

Molekulárna cytogenetika v problematike familiárnych malignít

Ing. Martin Čermák

Oddelenie lekárskej genetiky NOÚ, Bratislava

Vývoj nádorových ochorení je sprevádzaný množstvom genetických zmien na rôznych úrovniach genómu. Niektoré z týchto zmien sú stále predmetom skúmania, ale iné sú už známe do takej miery, že sa spájajú s konkrétnym typom malignity, jej vývojom alebo možnosťami liečby. Onkogenetika disponuje širokým spektrom vyšetrovacích metodík, ktorými je možné tieto zmeny spoľahlivo odhaliť. S nástupom molekulárnej cytogenetiky odštartovala nová éra v diagnostike genetických aberácií. Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) definitívne zmenila dovtedy čierno-biely svet cytogenetiky na farebný a položila základy moderných vyšetrovacích metód ako M-FISH, CGH, array CGH a mnohých iných. Postupne sa tieto metodiky stali súčasťou rutínnej nádorovej diagnostiky všade vo svete. Dnes, keď sa veľká pozornosť venuje hlavne submikroskopickým zmenám DNA nesúcim predispozíciu na rôzne typy malignít, sa molekulárna cytogenetika snaží obstáť v konkurencii moderných vysokosenzitívnych metód molekulárnej biológie.

Kľúčové slová: molekulárna cytogenetika, FISH, genetická diagnostika, familiárne hematomaliginity.

Molecular cythogenetic in the familial cancers

The development of cancer diseases is accompanied by number of genetic changes at different levels of the genome. Some of these changes are still subject of research but others are already known in such an extent that they are associated with a specific type of malignity, the development, or treatment possibilities. The cancer genetics dispose of wide range of techniques, with reliable detection of the causal changes. Starting the molecular cytogenetics has launched a new era in diagnostics of genetic aberrations. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) definitely changed cytogenetic world from black and white to color one and set the foundation of modern investigative methods such as M-FISH, CGH, array CGH and many others. Successively all these methodologies have become a part of routine cancer diagnostics thorough the world. Actually, when much attention is given mostly to submicroscopic changes in DNA supposed as predispositions to various malignancies, the molecular cytogenetics is trying to success in competition of modern highly sensitive molecular biology methods.

Key words: molecular cytogenetics, FISH, genetic diagnostics, familial hematologic malignancies.

Úvod

Tkanivá ľudského organizmu tvoria obrovské množstvá buniek vzájomne sa líšiacie tvarom, veľkosťou a funkciami. Bunkové delenie, rast a obnova tkanív sú pod prísnou kontrolou jadra. Ak v jadre bunky nastane trvalá porucha (deregulácia), bunka sa spod tejto prísnej kontroly vymkne a bunkové delenie (proliferácia) prestane správne fungovať. Nekontrolovaným autonómym množením postupne vznikne abnormálna masa tkaniva – nádor. Keďže gény sú základnými jednotkami genetickej výbavy organizmu, dlho sa uvažovalo o tom, že práve ich mutácie vedú k nádorovému bujneniu (1). Charakter genetických mutácií v transformovaných bunkách môže byť rozmanitý, no nie všetky musia automaticky zodpovedať za rozvoj nádoru (2, 3). Autoreparačné mechanizmy buniek majú za úlohu opravovať bežne sa vyskytujúce poškodenia DNA v génoch, respektíve eliminovať bunky s príliš veľkým poškodením DNA. Niekedy však kombinovaným vplyvom pôsobenia rôznych vnútorných a vonkajších stresových faktorov (chemické látky, žiarenia,

hormóny) dochádza k mohutným atakom na molekuly DNA, čo vedie ku genómovej nestabilitate, následnému hromadeniu mutácií ďalších génov a k rozvoju oveľa závažnejších zmien na rôznych úrovniach genetickej výbavy buniek. Tie môžu podporiť klonálny vývoj rakovinových buniek, ktoré dokážu získať oproti zdravým bunkám rastovú výhodu. Ak k tomu dôjde, začnú sa rakovinové bunky rozširovať do okolitých tkanív – metastázovať a nastáva rozvoj malígneho ochorenia (4).

Odhaľovaním genetického pozadia rakoviny sa zaoberá nádorová genetika – onkogenetika. Dá sa povedať, že metódy genetickej diagnostiky prešli rýchlym vývojom. Prvé významné objavy genetických zmien sa podarilo urobiť už pomocou cytogenetických prúžkovacích metód. No azda najväčší rozmach sa začal od 80. rokov minulého storočia s nástupom molekulárnej cytogenetiky a molekulárnej biológie. V súčasnosti existuje množstvo techník detekcie genetických zmien, a to buď na úrovni chromozómov – cytogenetika, alebo na úrovni génov a ich produktov – molekulárna cytogenetika, respektíve molekulárna biológia.

Onkológia (Bratisl.), 2015; roč. 10(2): 77–83

Drvivá väčšina mutácií sprevádzajúca nádorové ochorenia (90 %) vzniká sporadicky v somatických bunkách a len malá časť (5 – 10 %) zasahuje zárodočné bunky a je základom dedičných foriem rakoviny (5). Zárodočné mutácie spôsobujúce predispozíciu na nádorové ochorenie predstavujú spravidla bodové zmeny na úrovni exónovej štruktúry génov, preto ich odhaľovanie je záležitosťou techník molekulárnej biológie. Existujú však familiárne formy malignít, ktoré sprevádzajú aberácie detegovateľné aj na vyššej úrovni. V príspevku sa venujem práve metódam molekulárnej cytogenetiky a ich možnému prínosu v oblasti detekcie genetických zmien pri niektorých typoch onkologických ochorení.

Nádorová cytogenetika

Termín chromozóm má pôvod v dvoch gréckych slovách: *chroma* = farba a *soma* = telo. Vedci pôvodne použili toto označenie preto, lebo cytogenetické metódy využívajú na odhaľovanie zmien genetického materiálu rozličné druhy farbiacich metód (6). Techniky vytvárajúce charakteristický vzhľad horizontálnych pruhov na

chromozómoch sa nazývajú prúžkovacie metódy alebo *banding*. Molekulový základ prúžkovacích metód v sebe spája základné zloženie nukleotidov, súvisiacich proteínov a funkčnú organizáciu genómu. Prúžky = *bandy*, sú dlhé štruktúry DNA s veľkosťou od 5 do 10 megabáz (Mb), ktoré môžu obsahovať stovky génov. Podľa takto vzniknutých prúžkov je možné identifikovať a usporiadať všetky chromozómy v bunke do jednotlivých homologických párov a zostaviť karyotyp.

Prúžkovacie metódy možno rozdeliť do dvoch skupín:

1. tie, ktoré vizualizujú tmavé a svetlé prúžky pozdĺž celého chromozómu, a tým aj miesta potenciálnych zlomov (*G-band*, *Q-band*, *R-band*);
2. tie, ktoré zobrazujú špecifické chromozómové štruktúry ako heterochromatín (*C-band*), teloméry (*T-band*) alebo polohu jadierka (*NORs*) (7).

Najrozšírenejšou a najčastejšie používanou prúžkovacou technikou na zostavenie karyotypu je *G-band*. Vychádza zo vzoriek, ktoré prešli aspoň krátkodobou kultiváciou v príslušnom médiu (24 – 48 hodín) a výsledkom kultivácie sú mitózy s metafáznyimi chromozómami – tzv. metafázy. Výsledkom farbenia je vytvorenie svetlejších – euchromatínových prúžkov (bohatých na CG sekvencie) a tmavých – *heterochromatínových* (bohatých na AT sekvencie). Z takto zafarbených chromozómov dokáže skúsené oko cytogenetika identifikovať nielen konkrétne chromozómy a ich numerický stav, ale predovšetkým štruktúrne zmeny karyotypu, ktoré sú často sprievodným javom rozvoja malígnych chorôb.

Chromozómové aberácie nádorových buniek možno rozdeliť na: a) špecifické – charakterizujú určitý typ nádoru; b) nenáhodné – postihujú tie isté chromozómy pri rôznych diagnózach alebo c) náhodné – postihujú náhodne rôzne chromozómy (8).

Väčšina chromozómových zmien nádorových buniek je klonálna. Za klonálnu zmenu sa považuje nález dvoch metafáz s rovnakou numerickou odchýlkou, alebo štruktúrnou chromozómovou aberáciou, alebo tri metafázy s rovnakým chýbajúcim chromozómom. Pravidlá na definovanie cytogenetických nálezov upravuje medzinárodná cytogenetická nomenklatura – ISCN (International System for Human Cytogenetics Nomenclature).

Výhodou *G-bandu* je skutočnosť, že dáva pohľad na celý obraz genómu s možnosťou pozorovať „všetky“ aberácie (delécie, inzercie, inverzie, translokácie, alebo zisky) ak zodpove-

dajú jeho rozlišovacej schopnosti. Preto sa stal základnou vyšetrovacou metódou v nádorovej genetike, hlavne v hematológii. Prítomnosť chromozómov je nevyhnutná na zhodnotenie karyotypu a podanie výsledku z cytogenetického vyšetrenia, a tým pádom aj limitujúcim faktorom použitia *G-bandu* v diagnostike niektorých typov rakoviny. Zatiaľ čo pri malignitách s cirkulujúcimi bunkami, ako sú napríklad leukémie, sa dá pomocou krátkodobej kultivácie kostnej drene alebo krvi získať dostatočné množstvo metafáz na zostavenie karyotypu, pri solídnych tumoroch býva problémom nízka mitotická aktivita tumorového tkaniva a s ňou spojená potreba dlhodobej kultivácie, čo môže mať za následok tvorbu normálnych buniek, ktoré môžu prerásť na nádorové. Okrem toho, karyotypy nádorového tkaniva bývajú natoľko zložené, že aj pri dobrej kvalite metafáz nie je možné pomocou prúžkovacích metód spoľahlivo identifikovať všetky komplexné zmeny. Ďalším obmedzením *G-bandu* a konvenčnej cytogenetiky samej osebe je, že aberácie < 10 Mb sú pre metódu takmer neviditeľné (9). Preto bolo nevyhnutné nájsť nové prístupy, ktorými by bolo možné tieto genetické zmeny odhaliť.

Molekulárna cytogenetika

Zatiaľ čo cytogenetika študuje chromozómy, molekulárna cytogenetika je založená na *in situ* hybridizácii a dokáže detegovať aj zmeny na subchromozomálnej úrovni. Začiatkom 80. rokov minulého storočia bola z rádioaktívnych hybridizačných postupov využívaných pri mapovaní ľudského genómu vyvinutá fluorescenčná *in situ* hybridizácia – FISH, ktorá sa stala neskôr základom pre vývoj ďalších molekulárno-cytogenetických techník (6). Prehľad niektorých z nich uvádza tabuľka 1.

Ide o cytogenetický ekvivalent Southern blottingu, ktorý využíva schopnosť jednovláknovej DNA hybridizovať ku komplementárnemu úseku nukleovej kyseliny (10). Princíp spočíva v krátkych fluorescenčne značených DNA úsekoch – sondách, ktoré hybridizujú k cieľovým lokusom vyšetrovanej DNA/RNA s následnou analýzou pomocou fluorescenčného mikroskopu a príslušného softvéru. K fluorescencii dochádza, keď fluorescenčné chemické zlúčeniny (fluorochrómy) absorbujú svetlo určitej vlnovej dĺžky (excitácia) a časť tohto svetla opäť uvoľnia pod dlhšou vlnovou dĺžkou (emisia). Fluorescenčný mikroskop je schopný koncentrovať dostatočne veľké množstvo energie excitačného žiarenia na objekt, a zároveň efektívne pomocou príslušných filtrov oddeliť od seba excitačné a emisné

žiarenia. Fluorochrómy sú dnes už v prevažnej väčšine DNA sond chemicky naviazané priamo na molekulu DNA, pričom tento typ FISH sond sa nazýva ako priamo značené. V minulosti sa využíval systém nepriamo značených FISH sond, čo znamenalo, že fluorochrómy neboli priamo naviazané na sondu, ale sa na ňu viazali až po hybridizácii, a to za pomoci „záchytných“ molekúl (hapténov) prítomných na upravených nukleotidoch tvoriacich sondu. Na konečnú vizualizáciu takto konštruovaných sond bolo potrebné použiť imunologické alebo enzymatické detekčné látky. Metóda nepriameho značenia je však dodnes využívaná v imunohistochemii (IHC), kde je detekcia založená na naviazaní protilátky na príslušný antigén.

FISH sondy sú zostrojené z krátkych úsekov DNA alebo iných analógov nukleových kyselín. Základom pre väčšinu FISH sond sú fragmenty DNA klonované a uložené v umelých chromozómoch odvodených od DNA baktérií (hlavne *E. coli*) – BAC (bacterial artificial chromosomes), kvasiniek – YAC (yeast artificial chromosomes), bakteriofága P-1 (PAC), alebo iných vektorov. Tieto DNA klony boli vytvorené na potreby projektov mapovania ľudského genómu, ako je napríklad Human Genome Project (6).

Pre potreby rutínnej diagnostiky je na trhu veľké spektrum komerčne dostupných sond. Podľa miesta aplikácie možno FISH sondy rozdeliť do troch skupín:

Lokusovo-špecifické sa viažu ku konkrétnemu regiónu na chromozóme. Ich veľkosť sa môže pohybovať už od niekoľko desiatok kilobáz (kb), preto dokážu odhaľovať zmeny na úrovni génov. Konštrukčne sa od seba odlišujú podľa charakteru hľadanej aberácie. Používajú na detekciu mikrodélií, delécií, ziskov, prestavieb a tranlokácií.

Satelitové sondy tvoria tandemové a repetitívne sekvencie DNA viažuce sa k špecifickým α -satelitovým a β -satelitovým oblastiam, ako sú centroméry alebo subtelomerickým koncom chromozómov. Slúžia na rýchlu detekciu aneuploidii, analýzu telomér alebo plnia úlohu kontrolných sond pri lokusovo-špecifických sondách. Lokusovo-špecifické a satelitové sondy majú univerzálne využitie a sú základom interfáznej FISH (i-FISH).

Celochromozómové, respektíve *malovacie sondy* sú zostrojené z krátkych úsekov, ktoré sa viažu k rôznym miestam, buď pozdĺž celého chromozómu, alebo jeho segmentov. Ako už napovedá samotný názov, na ich zmysluplné použitie je potrebná prítomnosť metafáz. Používajú sa na špecifikáciu veľkých a komplexných chromozómových zmien v karyotype nájdených *G-bandom*.

Tabuľka 1. Prehľad a porovnanie detekčných vlastností niektorých metód molekulárnej cytogenetiky

Metodika	Aplikovateľnosť		Detekcia aberácií				
	Interfázy	Metafázy	Poly n	Aneuploidie	Vyvážené translokácie	Nevyvážené translokácie	Inverzie
Interfázna FISH (iFISH)	+	+	+	+	+	+	+
Chromozómové maľovacie sondy (Chromosome painting)	-	+	+	+	+-	+	+-
Spektrálne karyotypovanie (SKY)	-	+	+	+	+	+	-
Mnohofarebná FISH (M-FISH)	-	+	+	+	+	+	-
Farebné prúžkovacie metódy (RxFISH, M-BAND)	-	+	+	+	+	+	+
Komparatívna genómová hybridizácia (CGH)	-	+	-	+	-	+	-
Array CGH (aCGH)	0	0	-	+	-	+	-
Kombinácia imunofenotypu a FISH (FICTION)	+	-	+	+	+	+	+
Kombinácia <i>in situ</i> hybridizácie a PCR (PRINS, <i>in situ</i> PCR)	+	+	+	+	+	+	+
Experimentálne metódy a metódy s vysokou citlivosťou							
Fiber FISH	– FISH na rozpletených a napnutých vláknach DNA, – dokáže analyzovať fragmenty < 500 bp, – mapovanie pozícií zlomov pri deléciách, inzerciách, amplifikáciách, fúzyčných génoch						
MicroFISH	– kombinácia chromozómovej mikrodisekcie a FISH, – využíva sa pri získavaní unikátnych sekvencií použiteľných na výrobu sond,						
Flow-FISH, Q-FISH	– kombinácia FISH s prietokovou cytometriou – štúdium dĺžky telomér a repetitívnych sekvencií						
RNA FISH	– analýza cieľných mRNA – detekcie génovej expresie, vývojová biológia						
<p><i>Vysvetlivky a použité skratky: + detegovateľné, - nedetegovateľné, +- detekcia čiastočne obmedzená, 0 – nepodstatné pre danú metodiku, bp – bázové páry, RxFISH – cross-species FISH, M-BAND – Multicolor Banding, FICTION – Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation of Neoplasms, PCR – Polymerase Chain Reaction, PRINS – Primed In Situ Labeling, MicroFISH – microdissection FISH, Q-FISH – Quantitative FISH</i></p>							

Na podfarbenie chromozómov alebo jadier sa používa kontrastné farbivo známe pod skratkou DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Má silné fluorescenčné vlastnosti, dokáže prechádzať jadrovou membránou a silne sa viazať na DNA. Výsledkom je modré zafarbenie, ktoré výborne kontrastuje so signálmi jednotlivých sond.

Existujú stratégie na vylepšenie vlastností FISH sond využívajúce modifikované analógy nukleových kyselín. Sú to umelo syntetizované oligonukleotidové úseky označované ako PNA (protein nucleic acid) alebo LNA (locked nucleic acid). Takto upravené sondy získavajú napríklad lepšiu termostabilitu a afinitu k hybridizovanej DNA alebo RNA (11).

Vďaka týmto vlastnostiam a svojej veľkosti sa využívajú predovšetkým v RNA FISH diagnostike. Alternatívnou *in situ* technikou ku klasickej FISH využívajúcou oligonukleotidové sekvencie je napríklad metóda PRINS (Primed In Situ Labeling) (12, 13).

RNA FISH

RNA FISH je metóda vizualizácie RNA, ktorá umožňuje simultánne detekciu, lokalizáciu a kvantifikáciu jednotlivých molekúl RNA na subbunkovej úrovni. FISH sondy pre RNA detekciu tvorí množstvo krátkych DNA oligonukleotidov, pričom každý má fluorescenčnú značku, ktoré sa spoločne viažu do tej istej pozície cieľového transkriptu, čo vytvára bodkový signál.

Positívny signál je identifikovaný iba z kombinovanej lokalizovanej fluorescencie viacerých sond. Necieľové väzby sond vykazujú len slabé a difúzne signály, ktoré sú hlboko pod prahom pre špecificky cieľné detekcie mRNA. Tým sa znižuje možnosť falošnej pozitivity. Falošná negatívita je nepravdepodobná, pretože ak zlyhá jedna alebo viacero oligonukleotidových sond, nahradia ich iné. Je to kvantifikovateľná a pomerne citlivá metóda, ktorá môže určiť lokalizáciu jednotlivých molekúl mRNA v bunke, ich počet, transkripciu alebo mieru degradácie (14, 15).

RNA FISH diagnostika predstavuje veľký potenciál aplikácií, obzvlášť v prípadoch, keď bunková heterogenita bráni hromadnému využívaniu bežných biochemických testovacích metód ako Q-PCR alebo Northern Blotting (16).

Analýza vybraných sekvencií mRNA je dôležitým meradlom mnohých bunkových vlastností, napríklad identifikácie špecifických typov buniek alebo rôznych štádií diferenciácie buniek. Abnormálne hodnoty expresie mRNA často sprevádzajú rozvoj rakoviny. Overexpresia miR155 býva prítomná u pacientov s lymfómom, s karcinómom prsníka, pľúc, hrubého čreva, s agresívnou formou chronickej lymfocytovej leukémie (CLL). Pozornosť sa venuje aj miR21 pre jeho inhibičný účinok na tumor-supresorový *PTEN* gén, ktorý má úlohu v karcinogéze pľúc, prsníka, žalúdka a prostaty (3).

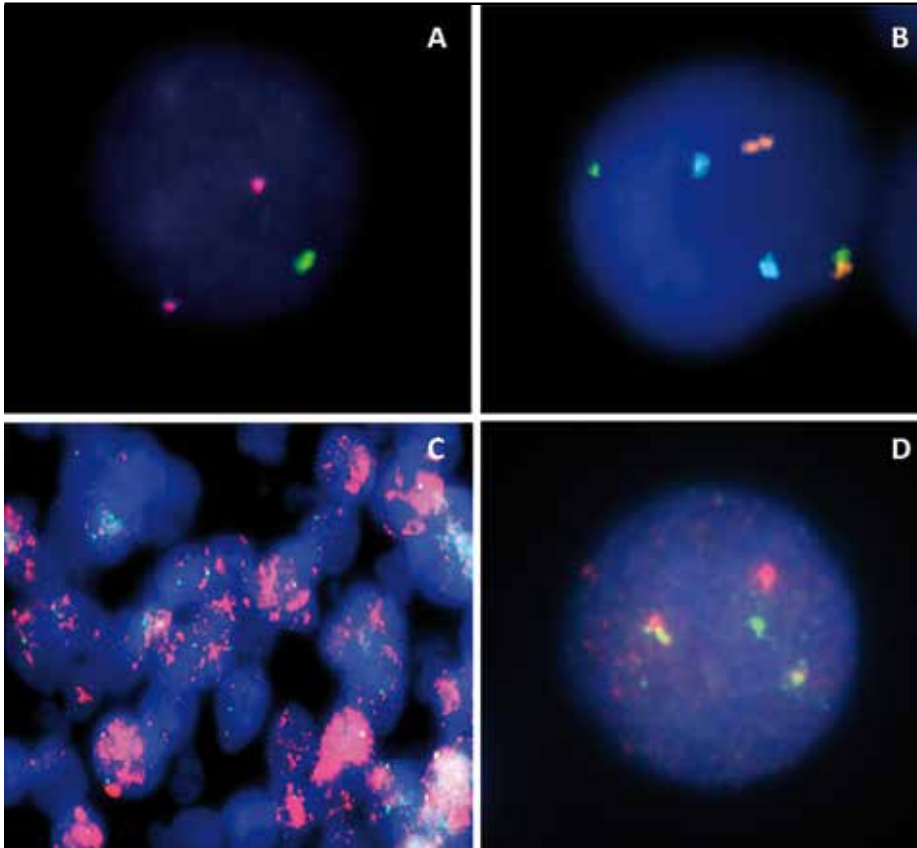
Oligonukleotidové sondy sa môžu viazať aj na čiastočne degradované cieľové mRNA, čo je oceneľné hlavne v prípade vzoriek fixovaných vo formalíne, respektíve paraafínových tkanivových vzorkách (FFPE). Napriek tomu, že je táto metodika využívaná na fixovaných materiáloch, posledné pokroky v technológii zdokonaľovania RNA FISH sond ukazujú aj na schopnosť detekcie jednotlivých molekúl mRNA v živých bunkách (15).

FISH v onkogenetike

FISH je metóda so širokým spektrom využitia. Dá sa povedať, že ju možno aplikovať na všetky druhy biologického materiálu, ktoré obsahujú nejaké formy nukleových kyselín. Na rozdiel od konvenčnej cytogenetiky nie je výlučne viazaná na prítomnosť chromozómov. Práve naopak, vo veľkom sa využíva predovšetkým na interfáznych jadrách buniek leukocytov aj solidných tumorov, či už v natívnej, alebo fixovanej forme. Spoľahlivo a rýchlo (za niekoľkých hodín) ňou možno nájsť numerické alebo štruktúrne zmeny, ktoré sú pomocou konvenčnej cytogenetiky neodhaliteľné a od prítomnosti ktorých sa často odvíja prognóza ochorenia, konečná diagnóza alebo možnosti liečby. Predovšetkým ide o he-

Obrázok 1. Interfázna FISH

- A.** Delécia *RUNX1*(21q22) pri FPD/MDS. Dva červené signály reprezentujú dve kópie génu *ETV6* (12p13) a jeden zelený signál označujúci len jednu kópiu génu *RUNX1*(21q22).
- B.** Prestavba *MYC* (8q24) pri Burkittovom lymfóme. Dvojfarebný červeno-zelený signál zobrazuje nepostihnutú kópiu génu *MYC*, samostatný červený a samostatný zelený signalizujú prestavbu druhej kópie. Dva modré signály označujú centroméry chromozómu 8.
- C.** Amplifikácia *MYCN* (2p24) pri neuroblastóme. Zmnožené červené signály sú kópie génu *MYCN*, zelené signály – kontrolný lokus na 2q11.2
- D.** Fúzia *BCR/ABL* – t(9;22) pri chronickej myeloidnej leukémii (CML). Dva fúzne červeno-zelené signály označujú fúzny gén *BCR/ABL* a jeho recipročný produkt. Jednofarebné signály označujú „zdravé“ kópie génov – červený *ABL* (9q34), zelený *BCR* (22q11.2) (Oddelenie lekárskej genetiky, NOÚ, Bratislava)



matoonkologické neoplázie, ako sú napríklad leukémie a lymfómy alebo solídne nádory. Na obrázku 1 vidieť príklady FISH nálezov aberácií sprevádzajúcich konkrétne malignity. Všetky tieto výhody ju predučili stať sa zlatým štandardom v rutínnej diagnostike leukémií, lymfómov, sarkómov a ďalších typov nádorových ochorení. Pevné miesto si drží nielen v genetických laboratóriách, ale čoraz častejšie sa stáva aj súčasťou patologických pracovísk. Samozrejme, ako v prípade cytogenetiky, aj interpretácie FISH nálezov podliehajú pravidlám ISCN, čím sa stávajú zrozumiteľnými pre širokú odbornú verejnosť všade vo svete.

Moderné metódy molekulárnej cytogenetiky

Cielenosť interfáznej FISH na konkrétne oblasti DNA je zároveň aj určitou nevýhodou, pretože nepodáva taký široký obraz genómu, ako je to v prípade karyotypovania. Práve snaha

sklíbiť výhodu *G-bandu* a senzitivity FISH bola dôvodom vzniku nových techník molekulárnej cytogenetiky ako spektrálne karyotypovanie (SKY), mnohofarebná FISH (M-FISH) a komparatívna genómová hybridizácia (CGH). SKY a M-FISH sú metafázne formy FISH diagnostiky, ktoré umožňujú simultánnu vizualizáciu všetkých ľudských chromozómov v rôznych farbách, čo do veľkej miery uľahčuje analýzu karyotypu, predovšetkým v prípadoch komplexných zmien a markeroch neznámeho pôvodu. Obe techniky vychádzajú z použitia celochromozómových sond značených kombináciou viacerých fluorochrómov, avšak rozdiel spočíva v technike získania konečného obrazu. Zatiaľ čo SKY je založená na spektrálnom zobrazovacom systéme pomocou interferometra a CCD kamery, M-FISH využíva snímanie jednotlivých farieb pod príslušnými filtermi a výsledná analýza sa získava zlúčením týchto obrazov pomocou príslušného softvéru (17, 18).

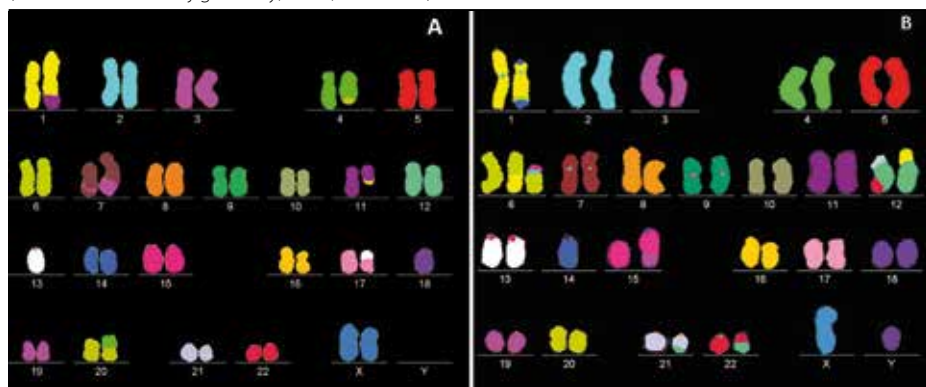
„Farebnou obdobou“ *G-bandu* je mnohofarebné prúžkovanie (M-BAND). Princíp je totožný s M-FISH, ale výsledkom sú farebné pruhované chromozómy, z ktorých sa dajú presnejšie identifikovať konkrétne miesta zlomov na postihnutých chromozómoch (obrázok 3).

CGH bola vyvinutá na celogenómový skrining nebalansovaných zmien nad 10 – 20 Mb. Jej princíp spočíva v porovnávaní testovanej a referenčnej DNA, pričom každá z nich je rozdielne fluorescenčne značená – testovaná zelenou, referenčná červenou. Zmes týchto dvoch DNA následne hybridizuje k normálnym metafáznym chromozómom pripravených kultiváciou krvi. Analýza je založená na meraní pomeru zeleného (zisky) a červeného (straty) signálu. Takto je možné odhaliť zmeny génovej dávky na všetkých chromozómoch súčasne alebo rovno numerické zmeny celých chromozómov (6). Nevýhoda CGH je hlavne fakt, že nedokáže odhaliť balansované translokácie, inverzie ani početnosť chromozómovej sady – ploidie. Okrem toho je táto metóda náročná na kvalitu mitóz a nevyhnutnosť viac ako 50 % zastúpenia patologického klonu vo vzorke.

Vyriešiť problém s mitózami a zvýšiť senzitivitu mala array CGH (aCGH), ktorej princíp je rovnaký, avšak namiesto k chromozómom sa využívajú unikátne sekvencie DNA (klony), ktoré sú fixované na sklíčku – tvorba DNA čipov. Pomocou týchto klonov je možné mapovať určité gény alebo celý genóm. Konečná analýza prebieha pomocou špeciálnych počítačových vyhodnocovacích programov.

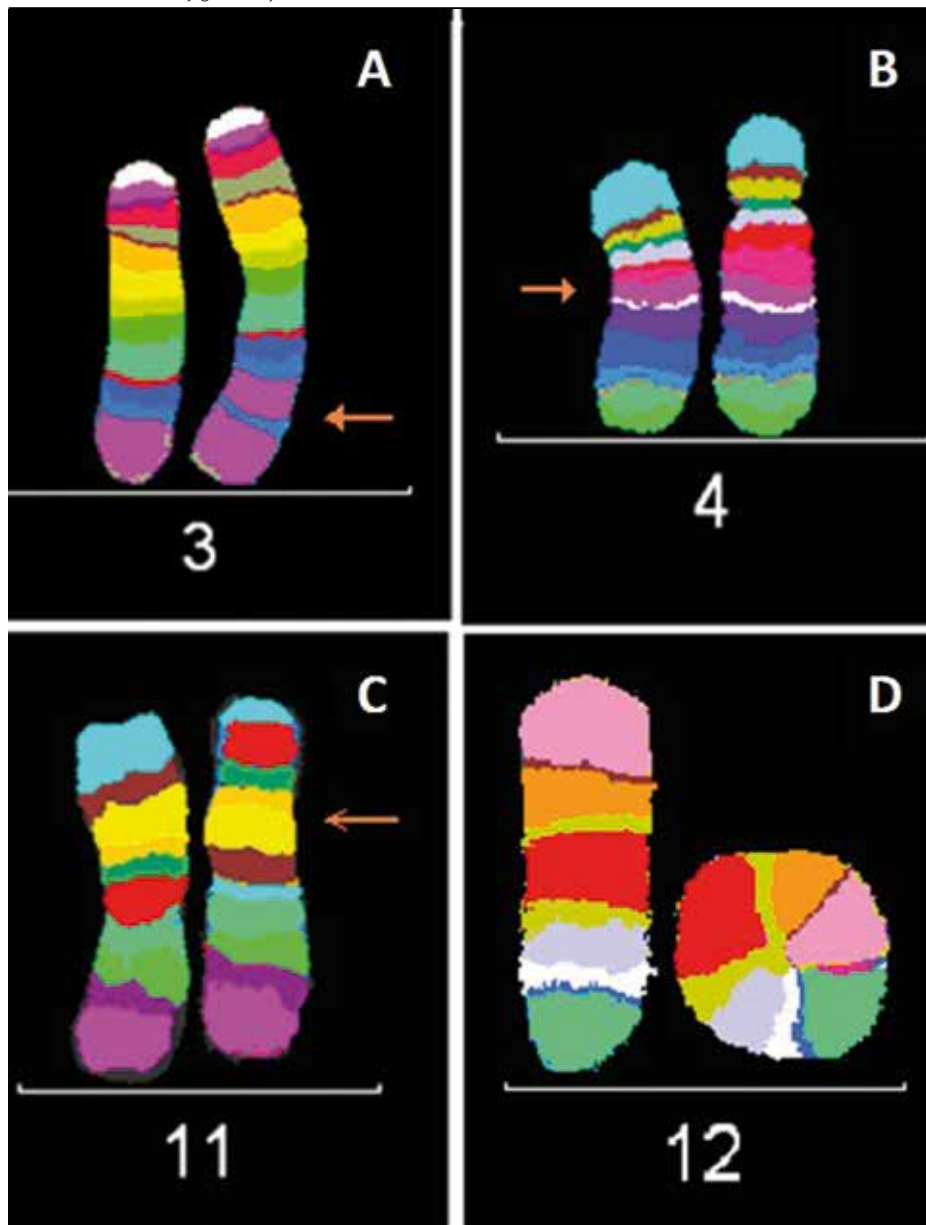
Na základe pôvodu klonov sa rozlišujú dva typy aCGH, a to cDNA array CGH a genómová array CGH. Zatiaľ čo cDNA array CGH využíva ako cieľové oblasti cDNA klony s veľkosťou 1 – 2 kb, genómová array CGH využíva sekvencie získané z rôznych typov vektorov (YAC, BAC, PAC, plazmidy). Osobitnú kategóriu tvorí array CGH založená na oligonukleotidových klonoch. Je citlivejšia, menej časovo náročná a podáva lepšie výsledky o profile mapovaného genómového úseku. Preto sa čoraz častejšie využíva vo výskume aj v diagnostike. Rozlišovacia schopnosť aCGH teda závisí od typu použitého vektora, v každom prípade je však rádovo vyššia než pri chromozómovej CGH. Dnes je už k dispozícii dostatok čipov s rôznou citlivosťou a tým, že dolná hranica rezolučného rozpätia aCGH prekračuje 100 kb výrazne posúva cytogenetickú analýzu na molekulárnu úroveň (19). Technológie aCGH vďaka možnosti rozsiahleho skriningu genómových zmien a plnej automatizácii predstavuje jeden z najlepších nástrojov genetického štúdia

Obrázok 2. M-FISH: komplexné zmeny karyotypov u:
A. Pacientky s difúznym veľkobunkovým lymfómom (DLBCL),
B. Pacienta s akútnou lymfoblastovou leukémiou (ALL)
 (Oddelenie lekárskej genetiky, NOÚ, Bratislava)



Obrázok 3. Metóda M-BAND je vhodná na odhaľovanie intrachromozómových aberácií (šípky ukazujú pozície zmien) alebo novotvarov (D).

- A.** Duplikácia na chromozóme 3 - dup(3)(q25.1q29)
B. Intersticiálna delécia na chromozóme 4 - del(4)(q13.1q21.1)
C. Pericentrická inverzia na chromozóme 11 - inv(11)(p15.2q14.1)
D. Prstencový (ring) chromozóm 12 - r(12)(p13;q24)
 (Oddelenie lekárskej genetiky, NOÚ, Bratislava)



na úrovni DNA. Predpokladá sa, že genómová aCGH bude čoraz viac využívaná tak v oblasti klinickej cytogenetiky, ako pri diagnostike zhubných nádorov (20).

Dedičné formy nádorových ochorení – podstata vzniku a diagnostika

Onkologické ochorenia majú väčšinou náhodný (sporadický) výskyt. Ich príčinou sú somatické mutácie s následným klonálnym vývinom. Ak k podobným mutáciám dôjde v zárodočných bunkách, môže to mať za následok dedičnú predispozíciu na vznik určitej formy rakoviny alebo rovno rozvoj nádorového ochorenia. Tieto mutácie môžu byť vo forme postihnutej alely prenášané z rodičov na potomstvo, čo zvyšuje riziko vzniku nádorových ochorení v ďalších generáciách.

Zárodočné mutácie sú vo väčšine bodové odchýlky v nukleotidovej štruktúre príslušných génov. Preto sa na ich detekciu najlepšie osvedčili molekulárne sekvenčné analýzy, napríklad priame sekvenovanie DNA. Existujú však aj výnimky, keď sa zárodočná mutácia môže prejaviť vo forme delécie celého génu alebo jeho veľkej časti. Ako príklad sa dá uviesť delécia génu *NF1* (17q11.2) pri neurofibromatóze typu 1. V tomto prípade je mutácia odhaľiteľná aj príslušnými komerčnými FISH sondami.

Najnovším prírastkom v molekulárnej biológii je sekvenovanie novej generácie (Next Generation Sequencing – NGS). Spolu s rastúcim počtom projektov využívajúcich NGS sa očakáva identifikácia veľkého počtu *de novo* amplifikovaných, deletovaných alebo translokovaných génov zohrávajúcich kľúčovú úlohu pri iniciácii a progresii nádoru. Predpokladá sa, že validácia týchto génov bude neskôr záležitosťou FISH (21).

Odhalit dedičnú formu nádorového ochorenia býva zložitejšie, pokiaľ nejde o typ nádoru, ktorý je charakteristickým znakom doteraz známych dedičných nádorových syndrómov, ako sú napríklad hereditárny karcinóm prsníka a ovarií, Li-Fraumeni syndróm, hereditárny nepolypózny karcinóm kolorekta (HNPCC) – Lynchov syndróm, retinoblastóm, neurofibromatóza 1 a 2 a mnohé ďalšie. Klinickými indikáciami býva relatívne nízky vek pacientov v čase diagnózy, opakovaný výskyt nádorového ochorenia v rodine, respektíve viacnásobný alebo opakujúci sa výskyt určitého nádoru u daného pacienta.

Aj keď sú dedičné formy rakoviny veľmi zriedkavé, o to viac sa venuje pozornosť hlavne skriningu známych rizikových genetických zmien asociovaných s ich vznikom. Jedinci,

u ktorých bola zistená zárodočná mutácia v príslušnom géne, sú zaradení do preventívnych skríningových programov, pričom sa kladie dôraz aj na vyšetrovanie blízkeho príbuzenstva. Samozrejme, samotná prítomnosť zárodočnej mutácie ešte neznamená automatický rozvoj malignity. Závisí to od viacerých faktorov, ako je typ postihnutého génu (onkogény, tumorsupresorové alebo mutátorové gény), penetrancia, vonkajšie rizikové faktory.

Familiárne formy hematologických malignít

Hematologické malignity s dedičnou predispozíciou, ako sú leukémie alebo lymfómy, sú veľmi raritné a o ich genetickom pozadí sa vie veľmi málo. Do budúcnosti sa však predpokladá, že sa im bude venovať oveľa väčšia pozornosť. Doteraz boli opísané familiárne formy pri niektorých typoch Hodgkinovho lymfómu (HL), primárneho mediastinálneho veľkobunkového lymfómu (PMBCL) (5), ale aj pri myeloproliferatívnych ochoreniach a myelodyspláziách (23, 24, 25).

Myeloproliferatívne neoplázie (MPNs) sú hematologické poruchy charakterizované nadprodukciou zreých myeloidných buniek s tendenciou k transformácii do akútnej myeloidnej leukémie (AML). Dedičné formy myeloproliferatívne ochorenia (MPNs) možno rozdeliť do dvoch veľkých skupín:

1. zdedené syndrómy, ktoré majú vplyv na jednu líniu s mendelovskou dedičnosťou, vysokú penetranciu a polyklonálnu krvotvorbu – tzv. hereditárna erytrocytóza a trombocytóza,
2. zdedené predispozície na pravý MPN, vyznačujú sa nízkou penetranciou, klonálnou krvotvorbou a prítomnosťou somatických mutácií, napríklad v génoch *JAK2-V617F*, *THPO* a *MPN*. Sem patria polycytémia vera (PV), esenciálna trombocytémia (ET) a primárna myelofibróza (PMF).

Za familiárne chronické myeloproliferatívne ochorenie sa považuje prítomnosť výskytu niektorých zo spomínaných foriem aspoň u dvoch príbuzných v rovnakom rodokmeni (25, 26).

Myelodysplastický syndróm (MDS) je heterogénna skupina ochorení charakteristická dysplastickými zmenami v kostnej dreňi, neúčinnou hematopoézou vedúcou k cytopénii a zvýšeným rizikom vývoja do akútnej myeloidnej leukémie (AML) (24). Z doteraz známych familiárnych foriem MDS (tabuľka 2) je asi najlepšie popísané familiárne ochorenie krvných doštičiek označované ako FPD – Familial Platelet

Tabuľka 2. Prehľad familiárnych syndrómov s predispozíciou k MDS/AML

Názov syndrómu	Zodpovedný gén(y)	Chr. lokus	dedičnosť	malignita	Výskyt v MDS/AML
Syndrómy zlyhania kostnej drene					
Diamond – Blackfan anémia	RPS19	19q13	AD	MDS/AML	0,5 – 1,0%
	RPS24	10q22			
	RPS17	15q25			
	RPL5	1p22			
	RPL11	1q35			
	RPL35A	3q29			
	RPS7	2p			
Ťažká kongenitálna neutropénia	ELA2	19q13	AD	MDS/AML	10%
	GFI1	1p22	AR		
	HAX-1	1q21			
Kongenitálna amegakaryocytová trombocytopenia	MPL	1q34	AR	MDS/AML	?
Schwachman-Diamond syndróm	SBDS	7q11	AR	MDS/AML	10%
Dyskeratosis congenita	DKC1	Xp28	XL	MDS/AML	3 – 5%
	TERC	3q26	AD		
	TERT	5p15	AR		
	TINF2	14q11			
	NOP10	15q14			
	NHP2	5q35			
Syndrómy porúch reparačných mechanizmov DNA					
Fanconiho anémia	FANC/BRCA kaskáda		AR XL	MDS/AML	50%
Bloomov syndróm	BLM	15q26	AR	MDS/AML	25%
Li-Fraumeniho syndróm	TP53	17p13	AD	MDS/AML	cca 7,5%
Poruchy signálneho prenosu					
Nooanov syndróm	RAS/MAPK kaskáda		AD	MDS/AML	?
Neurofibromatóza I.	NF1	17p11	AD	MDS/AML	0,2 – 0,5 %
Numerické chromozómové zmeny					
Trizómia ch. 21			zriedka	AML	2,5%
Familiárne formy MDS					
Familiárne ochorenie trombocytov s predispozíciou k myeloidnej leukémii	RUNX1	21q22	AD	MDS/AML T- ALL	20 – 60%
Skrátenie telomér asociované s familiárnou MDS (skrytá Dyskeratosis congenita)	TERC	3q26	AD	MDS/AML	?
	TERT	5p15			
Familiárne MDS/AML s mutáciou v GATA2	GATA2	3q21	AD	MDS/AML	?
Familiárna monozómia ch. 7		Ch. 7	AD	MDS/AML	?
Familiárne MDS/AML s mutáciou v CEBPA	CEBPA	19q13	AD	AML	1 – 10%

Vysvetlivky: MDS – myelodysplastický syndróm, AML – akútna myeloidná leukémia, AD – autozomálne dominantná dedičnosť, AR – autozomálne recesívna dedičnosť, FPD – Familial platelet disorders, XL – X-viazaná dedičnosť, T-ALL – T-bunková akútna lymfoblastová leukémia (Modifikovaná tabuľka podľa West et al., 2014 (23) a Liew et al., 2011 (24))

Disorder. Predstavuje autozomálne dominantné ochorenie charakterizované kvalitatívnymi a kvantitatívnymi defektmi krvných doštičiek s rizikom možného sklzu do akútnej leukémie. Genetickým základom je heterozygotná zárodočná mutácia génu *RUNX1* (21q22). Veľmi častými formami mutácií tohto génu sú delécie rôzneho rozsahu diagnostikovateľné napríklad pomocou FISH (vidieť na obrázku 1A). Ukázalo sa, že delécie v rozsahu 21q22.1-21q22.2 majú ťažší vplyv na fenotyp ako delécie proximálne alebo

distálne od tejto oblasti. Celoživotné riziko MDS/AML u pacientov s mutáciou je vyššie ako 40 % s priemerným vekom nástupu ochorenia 33 rokov. Treba mať na pamäti, že nástup ochorenia v rodokmeni sa môže skôr prejaviť u detí ako u staršieho príbuzenstva. Aj keď ide o predispozíciu k myeloidnej rade malignít, je zvýšené riziko aj k T-bunkovej akútnej lymfoblastovej leukémii (T-ALL) (23, 24).

Zaujímavým úkazom je familiárna monozómia 7. Úplná alebo čiastočná strata chromozómu

7 je častou zmenou v sporadických, niekedy sekundárnych MDS/AML a predpovedá nepriaznivú prognózu. Za zmienku stojí, že jedinci s rodinnou anamnézou monozómie 7 s predispozíciou k MDS/AML môžu mať spočiatku normálny karyotyp v periférnej krvi alebo kostnej dreni a časom sa u nich objaví mozaika monozómie 7 (27). To znamená, že monozómia 7 sa nenachádza v zárodočnej línii, ale sa objavuje ako prídavná zmena. Pôvodne sa predpokladalo, že za familiárnu formu zodpovedá zárodočná mutácia tumor-supresorového génu, ktorý je umiestnený na chromozóme 7 spolu so stratou druhej nepostihnutej kópie (wild-type) chromozómu 7 ako forma druhého zásahu nevyhnutného pre vývoj rakoviny. Táto teória však bola vyvrátená a kauzálny gén nebol zatiaľ identifikovaný. Je to o to zaujímavejšie, že pri sporadických formách MDS je bežne mutovaný gén *EZH2* lokalizovaný práve na 7q36 (24).

Záver

Molekulárna cytogenetika stále disponuje širokým spektrom metód, ktoré majú využitie v diagnostickej praxi, pričom každá z nich je unikátna. Ich citlivosť je obmedzená a niektoré zmeny na molekulárnej úrovni odhaliť nevedia, čo ich v prípade diagnostiky hereditárnych zmien pri malignitách vo svetle dnešných poznatkov odsúva na vedľajšiu koľaj. Avšak dnešné poznatky genetického pozadia rakoviny nie sú konečné a práve príklady familiárnych foriem hematolignit popisovaných v príspevku ukazujú, že aj tu stále bude priestor na molekulárnu cytogenetiku. Okrem toho doteraz žiadna z metód cytogenetického alebo molekulárneho charakteru nedokázala dať pangenomický pohľad na bunku. Táto skutočnosť sa asi tak

skoro nezmení, preto aj naďalej bude na dosiahnutie čo najlepšieho skríningu genetických zmien nevyhnutná kombinácia viacerých metódik a prístupov.

Literatúra

- Heng HH, Stevens JB, Liu G. Stochastic cancer progression driven by non-clonal chromosome aberrations. *Journal of Cell Physiology*. 2006;208:461–472.
- Sinclair DA. An age of instability. *Science*. 2003;301:1859–1860.
- Mladosievčová B, et al. *Molekulové mechanizmy patogenézy nádorov*. Bratislava: SAP; 2011: 123.
- Grundberg I. *Genotyping and Mutation Detection In situ. Development and application of single-molecule techniques*. Upsala: Acta Universitatis Upsaliensis, Digital Comprehensive Summaries of Upsala Dissertations from the Faculty of Medicine; 2006: 656.59.
- Saarinén S. *Genetic Basis of Familial Lymphoma Predisposition*. Academic dissertation. Helsinki: Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Haartman Institute, University of Helsinki; 2013.
- Fan YS. *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications*. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 204. Humana Press; 2003.
- Schaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2013*. Karger Switzerland; 2013.
- Kuglík P. *Vybrané kapitoly z cytogenetiky*. Brno: Masarykova univerzita; 2005.
- De Witte A, Nair M, Mehta K. *60-mer Oligo-Based Comparative Genomic Hybridization*. *Agilent Technologies*. 2006.
- Bishop R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience Horizons*. 2010;3:85–95.
- Biosynthesis. *LNA and PNA probes Comparison* [online]. 612 East Main Street. Lewisville, TX 75057. Available from: <http://www.biosyn.com/uploads/literature/pdf/LNA-PNA%20Comparison4.pdf>.
- Mozdarani H, Pellestor F. The Primed In Situ (PRINS) Technique: An Alternative Approach for Preimplantation Chromosomal Diagnosis. *Iran J Biotechnol*. 2004;2(3).
- Pellestor F. PRINS and In Situ PCR Protocols. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 334. Humana Press; 2006.
- Tam R, Shopland LS, Johnson CV. Applications of RNA FISH for visualizing gene expression and nuclear architecture. In: Beatty B, Mai S, Squire J. *FISH: A Practical Approach*. 1st ed. Oxford: Oxford University Press; 2002: 93–114.
- Stellaris® RNA FISH: *Detection, Localization, and Quantification of RNA at the Cellular Level* [online]. Available from: <https://www.biosearchtech.com/display.aspx?pageid=222>.
- Introduction to RNA FISH [online]. Available from: <https://sites.google.com/site/singlemoleculernafish/introduction-to-rna-fish>.
- McNeil N, Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. 2000 Sep 14;2000:1–14.
- Wan TS. Molecular Cytogenetics: techniques, developments and applications. *Journal of Hong Kong Institute of Medical Laboratory Sciences*. 2010;12(1, 2).
- Slámová I. *Technika array CGH a její využití v klinické genetiké* [online]. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita. 2007. Available from: <http://is.muni.cz>.
- Barett MT, Scheffer A, Ben-Dor A, et al. *Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA PNAS*. 2004;101:17765–17770.
- Available from: <http://www.cegat.de/en/services/customized-fish-assays/>.
- Fox Chase Cancer Center. *Knudson's „Two-Hit“ Theory of Cancer Causation* [online]. Available from: <http://www.fccc.edu/research/areas/advisors/knudson/twoHit.html>.
- West AH, Godley LA, Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014;1310(1):111–118.
- Liew E, Owen C. Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature. *Haematologica*. 2011;96(10):1536–1542.
- Rumi E. Familial chronic myeloproliferative disorders: the state of the art. *Hematol. Oncol*. 2008;26:131–138.
- Skoda RC. Hereditary myeloproliferative disorders. *Hematologica*. 2010;95(1):6–8.
- Morrisette JJD, de Chadarevian JP, Kolb EA. Familial Mosaic Monosomy 7 Syndrome. 2010 Jul 8 [Updated 2013 Feb 7]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., eds. *GeneReviews*® [online]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45015/>.

Ing. Martin Čermák

Oddelenie lekárskej genetiky NOÚ
Klenová 1, Bratislava
martin.cermak@nou.sk