

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

JESSENIOVA LEKÁRSKA FAKULTA V MARTINE

Ústav molekulovej biológie

Základy bunkovej a molekulovej biológie vybraných nádorových ochorení a súvisiacich laboratórnych metód

(VYSOKOŠKOLSKÉ SKRIPTÁ)

Mgr. Tatiana Burjanivová, PhD

ilustrácie: Ing. Andrea Juristová

Martin, 2018

Autor: Mgr. Tatiana Burjanivová, PhD.
Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova lekárska fakulta v Martine
Ústav molekulovej biológie
Malá hora 4C
036 01 Martin

Recenzenti: RNDr. Gabriel Minárik, PhD.
prof. MUDr. Martin Péč, PhD.

Obsah vzdelávacieho materiálu neprešiel špecializovanou terminologickou, jazykovou, gramatickou a štylistickou korektúrou. Za uvedený text zodpovedá autor.

Vydavateľ: Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine

ISBN: 978-80-8187-036-1

EAN: 9788081870361

Obsah

I. Základné údaje o štruktúre a funkcii DNA	5
DNA Replikácia	8
Chromatín.....	9
Tok genetickej informácie – Centrálna dogma	10
Transkripcia.....	11
Mikro RNA	14
Translácia	15
Epigenetika	16
Organizácia ľudského genómu.....	17
Bunkový cyklus	18
Apoptóza.....	20
Zápis génových a chromozómových zmien	22
II. Molekulová patológia vybraných nádorových ochorení.....	23
Úvod	23
Etiológia nádorových ochorení.....	25
Nádorová heterogenita	26
Gény asociované s onkogenézou.....	28
Využitie genomiky v onkológií	31
Cieľená liečba.....	31
Imunoterapia	33
Neinvazívna analýza nádorových markerov	35
Zhubné nádory pľúc.....	37
Kolorektálny karcinóm.....	38
Zhubné nádory prsníka.....	39
Karcinóm prostaty	41
Malígny melanóm.....	42
III. Metódy molekulovej genetiky	43
Izolácia nukleových kyselín.....	43
Stanovenie množstva, čistoty a kvality nukleových kyselín.....	44
PCR – polymerázová reťazová reakcia	44

Elektroforéza nukleových kyselín	45
Sekvenácia nukleových kyselín.....	46
Sekvenovanie novej generácie	48
Kvantitatívna PCR – real time PCR	50
DNA microarray (DNA čipy)	53
Použitá literatúra:	56
Zoznam použitých skratiek	62

Úvod

V liečbe pacientov onkologických ochorení nastal vďaka technologickým pokrokom v metódach molekulovej biológie obrovský posun. Predpokladá sa, že celogenómová sekvenácia nádorového tkaniva pomocou metód sekvenovania novej generácie (NGS) sa do roku 2020 stane súčasťou rutínnej diagnostiky u pacientov s onkologickými ochoreniami.

Podstatou nádorového ochorenia je nekontrolovateľné delenie malígne transformovaných buniek. K malígnej transformácii dochádza následkom nahromadenia mutácií, ktoré vedú k zabráneniu kontrolných mechanizmov a následne nekontrolovateľnej proliferácii buniek. Aj vďaka výskumu v oblasti molekulovej biológie nádorov sa podarilo vyvinúť nové liečebné postupy, tzv. cielenú protinádorovú liečbu. Príkladom lieku, ktorý bol vyvinutý na základe molekulových analýz nádoru je tyrozín-kinázový inhibítor imatinib (anti-EGFR) a monoklonálna protilátka trastuzumab (anti-HER2). Farmaceutické spoločnosti venujú čoraz väčšie úsilie vývoju nových liekov, ktoré by ovplyvnili signálne dráhy nádorových buniek a snažia sa identifikovať genetické zmeny zodpovedné za rast a šírenie jednotlivých zhubných nádorov a tak aj identifikovať, ktoré typy nádorov budú odpovedať na konkrétnu liečbu. Tento špecifický „personalizovaný“ prístup zlepšuje šance pacientov na odpoveď na liečbu a ich prognózu. Personalizovaná medicína je založená na princípe, že pacienti s tou istou klinickou diagnózou a genetickým „pozadím“ by mali možnosť dostať rovnakú odpoveď na liečbu, keďže pri vzniku nádorových ochorení dochádza k rôznym zmenám v genóme. Metódy molekulovej biológie a nimi verifikované riadiace mutácie sa začínajú využívať aj na nové tzv. molekulové klasifikácie nádorov.

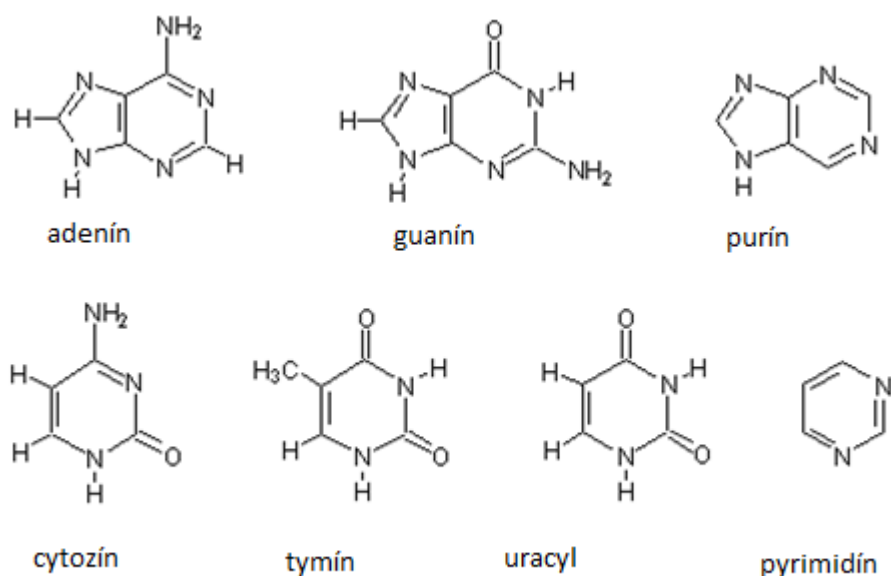
Nami predložený text je rozdelený do troch častí. V prvej sú opísané základy molekulovej biológie. Je určená hlavne pre tých, ktorí si potrebujú obnoviť aj zopakovať základné pojmy. V druhej časti je popísaná molekulová patológia vybraných nádorových ochorení a v tretej časti textu uvádzame prehľad metód používaných v laboratóriu molekulovej biológie využiteľných v klinickej praxi.

I. Základné údaje o štruktúre a funkcii DNA

Johann Gregor Mendel, považovaný za zakladateľa genetiky, opísal základy dedičnosti ešte pred objavením chemickej štruktúry DNA (deoxyribonukleová kyselina). DNA molekula sa nazýva aj molekulou dedičnosti. Každý žijúci organizmus na Zemi od najmenšej baktérie po veľrybu uchováva svoju genetickú informáciu v DNA. DNA molekula je obrovská. Keby sa vybrala DNA z jednej bunky, jej dĺžka by bola viac ako približne 182 centimetrov. DNA molekula je pomerne stabilná a odolná a preto sa zachovala po tisíce rokov napr. aj vo fosíliach mamuta. Štruktúra DNA bola popísaná v roku 1953 Jamesom Watsonom a Francisom Crickom. Chemická štruktúra DNA je pomerne jednoduchá. Je zložená z troch hlavných zložiek: dusíkatej bázy, deoxyribózy a fosfátu (PO_4^{3-}). Spojenie cukornej zložky a dusíkatej bázy voláme nukleozid. Po pripojení fosfátu vzniká nukleotid. Každá DNA molekula obsahuje tisíce kópií štyroch dusíkatých báz:

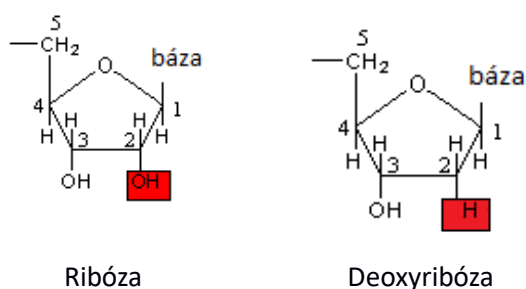
- adenín (A)
- guanín (G)
- cytozín (C)
- tymín (T)

RNA (ribonukleová kyselina) molekula obsahuje miesto tymínu dusíkatú bázu uracil (U). RNA slúži v bunke ako posol prenosu informácií z DNA uloženej v jadre do cytoplazmy.



Obr. 1 Dusíkaté bázy

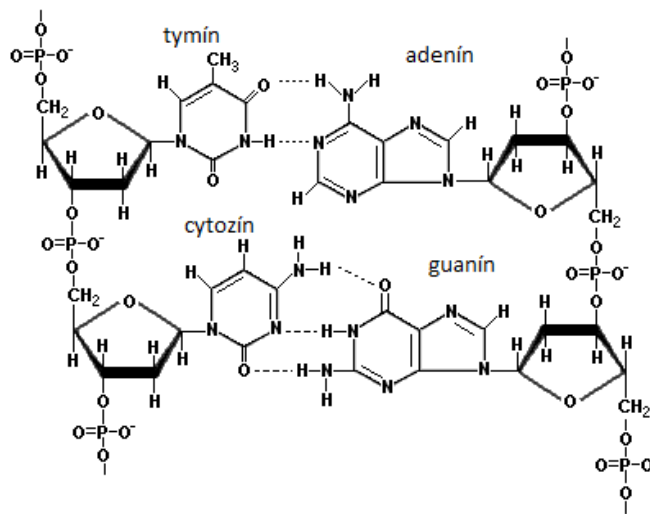
Adenín a guanín patria medzi purínové dusíkaté bázy. Názov purín sa používa v chémii na označenie dusíkatej heterocyklickej zlúčeniny tvorenej kondenzovaným pyrimidínovým a imidazolovým kruhom. Cytosín a tymín patria medzi pyrimidínové dusíkaté bázy. Pyrimidín je heterocyklická zlúčenina, v ktorej sú atómy dusíka v pozícií 1 a 3 v šesťčlennom kruhu. Keďže všetky štyri bázy majú prstencovitú štruktúru, tak to im dáva plochý tvar a umožňuje poskladať sa v reťazci DNA podobne, ako keď sa uložia na kopu mince do stĺpca. Na utvorenie nukleotidu je potrebné prichytenie pentózového cukru – deoxyribózy a zvyšku kyseliny fosforečnej k dusíkatej báze. Deoxyribóza je 5-uhlíkový cukor, odvodený od prekursora ribózy, vzniká nahradením druhej hydroxylovej skupiny (2'OH) atómom vodíka (2'H). V molekule RNA je namiesto deoxyribózy ribóza.



Obr. 2 Štruktúra ribózy a deoxyribózy

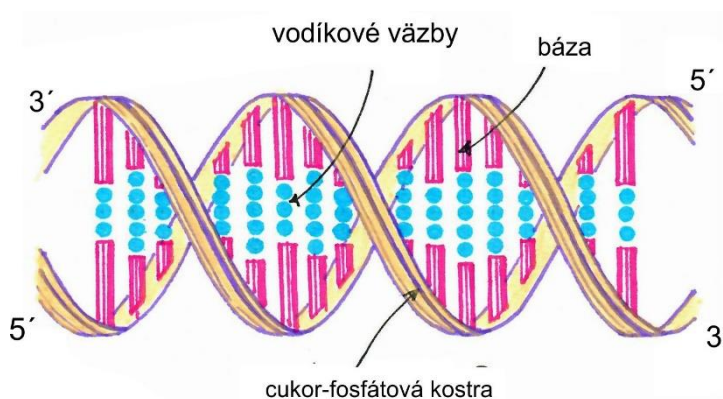
Nukleotidy sú základné stavebné prvky DNA. Jednotlivé nukleotidy sú pospájané fosfodiesterovou väzbou a vytvárajú polynukleotid. Väčšina molekúl DNA je tvorená dvoma komplementárnymi antiparalelnými vláknami DNA vytvárajúcimi dvojzávitnicu. Na jednom konci sa nachádza zvyšok kyseliny fosforečnej (5'- koniec) a na druhom konci je hydroxylová skupina pentózy (3'- koniec). Fosfátové skupiny udeľujú DNA molekule negatívny náboj. Dusíkaté bázy sa párujú medzi sebou pomocou vodíkových väzieb. Adenín sa v molekule DNA páruje s tymínom a v molekule RNA s uracilom, a to dvoma väzbami. Guanín sa páruje s cytozínom, a to tromi vodíkovými väzbami. Tento fenomén sa nazýva Watson-Crickove párovanie báz. Erwin Chargaff sa zaoberal sekundárnou

štruktúrou nukleových kyselín a formuloval tzv. Chargaffovo pravidlo, podľa ktorého je počet adenínov v DNA rovnaký ako počet tymínov a počet cytozínov je taký istý ako počet guanínov.



Obr. 3 Párovanie báz

Primárna štruktúra DNA je určená poradím nukleotidov. Poradie nukleotidov sa zapisuje v smere od 5' konca ku 3' koncu. Sekundárnu štruktúru DNA tvorí pravotočivá dvojzávitnica (helix) zložená z dvoch komplementárnych vlákien DNA. Reťazce DNA v dvojzávitnici sú antiparalelné. Jeden reťazec je orientovaný v smere 5'-3' a druhý reťazec je orientovaný v smere 3'-5'. Dvojzávitnica DNA pripomína svojou stavbou skrútený rebrík, kde jednotlivé schody rebríka predstavujú navzájom spojené bázové páry.



Obr. 4 DNA dvojzávitnica

Štruktúra dvojzávitnice a vodíkové väzby medzi jednotlivými bázami prispievajú k stabilite molekuly DNA a na povrchu molekuly DNA tvoria dva žliabky – veľký a malý. Najčastejším typom sekundárnej štruktúry DNA je B-DNA. B - forma je pravotočivá dvojzávitnica, ktorá má približne 10 báz na jeden závit.

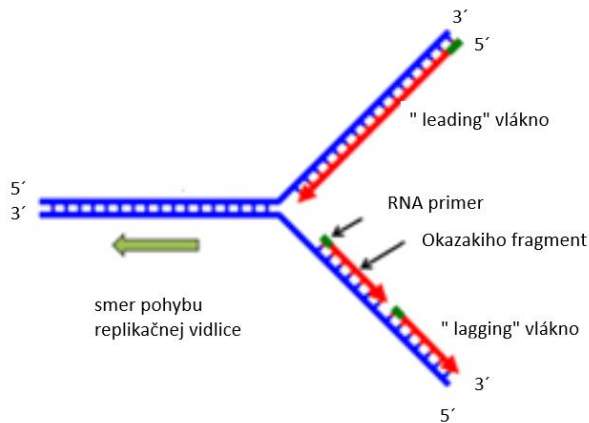
A-DNA je opäť pravotočivá dvojzávitnica, avšak tá má 11 komplementárnych párov báz na závit. Z-forma je ľavotočivá a má 12 párov báz na závit. DNA molekuly u prokaryotov ale aj mitochondrií sú cirkulárne.

DNA prvýkrát izoloval v roku 1868 švajčiarsky študent medicíny Johann Friedrich Miescher. Študoval hnis z obväzov chorých pacientov a zistil tu prítomnosť nebielkovinovej látky. Keďže sa táto látka vyskytovala v jadre buniek nazval ju nukleín. Tým pracovníkov vedený kanadským imunológom Oswaldom Averym zistil v roku 1944, že genetickým materiálom buniek, nesúcim dedičnú informáciu je DNA. Štruktúru dvojzávitnice DNA popísali v roku 1953 v časopise Nature James Watson a Francis Crick, ktorí boli ocenení v roku 1962 za svoj objav Nobelovou cenou. Títo vedci vychádzali vo svojej práci z röntgenových snímok anglickej biofyzičky Rosalind Franklinovej. Podľa názoru niektorých odborníkov mala Nobelovu cenu získať aj ona. Táto usilovná a v tej dobe nedocenená vedkyňa bohužiaľ umrela vo veku 37 rokov na ovariálny karcinóm. Na jej ochorenie sa mohla podpísať aj dlhodobá expozícia röntgenovému žiareniu, s ktorým pracovala v laboratóriu.

DNA Replikácia

Komplementarita A ku T a G ku C je základom pre DNA replikáciu. Pri DNA replikácii dôjde najskôr k rozpleteniu dvojvláknového reťazca DNA. Rozpletenie dvojzávitnice spôsobuje enzým helikáza. Každé vlákno slúži ako templát na syntézu nového reťazca. Celý proces replikácie označujeme ako semikonzervatívny, keďže každá novo syntetizovaná molekula DNA má jeden reťazec nový a druhý reťazec pochádza z pôvodnej DNA molekuly. Bázy sa v novo vzniknutom reťazci spájajú vodíkovými väzbami a medzi jednotlivými nukleotidmi sa utvárajú v rastúcom reťazci fosfodiesterové väzby prostredníctvom enzýmu DNA polymerázy. DNA replikácia prebieha v smere 5'–3' a k replikácii dochádza v mieste označovanom ako počiatok replikácie. Syntéza jedného reťazca DNA začína z konca reťazca krátkej RNA molekuly označovanej ako primer. Syntézu krátkeho RNA reťazca zabezpečuje enzým primáza. Tento reťazec označujeme ako vedúci (tzv. leading). Syntéza tohto reťazca prebieha klasicky. Druhý reťazec sa syntetizuje po malých úsekoch tzv. Okazakiho fragmentoch a označuje sa ako oneskorujúce (tzv. lagging) vlákno. Každý Okazakiho fragment sa skladá z RNA primeru a nasyntetizovaného DNA vlákna. Po nasyntetizovaní Okazakiho fragmentov sú RNA primery odstránené a krátke vlákna sú pospájané DNA ligázou do súvislého reťazca. Aby nedošlo znovu k spojeniu rozpletených vlákien DNA, vlákna pomáhajú držať oddelené SSB proteíny. Obidve vlákna DNA dvojzávitnice slúžia ako templát pre syntézu novosyntetizovaných reťazcov. Napriek komplexnosti celého procesu replikácie je tento proces rýchly. U človeka sa počas replikácie nasyntetizuje za minútu až 2000 báz. Nie je to teda prekvapujúce, že počas replikácie môže vzniknúť chyba. Približne každá báza zo 100 000 báz je zaradená v novosyntetizovanom reťazci zle. Našťastie DNA polymerázy majú korekčnú (tzv. proof-reading) aktivitu to znamená, že v smere 5'–3' sú schopné vyštípiť a opraviť zle priradené bázy. Ľudský genóm má dĺžku viac ako 3 miliardy básových párov. DNA nie je uložená do jednej molekuly ale do viacerých úsekov tvoriacich komplexy s proteínmi. Môžeme to porovnať k uloženiu dát v počítači na viacerých diskoch. Takisto informácie DNA sú uložené na viacerých jednotkách, ktoré nazývame chromozómy. Ľudská DNA je rozdelená do 23 párov chromozómov. Ak by replikácia prebiehala len na jednom mieste v DNA molekule, trval by tento proces príliš dlho. V skutočnosti tento proces trvá niekoľko hodín, lebo replikácia prebieha na viacerých miestach súčasne. Pri replikácii lineárnych chromozómov predstavujú výzvu konce chromozómov – teloméry. Pri replikácii po odstránení terminálneho RNA primeru z oneskorujúceho sa vlákna vzniká prečnievajúci jednovláknový koniec. To by mohlo viesť k skracovaniu chromozómu. Riešením voči skracovaniu chromozómov pri replikácii je existencia enzýmov – telomeráz. Tieto enzýmy sú RNA-dependentné DNA polymerázy, ktoré pridávajú podľa ich RNA-templátu DNA nukleotidy na prečnievajúce konce. U človeka má telomerická sekvencia poradie nukleotidov TTAGGG. Telomeráza je aktívna v embryonálnych bunkách. V diferencovaných somatických bunkách telomeráza aktívna nie je. Výsledkom je skracovanie koncov chromozómov po každom kole replikácie. To je jedným z faktorov, ktoré limitujú počet delení buniek, pred tým, ako bunka

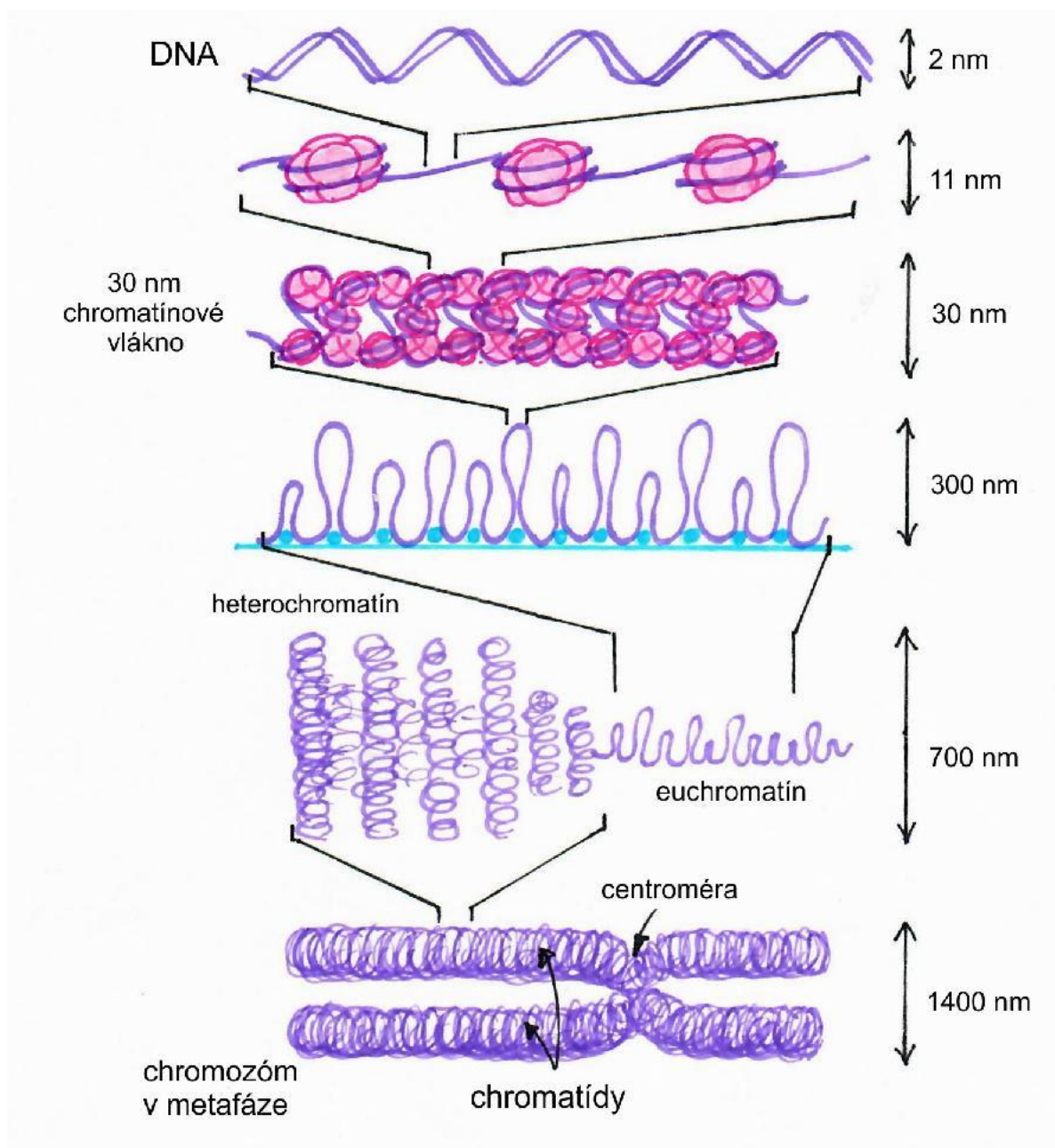
zahynie. Skracovanie telomér pri každom delení vedie k zastaveniu bunkového cyklu a indukuje bunkové starnutie - senescenciu.



Obr. 5 Replikácia DNA

Chromatín

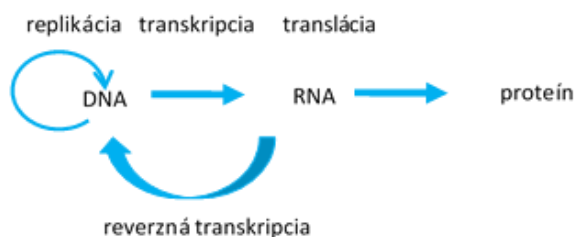
DNA vo vnútri každého jadra je vysoko kondenzovaná a musí sa dôkladne „zbaľiť“, aby sa zmestila do veľmi malého priestoru. K pochopeniu náročnosti, ako musí byť DNA v bunke zbalená, si možno predstaviť bunku ako guľovitý útvar, ktorý by mal priemer 1 meter. A teraz do tohto priestoru je potrebné umiestniť 46 dvojzávitníc DNA, ktoré majú síce hrúbku len 0,2 nm ale každá je dlhá v priemere 4,8 km. Molekuly nukleárnej DNA sú v komplexe s proteínmi a niekedy aj RNA molekulami. Tento komplex sa nazýva chromatín. Chromatín má niekoľko úrovní zloženia. Voľné vlákno DNA omotané na pozitívne nabité histónové proteíny utvára 10 nm nukleozómy. Táto štruktúra pripomína korálky navlečené na šnúrkę a nazýva sa preto aj „bead-on string“. Nukleozóm je základná štruktúrna jednotka chromatínu. Histónové jadro, okolo ktorého sa obtáča DNA, tvorí osem histónových proteínov, dva z každého druhu H2A, H2B, H3 a H4. Okolo neho je navinutý reťazec DNA dlhý 147 bázových párov. Histón H1 funguje ako svorka medzi jednotlivými nukleozómami. Histónové proteíny sú bázické proteíny s veľkým obsahom arginínu a lyzínu, majú kladný náboj a tým zaisťujú pevnú väzbu s negatívne nabitými fosfátovými skupinami molekuly DNA. Nukleozómové vlákno DNA sa ďalej stáča podobne ako telefónny kábel do 30 nm chromatínových vlákien, ktoré nazývame solenoidy. 30 nm vlákno sa skladá do slučiek, ktoré sú pripevnené ku kyslým nehistónovým proteínom, ktoré tvoria proteínové lešenie (tzv. protein scaffold). Ďalším skladaním týchto slučiek vzniká interfázny chromozóm. Jedna chromatída je približne 700 nm hrubá. Počas interfázy väčšinou chromatín existuje v nezbalenom rozvoľnenom stave. Takýto transkripčne aktívny chromatín, ktorý sa slabo farbí sa volá euchromatín. Niektoré časti interfáznych chromozómov sú silno kondenzované a farbja sa pri farbení jadrovými farbivami tmavšie, nazývajú sa heterochromatín. Predstavujú transkripčne neaktívne miesta. K maximálnemu skráteniu a kondenzácii chromozómov dochádza v metafáze.



Obr. 6 Kondenzácia chromatínu

Tok genetickej informácie – Centrálna dogma

Základná dogma molekulovej genetiky označovaná ako centrálna dogma hovorí o toku prenosu genetickej informácie z DNA do RNA a následne do proteínu. Dnes však už vieme, že tento pohľad je zjednodušený, keďže v genóme sa nachádzajú mnohé nekódujúce sekvencie ako repetitívna DNA alebo sekvencie kódujúce „malé“ RNA (small RNAs). Gén je sekvencia DNA nesúca informáciu pre syntézu polypeptidového reťazca na základe mediátorovej RNA (mRNA). Je to základná jednotka dedičnosti. Miesto uloženia génu na chromozóme sa nazýva **lokus**. Varianty génu na molekulovej úrovni odlišujúce sa v DNA sekvencii lokalizované na identickom lokuse sa nazývajú **alely**.

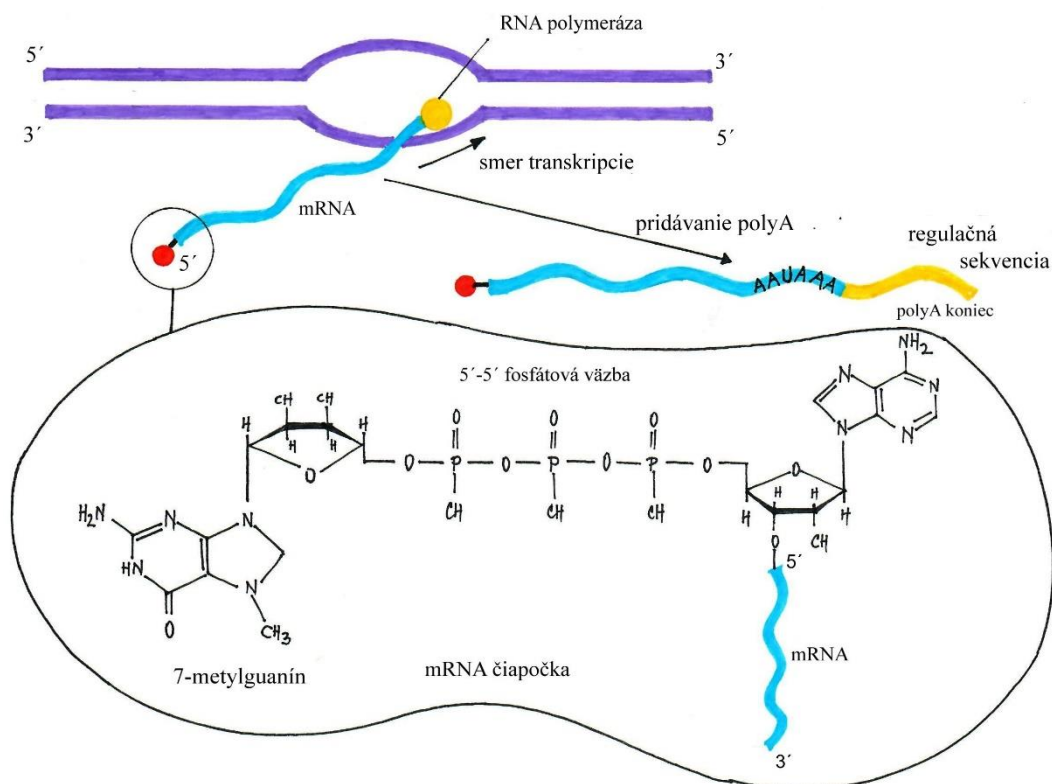


Obr. 7 Tok genetickej informácie

Transkripcia

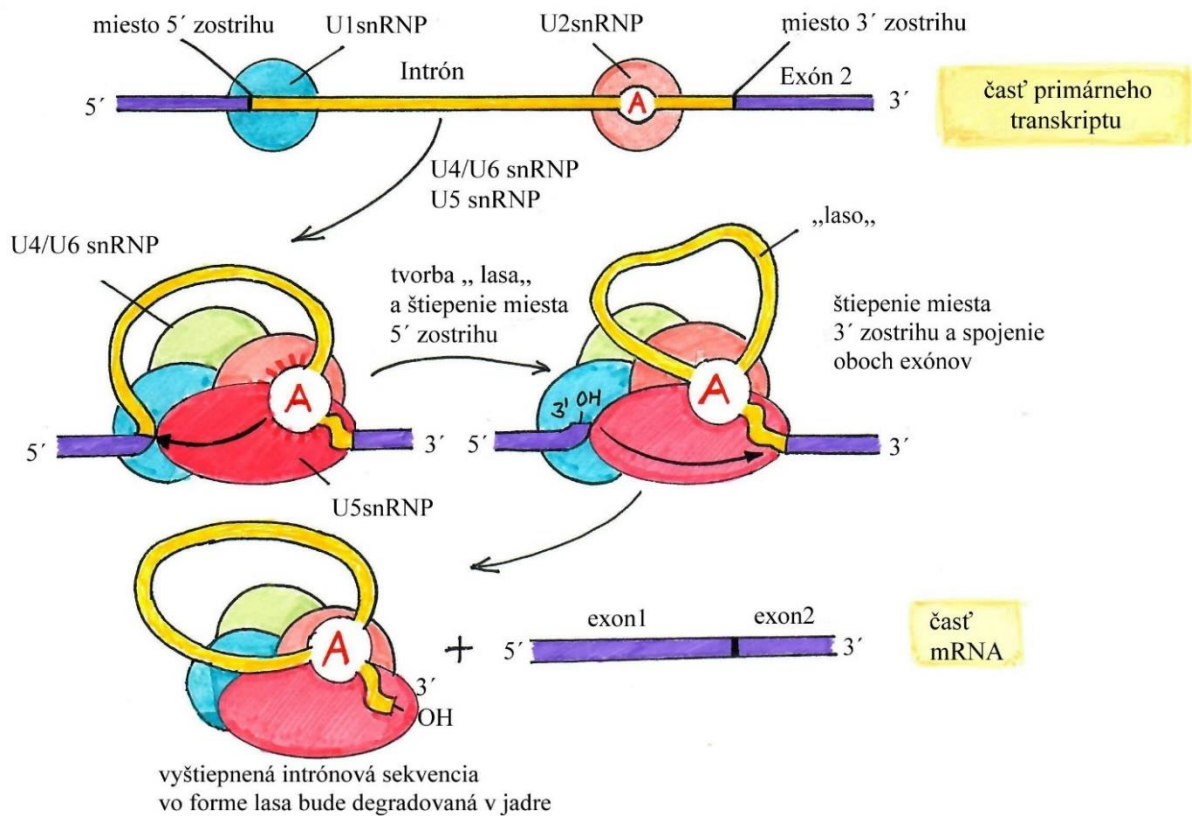
Proces prepisu genetickej informácie z DNA do **mediátorovej** (po anglicky messenger - **mRNA**) sa označuje ako transkripcia. Niektoré gény sa exprimujú vo všetkých bunkách a označujeme ich ako housekeeping gény. Sem patria gény zohrávajúce úlohu v replikácii DNA alebo v bunkovom metabolizme. Iné gény sú zase exprimované len v určitých vývojových štádiách alebo v odpovedi na bunkové signály. Génová expresia je regulovaná proteínmi, ktoré aktivujú alebo inhibujú transkripciu. Tieto DNA väzobné proteíny sa viažu na regulačné oblasti génu a môžu potláčať alebo aktivovať transkripciu väzbou na promótor, a to tzv. upstream (pred génom) alebo downstream (za génom). V oblasti ≤ 100 báзовých párov pred začiatkom transkripcie génu je umiestnený **promótor**. Väčšina promótorových sekvencií obsahuje oblasti bohaté na bázy A a T, ktoré sa nazývajú **TATA box**. Regulačné sekvencie sa môžu nachádzať v blízkosti promótoru, alebo môžu byť na pomerne vzdialených miestach. Tieto vzdialené regulačné sekvencie sú známe ako **enhancery**.

Aktivátory alebo represory génovej expresie sú proteíny, ktoré sú regulované väzbou k špecifickým ligandom. V bunke sa vyskytuje aj množstvo korepresorových a koaktivátorových proteínov. Transkripcia začína väzbou RNA polymerázy na oblasť promótoru. U človeka sú detekované tri základné typy polymeráz, a to RNA polymeráza I, II a III. Typ I prepisuje **ribozomálnu RNA (rRNA)**, typ III prepisuje **transferovú RNA (tRNA)** a typ II zohráva úlohu v transkripcii štruktúrnych génov a génov niektorých malých RNA. RNA polymeráza II prepisuje gény kódujúce proteíny a gény kódujúce niektoré RNA. Syntéza RNA reťazca komplementárneho k molekule DNA prebieha v smere 5'-3'. Výsledná mRNA molekula je presnou kópiou DNA molekuly (len namiesto tymínu sú v molekule RNA bázy uracily). Krátko po iniciácii transkripcie je 5'koniec RNA modifikovaný 7-metylguanozínom, ktorý formuje čiapku (tzv. cap). Úlohou čiapočky je chrániť 5'koniec mRNA pred štiepením exonukleázami. Na 3' konci sa odštiepi časť sekvencie RNA a enzymaticky sa pridá 100-200 adenínových zbytkov. Vzniká poly-A koniec, stabilizujúci molekulu mRNA umožňujúcu jej transport do cytoplazmy.



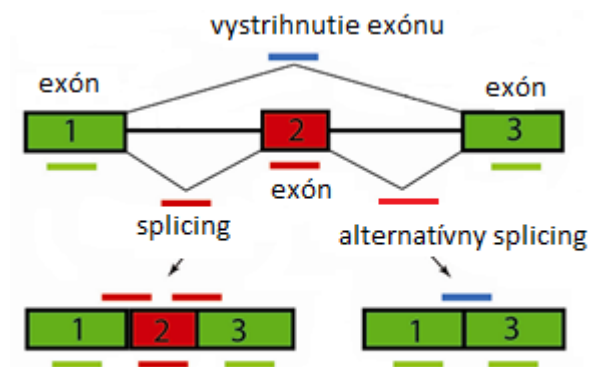
Obr. 8 Transkripcia (Upravené podľa Korf B.R., Irons M.B. Human Genetics and Genomics. 2013, Wiley-Blackwell, Sussex).

Transkripčná jednotka génov obsahuje sekvencie, ktoré nie sú prepisované do proteínu, tie nazývame intróny. Kódujúce sekvencie sa nazývajú **exóny**. Dĺžka niektorých exónov môže byť menej ako 100 bp, zatiaľ čo intróny sú dlhé aj niekoľko tisíc básových párov. Pri posttranskripčnej úprave primárneho transkriptu (RNA -vlákna) dochádza v priebehu procesu nazývaného zostrih (v angličtine **splicing**) k vystrihnutiu intrónov a pospájaniu pôvodne oddelených exónov. Na 5'konci intrónu sa nachádza dinukleotid GU označovaný ako donorové miesto zostrihu a na 3'konci intrónu sa nachádza dinukleotid AG označovaný aj ako akceptorové miesto zostrihu. Pred akceptorovým miestom zostrihu sa nachádza v intróne aj miesto vetvenia zostrihu, označované v angličtine ako **branching point**. Zostrih mRNA zabezpečuje komplex zložený z proteínov (U1, U2, U4, U5 a U6) a malých jadrových RNA (snRNA). Tieto ribonukleoproteínové častice snRNP sa v angličtine nazývajú small nuclear ribonucleoprotein particles. Ku splicingu dochádza po väzbe ribonukleoproteínového komplexu k donorovému miestu zostrihu, miestu vetvenia zostrihu a ku akceptorovému miestu zostrihu. Najskôr sa k donorovému miestu zostrihu viaže U1 snRNP, po väzbe U2 snRNP ku miestu vetvenia zostrihu sa následne naviaže komplex U4/U6 snRNP a U5 snRNP a spojí donorové miesto s miestom vetvenia zostrihu. Výsledkom je vznik voľného 3'konca exónu v oblasti pred donorovým miestom zostrihu, tvorba lasovitej štruktúry z intrónu a rozštiepenie RNA v akceptorovom mieste zostrihu. Po odstránení intrónu v cyklickej lasovitej štruktúre dochádza k jeho odbúraniu a spojeniu exónov do finálnej kódujúcej sekvencie novo sa syntetizovanej RNA.



Obr. 9 Splicing intrónov (Upravené podľa Alberts B., Bray D., Johnson A. a kol. Základy buněčné biologie. 2003, Espero)

Medzi posttranskripčné úpravy ovplyvňujúce génovú expresiu patrí aj **alternatívny zostrih** a editácia RNA. Alternatívny zostrih umožňuje kódovanie viacerých proteínov jedným génom. Na tvorbu mRNA sú využité rôzne exóny.

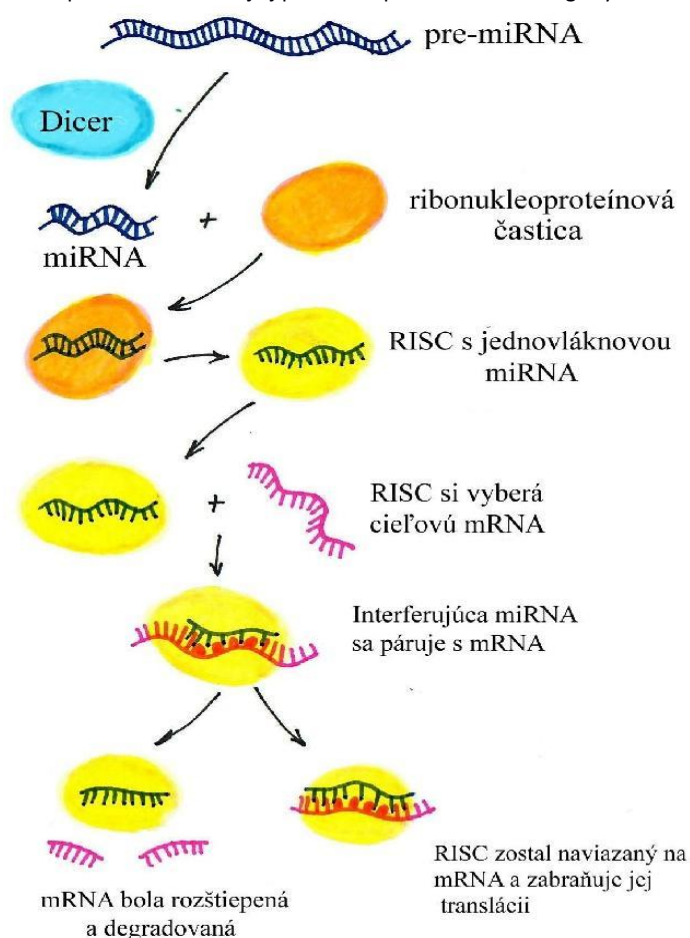


Obr. 10 Vystrihnutie exónov. V druhom proteíne bol pri alternatívnom splicingu vynechaný exón 2, čo má za následok vznik odlišného proteínu.

Mikro RNA

Na posttranskripčnej kontrole sa podieľajú aj RNA molekuly. V ľudskom genóme sa nachádza niekoľko stoviek génov, kódujúcich mikro RNA (miRNA) molekuly. Okrem miRNA, tRNA a rRNA patria medzi nekódujúce RNA aj malá interferujúca RNA (siRNA - small interfering RNA), jadrová RNA (snRNA - small nuclear RNA) a malá jadrová RNA (snoRNA - small nucleolar RNA). Gény kódujúce miRNA sú transkribované RNA polymerázou II. Prekursorová miRNA je modifikovaná na 5'konci čiapočkou a na 3'konci pridaním poly-A konca. Molekuly miRNA majú schopnosť tvoriť dvojvláknové vlásenky. Tieto vlásenky štiepi v jadre enzým Drosha na kratšie fragmenty. Tieto fragmenty sú transportované do cytoplazmy, kde ich ďalej štiepi enzým Dicer. Vznikajú krátke dvojreťazcové RNA označované ako siRNA (small interfering RNA). Molekuly siRNA sa viažu s proteínovým komplexom RISC (z anglického RNA-induced silencing complex). Tento nukleázový komplex sa po spojení s siRNA aktivuje a degraduje komplementárnu mRNA alebo inhibuje transláciu komplementárnej prípadne čiastočne komplementárnej mRNA. RNA interferencia neslúži len na reguláciu génovej expresie, ale má významnú úlohu aj v imunitnej obrane organizmu voči vírusom. Útlm génovej expresie pomocou krátkych fragmentov RNA označujeme ako **RNA interferencia**.

Za objav RNA interferencie dostali Andrew Fire a Craig Mello v roku 2006 Nobelovu cenu. Títo vedci robili experimenty s *Caenorhabditis elegans* – malými hlístovcom dlhým 1 mm. Počas ich experimentov pozorovali, že tieto hlístovce mali zvláštne trhavé pohyby. Takto postihnuté hlístovce majú takéto pohyby pri postihnutí génu kódujúceho bielkovinu dôležitú pre správne fungovanie svalov. Títo dvaja vedci pozorovali trhavé pohyby u týchto malých červíkov napriek tomu, že zodpovedajúci gén bol v poriadku. Vedci však gén pre tvorbu svalovej bielkoviny nechťiac umlčali vpichnutím krátkej dvojvláknovej RNA. RNA interferencia by mohla predstavovať nádej aj pre liečbu pacientov s onkologickými ochoreniami.



Obr.11 Mikro RNA

Translácia

Posttranskripčne upravená (maturovaná) mRNA je exportovaná z jadra do cytoplazmy. Počas translácie sa informácia zo sekvencie mRNA prepisuje do sekvencie aminokyselín rastúceho proteínového reťazca. Translácia prebieha na komplexoch zložených z ribozomálnej RNA (rRNA) a proteínov – ribozómov. Ribozómy eukaryotických organizmov, medzi ktoré patrí aj človek, sú zložené z dvoch podjednotiek, veľkej - 60S a malej - 40S podjednotky (S označuje Svedbergovu jednotku používanú na vyjadrenie sedimentačného koeficientu makromolekúl pri stanovení veľkosti molekúl ultracentrifugáciou). Ribozómy sa v bunke vyskytujú voľne v cytoplazme, alebo na povrchu endoplazmatického retikula. Takéto endoplazmatické retikulum označujeme ako drsné. Transport voľných aminokyselín v bunke pri translácii zabezpečujú molekuly transferovej RNA - tRNA. Molekuly tRNA majú vo svojej sekvencii trojicu za sebou idúcich báz - triplet, ktoré označujeme ako antikodón. Transferová RNA má tvar pripomínajúci ďatelinový trojlístok. Správne zaradenie aminokyselín do rastúceho polypeptidového reťazca zabezpečuje párovanie medzi antikodónom a kodónom - špecifickou trojicou báz na mRNA. Keďže genetický kód je tripletový, je možné utvoriť 64 kombinácií nukleotidových trojíc. Genetický kód je degenerovaný, to znamená, že niektoré aminokyseliny sú kódované viacerými tripletmi. Ďalšou vlastnosťou genetického kódu je univerzálnosť. To znamená, že jednotlivé kodóny kódujú rovnaké aminokyseliny u takmer všetkých organizmov. Poradie nukleotidov v kodóne určuje, aká aminokyselina sa bude nachádzať v príslušnom mieste proteínu. Po väzbe tRNA s ďalšou aminokyselinou na susedný kodón dochádza medzi aminokyselinami k vzniku peptidovej väzby. Čítanie mRNA počas translácie začína od 5'konca. tRNA nesúca metionín po väzbe na malú podjednotku ribozómu sa pomaly pohybuje od 5'konca po molekule mRNA až kým nenarazí na iniciačný kodón AUG. Iniciačná tRNA sa viaže do P miesta na ribozóme. Predlžovanie reťazca sa začína po naviazaní druhej tRNA s aminokyselinou do A miesta. Následne dochádza k tvorbe peptidovej väzby medzi metionínom a prichádzajúcou aminokyselinou a posunu ribozómu o tri nukleotidy pozdĺž mRNA. tRNA bez naviazanej aminokyseliny sa z E miesta uvoľní a tRNA sa presunie z A miesta do P miesta. Počas elongácie translácie sa neustále opakujú tri kroky: naviazanie tRNA s aminokyselinou do A miesta, vznik peptidovej väzby a nakoniec posun ribozómu o tri nukleotidy, tRNA bez aminokyseliny sa uvoľní do E miesta a tRNA z A miesta sa posunie do P-miesta. Syntéza proteínového reťazca prebieha od N-konca k C koncu. Proteosyntéza je ukončená, keď ribozóm narazí na stop kodón (UAA, UGA alebo UAG). Do A miesta sa naviaže uvoľňovací faktor, a C-koniec polypeptidového reťazca sa z tRNA v P mieste uvoľní. Posttranslačné modifikácie, ako je napríklad glykozylácia, začínajú prebiehať už počas translácie a pokračujú po jej dokončení.

		DRUHÉ PÍSMENO									
		T		C		A		G			
P R V É P Í S M E N O	T	TTT	Phe	TCT	Ser	TAT	Tyr	TGT	Cys	T	T R E E
		TTC		TCC		TAC		TGC		C	
		TTA	Leu	TCA		TAA	Stop	TGA	Stop	A	
		TTG		TCG		TAG	Stop	TGG	Trp	G	
	C	CTT	Leu	CCT	Pro	CAT	His	CGT	Arg	T	T I E
		CTC		CCC		CAC		CGC		C	
		CTA		CCA		CAA	Gis	CGA		A	
		CTG		CCG		CAG		CGG		G	
	A	ATT	Ile	ACT	Thr	AAT	Asn	AGT	Ser	T	P Í S M E N O
		ATC		ACC		AAC		AGC		C	
		ATA	Met	ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A	
		ATG		ACG		AAG		AGG		G	
	G	GTT	Val	GCT	Ala	GAT	Asp	GGT	Gly	T	E N O
		GTC		GCC		GAC		GGC		C	
		GTA		GCA		GAA	Glu	GGA		A	
		GTG		GCG		GAG		GGG		G	

Obr.12 Genetický kód

Epigenetika

Epigenetické faktory ovplyvňujú expresiu génov bez zmeny v sekvencii nukleotidov. Za určitých okolností sú niektoré gény inaktivované stále. Táto inaktivácia génov je výsledkom chemických modifikácií, ktoré stabilizujú kondenzovanú konformáciu chromatinu a udržujú gény v inaktívnom stave. Jedným z epigenetických mechanizmov je **DNA metylácia**. Epigenetika sa uplatňuje pri inaktivácii chromozómu X a génovom imprintingu. Epigenetické zmeny majú úlohu aj pri vzniku nádorových ochorení. Pri DNA metylácii dochádza k pridaniu metylovej skupiny na cytozín v miestach označených ako CpG ostrovčeky pomocou enzýmu DNA metyltransferázy. CpG dinukleotidy sú často asociované s promótorovými oblasťami génov. **Metylácia v promótorových oblastiach génov spôsobuje inaktiváciu - umlčanie génovej expresie**. Pri DNA metylácii dochádza k pripojeniu metylovej skupiny na 5' uhlíku vo vnútri palindromického dinukleotidu 5'-CpG- 3' sekvencie. Na metylované miesta sa viažu proteínové komplexy, ktoré odstraňujú acetylovú skupinu z histónov. Jednotlivé gény môžu byť reverzibilne aktivované alebo reprimované (ich expresia je inhibovaná). Keď u človeka dochádza k dedičnosti metylácie, nazývame tento jav génový imprinting. Pri dedičnej metylácii sa metyluje nemetylované dcérske vlákno v hemimetylovanej DNA. Po oplodnení sa metylačný vzor vymaže a následne je obnovený po implantácii embrya v maternici. Jedným z javov, kedy má význam metylácia cytozínu, je inaktivácia X chromozómu. Je dôležitá kvôli génovej kompenzácii dávky X-viazaných génov. Inaktivácia jedného z dvoch X chromozómov zabezpečuje, aby mali jedinci XX a XY približne rovnaké množstvo génových produktov odvodených od chromozómu X. K inaktivácii X chromozómu dochádza v skorých štádiách vývoja embrya, keď má embryo 100-200 buniek. Táto inaktivácia je trvalá a náhodná. Inaktivovaný X chromozóm obsahuje kondenzovaný chromatin a možno ho pozorovať počas bunkového cyklu farbením v interfáze ako tzv. Barrovo teliesko, ktoré je v mikroskope viditeľné ako hrudkovité teliesko. Iniciácia inaktivácie X chromozómu je kontrolovaná z regulačnej oblasti označovanej ako X-inaktivačné centrum. V tejto oblasti sa nachádza gén *Xist*, ktorý je exprimovaný na jednom z dvoch X chromozómov. Gén *Xist* kóduje RNA dlhú 25 kb, ktorá nie je translatovaná do proteínu, ale viaže sa na miesta pozdĺž X chromozómu. Následne dochádza k metylácii CpG ostrovčekov a deacetylácii histónov. Náhodná inaktivácia X chromozómu má napr. za následok čierno a oranžovo zafarbené oblasti srsti u trojfarebne zafarbených mačiek. Za normálnych okolností máme z každého génu dve kópie, jednu maternálnu a jednu paternálnu. Genomický imprinting je proces, pri ktorom dochádza k umlčaniu expresie konkrétnej rodičovskej alely v somatických bunkách potomstva podľa pohlavia. Dedičnosť „imprintu“ (metylačného otlaku o informácii, ktorý gén sa bude exprimovať, alebo bude jeho transkripcia inaktívna) je ovplyvnená pohlavnou špecifitou. To znamená, že je exprimovaná len materská alebo otcovská alela. K vytvoreniu imprintu dochádza v priebehu meiotického delenia alebo tvorby gamét. Genomický imprinting sa v potomstve u oboch pohlaví realizuje rovnako. To znamená, že ak máme gén, ktorý je utlmený na maternálnych chromozómoch, tak v potomstve u všetkých dcér a synov bude tento gén utlmený na maternálnych chromozómoch a aktívny na paternálnych chromozómoch. V zygóte dochádza k novému vzťahom medzi paternálnymi a maternálnymi chromozómami a metylačný „imprint“ - otlak je v germinálnych bunkách vymazaný. Metylácia cytozínu na 5-metylcytozín neovplyvňuje replikáciu DNA, ale len expresiu génu. Genomický imprinting môže mať na človeka aj negatívne účinky, napr. uplatňuje sa pri vzniku Angelmanovho a Prader-Williho syndrómu. Gény zodpovedné za vznik týchto syndrómov, sú lokalizované na dlhom ramienku chromozómu 15 v oblasti 15q11-q13. Okrem mikrodélcie a uniparentálnej dizómie spôsobujú tieto ochorenia aj defekty v imprintingu. U pacientov s Angelmanovým syndrómom sa v približne 70% vyskytuje delécia maternálneho úseku 15q11-q13. Otcovský gén, ktorý je imprintovaný a metylovaný sa nemôže exprimovať a funkčne prejavíť. Príznakmi Angelmanového syndrómu sú mentálna retardácia, nemotorná chôdza, puchy spánku. Anglický názov tohoto syndrómu znel „happy puppet“ (šťastná bábka). V prípade pacientov s Prader-Williho syndrómom ide o podobnú situáciu, avšak imprintované alely sú maternálne. Príznaky tohoto ochorenia sú mentálna retardácia, nízky svalový tonus, poruchy správania a učenia, obezita a hypogonádizmus.

Organizácia ľudského genómu

Ľudský genóm je zložený z DNA pozostávajúcej z $3,2 \times 10^9$ báзовých párov. Prekvapujúce je, že len 1,2% našej DNA kóduje proteíny. Aj keď zvyšok DNA nekóduje žiadne proteíny, tak aj táto proteínová nekódujúca DNA je v bunke dôležitá. Tvoria ju aj regulačné sekvencie, ako sú promótory a enhancery, ako aj sekvencie kódujúce regulačné elementy pracujúce na úrovni RNA. Niektoré z týchto RNA génov, ako napríklad gény kódujúce ribozomálnu RNA (rRNA) a transferovú RNA (tRNA), boli známe desiatky rokov. Okrem týchto génov majú v bunke obrovský význam aj gény kódujúce RNA, lebo mnohé z týchto RNA molekúl majú v bunkách regulačnú funkciu. Ľudský genóm obsahuje aj veľa repetitívnych sekvencií a niektoré z nich sú dôležité v centroméroch a teloméroch.

Komplexný pohľad na náš genóm umožnil Projekt ľudského genómu (Human Genome Project). Cieľom tohto projektu bolo určiť úplnú nukleotidovú sekvenciu ľudskej DNA a lokalizovať a identifikovať jednotlivé gény. Pred objavením technológie sekvenovania bolo určenie lokalizácie jednotlivých génov pomerne náročné. Sekvenovanie ľudského genómu prebiehalo na automatických sekvenátoroch a výsledky boli následne analyzované pomocou počítačových programov, ktoré vyhľadávali a identifikovali jednotlivé gény. Podrobnejšie bude technológia sekvenovania popísaná v ďalších kapitolách. V čase začatia prác na projekte ľudského genómu prečítal jeden automatický sekvenátor 1500 sekvencií s priemernou dĺžkou 1000 báзовých párov za 24 hodín. Na tomto projekte pracovalo spolu veľa laboratórií, sekvenátory bežali 24 hodín denne a napriek tomu trval celý projekt 15 rokov.

Ľudský genóm je tvorený genetickou informáciou zakódovanou v 25 odlišných DNA molekulách. V bunkovom jadre sa nachádza 23 lineárnych molekúl ak sa jedná o ženské pohlavie a 24 lineárnych molekúl v prípade mužského pohlavia. Chromozómy X a Y sa nazývajú gonozómy a určujú pohlavie. Ostatných 22 chromozómov voláme autozómy. V somatických bunkách človeka sú chromozómy usporiadané do párov. Bunky s dvoma sadami chromozómov sú diploidné. Jeden chromozóm je od otca a druhý od matky. Ak ide o jedince ženského pohlavia, tak v jadre somatických buniek sa nachádza spolu s autozómami aj pár dvoch chromozómov X. V prípade mužského pohlavia je okrem 22 párov homologických chromozómov prítomný jeden chromozóm X a jeden chromozóm Y.

Kódujúce oblasti sú bohaté na bázy cytozín a guanín, v repetitívnych nekódujúcich oblastiach sa vyskytuje prevažne adenín a tymín. Okrem génov sa v ľudskom genóme vyskytujú aj pseudogény. Pseudogény sú inaktívne verzie génov, ktoré stratili funkciu v dôsledku duplikácie a následnej mutácie v priebehu evolúcie. Sekvencia pseudogénu je síce podobná génu, avšak nekóduje funkčný produkt. Procesované pseudogény vznikajú reverznou transkripciou mRNA, a následne integráciou ssDNA kópie naspäť do genómu. Minimálne 50% ľudského genómu predstavujú repetitívne sekvencie. Repetitívne sekvencie rozdeľujeme do viacerých podskupín. **Krátke tandemové repetície** (z angl. short tandem repeats – STR) sú tvorené opakovaniami zloženými z dvoch, troch alebo štyroch nukleotidov, ktoré sa opakujú. Príkladom takejto repetície môže byť sekvencia GTGACACACACACACATGC, v ktorej sa dinukleotid CA opakuje sedemkrát. Krátke tandemové repetície sa označujú aj ako **mikrosatelity**. V genóme sú pomerne časté a majú využitie aj ako genetické markery. Ďalším typom repetitívnych sekvencií sú **minisatelity**. Tu je dĺžka sekvencie, ktorá sa opakuje desiatky až stovky krát v rozsahu 14-100 báзовých párov. Tieto repetície sa vyskytujú v centromerických a subtelomerických oblastiach chromozómov. Tieto úseky nazývame aj VNTR (z angl. variable number of tandem repeats) - variabilný počet tandemových opakovaní. Ďalším typom repetícií sú **LCR repetície** tvoriace 5% genómu. LCR repetície (z angl. low-copy repeats) sú repetície s nízkym počtom opakovaní, nazývané aj segmentové duplikácie. Tie sú definované ako súbor sekvencií dlhých minimálne 1 kilobázu so sekvenačnou homológiou viac ako 95%. Niektoré segmenty môžu mať dĺžku stovky až tisíce báзовých párov. Na **segmentové duplikácie** sú bohaté oblasti nachádzajúce sa v blízkosti telomér a centromér. Na tieto repetície je bohatý aj chromozóm Y, kde tvoria tieto oblasti viac ako 25%. Ďalšou skupinou repetitívnych sekvencií sú rozptýlené repetície. Tieto opakovania sa vyskytujú v rôznych častiach genómu v rámci jedného alebo viacerých chromozómov. **Rozptýlené repetície** označujeme aj ako mobilné genetické elementy alebo transpozómy z anglického transposable elements, lebo sú schopné premiestňovať sa v genóme z miesta na miesto. Rozptýlené repetície rozdeľujeme na štyri podskupiny: LINE, SINE, LTR a DNA transpozóny.

LINE (z angl. long interspersed nuclear elements, t.j. dlhé rozptýlené jadrové elementy) sú úseky DNA dlhé 6 – 8 kilobáz (kb). Obsahujú väzobné miesto pre RNA polymerázu II a kódujú dva proteíny. Jedným z proteínov je reverzná transkriptáza, ktorá prepisuje RNA do DNA. LINE sekvencia je transkribovaná do RNA, ktorá sa po prepise premiestni do cytoplazmy a tu dochádza k translácii tejto RNA sekvencie. Proteíny vzniknuté po translácii sa naviažu na RNA, s ktorou sa premiestnia naspäť do jadra. Túto RNA potom reverzná transkriptáza prepíše do DNA. Prepísaná DNA sa môže včleniť do genómu. Táto technika šírenia transpozónov sa nazýva aj „copy and paste“. LINE sekvencie sa nachádzajú v oblastiach euchromatínu bohatých na bázy adenín a tymín. V ľudskom genóme sa nachádza približne 850 000 LINE sekvencií a tvoria 21% genómu.

SINE (z angl. short interspersed nuclear elements) sú úseky DNA dlhé 100-400 bp. Na kopírovanie používajú SINE elementy reverznú transkriptázu LINE elementov. Ľudský genóm obsahuje 1,5 milióna SINE sekvencií. Hlavnou rodinou SINE sú Alu elementy (ich názov je odvodený od toho, že obsahujú restričné miesta pre štiepenie restričnou endonukleázou AluI). Súčasťou SINE je promótor RNA polymerázy III odvodený vo väčšine prípadov z tRNA génov.

LTR sa nazývajú aj LTR retrotranspozóny. Predstavujú neaktívnu DNA retrovírusov a svojím zložením pripomínajú retrovírusy. Tieto elementy obsahujú LTR (z angl. long terminal repeats, t.j. dlhé terminálne repetície) a gény *gag* a *pol* charakteristické pre retrovírusy. Gén *pol* kóduje reverznú transkriptázu. LTR sekvencie tvoria 8% ľudského genómu.

Poslednou skupinou rozptýlených repetícií sú **DNA transpozóny**. DNA transpozóny fungujú podobne ako bakteriálne transpozóny. V DNA transpozóne sa nachádza aj sekvencia kódujúca enzým transponázu, ktorá je schopná sa viazať k obidvom koncom DNA transpozónu tvorenými obrátenými repetíciami. Obrátené repetície sú schopné tvoriť vlásenkovú štruktúru. Enzým transponáza vyštípe transpozón z genómu a potom ho vloží do iného miesta v genóme. Takýmto spôsobom ostáva počet DNA transpozónov stabilný. Mechanizmus pohybu DNA transpozónu vyňat - vložiť sa v angličtine nazýva „cut and paste“. V ľudskom genóme sa ich vyskytuje približne 300 000. Transpozóny nie sú len parazitické sekvencie v genóme, ale sú aj zdrojom genetickej rozmanitosti, majú dôležitú rolu v evolúcii pri vzniku nových génov. Niektoré transpozóny obsahujúce promótory môžu zmeniť úroveň expresie susedného génu, do ktorého blízkosti sa dostanú. Okrem jadrového genómu sa v bunkách nachádza aj mitochondriálny genóm. Mitochondriálny genóm má dĺžku 16 569 básových párov a je tvorený dvojvláknovou kruhovou molekulou DNA. Kóduje 37 génov. Trinásť génov kóduje bielkoviny, 22 génov kóduje tRNA a 2 gény kódujú rRNA. Proteíny kódované mitochondriálnym genómom sa podieľajú na oxidatívnej fosforylácii. Mitochondrie majú vlastný replikačný, transkripčný a translačný aparát. Mitochondriálny genóm sa dedí maternálne výhradne z matky na potomstvo.

Bunkový cyklus

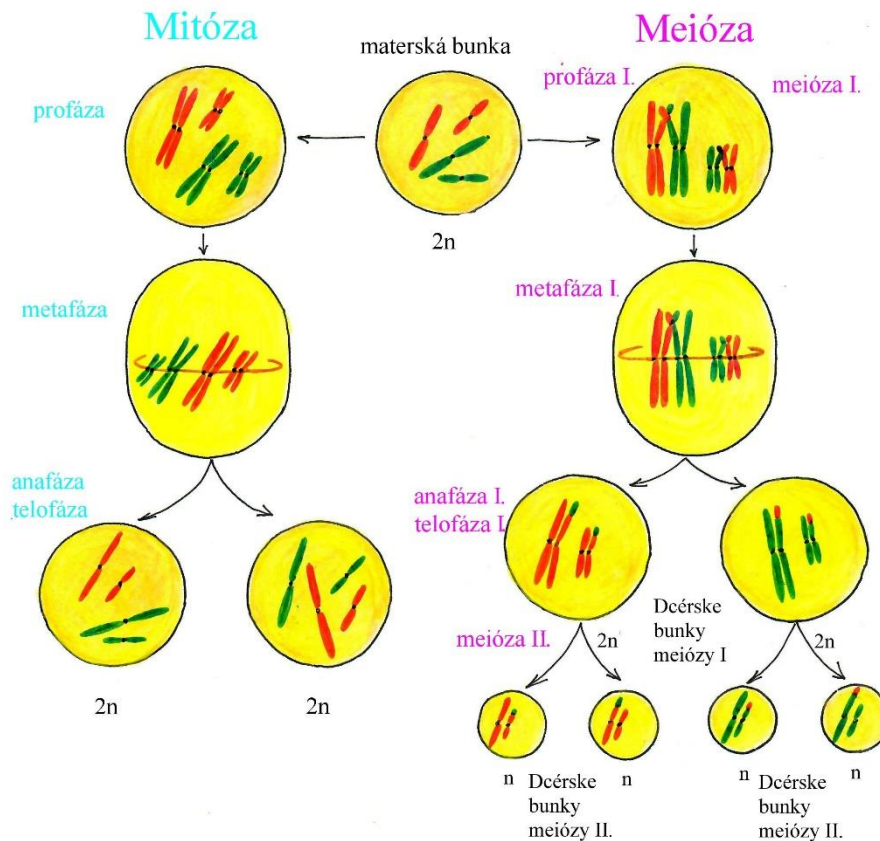
Bunkový cyklus je sled dejov, ktorými vznikajú z jednej bunky bunky dve. Môže byť morfológicky rozdelený do prípravnej fázy (interfázy) a bunkového delenia (mitózy). Interfáza pozostáva z G1, S a G2 fázy a mitóza sa skladá z profázy, metafázy, anafázy a telofázy. Bunkový cyklus a prechod medzi jednotlivými fázami je prísne regulovaný. G1 fáza je najdlhšou fázou bunkového cyklu. Prebieha tu syntéza všetkých typov RNA v jadre, v cytoplazme prebieha proteosyntéza a bunka rastie. G je z anglického výrazu gap, t.j. medzera. V G1 fáze v bunke dochádza aj k opravám DNA molekúl poškodených mutáciami. Reparačné mechanizmy majú obrovský význam, aby zaistili prenos nepoškodennej genetickej informácie do dcérskych buniek. V tejto fáze sa nachádza aj reštrikčný bod G0. G0 fázu označujeme aj ako kľudové štádium bunkového cyklu. V tomto štádiu bunkového cyklu bunka plní svoje základné funkcie a udržiava bazálny metabolizmus. G0 fáza môže byť rôzne dlhá, pričom niektoré bunky ostanú v G0 fáze až do konca ich bunkového života. V S fáze označovanej syntetickou fázou sa replikuje DNA a v cytoplazme sa syntetizujú históny. Obsah DNA sa replikáciou zdvojnásobí. V G2 fáze sa syntetizujú proteíny potrebné pre nasledujúcu mitózu. Bunka ďalej rastie a prebieha proteosyntéza. Vo zvýšenej miere sa syntetizuje tubulín a ďalšie proteíny potrebné pre tvorbu mitotického aparátu. V G2 fáze prebieha aj kontrola ukončenia DNA replikácie pred vstupom do mitotickej fázy. V mitóze dochádza k rozdeleniu jadra a rozdeleniu bunky (cytokinéze). V **profáze**

zaniká jadrový obal a jadierka, tenké nitkovité chromozómy sa postupne skracujú a hrubnú a z centrozómov vyrastajú mikrotubuly deliaceho vretienka. Centrozómy sa lokalizujú na póloch bunky a sú tvorené dvomi centriolami. V závere profázy sa vlákna deliaceho vretienka - mikrotubuly pripájajú k centroméram chromozómov. V **metafáze** sú chromozómy maximálne kondenzované a usporiadané do ekvatoriálnej roviny. V **anafáze** sa vlákna deliaceho vretienka postupne skracujú. Chromatídy chromozómov sa oddeľujú a presúvajú sa k opačným pólom bunky. Tento proces zabezpečuje prenos genetickej informácie z materskej bunky do buniek dcérskych. V **telofáze** sa chromozómy predlžujú a dekondenzujú, dochádza k rozpadu deliaceho vretienka. Okolo chromozómov sa tvorí jadrový obal a tvorí sa aj jadierko. Po skončení telofázy nasleduje samotné rozdelenie bunky, už spomínaná cytokinéza.

Na prechody medzi jednotlivými fázami bunkového cyklu dohliadajú tzv. **kontrolné body** (z angl. checkpoints). Tieto kontrolné body fungujú ako senzory v bunke detekujúce poruchy v syntéze DNA a segregácii chromozómov. Keď kontrolné body detekujú poškodenie, prostredníctvom signálnych mechanizmov dôjde k zastaveniu bunkového cyklu, pokiaľ nedôjde k opraveniu poškodenia. DNA poškodenia aktivujú proteíny ATM (z angl. ataxia telangiectasia mutated) a ATR (z angl. ataxiateleangiectasia and Rad3-related). Aktivácia týchto proteínkináz spôsobuje aktiváciu transkripčného faktora **p53**. P53 stimuluje transkripciu proteínu p21, ktorý sa viaže a inhibuje G1-S/Cdk komplex a S/Cdk komplex a zastaví replikáciu DNA, kým nedôjde k opraveniu poškodenej DNA. ATM a ATR okrem toho aktivujú proteíny, ktoré inhibujú mitotické cyklíny a zabraňujú bunke s poškodenou DNA vstúpiť do mitózy. Ak je poškodenie také vážne, že už nie je možné ho opraviť, spúšťa sa programovaná bunková smrť – **apoptóza**. Pri poruchách kontrolných bodov by bunke hrozila akumulácia mutácií a štrukturálnych aberácií, čo by mohlo mať za následok vznik nádorovej bunky. Bunkový cyklus je v jeho rôznych fázach riadený **cyklín-dependentnými kinázami (Cdk)**. Ich činnosť je riadená viacerými aktivátormi, ako sú **cyklíny** a inhibítormi. Cyklíny sú proteíny, ktorých koncentrácia sa v priebehu bunkového cyklu cyklicky mení. Deregulácia bunkového cyklu môže spôsobiť nekontrolovateľnú proliferáciu a vznik rakoviny. Cyklín-dependentné kinázy fungujú, ako už ich označenie napovedá, len vtedy, keď sa na ne naviaže regulačná podjednotka známa ako cyklín. Cyklíny sú syntetizované a degradované v rôznych fázach bunkového cyklu. U človeka sa nachádza 13 lokusov kódujúcich Cdk a 25 lokusov kódujúcich cyklíny. Na regulácii bunkového cyklu sa podieľajú len niektoré z nich. Sú to tri interfázne Cdk (Cdk2, Cdk4 a Cdk6), mitotická Cdk1 a desať cyklínov patriacich do 4 rôznych typov (A, B, D a E cyklíny). V G1 fáze sú dôležité cyklíny D (D1, D2 a D3), ktoré sa viažu na Cdk4 a Cdk6. Väzbou cyklínov na tieto cyklín-dependentné kinázy dochádza k fosforylácii proteínu Rb, čím sa uvoľňujú z inhibície transkripčné faktory. To vedie k iniciácii expresie cyklínov E a A, ktoré sa viažu a aktivujú **CDK2** a iniciujú syntézu DNA. Po skončení S fázy sa akumulujú mitotické cyklíny A a B a bunka vstupuje do mitózy.

Meióza je bunkové delenie, pri ktorom dochádza k tvorbe pohlavných buniek – gamét s haploidným počtom chromozómov. Meiózu môžeme charakterizovať ako dve po sebe idúce mitotické delenia. Prvé, ktoré sa označuje ako heterotypické, sa skladá z profázy I, metafázy I, anafázy I a telofázy I. Profáza I sa skladá z piatich štádií. V prvom štádiu, označovanom ako leptoténne štádium, dochádza ku kondenzácii vláknitých chromozómov. Druhé štádium sa nazýva zygoténne. V tomto štádiu sa homologické chromozómy spájajú do páru a vytvárajú tzv. bivalenty. V pachyténnom štádiu sa chromozómy ďalej špiralizujú a vytvárajú štvorchromatídový komplex označený ako tetráda. V priebehu pachyténneho štádia dochádza k tzv. crossing-over, kedy si chromozómy môžu navzájom vymieňať genetický materiál. V diploténnom štádiu sa tetrády chromatíd postupne rozostupujú, zostávajú však v kontakte v miestach prekríženia. Tieto prekríženia môžeme pozorovať ako tzv. chiazmy. V diakinéze dochádza k rozpadu jadrového obalu, chromozómy sa pohybujú smerom k ekvatoriálnej rovine, kolmej na os deliaceho vretienka. Počas metafázy I sa tvorí deliace vretienko. Spárované chromozómy sa zoskupujú do ekvatoriálnej roviny, zaniká jadierko. V anafáze I dochádza k oddeleniu bivalentov v dôsledku skracovania mikrotubulov deliaceho vretienka. Počet chromozómov sa počas tohto deja redukuje, keďže ku každému pólu bunky je priťahovaný iba jeden chromozóm z homologického chromozómového páru. V telofáze I dochádza k rozpadu deliaceho vretienka, dekondenzácii chromozómov, obnove jadrového obalu a oddeleniu dcérskych buniek. V porovnaní

s mitotickým delením sú chromozómy v telofáze I tvorené dvomi chromatídami. Druhé meiotické delenie sa nazýva aj homeotypické delenie. Toto delenie je analógiou mitózy. V porovnaní s mitózou sú však jej výsledné produkty haploidné a nie sú geneticky identické. V profáze II sa chromozómy kondenzujú, vzniká deliace vretienko. V metafáze II sa chromozómy usporadúvajú do ekvatoriálnej roviny. V anafáze II sa sesterské chromatídy oddelia a putujú k opačným pólom bunky. V telofáze II sa tvoria jadrové obaly, chromozómy sa dešpiralizujú a dochádza k deleniu buniek - cytokinéze.



Obr. 13 Bunkový cyklus (upravené podľa Korf B.R., Irons M.B. Human Genetics and Genomics. 2013, Wiley-Blackwell, Sussex).

Apoptóza

Názov apoptóza pochádza z gréckeho slova *apoptosis*, ktoré v gréčtine označovalo padanie lupeňov z kvetov, alebo opadávanie listov zo stromov na jeseň. Apoptóza eliminuje v tele bunky nežiadúce, alebo zmenené patologicky. Apoptózu prvýkrát opísal ako proces vyžadujúci aktívnu účasť odumierajúcej bunky austrálsky patológ John. F Kerr. Apoptóza sa označuje aj ako programovaná smrť bunky, pričom v kontraste k nekróze predstavuje fyziologický proces. Nekróza a apoptóza sa od seba líšia aj morfológicky. Pri nekróze dochádza k strate integrity plazmatickej membrány, narušeniu jadra, degradácii vnútorných organel, ale bunky ostávajú intaktné až do ich zániku prasknutím. Pri apoptóze sa integrita plazmatickej membrány neporuší a jadrový chromatin je kondenzovaný a fragmentovaný, rovnako sa neporuší integrita vnútorných organel a formujú sa tzv. apoptotické telieska a bunka sa zmenšuje. Mechanizmus apoptózy bol prvýkrát objasnený vedcami študujúcimi červa *Caenorhabditis elegans*. Zistili, že v tomto organizme sa z 1090 somatických buniek 131 buniek odstráni apoptózou. Analýza týchto 131 buniek ukázala, že tieto bunky sú naprogramované k tomu, aby zanikli v konkrétnych časových úsekoch embryonálneho vývoja. Počas vývoja a starnutia slúži apoptóza na udržanie homeostázy počtu buniek v tkanivách. Apoptóza môže byť pre bunku aj súčasťou imunitnej

reakcie, ktorou sa organizmus chráni voči poškodeniu. Rozlišujeme dve apoptotické dráhy: vonkajšiu signálnu cestu, spustenú vonkajšími stimulmi, alebo vnútornú cestu, iniciovanú vnútrobunkovými signálmi. Vo vonkajšej signálnej ceste zohrávajú zásadnú funkciu receptory patriace do rodiny TNF (TNF-tumor nekrotizujúci faktor z anglického tumor necrosis factor). Členovia rodiny TNF receptorov obsahujú cytoplazmatickú doménu tvorenú približne 80 aminokyselinami bohatú na cysteíny označovanú aj ako tzv. doménu smrti (z angl. death domain). Domény smrti majú dôležitú úlohu pri prenose signálu do bunky. Medzi najznámejšie popísané dvojice ligandu a receptoru patria FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 a Apo2L/DR5. Po väzbe Fas ligandu na Fas receptor dochádza k naviazaniu adaptorového proteínu FADD. Väzba TNF ligandu na TNF receptor indukuje naviazanie adaptorového proteínu TRADD s FADD a RIP. FADD viaže vďaka dimerizácii domény smrti prokaspázu 8 a formuje signálny komplex indukujúci smrť (DISC – z angl. death signal inducing complex). Tento DISC komplex môže následne aktivovať enzýmy prokaspázy, ako je napríklad prokaspáza - 8, ktoré proteolyticky konvertujú na kaspázy. Po aktivácii kaspázy 8 dôjde k spusteniu apoptózy. Kaspáza 8 môže spúšťať apoptotickú dráhu aj cez mitochondrie štiepením molekúl Bid. Bid proteín patrí do proteínov rodiny Bcl-2 (B bunkového lymfómu-2). Skrátená forma proteínu Bid sa translokuje do mitochondrií a aktivuje proapoptotické proteíny Bax a Bak. Apoptóza môže byť inhibovaná proteínom c-FLIP, ktorý sa viaže na FADD a kaspázu-8 a spôsobí, že tieto proteíny nemôžu vykonávať svoju funkciu. Príkladom ďalšieho proteínu, ktorý je schopný inhibovať vonkajšiu apoptotickú signálnu cestu, je proteín Toso. Spustenie vnútornej signálnej apoptotickej dráhy môže byť indukované depriváciou rastových faktorov, hormónov a cytokínov. Ďalšími faktormi, iniciujúcimi túto signálnu dráhu, sú ionizujúce žiarenie, toxíny, hypoxia, hypertermia a voľné radikály. Všetky spomínané stimuly spôsobujú zmeny vnútornej mitochondriálnej membrány. Výsledkom je zvýšená priepustnosť mitochondriálnej membrány cez jej póry, strata transmembránového potenciálu a dvoch hlavných skupín pro-apoptotických proteínov do cytosolu - (termín cytosol sa často zamieňa s termínom cytoplazma, cytoplazma označuje celé vnútrobunkové prostredie vrátane organel, kým cytosol označuje len tekutú časť tohto prostredia bez organel). Do prvej skupiny pro-apoptotických proteínov patria cytochróm c, Smac/DIABLO a serínová proteáza HtrA2/Omi. Tieto proteíny aktivujú na kaspáze závislú mitochondriálnu signálnu dráhu. Cytochróm c sa viaže a aktivuje apoptotický faktor aktivujúci proteázy (Apaf-1) a prokaspázu-9 a vytvorí komplex nazývaný apoptozóm. Toto zoskupenie spomínaných proteínov vedie aj k aktivácii samotnej kaspázy 9. Apoptózu podnecujú aj proteíny Smac/DIABLO a proteáza HtrA/Omi. Tieto proteíny sú schopné inhibovať IAP (z angl. inhibitors of apoptosis proteins) molekuly potlačujúce apoptózu. Druhú skupinu pro-apoptotických proteínov tvoria proteíny AIF, endonukleáza G a CAD. Tieto proteíny sa uvoľňujú relatívne neskoro, až v období, keď je bunka odsúdená k apoptóze. AIF proteín translokuje (premiestni sa) do jadra a v ňom spôsobuje kondenzáciu chromatinu a fragmentáciu DNA na 50-300 kb dlhé úseky (štádium I). Do jadra translokuje aj endonukleáza G, ktorá štiepi jadrový chromatin na krátke DNA oligonukleotidy. AIF a endonukleáza G nie sú závislé na kaspázach. Proteínom, ktorý je uvoľnený z mitochondrie a translokuje do jadra, je aj proteín CAD. Tento proteín po translokácii do jadra aktivuje kaspázu 3 a dochádza k ďalšej fragmentácii DNA a väčšej kondenzácii chromatinu označovanej ako štádium II. Kontrola a regulácia apoptózy je zabezpečovaná proteínmi rodiny Bcl-2. Tieto proteíny môžu byť pro-apoptotické aj anti-apoptotické. Medzi anti-apoptotické proteíny patria napríklad Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w a BAG. Pro-apoptotické proteíny sú Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik a Blk. Proteíny rodiny Bcl-2 regulujú apoptózu uvoľnením cytochrómu c z mitochondrie cez zmenu mitochondriálnej permeability. Pro-apoptotický proteín Bad je asociovaný s fosfoserínom viažúcim proteínom 14-3-3. Ak je Bad proteín fosforylovaný, tak je viazaný so 14-3-3 proteínom. Po jeho defosforylácii tento proteín translokuje ku mitochondrii a uvoľní cytochróm c. Bad môže dimerizovať s Bcl-XL alebo Bcl-2 a inhibovať ich účinok. Medzi pro-apoptotické patria aj proteíny Puma a Noxa. Puma zohráva úlohu v p53 sprostredkovanej apoptóze. Zvýšená expresia Puma zvyšuje expresiu proteínu Bax, dôjde k jeho konformačnej zmene, translokácii do jadra a uvoľneniu cytochrómu c. P53 sprostredkovanú apoptózu ovplyvňuje aj proteín Noxa. Tento proteín aktivuje kaspázu 9 jeho

interakciou s proteínmi rodiny Bcl-2 na mitochondriálnej membráne. Keďže proteíny Puma aj Noxa sú indukované proteínom p53, môžu byť tiež odpoveďou na genotoxické poškodenie alebo onkogénnu mutáciu. **Mutácie v géne p53 sú v nádorových bunkách u ľudí pomerne časté.** Ďalšou apoptotickou dráhou, ktorou zabíjajú cieľové bunky cytotoxické T lymfocyty a NK bunky, je perforínová/granzýmová dráha. Bunky sú zabíjané vonkajšou apoptotickou signálnou dráhou prostredníctvom FasL/FasR interakcie, rovnakou dráhou sú zabíjané aj bunky infikované vírusom a nádorové bunky. Z cytotoxických T lymfocytov a NK buniek je uvoľňovaný perforín. Perforín vytvára póry na cieľových bunkách. Obsah cytoplazmatických granúl, ktorých najdôležitejšími zložkami sú granzým A a granzým B, sa dostanú do lymfocytov. Granzým B štiepi proteíny na aspartátovom zvyšku a tým aktivuje prokaspázu 10, štiepi anti-apoptotické faktory ako je napríklad ICAD (z angl. Inhibitor of Caspase Activated DNase). Granzým B je schopný štiepiť aj proteín Bid a indukovať uvoľnenie cytochrómu c z mitochondrií. Okrem toho môže tiež priamo aktivovať štiepením kaspázu 3, čo má za následok aktiváciu apoptózy. Granzým A je tiež dôležitý v apoptóze indukovanej cytotoxickými T lymfocytmi a aktivuje signálne dráhy nezávislé od kaspáz. Granzým A môže aktivovať jadrovú DNA štiepením pomocou DNázy NM23-H1. Táto DNáza je inhibovaná proteínom SET, ktorý okrem inhibície NM23-H zohráva úlohu aj v oprave DNA a udržiavaní chromatinovej štruktúry. Granzým A proteáza štiepi SET proteín a následne dochádza ku kondenzácii chromatinu a apoptotickej degradácii DNA.

Zápis génových a chromozómových zmien

Najčastejšími zmenami v DNA sekvencii sú mutácie a polymorfizmy, ktoré zjednodušene označujeme ako sekvenčné varianty DNA. Zápis variantov musí byť presný, jednoznačný, ale aj flexibilný. Na popisovanie variantov by sa mala používať aktuálna systematická nomenklatúra. Termíny polymorfizmus a mutácia by sa už naďalej nemali používať, lebo pri hovorovom používaní majú nepresné významy. Termín polymorfizmus označujú niektoré práce ako sekvenčný variant, ktorý nespôsobuje ochorenie. Iné práce používajú toto označenie na variant, ktorého frekvencia v populácii je väčšia ako 1%. Mutácia v niektorých prácach označuje zmenu v genetickom materiáli, iní autori používajú tento výraz na označenie zmeny, ktorá spôsobuje ochorenie. Okrem toho výraz mutácia má často negatívny vedľajší význam v komunikácii medzi lekárom a pacientom a výraz variácia neznie pre pacienta tak dramaticky. Všetky varianty by mali byť vzťahované k referenčnej sekvencii. Pred každým variantom je použitý symbol, ktorý označuje, aký typ referenčnej sekvencie bol použitý.

- g.** označuje genomickú referenčnú sekvenciu, obsahujúcu kódujúce aj nekódujúce úseky DNA
- c.** označuje referenčnú sekvenciu začínajúcu iniciačným kodónom AUG a končiacu stop kodónom (UAA, UAG, UGA) v mRNA, ktorá neobsahuje intróny a je prepísaná na základe komplementarity do DNA
- n.** označuje nekódujúcu referenčnú DNA sekvenciu
- r.** je označenie pre referenčnú RNA sekvenciu
- p.** symbol sa používa na označenie proteínovej referenčnej sekvencie
- m.** označuje mitochondriálnu sekvenciu

Variácie vznikajú rôznymi mechanizmami. Patria medzi ne substitúcia, delécia, inverzia, duplikácia, inzercia, konverzia, a delécia s inzerciou.

Substitúcia (>) označuje zámenu jedného nukleotidu za druhý. Ak sa zamení purínová báza (A, G) za inú purínovú bázu, alebo pyrimidínová báza (C, T) za inú pyrimidínovú bázu, tak ide o tranzíciu. Transverzia označuje zámenu pyrimidínovej bázy za purínovú a opačne. Napr. g.1318G>T znamená, že v pozícii 1318 dochádza k zámene guanínu za tymín na úrovni genomickej DNA.

Delécia (del) označuje stratu jedného alebo viacerého nukleotidov. Napr. g.3661_3706del znamená deléciu nukleotidov v úseku 3661 až 3706 na genomickej úrovni.

Inverzia (inv) je zmena, kde jeden alebo viaceré nukleotidy nahrádza originálnu sekvenciu. Vnútrotný úsek chromozómu sa po vzniku dvoch zlomov otočí o 180 stupňov a následne sa umiestni na to isté miesto lepiacimi koncami. Napr. g.495-499inv označuje inverziu piatich nukleotidov v pozícii 495-499.

Duplikácia (dup) označuje zámenu, pri ktorej dochádza k znásobeniu jedného alebo viacerých nukleotidov v originálnej sekvencii. Napr. g.3661_3706dup je príkladom duplikácie nukleotidov v oblasti 3661 až 3706.

Inzercia (ins) je zmena, pri ktorej sa do sekvencie DNA začlení jeden alebo viaceré nukleotidy. Napr. g.7339-7340insTAGG znamená včlenenie nukleotidov TAGG medzi nukleotidy 7339 a 7340.

Konverzia (con) označuje špecifický typ inzerčno-delečnej zmeny, pri ktorej je nahradená pôvodná sekvencia úsekom DNA pochádzajúcim z iného chromozómu. Príkladom je zápis g.333_590con1844_2101

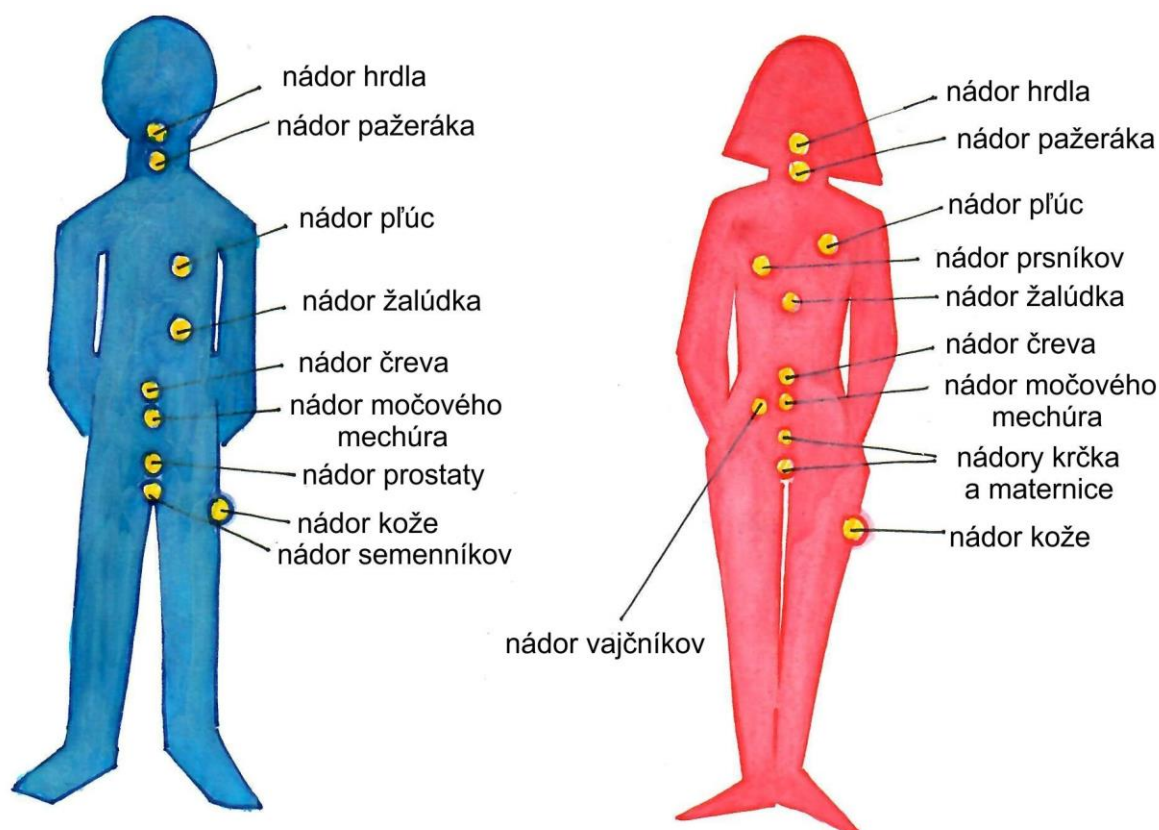
Indel variácie (delins/indel) znamenajú zmeny, pri ktorých súčasne prebiehajú inzercie aj delécie.

II. Molekulová patológia vybraných nádorových ochorení

Úvod

Nádorové ochorenia spolu s chorobami srdca a ciev patria medzi najčastejšie ochorenia u nás i vo svete. Na Slovensku je hlásených okolo 28 000 nových prípadov nádorového ochorenia ročne, pričom približne 12 000 pacientov na nádorové onemocnenia každoročne zomiera. V boji proti nádorovým ochoreniam v posledných rokoch zásadne prispela okrem klasickej biológie a patológie aj tzv. molekulová patológia.

Jej význam súvisí so skutočnosťou, že rast buniek a tkanív je u človeka prísne regulovaný komplexom regulačných mechanizmov, vrátane genetických. Ak sa nejaká bunka tejto regulácii vymkne, a naďalej sa delí, môže dať vznik nádoru – t.j. nádorové ochorenie je výsledkom mutácií, ktoré „oslobodia“ bunky od obvyklej regulácie bunkového delenia a prežitia. Bunka v tele mutuje vďaka sérii náhodných udalostí a získava schopnosť proliferovať bez normálnych zábran. Potomstvo tejto bunky získava mutácie a vzniká nádor, ktorý môže neobmedzene rásť. Ak nádorové bunky nevstupujú do okolitých tkanív, t.j. rastú neinvazívne, tak obvyčajne neohrozujú život nositeľa a ide o benígny nádor. Ak sa nádorové bunky z nádorovej masy uvoľňujú a sú schopné infiltrovať do okolitých tkanív, tak vytvárajú malígny nádor. Malígne nádory majú navyše aj schopnosť šíriť sa do ďalších miest v tele a vytvárať sekundárne nádorové ložiská, čo sa označuje ako metastázovanie. Schopnosť nádorových buniek infiltrovať do okolia a zakladať vzdialené ložiská – metastázy je umožnené aj ich vlastnosťami, ako je zmena ich tvaru a funkcie. Nádorové bunky majú schopnosť prechádzať cez bazálnu membránu a šíriť sa na vzdialenejšie miesta po tele prostredníctvom lymfatického a cievneho systému. Tvorba metastáz v neskorších štádiách ochorenia a zlyhanie ich liečby je jednou z hlavných príčin úmrtia onkologických pacientov. Nádorové ochorenia sa môžu primárne vyvinúť v akomkoľvek orgáne alebo tkanive ľudského tela. Solídne nádory vytvárajú zhľuky, zatiaľ čo pri leukémiách a lymfómoch môžu nádorové bunky prúdiť voľne v krvi.



Obr. 14 Výskyt nádorových ochorení

Nádory klasifikujeme v rámci ich typizácie do kategórií podľa tkanív alebo buniek, v ktorých vznikajú, resp. nádorovou proliferáciou ktorých vznikajú – tento princíp sa označuje ako tzv. histogenetický princíp (alebo tzv. C-O-O concept, z angl. Cell of Origin). Podľa uvedeného princípu rozlišujeme nádory

- Nádory typu jednej parenchýmovej bunky: sem patria tri kategórie najčastejších nádorov ľudí, ktorými podľa poradia častosti sú epitelové nádory (z krycieho, resp. žľazového epitelu), mezenchýmové nádory (z tukového alebo fibrózneho spojiva, chrupky, kosti, hladkého a priečne pruhovaného svalstva, atď) a neuroektodermové nádory (nádory centrálného resp. periférneho nervového systému a nádory melanocytov), menej časté sú nádory mezotelu, synovie, placenty a nádory zárodočných buniek.
- Zmiešané nádory: sú tvorené synchronnou nádorovou proliferáciou buniek dvoch rôznych bunkových radov identického pôvodu (napr. rôznych komponent mezenchýmového pôvodu) alebo rôzneho pôvodu (napr. adenofibróm je zložený z adenomatóznej komponenty epitelového a z fibróznej komponenty mezenchýmového pôvodu), pričom biologická povaha každej zo zúčastnených komponent môže byť zhodná alebo diskordantná
- Nádory z viac než jedného typu zárodočnej bunky napr. teratómy.

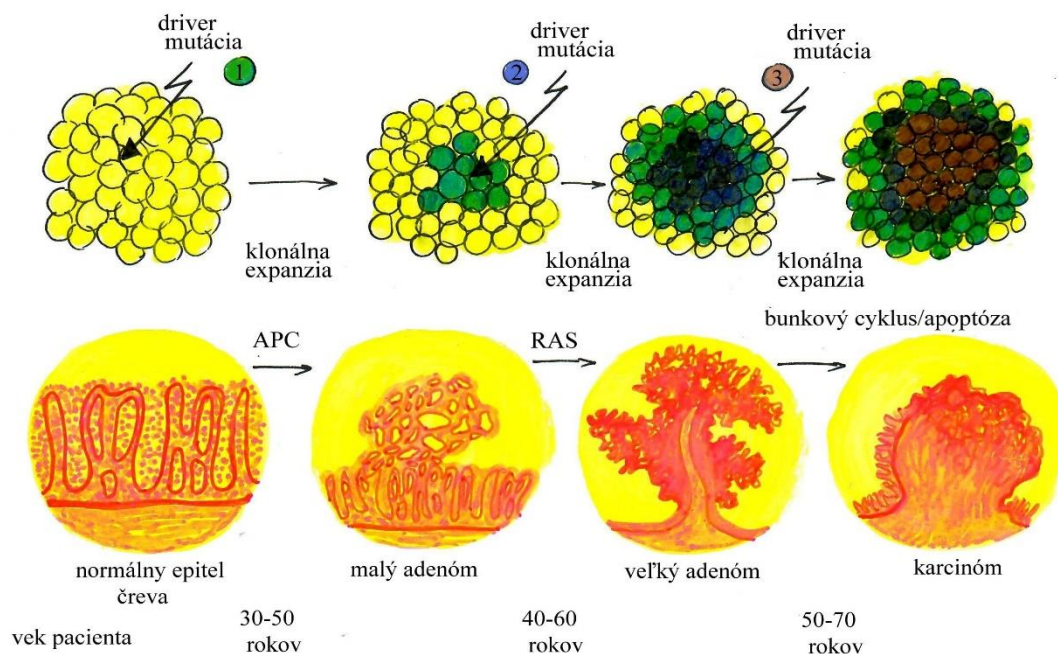
Ďalšie klasifikačné prístupy nádorov zahŕňajú delenie nádorov podľa dignity, t.j. ich biologickej povahy (na benígne, malígne, semimalígne a nádory neistej dignity) a delenie zhubných nádorov podľa stupňa ich diferenciácie (tzv. grading) a podľa rozsahu nádorového ochorenia (tzv. staging). Určenie histogenetického pôvodu nádoru, t.j. typu nádoru, určenie biologickej povahy a graduingu resp. stagingu vyžaduje diagnostické analýzy biopsicky vyšetreného tkaniva nádoru kvalifikovaným patológom.

Keď porovnáme nádorové a normálne bunky, tak normálne bunky majú pri kultivácii obmedzený počet

delení medzi 40 – 60 x a pri kultivácii sa ich rast pri vzájomnom kontakte zastaví. Túto reguláciu označujeme ako tzv. regulácia kontaktnou inhibíciou. Nenádorové bunky rastú len v jednej vrstve (z anglického tzv. monolayer). Tieto bunky sú náročné na prítomnosť rastových faktorov v médiu a ich metabolizmus je hlavne aeróbny. Bunky si zachovávajú svoj tvar aj počet chromozómov. Pri kultivácii rastú nádorové bunky neobmedzene, dochádza u nich k strate kontaktnej inhibície a preto rastú neorganizovane vo viacerých vrstvách. Metabolizmus nádorových buniek je vo zvýšenej miere anaeróbny. U týchto buniek sú teda nižšie nároky na proteínové faktory v kultivačnom médiu. Nádorové bunky vykazujú zmeny v počte chromozómov a často aj zmenený tvar buniek. Zmenená veľkosť buniek jedného druhu sa označuje ako anizocytóza .

Etiológia nádorových ochorení

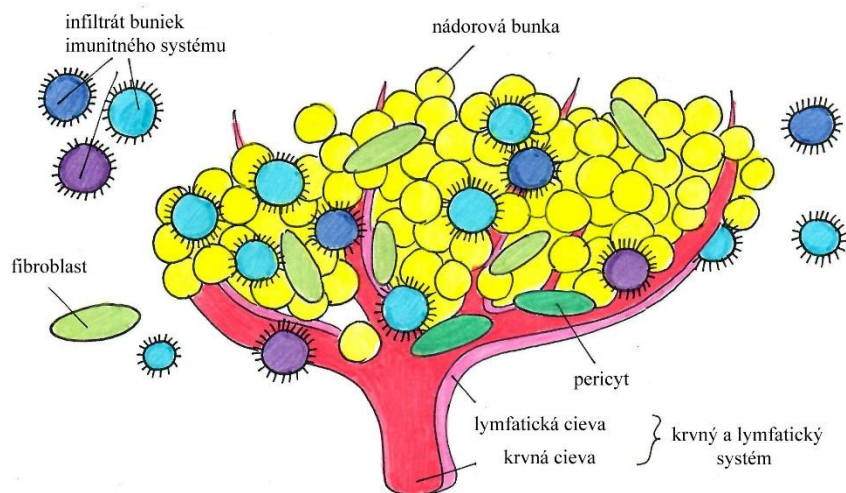
Okrem prípadov nádorových ochorení, kde sa dedí predispozícia na vznik ochorenia (hereditárne nádory), vo väčšine prípadov vznikajú onkologické ochorenia akumuláciou mutácií v somatických bunkách (sporadické nádory). DNA v normálnych bunkách je neustále poškodzovaná mutagénmi z vonkajšieho prostredia alebo v dôsledku impulzov z vnútrobunkového prostredia. Väčšina týchto poškodení je opravená. Problém nastane, ak k oprave poškodení nedôjde. Na vzniku mutácií sa podieľajú aj chyby pri replikácii DNA. Somatické mutácie v genóme nádorových buniek zahŕňajú rôzne zmeny v DNA sekvencii. Patria medzi ne bodové mutácie, inzercie alebo delécie rôzne veľkých úsekov DNA, prestavby, pri ktorých dochádza k zlomu v DNA, variácie počtu kópií, génové amplifikácie a aneuploidie. Tieto mechanizmy sú detailnejšie opísané nižšie v texte. Každá somatická mutácia môže byť klasifikovaná podľa jej vplyvu na nádorový proces. Mutácie určujúce charakter transformácie a majúce významný podiel na agresivite a rezistencii tumoru označujeme ako tzv. driver mutácie. Tieto mutácie udeľujú bunkám rastovú výhodu a sú výsledkom pozitívnej selekcie počas evolúcie nádoru. Prináleží im aj označenie v podskupine génov známych ako „nádorové gény“. Tieto mutácie sú identifikovateľné aj dnes dostupnými metódami u vysokého percenta pacientov s onkologickým ochorením. Ak sa ich podarí tzv. cieleňou liečbou zasiahnuť, resp. zablokať, má to za následok prinajmenej zastavenie rastu a v optimálnom prípade aj regresiu nádoru. Tieto genetické alterácie sa nachádzajú v génoch, ktoré zohrávajú úlohu v proliferácii buniek, supresii bunkového rastu, v deštrukcii indukovanej imunitným systémom, v kontrole replikatívneho potenciálu buniek, v bunkovej adhezivite a mobilite, v indukcii angiogenézy, v signalizácii apoptózy a v regulácii bunkového metabolizmu. Driver mutácie zvyšujú pravdepodobnosť ďalších mutácií tým, že udeľujú bunke rastovú výhodu. Passenger mutácie sa pasívne prenášajú do ďalšej generácie nádorových buniek a sú bez významného podielu na proliferáciu buniek.



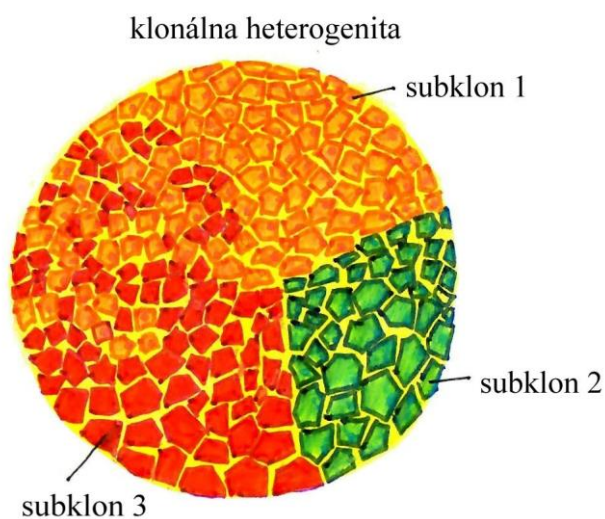
Obr. 15 Vznik nádoru. Na obrázku pod textom máme znázornené driver mutácie pri formovaní kolorektálneho karcinómu. Každá driver mutácia udeľuje bunkám rastovú výhodu a tým dochádza k formovaniu skupiny klonu buniek, ktorá je senzitívna na kumuláciu ďalších driver mutácií. Zelenou farbou je znázornená driver mutácia 1, modrou driver mutácia 2 a hnedou driver mutácia 3. (Upravené podľa Strachan T., Goodship J., Chinnery P. Genetics and Genomics in Medicine. 2014, Garland Science (Taylor & Francis Group))

Nádorová heterogenita

Štúdie analyzujúce nádorové genómy sa vo väčšine prípadov pozerajú na nádory ako na celok. Nádorové bunky majú monoklonálny pôvod, vznikajú z jednej bunky. Avšak v čase klinickej diagnózy je väčšina nádorov tvorená zmesou buniek, odlišujúcich sa v mnohých morfológických a fyziologických znakoch, ako sú expresia receptorov na povrchu buniek, metastatický a proliferatívny potenciál a schopnosť angiogenézy. Tento jav, ktorý vzniká počas postupujúceho vývoja nádorového tkaniva sa označuje ako nádorová heterogenita. Nádory sú preto veľmi komplexné tkanivá zložené z heterogénnej populácie buniek – malígnych i nemalígnych buniek z okolitého tkaniva. Za nádorové malígne bunky sa považujú tie, ktoré iniciujú vznik samotného nádoru a sú zodpovedné za jeho rast, nesú onkogénne i tumor-supresorové mutácie, ktorých kombináciou i vznikom nových mutácií sa vytvárajú klonálne subpopulácie v rôznom štádiu vývoja. Súčasťou samotného nádorového tkaniva je aj malá subpopulácia buniek označovaná ako nádorové kmeňové bunky. Tieto bunky majú na svojom povrchu markery, ktoré sa nachádzajú aj na normálnych nenádorových bunkách a sú schopné vytvoriť na imunodeficientej myši polyklonálny nádor totožný s pôvodným nádorom, z ktorého pochádzajú. Tieto bunky sú zodpovedné za rezistenciu nádoru voči terapii zameranej na rýchlo sa deliace nádorové bunky a relaps ochorenia. Netransformované bunky sa rovnako aktívne zúčastňujú na všetkých procesoch a interakciách, prispievajú k rozvoju nádorových charakteristík a utvárajú mikroprostredie asociované s nádorom označované ako stróma. Spolupracujú na nádorovej homeostáze a regulačných dráhach, čím vytvárajú mikroprostredie nádoru. Patria sem bunky endotelu, bunky imunitného systému a nádorovo asociované fibroblasty.



Obr. 16 Nádorová heterogenita. Nádorovú heterogenitu spôsobujú aj samotné rozdiely medzi nádorovými bunkami, ktoré boli pôvodne monoklonálne a vznikli delením jednej bunky. Následkom rôznych mutácií a epigenetických zmien sa tieto bunky samotného nádoru navzájom odlišujú. Jednotlivé subpopulácie klonov sa môžu navzájom premiešavať, alebo môžu byť od seba priestorovo oddelené. (Upravené podľa Strachan T., Goodship J., Chinnery P. Genetics and Genomics in Medicine. 2014, Garland Science (Taylor & Francis Group))



Obr. 17 Klonálna heterogenita. (Upravené podľa Strachan T., Goodship J., Chinnery P. Genetics and Genomics in Medicine. 2014, Garland Science (Taylor & Francis Group))

Gény asociované s onkogenézou

Nádorové ochorenie je chorobou génov. Na vzniku nádorov sa podieľajú fyzikálne, chemické a biologické faktory vonkajšieho prostredia, ale aj vnútorné faktory, ako sú chyby počas replikácie DNA, a tieto faktory spôsobujú zmeny v DNA v génoch zohrávajúcich úlohu v malígnej transformácii. S nádorovými ochoreniami sú asociované tri skupiny génov - **proto-onkogény, tumor-supresorové gény a mutátorové gény**. Aktiváciou protoonkogénov vznikajú onkogény. Produkty protoonkogénov stimulujú bunkovú proliferáciu. Tumor-supresorové gény inhibujú bunkovú proliferáciu. Mutátorové gény sú zapojené do DNA replikácie a opravy poškodenej DNA. Funkciu onkogénov a tumor-supresorových génov si môžeme predstaviť ako brzdu a plyn v aute. Onkogén funguje ako plyn a tumor - supresorové gény fungujú ako brzda. Silnejšie stúpnutie na plyn pripomína dominantnú mutáciu v onkogéne. To znamená, že mutácia postihujúca jednu alelu tohto génu postačuje na nádorovú transformáciu. Mutácie v tomto prípade aktivujú proteín, ktorý takýto gén kóduje. Takéto mutácie označujeme ako tzv. mutácie charakteru *gain of function*. Recessívne mutácie v tumor-supresorovom géne zasa naopak pripomínajú situáciu, keď brzdy v aute zlyhajú, lebo výsledkom je proliferácia („auto“) mimo kontroly. V podobnej situácii je aj bunka v prípade mutácie v onkogénoch alebo tumor-supresorových génoch. V prípade poškodenia tumor-supresorových génov je potrebné postihnúť obidvoch alel, aby došlo k poškodeniu proteínovej funkcie - vplyvom tejto mutácie sa nevytvorí funkčný proteín. Mutácie s takýmto správaním označujeme ako tzv. *loss of function*. Tento model analógie s autom je zjednodušený, v bunke sa nachádza „plynových pedálov“ a „brzd“ viacero. Skutočné poškodenie bunky a jej nádorová proliferácia je obvyčajne výsledkom zlyhania viacerých systémov v bunke. Keďže v priebehu starnutia dochádza k akumulácii mutácií v bunkách a poklesu schopnosti opráv poškodení v nukleových kyselinách tak je pochopiteľné, že incidencia nádorových ochorení stúpa s vekom. Aj preto niektorí označujú rakovinu starších ľudí ako tzv. „aging cancer“.

Onkogény boli objavené v 60. rokoch 20. storočia. Zistilo sa, že na vzniku niektorých typov nádorov sa podieľajú vírusy (leukémie, lymfómy). Vírusy sa môžu zúčastňovať nádorovej transformácie, pretože majú v sebe kópiu onkogénu. Vírusové onkogény sú odvodené z ľudských protoonkogénov. Bolo to dokázané na výskumoch s vírusom Rousovho sarkómu, izolovaného z kuracieho sarkómu. Transformujúci gén v-src nebol nevyhnutný pre vírusovú replikáciu. Ukázalo sa, že k vírusovému génom v-src boli v bunkovom génóme nájdené homologické úseky. Potvrdila sa homológia s bunkovým génom c-src, ktorý je konzervovaný u všetkých eukaryotických organizmov. Protoonkogény sú v bunkách zapojené do viacerých procesov. V bunke fungujú ako sekretované rastové faktory (napr. gén *SIS*, gén *FGF4*), receptory na povrchu buniek (napr. gény *ERBB*, *FMS*), zložky intracelulárnej bunkovej signalizácie (napr. *RAS* gény, gén *ABL*), DNA-väzobné proteíny, vrátane transkripčných faktorov (napr. gény *MYC* a *JUN*) a ako zložky cyklínovej siete - cyklín - dependentné kinázy a inhibítory kináz, ktoré regulujú bunkový cyklus (napr. gén *MDM2*). Protoonkogény sú aktivované rôznymi spôsobmi. **Príkladom sú amplifikácia, bodová mutácia alebo aktivácia translokáciou, vedúcou k vzniku nového chimerického génu.** Amplifikácia génu *HER2* je napr. relatívne často prítomná v nádorových bunkách pacientok s karcinómom prsníka. Amplifikácia génu *N-myc* bola popísaná u pacientov s neuroblastómom a rabdomyosarkómom. Príkladom aktivácie protoonkogénov sú **bodové mutácie génov** rodiny *RAS* (*H-RAS*, *K-RAS* a *N-RAS*). *RAS* gény kódujú malé proteíny, ktoré sú schopné na seba viazať GTP. Ak je *RAS* viazaný s GDP (guanozínmonofosfát), tak je v neaktívnom stave. Po naviazaní GTP (guanozíntrifosfát) na *RAS* proteín sa konvertuje z neaktívneho stavu na aktívny stav. Bodové mutácie v *RAS* géne boli nájdené v rôznych nádoroch, ako sú napríklad kolorektálny karcinóm, nádory prsníka, močového mechúra a pľúc. Mnohé z týchto mutácií majú za následok zníženie GTPázovej aktivity proteínu. *RAS* proteín je inaktívovaný pomalšie a to spôsobuje zvýšenú bunkovú odpoveď po väzbe na príslušný bunkový receptor. Ďalším príkladom onkogénu, ktorý je často aktivovaný bodovými mutáciami, je gén *BRAF*. Tento gén kóduje tyrozínkinázu, ktorá prenáša signál z aktivovaných *RAS* proteínov na *ERK* kinázu a stimuluje génovú transkripciu vybraných génov. Mutácie génu *BRAF* sú časté u malígnych

melanómov. Približne pri polovici pacientov s touto diagnózou je gén *BRAF* mutovaný. Vo väčšine prípadov sa jedná o mutácie p.V600E a p.V600K. Tieto mutácie spôsobujú konštitutívnu aktiváciu génu *BRAF* bez prítomnosti signálov z vonkajšieho prostredia. Ďalším typom aktivácie onkogénov je **tvorba fúzných génov**. Najznámejším príkladom je Filadelfský chromozóm (Ph), ktorý vzniká translokáciou dlhých ramienok chromozómov 9 a 22 – t(9;22)(q34;q11). Nachádza sa u viac ako 90% pacientov s chronickou myeloidnou leukémiou. Translokácia vedie k fúzii génu *BCR* s génom *ABL*. Tento fúzny gén sa nachádza u viac ako 90% pacientov s chronickou myeloidnou leukémiou.

Výsledkom tejto fúzie je proteín s abnormálne zvýšenou tyrozínkinázovou aktivitou. Iným príkladom translokácie je napríklad fúzny gén *AML1/ETO* prítomný v nádorových bunkách pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou. Translokácia *TEL/AML1* je častá v nádorových bunkách pacientov s akútnou lymfoblastickou leukémiou. Pre pacientov s Ewingovým sarkómom sú charakteristické translokácie *EWS/FL1* a *EWS/ERG*. Translokácií je obrovské množstvo a tu sú spomenuté len niektoré príklady.

Onkogény sa môžu aktivovať aj translokáciou do oblasti transkripčne aktívneho chromatinu. Príkladom takejto aktivácie je translokácia *MYC* onkogénu do blízkosti génu, ktorý kóduje ťažký reťazec imunoglobulínu u pacientov s Burkittovým lymfómom. Burkittov lymfóm, ktorý bol pôvodne popísaný v krajinách Afriky je agresívne ochorenie lymfatického systému postihujúce ľudí na celom svete. Gén *c-myc*, ktorý kóduje transkripčný faktor zohrávajúci úlohu v regulácii bunkového cyklu je translokovaný do oblasti kódujúcej imunoglobulínové reťazce. V 75 - 85% ide o translokáciu t(8;14). V ostatných prípadoch sú to translokácie t(2;8) alebo t(8;22). Tieto translokácie neutvárajú nové chimerické gény, ale miesto toho sa protoonkogén *c-myc* dostáva pod vplyv vysokotranskripčne aktívneho génu.

Ďalším typom génov, ktoré sú mutované v nádoroch, sú tumor-supresorové gény. Henry Harris fúzoval bunky z potkana s nádorovými bunkami, avšak bunky po fúzii nejavili známky malígnej transformácie. Vyslovil hypotézu, že nemutované bunky obsahovali génový produkt schopný nahradiť poškodený proteín v nádorových bunkách a tým potlačiť nekontrolovateľné delenie buniek charakteristické pre nádorové bunky. Tieto gény sa nazývajú tumor-supresorové gény. Proteíny kódované týmito génmi nevyvolávajú proliferáciu buniek, ale naopak ju potláčajú a udržiavajú bunky v klude, podporujú apoptózu a majú úlohu aj v bunkovej diferenciácii. Mutácie v tumor-supresorových génoch sa vyskytujú v somatických aj v zárodočných bunkách. Kým na inaktiváciu tumor-supresorového génu sú potrebné dve mutácie, tak na aktiváciu proto-onkogénu postačuje jedna mutácia. Ku identifikácii množstva tumor-supresorových génov prispeli zriedkavé dedičné formy nádorových ochorení. Nádorové ochorenia nie sú vo väčšine prípadov dedičné. Zriedkavo sa dedí len predispozícia na vznik nádoru. Ide o 5 - 10% všetkých onkologických ochorení. U zvyšných 90-95% pacientov vznikajú nádorové bunky akumuláciou mutácií v somatických bunkách. V roku 1971 formuloval Alfred Knudson mnohokrokový mechanizmus vzniku nádoru. Podľa jeho hypotézy je potrebných na vznik väčšiny nádorov 4 - 7 zásahov. Knudson skúmal sporadickú a familiárnu formu retinoblastómu. Zistil, že v prípade dedičnej formy retinoblastómu sa ochorenie prejaví často už v detskom veku a postihnuté sú obidve oči. Sporadická forma retinoblastómu sa objavuje neskôr a postihuje len jedno oko. Retinoblastóm je agresívny typ nádorového ochorenia u detí, postihujúci oči. Gén zohrávajúci úlohu v tomto ochorení sa nachádza na dlhšom ramienku chromozómu 13 a kóduje proteín Rb1 vyskytujúci sa v jadrách buniek. Mechanizmus tohto ochorenia spočíva v inaktivácii obidvoch alel tumor-supresorového *Rb* génu. V prípade dedičnej formy retinoblastómu je jedna mutácia zdedená a k druhej mutácii dochádza v priebehu života. Pri získanej forme tohto ochorenia dôjde ku dvom nezávislým mutáciám. To, že na inaktiváciu *Rb* génu sú potrebné postihnuté obidve alely sa označuje ako tzv. teória dvojitého zásahu.

Medzi nádorové ochorenia s genetickou predispozíciou spôsobené mutáciami v tumor-supresorových génoch patria napríklad Familiárna adenomatózna polypóza, podmienená mutáciou v tumor-supresorovom géne *APC* nachádzajúcom sa v oblasti 5q21, neurofibromatóza typu I, spôsobená mutáciou *NF1*, neurofibromatóza typu II, podmienená mutáciou v géne *NF2* a hereditárny nádor prsníka a ovárií spôsobený mutáciami v tumor-supresorových génoch *BRCA1* (breast related

cancer antigen) a *BRCA2*. Mutácie v tumor-supresorových génoch sú inaktivujúce - recesívne a často sú spojené so stratou heterozygoty (LOH-loss of heterozygosity). Delícia na úrovni DNA/chromozómu, ktorej dôsledkom je aj strata heterozygoty na príslušnom lokuse je teda jedným z mechanizmov spôsobujúcich stratu funkčnej alely.

Niektoré tumor-supresorové gény nazývané tzv. **gatekeeper gény** priamo zabráňujú bunkovej proliferácii a ovplyvňujú apoptózu. Druhý typ tumor-supresorových génov má funkciu pri rozpoznávaní a oprave poškodenej DNA a túto skupinu génov nazývame ako tzv. **caretaker gény**. Pri ich poškodení dochádza v bunke ku akumulácii poškodenej DNA a neschopnosti opravy týchto defektov.

Na pochopenie karcinogenézy je dôležité rozumieť regulácii bunkového cyklu. Bunkový cyklus a jeho fázy sú opísané v prvej časti knihy. Kľúčovú úlohu v regulácii bunkového cyklu majú komplexy tvorené cyklínmi a cyklín-dependentnými kinázami (CDK), ktoré aktivujú alebo deaktivujú rôzne proteíny počas bunkového cyklu. Bunka má možnosť kontroly dokončenia predchádzajúcich krokov v tzv. kontrolných bodoch bunkového cyklu označovaných ako „checkpoints“. G1 kontrolný bod umožní začatie syntézy DNA, až keď bunka dosiahne požadovanú veľkosť. Pre prechod bunky z G1 fázy do S fázy je potrebný komplex CDK2 a cyklínu E. Priebeh S fázy je kontrolovaný cyklínom A v komplexe s CDK2 uvoľnenej z komplexu s cyklínom E. Ako brzda v bunkovom cykle pracuje skupina piatich tumor-supresorových proteínov. RB1 inhibuje jeho naviazaním transkripčný faktor E2F. RB1 proteín je inhibovaný komplexom CDK4-cyklínu D alebo CDK6-cyklínu D. Negatívnym regulátorom RB1 proteínu je aj MDM2, ktorý pridáva na tento proteín ubiquitín. Proteín p16 inhibuje CDK4 a proteín p14 inhibuje MDM2 proteín. Zvýšená hladina p53 proteínu stimuluje proteín p21, aby inhiboval komplex CDK2 a cyklínu E. Avšak p53 je v bunke za normálnych podmienok v relatívne nízkej koncentrácii, pretože na tento proteín pridáva MDM2 proteín ubiquitín, čím dochádza k jeho degradácii. Pri poškodení DNA dochádza ku fosforylácii p53 proteínu a disociácii MDM2 proteínu. Následne sa zvýši hladina p53 proteínu. To spôsobí zastavenie bunkového cyklu a podľa stupňa poškodenia sa poškodená DNA opraví, alebo dôjde k apoptóze poškodenej bunky (viď prvá časť skriptu). Gén *TP53*, ktorý kóduje p53 proteín, je jedným z najčastejšie mutovaných génov v nádoroch. Zárodočné mutácie *TP53* génu spôsobujú Li-Fraumeniho syndróm, ochorenie, ktoré svojho nositeľa ohrozuje zvýšeným rizikom vzniku zhubných nádorov.

V rôznych typoch nádorov boli popísané signifikantne zmenené expzie mikroRNA (miRNA) a dlhých nekódujúcich RNA molekúl (lncRNA). Určité molekuly mikroRNA regulujú v bunkách apoptózu, starnutie, bunkový cyklus a odpoveď k DNA poškodeniu. Niektoré miRNA sa správajú ako onkogény a iné ako tumor-supresorové gény. Mnohé štúdie ukazujú na spojitosť miRNA a nádorových ochorení. Napríklad u pacientov s chronickou lymfocytovou leukémiou bola popísaná znížená hladina expzie miRNA-15a a miRNA-16-1. Dlhé nekódujúce RNA sú molekuly dlhé viac ako 200 nukleotidov. Majú kľúčovú úlohu v transkripcii aj posttranskripčných dráhach a k ich deregulácii dochádza v mnohých onkologických ochoreniach.

Na vzniku nádorových ochorení sa podieľajú aj epigenetické zmeny, ktoré ovplyvňujú expresiu vybraných génov, a to najmä metylácie DNA a acetylácia histónov. Metylácia umožňuje zapínať a vypínať gény - napr. hypermetylácia promótorov tumor-supresorových génov spôsobuje ich utlmenie a následne táto zmena udeľuje bunkám rastovú výhodu. Niektoré tumor-supresorové gény bývajú umlčané iba bodovou mutáciou a nedochádza u nich nikdy k metylácii. Takým génom je napríklad *MSH2*. U tumor-supresorového génu *MLH1* je metylácia alternatívou k bodovej mutácii. U iných génov je metylácia jediným mechanizmom, spôsobujúcim ich umlčanie. Príkladom týchto génov sú napríklad gén *RASSF1A* lokalizovaný v pozícii 3p21 a gén *HIC1*, nachádzajúci sa v oblasti 17p13.3.

Na vzniku nádorov sa podieľajú aj mutácie v génoch zodpovedných za opravné mechanizmy pri poškodení DNA. Ak nedôjde k oprave chýb, mutácie sa hromadia v bunke a spôsobujú nestabilitu genómu. Defekty v komponentoch nukleotidovej excíznej reparácie spôsobujú zvýšenú náchylnosť ku vzniku nádorov. Príkladom takéhoto ochorenia je Xeroderma pigmentosum. Pacienti postihnutí týmto ochorením majú zvýšenú citlivosť voči slnečnému žiareniu, tvoria sa u nich na koži tmavé flaky, často

vznikajú u nich kožné nádory a predčasne sa u nich objavujú prejavy starnutia. Defekty v bázevej excíznej reparácii nie sú príliš časté pri nádorových ochoreniach. Mutácie v *MUTYH* géne sú asociované so zvýšeným rizikom kolorektálneho karcinómu. Poruchy reparácie dvojreťazcových zlomov v DNA sa vyskytujú následkom mutácií *BRCA1* a *BRCA2* pri dedičnej forme karcinómu prsníka a ovárií. Iný príklad je mutácia *ATM* génu kódujúceho kinázu, ktorá spôsobuje neurodegeneratívne ochorenie ataxia teleangiectasia. Títo pacienti majú hypopláziu týmusu, spomalený psychomotorický vývoj, častejšie respiračné infekcie, problémy s artikuláciou a chôdzou.

Využite genomiky v onkológii

V roku 1986 americký biológ a nositeľ Nobelovej ceny Renato Dulbecco vyslovil názor, že nevyhnutným nástrojom, ktorý povedie k objasneniu génov zohrávajúcich úlohu v procese karcinogenézy, je kompletne osekvenovanie ľudského genómu. Dostupnosť genómových sekvencií spôsobila rozmach odboru nádorovej genomiky. Technológia sekvenovania novej generácie (NGS – z angl. next generation sequencing) umožňuje získať komplexnejší a detailnejší pohľad na vznik nádorového klonu, na to, ako nádorové bunky odpovedajú na liečbu a kedy dochádza k tvorbe metastáz. Ukázalo sa, že obavy z vysokej nákladovosti nových sekvenačných technológií neboli opodstatnené a tieto technológie priniesli do oblasti nádorovej genomiky revolúciu.

Technológie NGS napríklad odhalili, že aj gény, pri ktorých sa vôbec nepredpokladala úloha pri onkogenéze, sú v nádoroch často mutované. Priekopnícka štúdia v tomto smere bola publikovaná v roku 2008 v časopise Science. Autori zistili vysoký výskyt mutácií v *IDH1* géne u pacientov s malígnym gliómom. *IDH1* gén kóduje izocitrát dehydrogenázu 1, metabolický enzým, ktorý do doby publikovania tejto štúdie nebol v súvislosti s nádormi spájaný. Ďalšie práce pomerne častý výskyt mutácií v *IDH1* géne a v *IDH2* géne (*IDH2* gén je mitochondriálny homológ *IDH1* génu) potvrdili aj u iných typov nádorov. Genetická informácia nádoru je tvorená zmesou pôvodnej sekvencie pacienta a DNA s množstvom novo získaných menších alebo väčších zmien. Tieto technológie sú schopné identifikovať okrem zmien v génoch aj rozdiely v génovej expresii v nádoroch. Počet genetických zmien identifikovaných vďaka novým technológiám neustále rastie, veľkou otázkou však ostáva, aký je efekt týchto mutácií na organizmus. Nedávno bolo zistené, že dokonca aj synonymné mutácie (mutácie meniace sekvenciu v DNA, ale kvôli degenerácii genetického kódu nemenia aminokyseliny v proteíne) majú vplyv na funkciu proteínu. Program **Cancer Genome Project**, prebiehajúci na Wellcome Sanger Institute v Cambridge, identifikoval k aprílu 2017 viac ako 600 génov podieľajúcich sa na onkologických ochoreniach. Tieto gény boli zachytené pomocou sekvenovania novej generácie a ich počet a názvy sa zobrazujú na tejto webovej stránke: <http://cancer.sanger.ac.uk/census>. Celogenómové sekvenácie identifikovali u nádorov bodové mutácie v mnohých génoch vrátane *BRAF*, *PIK3CA*, *EGFR*, *HER2*, *JAK2*, *UTX* a *IDH1*. Niektoré z mutácií, ktoré boli objavené, boli jedinečné, iné mutácie boli nájdené u nádorov pomerne často. Objav týchto genetických zmien prispel k zlepšeniu pochopenia mechanizmu jednotlivých onkologických ochorení a hľadaniu nových protinádorových liekov. Každá podskupina nádorového ochorenia má charakteristický génový profil, bunkovú morfológiu, klinické prejavy, prognózu a možnosti pre cieľnú terapiu. Keďže nádorové bunky sú závislé od abnormálnych proteínov, vznikajúcich z mutovaných nádorových génov, stávajú sa cieľom pre vývoj nových protinádorových terapií.

Cieľená liečba

Princípom tejto stratégie je hypotéza, že prítomnosť jednotlivých molekulárnych markerov môže predvídať odpoveď na cieľnú terapiu individualizovanú na konkrétneho pacienta „na mieru

šitú“ liečbu (z angl. targeted therapy). Prvou účinnou a cielenou molekulárnou liečbou sa stal imatinib mesylát (Gleevec) inhibujúci proteínkinázy, vrátane kináz kódovaných génmi *ABL* a *KIT*, ktoré sú mutované a aktivované u pacientov s chronickou myeloidnou leukémiou a gastrointestinálnymi stromálnymi tumormi. U pacientok s karcinómom prsníka so zvýšenou expresiou génu *HER2*, ktorý kóduje transmembránový HER2 receptor, sa používa na liečbu monoklonálna protilátka proti extracelulárnej doméne HER2 – trastuzumab.

Prvé štúdie využívajúce technológiu NGS sekvenovali iba jednotlivé vzorky, postupne, ako klesala cena sekvenácií, sa stalo normou v publikáciách sekvenovať stovky vzoriek nádorových tkanív. To malo za následok získanie obrovského množstva dát a zvýšenie nárokov aj na bioinformatickú analýzu. Celogenómové analýzy odhalili značnú inter- a intratumorálnu heterogenitu, čo má za následok komplikáciu liečby pacientov s onkologickými ochoreniami. Štúdia skúmajúca rovnaké typy kolorektálneho karcinómu odhalila pomocou exómového sekvenovania značné rozdiely. Niektoré typy mutácií, ako napríklad mutácie v génoch *APC* a *TP53*, boli prítomné v oboch prípadoch. Veľké rozdiely však boli v passenger mutáciách. Komplexný pohľad do intratumorálnej heterogenity priniesla štúdia skúmajúca nádory obličiek. Exómová sekvenácia porovnávala vzorky biopsie primárneho nádoru a metastáz od jednotlivých pacientov. Bolo zistené, že len jedna tretina mutácií bola prítomná v metastáze aj v primárnom nádore v rámci jedného pacienta. Celoxómové a celogenómové štúdie viedli k identifikácii driver mutácií pri rôznych onkologických ochoreniach. Pre nádor prsníka sú typické mutácie génov *TP53*, *PIK3CA*, *ERBB2*, *MYC*, *FGFR1* a *GATA3*. V bunkách pacientov s kolorektálnym karcinómom sa našli často mutácie v génoch *APC*, *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA* a *FBXW7*. U glioblastómov sa zistili časté mutácie *PTEN*, *TP53*, *NF1* a *PIK3CA*. Pri nádoroch ovárií boli detekované mutácie *TP53*, *CSMD3*, *FAT3*, *NF1*, *BRCA1* a *BRCA2*. Pre melanóm sú typické mutácie *BRAF*, *NRAS*, *TP53* a *CCND1*. U pacientov s nádorom pľúc boli zistené časté mutácie génov *TP53*, *MLL2*, *PIK3CA*, *CDKN2A*, *NFE2L2* a *KEAP1*. Ukazuje sa, že je potrebné sekvenovať nielen exómy, ale aj nekódujúce oblasti. Štúdia na melanómoch ukázala, že u viac ako 70% pacientov s melanómom sa vyskytuje mutácia v promótorovej oblasti génu *TERT*, kódujúceho telomerázovú reverznú transkriptázu. Informácie o nádorovom genóme majú obrovský význam aj pri stanovovaní terapie. Pri väčšine nádorov totiž dochádza pri využití iba jedného terapeutického cieľa ku vzniku rezistencie. V štúdiách používajúcich RAF a MEK inhibítory u pacientov s melanómami s *BRAF* mutáciou došlo k ustápeniu ochorenia rýchlo, ale ochorenie zrecidivovalo znovu už v priebehu nasledujúcich mesiacov až roka. Riešením pri takýchto typoch nádorov by mohla byť kombinovaná terapia, kde sa použije viacero liekov súčasne. Matematické modelovanie ukazuje, že rezistencia nádoru voči terapii býva spôsobená existenciou malej subpopulácie nádorových buniek. Rezistencia sa po čase vyvinie u takmer každého pacienta s onkologickým ochorením liečeného cielenou terapiou alebo chemoterapiou. Je preto potrebná identifikácia terapeutických cieľov, ktoré budú predvídať nástup relapsu alebo vytvorenie rezistencie. Progresia nádorových ochorení preto predstavuje v súčasnosti najväčšiu výzvu v onkológii. To, že nádorové ochorenia vznikajú v dôsledku akumulácie mutácií, je dnes už plne akceptované. Otázkou však ostáva, čo tieto mutácie spôsobuje.

Nedávna štúdia vedená tímom Berta Vogelsteina z Johns Hopkins Kimmel Cancer Center spôsobila prevrat v oblasti onkológie. Táto štúdia tvrdí, že rakovinu spôsobujú v dvoch tretinách prípadov náhodné mutácie, ktoré vznikajú následkom náhodných chýb počas bunkového delenia. Táto štúdia rozdeľuje mutácie do troch skupín. Prvú skupinu vedci v práci publikovanej v roku 2015 v časopise Science označujú ako „H“ mutácie (z anglického výrazu heritage). Sú to dedičné genetické mutácie, ktoré sa vyskytujú v 5 percentách prípadov rakoviny. Príkladom takejto mutácie sú napríklad mutácie v *BRCA* génoch. Druhú skupinu mutácií predstavujú mutácie označované ako „E“ (z anglického výrazu environment). Tieto mutácie sú spôsobené prostredím a ovplyvňuje ich aj správanie človeka. Spôsobuje ich fajčenie, opaľovanie, pohyb, výživa, ale aj chemikálie v životnom prostredí. Poslednú skupinu mutácií predstavujú náhodné mutácie, vznikajúce následkom chýb počas bunkového delenia. Vedci ich v tejto práci označujú ako „R“ (po anglicky random). K náhodným mutáciám dochádza počas replikácie DNA neustále. Problém nastáva, ak je to mutácia v géne spôsobujúcom rakovinu. Nádorové ochorenie je jednoducho smola „due to bad luck“ pre pacienta. Podľa tejto štúdie by sa ľudia vôbec

nemuseli zamýšľať nad svojím životným štýlom. Vedci a nakoniec aj sám Bert Vogelstein uvádzajú, že aj keď značná časť nádorových ochorení vzniká v dôsledku náhody, je dôležité aby ľudia žili zdravo. Mnohým typom nádorových ochorení je totiž možné predchádzať. To neskôr v štúdií publikovanej v roku 2017 v časopise Science potvrdzuje aj tým Vogelsteina.

Pri onkologických ochoreniach u detí je počet mutácií podieľajúci sa na vzniku nádoru nižší. Genetická charakterizácia nádorov u dospelých je komplikovanejšia. Tu sa mutácií v porovnaní s nádormi u detí naakumulovalo viac a to zhoršuje rozlíšenie, ktoré mutácie sú „driver“ a ktoré „passenger“ pri jednotlivých typoch nádorov. Nová stratégia v liečbe nádorov sa označuje ako basket trial. Táto stratégia spočíva v liečbe zameranej cielene na typ špecifickej genetickej mutácie prítomnej v nádore, bez ohľadu na to, kde sa nádor vyskytuje. Napriek rastúcemu entuziazmu má tento prístup svoje limity. V štúdií publikovanej v roku 2015 Lopez-Chavez a kol. sledovali odpoveď na cieľnú liečbu pri pacientoch s nemalobunkovým nádorom pľúc, pri pacientoch s malobunkovým nádorom pľúc a nádormi štítnej žľazy, u ktorých boli charakterizované driver mutácie. Pacienti boli v tejto štúdií rozdelení do piatich skupín. V prvej skupine boli pacienti s *EGFR* (receptor pre epidermálny rastový faktor) mutáciami liečení erlotinibom. Erlotinib je molekula inhibujúca tyrozínkinázovú doménu intracelulárnej časti EGFR receptora. Selumetinub sa použil na liečbu pacientov s mutáciami v génoch *KRAS*, *NRAS*, *HRAS* alebo *BRAF*. Selumetinib je špecifický inhibítor MEK (mitogénon aktivovaná špecifická ERK kináza). Liek MK2206 (inhibítor kinázy Akt) sa použil pri zistení pozitivity na *PIK3CA*, *AKT* alebo *PTEN* mutácie. Lapatinib (blokátor tyrozín kinázovej intracelulárnej časti receptora HER1 a HER2) bol podávaný v prípade mutácií a amplifikácií *ERBB2* génu a sunitinib bol indikovaný u pacientov, ktorí mali v nádorových bunkách *KIT* alebo *PDGFRA* mutácie a amplifikácie. Sunitinib inhibuje tyrozínkinázy receptorov pre rastový faktor z doštičiek (PDGF), vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF), faktor kmeňových buniek (KIT), Fms podobnú tyrozínkinázu 3 (FLT-3), receptor faktoru stimulujúceho kolónie (CSF-1R) a receptor pre neutrofický faktor odvodený od gliových buniek (RET/GDNFR - glial cell line-derived neurotrophic factor receptor). Klinicky významná odpoveď však bola dosiahnutá len pri časti pacientov. Napríklad pri pacientoch s *EGFR* mutáciami, ktorí boli liečení erlotinibom, reagovalo na liečbu len 60% pacientov, pri 40% pacientov nedošlo k žiadnej odpovedi. To znamená, že u týchto pacientov sú ešte ďalšie mutácie, ktoré spôsobujú zlyhanie liečby. U pacientov s *RAS* alebo *RAF* mutáciami liečených monoterapiou selumetinibom sa nepodarilo dosiahnuť tzv. primárny endpoint - smrť z akejkoľvek príčiny. Dôležité je preto pozrieť sa na jednotlivé ochorenia komplexne. Pri pacientoch s malígnym melanómom dochádza ku klinickej odpovedi pri liečbe *BRAF* inhibítormi, ale v prípade rakoviny hrubého čreva, kde je takisto táto mutácia prítomná k odpovedi na liečbu *BRAF* inhibítormi nedošlo.

Imunoterapia

Pokrokom v liečbe nádorových ochorení je imunoterapia, ktorá prináša obrovské zmeny v liečbe nádorových ochorení. V nádorovom mikroprostredí dochádza k akumulácii regulačných T-lymfocytov, ktoré exprimujú molekuly označované ako tzv. „inhibítory strážnych bodov imunity“ (z anglického check point inhibitors). Ide hlavne o molekuly CTLA-4 (cytotoxický T-lymfocytový antigén 4), PD-1 a PD-L1, 2 (programmed cell death ligand 1, 2). Zablokovanie aktivity inhibítorov strážnych bodov imunity na regulačných T-lymfocytoch alebo na nádorových bunkách monoklonálnymi protilátkami vedie k prevahe aktivity cytotoxických lymfocytov, ktoré sa môžu uplatňovať v protinádorovej imunitnej reakcii.

V posledných piatich rokoch spôsobili monoklonálne protilátky ovplyvňujúce regulačné mechanizmy imunitnej odpovede v imunoterapii nádorov výrazný posun. Najnovšie štúdie s interleukínom-2 a s anti-CTLA-4 a anti-PD-1 monoklonálnymi protilátkami ukazujú, ako môže imunoterapia významne predĺžiť celkové prežitie pacientov s metastázujúcimi nádormi. CTLA-4 antigén

je prítomný na povrchu T lymfocytov. Táto molekula je negatívny regulátor adaptívnej imunitnej odpovede. Pri zablokovaní CTLA-4 dochádza k dlhšej a silnejšej aktivácii T lymfocytov a v ideálnom prípade k deštrukcii nádorového tkaniva cytotoxickými T lymfocytmi.

V roku 2011 bola schválená FDA plne humánna IgG1 monoklonová protilátka – Ipilimumab, viažuca sa selektívne na CTLA-4 antigén. Ipilimumab dokázal v monoterapii alebo v kombinácii s chemoterapiou signifikantne predĺžiť prežívanie pacientov s metastatickým melanómom. Dlhodobé dáta ukazujú, že pri liečbe ipilimumabom preživa po troch rokoch takmer 75% pacientov. Receptor programovanej bunkovej smrti PD-1 predstavuje v súčasnosti nádejnú cieľovú štruktúru v imunoterapii. Mechanizmom účinku je inhibícia primárne imunoinhibičného systému PD-1. Výsledkom je aktivácia T lymfocytov a posilnenie protinádorovej účinnosti imunitného systému.

Nivolumab je plne humánna monoklonová protilátka IgG4, inhibujúca PD-1. Monoterapia pacientov s nivolumabom preukázala veľmi dobré prežitie pri pacientoch s pokročilým štádiom melanómu. Po troch rokoch žilo ešte 41% chorých pacientov. Pembrolizumab je humanizovaná monoklonálna protilátka, takisto inhibujúca molekulu PD-1 u T lymfocytov. V roku 2014 bol tento liek schválený FDA na liečbu pokročilého malígneho melanómu pri pacientoch, kde zlyhala liečba prvej línie. Pembrolizumab sa v súčasnosti testuje ako nádejný liek aj pri iných typoch nádorov. V nedávno publikovanej štúdií sa však ukázalo, že u 25% pacientov s melanómom, ktorí podstúpili liečbu imunorezistencie nádorovej progresie je väčšinou neznámy.

Medzi onkologické ochorenia, pri ktorých sa v súčasnosti podáva imunologická liečba, patria pacienti s malígnym melanómom a s nemalobunkovým nádorom pľúc (ďalej NSCLC) vo vyšších klinických štádiách. Ak je melanóm diagnostikovaný včas, tak je ochorenie pomerne dobre liečiteľné, ale pacienti s pokročilým štádiom ochorenia majú horšie liečebné výsledky pri použití konvenčnej terapie. Preto liečba týchto prípadov predstavuje obrovskú výzvu v medicíne. V prípade lokalizovaného malígneho melanómu je 5-ročné prežívanie na úrovni približne 91% pacientov, v prípade metastatického ochorenia s lokoregionálnou metastázou (v blízkosti nádoru) približne 63% a v prípade ochorenia so vzdialenými metastázami len 15%. Pokroky v liečbe nastali až nedávno, a to vplyvom cielenej liečby zameranej proti najčastejšej mutácii *BRAF* génu, čo je výsledkom akumulácie poznatkov z biológie malígneho melanómu a rozvoja genetických metód.

Obrovský pokrok v liečbe melanómu nastal v roku 2011, keď sa objavila imuno-onkologická liečba, najprv ako súčasť klinických štúdií, dnes už ako jedna z možností reálnej onkologickej praxe. Imunoterapia sa ukazuje ako sľubná liečebná možnosť aj pre pacientov s NSCLC. Bronchogénny karcinóm patrí medzi nádory s najvyššou úmrtnosťou na svete. NSCLC (nemalobunkový pľúcny karcinóm) je najčastejším typom a tvorí asi 85% všetkých pľúcnych karcinómov. Napriek liečebným snahám je prežívanie pacientov s diagnózou NSCLC krátke. Väčšina pacientov je zachytená v pokročilom štádiu ochorenia a výsledky v liečbe sú následkom toho neuspokojivé. Chirurgická liečba je vhodná len pre 30% pacientov. Neskoré odhalenie je pri pacientoch s NSCLC problémom. Pri ostatných pacientoch je toto ochorenie zachytené, keď sú tu prítomné metastázy a liečba je potom komplikovanejšia. Štandardnú liečbu pokročilého nemalobunkového karcinómu pľúc predstavuje kombinovaná chemoterapia platinovým derivátom s cytostatikom. Cytostatická liečba je často spojená so závažnými nežiaducimi účinkami. Pri včasnom ale aj neoperovateľnom NSCLC sa aplikuje ako liečebná metóda rádioterapia. Napriek liečbe je celkové prežívanie pacientov s NSCLC veľmi nízke, preto je tu snaha o rozšírenie spektra terapie pri pacientoch s NSCLC, ktorá by viedla k efektívnejšej liečbe a zvýšeniu prežívania pacientov s týmto agresívnym ochorením. Výskumy v nádorovej biológii identifikovali viaceré molekulové ciele u pacientov s NSCLC. Pri cielenej liečbe je na rozdiel od klasickej chemoterapie menej nežiaducich účinkov, zvýšilo sa prežívanie pacientov v porovnaní s liečbou chemoterapiou a táto liečba je pacientmi dobre tolerovaná. Táto liečba však nedokáže pokryť celé spektrum pacientov a po čase sa pri mnohých pacientoch vyvinie rezistencia.

V posledných rokoch sme svedkami narastajúcej intenzity výskumu v oblasti imunoterapie karcinómu pľúc. Pri imunoterapii je cieľom podpora imunitného systému pacienta, aby mohol nádorové

bunky eliminovať. U NSCLC boli testované vakcíny obsahujúce antigény prítomné na nádorových bunkách. Bol testovaný celý rad vakcín pri rôznych štádiách NSCLC. Tieto štúdie však nespĺnili svoj cieľ predĺžiť život bez progresie v porovnaní s placebom. Ako sľubná sa ukazuje kombinácia použitia vakcín s inhibítormi kontrolných bodov imunitnej reakcie. V medzinárodnej štúdii porovnávannej bezpečnosť nivolumabu – monoklonová protilátka voči PD-1 s docetaxelom pri pacientoch s pokročilým skvamóznym NSCLC, ktorí progredovali počas prvej línie chemoterapie alebo po nej bolo pozorované zvýšené prežívanie pacientov. To bolo potvrdené aj ďalšou randomizovanou štúdiou.

Sľubné výsledky u pacientov s nemalobunkovým nádorom pľúc boli zistené aj pri použití pembrolizumabu, ďalšej monoklonovej protilátky inhibujúcej molekulu PD-1. Odpoveď na liečbu bola dosiahnutá pri 19,4% chorých. Pri pacientoch s expresiou PD – L1 vo vzorkách nádorového tkaniva viac ako 50% bola dosiahnutá odpoveď na liečbu pri 45,2% pacientov. Na základe týchto dát bol pembrolizumab registrovaný k liečbe NSCLC v októbri v roku 2015. Tento rok predstavuje míľnik v imunoterapii NSCLC. Pozitívna klinická štúdia dokazuje predĺženie prežitia pri použití nivolumabu a pembrolizumabu v porovnaní so štandardnou chemoterapiou. Po malígnom melanóme sa tak karcinóm pľúc stáva druhou malignitou, kde sa registrovala liečba protilátkou proti PD-1.

V októbri v tomto roku došlo k obrovskému prelomu v liečbe NSCLC. Pembrolizumab bol schválený na liečbu pacientov s metastázujúcim NSCLC, s expresiou PD-L1 vo vzorkách nádorového tkaniva viac ako 50% dokonca v prvej línii terapie. Je to obrovský krok vpred prinášajúci nádej v liečbe tohto ochorenia často končiaceho smrťou pacienta. Pembrolizumab bol schválený aj v druhej línii terapie pri pacientoch s pokročilým štádiom NSCLC s expresiou PD-L1 vo vzorkách nádorového tkaniva viac ako 1%. Imunoterapia sa ako potenciálne sľubná ukazuje aj pri iných typoch nádorov, ako je napríklad Hodgkinov lymfóm.

Neinvazívna analýza nádorových markerov

Voľná cirkulujúca DNA (cfDNA - z anglického cell free DNA) je DNA, ktorá sa vyskytuje voľne v krvnom obeh. U zdravých jedincov pochádza väčšina cfDNA identifikovaná v plazme z hematopoetických buniek. Okrem krvi bola prítomnosť cfDNA zistená v rozmanitých telových tekutinách, ako je moč, sliny, cerebrospinálny mok a pleurálna tekutina. Voľná cirkulujúca DNA má obrovský potenciál aj v klinickom využití pri prognóze nádorových ochorení. V tom prípade označujeme takúto DNA pochádzajúcu z nádoru ako cirkulujúcu nádorovú DNA (z angl. circulating tumor DNA, ctDNA). Už v roku 1977 bola popísaná zvýšená hladina cirkulujúcich nádorových DNA u pacientov s rôznymi typmi nádorov. Vyššie hladiny ctDNA boli zistené aj pri pacientoch s metastázujúcim ochorením. Zdrojom ctDNA môže byť apoptóza a nekróza nádorových buniek. Priemerná dĺžka cirkulujúcej nádorovej DNA je 134-144 bp, dĺžka nenádorovej voľnej cfDNA je 166 bp, čo korešponduje dĺžke DNA obtočenej okolo nukleozómu spolu s úsekom spojeným s histónom H1.

Okrem ctDNA sa v krvi pacientov s onkologickými ochoreniami vyskytujú aj cirkulujúce nádorové bunky. Tieto bunky je možné zachytiť v rôznych štádiách pomocou metód molekulárnej biológie alebo pomocou metód založených na detekcii antigénnych znakov protilátkami. V mnohých štúdiách bola detekcia CTCs spojená s nepriaznivou prognózou.

Po uvoľnení CTCs buniek z primárneho nádoru väčšina buniek v cirkulácii uhynie vplyvom nepriaznivého prostredia. Prežije len 1% buniek. Schopnosť tvoriť metastázy má len 0,1% z nich. Cirkulujúce nádorové bunky sú tvorené heterogénnou populáciou buniek. Pri metastázovaní nádoru sa nádorové bunky z primárneho nádoru musia oddeliť a púťovať do vzdialených miest. Diseminované nádorové bunky (DTCs, po anglicky - disseminated tumor cells) sú bunky usídlené v sekundárnych orgánoch, napríklad v pečeni, pľúcach alebo kostnej dreni. DTCs bunky môžu byť v kludovom stave aj niekoľko rokov po odstránení primárneho nádoru. Medzi CTCs bunky patria okrem spiacich

dormantných CTCs buniek aj apoptotické bunky. Jedným z antigénov, ktorý sa využíva na detekciu CTCs pomocou protilátok, je adhezívna molekula epitelových buniek (EpCAM). CTCs môžu byť identifikované aj protilátkami voči cytokeratínom. CellSearch™ (Veridex Corporation, Warren, NJ) imunofluorescenčný systém schválený FDA (Food and Drug Administration - Úrad pre kontrolu potravín a liečiv) je založený na detekcii EpCAM. Tento systém umožňuje zachytiť CTCs na základe expresie cytokeratínov 8, 18 alebo 19 a chýbajúcej expresie hematopoetických antigénov CD45.

Cirkulujúce nádorové bunky majú viacero klinických využití. CTCs sa dajú využiť ako markery prognózy nádorového ochorenia. Pri nádore prostaty bolo ukázané, že prítomnosť 5 a viac cirkulujúcich nádorových buniek v 7,5 ml krvi bola asociovaná s nepriaznivou prognózou ochorenia. Takýto počet CTC buniek v krvi pacientov bol stanovený ako hodnota spojená s kratším prežívaním aj pri nemalobunkovom (NSCLS) a malobunkovom karcinóme pľúc (SCLC) a pri pacientoch s karcinómom prsníka. CTCs bunky sa dajú využiť aj na sledovanie odpovede na liečbu u pacientov s nádorovými ochoreniami. Pri odpovedi na terapiu dochádza k poklesu počtu CTCs. Zníženie počtu CTCs bolo popísané po podaní chemoterapie napríklad pri pacientoch so SCLC, nádorom prostaty aj pri pacientoch s nádorom prsníka. Ak sa však množstvo CTC po podaní liečby zvýšilo, tak pri takýchto pacientoch bola prognóza ochorenia nepriaznivá. CTCs bunky sa môžu využiť aj ako prediktívny biomarker. Príkladom takéhoto využitia je analýza *KRAS* mutácie u pacientov s kolorektálnym karcinómom alebo detekcia *EGFR* mutácií u pacientov s NSCLC.

Neinvazívne analýzy cirkulujúcich nádorových buniek (circulating tumor cells) alebo cirkulujúcej nádorovej DNA označujeme ako tzv. **tekutá biopsia**.

Získavanie vzoriek konvenčnou biopsiou má viacero úskalí, medzi najzávažnejšie z nich patrí skutočnosť že ide o pacienta zaťažujúci invazívny zákrok, ktorý je navyše aj nákladným výkonom. V týchto prípadoch sa dá využiť cirkulujúca nádorová DNA (circulating tumor DNA, ctDNA). Pri bioptickom vyšetrení nie vždy je možné získať dostatočné množstvo materiálu na genetické analýzy, ďalším problémom je genetická heterogenita. Negatívom odberu bioptického materiálu je aj možnosť rozsevu nádorových buniek v trase, ktorou pôjde punkčná ihla. Zobrazovacie vyšetrovacie metódy spôsobujú ožiarenie pacienta. V porovnaní s týmito vyšetreniami má tekutá biopsia viacero výhod. Umožňuje skoré diagnostikovanie onkologického ochorenia, prognózu, reziduálnu chorobu, relaps ochorenia a opakovanie vyšetrení.

V roku 1989 Stroun a spoluautori ukázali, že niektoré voľne cirkulujúce DNA vyskytujúce sa v plazme pacientov s nádorovým ochorením pochádzajú z nádorových buniek. Mutácie génu *KRAS* boli zhodné s nádormi pľúc, pankreasu a kolorektálnymi tumormi pri porovnaní so vzorkami získanými zo stolice alebo spúta. Rovnaké mutácie v géne *KRAS* boli detekované v nádorovom tkanive u pacientov s rakovinou pankreasu ako aj v cfDNA izolovanej z týchto pacientov. Vyšetrovanie mutácií *KRAS* génu môže slúžiť ako prognostický faktor u pacientov s kolorektálnym karcinómom. Testovanie mutácií *EGFR* v plazme a sére sa ukazuje ako sľubné pri pacientoch s nádorom pľúc.

CtDNA sa dá použiť na analýzy pomocou alelovo-špecifickej DNA, digitálnu PCR ale aj celogenómovú sekvenáciu. Pri digitálnej PCR prebieha PCR reakcia v olejových mikrovapôčkach. Rozdelenie PCR reakcie do čiastkových PCR reakcií umožňuje absolútnu kvantifikáciu vzorky. Koncentrácia ctDNA koreluje s veľkosťou nádoru a so štádiom ochorenia. Pacienti s nižším štádiom nádorového ochorenia majú v plazme nižšie hladiny ctDNA v porovnaní s pacientmi s pokročilým stupňom nádoru a s horšou prognózou ochorenia. Výhoda tekutej biopsie je včasný záchyt ochorenia. CtDNA sa dá využiť na diagnostiku onkologického ochorenia. Pri pacientoch s kolorektálnym karcinómom boli detekované mutácie *KRAS* génu v ctDNA ešte pred nástupom ochorenia. *KRAS* mutácie boli popísané v ctDNA aj pri pacientoch s rakovinou pankreasu. CtDNA je možné použiť aj na stanovenie prognózy ochorenia. Koncentrácia ctDNA v plazme koreluje s veľkosťou tumoru a štádiom ochorenia. Štúdia, v ktorej bolo vyšetrených 640 pacientov s rôznymi typmi nádorov, ukázala 100-násobné zvýšenie koncentrácie ctDNA v štádiu IV v porovnaní so štádiom I onkologického ochorenia. Pacienti s detekovateľnou ctDNA majú horšiu prognózu v porovnaní s pacientmi bez ctDNA. Ďalším

príkladom využitia ctDNA je možnosť detekcie relapsu ochorenia a odpovede na liečbu. U pacientov s nádorom prsníka môže ctDNA slúžiť ako nástroj na ukázanie odpovede na chemoterapiu, takisto ctDNA identifikovala u týchto pacientov nástup relapsu. CtDNA je možné aplikovať aj na detekciu vzniku sekundárnej rezistencie, ktorá je pri pacientoch s onkologickými ochoreniami pomerne častým javom. Príkladom sú mutácie EGFR pri pacientoch s nádorom pľúc, vznikajúce po liečbe cieľovou terapiou. Tekutá biopsia nie je aplikovateľná na všetky typy nádorov. Pacienti s nádormi mozgu majú nízke hladiny ctDNA kvôli krvno-mozgovej bariére. Ako zdroj ctDNA sa dajú využiť aj iné tekutiny, ako je plazma. Zdrojom ctDNA je moč v prípade nádorov močového mechúra, prostaty a obličiek, stolica pri kolorektálnom karcinóme a karcinóme žalúdka a stery z krčka maternice pri cervikálnych nádoroch.

Analýza biopsie nemusí vždy odrážať úplnú skladbu nádoru kvôli nádorovej heterogenite. ctDNA pri tekutej biopsii, ktorá pochádza z rôznych zdrojov nádorových buniek v tele postihnutého pacienta, by mohla tento problém odstrániť. Schválenie používania tekutej biopsie EMA (European Medicines Agency - Európska lieková agentúra) a FDA na detekciu prítomnosti nádorov a jej využívanie v klinických štúdiách predstavujú míľnik v personalizovanej onkológii a otvárajú nové možnosti prinášajúce benefity pre pacientov s týmito závažnými ochoreniami. Aj napriek pokrokom v oblasti tekutej biopsie je potrebné si uvedomiť, že tieto vyšetrenia dopĺňajú konvenčné histologické vyšetrenie, ktoré má stále svoju nezastupiteľnú úlohu v diagnostike a manažmente liečby onkologických ochorení.

Zhubné nádory pľúc

Zhubné nádory pľúc patria k najčastejším onkologickým ochoreniam na svete. Každoročne postihne toto ochorenie 1,8 milióna ľudí a je príčinou smrti u 19,4 % pacientov s onkologickou diagnózou. Pomer postihnutia pohlaví s prevahou mužov sa postupne stiera, a čoraz viac žien trpí touto zákernou chorobou.

Etiologicky sa pri vzniku nádorov pľúc uplatňujú najmä fajčenie, znečistenie ovzdušia a expozícia karcinogénnym látkam pri určitých povolaniach (napr. kov ako chróm a nikel, rádioaktívne látky, azbest, silikón a iné).

Typickými **klinickými príznakmi** zhubného pľúcneho nádoru sú kašeľ, dýchavičnosť, bolesti alebo tlaky na hrudníku, hemoptýza alebo aj strata hlasu. Niekedy bývajú typické opakujúce sa pneumónie a strata hmotnosti. Metastatické nádory sa prezentujú príznakmi postihnutia daného orgánu, napríklad bolesťami kostí pri kostných ložiskách alebo neurologickými symptómami pri šírení do CNS. Niektoré pľúcne neoplázie môžu byť zdrojom produkcie rôznych aktívnych substancií a tak sa môžu prezentovať paraneoplastickými syndrómami z nadprodukcie najmä hormónov (napr. serotonin, parathormón, ACTH, iné).

Základným **zobrazovacím vyšetrením** v diagnostike pľúcnych nádorov je röntgen, nasledovaný počítačovou tomografiou (CT), magnetickou rezonanciou (MRI) a pozitronovou emisnou tomografiou (PET), ktoré je možné využiť aj pri stanovovaní rozsahu (tzv. stagingu) choroby. Jednoznačné potvrdenie tejto diagnózy však spočíva **v bioptickom vyšetrení** materiálu nádoru získaného pri bronchoskopii.

Medzi najčastejšie zhubné pľúcne nádory patria **karcinómy**, ktoré reprezentujú neoplázie vychádzajúce z epitelu, najmä priedušiek, preto sa zvyknú označovať aj ako **brochogénne karcinómy**.

Základné histologické rozdelenie karcinómov je na skupinu **nemalobunkových karcinómov** (NSCLC – „Non-Small Cell Lung Cancer“), predstavujúcu väčšinu (75 - 80%) pľúcnych karcinómov. Tu patria **spinocelulárny (resp. skvamózny) karcinóm**, vychádzajúci z metaplastického dlaždicového epitelu bronchov, a **adenokarcinóm**, vyrastajúci zo žľazového epitelu bronchov, bronchiolov alebo alveolov pľúc. Medzi adenokarcinómy patrí väčšie množstvo histologických podtypov, napríklad mucinózny (hlienotvorný) karcinóm, papilárny adenokarcinóm, solídny adenokarcinóm, veľkobunkový adenokarcinóm, adenoskvamózny karcinóm, sarkomatoidný karcinóm, a iné).

Zvyšok karcinómov tvoria nádory s neuroendokrinnou morfológiou, tu sú zaradené **malobunkový karcinóm** (SCLC – „Small Cell Lung Cancer“), veľkobunkový neuroendokrinný karcinóm, typický karcinoid a atypický karcinoid.

Malobunkové karcinómy sa v porovnaní s NSCLC vyznačujú rýchlejším rastom a vzdialeným metastázovaním už v čase diagnózy. Väčšina pacientov s SCLC je diagnostikovaná v pokročilom štádiu, kde už nie je šanca na chirurgickú liečbu a je potrebné využiť možnosti systémovej chemoterapie. Pri pacientoch s pokročilým SCLC je priemerné 5-ročné prežívanie menej ako 5% pacientov. V prvej línii liečby sa používa chemoterapia na báze platiny.

Prognosticky priaznivejšie sú spinocelulárne karcinómy, najmä ak v čase diagnózy sú v nižšom štádiu, o niečo horšiu prognózu majú adenokarcinómy.

Nádory pľúc sa vyznačujú vysokou mutačnou rýchlosťou. K detailnejšej charakterizácii jednotlivých podskupín pulmonálnych nádorov prispeli poznatky z molekulárnej biológie a stali sa tak súčasťou rutínnej diagnostiky prispievajúcej k zlepšeniu prežívania pacientov s nádorom pľúc. Mutácie, ktoré je možné ovplyvniť cieľovou molekulárnou terapiou, boli zistené pri 20-25% adenokarcinómov.

Medzi najviac preskúmané patria mutácie v *EGFR* géne, ktorý kóduje receptor epidermálneho rastového faktoru a translokácie génu *ALK*. Tieto genetické alterácie prispievajú k citlivosti nádorových buniek na molekuly ovplyvňujúce určité tyrozínkinázové receptory, napríklad erlotinib, gefitinib a afatinib v prípade mutácií *EGFR*, v prípade *ALK* prestavieb sú používané crizonitinib a ceritinib. Napriek zvýšeniu priemerného prežívania pacientov pomocou takejto biologickej cieľenej terapie u pacientov dochádza po určitom čase ku vzniku rezistencie na tieto molekuly. Najčastejšou mutáciou spôsobujúcou rezistenciu voči *EGFR* tyrozínkinázovým inhibítorm je Thre790Met mutácia v exóne 20, ktorú je však možné terapeuticky ovplyvniť molekulami tretej generácie *EGFR* tyrozínkinázových inhibítorov, ako je napríklad osimertinib.

Medzi ďalšie mechanizmy vzniku rezistencie patria amplifikácie *MET* a *EGFR* génu a mutácie v génoch *ALK* a *PIK3CA*. Okrem najbežnejších mutácií u NSCLC, ako sú *EGFR* a *KRAS* mutácie a prestavby *ALK* génu boli popísané aj mutácie v génoch *HER2*, *BRAF* a *MET* a fúzie v génoch *ROS1* a *NTRK1*. Vývoj nových tyrozínkinázových inhibítorov a lepšie pochopenie genetických zmien pomocou najnovších metód molekulárnej biológie by mohli výrazne prispieť ku skvalitneniu a predĺženiu života pacientov s karcinómom pľúc. Ako sľubná sa ukazuje pri pacientoch s nádorom pľúc aj imunoterapia. Tento typ terapie sa nezameriava na samotný nádor, ale na imunitný systém pacienta, ktorý podporuje za účelom eliminácie nádorových buniek vlastnými imunitnými bunkami. Na stanovenie dlhodobého efektu imunoterapie pri pacientoch s nádorom pľúc sú však potrebné ďalšie štúdie. Súčasťou trendov v diagnostike nádoru pľúc sa stáva aj technológia sekvenovania novej generácie a využite tekutej biopsie, ktoré zatiaľ iba dopĺňajú histopatologické vyšetrenie a v budúcnosti by mohli viesť aj ku predikcii úspešnosti terapie a určenia prognózy pacientov s pľúcnymi nádormi.

Kolorektálny karcinóm

Kolorektálny karcinóm (KRK) patrí medzi najčastejšie zhubné ochorenie na svete, postihujúce hrubé črevo a konečník, a má stále stúpajúcu tendenciu. Muži bývajú postihnutí o niečo častejšie ako ženy. Etiologicky sa pri vzniku KRK uplatňujú najmä nezdravá vysoko kalorická diéta a sedavý spôsob života, nasledované fajčením a požívaním alkoholu. Niektoré z chronických zápalových ochorení hrubého čreva môžu tiež prispievať ku zvýšenej náchylnosti na vznik KRK, patrí sem najmä ulcerózna kolitída a Crohnova choroba.

Niektorí pacienti s KRK sú asymptomatickí, u iných sa objavuje hematochézia a anémia, ktoré sa dajú ľahko zistiť pri pravidelných preventívnych kontrolách. U iných pacientov býva prítomná zmena vyprázdňovacích návykov, charakterizovaná striedaním niekoľko dňovej obstipácie s hnačkami. Medzi

ostatné symptómy patria nechutenstvo, strata hmotnosti a bolesti brucha. Základnými vyšetrovacími metódami sú kontrastná rádiografia, CT, MRI a PET, pričom najdôležitejšie je opäť endoskopické vyšetrenie (kolonoskopia, rektoskopia), ktoré poskytuje aj možnosť odberu vzorky na bioptickú analýzu.

Kolorektálne karcinómy sú **adenokarcinómy**, ktoré sa rozdeľujú z histologického hľadiska na viaceré podtypy. Najčastejším je „konvenčný“ kolonický typ adenokarcinómu, nasledovaný mucinóznym karcinómom. Ostatné typy predstavujú adenokarcinóm z prstencovitých buniek, adenoskvamózny karcinóm, „medulárny“ karcinóm a nediferencovaný karcinóm. Špeciálnou skupinou nádorov sú lézie z neuroendokrinných buniek, označované ako neuroendokrinné tumory (NET). Niektoré zo zhubných nádorov môžu vznikať na podklade prekursorových lézií hrubého čreva a rekta, ktoré označujeme ako adenómy. V prípade výskytu viacpočetných adenómov v hrubom čreve, najmä v nižšom veku, je potrebné zvážiť aj možnosť ich hereditárneho výskytu – familiárna adenomatózna polypóza.

Kolorektálny karcinóm je výsledkom viackrokového procesu. Toto ochorenie je v 80% prípadov **sporadické** a u 20% pacientov sa dedí predispozícia – v tom prípade hovoríme o dedičných nádoroch.

Hereditárne KRK sú asociované s mutáciami v génoch *APC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*. *APC* gén je lokalizovaný na 5 chromozóme v oblasti 5q21-q22 a reguluje prostredníctvom β -katenínu Wnt signálnu dráhu. *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2* gény zohrávajú úlohu v oprave replikačných poškodení v DNA, sú to tzv. „mismatch repair“ gény. Testovanie na tieto mutácie je odporúčané vo vysokorizikových rodinách so včasným nástupom ochorenia. Mutácie v týchto génoch vedú ku akumulácii zmien v iných génoch, ktoré nie sú následne opravené reparačnými mechanizmami a vedú ku abnormálnej proliferácii poškodených buniek. Tento opravný proces je dôležitý hlavne v črevnej sliznici.

Jedným z významných objavov v terapii KRK bolo zistenie prínosu EGFR inhibítora v liečbe pacientov s týmto ochorením. U týchto pacientov by sa mala realizovať molekulárne-biologická analýza v génoch *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* na prítomnosť mutácií. Na základe týchto výsledkov sa potom odvíja následná liečba zameraná proti receptoru pre EGFR, medzi najznámejšie molekuly patria panitumumab a cetuximab.

Mutácie *KRAS* a *NRAS*, spôsobujúce trvalú proteínovú aktiváciu v tumore, sú negatívnym prediktívnym biomarkerom pre anti-EGFR terapiu. U tejto skupiny pacientov je blokovanie monoklonálnou protilátkou proti EGFR receptoru neúčinné. Mutácie v géne *KRAS* sa vyskytujú pri približne 40% pacientov a *NRAS* mutácie sú prítomné pri 4-6% pacientov s KRK. Pri géne *KRAS* je najčastejšie mutovaný exón 2 (v kodónoch 12 a 13). Ďalšie časté mutácie onkogénov *RAS* sa vyskytujú v exóne 3 (v kodónoch 59 a 61) a v exóne 4 (v kodónoch 117 a 146). *BRAF* mutácie sa vyskytujú pri približne 10% pacientov s KRK. Prítomnosť *BRAF* mutácií je považovaná za nepriaznivý prognostický faktor. Pacienti s týmito mutáciami majú vysoké riziko návratu ochorenia a tvorby metastáz. *BRAF* a *RAS* mutácie sa pri týchto ochoreniach navzájom vylučujú. To znamená, že ak má pacient s KRK v nádorových bunkách *RAS* mutácie, nie sú tam prítomné mutácie v géne *BRAF*. Testovanie mutácií *RAS* je u týchto pacientov už súčasťou diagnostiky s následnou štandardnou liečbou monoklonálnou protilátkou. Metódy molekulárnej biológie prispeli aj u tohto typu nádorového ochorenia k posunu poznatkov a ku vytvoreniu liečby na mieru.

Zhubné nádory prsníka

Zhubné nádory prsníka sú najčastejšou rakovinou u žien, u ktorých tvoria takmer až štvrtinu všetkých onkologických diagnóz. Incidencia rakoviny prsníka má celosvetovo vzrastajúcu tendenciu, s postihovaním čoraz mladších vekových kategórií. V etiológii malígnych nádorov prsníka sa uplatňujú viaceré faktory, ako sú diéta, reprodukčné faktory a hormonálny status. Medzi rizikové faktory patria najmä skorý nástup menarché, nuliparita a neskorý vek pôrodu prvého dieťaťa. Nádory prsníka sa delia

do viacerých podskupín vzájomne sa líšiacich genetickým pozadím, prognózou a odpoveďou na liečbu. Ku zlepšeniu klasifikácie týchto ochorení prispeli aj poznatky v oblasti molekulárnej biológie.

Zhubné nádory prsníka nemusia mať špecifickú symptomatológiu, mnohokrát sa prezentujú iba ako hmatný tumor v prsníku, inokedy sa nájdu náhodne pri preventívnom vyšetrení, ktoré využíva okrem palpácie aj zobrazovacie metódy, najmä ultrasonografiu (USG) a mamografiu. V prípade podozrivého nálezu sa ďalej využívajú CT a MRI, ktoré umožnia aj stanovenie rozsahu ochorenia. Pokročilé nádory môžu erodovať kožný povrch prsníka, alebo sa prejavujú sekréciou či vtiahnutím bradavky. Boolestivosť zvyčajne nebýva typickým príznakom. Špeciálnym klinickým prejavom nádoru prsníka môže byť edém a začervenanie kože prsníka, vtedy hovoríme o tzv. inflamatórnom karcinóme.

Zhubné nádory prsníka tvoria pomerne heterogénnu skupinu ochorení, z ktorej sú najčastejšie karcinómy. Karcinómy prsníka (KP) je možné rozčleniť na dva základné typy: **duktálny karcinóm** a **lobulárny karcinóm**, ktoré oba môžu byť buď vo forme preinvazívneho (tzv. in situ) ochorenia ako aj v invazívnej podobe. Medzi ostatné špeciálne podtypy KP patria napríklad: tubulárny karcinóm, mucinózny karcinóm, papilárny karcinóm, kribriformný karcinóm, neuroendokrinný karcinóm, apokrinný karcinóm, metaplastický karcinóm, a iné (celkovo počet špeciálnych podtypov dosahuje takmer 40).

Karcinómy prsníka vznikajú akumuláciou genetických aberácií vrátane bodových mutácií, amplifikácií, delécií, duplikácií a translokácií. Väčšina nádorov prsníka vzniká akumuláciou genetických zmien v somatických bunkách, hereditárne formy tvoria iba 10% ochorení. Gény, ktoré zvyšujú náchylnosť na vznik rakoviny prsníka delíme do troch skupín, patria sem gény s vysokou, strednou a nízkou penetranciou.

Gény s vysokou penetranciou sú *BRCA1* a *BRCA2*. Zárodočné mutácie v týchto génoch zvyšujú riziko karcinómu prsníka 15 až 20 krát v porovnaní s populáciou, v ktorej tieto mutácie nie sú. Nádory pozitívne na *BRCA1* mutácie sa označujú ako „triple“ negatívne, čo znamená, že sú pri imunohistochemickom vyšetrení negatívne na estrogénový receptor, progesterónový receptor a na *HER2* (receptor ľudského epidermálneho rastového faktoru). *BRCA1* a *BRCA2* sú tumor-supresorové gény zohrávajúce úlohu pri oprave dvojreťazcových zlomov.

Príkladom mierne rizikového génu pri karcinóme prsníka je gén *CHEK2*. So zvýšeným rizikom karcinómu prsníka sú asociované aj mutácie ďalších génov ako je napríklad gén *PTEN* alebo *CDH1*.

Celogenómové asociačné štúdie („genome-wide association studies“), známe pod skratkou GWAS, viedli k identifikácii génov ako *FGRF2* kódujúcom fibroblastový rastový hormón, *RAD51L1*, a ďalších génov, ktorých mutácie zvyšujú riziko vzniku nádoru prsníka. Analýza polymorfizmov v signálnej kaskáde *TP53* viedla k identifikácii alelického variantu v pozícii 309 promótoru v *MDM2* géne, kontrolujúcom expresiu *TP53* génu. *MDM2* gén kóduje ubiquitín-ligázu, regulujúcu degradáciu p53. Vyššia expresia tohto génu spôsobuje zníženie hladiny aktívneho p53 proteínu.

Cielená terapia pri nádoroch prsníka ukázala obrovský efekt, aj keď ide len o určitú podskupinu pacientov. Trastuzumab je rekombinantná monoklonálna protilátka voči receptoru *HER2*, ktorá pri *HER2* pozitívnych tumoroch inhibuje proliferáciu nádorových buniek a vedie k predĺženiu života pacientok. Zvýšená expresia *HER2* sa však vyskytuje len pri 15-18% pacientok s karcinómom prsníka, v prípadoch bez *HER2* expresie je liečba transtuzumabom neúčinná.

Na základe štúdií profilovania génovej expresie boli stanovené základy pre tzv. **molekulovú klasifikáciu KP**, ktorá rozlišuje štyri podtypy nádorov: luminal A, luminal B, *HER2* pozitívne a basal-like karcinómy (označované aj ako „triple“ negatívne nádory).

Luminal A a B karcinómy vykazujú expresiu hormónových receptorov, luminal B navyše môže vykazovať aj expresiu *HER2* a expresia hormónových receptorov je v tomto type variabilnejšia ako u luminal A resp. je redukovaná. Luminal B karcinómy majú zvýšenú expresiu proliferačných génov a horšiu prognózu v porovnaní s luminal A karcinómami.

HER2 karcinómy majú zvýšenú expresiu *HER2* génu pri negativite hormónových receptorov.

Basal-like karcinómy majú nízku alebo žiadnu expresiu hormónových receptorov a HER2, býva tu prítomná mutácia v géne *TP53*. Basal-like karcinómy prsníka sú pomerne agresívne nádory s nepriaznivou prognózou.

V roku 2007 bol popísaný karcinóm prsníka typu „claudin-low“. Tento nádor je „triple“-negatívny a často metastázujúci už v čase diagnózy. Nádorové bunky sa podobajú kmeňovým bunkám a majú nízku expresiu adhézných molekúl.

Pred samotnou liečbou karcinómu prsníka je potrebné pri bioptickom vyšetrení okrem histologického typu a rozsahu ochorenia stanoviť prítomnosť estrogénových a progesterónových receptorov a HER2 v nádorových bunkách.

Pri „triple“-negatívnych nádoroch, medzi ktoré patria aj *BRCA1* a *BRCA2* pozitívne nádory, je nádejou liečba PARP inhibítormi. Enzým PARP (polymeráza polyADP-ribóza) sa podieľa na oprave jednovláknových zlomov v DNA pomocou výmeny báz. Pri zablokovaní PARP nádorové bunky nie sú schopné opraviť jednoreťazcové zlomy v DNA a tie sa následne menia na dvojreťazcové zlomy, ktoré sa za normálnych okolností opravujú homologickou rekombináciou. V homologickej rekombinácii zohrávajú úlohu proteíny kódované génmi *BRCA1* a *BRCA2*. Pri pacientkach s mutáciami *BRCA1* a *BRCA2* sa však následkom mutácií hromadí poškodenie v bunke a môže dôjsť až k zániku nádorovej bunky. Pri podávaní monoklonálnych molekúl olaparibu a inaparibu bolo pozorované zvýšené prežívanie pacientok s karcinómom prsníka. Olaparib bol podávaný samostatne a u inaparibu boli indikované aj gemcitanib a karboplatina.

Cenným nástrojom v diagnostike karcinómu prsníka je technológia sekvenovania novej generácie, ktorým môžeme detegovať veľké množstvo mutácií a alterácií. Technológia celoexómového sekvenovania a bioinformatických analýz umožňuje detegovať driver mutácie, hotspot mutácie (to sú mutácie, ktoré vznikajú v genóme častejšie) a oblasti, ktoré sú potenciálnym cieľom pre terapiu. Na všetky tieto vyšetrenia je potrebné získať vzorku z nádoru, najideálnejšie v „čerstvom“ nefixovanom stave. Nevýhodou je, že nie vždy je to možné a takisto nám biopsia nádoru neposkytne informácie o heterogenite nádoru. Preto pri tomto ochorení by mohla byť nádejou, prispievajúcou ku včasnej detekcii nádorových buniek tekutá biopsia. Z nedávnych štúdií sa ukazuje, že technológie sekvenovania novej generácie sú schopné detegovať somatické mutácie v cirkulujúcej nádorovej DNA a môžu byť spoľahlivým náhradným markerom, ktorý identifikuje heterogenitu nádoru a vývoj mechanizmov rezistencie. Tekutou biopsiou boli detekované aj somatické mutácie v génoch *TP53* a *PIK3CA*, prítomné aj v primárnom nádore. *PIK3CA* mutácie spôsobujú rezistenciu na transtuzumab a zhoršujú prognózu pri liečbe karcinómu prsníka. V iných prácach sa zistilo, že mutácie detekované v tekutej biopsii sa v primárnom nádore pri karcinóme prsníka nedetekovali. To odráža skutočnosť, že tekutá biopsia má neoceniteľný význam pri sledovaní nádorovej heterogenity a v budúcnosti sa bude čoraz viac využívať aj pri diagnostike a sledovaní úspešnosti liečby nádorov prsníka.

Karcinóm prostaty

Karcinóm prostaty patrí medzi najčastejšie onkologické ochorenia u mužov. Na Slovensku je ročne diagnostikovaných 1000 – 1200 prípadov. Častejšie postihuje starších mužov. Incidencia tohto ochorenia je na vzostupe, čo možno vysvetliť skriningovým vyšetrením prostatického špecifického antigénu (PSA) z krvi. Etiologicky sa uplatňujú najmä hormonálne faktory, menej dôležitý vplyv na vznik karcinómu prostaty majú diétne faktory či životný štýl.

Väčšina pacientov s rakovinou prostaty je asymptomatická, ochorenie sa zistí iba na základe vyšetrenia hladiny PSA, kedy sa pri jej zvýšení indikuje palpačné vyšetrenie a biopsia prostaty. Pri väčších nádoroch môžu byť prítomné príznaky ako pri hyperplázii prostaty, najmä častejšie močenie,

obtiažne močenie, pri erodovaní sliznice močového mechúra nádorom sa môže vyskytnúť hematúria, pri infiltrácii rekta sa objaví krv v stolici. Niektorí pacienti sa prezentujú až v štádiu metastatickej choroby, s nálezom zväčšených lymfatických uzlín (niekedy až v supraklavikulárnej oblasti), s bolesťami v kostiach a kĺboch alebo príznakmi pľúcneho postihnutia.

Na diagnostiku tohto ochorenia sa používa okrem už spomínanej sérovej hladiny PSA najmä palpácia, transrektálna USG, CT a MRI. Pri určení stagingu choroby je veľmi užitočné vyšetrenie PET. Najdôležitejšie v diagnostickom algoritme je bioptické vyšetrenie nádoru formou core-cut biopsie alebo transuretrálnej resekcie prostaty.

Najčastejším nádorom v prostate je acinárny adenokarcinóm, zriedkavejšími podtypmi sú duktálny karcinóm a neuroendokrinný karcinóm.

Dedičnosť sa pri rakovine prostaty vyskytuje v približne 10% prípadov. Zvýšené riziko karcinómu prostaty bolo popísané u mužov s mutáciami v géne *BRCA2*. U ostatných pacientov vzniká toto ochorenie v dôsledku mutácií získaných v somatických bunkách v priebehu života. Vo včasných štádiách ochorenia sú nádorové bunky androgén dependentné. Tento fakt sa využíva aj pri terapii v počiatočnom štádiu ochorenia. Neskôr sa však nádor stáva nezávislým od androgénov a blokovanie androgénov prestáva byť efektívne. Metódy celogenómovej sekvenácie identifikovali genetické aberácie charakteristické pre tieto ochorenia. Kým pri väčšine onkologických ochorení sú časté bodové mutácie, pre karcinóm prostaty sú typické rozsiahle génové prestavby a zmeny v počte kópií. To má za následok stratu jedného alebo oboch tumor-supresorových génov ako sú *PTEN*, *NKX3.1*, *TP53* a *CDKN1B* a prestavby *ERG* génu a *SPOP* mutácie. Najčastejším fúznym génom pri karcinóme prostaty je prestavba *TMPRSS2-ERG*. Táto fúzia ovplyvňuje expresiu ETS transkripčných faktorov. ETS transkripčné faktory sú evolučne konzervované a ovplyvňujú bunkovú proliferáciu, apoptózu, hematopoézu a diferenciáciu. Nádory, ktoré sú ETS pozitívne, majú horšiu prognózu a častejšie metastázujú v porovnaní s ETS negatívnymi nádormi. U ETS pozitívnych nádorov sú aj častejšie chromozómové prestavby. Nádory s fúznym génom *TMPRSS2-ERG* sú pomerne agresívne a nezávislé od androgénov. Ďalšími mutáciami, ktoré boli popísané pri nádoroch prostaty, sú mutácie v génoch *SPOP*, *FOXA1* a variácie počtu kópií v génoch *MYC*, *RB1*, *PTEN* a *CHD1*. Pri karcinóme prostaty bola popísaná hypermetylácia viacerých génov. Jedným z takýchto génov je aj *GSTP1*, kódujúci glutatión S-transferázu triedy fí. Proteín kódovaný týmto génom zohráva úlohu pri detoxifikácii buniek premenou lipofilných metabolitov na lipofóbne. Medzi ďalšie gény, ktorých promótorová hypermetylácia bola popísaná pri karcinóme prostaty, patria gén *APC*, spôsobujúci familiárnu adenomatóznu polypózu, gén *MDR1* kódujúci P-glykoproteín spôsobujúci liekovú rezistenciu, gény *E-cadherin* a *TIG1* podieľajúce sa na adhézii buniek, gény kódujúce receptory steroidných hormónov *ERα*, *ERβ*, *RARB*, gény *PTGS2/COX2* podieľajúce sa na zápale a gén *CRBP1* zohrávajúci úlohu v apoptóze. Detekcia metylácie génov by mohla byť vhodným biomarkerom včasného záchytu ochorenia ako aj potenciálnym cieľom pre liečbu.

Malígny melanóm

Malígny melanóm (MM) kože je onkologické ochorenie s heterogénnou etiológiou a trvalo stúpajúcou incidenciou. Je to nádor, ktorý vzniká malígnou premenou melanocytov, buniek bazálnej vrstvy epidermis, ktoré tvoria pigment melanín. MM je z prognostického a prediktívneho hľadiska závažné ochorenie s možnosť metastázovania aj po mnohých rokoch. Etiologicky sa pri vzniku MM uplatňuje hlavne expozícia UV žiareniu, ktorá má kumulatívny charakter, najmä v kombinácii s endogénnymi faktormi (bledý typ pokožky, imunodeficit, genetická predispozícia).

MM sa prejavuje ako zväčšujúca sa pigmentová lézia alebo nodul na koži, resp. na sliznici, s variabilným pigmentovaním, s možným krvácaním, svrbením alebo aj bolestivosťou. Často majú lézie typu MM nepravidelné okraje. Diagnóza MM patrí do rúk skúseného onkodermatológa, ktorý na základe dermatoskopického vyšetrenia dokáže stanoviť vysokú suspekciu na MM a odoslať pacienta na jeho extirpáciu s následným bioptickým vyšetrením nádoru.

Z histologického hľadiska rozlišujeme dva základné typy MM, a to superficiálne sa šíriaci MM a nodulárny MM. Medzi menej časté patria lentigo maligna, akrálny lentiginózný melanóm, dezmoplastický melanóm, névoidný melanóm a iné.

S rozvojom genetických metód sa rozšírili poznatky aj v oblasti biológie MM. Pri jeho vzniku sa uplatňuje najmä interakcia faktorov z prostredia a genetická náchylnosť. Melanómy rozdeľujeme u Kaukazoidnej populácie do dvoch subtypov. Prvým sú melanómy bez chronického poškodenia slnkom označované ako **non-CSD** („non chronically sun damaged“). Druhým typom sú mutácie spôsobené slnečným žiarením a označujú sa ako **CSD** („chronically sun damaged“). Tieto dve skupiny sa vzájomne odlišujú prítomnosťou driver mutácií. Pri non-CSD melanómoch je častá mutácia *BRAF* p.V600E. Zvýšené riziko vzniku melanómu bolo zistené pri mutáciách v géne *CDKN2A* a *CDK4*. Gény s nízkou penetranciou spôsobujúce náchylnosť na melanóm ovplyvňujú pigmentáciu kože. Patria medzi ne gény *SLC45A2*, *TYR*, *RB1*, *MC1R*, *OCA2*, *MITF* a *ASIP*. Priekopníckou štúdiou bolo zistené, že pri MM sú pomerne časté mutácie v nekódujúcich regulačných oblastiach génu *TERT* kódujúceho enzým telomerázu. Tento objav je zaujímavý z toho hľadiska, že patogénne mutácie môžu byť lokalizované aj v nekódujúcich oblastiach genómu. Ďalšími génmi, ktoré sú často mutované, sú gény ovplyvňujúce bunkovú proliferáciu (*BRAF*, *NRAS* a *NF1*). Mutácie v génoch *RAS* a *NF1* sú charakteristické pre CSD melanómy. Gén *BRAF* je dôležitým terapeutickým cieľom a je mutovaný u 50% melanómov. V 80% prípadoch *BRAF* mutácií ide o *BRAF* p.V600E mutáciu. Gén *BRAF* je člen MAPK (mitogénom aktivovaná proteínkináza) signálnej dráhy, regulujúcej bunkový rast, delenie, diferenciáciu a apoptózu.

Na liečbu melanómu sa štandardne využívajú inhibítory *BRAF* mutácie vemurafenib a dabrafenib. Príkladom ďalších mutácií opísaných pri MM sú genetické zmeny postihujúce gény regulujúce bunkový metabolizmus a rast (*PTEN* a *KIT*), bunkovú identitu (*ARID2* – proteín obsahujúci interaktívnu doménu bohatú na AT nukleotidy) a apoptózu (*TP53*). Niektoré zo spomínaných mutácií zohrávajú úlohu aj v metastázovaní nádorových buniek. Z celogenómových sekvenácií u pacientov s MM bola zistená aj prítomnosť mutácií v génoch *RAC1*, *PPP6C* a *STK19*. Mutácie v spomínaných génoch by mohli byť tzv. „driver“ variácie, ktoré sú rozhodujúce pre onkogenézu a poskytujú nádorovým bunkám selektívnu výhodu. S tvorbou metastáz korelujú mutácie v géne *CDKN2A*. Ďalšími génmi sú členovia chromatín remodelujúceho SWI/SNF komplexu, najmä gény *ARID2* a *ARID1A*. Mutácie v géne *TP53* sú nájdené u približne 20% metastázujúcich melanómov. To naznačuje, že ku vzniku týchto mutácií dochádza neskôr. Takisto ako aj ku mutáciám v géne *PTEN*, ktoré boli nájdené až u hrubších a metastázujúcich melanómov. Nádejou v terapii MM môže byť aj ovplyvnenie epigenetických zmien. Medzi gény s vyššou hypermetyláciou patria hlavne *RIL*, *ECAD*, *RASSF1A*, *NKX2-2*, *OLIG2* a *HAND1*. Pochopenie evolúcie melanómov povedie k zlepšeniu záchytu, diagnostiky a liečby tohto ochorenia. Pri tomto ochorení sa ukazuje ako obrovská nádej v posledných rokoch liečba pomocou imunoterapie.

III. Metódy molekulovej genetiky

Izolácia nukleových kyselín

Dôležitým krokom pri molekulovo-genetických analýzach je izolácia nukleových kyselín. Nukleové kyseliny musia byť vyizolované v dostatočnom množstve a čistote, aby bolo vhodné s nimi naďalej pracovať. Pre úspešnú purifikáciu nukleových kyselín je potrebné odstrániť z cieľovej nukleovej kyseliny iné nukleové kyseliny – napr. pri izolácii RNA je nevyhnutné zbaviť eluát molekúl DNA a naopak, ale aj proteínov, lipidov, karbohydrátov a pod. Nukleové kyseliny môžu byť izolované z rôznych biologických materiálov (krv, krvné bunky, plazma, zaschnutá krv, sliny, moč, biopsia, bunková kultúra a iné). Dôležité je dodržanie odberových postupov, keď napr. pri izolácii nukleových kyselín z periférnej krvi alebo kostnej drene, je nutný odber do skúmavky potiahnutej na vnútornej strane EDTA (etylén-diamino-tetraoctová kyselina) na zabránenie zrážania krvi. DNA molekula je relatívne stabilná v porovnaní s RNA. Pri izolácii je však potrebné zabrániť vstupu aktívnych nukleáz do roztoku s DNA, aby sa zabránilo degradácii DNA. Vo vodnom roztoku dochádza ku kyslej hydrolýze DNA, preto sa na jej

uchovávanie odporúča radšej alkalický pufo, ako je napríklad TE pufo alebo komerčné pufre, ktoré sú dodávané s kitmi na izoláciu DNA. TE pufo obsahuje látku Tris (tris(hydroxymetyl)aminoetán) a EDTA. Izoláciu DNA alebo RNA môžeme rozdeliť do štyroch krokov: rozbitie bunky (disrupcia), lýza bunky, odstránenie proteínov a nečistôt, ako sú soli, fenol, etanol a detergenty, a posledným krokom je získanie RNA alebo DNA. Proteíny a nečistoty sa dajú pri izolácii nukleových kyselín odstrániť rôznymi spôsobmi. Jedným z nich je použitie organických zlúčenín, ako je fenol, chloroform a izoamylalkohol. Je tu dôležitá koncentrácia solí a pH. Nečistoty sú oddelené do organickej fázy a DNA alebo RNA ostáva vo vodnej fáze. Nukleové kyseliny sa získajú alkoholovou precipitáciou a následnou centrifugáciou. Táto metóda využíva toxické zlúčeniny a je časovo náročná. Inou metódou odstraňujúcou proteíny a nečistoty je gradientová centrifugácia v céziu chloride (CsCl). Pri tomto postupe sú bunky lyzované detergentom, lyzáť je precipitovaný alkoholom. Resuspendovaná DNA je zmiešaná s CsCl a etídiumbromidom (EtBr) a centrifugovaná niekoľko hodín. Prúžok DNA je lokalizovaný v centrifugačnej skúmavke, extrahovaný izopropanolom (odstraňuje EtBr) a potom precipitovaný etanolom, v ktorom je DNA. Touto metódou sa získa DNA vysokej kvality, ale je časovo náročná a drahá a nie je vhodná na rutinné používanie. Jednoduchou, rýchlou, spoľahlivou a lacnou technológiou je metóda využívajúca oxid kremičitý. Princípom tejto metódy je selektívna adsorpcia DNA na gél oxidu kremičitého v prítomnosti vysokých koncentrácií chaotropných solí. V tejto metóde sa využívajú počas lýzy optimalizované pufre. Na kremičitanovom géli je absorbovaná len DNA, bunkové proteíny a metabolity ostávajú v roztoku a sú postupne vymývané. DNA je eluovaná z membrány pomocou pufov s nízkou koncentráciou solí a je vhodná na okamžité použitie.

Stanovenie množstva, čistoty a kvality nukleových kyselín

Koncentráciu a čistotu nukleových kyselín možno zistiť rôznymi spôsobmi. Jedným spôsobom je meranie spektrofotometrom. Nukleové kyseliny absorbujú UV žiarenie s maximom absorbancie v oblasti vlnovej dĺžky okolo 260 nm. Z hodnôt optickej hustoty sa dá stanoviť koncentrácia a čistota vzoriek podľa empirických vzťahov. Meranie koncentrácie prebieha pri vlnových dĺžkach 260 a 280 nm. To umožní hodnotenie čistoty vzorky, očakávané pomery sú 1.8 pre DNA a 2.0 pre RNA. Pomer absorbancií 260/280 menší než 1,75 svedčí pre obsah kontaminujúcich bielkovín. V prípade vyššieho obsahu nečistôt sa vzorka znovu reprecipituje. Klasický spektrofotometer meria celé spektrum žiarenia, zvyčajne UV žiarenie a spektrum viditeľného svetla. Vzorky sú merané v kyvetách. Nevýhodou týchto prístrojov je nutnosť používania kyviet a časová náročnosť merania koncentrácie. Ďalším typom spektrofotometra je Nanodrop. Výhodou tohoto prístroja je meranie koncentrácie nukleových kyselín bez nutnosti používania kyviet. Vzorku nie je potrebné pred meraním riediť. Postačuje aj 1 mikroliter vzorky, ktorý sa nanáša medzi optické povrchy, ktoré regulujú výšku stĺpca kvapaliny (vzorky). Koncentráciu nukleových kyselín je možné stanoviť aj pomocou mikrofluorometru. Príkladom takéhoto prístroja je fluorometer Qubit®, ktorý umožňuje presnú kvantifikáciu nukleových kyselín s využitím špecifického fluorescenčného značenia.

PCR – polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia (PCR - z anglického polymerase chain reaction) je technika umožňujúca namnožiť cieľový úsek DNA bez pomoci buniek. Pred jej objavením bol jediný spôsob namnoženia DNA vnesenie do plazmidu baktérie a klonovanie. PCR reakcia prebieha v prístrojoch termocyklero, meniacich teplotu v požadovaných časových intervaloch podľa zvoleného programu. Pred objavením termocyklieru sa museli skúmavky prenášať medzi jednotlivými vodnými kúpeľmi

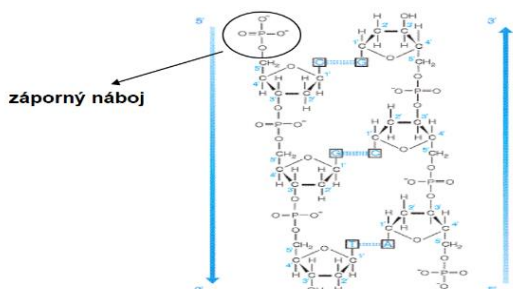
s rôznou teplotou. Bolo to nepraktické a časovo náročné. Prielomom v PCR technológii bolo aj objavenie termostabilnej DNA polymerázy, pochádzajúcej z baktérie žijúcej v termálnych prameňoch Yellowstoneského národného parku. Dovtedy sa používal Klenow fragment DNA polymerázy I získaný z baktérie *Escherichia coli*, ktorý teploty okolo 95°C nevydržal. Preto sa musel pridávať pred každým cyklom. PCR vymyslel v roku 1983 kalifornský vedec Kary Mullis, ktorý za svoj objav dostal v roku 1993 Nobelovu cenu. Pri tejto metóde sa cyklicky opakujú tri kroky: denaturácia DNA vlákna, naviazanie primerov (označované anglickým termínom annealing) a elongácia DNA vlákna. Pri PCR reakcii je potrebné poznať aspoň časť sekvencie, ktorú chceme naamplifikovať, aby sme mohli navrhnúť primery. Pri denaturácii dochádza k oddeleniu oboch reťazcov DNA rozpadnutím vodíkových väzieb v dôsledku zahriatia reakčnej zmesi na teplotu 90-98°C podľa typu použitej polymerázy. Druhým krokom je ochladenie zmesi na 50-65°C. Ochladenie umožní primerom naviazať sa na cieľový úsek DNA vodíkovými väzbami podľa pravidiel komplementarity. V treťom kroku dochádza k syntéze DNA vlákna pomocou enzýmu DNA polymerázy podobne, ako tomu je pri replikácii DNA. Tá polymeráza pridáva nukleotidy k voľným 3' - koncom primerov. Tento tretí krok (elongácia) prebieha zvyčajne pri teplote 72°C. Počas PCR reakcie sa množstvo utvorených reťazcov DNA zvyšuje exponenciálne. Zložky reakčnej zmesi PCR reakcie sú: templátová DNA, termostabilná Taq polymeráza, primery, reakčný pufo, dvojmocné katióny $MgCl_2$ a PCR voda. Templátová DNA obsahuje sekvenciu, ktorú chceme pomocou PCR namnožiť - amplifikovať. Termostabilná Taq polymeráza syntetizuje nové vlákno DNA pridávaním voľných deoxynukleotidtrifosfátov, $MgCl_2$ ióny slúžia ako kofaktor Taq polymerázy. Primery sú krátke jednoreťazcové oligonukleotidy DNA, ohraničujúce požadovaný amplifikovaný úsek DNA, a pufo zabezpečuje optimálne pH a chemikálie potrebné pre činnosť Taq polymerázy. Po PCR reakcii môžeme vytvorené produkty vizualizovať a separovať elektroforeticky. PCR reakcia má aj viaceré varianty ako sú touchdown PCR, nested PCR, RT-PCR, alelovo-špecifická PCR a PCR v reálnom čase.

Pri **touchdown PCR** sa annealingová teplota zvolí vyššia ako bola vypočítaná pre nasadenie primerov. Zvolená annealingová teplota sa znižuje v každom cykle. Týmto postupom sa uprednostňuje amplifikácia špecifických produktov. **Nested PCR** pozostáva z dvoch krokov. V prvom kroku sa amplifikuje vybraný dlhší úsek DNA. V druhom kroku je templátom produkt z prvého kroku s druhým párom primerov. Výsledkom je kratší PCR produkt. Táto metóda zvyšuje citlivosť PCR. V multiplex PCR sa využíva viac primerových párov, čím sa amplifikuje viacero DNA úsekov súčasne. Pri RT-PCR je východiskovou nukleovou kyselinou RNA, ktorá sa najskôr musí prepísať do cDNA prostredníctvom enzýmu reverznej transkriptázy a cDNA sa použije ako templát pre PCR. **Alelovo-špecifická PCR** využíva na detekciu mutácie primery s odlišnou sekvenciou na 3'koncoch. Jeden primer detekuje mutáciu, druhý primer detekuje sekvenciu bez mutácie. PCR reakcia neprebehne, ak 3'koniec nie je komplementárny ku templátovej DNA. PCR v reálnom čase bude detailnejšie popísaná neskôr v texte. PCR reakcia má veľa aplikácií. Môžeme pomocou nej zisťovať prítomnosť mutácií a polymorfizmov asociovaných s genetickými ochoreniami. Príkladom využitia PCR je aj identifikácia prítomnosti patogénnych baktérií alebo vírusov.

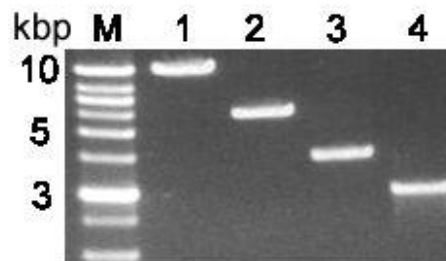
Elektroforéza nukleových kyselín

Elektroforéza je základná separačná metóda nukleových kyselín ako sú RNA a DNA. Obidve molekuly sú pri neutrálnom pH záporne nabité a pohybujú sa v elektrickom poli ku kladnej elektróde. Fragmenty nukleových kyselín sa separujú podľa veľkosti. Kratšie fragmenty sa pohybujú v elektrickom poli rýchlejšie ako dlhšie úseky nukleových kyselín. Najčastejším typom elektroforetického média je agaróza, ktorej koncentrácia sa volí podľa veľkosti fragmentov, ktoré majú byť separované. Druhým najčastejším elektroforetickým médiom je polyakrylamidový gél, ktorý je vhodný aj na separáciu malých fragmentov. Elektroforéza umožňuje priamu detekciu fragmentov nukleových kyselín v ultrafialovom svetle pomocou farbenia interkalačným činidlom etídiumbromidom. Etídiumbromid je mutagénna

látka, preto je dôležité pri práci s ním používať rukavice. Fragmenty nukleových kyselín sa vizualizujú pomocou transiluminátora s UV žiarením. Veľkosť produktov sa dá zistiť použitím štandardných DNA markerov so známymi molekulovými hmotnosťami nanesených na elektroforetický gél.



Obr. 18 Negatívny náboj DNA

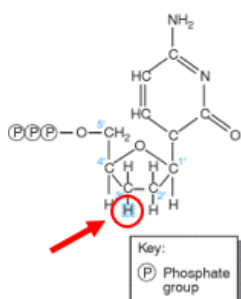


Obr.19 Ukážka vizualizácie gélu po gélovej elektroforéze (vľavo DNA marker (M) – DNA rebrík, vpravo vzorky)

Sekvenácia nukleových kyselín

Táto metóda nám umožňuje určiť sekvenciu (poradie) nukleotidov vo vlákne DNA. Pre sekvenovanie boli vyvinuté dve metódy. Chemická metóda bola popísaná Allanom Maxamom a Walterom Gilbertom na prelome rokov 1976-77. Dideoxynukleotidová terminačná metóda bola zavedená Frederickom Sangerom v roku 1977. Dnes z týchto dvoch uvedených metód prevláda Sangerova sekvenácia. V roku 1980 boli Walter Gilbert a Frederic Sanger ocenení za tieto objavy Nobelovou cenou za chémiu. Kedysi sekvenácia prebiehala v štyroch oddelených skúmavkách, ktorých obsah sa líšil len v tom, že v každej skúmavke bol iný dideoxynukleotid. V priebehu DNA syntézy sú do rastúceho reťazca pridávané pomocou polymerázy nukleotidy. Avšak občas sa môže do rastúceho vlákna zaradiť miesto nukleotidu dideoxynukleotid. Tým dochádza k zastaveniu reakcie. Dideoxynukleotidy totiž nemajú na rozdiel od deoxynukleotidov na 3'-konci OH skupinu, na ktorú by sa pripájal ďalší nukleotid. Výsledkom reakcie bude zmes nových vlákien, ktoré budú rôzne dlhé, podľa toho, v ktorej pozícii sa syntéza zastavila.

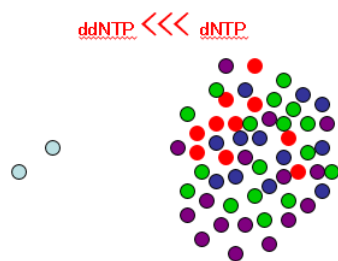
Dideoxynukleotidtrifosfát
(v tomto prípade ddCTP)



Deoxynukleotidtrifosfát
(v tomto prípade dCTP)

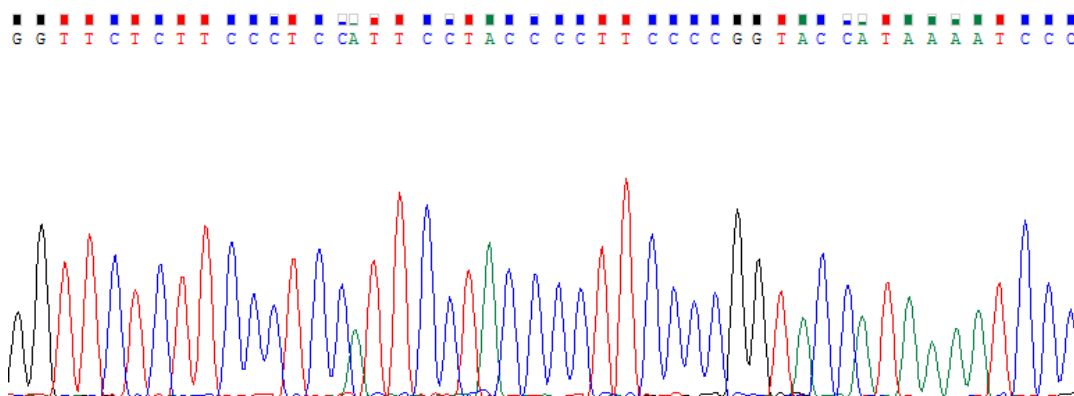


Obr. 20 Štruktúra dideoxynukleotidu a deoxynukleotidu

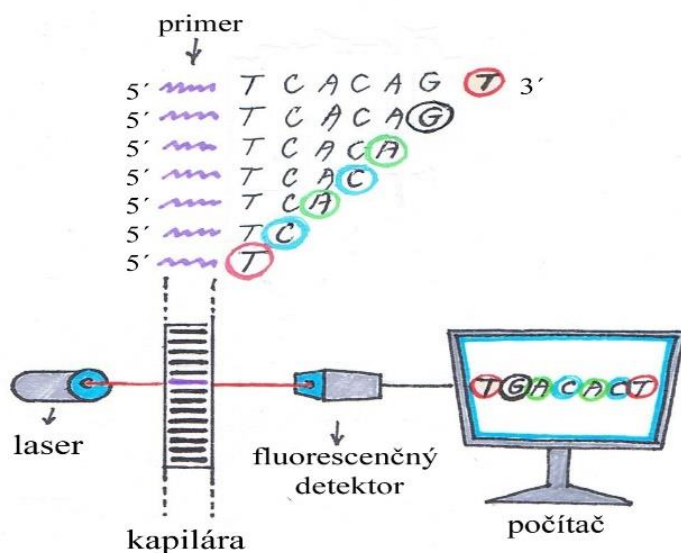


Obr. 21 Pomer deoxyribonukleotidov a dideoxyribonukleotidov v sekvenačnej reakcii

V súčasnosti prebieha sekvenácia v jednej reakcii. Reakčná zmes obsahuje DNA templát, primery, DNA polymerázu, deoxynukleotidy (dATP, dCTP, dGTP a dTTP) a dideoxynukleotidy (ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP). Aby terminácia bola postupná, do reakcie sa pridáva jedna dideoxymolekula v pomere k 100 normálnym molekulám (napr. 100 dCTP : 1 ddCTP). Po skončení reakcie a následnej denaturácii sa jednotlivé vzorky delia elektroforeticky v PAGE géli. Kedysi pri starších metódach separácie sa používalo samostatné delenie pre každý nukleotid aj v elektroforéze. **Každý z terminátorov reakcie (ddNTP) je značený inou fluorescenčnou farbičkou.** Každá fluorescenčná farbička (pre ddATP, ddGTP, ddCTP a ddTTP) má odlišnú vlnovú dĺžku. Laser tak môže určiť identitu každého prúžku podľa príslušnej vlnovej dĺžky fluorescenčnej farbičky. Urýchlenie sekvenovania prinieslo aj zavedenie tzv. kapilárnej elektroforézy. Namiesto tradičného gélu sú produkty jednotlivých reakcií separované v kapiláre. Výsledky sú znázornené vo forme elektroferogramu. Jednotlivé farby zodpovedajú jednotlivým bázam. Laserová detekcia emisie 4 rôznych fluorescenčných farbičiek sa uskutočňuje pomocou fotonásobiča a veľmi citlivého detektoru priamo z gélu. Získané dáta vyhodnocuje počítač. Táto technológia bola použitá aj v projekte sekvenácie ľudského genómu. Sekvenovanie nám umožňuje identifikovať, o akú mutáciu sa jedná. To má obrovský význam v diagnostike rôznych ochorení.



Obr.22 Elektroferogram



Obr. 23 Priebeh Sangerovej sekvenácie

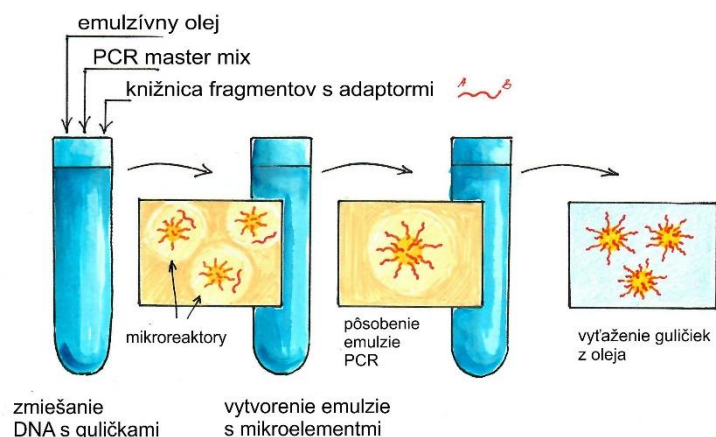
Sekvenovanie novej generácie

Technológia sekvenovania novej generácie (next generation sequencing-NGS) vznikla pre efektívne a lacné sekvenovanie celých genómov. Kedysi trvalo osekvenovanie celého ľudského genómu niekoľko rokov. Dnes je to možné urobiť vďaka technickému pokroku za niekoľko hodín. NGS je veľmi rýchlo sa rozvíjajúca metóda molekulovej genetiky, ktorá sa čoraz viac bude uplatňovať v personalizovanej medicíne. Táto metóda však kladie aj vyššie nároky na interpretáciu výsledkov a na analýzu dát, sú potrebné softvéry a bioinformatická podpora. Technológia NGS je výborným nástrojom. Vďaka tejto technológii je možné rozšíriť množstvo analyzovaných génov, čo povedie k zlepšeniu preventívnych a liečebných postupov u rizikových pacientov. Celogenómová sekvenácia (WGS – whole genome sequencing) poskytuje najkomplexnejšie dáta o genóme. Toto sekvenovanie je však pomerne drahé. Celogenómové sekvenovanie je využiteľné skôr na výskumných pracoviskách. Tento prístup je finančne náročný a vedie aj k získaniu obrovského množstva dát, ktoré často nemajú klinický význam. Zjednodušenou variantou je tzv. celoexómové sekvenovanie (WES -Whole Exome Sequencing). Tu sa používa ako vstupný materiál DNA, ale sekvenované sú len oblasti exónov kódujúce proteíny. Exómové sekvenovanie spája výhody sekvenovania celogenómového aj cieleného. Táto analýza je v porovnaní s celogenómovým sekvenovaním výrazne lacnejšia aj pri väčšom množstve prečítaní. Cílené sekvenovanie (target sequencing) je metóda sekvenovania, pri ktorej sa sekvenujú len vybrané gény spojené s určitým typom ochorenia. Výhodou tejto metódy je jednoduchá príprava vzoriek, nízke finančné náklady a detekcia mutácií s veľkou hĺbkou. Na trhu už pre túto metódu existujú komerčné kity s pevne stanoveným panelom vyšetřovaných génov, alebo je možné si sami navoliť gény, ktoré budú vyšetřované v rámci panelu. Na cílené sekvenovanie sa hodia stolné sekvenátory, ako je napríklad Miseq (Illumina). Táto metóda bude v budúcnosti nahrádzať Sangerovu sekvenáciu. NGS má obrovský dopad v personalizovanej medicíne u pacientov s nádorovými ochoreniami. Je možné porovnať genóm nádorovej bunky s genómom nenádorovej bunky od jedného pacienta. Metóda NGS nám umožňuje identifikovať všetky génové mutácie a štruktúrne chromozomálne aberácie súčasne. To povedie k presnejšej klasifikácii nádorov. Väčšina súčasných prístupov umožňuje sekvenáciu miliárd DNA úsekov naraz, preto sa táto NGS - technológia nazýva aj metódou masívneho paralelného sekvenovania. Nie

je tu potrebná na rozdiel od Sangerovej sekvenácie separácia produktov pomocou elektroforézy.

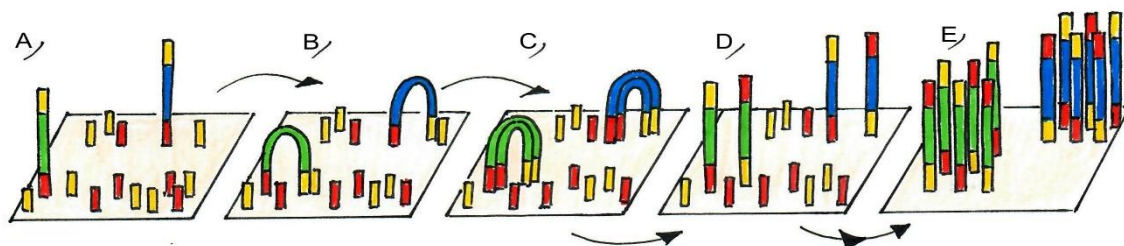
Existujú rôzne prístupy NGS sekvenácie, ktoré môžeme rozdeliť do dvoch skupín. V prvej skupine musí byť DNA, ktorú chceme osekvenovať, najskôr amplifikovaná pomocou PCR. V druhej skupine je možné sekvenovať DNA vzorku priamo bez amplifikácie. Masívne paralelné sekvenovanie často prebieha v priebehu syntézy DNA, to znamená, že sekvenačná reakcia je monitorovaná pri každom začlenení nukleotidu pomocou DNA polymerázy.

Príkladom takéhoto sekvenovania je aj technológia, ktorú na trh uviedla v roku 2005 spoločnosť Roche. Táto firma uviedla na trh NGS platformu ako prvá. DNA sa najskôr štiepi do krátkych fragmentov (300-500 bp) a pripraví sa jednovláknové templáty. Dva rôzne oligonukleotidové adaptory sú ligované ku koncom DNA fragmentov (adaptory poskytujú univerzálne sekvencie pre začatie amplifikácie). Jednovláknové DNA templáty sú imobilizované na guľôčkách a guľôčky sú separované jedna od druhej pomocou olejovo-vodnej emulzie. Každá kvapka obsahuje jednu guľôčku a všetky reagenty potrebné pre PCR. Po PCR je tu približne 10 miliónov kópií DNA fragmentu na jednej guľôčke. Po narušení emulzie dôjde k uvoľneniu guľôčiek. Guľôčky sa nachádzajú v jamkách o veľkosti pikolitrov, jedna guľôčka pripadá na jednu jamku. Na ich povrchu je ATP, sulfuryláza a luciferáza. Guličky sa premyjú zmesou na sekvenáciu, v ktorej sú prekursori dNTP (najskôr T, potom A, potom C a potom G). Po začlenení nukleotidu sa emituje svetlo.



Obr. 24 Sekvenovanie NGS uvedené spoločnosťou Roche

Ďalší z príkladov sekvenovania novej generácie, ktorý bol vymyslený spoločnosťou Illumina, je znázornený na obrázku. DNA fragmenty, ktoré majú byť sekvenované, sú prichytené na pevný povrch reakčnej prietokovej komôrky, ktorá sa v angličtine nazýva **flow cell**. Po naštiepení DNA na krátke fragmenty sú k obidvom koncom pridané krátke sekvencie - adaptory. Po denaturácii DNA s adaptormi sa pripájajú tieto segmenty ku povrchu prietokovej komôrky. To zabezpečuje väzbu adaptorov v DNA fragmentoch s adaptormi pokrývajúcimi povrch flow cell. Tieto fragmenty sú následne amplifikované pomocou PCR, ktorá sa v angličtine označuje ako zhuková (po anglicky cluster // bridge) alebo „mostíková“ PCR, keďže tvar PCR produktov, prichytený obidvomi koncami k povrchu pevnej doštičky pripomína svojou štruktúrou mostík. Nasyntetizované vlákna DNA sa podobajú na trsy trávy vejúce vo vetre.



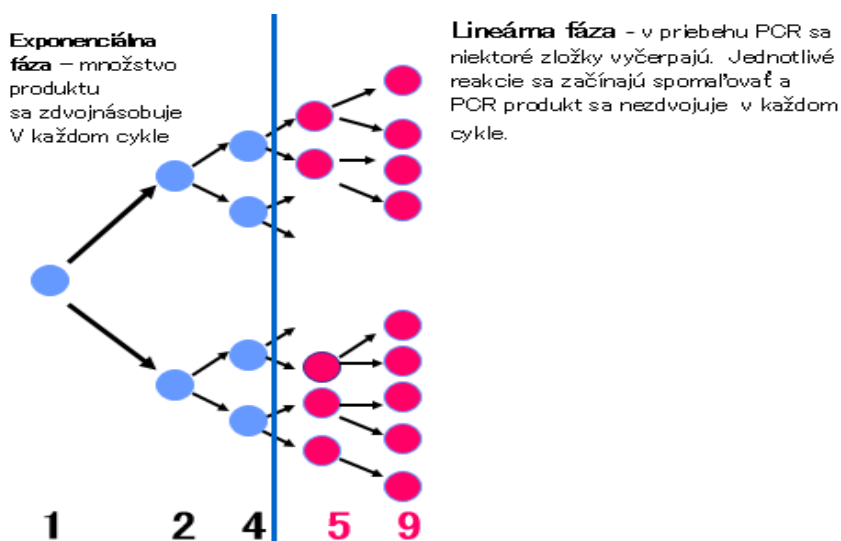
Obr. 25 Sekvenovanie novej generácie vymyslené spoločnosťou Illumina

a) Ku DNA fragmentom sa na oboch koncoch ligáciou pripájajú univerzálne adaptory. b) Adaptory sú komplementárne ku adaptorom pokrývajúcim povrch prietokovej komôrky (flow cell) a slúžia aj ako PCR primery na syntézu komplementárneho vlákna. Novovzniknuté vlákno sa ohne a utvára štruktúru podobajúcu sa mostíku. c) Dochádza aj k syntéze komplementárneho vlákna d) Po amplifikácii sa reťazce denaturujú. e) Opakovaním amplifikácie sa utvárajú zhluky (clusters) toho istého DNA fragmentu. Na PCR amplifikáciu sa využívajú univerzálne primery, kovalentne prichytené na sklenenú doštičku. Ku vláknu v clusteri sa po hybridizácii primeru pridáva DNA polymeráza a fluorescenčne značené nukleotidy s modifikovanými 3'-OH koncami. Každý nukleotid je označený inou fluorescenčnou farbičkou. V jednom cykle je možné kvôli modifikácii 3'-OH konca začlenenie len jedného nukleotidu. Po inkorporácii nukleotidu do vlákna DNA je typ nukleotidu na základe jeho fluorescenčného označenia snímaný prostredníctvom CCD kamery v každom zhluku. Odstráni sa fluorescenčná farbička a 3'-OH modifikácia a cyklus sa opakuje.

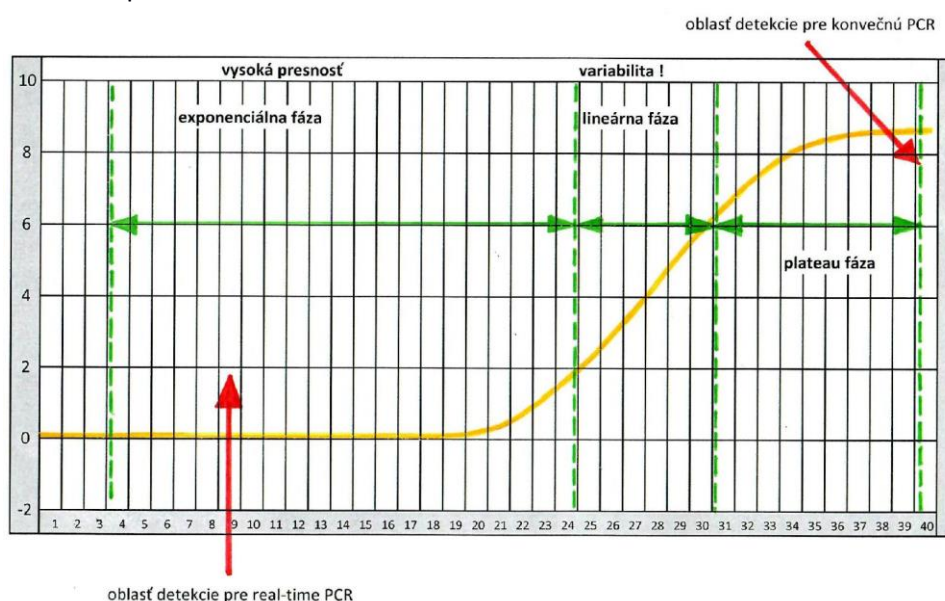
Kvantitatívna PCR – real time PCR

Kvantitatívna PCR je metóda založená na klasickej PCR, princípom je sledovanie množstva naamplifikovaného produktu v priebehu jednotlivých cyklov reakcie. Táto metóda sa používa na kvantifikáciu vybraného úseku DNA. Ak chceme kvantifikovať množstvo RNA vo vzorke, tak je potrebné najskôr prepísať RNA do cDNA. Kvantitatívna PCR (qPCR) je nazývaná aj real-time PCR. Táto metóda je variáciou konvenčnej polymerázovej reťazovej reakcie. Pri konvenčnej PCR reakcii prebieha detekcia produktu po n-násobných amplifikačných cykloch na konci, preto hovoríme o tzv. end-point analýze. Výstupom je fotografia gélu získaná po elektroforetickej separácii a vizualizácii na transiluminátore v UV svetle. Na túto metódu nám postačuje štandardný termocykler. Kvantitatívna PCR nám umožňuje sledovať množstvo naamplifikovaného produktu v reálnom čase - teda v každom cykle reakcie. Prírastok PCR produktu je sledovaný na základe intenzity fluorescence. Množstvo fluorescenčného signálu v exponenciálnej fáze PCR je priamo úmerné množstvu PCR produktu. Exponenciálna fáza je prvou fázou real-time PCR. V tejto fáze sa množstvo PCR produktu zdvojnásobuje v každom cykle. Po exponenciálnej fáze nasleduje lineárna fáza. Tú charakterizuje spomaľovanie jednotlivých reakcií

v dôsledku postupného spotrebúvania jednotlivých zložiek reakčnej zmesi. PCR produkt sa v každom cykle nezdvouje. Treťou fázou kvantitatívnej PCR je plateau (číta sa ako plató) fáza. V tejto fáze sa už množstvo PCR produktu nezvyšuje kvôli vyčerpaniu jednotlivých zložiek reakcie.



Obr. 26 Exponenciálna a lineárna fáza real-time PCR



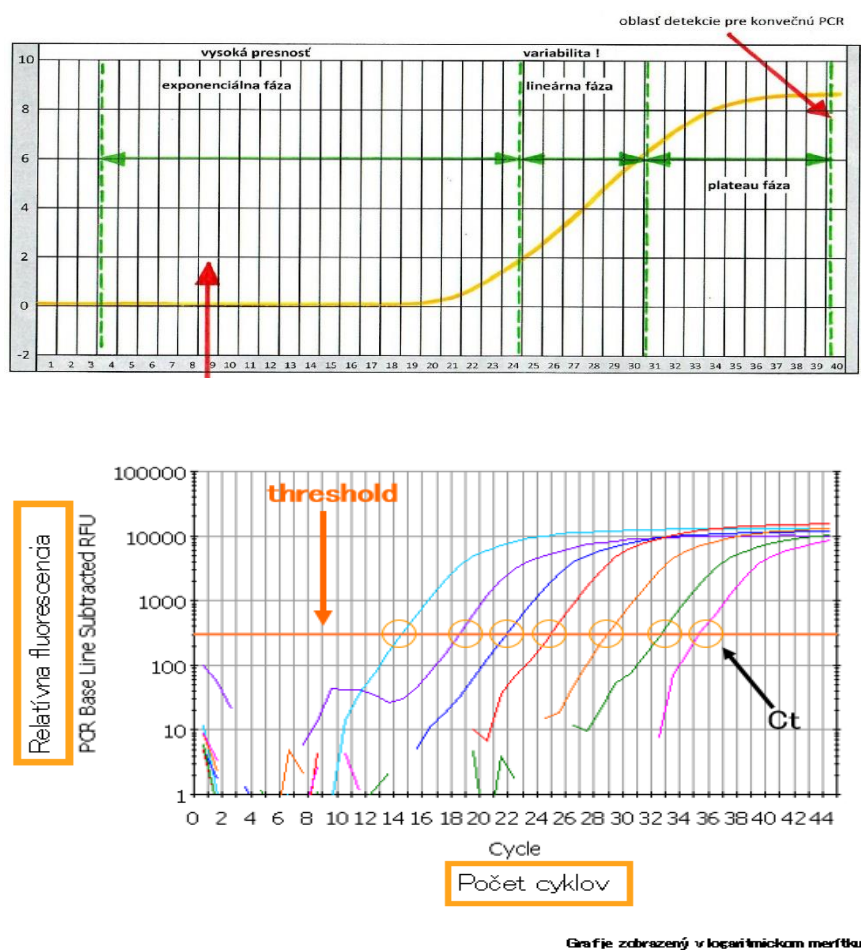
Obr. 27 Oblasti detekcie konvenčnej a real-time PCR

Fluorescenčné systémy v kvantitatívnej PCR delíme na špecifické a nešpecifické. Všetky detekčné systémy pracujú na základe utvárania fluorescenčného signálu. Príkladom nešpecifického fluorescenčného systému je fluorecenčné farbivo SYBR Green viažúce sa do menšieho žliabku dvojvláknovej DNA. Toto farbivo je schopné emitovať žiarenie, len keď je interkalované do dvojvláknovej DNA. Tento fluorescenčný systém je menej nákladný, jeho nevýhodou však je nešpecifita, keďže SYBR Green sa viaže do akejkoľvek dvojvláknovej DNA, ako sú nešpecifické

amplikóny a tzv. primery-dimery. Špecifické detekčné systémy sú v porovnaní so SYBR Greenom nákladnejšie. Ich výhodou je vysoká špecifickosť detekcie. Príkladom špecifických detekčných systémov sú hydrolyzačné (TaqMan[®]) próby, hybridizačné próby, molekulárne majáky (po anglicky molecular beacons) a škorpiónové sondy (Scorpions). Hydrolyzačné (TaqMan[®]) próby sú oligonukleotidy označené dvomi značkami – na 5'- konci fluorofórom a na 3'- konci zhášačom, blokujúcim fluorescenciu z fluorofóru. Po väzbe na cieľovú sekvenciu je zhášač od fluorofóru oddelený rozkladom oligonukleotidového reťazca 5'-3' nukleázovou aktivitou Taq polymerázy. Taq polymeráza začína štiepiť sondu od 5'konca a indukuje tak uvoľnenie fluorescenčného svetla. Hybridizačné sondy sú tvorené systémom dvoch sond, ktoré sú navrhnuté tak, aby hybridizovali vedľa seba na PCR produkt. Jedna sonda je značená na 3' konci donorovým fluorofórom a druhá sonda na 5' konci akceptorovým fluorofórom. Len po hybridizácii na templátovú DNA sa dve sondy dostanú do absolútnej blízkosti, výsledkom čoho je prenos fluorescencie (fluorescence resonance energy transfer, FRET) medzi dvoma fluorochrómami. Počas FRET je donorový fluorochróm, nabudený svetelným zdrojom z prístroja, v ktorom prebieha real-time PCR, a časť exitovanej energie je prenášaná na akceptorový fluorochróm. To má za následok emitovanie fluorescencie.

Molekulové majáky sú krátke oligonukleotidy s navzájom komplementárnym 5'a 3' koncom. Na jednom konci oligonukleotidového reťazca sa nachádza fluorofór a na druhom konci zhášač. Keď sa nachádza táto sonda voľne v skúmavke, komplementárna väzba oboch koncov spôsobuje, že blízkosť fluorofóru a zhášača spôsobuje zhášanie fluorescencie. Po hybridizácii na cieľovú molekulu DNA sonda mení konformáciu, fluorofór a zhášač sa oddelia a vzniká fluorescenčné žiarenie. Molekuly Scorpions obsahujú primer a sondu v jednej molekule. Sú tvorené dvoma reťazcami. V jednom reťazci je kovalentne spojená sonda s primerom a na 5' konci sondy sa nachádza fluorofór, sondu od primeru oddeľuje blokátor. Na 3' konci druhého reťazca, ktorý je komplementárny k prvému reťazcu so sondou, sa nachádza zhášač. Scorpions sonda nasadá na cieľovú sekvenciu prostredníctvom primeru, následne dochádza k extenzii primeru a syntéze cieľovej sekvencie. V ďalšom kroku dochádza k denaturácii a oddeleniu primeru od cieľovej sekvencie. Pri znížení teploty sa sonda viaže na cieľovú naamplifikovanú sekvenciu utvorenú extenziou primeru. Tým sa dostane molekula fluorofóru ďalej od molekuly zhášača a dochádza k vyžarovaniu fluorescencie.

Kvantifikačné stratégie delíme do dvoch skupín, na **absolútnu** a **relatívnu kvantifikáciu**. Pri absolútnej kvantifikácii si zo vzoriek so známym množstvom templátu utvoríme kalibračnú krivku a neznáma vzorka môže byť priamo odčítaná z tejto krivky. Relatívna kvantifikácia porovnáva expresiu jedného génu vo vzorkách voči referenčnému génu. Najčastejšie sú ako referenčné gény zvolené tzv. „housekeeping gény“, ktoré sú exprimované vo všetkých typoch buniek (napríklad gén kódujúci aktín alebo tubulín). Referenčný gén nám slúži na to, aby sme zistili množstvo vstupného materiálu použitého do reakcie. V exponenciálnej fáze real-time PCR je potrebné stanoviť si amplifikačný prah (z angl. threshold), ktorý slúži aj na stanovenie amplifikačného signálu od fluorescenčného pozadia. Dáta sa získavajú v exponenciálnej fáze ako Cq hodnota (Cq - quantification cycle). Cq hodnota vyjadruje počet cyklov, v ktorých fluorescencia dosiahne prahovú hodnotu. Čím je hodnota Cq nižšia, tým viac templátovej DNA vstupovalo do qPCR-reakcie. Ak budeme uvažovať, že účinnosť PCR reakcie je v ideálnom prípade 100%, tak môžeme vyhodnotiť rozdiel koncentrácie templátovej DNA jednotlivých porovnávaných vzoriek ako rozdiel v Cq hodnotách, označovaný ako $2^{\Delta Cq}$, kde ΔCq , je rozdiel v hodnotách medzi porovnávanými vzorkami. Výpočet s použitím referenčného génu je potom je $2^{\Delta Cq1 - \Delta Cq2}$, kde $\Delta Cq1 = Cq_{(pre\ cieľový\ gén\ vzorky\ 1)} - Cq_{(pre\ referenčný\ gén\ vzorky\ 1)}$, $\Delta Cq2 = Cq_{(pre\ cieľový\ gén\ vzorky\ 2)} - Cq_{(pre\ referenčný\ gén\ vzorky\ 2)}$.



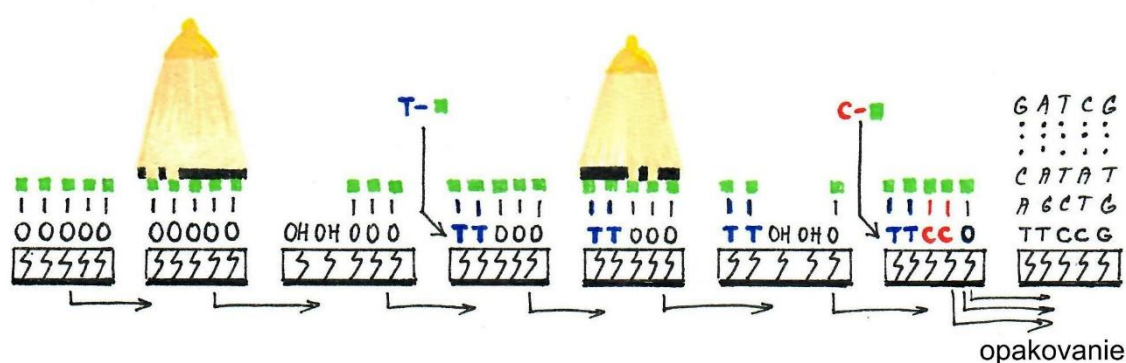
Obr. 28 Záznam PC v logaritmickom a v aritmetickom merítku

Aplikácie real-time PCR sú napríklad kvantifikácia expresie génov, validácia metód, sledovanie účinnosti liečby u pacientov s rôznymi ochoreniami, kvantifikácia vírusov, detekcia patogénov a genotypizácia.

DNA microarray (DNA čipy)

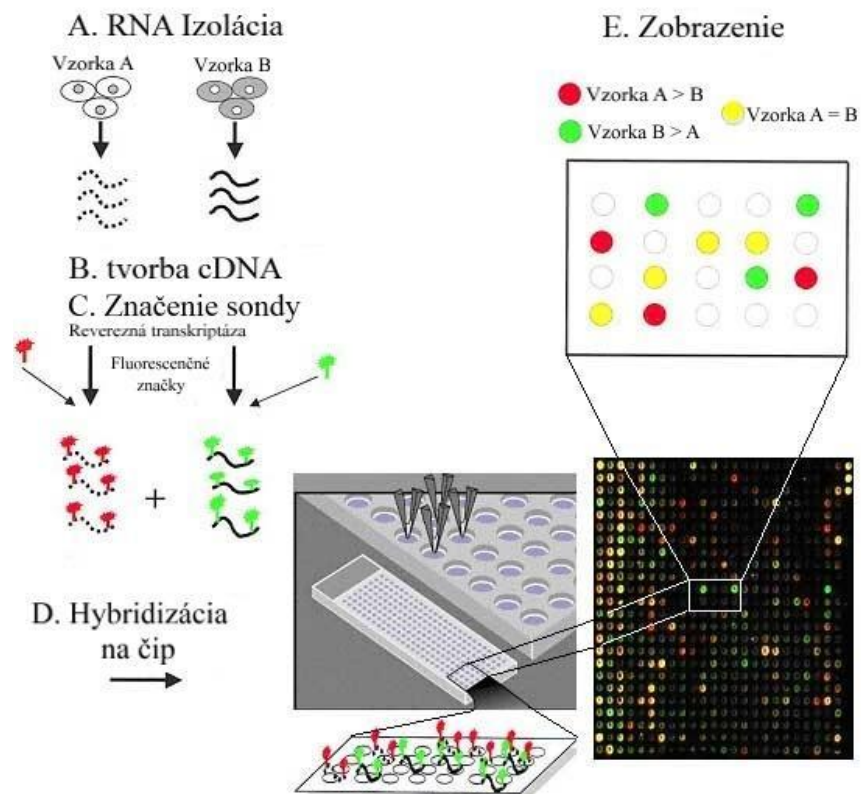
Bunky exprimujú (prepisujú DNA do RNA) súčasne stovky až tisíce génov. Niektoré produkty sú exprimované vo veľkom množstve, kým iné gény sú exprimované len v niekoľkých kópiách. Rozdiely v génovej expresii môžeme pozorovať v rôznych štádiách bunkovej maturácie, takisto sa v génovej expresii líšia nádorové a nenádorové bunky. Snaha identifikovať rozdiely v génovej expresii je dôležitou súčasťou výskumu. Technológia microarray umožňuje analyzovať v priebehu jedného experimentu expresiu až 10 000 génov súčasne. To prináša značnú časovú úsporu. Na túto metódu je potrebné finančne náročné prístrojové vybavenie a získané výsledky je potrebné štatisticky spracovať. DNA microarray čip je sklenená, kremíková alebo plastová podložka, na ktorej sú imobilizované jednovláknové sondy so známou sekvenciou (vidíme ich ako mikroskopické bodky). Princípom

microarray je paralelná hybridizácia značenej vzorky ku sondám, ktoré sú pripevnené k pevnému podkladu. Ak je sonda komplementárna ku vzorke značenej nukleovej kyseliny, dochádza k hybridizácii. Podmienky hybridizácie sú prísne a po nej je fluorescencia z jednotlivých políčok snímaná laserom. Dáta sú ukladané do počítača. Microarray delíme do dvoch skupín na základe prípravy oligonukleotidových sond. Prvou skupinou sú čipy z pre-syntetizovaných nukleových kyselín. V tomto prípade sú sondy vytvorené mimo nosiča, na ktorý sa po syntéze kovalentne pripoja. Sondy sú nasávané veľmi tenkými ihlami a natlačené na povrch čipu prístrojom nazývaným spotter. Druhou skupinou sú čipy, kde sú oligonukleotidy syntetizované priamo na nosiči (in-situ) pomocou fotolitografickej metódy. Pri tejto metóde sa podkladová doštička zakryje špeciálnou fotolitografickou maskou. Svetlo prechádzajúce selektívne cez masku spôsobuje odstránenie protektívnej skupiny zo špeciálne modifikovaných nukleotidov, čo umožňuje väzbu ďalšieho nukleotidu do syntetizovaného oligonukleotidového reťazca. Doštička je zakrytá a následne odkrytá na ďalších miestach, kde majú byť pridané nukleotidy ďalšieho druhu. Takto sa postupne nasyntetizujú požadované sekvencie.



Obr. 29 Fotolitografická metóda

V súčasnosti je najrozšírenejšie fluorescenčné značenie DNA vzoriek, najčastejšie používané fluorescenčné farbičky sú zelený cyanín (Cy3) a červený cyanín (Cy5). Pomocou tejto techniky môžeme analyzovať súčasne viacero vzoriek, ak použijeme značenie fluorescenčnými farbičkami s neprekrývajúcim sa spektrom. Takto môžeme porovnať napríklad expresiu génov v nádorovej a nenádorovej bunke. Najskôr sa z obidvoch typov buniek izoluje RNA, prepíše sa do cDNA a tieto cDNA pochádzajúce z rôznych typov buniek sa označia rozdielnymi fluorescenčnými farbičkami. Po hybridizácii je fluorescencia z jednotlivých políčok snímaná laserom a dáta ukladá počítač. Technológia DNA microarray má rôzne aplikácie. Pomocou tejto metódy je možné analyzovať expresiu veľkého množstva génov súčasne. Táto technológia sa dá využiť aj na nájdenie nových molekulárnych markerov rôznych ochorení a identifikáciu polymorfizmov. Ďalšími aplikáciami je hľadanie nových cieľov na liečbu, upresnenie diagnostiky a sledovanie účinnosti liečby. Príkladom upresnenia diagnostiky na základe dát z microarray môžeme rozlíšiť agresívny subtyp difúzneho veľkobunkového lymfómu od subtypu s priaznivou prognózou, pričom pri mikroskopickom vyšetrení vyzerajú obidva subtypy rovnako.



Obr. 30 Princíp microarray. a) Najskôr je izolovaná z oboch tkanív RNA. b) Z RNA je pripravená cDNA. c) DNA vzorky sú značené fluorescenčnou farbičkou. Vzorka A je označená červenou Cy5 (cyanine) farbičkou. Vzorka B je označená zelená Cy3 (cyanine) farbičkou. d-e) Po hybridizácii je fluorescencia z jednotlivých políčok snímaná laserom a dáta ukladá počítač (Upravené podľa <http://nanohub.org/app/site/resources/2013/05/17915/slides/001.01.jpg>).

Použitá literatura:

- Akhavain A., Neuberger M.M., Dahm P. BMJ Case Rep. 2012 Sep 30;2012
- Alberts B., Bray D., Johnson A. a kol. Základy buněčné biologie. 2003, Espero
- Alexandrov L.B., Nik-Zainal S, Wedge D.C., et al. Nature. 2013 Aug 22;500 (7463):415-21
- Allen P.B., Gordon L.I.. Expert Rev Hematol. 2016 Sep 13.
- Altaner Č., Altanerová V. Onkológia (Bratisl.), 2010; roč. 5 (1): 26–30
- American Cancer Society, Cancer Fact and Figures 2015, American Cancer Society,2015
- Atkins M.B., Kunkel L., Szol M., et al.Cancer J Sci Am 2000;6:Suppl 1:S11-4
- Atkinson V. Aust Prescr. 2015 Jun;38(3):74-8
- Barkmanová J., Staněk L. Onkologie 2015; 9(4): 167–170
- Barlow L.J., Shen M.M. Cancer Cell. 2013 Sep 9;24(3):400
- Barlesi F., Mazieres J., Merlio J.P., et al. Lancet. 2016 Apr 2;387(10026):1415-1426
- Besaratinia A., Tommasi S. J. Mol Cell Biol. 2014 Oct;6(5):356-67
- Birck A., Ahrenkiel V., Zeuthen .J, et al. J Invest Dermatol. 2000 Feb;114(2):277-80
- Borghaei H., Paz-Ares L., Horn L., Spigel D.R., et al. N Engl J Med. 2015 Oct 22;373(17):1627-39
- Bosman, F.T., Carneiro, F., Hruban, R.H., et al. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Fourth Edition.2010, WHO Press
- Bradford P.T., Goldstein A.M., Tamura D., et al. J Med Genet. 2011 Mar;48(3):168-76
- Brahmer J., Reckamp K., Baas P., et al. N. Engl J Med. 2015 Jul 9;373(2):123-35
- Burns M.C., O'Donnell A, Puzanov I. Expert Opin Orphan Drugs. 2016;4(8):867-873
- Bustin. S.A. A-Z of quantitative PCR. 2004, International University Line
- Cannon-Albright L.A., Teerlink C.C., Farnham J.M., et al. J Invest Dermatol. 2013 Jan;133(1):128-34
- Cristofanilli M., Budd G.T., Ellis M.J., et al. N. Engl J Med. 2004 Aug 19;351(8):781-91
- Culig Z., Santer F.R. Cancer Metastasis Rev. 2014 Sep;33(2-3):413-27

Čižmarová M., Ilenčíková D., Kovács L. *Pediatrics pre prax.* 2013; 14(6): 238–241

Davies M.. *Cancer Manag Res.* 2014;6: 63–75

de Bono J.S., Scher H.I., Montgomery RB, et al. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 1;14(19):6302-9

Demichelis F., Attard G. *Nat Med.* 2013 Aug;19(8):966-7

DeSantis C.E., Lin C.C., Mariotto A.B., et al. *A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 64, no. 4, pp. 252–271, 2014

den Dunnen J.T., Dagleish R., Maglott .DR., et al. *Hum Mutat.* 2016; 37(6):564-9

Drunker B.J. *Blood.* 2008; 112:4808-4817

Dulbecco R. *Science.* 1986 Mar 7;231(4742):1055-6

D’Urso C.M., Wang Z.G., Cao Y.,et al. *J .Clin Invest* 1991;87:284-92

Eggermont A.M., Chiarion-Sileni V., Grob J.J., et al. *N Engl J. Med* 2016; 375(19):p. 1845-55

Eroglu Z., Kim D.W., Wang X., et al. *Eur J Cancer* 2015;51:2689-97

Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., et al. *Int J Cancer.* 2015 Mar 1;136(5):E359-86

Flaherty K.T., Puzanov I., Kim K.B., et al. *N Engl J Med.* 2010 Aug 26;363(9):809-19

Foulkes W.D. *N Engl J Med.* 2008 Nov 13;359(20):2143-53

Gainor J.F., Dardaei L., Yoda S., et al. *Cancer Discov.* 2016;6:1118-1133.

Garon E., Rizvi N., Hui R., et al. *N Engl J Med* 2015; 372: 2018–2028

Geurts van Kessel A. *Cell Oncol (Dordr).* 2012 Jun;35(3):139-47

Glitza I.C., Davies M.A. *Chin Clin Oncol.* 2014 Sep;3(3):27.

Hamid O., Robert C., Daud A., et al. *N Engl J Med.* 2013 Jul 11;369(2):134-44

Hieronymus H., Schultz N., Gopalan A., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jul 29;111(30):11139-44

Hodi F.S., O’Day S.J., McDermott D.F., et al. *N Engl J Med* 2010; 8: 711–723.

Hodis E., Watson I.R., Kryukov G.V., et al. *Cell*; 150, 251–263.

Hou J.M., Krebs M.G., Lancashire L, et al. *J. Clin Oncol.* 2012 Feb 10;30(5):525-32

Huang F.W., Hodis E., Xu MJ, et al. *Science.* 2013 Feb 22;339(6122):957-9

Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL. Eur Urol. 2016 Jul;70(1):106-119

Chapman P.B., Hauschild A., Robert C., et al. N.Engl. J. Med. 2011; 364, 2507-2516

Chen D.L., Ju HQ, Lu YX. Et al. J. Exp Clin Cancer Res. 2016; 35(1): 142

Kaplan D.H., Shankaran V., Dighe A.S., et al. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:7556-61

Knudson A.G. Jr. Proc Natl Acad Sci U S A. 1971 Apr;68(4):820-3

Korf B.R., Irons M.B. Human Genetics and Genomics. 2013, Wiley-Blackwell, Sussex

Kote-Jarai Z., Leongamornlert D, Saunders E, et al. Br J Cancer. 2011 Oct 11;105(8):1230-4

Koubková L. Onkologie 2014; 8(4): 160–162

Krebs M.G., Sloane R., Priest L., et al. J Clin Oncol. 2011 Apr 20;29(12):1556-63

Križanová K. Onkológia (Bratisl.), 2012; roč. 7(4): 220–222

Kučerová L., Baranovičová L., Školeková S. a kol. Onkológia (Bratisl.), 2013; roč. 8(4): 234–237

Kumar R., Angelini S., Czene K., et al. Clin Cancer Res. 2003 Aug 15;9(9):3362-8

Kwak E.L., Bang Y.-J., Camidge D.R., et al. N Engl J Med. 2010;363: 1693–1703

Lander E.S., Linton .LM., Birren B., et al. Nature 2001 Aug 2;412(6846):565

Lasabova Z., Tilandyova P., Kajo K., et al. Neoplasma. 2010;57(1):35-40

Law M.H., Bishop D.T., Lee J.E., et al. Nat Genet. 2015 Sep;47(9):987-995

Leber M.F., Efferth T. Int J Oncol. 2009;34:881–95

Le Boit P.E., Burg G., Weedon D., et al. Pathology and Genetics of Tumours of the Skin. 2005, Third edition. WHO Press

Levine R.L., Wadleigh M., Cools J, et al. Cancer Cell. 2005 Apr;7(4):387-97.

Ley T.J., Mardis E.R., Ding L. et al. Nature. 2008; 456, 66-72

Lindeman N.I., Cagle P.T., Beasley M.B., et al. J Mol Diagn. 2013 Jul;15(4):415-53

Liu Z., Zhang X.S., Zhang S. Sci Rep. 2014 Feb 6;4:4002

Lopez-Chavez A., Thomas A., Rajan A., et al. J Clin Oncol. 2015 Mar 20;33(9):1000-7

Mardis E.R., Ding L., Dooling D.J., et al. N Engl J Med. 2009 Sep 10;361(11):1058-66

Marenčák J. *Via pract.*, 2010, 7 (3): 114–120

Mariani G., Fasolo A., DecBenedictis E., et al. *Nature Clin. Prac. Oncol.* 2009; 6:93-104

Marusyk A., Polyak K. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jan;1805(1):105-17

Massarelli E., Varella-Garcia M., Tang X., et al. *Clin Cancer Res.* 2007;13: 2890–2896

Maximiano S., Magalhães P., Guerreiro M..P, et al. *BioDrugs.* 2016 Apr;30(2):75-86

Mehrotra A., Mehta G., Aras S., et al. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2014;24(2):151-61

Mego M. *Onkológia (Bratisl.)*, 2010; roč. 5 (6): 356–359

Mego M, Rečková M. *Onkológia*, 2008, 3 (4): 241–243

Meyerson M., Gabriel S., Getz G. *Nat Rev Genet* 2011; 11(10): 685-696

Michor F. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005 Mar 29;360(1455):631-5

Midha A., Dearden S., McCormack R. *Am J Cancer Res.* 2015 Aug 15;5(9):2892-911

Minárik G. *Onkológia (Bratisl.)*, 2014; roč. 9(5): 292–295

Minárik M. *Onkologie* 2016; 10(1): 7–10

Molina J.R., Yang P., Cassivi .SD. et al. *Mayo Clin Proc.* 2008;83: 584–594

Nakauchi C., Kagara N., Shimazu K., et al. *Clin Breast Cancer.* 2016 Oct;16(5):418-423

National Cancer Institute, Melanoma Treatment (PDQ), National Cancer Institue, 2014

Nenutil R. *Cesk Patol.* 2015;51(1):23-5.

O’Shaughnessy J., Osborne C., Pippen J.E., et al. *New Engl J Med* 2011; 364: 205 – 214

Ossio R., Roldán-Marín R., Martínez-Said H., et al. *Nat Rev Cancer.* 2017 Jul;17(7):393-394

Paez J.G., Jänne P.A., Lee J.C., et al. *Science.* 2004;304: 1497–1500

Paik P.K., Drilon A., Fan P.-D., et al. *Cancer Discov.* 2015;5:842-849

Parsons D.W., Jones S., Zhang X., et al. *Science.* 2008 Sep 26;321(5897):1807-12

Podrazil M., Špíšek R., Bartůňková J. *Urologie pro praxi* 2016; 17(4): 159–166

Prahallad A., Sun C., Huang S., et al. *Nature.* 2012 Jan 26;483(7387):100-3

Purrington K.S., Slager S., Eccles D., et al. *Carcinogenesis.* 2014 May;35(5):1012-9

Rečková M., Mego M.. Onkológia (Bratisl.), 2008, roč. 3 (3): 178–181

Redig A.J., Jänne P.A. J Clin Oncol. 2015 Mar 20;33(9):975-7

Ribas A., Hamid O., Daud, et al. JAMA 2016;315:1600-9

Robert C., Ribas A., Wolchok J.D., et al. Lancet. 2014 Sep 20;384(9948):1109-17

Robert C, Thomas L., Bondarenko I., et al. N Engl J Med 2011; 26: 2517–2526

Robinson D., Van Allen E.M., Wu Y.M., et al. Cell. 2015 May 21;161(5):1215-28

Rothé F., Laes J.F., Lambrechts D., et al. Ann Oncol. 2014 Oct;25(10):1959-65

Sabatier R., Finetti P., Guille A., et al. Mol Cancer. 2014 Oct 2;13:228

Sequist L.V., Waltman B.A., Dias-Santagata D., et al. Sci Transl Med. 2011 Mar 23;3(75):75ra26

Shaw A.T., Ou S.-H.I., Bang Y.-J., et al. N Engl J Med. 2014;371:1963-1971

Shain A.H., Yeh I., Kovalyshyn I, et al. N Engl J Med. 2015 Nov 12;373(20):1926-36

Shigematsu H., Lin L., Takahashi T., et al. J Natl Cancer Inst. 2005;97: 339–346

Schiller J.H., Harrington D., Belani C.P., et al. N Engl J Med. 2002;346:92–8

Shu C.A., Rizvi N.A. Oncologist 2016; 21(5). 527-8

Schuback H.L., Arceci R.J., Meshinchi S. Semin Hematol. 2013 Oct;50(4):325-32

Sikkema-Raddatz B., Johansson L.F., de Boer E.N., et al. Hum Mutat. 2013 Jul;34(7):1035- 1042

Siddiqui S., Chattopadhyay S., Akhtar M.S., et al. PLoS One. 2014 Oct 21;9(10):e11042

Sleijfer S., Wiemar E., Verweij J. Nature Clin. Prac. Oncol. 2008;5:102 -111

Solomon B.J., Mok T, Kim D.W., et al. N Engl J Med. 2014 Dec 4;371(23):2167-77

Soria J. C, Tan DSW, Chiari R, et al. Lancet. 2017 Mar 4;389(10072):917-929

Sosman J.A., Kim K.B., Schuchter L. et al. N. Engl. J. Med. 2012;366, 707–714

Stephens P., Hunter C., Bignell G. et al. Nature. 2004 Sep 30;431(7008):525-6.

Strachan T., Goodship J., Chinnery P. Genetics and Genomics in Medicine. 2014, Garland Science (Taylor & Francis Group)

Stratton M.R., Campbell P.J., Futreal P.A. Nature. 2009; 458(7239): 719-724

Suh J.H., Johnson A., Albacker L., et al. *Oncologist*. 2016;21:684-691.

Supek F., Minana J., Valcarcel T. et al. *Cell*. 2014;156, 1324-1335

Šána J., Faltejsková P., Svoboda M. a kol. *Klin Onkol* 2012; 25(4): 246–254

Tang T., Eldabaje R., Yang L. *Anticancer Res*. 2016 Jul;36(7):3229-41

Teer J.K., Mullikin J.C. *Hum Mol Genet* 2010; 19(R2): R145-151

Tilandyová P., Kajo K., Kliment J. A kol. *Klin Onkol* 2010; 23(5): 293–299

Tomasetti C, Vogelstein B. *Science*. 2015 Jan 2;347(6217):78-81

Topalian S.L., , McDermott D.F., et al. *J Clin Oncol*. 2014 Apr 1;32(10):1020-30

Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG., et al. *J Thorac Oncol*. 2015 Sep;10(9):1243-1260

Tsao H., Chin L., Garraway L.A., et al. *Genes Dev*. 2012 Jun 1;26(11):1131-55

Tutt A., Robson M., Garber J.E., et al. *Lancet* 2010; 376: 235 – 244

Tyagi P., Mirakhur B. *Clin Lung Cancer*. 2009;10: 371–374

Valastyan S, Weinberg R.A. *Cell*. 2011;147:275–92

van Haaften G., Dalglish G.L., Davies H., et al. *Nat Genet*. 2009 May;41(5):521-3

Vazquez A., Bond E.E., Levine A.J., et al. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Dec;7(12):979-87

Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., et al. *Science*. 2001 Feb 16;291(5507):1304-51

Wan J.C., Massie C., Garcia-Corbacho J., et al. *Nat Rev Cancer*. 2017 Apr;17(4):223-238

Yan H., Parsons D.W., Jin G., et al. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):765-73

Yoh K., Seto T., Satouchi M., et al. *Lancet Respir Med*. 2017;5:42-50.

Zaretsky J.M., Garcia-Diaz A., Shin D.S., et al. *N Engl J Med*. 2016 Sep 1;375(9):819-29

Zoznam použitých skratiek

A	adenín
ABL	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene
AML1 (RUNX1)	runt-related transcription factor 1
ALK	anaplastic lymphoma kinase, anaplastická lymfómová kináza
Apaf-1	apoptotický faktor aktivujúci proteázy
APC	adenomatous polyposis of the colon gene
ARID1A	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)
ARID2	AT rich interactive domain 2
ASIP	Agouti-signaling protein
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ataxiateleangiectasia and Rad3-related
BCR	breakpoint cluster region
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA1	familial breast/ovarian cancer gene 1
BRCA2	familial breast/ovarian cancer gene 2
C	cytozín
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
Cdk	cyklín-dependentné kinázy
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16(INK4a)) gene
Con	konverzia
CNV	variácie počtu kópií
CsCl	chlorid cézny
CCDN1	cyclin D1
CDH1	cadherin 1; type 1; E-cadherin (epithelial) (ECAD)
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
COX2	cytochrome c oxidase II
CRBP1	cellular retinol binding protein
CSMD3	CUB And Sushi Multiple Domains 3
CT	počítačová tomografia
CTCs	cirkulujúce nádorové bunky

ctDNA	cirkulujúca nádorová DNA
CTLA4	cytotoxický T-lymfocytový antigén 4
DNA	deoxyribonukleová kyselina
del	delécia
DISC	death signal inducing complex
DTCs	diseminované nádorové bunky
dup	duplikácia
ECAD (CDH1)	cadherin 1; type 1; E-cadherin (epithelial)
EDTA	etylén-diamino-tetraoctová kyselina
EGFR	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog; avian)
EMA	Európska lieková agentúra
EpCAM	adhezívna molekula epitelových buniek
ER α	Estrogen receptor alpha
Er β	Estrogen receptor beta
ETO	eight-twenty-one, tiež známy ako MTG8 myeloid transforming gene on chromosome 8
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2; neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
ERG	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene like (avian)
EtBr	etídiumbromid
EWS (EWSR1)	Ewing sarcoma breakpoint region 1
FBXW7	F-box and WD-40 domain protein 7 (archipelago homolog; Drosophila)
FAT3	FAT Atypical Cadherin 3
FDA	Úrad pre kontrolu potravín a liečiv
FL1	Friend leukemia integration 1 transcription factor
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
FOXA1	forkhead box A1
G	guanín
GATA 3	GATA binding protein 3
GDP	guanozínmonofosfát
GSTP1	glutathione S-transferase pi 1

GTP	guanozínmonofosfát
H	atóm vodíka
HAND1	Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1
HER2	human epidermal growth factor
HIC	human I-mfa domain containing gene
HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
CHEK2	checkpoint kinase 2
IAP	inhibitors of apoptosis proteins
ICAD	Inhibitor of caspase activated Dnase
IDH1	isocitrate dehydrogenase 1
IDH2	isocitrate dehydrogenase 2
Indel	Indel variácie
Ins	inzercia
inv	inverzia
JAK2	Janus kinase 2
KEAP1	kelch-like ECH-associated protein 1
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
KP	karcinóm prsníka
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog
LCR	low-copy repeats
LINE	long interspersed nuclear elements
lncRNA	dlhé nekódujúce RNA molekuly
LOH	strata heterozygoty
LTR	long terminal repeats
MC1R	melanocortin 1 receptor
MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog
MET	MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase
MITF	melanogenesis associated transcription factor
MLH1	E.coli MutL homolog gene
MLL2	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2
mRNA	messengerová RNA
miRNA	mikro RNA

MSH2	mutS homolog 2 (E. coli)
MSH6	mutS homolog 6 (E. coli)
MUTYH	mutY homolog (E. coli)
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
NGS	technológie sekvenovania novej generácie
NF1	neurofibromatosis type 1 gene
NFE2L2	nuclear factor, erythroid 2-like 2
NKX2-2	Homeobox protein NK-2 homolog B
NKX3-1	NK3 homeobox 1
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
NSCLS	nemalobunkový karcinóm pľúc
NTRK1	neurotrophic tyrosine kinase
OCA2	oculocutaneous albinism II
OH	hydroxylová skupina
OLIG2 (BHLHB1)	oligodendrocyte lineage transcription factor 2
PARP	polymeráza polyADP-ribóza
PDGFRA	platelet-derived growth factor; alpha-receptor
PD-L	programmed cell death ligand
PET	pozitrónová emisná tomografia
Ph	filadelfský chromozóm
PI3K	kináza fosforylujúca fosfatidylinozitol
PIK3CA	phosphoinositide-3-kinase; catalytic; alpha polypeptide
PMS2	PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)
PO4 ³⁻	fosfátová skupina
PTEN	phosphatase and tensin homolog gene
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
PSA	prostatický špecifický antigén
RAD51L1	DNA repair protein RAD51 homolog 2
RAF	v-raf murine leukemia viral oncogene homolog
RARB	retinoic acid receptor, beta
RASSF1A	Ras association domain family 1 isoform A
Rb	retinoblastoma gene

RIL	radiation-induced leukemia sensitivity gene
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonukleová kyselina
ROS1	proto-oncogene 1
rRNA	ribozomálna RNA
S	Svedbergova jednotka
ssDNA	single-stranded DNA
SINE	short interspersed nuclear elements
SCLC	malobunkový karcinóm pľúc
SLC45A2	solute carrier family 45, member 2
snRNA	malé jadrové RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
SPOP	speckle type POZ protein
STR	short tandem repeats
T	tymín
TEL (ETV6)	ets variant gene 6
TERT	telomerase reverse transcriptase
TNF	tumor nekrotizujúci faktor
TP53	tumor protein p53
Tris	tris(hydroxymetyl)aminoetán
tRNA	transferová RNA
TYR	tyrosinase
U	uracil
USG	ultrasonografia
UTX	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome
VNTR	variable number of tandem repeats
v-src	onkogén náchádzajúci sa v genóme vírusu Rousovho sarkómu neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)