

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra Antropologie a genetiky člověka



**SLEDOVÁNÍ CHROMOZOMÁLNÍCH ZMĚN
U SOLIDNÍCH NÁDORŮ SE ZAMĚŘENÍM
NA KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM**

Bakalářská práce

Soňa Vodenková

2009/2010

Školitel: Mgr. Čejková Pavlína, PhD.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné použití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a souhlasím s tím, aby byla řádně vedena v evidenci vypůjčovatelů.

V Praze dne 13. srpna 2010

.....

Soňa Vodenková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé práce Mgr. Pavlíně Čejkové, Ph.D., a to především za trpělivost, věnovaný čas, cenné rady a připomínky. Dále pak bych chtěla poděkovat konzultantce RNDr. Zdeňce Polívkové z Ústavu obecné biologie a genetiky 3. lékařské fakulty za poskytnutí odborných rad. V neposlední řadě děkuji rodině za podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

Nádorová onemocnění jsou globální genetická a epigenetická onemocnění, která stojí i přes intenzivní výzkum a pochopení základních mechanismů jejich vzniku stále v popředí z hlediska lidské morbidity a mortality. Vývoj a vznik nádoru je složitý mnohastupňový proces, během kterého získávají genomy vznikajících nádorových buněk mutantní alely genů, jež jsou rozhodující v procesu maligní transformace. Mezi nejdůležitější skupiny těchto genů patří protoonkogeny, tumor-supresorové geny a mutátorové geny. Epigenetické změny, jako DNA metylace a histonové modifikace, byly v posledních letech uznány jako nejdůležitější znaky lidských nádorů a díky pokrokům v porozumění jejich fungování se i stále více rozšiřuje epigenetická nádorová terapie. Z hlediska cytogenetiky obsahují nádorové buňky četné numerické a strukturní aberace. U maligních buněk bývá častá heteroploidní chromozomová výbava a chromozomy vykazují často náhodné, ne vždy jednoznačně definovatelné strukturní aberace. U některých nádorů se ale vyskytují pro ně typické nenáhodné (systematicky se opakující) strukturní změny. Vysoká frekvence chromozomálních aberací (CHA) v lymfocytech periferní krve predikuje zvýšené riziko vzniku nádorového onemocnění. CHA u lidských solidních nádorů jsou charakteristickým znakem genové deregulace a nestability genomu. Solidní nádory lze nejlépe charakterizovat kombinací cytologických, cytogenetických a molekulárně-cytogenetických metod (především pomocí technik založených na metodě *in situ* hybridizace). Tyto analýzy jsou nezbytné pro poskytování diagnostických nebo prognostických informací u řady solidních nádorů. Tato práce je shrnutím molekulárně genetických, epigenetických a chromozomálních změn vedoucích ke vzniku nádoru a metod jejich detekce, se zvláštním zaměřením na kolorektální karcinom.

Klíčová slova: nádorová onemocnění, CRC, maligní transformace, protoonkogeny, tumor-supresorové geny, epigenetika, chromozomální aberace, kolorektální karcinom, FISH, CGH

Abstract

Cancer diseases are global genetic and epigenetic diseases, which despite the intensive research and the knowledge of the basic mechanism of their formation, are still in the centre of attention concerning human morbidity and mortality. Carcinogenesis and tumour formation is a complex multi-stage process during which the genomes of originating tumour cells acquire mutant allele of genes that are crucial for malignant transformation process. The most important groups of such genes are protooncogenes, tumor-suppressor genes and mutator genes. In the last few years, epigenetic mutations, such as DNA methylation and histon modification have been acknowledged as the most important human tumour markers and owing to the progress in the understanding of their behaviour the epigenetic tumour therapy is widening increasingly. In term of cytogenetics, tumour cells contain extensive numerical and structural aberrations. Malignant cells often have heteroploid chromosomal equipment and chromosomes often show random structural aberrations, which are not always unambiguously definable. But typical non-random (repeated systematically) structural changes occur at some tumours. High frequency of chromosomal aberrations (CHA) at peripheral blood lymphocytes predicts enhanced risk of the cancer disease formation (appearance, origination). CHA at human solid tumours are the characteristic sign of gene deregulation and genome instability. Solid tumours can be best characterized by combination of cytological, cytogenetic and molecularly-cytogenetic methods, especially with the aid of techniques based on the method of in situ hybridization. Such analyses are necessary to provide diagnostic or prognostic information for numerous solid tumours. This work is the summary of molecularly genetic, epigenetic and chromosomal changes that lead to tumour formation and the methods of their detection, focused especially on colorectal cancer.

Keywords: cancer, malignant transformation, CRC, protooncogenes, tumor-suppressor genes, epigenetics, chromosomal aberrations, colorectal cancer, FISH, CGH

Obsah

Přehled použitých zkratk	7
1. Úvod	9
2. Molekulárně genetické a epigenetické změny vedoucí ke vzniku nádoru	12
2.1. Karcinogeny.....	12
2.2. Molekulárně genetické změny	14
2.2.1. Protoonkogeny a onkogeny.	15
2.2.1.1. Telomerázy jako onkogeny.....	17
2.2.2. Tumor-supresorové geny	19
2.2.3. Mutátorové geny	20
2.3. Epigenetické změny.....	20
2.3.1. DNA methylace	21
2.3.2. Modifikace histonů	22
3. Chromozomální aberace při vzniku nádoru	25
3.1. Dělení chromozomálních aberací	25
3.2. Mechanismus vzniku chromozomálních aberací.....	25
3.3. Typy chromozomálních aberací v lidských nádorových buňkách	28
4. Mutace a chromozomální aberace při vzniku CRC	29
4.1. Struktura sliznice tlustého střeva	29
4.2. Mutace a chromozomální aberace v karcinogenezi CRC.....	29
5. Metody detekce chromozomálních změn v nádorové tkáni	34
5.1. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH).....	36
5.1.1. Historie FISH.....	37
5.1.2. Principy FISH	39
5.1.3. Sondy pro FISH, metody jejich značení a vizualizace signálů	40
5.2. Multicolor FISH (M-FISH) a Spektrální karyotypování (SKY)	41
5.3. Multicolour banding (M-band)	42
5.4. Komparativní genomová hybridizace (CGH).....	43
6. Závěr	44
7. Seznam použitých zdrojů informací	45

Přehled použitých zkratk

ALT	Alternative lengthening of telomeres	Alternativní prodlužování telomer
CBP	CREB-binding protein	CREB-vazebný protein
CGH	Comparative genomic hybridization	Komparativní genomová hybridizace
CHA	Chromosome aberrations	Chromozomální aberace
CHSA	Chromosome aberrations	Chromozomové aberace
CHTA	Chromatide aberrations	Chromatinové aberace
CRC	Colorectal cancer	Kolorektální karcinom
DAPI	Diaminophenyl-indol	Diaminofenyl-indol
DNMT	DNA methyl transferase	DNA metyltransferáza
DSBs	Double-strand breaks	Dvouvláknové zlomy
dUTP	Deoxyuridine triphosphate	Deoxyuridin trifosfát
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FITC	Fluorescein isothiocyanate	Fluorescein thioisokyanát
GDP	Guanosine diphosphate	Guanosin difosfát
GTP	Guanosine triphosphate	Guanosin trifosfát
HAT	Histone acetyl transferase	Histon acetyltransferáza
HDAC	Histone deacetylase	Histon deacetyláza
HHV-8	Human herpes virus type 8	Lidský herpes virus typu 8
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1	Virus lidské imunodeficiency typu 1
HIV-2	Human immunodeficiency virus type 2	Virus lidské imunodeficiency typu 2
HNPCC	Hereditary non-polyposis colon cancer	Děděčné nádorové onemocnění tlustého střeva bez předchozího polypózního stádia
HPV-16	Human papilloma virus type 16	Lidský papiloma virus typu 16
HPV-18	Human papilloma virus type 18	Lidský papiloma virus typu 18
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase	Lidská telomerázová reverzní transkriptáza
HTLV-1	Human T-lymphocyte virus type 1	Virus lidských T-lymfocytů typu 1

IARC	International Agency of Research on Cancer	Mezinárodní agentura pro výzkum nádorových onemocnění
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature	Mezinárodní systém pro lidskou cytogenetickou nomenklaturu
ISH	<i>In situ</i> hybridization	<i>In situ</i> hybridizace
MBD	Methyl-binding domain protein	Metyl-vazebné domény proteinů
MMR	Mismatch repair genes	Mutátorové (reparační) geny
M-BAND	Multicolour banding	Mnohobarevné pruhování
M-FISH	Multicolour fluorescence <i>in situ</i> hybridization	Mnobarevná fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PRINS	Primed <i>in situ</i> labeling	Pruhovací <i>in situ</i> barvení
RSV	Rouse sarcom virus	Virus Rousova sarkomu
SKY	Spectral karyotyping	Spektrální karyotypování
TCDD	2,3,7,8-tetrachloro- -dibenzo(b,e)(1,4)dioxine	2,3,7,8-tetrachloro- -dibenzo(b,e)(1,4)dioxin
THBS1	Thrombospondin	Trombospondin
TRITC	Tetramethylrhodamin	Tetrametylrhodamin
UTP	Uridine triphosphate	Uridin trifosfát
WHO	World Health Organisation	Světová zdravotnická organizace

1. Úvod

Definovat termín nádor (tumor) není zcela jednoduché. Přestože lékaři dobře znají jeho význam, nelze na otázku „Co je nádor?“ odpovědět stručně a komplexně. Tento termín je latinského původu a znamená „otok“. Ale ne všechny otoky jsou tumory v moderním slova smyslu (Connolly, J. L. *et al.*, 2000). Podle Clark, W. H., 1991 zní definice takto: Nádor je populace abnormálních buněk vyznačující se časově neomezenou růstovou preferencí (kontinuálně se zvyšujícím počtem buněk v populaci) přes jejich normální protějšky. Tyto abnormální buňky napadají okolní tkáň, procházejí alespoň jednou zónou bazální membrány, rostou v mezenchymu na primární lokalitě a mohou metastazovat do okolních míst. Jedná se o soubor vlastností, který určuje, zda by daná porucha měla být označena jako nádorové onemocnění (Clark, W. H., 1991).

Obecně rozdělujeme malignity na čtyři základní typy: sarkomy, karcinomy, lymfomy a leukémie. Sarkomy jsou nádory, které vznikly z mezenchymální tkáň (kost, sval, vazivo). Karcinomy naopak pocházejí z epitelální tkáň (výstelka střeva, bronchů, vývodů mléčné žlázy). Lymfomy jsou zhoubné nádory lymfatických uzlin a lymfatické tkáň v okolí sleziny, jater, střev a velkých krevních cév. Hematopoetické malignity jsou nádorová onemocnění, která vycházejí z krvetvorné tkáň a lymfatických uzlin, ale na rozdíl od lymfomů postihují celý organismus a těmito nádorovými buňkami jsou prostoupeny více méně všechny orgány (Nussbaum, R. L. *et al.*, 2004).

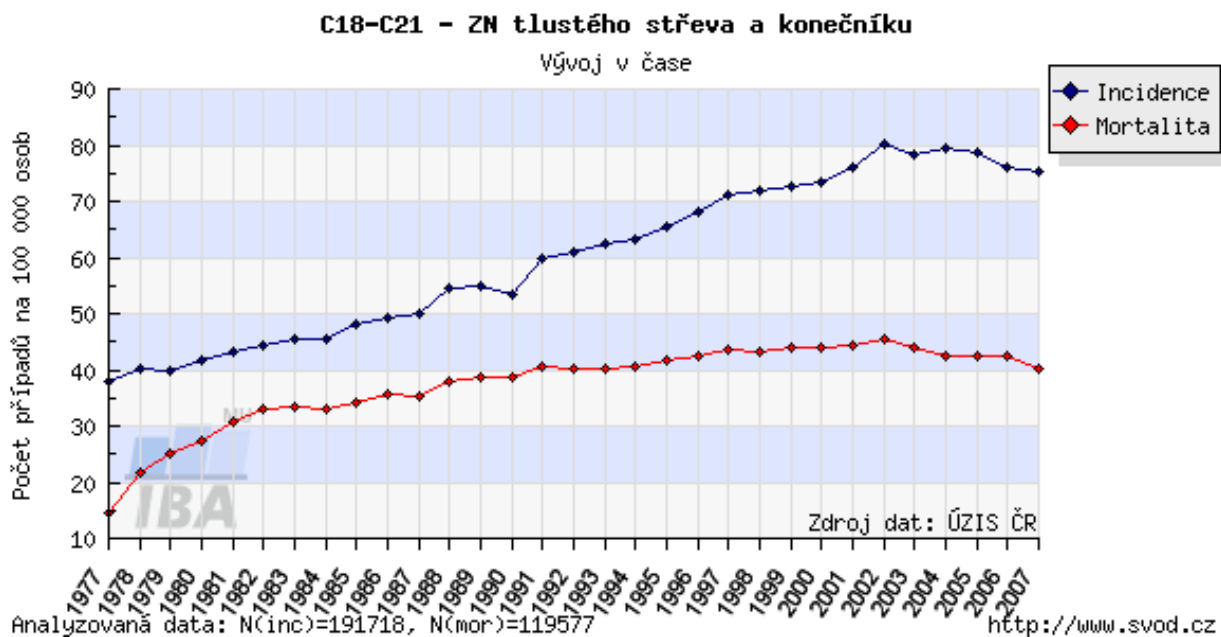
Výraz solidní nádor pak používáme pro označení všech nádorových onemocnění, která napadají tělesné tkáň s výjimkou krve, kostní dřeně a lymfatické soustavy (www.breastcancer.org – Dictionary).

Nádorová onemocnění jsou globální onemocnění, která stojí i přes intenzivní výzkum a pochopení základních mechanismů jejich vzniku stále v popředí z hlediska lidské morbidity a mortality. Podle WHO představovala nádorová onemocnění v roce 2004 13% všech úmrtí (7,4 milionů) na světě. Ani prognózy do budoucna nevypadají nijak dobře, v počtech úmrtí se předpokládá další růst, na rok 2030 se odhaduje úmrtnost 12 milionů za rok. Karcinom plic (1,3 mil. úmrtí/rok), žaludku (803000), tlustého střeva (639000), jater (610000) a prsu (519000) představuje nejvíce úmrtí na toto onemocnění ročně. Z toho více než 30% úmrtí by se dalo předejít a více než 70% všech úmrtí připadá na země s nízkými nebo středními příjmy (www.who.int, 2009). V Evropě bylo za rok 2006 diagnostikováno 3,2 milionů případů nádorových onemocnění a 1,7 milionů úmrtí. Nejčastějšími malignitami s následkem úmrtí

jsou v Evropě karcinom plic, následuje karcinom tlustého střeva, prsu a žaludku (Ferlay, J. *et al.*, 2007).

Kolorektální karcinom (CRC) je zhoubný nádor buněk sliznice tračnicku a konečníku. Právě od latinských názvů těchto dvou částí tlustého střeva je odvozen termín kolorektální, tj. od pojmů colon (tračník) a rektum (konečník). CRC je jednou z nejčastějších onkologických diagnóz a ve všech vyspělých státech jeho incidence setrvale narůstá. Česká republika bohužel v mezinárodním srovnání obsazuje přední místa. Podle posledních dat z roku 2006 české prvenství v onemocnění kolorektálním karcinomem vystřídalo u mužů Maďarsko a u žen Česká republika stojí za Maďarskem a Slovenskou republikou v rámci incidence (Ferlay, J. *et al.*, 2007). Populační zátěž je opravdu vysoká, ročně je v ČR nově diagnostikováno 7900–8100 pacientů s tímto karcinomem a 4300–4500 pacientů na něj zemře (Dušek, L. *et al.*, 2009). Rovněž z hlediska mortality zaujímáme přední světová místa (2. místo muži, 4. místo ženy). Závažnost onemocnění kolorektálním karcinomem v ČR dokládá i následující graf, který zobrazuje časový vývoj hrubé incidence (tj. počet nových případů na 100000 osob) a hrubou mortalitu (tj. počet úmrtí na diagnózu na 100000 osob) v rámci celé populace.

Obrázek 1: Graf znázorňující časový vývoj hrubé incidence a hrubé mortality v ČR pro kolorektální karcinom (www.svod.cz - Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice)



Co se týče nádorových onemocnění, je všeobecně známo, že záchyt onkologického onemocnění v méně pokročilém stádiu (a nebo nejlépe ve fázi prekancerózy) výrazně zvyšuje naději na dobrý výsledek léčby a na dlouhodobé přežití. Pokud nahlédneme do populačních dat o kolorektálním karcinomu, zjistíme, že Česká republika má v tomto ohledu nelichotivé postavení. Více než 50% nových pacientů s CRC je diagnostikováno v klinickém stádiu III nebo vyšším. Tato skutečnost pak tedy samozřejmě výrazně snižuje počet úspěchů v léčbě. Tato epidemiologická situace je výzvou pro posílení všech aktivit směřujících k prevenci CRC, v první řadě organizovaného screeningu tohoto onemocnění (Dušek, L. *et al.*, 2005).

Prevence nádorových onemocnění je obecně základem úspěchu. Primární prevenci rozumíme eliminaci faktorů zvyšujících riziko rozvoje nádoru. Mezi rizikové faktory řadíme hereditární (vrozené) dispozice především u příbuzných 1.stupně a faktory vnějšího prostředí spojené s nezdravým životním stylem. Významnou součástí primární prevence je i využití biomarkerů expozice a účinku (konkrétně cytogenetických analýz lymfocytů periferní krve) u osob exponovaných genotoxickým karcinogenům (Rössner, P., 2006). Sekundární prevence je zaměřena na včasný záchyt onemocnění ve stádiu, které je léčitelné. Základem sekundární prevence je tedy aktivní vyhledávání nádorových onemocnění, nejlépe plošně v celé populaci. Terciární prevence spočívá v předcházení dalším negativním účinkům onemocnění.

2. Molekulárně genetické a epigenetické změny vedoucí ke vzniku nádoru

Nádorové onemocnění je genetické onemocnění. Přesto existují dva hlavní rozdíly mezi nádorem a většinou ostatních genetických onemocnění. Za prvé, nádor je z velké části způsoben somatickými mutacemi, zatímco všechny ostatní genetické choroby savců jsou způsobeny výhradně zárodečnými mutacemi. Za druhé, nádorové onemocnění nevzniká na základě pouze jediné mutace, ale nahromaděním několika mutací a dalších genetických změn (Vogelstein, B.; Kinzler, K. W., 1993). Jednotlivé typy genetických změn a jejich rozličné kombinace přispívají k neoplastické transformaci. Vznik a vývoj nádoru je složitý proces, jenž zahrnuje komplexní posloupnost událostí, které se obvykle odehrávají v průběhu několika let až desetiletí. Během tohoto mnohastupňového procesu získávají genomy vznikajících nádorových buněk mutantní alely genů, které jsou rozhodující pro vznik nádorového onemocnění (Hahn, W. C.; Weinberg, R. A., 2002). Mezi nejdůležitější skupiny genů podílející se na vzniku nádoru patří protoonkogeny, tumor-supresorové geny, mutátorové geny a checkpoint geny.

Nádorové onemocnění je rovněž epigenetickým onemocněním. Epigenetické mechanismy, které zahrnují modifikace DNA a histonů, mají za následek dědičné umlčování genů bez změny jejich kódující sekvence. Epigenetika se tedy týká odlišných fenotypových stavů, které nejsou založeny na rozdílech v genotypu a které jsou potenciálně vratné, ale jsou obecně udržovány během buněčného dělení (Laird, W. P., 2005). Částečně tak dokáže vysvětlit rozmanitost fenotypů v populaci (Esteller, M., 2008). Epigenetické procesy jsou nezbytné pro normální vývoj a udržení tkáňově specifických vzorů genové exprese u savců. Narušení těchto procesů může vést ke změně funkce genů a k maligní buněčné transformaci (Sharma, S. *et al.*, 2010). Epigenetické změny zahrnují především DNA metylaci, modifikace histonů, polohování nukleosomů a nekódující RNA (především expresi microRNA).

2.1. Karcinogeny

Mutace vedoucí ke vzniku nádorového onemocnění mohou být buď vrozené (familiární výskyt určitých nádorů), nebo získané během života jedince následkem působení různých mutagenů – karcinogenů, neboli faktorů vnějšího prostředí. Karcinogen se definuje jako látka nebo faktor, který způsobuje maligní transformaci buněk. Nezpůsobuje ale malignizaci v každém případě a v jakékoliv fázi ontogenetického vývoje, navíc má také různé

úrovně karcinogenního potenciálu (www.cancer.org). Působení karcinogenu nevede k okamžité produkci nádoru, ale následuje řada změn po iniciačním kroku, který byl vyvolán karcinogenem.

Karcinogeny můžeme rozdělit do 3 skupin podle původu:

1) Fyzikální

(různé typy záření – UV záření, ionizující záření, Gamma-paprsky)

2) Chemické

(různé polycyklické aromatické uhlovodíky, např. tabákového kouře, aminy, těžké kovy, aflatoxiny, estrogeny, steroidy,...)

3) Biologické

(onkogenní viry – DNA onkoviry: polyomavirus SV40, lidské papiloma viry (HPV- 16, 18,...), herpesvirus Epstein-Barrové, lidský herpesvirus typu 8 (HHV-8), virus Rousova sarkomu (RSV), nádory spojené s chronickou infekcí virem hepatitidy typu B a C; retroviry: HTLV-1 virus, nádory spojené s infekcí HIV-1 a HIV-2; nádory spojené s infekcí bakterie *Helicobacter pylori*; nádory spojené s infekcí parazitem *Schistosoma haematobium*)

Dále dělíme karcinogeny do 2 skupin podle mechanismu jejich účinku na:

1) Genotoxické – působí přímé poškození DNA, na které buňka reaguje spuštěním reparačních mechanismů, pozastavením buněčného cyklu nebo indukci apoptózy (van Delft, J. H. M. *et al.*, 2004); přímo ovlivňují strukturu nebo počet chromozomů, jsou snadno detekovatelné v testech na mutagenicitu, klastogenicitu, DNA opravu nebo DNA reaktivitu (př. přímé působení - etyl metan sulfonát; vyžadující metabolickou aktivaci - dimetylnitrosamin, 2-acetylaminofluoren, 1,6-dinitropyren) (Parodi, S. *et al.*, 1991);

2) Negenotoxické – přímo nepoškozují DNA, ale buňka na ně může reagovat celou řadou buněčných procesů (van Delft, J. H. M. *et al.*, 2004), přičemž genotoxický dopad je sekundární k jiným biologickým aktivitám (př. mitogenní karcinogeny - fenobarbital, receptorem zprostředkované karcinogeny - TCDD, cytotoxické karcinogeny - chloroform) (Parodi, S. *et al.*, 1991).

IARC (International Agency for Research on Cancer) neboli Mezinárodní agentura pro výzkum nádorových onemocnění, která je součástí WHO (World Health Organization) – Světové zdravotnické organizace, koordinuje výzkum příčin nádorových onemocnění, vede oficiální databázi kategorizující karcinogeny a vydává monografie věnované jednotlivým agens.

Podle IARC jsou karcinogeny děleny do těchto kategorií:

Skupina 1: Prokázané karcinogeny pro člověka (107)

Skupina 2A: Látky pravděpodobně karcinogenní pro člověka (58)

Skupina 2B: Látky potenciálně karcinogenní pro člověka (249)

Skupina 3: Látky neklasifikované jako karcinogenní pro člověka (512)

Skupina 4: Látky pravděpodobně nekarcinogenní pro člověka (1)

(Podle www.iarc.fr, 2010)

2.2. Molekulárně genetické změny

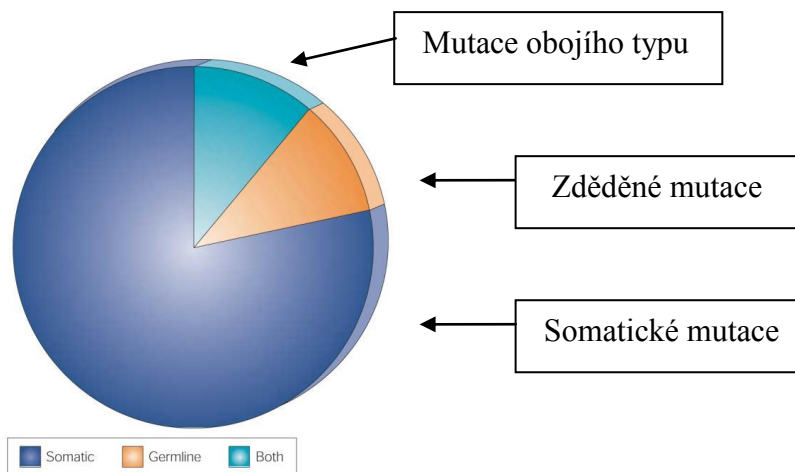
Vlastní příčinou vzniku nádorových buněk jsou změny na molekulární úrovni. S přibývajícím věkem jedince exponenciálně roste výskyt rakoviny zhruba 10^3 až 10^7 krát (Miller, D. G., 1980). To je důkazem toho, že k maligní transformaci dochází až po dostatečné kumulaci mutací v určitých genech. Maligní transformaci může spouštět jediná buňka a může postihnout buňky téměř kterékoliv tkáně. Následně pak klonálním namnožením buněk vzniká maligní tkáň (nádor) s autonomním, často neomezeným růstem. Klonální množení znamená, že všechny buňky pocházejí ze stejného předka, tj. že vznikly jako klony jediné výchozí buňky. Nádor je tedy klonálním onemocněním. Neoplázie je termín používaný k popisu různorodých okolností spojených s nekontrolovanou buněčnou replikací. Množství tkáňové hmoty je normálně přísně kontrolováno podle potřeb organismu. Této kontroly je dosaženo vyvážením různých buněčných procesů. Narušení rovnováhy těchto procesů má pak za následek onemocnění. Jestliže je expanze buněk omezena jen lokálně, popisujeme ji jako benigní. Pokud je ale toto patologické buněčné dělení doprovázeno invazí do okolní tkáně nebo šířením do vzdálených míst pomocí metastáz, pak se jednoznačně popisuje jako maligní (Pelengaris, S.; Khan, M., 2006).

Ale nelze tvrdit, že mutace v kterémkoliv genu přispívají ke vzniku a vývoji nádoru. Genetický materiál každé buňky podle odhadů kóduje přibližně 30000 genů a pouze v necelých 10% těchto genů způsobují mutace proces karcinogeneze. Jedná se o geny, jež hrají

klíčovou roli v kritických regulačních buněčných procesech, jako je buněčné dělení, regulace životnosti buňky, diferenciaci, angiogeneze, invaze a buněčná smrt (Oster, S. *et al.*, 2005). Tyto procesy se vztahují k již zmíněným skupinám genů – protoonkogenů, tumor-supresorových genů, mutátorových a checkpoint genů.

Mezi nejčastější mutace těchto genů patří bodové mutace, substituce (tranzice nebo transverze), delece, inserce, duplikace, rozsáhlé genomové delece nebo tandemové multiplikace a amplifikace. Tyto geny nejsou náchylné k mutacím více než jiné geny, ale co odlišuje mutace v nádoru od jiných mutací, je mutacemi podmíněná intenzivní selektivní podpora buněčné proliferace nebo přežití (Nussbaum, R. L. *et al.*, 2004).

Obrázek 2: Typy mutací v lidských nádorech (převzato z Futreal, P. A. *et al.*, 2004)



2.2.1. Protoonkogeny a onkogeny

Jednotlivé geny se nacházejí v každé buňce ve dvou kopiích (alelách). Specifická mutace jedné alely tohoto genu změní normální formu protoonkogenu na aktivní, transformující onkogen. Tato mutace tedy vede ke zvýšení funkce. Onkogen je dominantní nad protoonkogenem a všeobecně rozhoduje o proteinovém produktu, který je deregulační a/nebo konstitutivně aktivní (Oster, S. *et al.*, 2005). Onkogeny ale nemusí být pouze mutované alely normálních celulórních protoonkogenů, ale mohou to být také takové geny, které kódují telomerázu, nebo geny, které blokují apoptózu (Nussbaum, R. L. *et al.*, 2004).

Protoonkogeny jsou vysoce evolučně konzervované geny, jejichž proteinové produkty řídí důležité funkce regulující buněčný růst a diferenciaci buněk. Regulují buněčnou proliferaci na všech úrovních signálních drah. Produkty protoonkogenů můžeme klasifikovat

do šesti skupin: transkripční faktory, chromatinové remodelátory, růstové faktory, receptory růstových faktorů, molekulární přepínače a regulátory apoptózy (Croce, C. M., 2008).

K aktivaci onkogenů dochází několika způsoby: chromozomální přestavbou, genovou mutací, amplifikací, nebo změnou exprese (metylace, imprinting). Mutace mohou zasáhnout buď přímo gen nebo jeho regulační oblast. Genetické změny protoonkogenů vedou buď k nadměrné aktivitě změněného produktu, nebo se vytváří produkt normální, ale v nadměrném množství. Produkty onkogenů (onkoproteiny) jsou pak zodpovědné za změny regulace buněčné proliferace.

Tabulka 1: Přehled onkogenů podílejících se na vzniku lidských nádorů

(převzato z Weinberg, R. A., 1994)

Gen	Asociace s nádorem	Mechanismus aktivace	Vlastnosti genového produktu
ERBB2	Karcinom prsu, vaječnicků a žaludku	Amplifikace	Povrchový receptor růstového faktoru
ERBB	Karcinom prsu, glioblastom	Amplifikace	Receptor růstového faktoru
RAF	Karcinom žaludku	Změna v uspořádání	Cytoplasmatická serin/threoninová kináza
HARAS	Karcinom močového měchýře	Bodová mutace	GDP/GTP vazba
KIRAS	Karcinom plic a tlustého střeva	Bodová mutace	GDP/GTP vazba
NRAS	Leukémie	Bodová mutace	GDP/GTP vazba
MYC	Lymfomy, karcinomy	Amplifikace, chromozomální translokace	Jaderný transkripční faktor
NMYC	Neuroblastom	Amplifikace	Jaderný transkripční faktor
LMYC	Karcinom malých buněk plic	Amplifikace	Jaderný transkripční faktor
BCL2	Folikulární a nediferencované lymfomy	Chromozomální translokace	Cytoplasmatický mitochondriální
GSP	Nádor hypofýzy	Bodová mutace	Cytoplasmatický GDP/GTP signální transducer
HST	Karcinom žaludku	Změna v uspořádání	Růstový faktor
RET	Karcinom štítné žlázy	Změna v uspořádání	Receptor růstového faktoru
TRK	Karcinom štítné žlázy	Změna v uspořádání	Receptor růstového faktoru

2.2.1.1. Telomerázy jako onkogeny

Jiným typem onkogenu je gen kódující telomerázu. Telomeráza je reverzní transkriptáza (RNA dependentní DNA-polymeráza), která prodlužuje repetitivní sekvence na konci eukaryotních lineárních chromozomů, tzv. telomery, a to takovým způsobem, že po každém buněčném cyklu doplní 3' konec opožďujícího se vlákna o hexanukleotidové repetice TTAGGG (tento vzor repetitivního úseku je pouze u obratlovců). Telomeráza je tedy ribonukleoprotein, nese si vlastní RNA, kterou používá jako templát pro přidání repetitivní telomerické DNA. Telomery chrání konce eukaryotických chromozomů a slouží jako vazebné místo pro širokou škálu vazebných proteinů. Jejich zkracování v důsledku snížené funkce nebo nefunkčnosti telomerázy vede k replikativnímu stárnutí buňky a naopak nadměrná funkce telomerázy vede ke zvýšené proliferaci, a tudíž ke zvýšení rizika vzniku nádoru.

Pokud je telomeráza nefunkční, po desítkách (40 – 60, u některých buněk max. 80) buněčných dělení budou konce chromozomů poškozeny a geny lokalizované blízko telomer mohou být deletovány. Kriticky krátké telomery a následné poškození DNA pak vyvolává buněčné a tkáňové defekty prostřednictvím checkpoint signálních drah, které se sbíhají na tumor supresorovém proteinu p53, velmi známém buněčném senzoru stresu, který způsobuje zástavu buněčného dělení spojenou s přechodem buňky do G₀-fáze nebo smrt buňky (Artandi, S. E.; DePinho, R. A., 2010).

Zvýšená funkce telomerázy v nádorových buňkách naopak zvyšuje schopnost neomezeně proliferovat. Obnova telomerázové aktivity buď může být výsledkem chromozomových změn (nereciprokých translokací a chromozomových fúzí) nebo genomových mutací, které přímo regulují expresi genu pro telomerázu, nebo je telomeráza jedním z mnoha genů, jejichž exprese je změněna onkogenem produkujícím transkripční faktor, jako je MYC.

Proces udržování telomer se tedy může částečně podílet na kontrole komplexních fenotypů, jako je stárnutí buněk a vznik nádorů procesem maligní transformace. Stabilizace délky telomer je silně spojená s buněčnou imortalizací a konstitutivní aktivace telomerázy se vyskytuje ve většině případů lidských nádorů. Tyto výzkumy tvoří základ pro přetrvávající model, který předpokládá, že změny v biologii telomer potlačují nebo usnadňují maligní transformaci regulací genomové stability a životnosti buněk (Blasco, M. A.; Hahn, W. C., 2003).

Nicméně vztah mezi telomerami, telomerázou a nádory je mnohem složitější než se zdál být. Novější výzkumy naznačují, že udržování telomer nemusí být obligátním

požadavkem pro počáteční vznik nádoru a že aktivace telomerázy přispívá ke vzniku tumoru nezávisle na její roli při udržování délky telomer (Blasco, M. A.; Hahn, W. C., 2003). I přes to, že většina lidských nádorových buněk vykazuje telomerázovou aktivitu, některé nádory (10 – 15%) postrádají detekovatelnou aktivitu telomerázy (Bryan, T. M. *et al.*, 1997). Mnoho, téměř většina těchto nádorů, kterým chybí telomerázová aktivita, se projevuje dodatečnými fenotypy – extrémně velikou a heterogenní délkou telomer a znatelnou imortalitou při kultivaci *in vitro*. V těchto buňkách se předpokládá, že k udržování délky telomer dochází alternativním mechanismem replikace telomer. Například u kvasinek dochází k podobnému procesu udržování délky telomer nezávislém na telomerázové aktivitě, jenž je založený na interchromozomové rekombinaci (Lundblad, V.; Blackburn, E. H., 1993). Práce z roku 2000 dokazuje, že zvýšená telomerická rekombinace se také vyskytuje v lidských ALT buňkách (z anglického spojení alternative lengthening of telomeres – alternativní prodlužování telomer) (Dunham, M. A. *et al.*, 2000).

ALT, které je závislé na homologní rekombinaci, je důležitý cíl pro léčbu nádorových onemocnění. Nedávný pokrok vedl k identifikaci několika genů, které jsou potřebné pro ALT, a k objasnění biologického významu některých fenotypových markerů ALT. To umožnilo rozvoj rychlého stanovení aktivity hladiny ALT a konstrukci molekulárních modelů ALT (Cesare, A. J.; Reddel, R. R., 2010).

Na druhé straně také nádorové buňky obvykle vykazují vysokou míru telomerických ztrát a tím způsobenou chromozomovou nestabilitu. Zdá se, že tato vysoká frekvence ztrát telomer vyplývá z kombinace čtyř hlavních faktorů. Prvním faktorem je zvýšená četnost dvouvláknových zlomů (DSBs – z anglického double-strand breaks) na fragilních místech v nádorových buňkách následkem replikačního stresu. Druhým faktorem je to, že jsou telomery samy o sobě nestabilními oblastmi. Třetí faktor je ten, že subtelomerické regiony jsou velmi citlivé k DSBs, takže tyto zlomy v blízkosti telomer zvyšují pravděpodobnost z toho plynoucí chromozomové nestability. Čtvrtým faktorem je to, že nádorové buňky mohou být deficientní k chromozomové léčbě, *de novo* přidání telomer do míst DSBs. To je mechanismus, jenž zabraňuje chromozomové nestabilitě plynoucí z DSBs v blízkosti telomer (Murnane, J. P., 2010).

Zásahy do telomerázové aktivity představují slibnou cestu ve vývoji v oblasti boje proti nádorovým onemocněním, a to anti-telomerázovou imunoterapií, s využitím lidské telomerázové reverzní transkriptázy (hTERT – z anglického human telomerase reverse transcriptase) jako tumorovým antigenem. Očkování pomocí hTERT peptidů nebo adoptivní přenos hTERT-specifických cytotoxických T-lymfocytů indukuje rozšířenou regresi nádoru.

Různé hTERT peptidové antigeny jsou proto slibnými kandidáty na očkovací látky proti nádorovým onemocněním (Liu, J. P. *et al.*, 2010).

2.2.2. Tumor-supresorové geny

Tumor-supresorové geny mají opačný charakter než onkogeny a jejich produkty se podílejí na inhibici buněčného dělení. Redukují tedy pravděpodobnost, že se buňka mnohobuněčného organismu zvrátí v buňku maligní. Uplatňují se zejména v regulaci trvání interfáze buněčného cyklu a podporují apoptózu. Mutace v tumor-supresorových genech mají recesivní charakter, tudíž pouze mutace v obou alelách tohoto genu vede k poruše regulace buněčného cyklu. Tyto geny přestávají plnit svou funkci, pokud jsou obě jejich alely mutovány nebo deletovány (Polinsky, K. R., 2007).

Tabulka 2: Přehled tumor-supresorových genů podílejících se na vzniku jednotlivých forem nádorů u lidí (převzato z Coppola, D., 2010)

Gen	Lokalizace na chromozomu	Nádor asociovaný se somatickou mutací	Nádor asociovaný s dědičnou (germinální) mutací
WT-1	11p13	Wilmsův tumor	Wilmsův tumor
p53	17p13.1	Mnoho lidských nádorů	Li-Fraumenův syndrom; karcinomy prsu a kůry nadledvin; sarkomy; leukémie; nádory mozku
APC	5q21	Karcinomy tlustého střeva, žaludku a pankratu	Familiární adenomatózní polypózy; karcinomy tlustého střeva
DCC	18q21	Karcinomy tlustého střeva a žaludku	Neznámo
WHL	3p25	Karcinomy renálních buněk	Von Hippelova - Lindauova choroba; hemangioblastomy retiny a cerebela; karcinomy renálních buněk; angiomy a cysty mnoha viscerálních orgánů
NF-1	17q11	Schwannomy	Neurofibromatóza typu 1; nádory nervů
NF-2	22q12	Schwannomy a meningiomy	Neurofibromatóza typu 2; centrální schwannomy; meningiomy
Rb	13q14	Retinoblastom; osteosarkom; karcinom prsu, močového měchýře, prostaty a plic	Retinoblastom; osteosarkom

2.2.3. Mutátorové geny

Mutátorové, nebo také reparační geny (MMR geny), kontrolují stabilitu genomu. Český název „reparační geny“ a zkratka MMR geny jsou odvozeny od anglického názvu – mismatch repair genes. Zachování genomové stability má zásadní význam pro přežívání buněk a jejich normální růst. Odpovídají za opravy (reparace) chyb v DNA vznikajících během replikace. Mutace těchto genů vedou k hromadění a udržování mutací v buňce, jako je nesprávné párování purinů a pyrimidinů, modifikace templátu mutagenem a následné chybné párování, nesprávný počet nukleotidů v repetitivní sekvenci polyA nebo v repetitivní sekvenci (CA)_n. Mutace v těchto genech musí opět postihnout obě alely, aby se projevila, je tudíž recesivního charakteru. Zvýšená frekvence a kumulace těchto mutací v buňce vede k maligní transformaci.

Mezi nejvýznamnější mutátorové geny patří hMSH2, hMSH6, hMLH1, hPMS1, hPMS2. Lidský mutátorový gen hMSH2 ležící na krátkém raménku chromozomu 2 a jeho mutace jsou zapojeny do procesu vzniku dědičného nádorového onemocnění tlustého střeva bez předchozího polypózního stádia (HNPCC – Hereditary non-polyposis colon cancer) (Fishel, R. *et al.*, 1993). Mutátorové geny se účastní i vzniku dalších typů nádorů, např.: nádorů ovárií, glioblastomů nebo karcinomů endometria.

2.3. Epigenetické změny

Termín epigenetika zahrnuje všechny dědičné modifikace v genové expresi, které ale nejsou současně spojeny se změnou DNA sekvence, jsou potenciálně reverzibilní, ale obecně jsou stabilně udržovány během buněčného dělení. Epigenetické změny byly v posledních letech uznány jako nejdůležitější znaky lidských nádorů (Cheung, H-H. *et al.*, 2009). Epigenetické modifikace jsou ve skutečnosti náchylné na změny a jsou výbornými kandidáty na vysvětlení, jak určité faktory životního prostředí mohou zvýšit riziko vzniku nádorového onemocnění (Esteller, M.; Herman, J. G., 2001). Oblast nádorové epigenetiky se rychle vyvíjí v mnoha směrech. Pokroky v porozumění chromatinové struktury, histonových modifikací, transkripční aktivity a DNA metylace přispívají k stále více ucelenému pohledu na epigenetiku. Díky tomu se rozšiřuje i epigenetická terapie, která zahrnuje použití kombinací různých histon deacetylázových (HDAC) a DNA metyltransferázových (DNMT) inhibitorů. Aberantní DNA metylační vzorce poskytly tři hlavní diagnostické aplikace, a to klasifikaci, citlivou detekci a rizikové hodnocení markerů (Laird, P. W., 2005).

2.3.1 DNA metylace

Každá buňka je tvořena souborem proteinů, který vzniká jako výsledek exprese genů, jež daným proteinům odpovídají svou sekvencí v DNA. Díky překlada informace nesené genem do proteinu je daná vlastnost nebo funkce realizována. DNA vazebné transkripční faktory jsou rozhodujícími faktory, které rozpoznávají DNA sekvence v promotorových oblastech genu a rozhodují o expresi jednotlivých genů. Určují, zda budou geny transkripčně aktivovány nebo reprimovány (Bird, A., 2002). Methylace promotoru inhibuje velika množství genů, včetně onkogenů. V nádorových buňkách se obvykle setkáváme se sníženou expresí DNA metyltransferázy, která vede k nespécifické demethylaci 5-metylcytosinů.

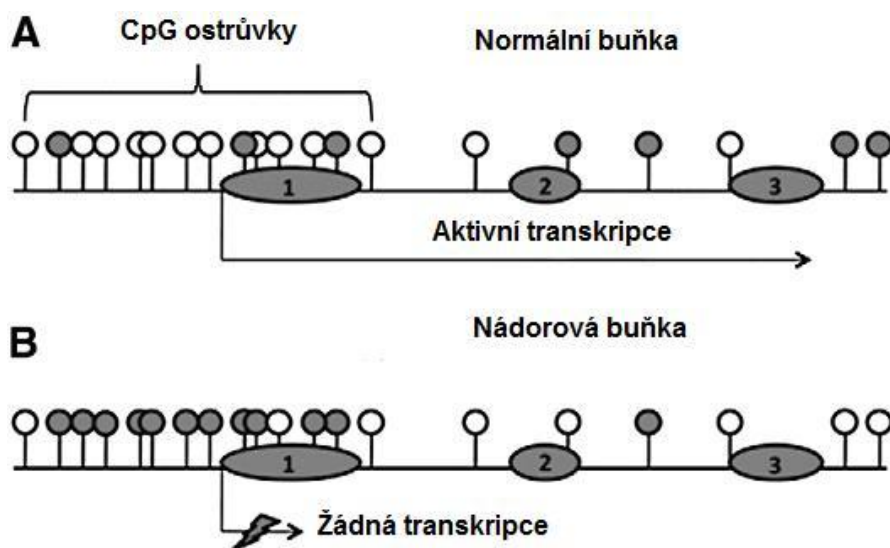
Změny metylace jsou spojeny s maligním procesem, kdy dochází ke globální hypomethylaci genomu, zvláště repetitivních sekvencí, a ke specifické hypermethylaci některých genů. Hypomethylace vede ke genomové nestabilitě a k dalším genetickým změnám, mutacím a chromozomálními aberacím. Hypomethylace také vede k aktivaci imprintovaných protoonkogenů (tj. genů, které mají aktivní jen jednu alelu) s následkem neregulovaného růstu a migrace buněk. Hypermethylace CpG promotorů tumor supresorových genů (např. Rb1, BRCA1), reparačních genů (např. hMLH1), inhibitorů angiogeneze (např. THBS1) vede k jejich inaktivaci (Ehrlich, M, 2002).

Stejné změny metylace genomu – globální hypomethylace a genově specifická hypermethylace jsou i průvodním jevem stárnutí, což je jedna z příčin souvislosti vyššího věku s nádory.

Obrázek 3: Methylace promotoru korelující s transkripční aktivitou downstream genů

(upraveno podle Kristensen, L. S. *et al.*, 2009)

- A) CpG místa (označovaná jako „lollipops“) v CpG ostrůvcích jsou v normálních buňkách obvykle nemytylována (nevybarvené kroužky), zatímco CpG místa rozptýlená mimo CpG ostrovy mají tendenci být netylována (vybarvené kroužky). CpG oblasti se často nacházejí uvnitř promotorových regionů a prvního exonu (exony těchto hypotetických genů jsou znázorněny jako ovály). Nemytylované CpG oblasti jsou obecně aktivně transkribovány.
- B) Transkripční umlčování tumor-supresorových genů v nádorových buňkách je často spojené s hypermethylací jejich promotorových CpG ostrovů. Kromě toho CpG místa ležící mimo ostrovy často podstupují v nádorových buňkách hypomethylaci.



2.3.2. Modifikace histonů

Histonové modifikace jsou další epigenetickou změnou, jež se podílejí na remodelaci chromatinu (Kristensen, L. S. *et al.*, 2009). Hlavní strukturou chromatinu u eukaryot je nukleosomové jádro, které se skládá z oktameru bazických proteinů zvaných histony ($2 \times \text{H2A}$, $2 \times \text{H2B}$, $2 \times \text{H3}$ a $2 \times \text{H4}$), kolem nichž je obtočená přibližně 146 bp dlouhá DNA (Luger, K. *et al.*, 1997). Chromatin se může nacházet ve dvou odlišných stavech - v otevřené nebo uzavřené konfiguraci. Uzavřená konfigurace chromatinové struktury je špatně přístupná pro transkripční aparát a obecně obsahuje transkripčně inaktivní geny. Methylace CpG ostrovů je často spojena s četnými chemickými modifikacemi histonů, což naznačuje, že se tyto DNA-balící proteiny účastní regulace genové exprese (Kristensen, L. S. *et al.*, 2009).

Nejvíce prostudovanou posttranslační modifikací histonů je acetylace lyzinových zbytků na N-koncích. Acetylací dojde k neutralizaci pozitivního náboje histonů, což má za následek snížení interakce histonů se záporně nabitou kostrou DNA, a tím otevření chromatinové struktury pro snazší přístup transkripčních faktorů (Gregory, P. D. *et al.*, 2001). Tudíž je acetylace histonů obvykle spojena s aktivací transkripce (Bernstein, B. E. *et al.*, 2007). Methylace histonu H3 na lyzinu 4 (K4) je další modifikace, jež je spojená s transkripční aktivací, zatímco methylace histonu H3 na lyzinu 9 (K9) nebo 27 (K27) a histonu H4 na lyzinu 20 (K20) je spojena s represí transkripce (Esteller, M., 2008 a Kondo, Y. *et al.*, 2008).

Za histonovou acetylaci je zodpovědná skupina proteinů, zvaná histon-acetyltransferázy (HAT), a naopak za odstraňování acetylových skupin (deacetylaci) mohou provádět proteiny s názvem histon-deacetylázy (HDAC), které tak mohou regulovat expresi mnoha genů, z nichž jsou některé zahrnuty do procesu apoptózy a buněčné proliferace (Kristensen, L. S. *et al.*, 2009). Deregulovaná činnost HAT a HDAC hraje roli při vývoji celé řady různých druhů nádorů. V důsledku toho mají inhibitory těchto enzymů potenciál protinádorových látek (Stimson, L. *et al.*, 2005).

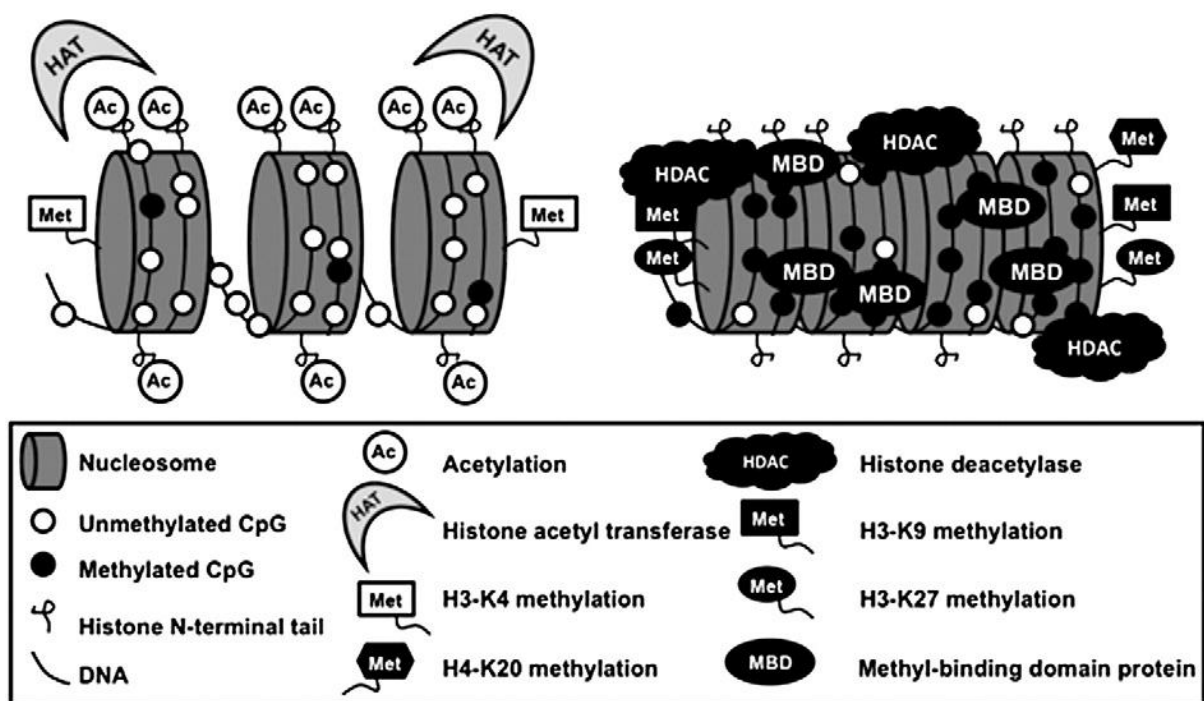
Histon-acetyltransferázovou enzymovou aktivitu vykazují řada proteinových faktorů. Jsou to zejména dva velké proteiny s vysokým stupněm homologie p300 a CBP (z anglického CREB-binding protein), které fungují jako transkripční koaktivátory pro množství tkáňově specifických transkripčních faktorů. HAT aktivitu mají i další skupiny proteinů, jako jsou např. PCAF, GCN5-L, GCN5-S, TAFII250, ACTR, SRC-1, MOZ, TIF2 a Tip60. Některé histonové acetyltransferázy jsou schopny acetylovat i nehistonové proteiny, např. p300 acetyluje tumor-supresorový protein a transkripční faktor p53, a zvyšuje tak jeho afinitu pro vazbu na DNA. Proteiny p300 i CBP mají vztah k ontogenezi a jsou již považovány za tumor-supresorové geny. Jejich koaktivační funkce při transkripci je inaktivována onkoproteiny DNA virů (E1a adenoviru, velký T-antigen SV40 viru) a jejich mutace byly nalezeny u nádorů. Byla nalezena inaktivace obou alel p300 (mutace jedné alely a současná ztráta druhé alely) u gastrointestinálních nádorů a karcinomu prsu. Tyto mutace p300 však byly přítomny jen v malém počtu případů; šlo o mutace somatické (Vachtenheim, J., 2000).

Deacetylace histonů v nukleozomech je enzymová reakce, která je protichůdná k HAT aktivitě a má za následek tvorbu kompaktních nukleozomů nepřístupných pro transkripci. HDAC byly tedy nalezeny v proteinových komplexech způsobujících transkripční represí. Pravděpodobně nejdůležitějším takovým komplexem, zvl. vzhledem k regulaci buněčné proliferace a k ontogenezi je komplex tumor-supresorového proteinu Rb (retinoblastoma protein) a HDCA. U nádorů je funkční inaktivace Rb hyperfosforylací ekvivalentní mutacím (často je též inaktivován onkosupresor p16, inhibitor cyklin dependentních kináz 4/6 inhibující fosforylací Rb) (Vachtenheim, J., 2000).

Obrázek 4: Časté epigenetické změny v nádorech

(převzato z Kristensen, L. S. *et al.*, 2009)

- 1) Na levé straně jsou zobrazeny promotorové oblasti v normálních buňkách s aktivně přepisovanými geny. Acylace histonových N-terminálních konců pomocí histon acetyl transferáz podporuje otevřenou chromatinovou konformaci, což umožňuje transkripčním faktorům nasednout na promotor.
- 2) Vpravo jsou ukázány promotorové oblasti nádorových buněk a epigeneticky umlčenými geny. CpG ostrovy jsou zde metylovány a metyl-vazebné domény (MBD) proteinů pomáhají histon deacetylázám, které odstraňují acetylové skupiny z N-terminálních konců histonů. Tato a další modifikace histonů vede k uzavření chromatinové struktury a znemožní nasednutí transkripčního aparátu.



3. Chromozomální aberace při vzniku nádoru

Chromozomální aberace (CHA) jsou změny v počtu chromozomů (numerické CHA) nebo změny ve struktuře (pořadí genů, poloha centromery) chromozomů (strukturní CHA), které mohou nastat spontánně nebo v důsledku působení genotoxických karcinogenů (Mateuca, R. *et al.*, 2006). Frekvence strukturních aberací chromozomů je mezinárodně uznávaný biomarker prokazující asociaci se sumárním karcinogenním rizikem. Vysoká frekvence CHA v lymfocytech periferní krve predikuje zvýšené riziko vzniku nádorového onemocnění (Hagmar, L. *et al.*, 2004). CHA u lidských solidních nádorů jsou charakteristickým znakem genové deregulace a nestability genomu (Albertson, D. G. *et al.*, 2003).

3.1. Dělení chromozomálních aberací

CHA zahrnují zlomy a výměny viditelné na metafázím rozprostření buněk a obvykle je dělíme na dva typy: chromozomové aberace (CHSA) a chromatidové aberace (CHTA), které se navzájem liší morfologicky. Do CHSA je zapojen stejný lokus na obou sesterských chromatidách jednoho nebo více chromozomů, zatímco CHTA postihují pouze jednu chromatidu jednoho nebo více chromozomů (Hagmar, L. *et al.*, 2004).

Z hlediska stability dělíme CHA na stabilní (balancované), které vznikají symetrickými výměnami genetického materiálu, a v buňce je ho tudíž zachováno stejné množství (př. translokace, inverze), a na nestabilní (nebalancované), vzniklé nesymetrickými výměnami, kdy se konečné množství genetického materiálu liší od původního (př. delece, duplikace) (Lobo, I., 2008).

Aberace také dělíme na jednochromatidové, které zasahují pouze jednu chromatidu, a dvouchromatidové, kterých se účastní obě chromatidy.

Dále můžeme CHA rozdělit na intrachromozomové (v rámci jednoho chromozomu) a interchromozomové (mezi více chromozomy).

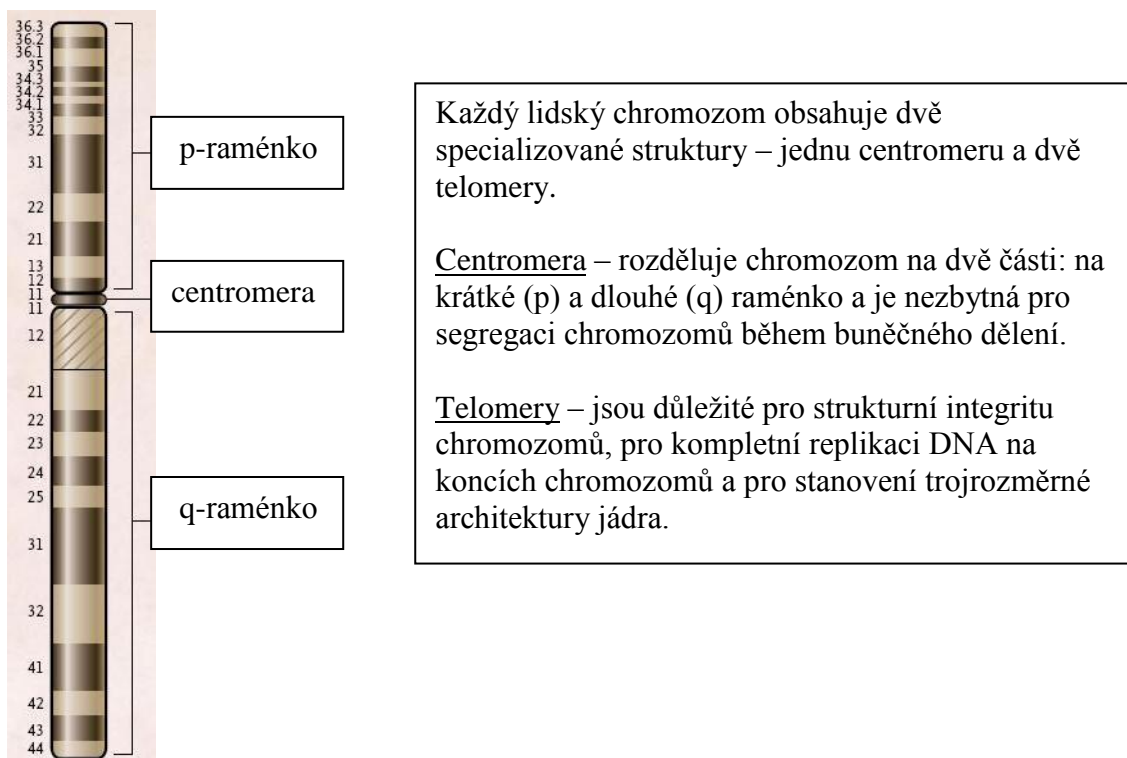
3.2. Mechanismus vzniku chromozomálních aberací

Mechanismus vzniku strukturních chromozomálních aberací se skládá z několika kroků. Prvním a nejkritičtější krokem je indukce DNA dvouvláknových zlomů. Ve všech případech je minimálně jeden ze dvou dvouvláknových zlomů generován patologickými

procesy, jako jsou: 1) náhodné zlomy v důsledku působení ionizujícího záření, oxidativního poškození volnými radikály nebo spontánní hydrolyzou, 2) zlomy asociované s účinkem inhibitoru topoizomerázy, 3) zlomy přímých nebo invertovaných repetitivních sekvencí způsobené nedefinovaným mechanismem zlomu. Jeden ze dvou zlomů je často fyziologický, tj. je výsledkem např. VDJ rekombinace nebo switch class rekombinace výhradně lymfoidních buněk (Tsai, A. G.; Liber, M. R., 2010).

Obrázek 5: Struktura lidského chromozomu 1

(upraveno podle Fröhling, S.; Döhner, H., 2008)



Chromozomální změny nádorových buněk rozdělujeme do dvou základních skupin:

- 1) **primární** – vedou přímo ke vzniku nádoru - to znamená, že jde o aberace, jimiž jsou ovlivněny geny, jejichž změna (např. amplifikace, delece nebo translokace vedoucí k vzniku fúzaného genu nebo ke změněné regulaci genu v nové pozici) může vést k transformaci buňky v buňku nádorovou
 - primární změny dále dělíme na:
 - a) získané – dochází k nim pouze v jedné buňce organismu a dále se klonálně množí

- b) konstituční – jsou zděděné po germinální linii od rodičů a tedy přítomné ve všech buňkách jedince, který má pak zvýšené riziko vzniku nádoru;
- 2) **sekundární** – provázejí samotný nádorový proces, popř. další vývoj nádorové buňky. Souvisejí s metylací DNA, především s hypometylací genomu nádorové buňky, která vede ke genomové nestabilitě.

3.3. Typy chromozomálních aberací v lidských nádorových buňkách

V aberantní tkáni solidních nádorů se setkáváme s různými chromozomálními abnormalitami – se změnou ploidie, se zisky nebo ztrátami jednotlivých chromozomů nebo jejich částí a se strukturními přestavbami.

Normální somatické buňky mají diploidní počet chromozomů. U maligních buněk bývá heteroploidní chromosomová výbava (aneuploidie, polyploidie). Chromosomy transformovaných buněk vykazují často náhodné, ne vždy jednoznačně definované strukturní aberace. U některých nádorových onemocnění se vyskytují pro ně typické nenáhodné (systematicky se opakující) strukturní aberace, například translokace.

Stanovení chromosomálních odchylek v nádorové tkáni je v některých případech diagnostickým a též prognostickým markerem nádorového onemocnění. Chromozomální výbava, tzn. počty chromozomů a přestavby, mohou vypovídat o progresi onemocnění. Charakteristické chromozomální změny jsou vodítkem pro volbu terapie.

Tabulka 3: Chromozomální změny u solidních nádorů

(upraveno podle <http://www.slh.wisc.edu/cytogenetics/cancer/solid-tumor.dot>)

Typ nádoru	Chromozomální aberace
Adenolymfom slinných žlaz	t(11;19)(q21;p11)
Alveolární rhabdomyosarkom	t(2;13)(q35;q14)
Askinsův tumor	t(11;22)(q24;q12)
Děložní leiomyomy	t(12;14)(q14-15;q23-24)
	del(7)(q21q31)
Esthesioneuroblastom	t(11;22)(q24;q12)
Ewingsův sarkom	t(11;22)(q24;q12)
Extraskelální myxoidchondrosarkom	t(9;22)(q22;q11-12)
Karcinom malých buněk plic	del(3)(p14p23)
Karcinom nemalých buněk plic	del(3p)
Karcinom prsu	del(3)(p12p14)
	změny v uspořádání chromozomu 1
Karcinom renálních buněk	del(3p)
Kolorektální adenom	del(1p)
Maligní karcinom papilárních renálních buněk	t(X;1)(p11;q21)
Maligní melanom	del(9)(p13)
Meningiom	del(22q) nebo -22
Mukoepidermoidní karcinom	t(11;19)(q21;p11)
Myxoidní liposarkom	t(12;16)(q13;p11.2)
Nádory testikulárních germinálních buněk	i(12)(p10)
Neuroblastom	t(1;17)(p36;q12)
Nitrobřišní desmoplastický nádor malých kulatých buněk	t(11;22)(p13;q12)
Papilární karcinom štítné žlázy	inv(10)(q11q21)
Pleomorfní adenom slinných žlaz	t(3;8)(p21;q12)
Sporadické typické lipomy	t(3;12)(q27-28;q13-15)
Primitivní neuroektodermální tumor	i(17)(q10)
Retinoblastom	i(6)(p10)
Synoviální sarkom	t(X;18)(p11.2;q11.2)
Uveální melanom	i(8)(q10)
Wilmsův tumor	del(11)(p13)

4. Mutace a chromozomální aberace při vzniku kolorektálního karcinomu (CRC)

Kolorektální karcinom je onemocnění vzniklé v důsledku nahromadění mutací v tumor-supresorových genech a onkogenech. Další vlastností je ztráta genomové stability. Byly zjištěny dva hlavní typy genomové nestability v buňkách kolorektálního karcinomu (CRC) - chromozomální a mikrosatelitní nestabilita. Chromozomální nestabilita odkazuje na zvýšený stupeň hromadění chromozomálních abnormalit, mikrosatelitní nestabilita vede ke zvýšenému množství bodových mutací. Všechny nádorové buněčné linie CRC jsou tedy nestabilní (Nowak, M. A., 2005).

4.1. Struktura sliznice tlustého střeva

Základem mikroskopické struktury sliznice tlustého střeva jsou krypty, v jejichž dolní třetině probíhá dělení a diferenciací kmenových buněk. Lokalizace na dně krypt a ochranná hlenová vrstva chrání dělicí se buňky před působením agresivních a mutageně působících vlivů ze střevního lumen. Na povrchu krypt jsou již buňky diferencované, nedělí se a postupně podléhají apoptóze. Uplatnění intraluminálních kancerogenů na normální proliferující kolonocyty je tak prakticky znemožněno (Bortík, M. *et al.*, 2003).

4.2. Mutace a chromozomální aberace v karcinogenezi CRC

Z mechanismu postupné diferenciací a posunu epiteliálních buněk na povrch krypt vychází představa, že „první zásah“ v procesu karcinogeneze, který postihuje dosud zdravé, dělicí se buňky, je iniciován z krevního oběhu. Tímto zásahem je nejčastěji mutace APC genu a důsledkem je vznik benigní léze - adenomového polypu. Populace proliferujících buněk se růstem adenomu dostává do bezprostředního kontaktu se střevním obsahem a vznikají tak podmínky pro „druhý zásah“, přicházející nejspíše ze střevního lumen. Pokračující genetické poruchy prohlubují dysplastické změny v nádoru a vedou nakonec ke vzniku invazivního karcinomu.

Kolorektální karcinom je ideálním modelem vícestupňových změn v procesu karcinogeneze. Postupné hromadění genetických poruch na různé úrovni vede v konečné fázi ke vzniku invazivního karcinomu. Tyto genetické změny mohou být vrozené nebo získané a zahrnují tři typy poruch: inaktivace tumor supresorových genů (APC, DCC, p53), aktivace

protoonkogenů na funkční onkogeny (K-ras) a mutace genů tzv. MMR (mismatch repair) systému. K vyřazení funkce genu nebo jeho přeměně na onkogen je nezbytná inaktivace obou alel tohoto genu (tzv. Knudsenova teorie dvojího zásahu). Může k ní dojít postnatálně - somatická mutace, nebo si nemocný přináší mutovanou alelu od jednoho z rodičů - zárodečná mutace. V prvním případě hovoříme o sporadickém karcinomu, ve druhém jde o hereditární formu CRC (Markowitz, S. D.; Bertagnolli, M. M., 2009).

Z genetického hlediska jsou v současné době známy čtyři odlišné cesty vedoucí ke vzniku CRC (Bortík, M. *et al.*, 2003):

1. „Klasická“ cesta sekvence adenom-karcinom popsána Morsonem v první polovině 70. let. Klíčovým bodem je zde mutace APC genu s následným nadbytkem beta-kateninu, vystupňováním proliferační aktivity a ztrátou přiměřené adhezivity buněk. Ve vzniklém adenomu se pak hromadí další genetické poruchy (mutace K-ras, p53, DCC, DPC4/Smad4 atd.) a vzniká invazivní karcinom. Vrozená mutace APC je příčinou familiární adenomatózní polypózy tlustého střeva. U sporadických nádorů je sice mutace APC genu považována za velmi časnou událost v procesu karcinogeneze, avšak některé práce z poslední doby tuto představu zpochybňují tím, že nacházejí ztrátu APC jen ve 30 % střevních adenomů.

2. Cesta tzv. mikrosatelitní nestability (MSI), na jejímž počátku je mutace nebo ztráta funkce některého z genů mismatch repair systému (MMR systém). Tento enzymatický systém udržuje homeostázu tím, že vyhledává a opravuje replikační chyby v tzv. repetitivních sekvencích genů. Ztráta funkce MMR systému může postihnout geny významné pro buněčné dělení či apoptózu a vést tak ke vzniku nádoru. Zárodečná mutace genů MMR systému je základem syndromu hereditární nepolypózní rakoviny tlustého střeva (HNPCC - Lynchův syndrom). Adenomové polypy nejsou v přítomnosti MSI častější než v ostatní populaci, nicméně již vzniklý adenom rychleji progreduje a malignizuje. U sporadických karcinomů je defekt MMR systému přítomen v 10-15 % a nejčastějším mechanismem vyřazení genu je hypermetylace hMLH1. U nemocných do 50 let se MSI vyskytuje častěji a zdá se, že je u těchto nemocných příznivým prognostickým faktorem (nižší výskyt metastáz do lymfatických uzlin a do vzdálených orgánů).

3. Ulcerózní kolitida (UC) sice přispívá k celkovému počtu střevních karcinomů jen málo, mechanismus karcinogeneze se však liší od ostatních forem KRC. Namísto sekvence adenom-karcinom se v terénu UC setkáváme s posloupností dysplazie-karcinom bez mezistupně

v podobě adenomu (částečná podobnost s karcinomem v Barrettově jícnu a karcinomem žaludku). Mutace APC genu jsou méně časté a jsou událostí spíše pozdní ve srovnání s běžným karcinomem. Častější a časnější je defekt dalšího z tumor supresorových genů - p53. V poslední době bylo zjištěno, že genetické změny - tzv. chromozomová nestabilita - postihují u nemocných s UC a ložiskovým nálezem dysplazie sliznici celého tlustého střeva, včetně úseků bez histologicky prokazatelné dysplazie. Detekce chromozomové nestability by tak mohla vést k identifikaci nemocných s nejvyšším rizikem vzniku KRK v terénu UC.

4. Konečně je třeba zmínit skutečnost, že v buňkách většiny střevních karcinomů je prostřednictvím hypermetylace blokována funkce estrogenového receptoru a tento jev pravděpodobně narůstá s věkem. Není jasné, zda právě tento mechanismus může vysvětlit vyšší výskyt KRK u bezdětných žen. Rovněž chybí v současné době podrobnější informace o dalších mechanismech navazujících na tento proces v buňkách střevní sliznice .

Tabulka 4: Onkogeny a tumor-supresorové geny často spojené s kolorektálním karcinomem (převzato z Markowitz, S. D.; Bertagnolli, M. M., 2009)

Zúčastněný gen	Frekvence (%)	Podstata defektu	Poznámky
APC	85	Aktivace Wnt signalizace z důvodu nemožnosti degradovat β -catenin onkoproteinu	Zárodečná mutace u familiárních adenomatózních polypóz; somatická inaktivace se nachází u 85% sporadických kolorektálních karcinomů
MLH1, MSH2, MSH6	15 - 25	DNA jednonukleotidový mismatch-repair defekt způsobující akumulaci onkogeních mutací a tumor-supresorových ztrát	Zárodečná mutace u hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu; epigenetické umlčení způsobené ztrátou exprese nádorového proteinu MLH1
TP53	35 - 55	Kódování proteinu zodpovědného za regulaci buněčného cyklu; inaktivace missense mutací spojených se ztrátou heterozygosity	Zárodečná mutace u Li-Fraumenova syndromu

TGFBR2	20 - 30	Receptor zodpovědný za signální dráhy zprostředkující zastavení růstu a apoptózu; inaktivován pomocí frameshift mutace v poly A repetici v TGFBR2 kódující sekvenci u pacientů a mismatch-repair defekty nebo pomocí inaktivační mutace kinázové domény	Mutace představuje ve více než 90% nádorů mikrosatelitní nestabilitu a 15% mikrosatelitněstabilní rakovinu tlustého střeva
SMAD4	10 - 35	Kritické součásti signální dráhy transformujícího růstového faktoru β spolu se souvisejícími proteiny SMAD2 a SMAD3; SMAD4 a SMAD2 jsou lokalizovány na 18q, častém místě pro ztrátu heterozygoty u kolorektálního karcinomu; inaktivace pomocí homozygotních delecí nebo mutací	Zárodečná mutace u familiální juvenilní polypózy s rizikem kolorektálního karcinomu vyšším než 60% přes tři až čtyři desítky let
KRAS	35 - 45	Kódování KRAS G-proteinu s konstitutivní aktivací má za následek aktivaci obou PI3K-PDK1-PKB a RAF-MEK-ERK1/2 signalizačních drah, a tím podporu buněčného přežívání a suprese apoptózy	Zárodečná mutace u kardiofaciokutáního syndromu
BRAF V600E	8 - 12	Aktivační mutace v BRAF serinthreoninové kináze, následná mediátorem zprostředkovaná signalizace přes RAF-MEK-ERK1/2 dráhu, která napodobuje následky KRAS mutace	Spojení s hyperplastickou polypózou se zvýšeným výskytem pilovitého adenomu; podobně jako u KRAS, zárodečná mutace u kardiofaciokutáního syndromu
PTEN	10 - 15	Podpora aktivace PI3K signalizační dráhy kvůli ztrátě funkce inaktivační mutací, výsledkem je signalizace buněčného přežití a suprese apoptózy	Zárodečná mutace u Crowdenova syndromu, který představuje vysoké riziko rakoviny prsu, s 10% zvýšením rizika kolorektálního karcinomu; možná role v udržování chromozomální stability

Existují dva typy kolorektálního karcinomu, a to podle ploidie (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology <http://atlasgeneticsoncology.org/>):

1) aneuploidní nádory vykazující řadu alelických ztrát

- aneuploidie, ztráta nebo přestavba p-raménka chromozomu 1 (okolo 70%), q-raménka chr. 5 (55%, ztráta APC), q-raménka chr. 15, q-raménka chr. 18 (65%, ztráta DCC), p-raménka chr. 17 (80%, TP53), a q-raménka chr. 17 (30%)
- abnormality q-raménka chr. 7 (25%) a p-raménka chr. 8 (55%)
- reciproké translokace: t(5;10)(q22;q25), inv(5)(q22-q31.3);

2) diploidní nádory – bez četných alelických ztrát.

Na kolorektálním karcinomu s předcházející polypózou střevní sliznice lze dobře demonstrovat již dříve zmiňovaný mnohastupňový proces maligní transformace. Genetické změny, které postupně vedou ke vzniku kolorektálního karcinomu je možné zjednodušeně popsat následovně:

1. stupeň: normální epitel se mění na hyperplastický po delecii obou alel tumor-supresorového genu APC (adenomatous poliposis coli) na chromozomu 5;
2. stupeň: následuje vznik časných adenomů (menších než 1 cm) vlivem hypometylace DNA;
3. stupeň: mutace protoonkogenu (onkogen K-ras) vede ke střednímu adenomatóznímu stádiu (adenomy nad 1 cm);
4. stupeň: delece tumor-supresorového genu (DCC) na chromozomu 18 zhoršuje stav střevní sliznice do pozdního stádia polypů.

Do této fáze je stav hodnocen jako benigní. Zvrat ze stádia benigního do maligního a pozdější vznik metastáz je provázen akumulací dalších genetických mutací. U 75% kolorektálních karcinomů je to ztráta funkce tumor-suprasorového genu TP53 na chromozomu 17. Tento gen má význam pro kontrolu buněčného cyklu a reaguje na poškození DNA dočasným zastavením buněčného cyklu v prvním kontrolním bodě mezi G1 a S fází a umožní tak reparaci DNA (Michor, F. *et al.*, 2005).

Vznik kolorektálního karcinomu je sled mutací, který je dáván do souvislosti s působením mutagenních látek obsažených v potravě.

5. Metody detekce chromozomálních změn v nádorové tkáni

Chromozomální změny jsou charakteristickým znakem všech nádorových buněk. Opakující se konzistentní strukturní a numerické aberace byly ve velkém počtu zjištěny u leukémií, lymfomů a solidních nádorů (Popescu, N. C.; Zimonjic, D. B., 1997). Jak tyto změny nejlépe detekovat? Vyšetřování solidních nádorů ukázalo, že specifické charakteristiky aberantních tkání lze nejlépe charakterizovat kombinací cytologických, cytogenetických a molekulárně-cytogenetických metod (Schwanitz, G.; Raff, R., 2005). Tyto analýzy jsou nezbytné pro poskytování diagnostických nebo prognostických informací u řady solidních nádorů. Solidní nádory jsou obvykle karyotypovány použitím vzorků získaných otevřenou biopsií. Proto jsou analýzy solidních nádorů obvykle prováděny v době počáteční diagnózy, nebo když je provedena opětovná biopsie v době klinické progresy nádoru (Fletcher, J. A., 2005).

Cytologické analýzy mohou sloužit k posouzení různých vlastností nádorových buněk kultivovaných *in vitro*. Sledovány jsou zvláštnosti růstu buněk a koordinace procesů proliferace pomocí kontrolních mechanismů, dále pak morfologie buněk - variabilní tvar, nukleoplasmatické poměry, rozložení cytoplasmy a struktura jádra, popř. přítomnost tzv. mikrojadra, která může být způsobena abnormalitami v buněčném dělení. Odlišnosti v buněčném dělení u nádorových buněk se projevují také v mitotickém indexu, stupni ploidie a anomáliích dělicího vřeténka (Schwanitz, G. ; Raff, R., 2005).

Chromozomová diagnostika charakterizující nescifické aberace se zaměřuje na patologický karyotyp, jeho vývoj a různorodost. Cytogenetické analýzy nádorových buněk poskytují vstupní body pro molekulární studie, které následně identifikují geny zapojené do patogeneze rakoviny (Heim, S.; Mitelman, F., 1995). Obecně platí, že chromozomy v nádorových preparátech vykazují tendenci ke snížené kondenzaci a aberantní spiralizaci. Analýza poskytuje podrobné informace o počtu chromozomů, odhalí nápadné marker chromozomy, přestavby a amplifikace. Solidní nádory také často vykazují výrazně zvýšenou nestabilitu v karyotypu. Analýza velkého počtu metafází je proto velice podstatná pro posouzení heterogenity buněčné populace. Pro nádorové karyotypování je také nutné zaznamenávat souhrn různých charakteristických aberací, stejně jako informace o vývoji nádoru. Cytogenetické analýzy jsou rovněž nezbytné pro odhalení a studium vývoje sekundárních chromozomálních aberací, jejichž přítomnost zpravidla zhoršuje prognózu nádorového onemocnění (Schwanitz, G.; Raff, R., 2005).

V oblasti molekulárně-cytogenetické diagnostiky je kladen důraz především na kombinaci interfázních a metafázních analýz a na vyšetřování konkrétních strukturních aberací. Techniky založené na metodě in situ hybridizace jsou nezbytné pro analýzu solidních nádorů a překlenuly propast mezi molekulární biologii a konvenční cytogenetikou (Patel, A. S.; Hawkins, A. L.; Griffin, C. A., 2000). Řadou FISH metod v kombinaci s vhodnou sondou lze vyřešit prakticky jakoukoliv chromozomální změnu bez ohledu na její složitost (Popescu, N. C.; Zimonjic, D. B., 1997). Techniky FISH jsou velmi užitečné v každodenní praxi vzhledem k jejich citlivosti, rychlosti a také proto, že analýzy mohou být prováděny na stejném vzorku, který byl již použit pro karyotypování, bez nutnosti nové biopsie tkáně nebo aspirace kostní dřeně. Poměrně vysoké náklady na sondy jsou ale stále nevýhodou těchto technik (Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille, *et al.*, 2001). Tzv. „klasická“ FISH má ale poněkud úzké zaměření, neboť pracuje se sondami, které hybridizují s určitým chromozomem nebo jeho částí, popř. jen jediným genem. Proto lze touto metodou identifikovat nebo vyloučit pouze konkrétní chromozomové aberace, na jejichž výskyt máme podezření. Z tohoto důvodu je nutné využívat i další molekulárně-cytogenetické metody na bázi in situ hybridizace, jež umožňují současnou identifikaci a lokalizaci chromozomálních aberací, aniž bychom předem museli vyšetření zacílit na konkrétní lokus, chromozom nebo omezenou skupinu 2-3 chromozomů. Nejvýznamnější z těchto metod jsou: multicolour nebo multiplex FISH (M-FISH), spektrální karyotypování (SKY), multicolour banding (M-BAND), primed in situ labelling (PRINS), komparativní genomová hybridizace (CGH) a array CGH (genové čipy, microarray).

Tabulka 5: Využití a rozlišení cytogenetických a molekulárně-cytogenetických metod
(upraveno podle Kočárek, E.; Pánek, M.; Novotná D., 2006 a De Witte, A. *et al.*, 2006)

Vysvětlivky k tabulce:

- ...nevhodné

+ ...provádí se jen ve zvláštních případech

++ ...vyšetření se provádí, avšak není vždy spolehlivé

+++ ...velmi vhodná metoda poskytující u správně indikovaných případů spolehlivé výsledky

Metoda	Numerické aberace	Kryptické aberace	Větší strukturální aberace	Možnost analýzy interfázních jader	Rozlišení	Konkrétní využití
Pruhování chromozomů	+++	-	+++	NE	10Mb	Základní cytogenetické vyšetření
FISH Centromerické sondy	+++	-	+ nelze samostatně	ANO	20kb	Prenatální a preimplantační vyšetření, analýza marker chromozomů
FISH Lokus specifické sondy	+	+++	++	ANO	20kb	Mikrodelece, subtelomerické přestavby, onkocytogenetika
FISH Malovací sondy	+	-	+++	NE	100kb	Analýza strukturálních přestaveb (translokací), onkocytogenetika
M-FISH, SKY	+	-	+++	NE	2Mb	Analýza složitých strukturálních přestaveb (translokací), onkocytogenetika
M-BAND	-	-	+++	NE	10Mb	Analýza strukturálních přestaveb (translokací) a delecí, onkocytogenetika
CGH	+	+++	+++ jen nebalancované	ANO	2Mb	Nebalancované aberace, onkocytogenetika
DNA microarray	+	+++	+++ jen nebalancované	ANO	0,06 – -100kb	Mikrodelece, screening submikroskop. aberací, onkocytogenetika

5.1. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Fluorescenční *in situ* hybridizace je výborným nástrojem k detekci specifických DNA nebo RNA sekvencí a k přímé vizualizaci kvantitativních změn přímo v buňce, tkáni nebo nádoru. V molekulární hybridizaci jsou značené DNA nebo RNA sekvence použity jako sondy pro identifikaci nebo kvantifikaci přirozeně se vyskytujících homologních sekvencí v biologickém vzorku. Úspěch FISH a všech ostatních metod hybridizace *in situ* závisí na

pozoruhodné stabilitě dvojité šroubovice DNA, kde síť vodíkových vazeb mezi komplementárními dusíkatými bázemi drží pohromadě dvě antiparalelní vlákna DNA. Navíc, pokud vodíkové vazby, které drží helix pohromadě, jsou štěpeny teplem, chemickými látkami nebo specifickými enzymy, helix denaturuje a po navození příznivějších podmínek je schopen následné renaturace. Tato schopnost zpětné reasociace u šroubovice DNA poskytuje základ pro molekulární hybridizaci (O'Connor, C., 2008).

FISH poskytuje jedinečné propojení mezi studii buněčné biologie, cytogenetiky a molekulární biologie. Tato technika byla adaptována na širokou oblast aplikací v medicínské diagnostice. FISH techniky jsou nejen velmi užitečné pro kauzální analýzu vývoje a šíření některých nádorů, jsou ale také účinné pro včasnou diagnostiku a pro navrhování nejúčinnějšího terapeutického přístupu .

Na rozdíl od klasických cytogenetických metod k identifikaci lidských chromozomů, které využívají různé techniky barvení chromozomů, dokáže FISH odhalit i derivované (marker) chromozomy, malé translokace, inzerce či delece. Ještě podstatnější je, že klasické metody jsou použitelné jen na chromozomy v metafázi a jsou silně závislé na kvalitě vzorku. Metafázní rozprostření chromozomů lze získat pouze z vysoce mitoticky aktivní tkáně nebo po několikadenní *in vitro* kultivaci příslušné tkáně, kdy dosáhneme vhodné metafáze buněčného dělení. FISH umožňuje cytogenetikům tyto kroky obejít a vyšetřovat buňky i v interfázi, tedy v nedělící se buňce. Další výhodou je, že lze vyšetřit relativně rychle velké množství materiálu. Při běžných cytogenetických analýzách se hodnotí zpravidla 20, výjimečně 50 – 100 buněk, naproti tomu FISH hodnotí stovky nebo tisíce buněk, což poskytuje přesnější informace.

5.1.1. Historie technik in situ hybridizace

Historie ISH sahá do 60. let 20. století, když si Joseph G. Gall a Mary Lou Pardue uvědomili, že by mohli použít molekulární hybridizaci k identifikaci pozice DNA sekvencí in situ, tj. v jejich přirozené pozici v chromozomu (Gall, J. G; Pardue, M. L., 1969) . V roce 1970 pak publikovali práci, v níž využili metodu in situ hybridizace k lokalizaci satelitních DNA sekvencí v centromerických heterochromatinových oblastech na myších chromozomech (Gall, J. G; Pardue, M. L., 1970). Ke studiu využili radioaktivně značené sondy, jejichž výhodou je obecně vysoká citlivost detekce, nevýhodami však nepřesně lokalizovaný signál na chromozomech, nestabilita sondy, požadavek dlouhých expozičních časů k produkci měřitelných signálů na radiografickém filmu a v neposlední řadě nákladnost a nebezpečnost

radioaktivního materiálu, s nímž musí být zacházeno v souladu s předpisy (Levsky, J. M.; Singer, R. H., 2003) . O více než deset let později byly *in situ* hybridizací prvně lokalizovány unikátní sekvence genů pomocí DNA klonů. V roce 1981 byl lokalizován lidský inzulinový gen (Harper, M. E.; Saunders, G. F.; Ullrich, A., 1981), gen lidského α -globinu (Gerhard, D. S. *et al.*, 1981) a také sekvence β -globinového genu (Malcolm, S. *et al.*, 1981) . Tyto objevy iniciovaly rozvoj dalších studií zabývajících se mapováním genů. Téhož roku byl popsán nový postup značení 3' konce molekuly RNA pomocí molekuly fluorochromu (Bauman *et al.*, 1981). Nejdůležitějším krokem pro rozvoj neizotopových technik byl vývoj biotinem značených nukleotidů, jakožto analogů dUTP a UTP s kovalentně navázaným biotinem (Langer *et al.*, 1981). O dva roky později bylo značení nukleotidů biotinem provedeno enzymatickou syntézou (Leary, J. J. *et al.*, 1983). Dnešní FISH technologie se naplno rozvinula rok na to, kdy byly biotinem značené molekuly detekovány pomocí imunofluorescence (Albertson, D. G., 1984), a dva roky poté s využitím fluorescein thioisokyanátu (FITC) konjugovaného avidinem (Pinkel, D. *et al.*, 1986). Od té doby mohla být hybridizace zviditelňována pomocí fluorescenčního mikroskopu. Téhož roku byla objevena PCR technologie jakožto specifická enzymatická amplifikace DNA (Saiki, R. *et al.*, 1986). V polovině 80. let vznikla Mezinárodní cytogenetická nomenklatura (1985, ISCN – International System for Human Cytogenetic Nomenclature), která zavádí mezinárodně závazný popis výsledků molekulárně cytogenetického vyšetření. V roce 1986 Daeven, L. L. a kolektiv zkonstruovali lidské chromozom-specifické DNA knihovny na základě průtokem tříděných chromozomů. Roku 1988 byly prováděny fluorescenční *in situ* hybridizace s využitím těchto DNA knihoven k detekci specifických aberací (Pinkel, D. *et al.*, 1988; Cremer, T. *et al.*, 1988). V témže roce Lichter, P. a kolektiv vymezili jednotlivé lidské chromozomy v metafázích a interfázních buňkách pomocí *in situ* supresní hybridizace s využitím rekombinantních DNA knihoven. V roce 1990 byla vyvinuta multiple-FISH, která umožnila současnou detekci více než tří cílových sekvencí (Nederlof, P. M. *et al.*, 1990). V roce 1991 vznikl dodatek k ISCN zahrnující onkocytogenetiku. Roku 1992 zavádí Kallioniemi, A. a kolektiv novou metodu určenou k molekulárně-cytogenetické anlyze nádorů, a to komparativní genomovou hybridizací (CGH). Tímto objevem byly odstraněny nedostatky klasické FISH, která umožňuje vyšetření změn pouze té části, ke které je zvolená sonda komplementární. Od roku 1995 je součástí ISCN i dodatek obsahující FISH nomenklaturu (Mitelman, F., 1995). Dalšími kroky bylo vyvinutí multicolour FISH (M-FISH) (Speicher, M. R. *et al.*, 1996) a vícebarevné spektrální karyotypizace (SKY) (Schröck, E. *et al.*, 1996), jež umožnily barevné rozlišení všech 24 lidských chromozomů. Nicméně i přes

zdokonalování FISH technik nebylo stále možné detekovat pericentrické a paracentrické inverze a přesně určit lokalizaci bodu zlomů. K překonání tohoto omezení posloužil objev nové techniky high resolution multicolour banding (M-BAND) (Chudoba, I. *et al.*, 1999), která byla testována na chromozomu 5. Od přelomu 20. a 21. století se v molekulární cytogenetice také stále častěji uplatňují genové čipy (DNA-microarray). Solinas-Toldo, S. a kol., 1997 a Pinkel, D. a kol., 1998 jako první nahradili metafázi chromozomy na sklíčku malými úseky DNA (klony) a poprvé byla tato metoda použita k diagnostice karcinomu prsu (Pollack, J. R. *et al.*, 1999).

5.1.2. Principy ISH

Hybridizací máme na mysli komplementární spojení dvou jednořetězcových molekul nukleových kyselin různého původu podle zákona párování dusíkatých bází (Nussbaum, R. L. *et al.*, 2004). Jednou nukleovou kyselinou je vyšetřovaná (cílová) molekula DNA („target DNA“) a druhou je sonda („probe“). *In situ* detekce sekvencí nukleových kyselin poskytuje přímou vizualizaci prostorového umístění specifických sekvencí, které mají zásadní význam pro organizaci a funkci genů. *In situ* hybridizace využívá specifické hybridizace komplementárních molekul nukleových kyselin pomocí vodíkových vazeb vytvořených mezi bázemi, které jsou připojeny k cukr-fosfátové kostře. Toto párování bází je základem pro vytvoření dvouvláknové šroubovice, v níž má jedno vlákno opačnou orientaci k druhému s ohledem na cukr-fosfátovou kostru. Sekvence jsou čteny od 5' konce k 3' konci. Každou nukleovou kyselinu lze tedy specificky detekovat použitím sondy, kterou je antisense reverzní komplementární sekvence. Praktickým přínosem je dosažení co nejvyšší rychlosti vytváření sond, ať už klonováním DNA sekvencí, amplifikací pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo syntézou oligonukleotidů (Wilkinson, D. G., 1992). Při hybridizaci *in situ* je cílová molekula nukleové kyseliny stále přítomna v biologickém materiálu, kterým jsou zpravidla chromozomy, interfázni jádra nebo i celé buňky, např. z histologických řezů. Pokud je cílová sekvence přítomna, místo vazby sondy se nám jeví jako hybridizační signál, jehož podoba závisí na způsobu značení sondy.

Existuje standardní FISH protokol pro provádění analýz. Každý typ sondy vyžaduje mírné specifické úpravy základního protokolu. Komerčně vyráběné próby jsou dodávány s doporučeným pracovním návodem.

Standardní protokol FISH můžeme popsat v šesti hlavních krocích (Kjeldsen, E.; Kølvrå, S., 2002):

1) Příprava vzorku

(zpracování, fixace, kapání na podložní sklo)

2) Aplikace značené sondy

(přímo na dehydratované podložní sklo se vzorkem)

3) Denaturace sondy a cílové DNA

(při 75-80°C, max. 5 minut, za účasti formamidu – ten destabilizuje DNA a tím snižuje teplotu nezbytnou k její denaturaci)

4) Hybridizace sondy a cílové DNA

(v termostatu při 37°C, 30 minut až 24 hodin podle typu sondy)

5) Post-hybridizační odmyváání nespecifických signálů

(používáme horký pufovaný solný roztok nebo 50% roztok formamidu o t=45-50°C)

6) Detekce a amplifikace signálů - pouze u nepřímo značených sond

(u sond značených biotinem se zpravidla aplikuje avidin konjugovaný s FITC a k amplifikaci signálu přidáme protilátku proti avidinu)

5.1.3. Sondy pro FISH, metody jejich značení a vizualizace signálů

Existuje mnoho možností pro typy sond, metod jejich značení a vizualizace. Hlavní body v rozhodování jsou zda za: a) zvolit RNA sondu, dlouhou DNA sondu (jedno- nebo dvouvláknovou) nebo oligonukleotidy, b) vybrat radioaktivní (v dnešní době již nepoužívané) či neradioaktivní značení, c) detekovat přímo nebo nepřímo (Wilkinson, D. G., 1992).

Kritickým bodem v rozhodování o tom, jaký typ sondy a jejího značení zvolit, je senzitivita. Je třeba zvážit, jaký typ cílové sekvence chceme detekovat. Při výběru záleží na mnoha faktorech: 1) na velikosti cílové sekvence (na dlouhé sekvence genů nebo nukleových kyselin se může vázat více sond a tím více značek), 2) jestli je cílová sekvence unikátní, nebo jestli se vyskytuje ve více kopiích v místě lokalizace (čím více kopií, tím více značek se váže), 3) na velikosti sekvence sondy (teoreticky, velké sondy mohou nést více značek, ale maximální velikost sondy pro hybridizační směs je 300 až 500 párů bazí, velké fragmenty sondy mají buď potíže s pronikáním do cílové sekvence nebo vytvářejí velké agregáty, jež

snižují množství dostupné sondy a zvyšují pozadí), 4) nepřímé techniky značení nabízejí možnost amplifikace signálu (Kjeldsen, E.; Kølvrå, S., 2002).

Sondy nejčastěji rozdělujeme podle charakteru cílového úseku DNA. Mezi nejběžnější typy sond pro hybridizaci patří lokus-specifické, satelitní (centromerické, telomerické) a celochromozomové (malovací) sondy.

- Lokus-specifické sondy jsou sondy pro jedinečné sekvence DNA (jednotlivé geny, popř. skupiny genů). V závislosti na klonovacím vektoru jsou velké od 500pb do 1000kb.
- Satelitní sondy jsou sondy specifické pro určitý chromozom.
- Celochromozomové sondy jsou vlastně soubory sond, které hybridizují s mnoha jedinečnými sekvencemi podél celého chromozomu.

Sondou může být značený úsek DNA nebo RNA umožňující lokalizaci příslušné komplementární sekvence. Aby se sonda na komplementární cílovou sekvenci vážala přednostně, musí být obsažena ve směsi ve vyšší koncentraci než vyšetřovaná DNA. Sonda je značena buď přímo fluorescenčním barvivem, nebo nepřímo např. přes systém antigen – protilátka. Druhá metoda je náročnější, ale umožňuje opakování procesu značení, a tím i zesílení fluorescenčního signálu (LeBeau, M. M., 1993).

K vizualizaci signálů, a tedy hodnocení výsledků, se používá epifluorescenční mikroskop. V praxi je třeba vždy kombinovat konkrétní typy filtrů s použitými fluorochromy. Nejvíce používanými fluorescenčními barvivy jsou DAPI (diaminophenyl-indol), který slouží k podbarvení vyšetřovaného materiálu, tj. chromozomů a jader. K detekci specifických lokusů jsou nejčastěji používány FITC (fluorescein-isothiokyanát), který pozorujeme jako zelený signál, a TRITC (tetramethylrhodamin), pozorovaný jako červený signál. Následkem excitačního záření i vlastní fluorescence proteinů se na preparátu objevují i další, rušivé signály, které je třeba co nejlépe eliminovat.

5.2 Multicolour FISH (M-FISH) a spektrální karyotypování (SKY)

Multicolour neboli mnohobarevná fluorescenční *in situ* hybridizace je molekulárně-cytogenetická metoda vyvinutá pro diagnostiku a výzkum nádorových onemocnění. M-FISH je založena na kombinatorním značení, které poskytuje nejjednodušší způsob mnohonásobného označení sondy. Sondy jsou značené buď jediným fluorochromem nebo

kombinací fluorochromů, což zvyšuje počet rozpoznatelných DNA sekvencí (Nederlof, P. M. *et al.*, 1990). Počet možných identifikovatelných cílových sekvencí pro n počet fluorochromů je roven $2n-1$. Nejméně 5 rozlišitelných fluorochromů je zapotřebí pro kombinatorní označení jedinečné identifikace všech 24 chromozomových typů lidského genomu (Speicher, M. R. *et al.*, 1996). Technologie mFISH nevyžaduje žádné speciální vybavení, může být prováděna s jakýmkoliv fluorescenčním mikroskopem, je však zapotřebí sada šesti různých optických filtrů (pro 5 fluorochromů a DAPI) zahrnujících úzký spektrální interval 350-770 nm, což umožňuje vysoký stupeň rozlišení všech možných fluorochromových párů a vyšší citlivost obrazu, který je snímán CCD kamerou. Metoda mFISH je vhodná především při určování původu malých nadpočetných marker chromozomů, bývá úspěšně využívána při studiu komplexních změn karyotypu a lze díky ní přesně lokalizovat rozsah delecí a duplikací. Umožňuje odhalit nejrůznější kryptické translokace a inserce.

SKY je dalším významným zdokonalením techniky mnohobarevného karyotypování, od mnohobarevné FISH se liší především v závěrečném získávání obrazu. Metoda je založena na hybridizaci fluorescenčně značené sondy, která je tvořena komplexem skládajícím se zpravidla z 55 jednotlivě vytvořených chromozomově specifických sond. Na rozdíl od M-FISH, která využívá sadu fluorochromově specifických filtrů (pět nebo sedm odlišných filtrů), pro SKY je postačující mikroskop vybavený dvěma fluorescenčními filtry. (Padilla-Nash, H. M. *et al.*, 2006). SKY je osvědčenou technologií pro studium konstitučních chromozomových abnormalit, které vyplývají z *de novo* vytvořených balancovaných a nebalancovaných translokací, jenž zahrnují náhodné chromozomové výměny mezi velmi malými oblastmi DNA, speciálně v telomerách (Schröck, E. *et al.*, 1997). Významně napomáhá v identifikaci double minutes chromozomů, bez ohledu na jejich velikost a počet napomáhá určit původ nadbytečných marker chromozomů.

5.3 Multicolour banding (M-BAND)

M-BAND je molekulárně cytogenetická metoda mnohobarevného pruhování chromozomů s vysokou rozlišovací schopností, která je založena na podobném principu jako mFISH s tím rozdílem, že vychází z použití tzv. parciálních malovacích sond, které hybridizují se specifickými oblastmi jednotlivých chromozomů. Tyto částečné sondy jsou označeny stejně jako při mFISH kombinatorním smícháním 5 fluorochromů pomocí PCR. Po hybridizaci se fluorescenční signály jednotlivých parciálních sond částečně překrývají a podél sledovaného chromozomu dochází ke kontinuálním změnám v intenzitě jednotlivých

fluorochromů a jejich kombinací. Vyhodnocení chromozomů je opět prováděno ve fluorescenčním mikroskopu, který je vybaven kamerou a počítačovým zpracováním obrazu. Na základě analýzy intenzity fluorescenčních signálů program přiřadí k jednotlivým částem chromozomu pseudobarvy a vznikne tak charakteristický obraz sledovaného chromozomu s m-pruhy. Díky mBAND získáme mnohobarevné pruhy vydělující jednotlivé oblasti dlouhých i krátkých ramen a můžeme přesně lokalizovat zlomová místa na chromozomech. Na rozdíl od metod mFISH a SKY jsme schopni detekovat i pericentrické a paracentrické inverze (Chudoba, I. *et al.*, 1999).

5.4 Komparativní genomová hybridizace (CGH)

Metoda zvaná komparativní genomová hybridizace je modifikací *in situ* hybridizační techniky, která umožňuje detekci a mapování DNA sekvenčních rozdílů v počtu kopií mezi dvěma genomy v rámci jednoho experimentu. V CGH analýze jsou dvě různě značené genomové DNA (studovaná a referenční) ko-hybridizovány na normální metafázní chromozomy (Kallioniemi, A. *et al.*, 1992). Studovaná i referenční DNA je rozštěpena na malé fragmenty a označena. Tyto označené fragmenty jsou přibližně ve stejném poměru smíchány a přidány do roztoku s cílovou DNA. Následuje denaturace studované, referenční a cílové DNA. Hybridizace mezi různými typy DNA probíhá náhodně podle standardu molekulární kinetiky. Zejména hybridizace mezi studovanou a cílovou DNA na jedné straně a mezi referenční a cílovou DNA na druhé straně probíhá v poměru k množství studovaný a referenční DNA (Tachdjian, G. *et al.*, 2000). Pomocí kvalitní kamery jsou metafáze nasnímány, zkaryotypovány a pak hodnoceny. Software kvantifikuje změny v genomu pacienta na základě porovnání fluorescenčních intenzit. CGH nemůže detekovat balancované translokace, reciproké translokace, Robertsonovské translokace a inverze, protože u nich nedochází k větším ztrátám genetického materiálu a případné menší ztráty není tato metoda schopna postihnout. Výhodou je, že CGH využívá izolovanou DNA, což je důležité pro onkogenetiku, protože odpadá nutnost získávat kvalitní metafáze z mitoticky inaktivních vzorků. Studium archivního materiálu umožňuje analýzu DNA, při které můžeme zpětně zjistit souvislost mezi změnami v genomu (ve smyslu zisků a ztrát DNA) a klinickým nálezem.

6. Závěr

Proces maligní transformace je genetickým a epigenetickým onemocněním, při němž je ztracena kontrola nad buněčnou proliferací. Hlavní příčinou vzniku všech zhoubných nádorů je mutace, buď v zárodečné linii, nebo častěji v somatických buňkách. Ačkoliv jsou základní mechanismy vzniku nádorových onemocnění známy a rychle se vyvíjející technologie umožňující čím dál více citlivější metody detekce využitelné v onkocytogenetice, tak nemocných s nádory stále přibývá. V ČR 23% mortality spadá na nádorová onemocnění. Ještě se musíme hodně dozvědět o genetických a epigenetických procesech karcinogeneze a o faktorech zevního prostředí, které různými způsoby poškozují DNA a mohou tak vést k malignitě. Je pravděpodobné, že nové pohledy na základní roli změn DNA v karcinogenezi povedou v blízké budoucnosti k účinnější detekci, prevenci a léčbě maligních chorob.

7. Seznam použitých zdrojů informací

- Albertson, D. G. (1984)** Localization of the ribosomal genes in *Caenorhabditis elegans* chromosomes by in situ hybridization usány biotin-labeled probes. *EMBO J.*; 3(6):1227-1234.
- Albertson, D. G.; Collins, C.; McCormick, F.; Gray, J. W. (2003)** Chromosome aberrations in solid tumors. *Nature Genetics*; 34(4):369-376.
- Artandi, S. E.; DePinho, R. A. (2010)** Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*; 31(1):9-18.
- Bauman, J. G.; Wiegant, J.; van Duijn, P. (1981)** Cytochemical hybridization with fluorochrome-labeled RNA. I. Development of a method using nucleic acids bound to agarose beads as a model. *J Histochem Cytochem*; 29(2):227-37.
- Bernstein, B. E.; Meissner, A.; Lander, E. S. (2007)** The mammalian epigenome. *Cell*; 128:669–681.
- Bird, A. (2002)** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*; 16:6-21.
- Blasco, M. A.; Hahn, W. C. (2003)** Evolving views of telomerase and cancer. *Trends in Cell Biology*; 13(6):289-294.
- Bortík, M.; Novotný, A.; Adamec, S. (2003)** Patogeneze adenomů a karcinomů tlustého střeva. *Zdravotnické noviny*.
- Bryan, T. M. et al. (1997)** Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med*; 3:1271-1274.
- Cesare, A. J.; Reddel, R. R. (2010)** Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature Reviews Genetics*; 11:319-330.
- Chudoba, I.; Plesch, A.; Lörch, T.; Lemke, J.; Claussen, U.; Senger, G. (1999)** High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.*; 84(3-4):156-60.
- Clark, W. H. (1991)** Tumor progression and the nature of cancer. *Br J Cancer*; 64:631–644.
- Connolly, J. L.; Schnitt, S. J.; Wang, H. H.; Dvorak, A. M.; Dvorak, H. F. (2000)** Holland-Frei Cancer Medicine: Part III Cancer Diagnosis, Section 6: Cancer Pathology: Principles of Cancer Pathology; 1-55009-113-12000.
- Coppola, D. (2010)** Mechanism of oncogenesis. New York, Springer; ISBN: 978-90-481-3724-4.
- Cremer, T.; Lichter, P.; Borden, J.; Ward, D. C.; Manuelidis, L. (1988)** Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome specific library probes. *Hum Genet*; 80:235-246.
- Croce, C. M. (2008)** Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*; 358:502-11.

- Deaven, L. L.; Van Dilla, M. A.; Bartholdi, M. F.; Carrano, A. V.; Cram, L. S.; Fuscoe, J. C.; Gray, J. W.; Hildebrand, C. E.; Moyzis, R. K.; Perlman, J. (1986)** Construction of human chromosome-specific DNA libraries from flow-sorted chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 51:159-167.
- De Witte, A.; Nair, M.; Mehta, K.; Ghosh, J.; Scheffer, A.; Cifuentes, F.; Suela, J.; Garcia, M. (2006)** 60-mer oligo-based comparative genomic hybridization. Agilent Technologies.
- Dunham, M. A. et al. (2000)** Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet*; 26:447-450.
- Dušek, L.; Mužík, J.; Kubásek, M.; Kostíková, J.; Žaloudík, J.; Vyzula, R. (2005)** Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. Masarykova univerzita, ISSN 1802 – 8861.
- Dušek, L.; Abrahámová, J.; Mužík, J.; Májek, O.; Pavlík, T.; Koptíková, J.; Vyzula, R.; Fínek, J. (2009)** Populační odhady počtu nemocných s kolorektálním karcinomem v ČR – jeden z nástrojů hodnocení včasné diagnostiky časných stádií a rekurence onemocnění. *Farmakoterapie*; 5:11-20.
- Ehrlich, M. (2002)** DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*; 21:5400–5413.
- Esteller, M. (2008)** Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*; 358(11):1148-59.
- Esteller, M.; Herman, J. G. (2001)** Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *The Journal of Pathology*; 196(1):1-7.
- Ferlay, J.; Autier, P.; Boniol, M.; Heanue, M.; Colombet, M.; Boyle, P. (2007)**. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals Oncology*; 18:581-92.
- Fishel, R.; Lescoe, M. K.; Rao, M. R. S.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Gerber, J.; Kane, M.; Kolodner, R. (1993)** *Cell*; 75:1027-1038.
- Fletcher, J. A. (2005)** The principles of clinical cytogenetics: Cytogenetics of solid tumors. 2nd ed. Edited by: Gersen, S. L. and Keagle, M. B. New Jersey, Humana Press; ISBN 1-58829-300-9.
- Fröhling, S.; Döhner, H. (2008)** Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med*; 359:722-734.
- Futreal, P. A.; Coin, L.; Marshall, M.; Down, T.; Timothy, H.; Wooster, R.; Rahman, N.; Stratton, M. R. (2004)** A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*; 4(3):177-183.
- Gall, J. G.; Pardue, M. L. (1969)** Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Science*; 63:378–383.
- Gall, J. G.; Pardue, M. L. (1970)** Chromosomal Localization of Mouse Satellite DNA. *Science*; 168(3937):1356-1358.
- Gerhard, D. S.; Kawasaki, E. S.; Bancroft, F. C.; Szabo, P. (1981)** Localization of unique gene by direct hybridization in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 78(6):3755-3759.
- Gregory, P. D.; Wagner, K.; Horz, W. (2001)** Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp Cell Res*; 265:195–202.

- Hagmar, L.; Strömberg, U.; Bonassi, S.; Hansteen, I.-L.; Knudsen, L. E.; Lindholm, C.; Norppa, H. (2004)** Impact of Types of Lymphocyte Chromosomal Aberrations on Human Cancer Risk: Results from Nordic and Italian Cohorts. *Cancer Research*; 64:2258-2263.
- Hahn, W. C.; Weinberg, R. A. (2002)** Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*; 347(20).
- Harper, M. E.; Saunders, G. F.; Ullrich, A. (1981)** Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 78(7):4458-4460.
- Heim, S.; Mitelman, F. (1995)** *Cancer cytogenetics*. 2nd Ed. New York, Wiley-Liss.
- Cheung, H.-H.; Lee, T.-L.; Rennert, O. M.; Chan, W.-Y. (2009)** DNA methylation of cancer genome. *Birth Defects Research (Part C)*; 87:335-350.
- Kallioniemi, A.; Kallioniemi, O.-P.; Sudar, D.; Rutovitz, D.; Gray, J. W.; Waldman, F.; Pinkel, D. (1992)** Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*; 258:818-821.
- Kjeldsen, E.; Kjøtvraa, S. (2002)** FISH technology: FISH techniques, FISH probes and their applications in medicine and biology – an overview. Edited by: Rautenstraub, B. W. and Liehr, T. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; ISBN 3-540-67276-1.
- Kočárek, E.; Pánek, M.; Novotná, D. (2006)** *Klinická cytogenetika I.: Úvod do klinické cytogenetiky: Vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. Praha, Karolinum; ISBN 80-246-1069-8.
- Kondo, Y.; Shen, L.; Cheng, A. S.; Ahmed, S.; Bumber, Y.; Charo, C.; Yamochi, T.; Urano, T.; Furukawa, K.; Kwabi-Addo, B.; Gold, D. L.; Sekido, Y.; Huang, T. H.; Issa, J. P. (2008)** Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet*; 40:741–750.
- Kristensen, L. S.; Nielsen, H. M.; Hansen, L. L. (2009)** Epigenetics and cancer treatment. *European Journal of Pharmacology*; 625:131-142.
- Laird, P. W. (2005)** Cancer epigenetics. *Human Molecular Genetics*; 2005; Vol 14. Review Issue 1.
- Langer, P. R.; Waldrop, A. A.; Ward, D. C. (1981)** Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 75:6633-6637.
- Leary, J. J.; Brigati, D. J.; Ward, D. C. (1983)** Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*; 80(13):4045-4049.
- LeBeau, M. M. (1993)** Fluorescence in situ hybridization in cancer diagnosis. Important advances in oncology. J.B.Lippincott, Philadelphia; 29-45.
- Levsky, J. M.; Winter, R. H. (2003)** Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*; 116:2833-2838.
- Lichter, P.; Cremer, T.; Borden, J.; Manuelidis, L.; Ward, D. C. (1988)** Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using chromosome specific library probes. *Hum Genet*; 80:224-234.
- Liu, J. P.; Chen, W.; Schwager, A. P.; Li, H. (2010)** Telomerase in cancer immunotherapy. *Biochim Biophys Acta*; 1805(1):35-42.

- Lobo, I. (2008)** Chromosome abnormalities and cancer cytogenetics. *Nature Education*; 1(1).
- Luger, K.; Mader, A. W.; Richmond, R. K.; Sargent, D. F.; Richmond, T. J. (1997)** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*; 389:251–260.
- Lundblad, V.; Blackburn, E. H. (1993)** An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell*; 73:347-360.
- Malcolm, S.; Barton, P.; Murphy, C.; Ferguson-Smith, M. A. (1981)** Chromosomal localization of a single copy gene by in situ hybridization--human beta globin genes on the short arm of chromosome 11. *Ann Hum Genet*; 45(Pt 2):135-141.
- Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille; José Salvador Rodrigues Oliveira; Maura Romeo; José Kerbauy. (2001)** Fluorescent in-situ hybridization (FISH) for BCR/ABL in chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation. *Sao Paulo Med J*; 119(1).
- Markowitz, S. D.; Bertagnoli, M. M. (2009)** Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.*; 361(25):2449-60.
- Mateuca, R.; Lombaert, N.; Aka, P. V.; Decordier, I.; Kirsch-Volders, M. (2006)** Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*; 88(11):1515-1531.
- Michor, F.; Iwasa, Y.; Lengauer, Ch.; Nowak, M. A. (2005)** Dynamics of colorectal cancer. *Seminars in Cancer Biology* 15; 484–493.
- Miller, D. G. (1980)** On the nature of susceptibility to cancer. The presidential address. *Cancer*; 46(6):1307-1318.
- Mittelman, F. (Ed.) (1995)** ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel Karger.
- Murnane, J. P. (2010)** Telomere loss as a mechanism for chromosome instability in human cancer. *Cancer Res.*; 70(11):4255-9.
- Nederlof, P. M.; van de Flier, S.; Wiegant, J.; Raap, A. K.; Tanke, H. J.; Ploem, J. S.; van der Ploeg, M. (1990)** Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*; 11:126-131.
- Michor, F.; Iwasa, Y.; Lengauer, C.; Nowak, M. A. (2005)** Dynamics of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol*; 15(6):484-493.
- Nussbaum, R. L.; McInnes, R. R.; Willard, H. F. (2004)** Thompson&Thompson: Klinická genetika. 6. vyd. Praha, Triton; ISBN 80-7254-475-6.
- O'Connor, C. (2008)** Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Nature Education*; 1(1).
- Oster, S.; Penn, L.; Stambolic, V. (2005)** Oncogenes and tumor suppressor genes. In: Tannock IF, Hill RP, Bristow RG, Harrington L, eds. *The Basic Science of Oncology*. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 123–141.
- Padilla-Nash, H. M.; Barenboim-Stapleton, L.; Difilippantonio, M. J.; Ried, T. (2006)** Spectral karyotyping analysis of human and mouse chromosomes. *Nat Protoc*; 1(6):3129-3142.

- Parodi, S.; Malacarne, D.; Romano, P.; Taningher, M. (1991)** Are Genotoxic Carcinogens More Potent Than Nongenotoxic Carcinogens?. *Environmental Health Perspectives*; 95:199-204.
- Patel, A. S.; Hawkins, A. L.; Griffin, C. A. (2000)** Cytogenetics and cancer. *Current Opinion in Oncology*; 12:62–67.
- Pelengaris, S.; Khan, M. (2006)** The molecular biology of cancer. Malden (USA), Blackwell Publishing; ISBN-13:978-1-4051-1814-9.
- Pinkel, D.; Landegent, J.; Collins, C.; Fuscoe, J.; Seagraves, R.; Lucas, J.; Gray, J. W. (1988)** Fluorescence in situ hybridization with human chromosome specific libraries: detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85:9138-9142.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J. W. (1986)** Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization, *Proc Natl Acad Sci USA*; 83:2934-2938.
- Pinkel, D. et al. (1998)** High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat. Genet*; 20:207–211.
- Polinsky, K. R. (2007)** Tumor suppressor genes. New York, Nova Science Publishers; ISBN-13:978-1-60021-693-0.
- Pollack, J. R.; Perou, C. M.; Alizadeh, A. A.; Eisen, M. B.; Pergamenschikov, A., Williams, C. F.; Jeffrey, S. S.; Botstein, D., Brown, P. O. (1999)** Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet*; 23(1):41-6.
- Popescu, N. C.; Zimonjic, D. B. (1997)** Molecular cytogenetic characterization of cancer cell alterations. *Cancer Genet Cytogenet*; 93:19-21.
- Rössner, P. (2006)** Je spojená vyšší frekvence chromozomových aberací v lidských periferních lymfocytech s vyšším rizikem vzniku nádorových onemocnění?. *České pracovní lékařství*; 2:82-83.
- Saiki, R. K.; Bugawan, T. L.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. (1986)** Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*; 324(6093):163-166.
- Schröck, E.; Manoir, S.; Veldman, T.; Schoell, B.; Wienberg, J.; Ferguson-Smith, M. A.; Ning, Y.; Ledbetter, D.; Bar-Am, I.; Soenksen, D.; Garini, Y.; Ried, T. (1996)** Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*; 273:494-497.
- Schröck, E.; Veldman, T.; Padilla-Nash, H.; Ning, Y.; Spurbeck, J.; Jalal, S.; Shaffer, L.G.; Papenhausen, P.; Kozma, C.; Phelan, M. C.; Kjeldsen, E.; Schönberg, S.A.; ÓBrien, P., Biasecker, L.; du Manoir, S.; Ried, T. (1997)** Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet*; 101(3): 255-262.
- Schwanitz, R.; Raff, R. (2005)** Application of specific cytologic, cytogenetic and molecular-cytogenetic techniques for the characterization of solid tumors. *Annales Academiae Medicae Bialostocensis*; 50:91-96.
- Sharma, S.; Kelly, T. K.; Jones, P. A. (2010)** Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*; 31(1):27-36.
- Solinas-Toldo, S.; Lampel, S.; Stilgenbauer, S.; Nickolenko, J.; Benner, A.; Dohner, H.; Cremer, T.; Lichter, P. (1997)** Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*; 20:399-407.

- Speicher, M. R.; Ballard, S. G.; Ward, D. C. (1996)** Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet*; 12:368-375.
- Stimson, L.; Rowlands, M. G.; Newbatt, Y. M.; Smith, N. F.; Raynaud, F. I.; Rogers, P.; Bavetsias, V.; Gorsuch, S.; Jarman, M.; Bannister, A.; Kouzarides, T.; McDonald, E.; Workman, P.; Aherne, G. W. (2005)** Isothiazolones as inhibitors of PCAF and p300 histone acetyltransferase activity. *Mol Cancer Ther*; 4(10):1521-1532.
- Tachdjian, G.; Aboura, A.; Lapierre, J. M.; Viguie, F. (2000)** Cytogenetic analysis from DNA by comparative genomic hybridization. *Annales de Génétique*; 43(2000):147–154.
- Tsai, A. G.; Liber, M. R. (2010)** Mechanisms of chromosomal rearrangement in the human genome. *BMC Genomics*; 11(suppl 1):S1.
- Vachtenheim, J. (2000)** Chromatin, transkripce a nádorové transformace. *Zdravotnické noviny*.
- van Delft, J. H. M.; van Agen, E.; van Breda, S. G. J.; Herwijnen, M. H.; Staal, Y. C. M.; Kleinjans, J. C. S. (2004)** Discrimination of genotoxic from non-genotoxic carcinogens by gene expression profilig. *Carcinogenesis*; 25(7):1265-1276.
- Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. (1993)** The multistep nature of cancer. *Reviews*; 9(4):138-141.
- Weinberg, R. A. (1994)** Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J Clin*; 44:160-170.
- Wilkinson, D. G. (1992)** In situ hybridization: A practical approach. 2nd ed. New York, Oxford University Press; ISBN 0-19-963659-1.

Internetové odkazy:

- <http://www.breastcancer.org/> – Dictionary
- <http://www.cancer.org/>
- <http://www.iarc.fr/>, 2010
- <http://www.slh.wisc.edu/cytogenetics/cancer/solid-tumor.dot>
- <http://www.svod.cz/> – Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice
- <http://www.who.int/>, 2009