

MOLEKULARNE PODŁOŻE POWSTAWANIA NOWOTWORÓW ORAZ GENETYCZNE

METODY ICH DIAGNOSTYKI

The molecular basis of cancer and genetic methods of its diagnosis

PAWEŁ LIS*, MARTA NICZYJ-RAUCY, MARTA LIS

Zakład Genetyki, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul.

Przybyszewskiego 63-77, 51-148 Wrocław, Poland

*e-mail: pawel.lis@microb.uni.wroc.pl

ABSTRACT: Cancer continues to be a big problem in XXI century. There are a lot of methods to diagnose this disease, such as: USG, mammography, tomography. However they are still imperfect. Genetic diagnosis is developing very fast and it can become the most important method in the nearest future. This paper presents some of the universal, modern and the most scientifically advanced ways of genetic diagnosis of cancer. These include: cytogenetics, polimerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP), fluorescence in situ hybridization (FISH), Southern blotting, microarray, microdissection and others. Each one is described with its advantages and disadvantages. It also contains basic information about the process of cancerogenesis and about the reasons for tumour forming.

KEY WORDS: Cancer genesis, cancer diagnostics, molecular diagnostics.

1. Wprowadzenie

W ostatnich kilkudziesięciu latach nastąpił znaczny postęp w medycynie i biologii molekularnej, pomimo tego choroby nowotworowe nadal stanowią plagę XXI wieku. Dzięki udoskonalaniu metod wykrywania i leczenia nowotworów, zwiększają się szanse przeżycia człowieka. Przewidywania lekarzy wskazują jednak na dalszy wzrost liczby osób zapadających na raka. Według WHO nowotwory stanowią drugą po chorobach układu krążenia przyczynę zgonów na świecie, szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych. Choroba ta może dotknąć każdego, niezależnie od wieku, płci czy statusu majątkowego. Szacuje się, że śmiertelność związana z chorobami nowotworowymi wzrośnie o 45% do 2030 roku. Jeśli nadal będzie utrzymywała się tendencja wzrostowa, to w 2020 r. u 16 milionów ludzi na świecie zostanie zdiagnozowany rak. Wiele

nowotworów można skutecznie wyleczyć, jeśli odpowiednio wcześnie się je wykryje i podejmie prawidłowe postępowanie terapeutyczne. Dlatego tak ważne jest prowadzenie badań mających na celu rozwój metod diagnostycznych. Dobrym tego przykładem jest znaczenie wczesnego wykrycia raka piersi: w Polsce ze względu na późne rozpoznanie, prawdopodobieństwo wyleczenia wynosi tylko 30% (Śliwowska et al. 2005), natomiast w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej aż 73% (Kochańska-Dziurawicz et al. 2003). W Polsce około 70% kobiet zgłaszających się do lekarza jest w II lub III stopniu zaawansowania klinicznego raka piersi. Na tym etapie choroba nowotworowa jest już zwykle trudna do leczenia i często prowadzi do przedwczesnej śmierci (Siedlecki i Limon 2006).

2. Nowotwory i molekularne przyczyny ich powstawania

Nowotwory są grupami komórek, które przestały prawidłowo funkcjonować i podlegać mechanizmom regulacyjnym organizmu, co skutkuje ich niekontrolowanymi podziałami i nieprawidłowym różnicowaniem. Charakteryzują się one niezahamowanym wzrostem związanym z dużą niestabilnością genetyczną, nabyciem zdolności do naciekania (inwazji) oraz kolonizacji obszarów normalnie zajmowanych przez inne rodzaje komórek (przerzutów). Powstają w wyniku serii somatycznych i/lub germinalnych mutacji DNA, które prowadzą do zaburzeń wzrostu, różnicowania, proliferacji, starzenia i śmierci komórek. Zmianom molekularnym najczęściej towarzyszą anomalie chromosomowe, będącym swoistym markerem nowotworowym wykorzystywanym często w ich diagnostyce (Srebrniak et al. 2006).

Nowotwory zalicza się do tzw. chorób kompleksowych. Wykazują one rodzinne występowanie, ale ich rozkład nie odpowiada wzorom oczekiwanym dla prostego mendelowskiego modelu dziedziczenia. Aktualnie definiuje się je jako jednostki, w których kilka lub więcej genów współdziałających ze sobą, z udziałem lub bez udziału czynników środowiskowych, prowadzi do zwiększenia lub zmniejszenia ryzyka ujawnienia choroby. Ważnym celem genetyki jest identyfikacja genów warunkujących szansę wystąpienia chorób, co pozwoliłoby na wdrożenie bardziej skutecznych metod wcześniejszego ich rozpoznawania oraz prewencji (Downs-Holmes i Silverman 2011, Weitzel et al. 2011).

2.1. Geneza powstawania choroby nowotworowej

Jedną z pierwszych teorii dotyczących molekularnych mechanizmów powstawania nowotworów była tzw. hipoteza dwóch uderzeń zaproponowana przez Knudsona i współpracowników (Knudson 1971, Knudson 2001). Była ona oparta na wynikach badań nad ludzkim siatkówczakiem oka. Badacze Ci zauważyli, że choroba ta może występować jako dziedziczna lub nie. Jeżeli ma ona charakter dziedziczny, nowotwór powstaje przeważnie w obu gałkach ocznych, bardzo szybko po urodzeniu. Jeśli natomiast ma postać sporadyczną, ujawnia się w starszym wieku, ale w jednej gałce ocznej. Na podstawie tych obserwacji i badań sformułowano teorię, która zakładała, że do powstania nowotworu niezbędne jest zajście przynajmniej dwóch mutacji. W nowotworach dziedzicznych pierwsza z nich zachodzi w komórkach zarodkowych, a druga w somatycznych. Natomiast w postaci sporadycznej obie mutacje powstają w komórkach somatycznych. Z teorią tą związane jest także pojęcie utraty heterozygotyczności – LOH (ang. loss of heterozygosity). W wyniku pierwszej mutacji

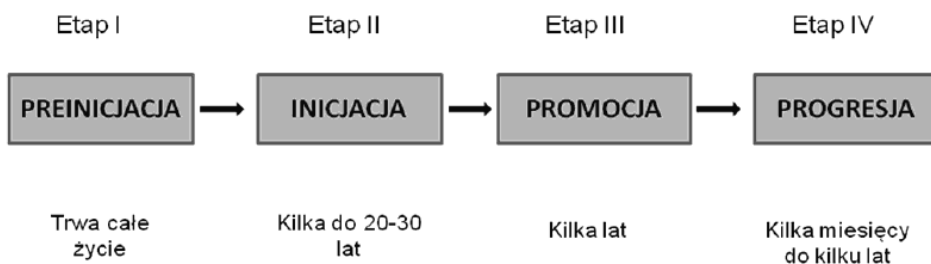
następuje utrata prawidłowej funkcji jednego allelu w genie supresorowym, natomiast aby zaszła transformacja nowotworowa musi nastąpić uszkodzenie drugiego allelu. Prowadzi to do całkowitej inaktywacji genu supresorowego, a co za tym idzie utraty heterozygotyczności (Beroukhim et al. 2006).

Proces transformacji zdrowej komórki w nowotworową jest mechanizmem złożonym, podczas którego musi dojść do wielu mutacji. Taką teorię powstawania nowotworów zaproponowano na podstawie badań nad rakiem jelita grubego (Fearon i Vogelstein 1990). Transformacja rozpoczyna się utworzeniem niewielkiego ogniska dysplastycznego w nabłonku, a w wyniku kolejnych zdarzeń rozwija się gruczolak, który nabierając cech inwazyjnych przekształca się następnie w raka. Vogelstein uważa, że kolejne zmiany prowadzące do powstawania nowotworu są spowodowane licznymi mutacjami inaktywującymi tzw. geny supresorowe oraz aktywacją onkogenów (Kinzler i Vogelstein 1996).

Wedle innej teorii (Hahn i Weinberg 2002) rak powstaje wówczas, gdy komórka nabywa zdolności do niekontrolowanego wzrostu i nie podlega mechanizmom decydującym o jej podziałach, funkcji i lokalizacji. Cykl komórkowy normalnych komórek jest ściśle kontrolowany przez odpowiednie systemy, tak aby nie została zachwiana równowaga pomiędzy ich podziałami a obumieraniem. W komórkach nowotworowych równowaga ta ulega przesunięciu w kierunku intensywnych podziałów komórkowych. Według Weinberga i Hahna większość komórek nowotworowych posiada wspólne cechy: niezależność od sygnałów wzrostu, niewrażliwość na sygnały hamujące wzrost, nieśmiertelność, nieograniczoną proliferację, zdolność do angiogenezy, zdolność do inwazji i przerzutów (Hahn i Weinberg 2000).

2.2. Etapy transformacji nowotworowej

Transformacja komórki prawidłowej w nowotworową jest procesem wieloetapowym. Zwykle czas przemiany jest długotrwały i wymaga wielu zmian w komórce. Podczas kancerogenezy można wyróżnić cztery główne etapy: preinicjację, inicjację, promocję i progresję (Ryc. 1). Preinicjacja zachodzi gdy organizm wystawiony zostaje na działanie czynników kancerogennych, co ma miejsce praktycznie przez całe jego życie. Do kancerogenów zalicza się czynniki chemiczne, fizyczne oraz biologiczne (Pitot i Dragan 1991, Gooderham et al. 2007).



Ryc. 1. Etapy transformacji nowotworowej (opis w tekście) (Pitot i Dragan 1991)

Pomimo, że każdy człowiek ciągle poddawany jest działaniu czynników kancerogennych, to nie u każdego przyczyniają się one do rozwoju nowotworu, ponieważ na rozwój choroby mają także wpływ osobnicze własności organizmu wynikające m.in. z wydolności układu immunologicznego i polimorfizmu genetycznego (Sugimura et al. 1995).

Wraz z pojawieniem się pierwszych zmian w aparacie genetycznym rozpoczyna się następny etap czyli inicjacja nowotworowa. Na tym etapie ważną rolę odgrywają predyspozycje związane z odziedziczonymi mutacjami np. w genach supresorowych. W przypadku osób u których występują rodzinne skłonności do nowotworów, aby nastąpiła złośliwa transformacja, nie musi wystąpić etap preinicjacji, co znacznie zwiększa ryzyko rozwoju nowotworu. Około 20% wykrywanych nowotworów to nowotwory dziedziczne (Bębenek et al. 2006). Następną fazą rozwoju raka jest promocja. Komórki nowotworowe zaczynają ulegać szybkim podziałom, dochodzi do powstawania kolejnych mutacji, jednak proces ten jest jeszcze odwracalny. Jeśli na tym etapie rozwój choroby nie zostanie zahamowany, wokół defektywnych komórek zaczynają rozwijać się naczynia krwionośne, które dostarczają komórkom substancji odżywczych. Wraz z procesem angiogenezy rozpoczyna się kolejny etap kancerogenezy – progresja. Komórki guza intensywnie się dzielą, nabierając zdolności do przełamania błony podstawnej otaczającej tkanki, a w konsekwencji do tworzenia przerzutów (Pitot i Dragan 1991).

2.3. Onkogeny oraz geny supresorowe są odpowiedzialne za transformację nowotworową

Poznanie genów i mechanizmów zaangażowanych w proces onkogenezy jest warunkiem koniecznym, aby można było identyfikować nowe cele terapii nowotworów. Do takich genów mających zasadniczy wpływ na transformację nowotworową należą: onkogeny, geny supresorowe i geny stabilizujące (Hilkens 2006).

W prawidłowo funkcjonujących komórkach proliferacja jest ściśle kontrolowana przez czynniki mitogenne, dzięki którym rozpoczyna cykl podziałowy. Za prawidłową proliferację i różnicowanie odpowiedzialne są protoonkogeny. Ich transkrypcja jest rygorystycznie kontrolowana, a produkty białkowe tych genów odpowiedzialne są m.in. za podział komórki. Białka te mogą mieć różny charakter, w zależności od pełnionych funkcji mogą być: receptorami czynników wzrostu, czynnikami wzrostu, mogą pośredniczyć w przekazywaniu sygnałów, a także być czynnikami transkrypcyjnymi regulującymi proliferację i apoptozę (Novakofski 1991). Jednak proces prawidłowej proliferacji komórki może ulec zaburzeniu, gdy na skutek np. mutacji, protoonkogen ulega przekształceniu w onkogen. Mutacje te mogą mieć charakter: mutacji punktowych, delecji, translokacji chromosomu. Mogą powodować nadekspresję białka lub zmianę jego struktury, w wyniku czego nie podlegająca już kontroli czynników regulujących komórka może się ciągle i niekontrolowanie dzielić. Najczęściej spotykaną zmianą występującą w komórkach nowotworowych są mutacje w kodonach 12, 13 i 61 trzech genów RAS: H-RAS, K-RAS, N-RAS. Każdy z tych genów koduje białko o masie 21 kDa o aktywności kinazy białkowej. Mutacje w tych genach są wykrywane w wielu rodzajach nowotworów. Występują w około 90% nowotworów trzustki, jelit – 50%, płuc – 30%, tarczycy – 50% i białaczek szpikowych – 30% (Urbain 1999). Prawidłowo funkcjonujące białko ma zdolność wiązania i hydrolizy guanozynotrisfosforanu (GTP) i zaangażowane jest w przenoszenie sygnałów w obrębie

komórki. Mutacja prowadzi do utraty prawidłowej GTP-azowej aktywności białek Ras, co powoduje niemożliwość dezaktywacji białka i ciągłe pobudzenie komórek do mitozy jako wynik zwiększonego poziomu cAMP (Reuter et al. 2000).

Geny supresorowe chronią komórkę przed transformacją nowotworową kontrolując jej podziały (Tab. 1). W prawidłowych warunkach regulują negatywnie cykl komórkowy, utrzymując liczbę komórek na stałym poziomie poprzez hamowanie proliferacji lub indukcję apoptozy. Ich prawidłowe funkcjonowanie znacznie zmniejsza ryzyko powstania nowotworu. Do utraty funkcji genu supresorowego potrzebna jest inaktywacja obydwu kopii genu – utrata heterozygotyczności (LOH). Wyróżnić można trzy klasy genów supresorowych:

- „gatekeepers” – należą tutaj geny bezpośrednio wpływające na proliferację poprzez hamowanie podziału lub promocję apoptozy. Często są specyficzne dla określonej tkanki, dlatego ich dysfunkcja powoduje konkretny typ nowotworu, np. mutacja genu RB wywołuje nowotwory siatkówki.

- „caretakers” – pośrednio wpływają na proliferację komórki. Ich zadaniem jest utrzymywanie stabilności w genomie. Do tej grupy należą głównie geny zaangażowane w naprawę uszkodzeń DNA.

- „landscaper” – kształtują mikrośrodowisko w którym powstaje nowotwór (Kopnin 2000).

Tab. 1. Przykładowe geny supresorowe i funkcje ich produktów białkowych (na podstawie Kopnin 2000)

Gen supresorowy	Funkcja białka
P53	Czynnik transkrypcyjny, regulator cyklu komórkowego i apoptozy
RB	Czynnik transkrypcyjny, kontroler cyklu komórkowego
APC	Białko cytoszkieletu
BRCA1	Należy do systemu naprawy DNA, aktywator transkrypcji
BRCA2	Aktywator transkrypcji, bierze udział w naprawie DNA

Dwa z pośród wielu genów supresorowych pełnią jedną z najważniejszych ról w transformacji nowotworowej, a mianowicie geny P53 i RB. Mutacje genu P53 obserwuje się w ponad 50% przypadków nowotworów (Oesterreich i Fuqua 1999). U osób cierpiących na raka jamy ustnej poziom przeciwciał anty-p53 jest wykrywalny jeszcze przed wystąpieniem objawów i ściśle skorelowany ze wzrostem guza (Rahhan et al. 1998). Gen P53 jest najczęściej uszkodzonym genem supresorowym. Nazywany jest także „strażnikiem genomu” gdyż wpływa na transkrypcję wielu innych genów. Jest genem o wielkości 20 000 par zasad znajdującym się na 17 chromosomie, zawiera 11 eksonów i 10 intronów. Białko zbudowane jest z 393 aminokwasów i zawiera trzy domeny. N-końcowa domena zawiera subdomenę transaktywacyjną i region bogaty w prolinę. Część centralna posiada sekwencję wiążącą DNA. Jest to region w którym najczęściej dochodzi do mutacji, tzw. region gorących miejsc – HSR (z ang. hot spot region). Mutacje najczęściej zachodzą w kodonach: Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273, Arg282. Część C-końcowa zawiera domenę oligomeryzacyjną, zasadową

domenę regulatorową oraz sygnał lokalizacji i eksportu jądrowego (Bai i Zhu 2006). W normalnych warunkach białko p53 jest wykrywane u ludzi w bardzo małych ilościach gdyż ulega szybkiemu rozkładowi dzięki ubiquitynacji. Jego okres półtrwania wynosi około 20 minut, a białka zmutowanego wydłuża się nawet do kilku godzin (Balgosklonny 2002). Białko p53 jest bardzo istotne do prawidłowego funkcjonowania komórki. Nie pozwala wejść komórce w cykl podziałowy jeśli ma uszkodzone DNA, co związane jest z zatrzymaniem cyklu komórkowego w punktach restrykcyjnych G1/S lub G2/M. Gdy dojdzie do sytuacji, w której uszkodzenie DNA nie zostanie naprawione, białko p53 kieruje komórkę na drogę apoptozy (Efeyan i Serrano 2007).

Innym ważnym genem supresorowym regulującym cykl komórkowy, którego mutacje mają wpływ na nowotworzenie jest gen RB. Gen RB zlokalizowany jest na chromosomie 13 i posiada 27 eksonów. Białko pRb należy do rodziny białek zwanych kieszeniowymi (ang. pocket protein). Białko to składa się z 928 aminokwasów i posiada dwie kieszenie A i B, do których wiążą się inne białka (Dick 2007). Jego główną funkcją jest regulacja przejścia komórki z fazy G1 do S, jednak gdy białko w wyniku mutacji nie ulega defosforylacji, staje się nieaktywne w wyniku czego komórka może w sposób niekontrolowany wejść w kolejną fazę cyklu. Inaktywacja obu alleli genu RB prowadzi do rozwoju siatkówczaka (retinoblastoma) we wczesnym wieku. Badania nad siatkówczakiem potwierdziły hipotezę dwóch uderzeń Knudsona (Knudson 1971, Knudson 2001).

2.4. Geny stabilizujące (geny mutatorowe) odpowiadają za naprawę uszkodzeń w genomie

W wyniku działania niekorzystnych czynników, w organizmie ciągle dochodzi do uszkodzeń w aparacie genetycznym. Sprawny system naprawy uszkodzeń DNA, w którego funkcjonowanie zaangażowanych jest wiele genów, pełni bardzo ważną funkcję w utrzymaniu stabilności genomu (Verdine i Bruner 1997). Wyróżnić można kilka systemów naprawy uszkodzeń DNA:

- bezpośrednia naprawa uszkodzeń – DR (ang. direct repair),
- naprawa przez wycinanie zasad – BER (ang. base excision repair),
- naprawa przez wycinanie nukleotydów – NER (ang. nucleotide excision repair),
- naprawa błędnie sparowanych zasad – MMR (ang. mismatch repair),
- rekombinacja homologiczna – HR (ang. homologous recombination),
- rekombinacja niehomologiczna – NHEJ (ang. non – homologous end joining).

Głównym enzymem biorącym udział w bezpośredniej naprawie DNA jest produkt białkowy genu MGMT – metylotransferaza O⁶-metyloguaninowa. Posiada ona zdolność do usuwania alkilowych uszkodzeń DNA. Z uszkodzeniem genu MGMT wiąże się zwiększona wrażliwość na środki alkilujące i podatność na nowotwory (Hegi et al. 2005). Naprawa poprzez wycinanie zasad ma za zadanie usuwanie nieprawidłowych zasad. Za rozpoznanie zmodyfikowanej zasady odpowiedzialny jest enzym glikozydaza 8-oksoguaniny, produkt genu OGG1. Innym ważnym genem biorącym udział w systemie BER jest XRCC1, produkt białkowy tego genu zaangażowany jest we wstawianie nukleotydu w nić DNA (Krokan et al. 2000). System NER ma zdolność naprawy bardziej złożonych uszkodzeń m.in. spowodowanych działaniem

promieniowania UV. Naprawa rozpoczyna się od rozpoznania niewłaściwego nukleotydu, następnie dochodzi do jego wycięcia i syntezy nowej nici DNA. Zaangażowanych jest w nią około 30 różnych białek, ich dysfunkcja powoduje powstawanie wielu różnych chorób np. zespołu skóry pergaminowej (Xeroderma pigmentosum) (Wood 1997). System MMR naprawia błędy, które powstały w czasie replikacji DNA oraz uszkodzone nukleotydy. Pełni on bardzo ważną rolę w stabilizacji genomu, dlatego uszkodzenia w genach tego szlaku przyczyniają się do wzrostu ryzyka zachorowania na wiele różnych nowotworów (Li 2008). Mutacje genów systemu MMR (głównie MSH2 i MLH1), wchodzące w kompleksy odpowiedzialne m.in. za rozpoznawanie uszkodzeń, są często związane z występowaniem raka jelita grubego. Podwójne pęknięcia nici DNA mogą być usuwane na drodze homologicznej i niehomologicznej rekombinacji (Hewish et al. 2010).

Procesy naprawy DNA są niezbędne, ponieważ każdego dnia organizm jest narażony na liczne kancerogenne czynniki, ponadto mutacje powstają również z powodów przypadkowych nieprawidłowości w sparowaniu nukleotydów podczas replikacji DNA. Gdy któryś z tych genów ulega uszkodzeniu (lub jest dziedzicznie nieprawidłowy) – tym samym następuje zwielokrotnienie liczby mutacji w komórce i zwiększona częstość zapadania na choroby nowotworowe (Valdiglesias et al. 2011). Sądzi się, że mutacje somatyczne i zakłócenia w funkcji tych genów nie prowadzą bezpośrednio do procesu nowotworzenia, ale przyczyniają się do stanu nierównowagi genetycznej i lawinowego wzrostu tempa mutacji innych genów, łącznie z genami supresorowymi i protoonkogenami (Weitzel et al. 2011).

3. Genetyczne metody diagnostyki nowotworów

Diagnostyka molekularna należy do najbardziej dynamicznie rozwijających się działów biologii i medycyny. Już w połowie lat osiemdziesiątych znalazła ona zastosowanie w genetyce człowieka. Stało się to za przyczyną wprowadzenia m.in. sond molekularnych, enzymów restrykcyjnych oraz nowych technik badawczych takich jak transfer Southerna, sekwencjonowanie, znakowanie i detekcja DNA, PCR i synteza oligonukleotydów. Obecnie diagnostyka molekularna obejmuje m.in. genetykę człowieka, immunologię, onkologię, medycynę sądową, choroby krążenia, wykrywanie patogenów. W coraz większym stopniu współczesna diagnostyka laboratoryjna uczestniczy też w wykrywaniu i monitorowaniu leczenia chorób nowotworowych (Kopański 1995, Weitzel et al. 2011).

Bodźcem dla rozwoju metod diagnostycznych w onkologii jest dążenie do rozpoznawania nowotworów we wczesnym, jeszcze bezobjawowym stadium choroby. Dlatego obok ciągłego rozwoju technik obrazowania nowotworów rozwijają się również metody molekularne (Nowsheen et al. 2011).

3.1. Markery nowotworowe

W przebiegu procesów nowotworowych dochodzi bardzo często do konstytutywnej (niezależnej od fizjologicznych mechanizmów regulacyjnych) ekspresji genów, których produkty w komórkach normalnych pojawiają się tylko przejściowo – w okresie ich rozplemu i różnicowania się. Jeżeli produkty pochodzące z komórek nowotworowych są uwalniane do płynów ustrojowych to mogą być markerami użytecznymi w rozpoznawaniu, prognozowaniu i leczeniu chorób nowotworowych (Steffen 1994,

Niezabitowski et al. 2000). Szereg takich markerów to substancje wytwarzane w znacznych ilościach na pewnych etapach ontogenezy. W dojrzałych komórkach prawidłowych ich synteza nie zawsze ulega całkowitemu zablokowaniu, ale pozostaje na śladowym poziomie. Niestety, nie wszystkie komórki ulegające transformacji nabywają zdolności do syntetyzowania i/lub uwalniania do krążenia tego rodzaju substancji. Stąd szereg chorych, u których stężenia markerów kształtują się w granicach obserwowanych u ludzi zdrowych, czy z chorobami nienowotworowymi (Niezabitowski et al. 2000).

3.1.1. Markery biochemiczne

Marker biochemiczny to dowolna substancja wielkocząsteczkowa umożliwiająca odróżnienie komórki prawidłowej od nowotworowej. Odzwierciedlają one zwiększoną proliferację komórek nowotworowych, ich różnicowanie i obumieranie. Obecnie oznacza się wiele substancji pełniących rolę markerów nowotworowych takich jak np. białka, antygeny, enzymy, hormony. Związki te występują w zmienionej postaci lub ilości w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Obecność tychże markerów lub zmiany w poziomie ujawnia się za pomocą przeciwciał mono- i poliklonalnych (Kopański 1994, Kopański 1995, Nowsheen et al. 2011).

Zastosowanie markerów biochemicznych w praktyce diagnostycznej jest dosyć powszechne, jednak rzadko są one specyficzne dla danego typu nowotworu, często jeden z nich jest charakterystyczny dla wielu jednostek chorobowych. Znane są liczne markery nowotworowe np. obecnie najczęściej badany jest CA 15-3 dotyczący raka piersi (Kopczyńska i Tyrakowski 2006). Obecność tego antygenu stwierdzono również w licznych nowotworach: płuc, jajnika, trzustki, żołądka i wątroby, z wyjątkiem nowotworów pochodzenia mezenchymalnego (Śliwska et al. 2005).

Liczne biomarkery mają wiele funkcji: nie tylko stwierdzają obecność nowotworu w organizmie, ale też mogą mieć wartość predykcyjną jak np. ECDHER2. Niektóre markery mogą również być pomocne w wyborze terapii oraz ocenie reakcji komórek nowotworowych na stosowane leczenie. HER2 (białko p185) to receptor błonowy o aktywności kinazy tyrozynowej, zbudowany z trzech domen: wewnątrzkomórkowej, transmembranowej i zewnątrzkomórkowej (Kopczyńska i Tyrakowski 2006, Wójcik et al. 2006). Kodowany jest przez protoonkogen HER2 (ERBB2, NEU), zlokalizowany w chromosomie 17q. Zewnątrzkomórkowa domena receptora HER2 zwana jest inaczej ECDHER2 i jest odpowiedzialna za wiązanie ligandów, konsekwencją czego jest przenoszenie unikalnego sygnału do jądra komórki i stymulacja mitogenna. Uważa się, że nadekspresja onkoproteiny HER2 w komórkach nabłonkowych gruczołu piersiowego jest związana ze wzmożoną proliferacją i rozwojem fenotypu złośliwego. Domena ECDHER2 może być odszczepiana od receptora (przy udziale metaloproteinaz) i uwalniana do krwioobiegu, dlatego pomiar jej stężenia w surowicy pośrednio umożliwia wykrywanie nadekspresji białka receptorowego w raku piersi. Stężenie ECDHER2 stwierdzono w surowicy u 0-38% pacjentek z pierwotnym rakiem piersi i u 23-80% chorych z przerzutami. Komplementarne do CA 15-3 oznaczenia sHER2 istotnie podnoszą czułość diagnostyczną (Kopczyńska i Tyrakowski 2006, Wójcik et al. 2006, Palacios et al. 2008, Nowsheen et al. 2011).

Do markerów przydatnych w diagnostyce laboratoryjnej raka piersi włączono w latach 90 ubiegłego wieku komercyjne testy do oznaczania stężenia tkankowego

antygeny polipeptydowego swoistego (TPS) oraz tkankowego antygeny polipeptydowego (TPA). Oznaczenie pierwszego antygeny w surowicy oraz w płynach ustrojowych dostarcza informacji o aktywności procesu nowotworowego nawet przy małej masie guza. Natomiast stężenie TPA wzrasta wraz z progresją nowotworu i wzrost jego poziomu może być sygnałem nawrotu choroby nowotworowej, spadek zaś może wskazywać na efektywność stosowanego leczenia (Wójcik 1994, Będowska et al. 2007). Wartość diagnostyczną oznaczania TPA w rozpoznaniu tego raka można zwiększyć poprzez łączne oznaczenie stężenia TPA z CA 15-3 (Śliwowska et al. 2005).

Kolejnym biomarkerem są cytokiny hematopoetyczne (HGFs), które są również używane jako markery raka piersi. Ponadto podwyższenie stężenia HGFs w surowicy zaobserwowano również w przebiegu niedrobnokomórkowego raka płuca i w raku jelita grubego. Badania wykazały, że stężenie oraz czułość diagnostyczna HGFs wzrastały wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu (Ławicki 2005).

Ogromną zaletą biomarkerów jest to, że mogą sygnalizować początek procesu nowotworzenia znacznie wcześniej niż uwidaczniają się zmiany kliniczne, ponieważ proces nowotworzenia ma charakter wieloetapowy, w którym zmiany molekularne poprzedzają zmiany na poziomie komórki i organizmu. Wadą natomiast jest trudność w wypracowaniu wzorców różniących stan markera w komórce prawidłowej od stanu markera w komórce nowotworowej oraz niska wartość diagnostyczna, gdy stosuje się je pojedynczo. Dlatego często stosuje się oznaczenie kilku markerów łącznie. Na przykład dodatnia wartość predykcyjna zwiększenia stężenia ECD (HER2), CEA i CA15-3 dla wykrycia reaktywacji nowotworzenia ocenia się odpowiednio na: 18%, 20%, 32,6%. Natomiast wartość markerów oznaczanych łącznie: dla CA15-3 oraz ECD (HER2) wynosi 62,9%, dla CEA i CA15-3 – 59,6% (Kopczyńska i Tyrakowski 2006, Wójcik et al. 2006, Newshean et al. 2011).

3.1.2. Markery genetyczne

Marker genetyczny jest zmianą w strukturze, sekwencji lub ekspresji materiału genetycznego. Znajdują one zastosowanie w badaniach predyspozycji do zapadnięcia na choroby nowotworowe, ich diagnozowaniu i przebiegu. Ostatnio zostało wykazane, że mogą mieć wpływ na wybór terapii (Siedlecki i Limon 2006, Eddy et al. 2010).

Podstawową cechą markera musi być jego polimorfizm, to znaczy występowanie w danym *locus* więcej niż jednego allelu. Może on być dwualleliczny, gdy jest nim sekwencja DNA rozpoznawana na przykład przez określony enzym restrykcyjny (obecność lub brak miejsca restrykcyjnego) lub wieloalleliczny, gdy stanowią go sekwencje powtórzone (np. sekwencje mikrosatelitarne). W analizie DNA wykorzystuje się zarówno markery wewnętrzne, jak i umiejscowione fizycznie blisko badanego genu. Szacuje się, że polimorfizm DNA (w różnych postaciach) występuje średnio raz na 100 nukleotydów. Właśnie dlatego markery polimorficzne są bardzo użytecznym i poszukiwanym narzędziem w diagnostyce medycznej. Ponadto analiza markerów polimorficznych jest bardzo przydatna, ponieważ umożliwia diagnozowanie chorób genetycznie uwarunkowanych, dla których nie jest znany ani produkt badanego genu, ani molekularny charakter zmian prowadzących do powstania schorzenia (Eddy et al. 2010).

Rodzaj markera polimorficznego decyduje o wyborze rodzaju techniki molekularnej stosowanej do jej wykrycia. Na przykład w przypadku markerów mikrosatelitarnych wystarczy ocena wielkości produktów PCR z użyciem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (Lin 2010).

Badania wykazały, że markerem nasilenia zmian nowotworowych i obecność przerzutów u chorych na zróżnicowane raki tarczycy jest stężenie tyreoglobuliny (Tg) w surowicy. Poznanie sekwencji i sklonowanie genu tyreoglobuliny umożliwiło badanie jego ekspresji. Wyizolowanie mRNA dla Tg pozwoliło na preparatykę komplementarnych sond molekularnych. Analiza otrzymanych wyników wskazuje, że poziom mRNA Tg zależy od typu nowotworu gruczołu tarczycowego. W raku anaplastycznym wykazano bardzo niski poziom transkryptów genu Tg w porównaniu z wołem obojętnym, nieco wyższy poziom w rakach zróżnicowanych wywodzących się z komórki pęcherzykowej. Z przeprowadzonych badań wynika, że zaobserwowany spadek ekspresji mRNA Tg w przypadkach nowotworów złośliwych tarczycy wywodzących się z komórek pęcherzykowych może być jednym ze wskaźników określających stopień złośliwości procesu nowotworowego (Łącka et al. 2000).

3.2. Cytogenetyka

Cytogenetyka zajmuje się badaniem chromosomów, ich morfologii, liczby i roli w procesie dziedziczenia. Badania cytogenetyczne nowotworów są wykonywane rutynowo w wielu ośrodkach onkologicznych. Dostarczają one informacji na temat całości kształtu zmian chromosomowych w komórkach nowotworowych i swoistych zmian chromosomowych, które są często istotne dla diagnostyki różnicowej. Również pozwalają na rozróżnienie proliferacji klonalnej od nieklonalnej i wykrycie więcej niż jednego klonu w przypadkach nowotworów złożonych. Klasyczną analizę chromosomową przeprowadza się po krótkotrwałym wyhodowaniu komórek nowotworowych *in vitro*, inkubacji w obecności Colcemidu (analog alkaloidu roślinnego – kolchicyny), a następnie prążkowym wybarwieniu chromosomów metafazalnych. Wadą tej metody jest częsta trudność w uzyskaniu płytek metafazalnych, zła jakość chromosomów, ograniczona zdolność rozdzielcza prążków chromosomowych oraz złożone rearanżacje kariotypowe. Wprowadzenie technik prążkowego barwienia chromosomów umożliwiło precyzyjną identyfikację każdej z 23 par chromosomów człowieka, a tym samym rozpoznawanie i charakterystykę aberracji chromosomowych (Tab. 2) (Bocian i Limon 2006, Bridge i Cushman-Vokoun 2011, Kluin i Schuurin 2011).

Technika uzyskiwania dużej rozdzielczości prążkowej chromosomów (ang. *high resolution technique* - HRT) zapoczątkowała rozwój mikrocytogenetyki. Powstała również możliwość analizy fluorescencyjnej DNA chromosomowego w cytometrze przepływowym. Ponadto rozwój techniki inżynierii genetycznej przyczynił się do opracowania metody hybrydyzacji *in situ* (ang. *in situ hybridization* - ISH). Metody te znacznie poszerzyły możliwości diagnostyczne badań cytogenetycznych (Bridge i Cushman-Vokoun 2011, Kluin i Schuurin 2011).

Tab. 2. Przykłady swoistych aberracji chromosomowych występujących w nowotworach układu krwiotwórczego (na podstawie Siedlecki i Limon 2006)

Rodzaj aberracji chromosomowej	Nazwa choroby	Geny fuzyjne
t(1;19)(q23;p13)	ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)	PBX; E2A
t(4;11)(q21;q23)	ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)	AF4; MLL
t(9;22)(q34;q11)	przewlekła białaczka szpikowa (CML)	BCR; ABL
t(14;18)(q32;q21)	chłoniak złośliwy	IGH; BCL2
t(8;21)(q22;q22)	ostra białaczka szpikowa (AML) M2	ETO; AML1

Badania cytogenetyczne wykazały, że zdecydowana większość komórek nowotworowych układu krwiotwórczego oraz niektórych chłoniaków złośliwych i guzów litych charakteryzuje się obecnością aberracji chromosomowych. Aberracje te są zarówno ilościowe, jak i strukturalne. Niektóre z tych aberracji są wysoce swoiste, dlatego też identyfikacja zmian chromosomowych w komórkach nowotworowych staje się coraz ważniejszym czynnikiem diagnostycznym i niekiedy prognostycznym w przebiegu choroby (Kluin i Schuurin 2011).

Duże znaczenie ma analiza cytogenetyczna również kilku rodzajów drobnookrągłokomórkowych guzów wieku dziecięcego np. guz Ewinga i mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy pęcherzykowy, których diagnostyka różnicowa może sprawiać patologom trudności. Wyniki badań cytogenetycznych tych guzów wykazują, że komórki każdego z nich mają odrębne, swoiste aberracje chromosomowe (Tab. 3). Coraz częściej w diagnostyce mięsaków tkanek miękkich stosowane są badania cytogenetyczne i badania w zakresie technik biologii molekularnej (Bridge i Cushman-Vokoun 2011).

Tab. 3. Aberracje chromosomowe typowe dla komórek niektórych rodzajów złośliwych guzów nowotworowych tkanek miękkich człowieka (Siedlecki i Limon 2006, Bridge i Cushman-Vokoun 2011)

Rodzaj aberracji chromosomowej	Nazwa choroby
t(12;22)(q13;q12)	mięsak jasnokomórkowy
t(12;15)(p13;q25)	włókniakomięsak dziecięcy
t(11;22)(q24;q12)	guz Ewinga, PNET – prymitywne nowotwory neuroektodermalne
t(9;22)(q22;q12)	pozaszkieletowy chrzęstniakomięsak śluzowaty
t(2;13)(q35-37;q14); t(1;13)(p36;q14)	mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy pęcherzykowy

Zaletą diagnostyki cytogenetycznej jest stosunkowo niski koszt w porównaniu z badaniami molekularnymi oraz nieskomplikowane testy mogące potwierdzić stawianą diagnozę (Srebrniak et al. 2006). Aberracje chromosomowe analizowane na poziomie cytogenetyki klasycznej dają całościowy obraz zmian cytogenetycznych zachodzących w komórce. Ponadto analizuje się również pulę komórek proliferujących, czyli najbardziej istotnych dla rozwoju procesu nowotworowego. Jest to metoda referencyjna i w wielu wypadkach niezastąpiona. Jednak wadą tej techniki diagnostycznej jest subiektywność zależna od doświadczenia i sprawności wzroku cytogenetyka. Ponadto, niestety, wymaga hodowli komórkowych, które w odniesieniu do komórek białaczkowych nie zawsze są efektywne (Haus 2001) (Tab.4.).

Tab. 4. Zalety i wady konwencjonalnych badań cytogenetycznych (Bridge i Cushman-Vokoun 2011)

ZALETY	WADY
<ul style="list-style-type: none"> • Dostarcza ogólnych informacji na podstawie jednego badania • Ujawnia anomalie pierwotne i wtórne • Nie wymagana jest wcześniejsza diagnoza histologiczna 	<ul style="list-style-type: none"> • Badanie tylko na podstawie świeżej próbki, najczęściej niezbędne jest przeprowadzenie hodowli komórkowej
<ul style="list-style-type: none"> • Może ujawnić zmiany niewykrywalne metodami FISH oraz RT-PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • Trudności w interpretacji wyników przy złożonych rearanżacjach w kariotypie • Niemożność zaobserwowania zmian niewidocznych w skali mikroskopowej • Trudność uzyskania chromosomów dobrej jakości
<ul style="list-style-type: none"> • Metoda czuła i specyficzna • Mogą być wykorzystywane próbki pochodzące z cienkoigłowej biopsji aspiracyjnej (BAC) 	<ul style="list-style-type: none"> • Problemy z próbkami pochodzącymi z nowotworów kości (niska gęstość komórek, uwalnianie komórek ze szpiku kostnego)

3.3. Sekwencjonowanie DNA

Ta metoda polegająca na ustaleniu kolejności i rodzaju nukleotydów, składających się na zapis informacji w DNA, jest równocześnie najbardziej precyzyjną metodą poznania tej struktury. Powszechnie sekwencjonowanie DNA oparte jest na metodzie Sangera. Znajomość sekwencji sklonowanego fragmentu DNA pozwala na zidentyfikowanie rejonów zawierających właściwe sekwencje kodujące białko, obszarów zawierających sekwencje ważne dla regulacji ekspresji genów. Stwarza to możliwość ciągłego postępu badań w biologii molekularnej. W miarę identyfikacji i sekwencjonowania większej liczby genów ludzkich będzie możliwe wykrywanie coraz większej ilości nieprawidłowych alleli warunkujących nowotworzenie i wiele chorób genetycznych (Bridge i Cushman-Vokoun 2011).

Istnieje wiele mutacji wrodzonych, które predysponują do rozwoju nowotworów oraz mutacje występujące w nowotworach sporadycznie. Oba powyższe typy nieprawidłowych zmian w DNA można wykazywać w badaniach molekularnych opartych na bezpośrednim lub pośrednim badaniu struktury tego kwasu nukleinowego. Do rozpoznawania nowych mutacji powszechnie stosuje się bezpośrednio sekwencjonowanie DNA. Ponieważ sekwencjonowanie dużych obszarów DNA jest długotrwałe i kosztowne, dlatego stosuje się wiele innych metod skanujących, które pozwalają na szybsze wykrycie mutacji bez potrzeby sekwencjonowania całego genu. Jednak wszystkie te techniki są kosztowne i wymagają dużej praktyki (Bridge i Cushman-Vokoun 2011, Weitzel et al. 2011).

3.4. PCR

Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction* – PCR) jest metodą powszechnie używaną w wielu badaniach genetycznych, w tym także do diagnostyki nowotworów. Technika ta opiera się na enzymatycznej amplifikacji fragmentu DNA, ograniczonego dwoma oligonukleotydowymi starterami (ang. *primers*), komplementarnymi do przeciwnych nici DNA badanych sekwencji, zachodzącej w trakcie powtarzających się cykli replikacji i separacji nici DNA. Jednak do stosowania tej metody potrzebna jest znajomość sekwencji amplifikowanego fragmentu DNA do syntezy swoistych starterów (Kluin i Schuurin 2011).

Polimorfizm DNA wykrywany za pomocą techniki PCR stosuje się również do ustalania nosicielstwa zmutowanego genu w rodzinach z ryzykiem wystąpienia częstych chorób genetycznych. Zaletami PCR są: wysoka czułość, wystarcza niewielka ilość DNA, która może pochodzić z dowolnego rodzaju materiału biologicznego oraz krótki czas badania. Dzięki temu możliwe jest znalezienie zmutowanych komórek, które oddzieliły się od tkanki guza nowotworowego we wczesnej fazie jego rozwoju i przedostały się do płynów, wydzielin ustrojowych. Metoda ta w prosty sposób pozwala na wykazanie obecności mutacji charakterystycznych dla danego typu nowotworów na przykład w płwocinie chorego na raka płuc, w moczu chorego na raka pęcherza czy w kale chorego na raka jelita grubego. PCR umożliwia namnażanie bardzo małych próbek DNA miliony razy w ciągu godziny. Wadą tej metody jest możliwość otrzymania wyników fałszywie dodatnich (przez mikrozanieczyszczenia) lub ujemnych (przez zastosowanie niewłaściwych starterów) (Chetverina i Chetverin 2010, Varsale et al. 2010).

Amplifikacja materiału genetycznego za pomocą PCR jest też etapem wyjściowym do szeregu innych metod badawczych stosowanych w diagnostyce nowotworów. Najważniejszym zastosowaniem jest wykorzystanie jej do uzyskania zwiększonej ilości DNA przed jego dalszą analizą. Po uzyskaniu fragmentu genu możliwe jest dalsze jego badanie za pomocą metody RFLP, a uzyskany wynik podobny jest jak w przypadku zastosowania metody transferu Southerna, jednakże PCR zastępuje ją często, ponieważ jest znacznie mniej czasochłonny. Technika PCR-RFLP może być stosowana zarówno do bezpośredniego identyfikowania mutacji jak i określania nosicielstwa. Wysoka czułość tej metody daje możliwość ich wykorzystania w monitorowaniu leczenia białaczek, chłoniaków oraz nowotworów litych z potencjalnym krwiopochodnym rozsiewem (Słomski et al. 1996).

Opracowano wiele odmian PCR. Techniki te wykorzystuje się w sekwencjonowaniu DNA, wykrywaniu mutacji, hybrydyzacji *in situ*, identyfikacji patogenów (Bal i Mazurczak 2006, Kluin i Schuurin 2011).

3.4.1. Real time - PCR

Jest to technika PCR w czasie rzeczywistym, która daje nowe możliwości diagnostyczne i badawcze. Jest metodą bardzo szybką, pozwalającą na seryjną analizę materiału diagnostycznego. Ponadto jest reakcją ilościową, podczas gdy klasyczna technika PCR to tylko reakcja jakościowa (otrzymuje się informacje o obecności lub braku produktu) (Soumaoro et al. 2006). W Real time - PCR w sposób powtarzalny określa się liczbę powielonych matryc. Obecnie jest kilka odmian różniących się metodami wykrywania sygnału fluorescencji, we wszystkich bowiem sondy lub markery znakowane są tego typu znacznikami. Wysoka czułość pozwala na wykorzystanie tej techniki w monitorowaniu leczenia białaczek, chłoniaków oraz nowotworów litych z potencjalnym krwiopochodnym rozsiewem. Dzięki tej metodzie jest możliwe oznaczanie 5-lipoksygenazy, której wartość jest podwyższona w raku okrężnicy (Pidgeon et al. 2007). Zahamowanie ekspresji tego enzymu może być cenne w profilaktyce i leczenie tego nowotworu (Soumaoro et al. 2006, Ståhlberg i Bengtsson 2010).

3.4.2. RT - PCR

Jest to analiza transkryptu mozaikowego mRNA, gdzie materiałem diagnostycznym jest cDNA, przepisany metodą odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription* – RT). Stosuje się ją np. w diagnostyce białaczek, chłoniaków, nowotworów litych, gdzie większość translokacji chromosomowych prowadzi do utworzenia genu mozaikowego, miejsca złamań DNA występują na bardzo dużych obszarach w intronowym DNA i dlatego ich analiza na poziomie DNA jest trudna (Włodarska 2006, Kluin i Schuurin 2011).

Reverse transcription - PCR oparty na badaniu tkankowo specyficznych markerów, pozwala na znalezienie nawet kilkuset komórek nowotworowych krążących we krwi obwodowej. Przykładem wykorzystania tej metody jest poszukiwanie komórek czerniaka krążących we krwi obwodowej u chorych po radykalnym zabiegu chirurgicznym i/lub z czynnym procesem nowotworowym. W celu wykrycia tych komórek wykorzystuje się fakt, że są one jedynymi komórkami krążącymi we krwi, które wykazują ekspresję genu tyrozynazy – enzymu uczestniczącego w syntezie melaniny, barwnika wytwarzanego tylko przez melanocyty. Dlatego test ten jest wysoce specyficzny i czuły (wykrywa nawet pojedynczą komórkę czerniaka w 5 ml krwi) (Siedlecki i Limon 2006, Bridge i Cushman-Vokoun 2011, Dadras 2011).

Są również testy wykorzystujące inne markery, co zwiększa jeszcze bardziej ich czułość (o kilka procent) i sprawia, że stają się znacznie bardziej precyzyjne, ale z drugiej strony – podraża to koszty badania i utrudnia ich wykonanie. Z tego powodu najczęściej wykorzystywane są testy dwu- i trójmarkerowe (Ståhlberg i Bengtsson 2010, Bridge i Cushman-Vokoun 2011).

RT - PCR używany jest również do oceny fuzji genowych, oparty na analizie fuzyjnego mRNA. Ta technika znalazła szersze zastosowanie niż PCR z użyciem DNA, między innymi ze względu na znaczną wielkość cząsteczek DNA genów fuzyjnych.

Dużą zaletą tej metody jest wyjątkowa czułość, która pozwala na wykrycie jednej komórki nowotworowej (np. z genem fuzyjnym) na milion prawidłowych. Jednak wadą jest trudność, jaką czasem sprawia kliniczna interpretacja wyniku, zwłaszcza gdy badanie wykonywane jest w celu kontroli choroby resztkowej. Ponieważ tą metodą bada się całą pulę komórek z fuzjami genowymi (komórki proliferujące i nieproliferujące) nie wiadomo więc, czy słaby prążek w RT - PCR odpowiada przetrwałym komórkowym nowotworowym, czy jest wyrazem odradzającego się klonu białaczkowego (Haus 2001) (Tab.5.).

Tab. 5. Zalety i wady metody RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) (Bridge i Cushman-Vokoun 2011)

ZALETY	WADY
<ul style="list-style-type: none"> • Próbką może być materiał świeży, zamrożony, zawieszony w parafinie; wystarczy niewielka jego ilość 	<ul style="list-style-type: none"> • Nie wszystkie nowotwory wykazują obecność charakterystycznych genów fuzyjnych
<ul style="list-style-type: none"> • Może dać pozytywne wyniki gdy ilość tkanki jest niewystarczająca do badań cytogenetycznych lub kiedy badania cytogenetyczne były nieskuteczne 	<ul style="list-style-type: none"> • Podejście ukierunkowane, nie nadaje się do badań o podejściu całościowym • konieczna jest znajomość sekwencji konkretnego genu fuzyjnego w celu zaprojektowania odpowiednich primerów
<ul style="list-style-type: none"> • Metoda wysoce czuła i specyficzna 	<ul style="list-style-type: none"> • Trudności wynikające z szybkiej degradacji analizowanego RNA • wysokie ryzyko uzyskania wyników fałszywie negatywnych

3.4.3. VNTR-PCR

Jest jedną z metod wykrywających polimorfizm, który wynika z różnej liczby powtórzeń krótkich sekwencji DNA (ang. *variable number of tandem repeats*; PCR). Technika ta oparta jest na analizie uprzednio zamplifikowanych, polimorficznych fragmentów DNA. W badaniach mutacji punktowych również wykorzystuje się polimorfizm DNA. Metoda ta zapewnia ok. 100 razy większą czułość w porównaniu z RFLP z użyciem sond pojedynczego locus i znacznie mniejszą podatność na skutki degradacji DNA (Włodarska 2006, Downs-Holmes i Silverman 2011) .

3.5. Enzymy restrykcyjne i RFLP

Enzymy restrykcyjne charakteryzują się tym, że trawią DNA tylko w obszarach o specyficznej dla siebie sekwencji zasad. Odkrycie ich u bakterii zapoczątkowało ogromny rozwój inżynierii genetycznej. Znalazły one zastosowanie w identyfikacji mutacji i markerów polimorficznych, sporządzaniu map fizycznych cząsteczek DNA i wyodrębnianiu oraz klonowaniu fragmentów DNA (Bal i Mazurczak 2006).

Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism* – RFLP) wykorzystywany jest do określania stopnia

pokrewieństwa osobników w populacji, kryminalistyce, a także w diagnostyce nowotworów. Powstają one poprzez przypadkowe mutacje i rekombinacje w DNA. Staje się to przyczyną indywidualnych różnic dotyczących liczby i lokalizacji miejsc przecinanych przez poszczególne enzymy restrykcyjne, a co za tym idzie – długości powstających fragmentów restrykcyjnych. Mutacje mogą być nieszkodliwe, neutralne dla organizmu lub powodować znaczne zmiany w DNA prowadzące do wielu chorób, w tym nowotworów (Northcott et al. 2010, Kanaji et al. 2011).

Badanie typu RFLP jest jedną z najwcześniejszych pośrednich analiz genu. W tym przypadku wykonuje się testy rodzinne. Nie jest tu określany defekt genu, lecz jedynie jego dziedziczenie zawierające mutację i umożliwia rozróżnienie zmutowanych alleli. Najczęściej genomowy DNA badanej rodziny trawiony jest enzymami restrykcyjnymi, a następnie wykonywana jest analiza za pomocą transferu Southerna. W badaniach typu RFLP można zastosować również metodę PCR. Technika ta jest wykorzystywana w identyfikacji defektów molekularnych, a w określonych przypadkach umożliwia również różnicowanie sekwencji prawidłowych od zmienionych na skutek mutacji. Wadą tej metody jest to, że w trakcie analizy RFLP z wykorzystaniem hybrydyzacji genomowej z odpowiednimi sondami molekularnymi może pojawić się błąd, gdy preparat DNA chromosomowego nie zostanie przecięty we wszystkich miejscach rozpoznawanych przez enzym restrykcyjny (Northcott et al. 2010, Kanaji et al. 2011).

3.6. Badanie SNP

SNP - to niespecyficzny polimorfizm dotyczący zmian pojedynczego nukleotydu w określonym miejscu sekwencji DNA (ang. *single-nucleotide polymorphism* – SNP). Polimorfizmy SNP i RFLP są wykorzystywane jako fizyczne markery genetyczne. W ludzkim genomie najmniejszą rozdzielczością charakteryzuje się RFLP, ponieważ istnieje stosunkowo niewielka liczba miejsc rozpoznawanych w cząsteczce DNA człowieka przez enzymy restrykcyjne (Chung i Chanock 2011, Kluin i Schuurin 2011).

Największą nadzieję wiąże się z możliwościami analizy SNP. Powodem tego jest liczba miejsc zmienionych (czyli markerów) w całym genomie człowieka, którą szacuje się na około trzy miliony, co stanowi około 90% wszystkich różnic w sekwencji. SNP występuje średnio co 1000 pz. Najczęściej spotykany jest polimorfizm dwualleliczny, rzadziej trójalleliczny, natomiast prawdopodobieństwo wystąpienia czwartego allelu w danym *locus* jest bliskie zera. Gęstość i nasycenie SNP nie jest identyczne dla całego genomu (Huang et al. 2011).

Wiele analiz zmierzających do rozszyfrowania genetycznego podłoża chorób kompleksowych opiera się na porównaniu grup niespokrewnionych osób chorych i zdrowych w poszukiwaniu współwystępowania pomiędzy objawami badanej patologii a obecnością markerów genetycznych. Duża liczba markerów SNP i ich równomierne rozmieszczenie w genomie czyni je użytecznymi narzędziami w mapowaniu genów zaangażowanych w choroby kompleksowe. Jednak określenie przydatności wymaga znajomości ich częstości w etnicznie różnych populacjach (Gibbs i Singleton 2006).

W przypadku raku żołądka dochodzi do wzmocnionej ekspresji MMPs (ang. *matrix metalloproteinases*) oraz ich tkankowych inhibitorów TIMPs (ang. *tissue inhibitors MPs*). SNP w genach MMP i TIMP są związane z podatnością na tego typu

nowotworzenie. Po przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że zwłaszcza MMP₇-_{181A>G} i TIMP_{2303C>T} mogą być pomocne w diagnostyce raka żołądka (Kubben et al. 2006).

W krótkich fragmentach DNA można identyfikować SNP technikami przesiewowymi, takimi jak SSCP (ang. *single-strand conformation polymorphism*) czy DGGE (ang. *denaturing gradient gel electrophoresis*). Założeniem badania SNP jest jednak równoczesna analiza tych markerów w dużych częściach lub w całym genomie. Na taką skalę będzie to możliwe dopiero przy wykorzystaniu technologii mikromacierzy DNA (Gibbs i Singleton 2006, Varsale et al. 2010) (Tab.6.).

Tab. 6. Zalety i ograniczenia analizy polimorfizmu SNP (Bridge i Cushman-Vokoun 2011)

ZALETY	WADY
<ul style="list-style-type: none"> Analiza całościowa w jednym badaniu nie jest wymagana wcześniejsza identyfikacja zmiany nowotworowej 	<ul style="list-style-type: none"> Nie wszystkie rearanżacje DNA oraz mutacje punktowe są powiązane z występowaniem nowotworu niektóre identyfikowane zmiany nie mają istotnego znaczenia klinicznego
<ul style="list-style-type: none"> Wyższa rozdzielczość niż badań cytogenetycznych oraz metody FISH genotypowanie SNP można przeprowadzić także przy niedostępności materiału ze zdrowych komórek pacjenta 	<ul style="list-style-type: none"> Wymaga próbki DNA wysokiej jakości trudności przy analizie próbek przechowywanych w formalinie/parafinie niezbędne jest zastosowanie zaawansowanej oraz drogiej aparatury metoda pracochłonna
<ul style="list-style-type: none"> Metoda czuła, może dać pozytywne wyniki w przypadku kiedy konwencjonalne metody cytogenetyczne lub metoda FISH zawiodą 	<ul style="list-style-type: none"> Informacja o liczbie rearanżacji jest względna (jest średnią ze wszystkich komórek populacji znajdujących się w próbce)

3.7. Sondy i technika hybrydyzacji

Sondy to jednoniciowe fragmenty DNA lub RNA o ściśle określonej sekwencji nukleotydów, otrzymane na drodze klonowania lub syntezy chemicznej. Można je wyznakować radioaktywnie lub w inny sposób i są zdolne do wiązania się (hybrydyzacji) z komplementarną nicią kwasu nukleinowego. Sondy stosowane w identyfikacji określonego DNA znajdują komplementarne sekwencje zasad w niektórych tylko fragmentach restrykcyjnych DNA i dlatego – po hybrydyzacji – wykrywa się obecność sondy za pomocą autoradiografii lub swoistej reakcji enzymatycznej jedynie w obrębie niektórych prążków (fragmentów restrykcyjnych DNA) (Kluin i Schuurings 2011).

Hybrydyzacja wykorzystuje zjawisko tworzenia dwuniciowych kompleksów między komplementarnymi, jednoniciowymi odcinkami kwasów nukleinowych, gdzie jedną z nici jest DNA danego fragmentu restrykcyjnego na filtrze, a drugą – znakowana radioaktywnie, enzymatycznie lub luminescencyjnie sonda (ang. *probe*). Sondowanie umożliwia wykrycie tylko tych fragmentów DNA, które zawierają sekwencje nukleotydów komplementarną do sekwencji sondy. Podstawową cechą tej techniki jest specyficzność danej sondy. Sondowanie, łącznie z cięciem badanego DNA enzymami restrykcyjnymi, umożliwia identyfikację zmian sekwencji DNA. Obserwuje się je jako powstanie lub zanikanie wykrywanych przez sondę molekularną fragmentów DNA. Technika ta ma szczególne znaczenie w badaniu struktury DNA. Umożliwia lokalizację określonych sekwencji w cząsteczce DNA i ich wzajemnego porównania. Im dłuższe odcinki wykazujące komplementarność, tym większa jest stabilność powstałego dwuniciowego kompleksu (Varsale et al. 2010, Bridge i Cushman-Vokoun 2011).

3.7.1. Kariotyp FISH

Technika cytogenetyki molekularnej opartej na fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. *fluorescence in situ hybridization* – FISH) pozwoliła ominąć wiele ograniczeń analizy kariotypowej (Tab.7). FISH do jąder interfazowych i do chromosomów metafazowych zalicza się do cytogenetyki molekularnej, która jest na pograniczu cytogenetyki klasycznej i metod molekularnych. Istotą tej metody stanowi hybrydyzacja, wykrywanie i lokalizacja specyficznych, komplementarnych sekwencji nukleotydowych (dzięki użyciu sond DNA) na morfologicznie zachowanych strukturach biologicznych (chromosomy, jądra komórkowe) (Kluin i Schuurin 2011). Stosuje się wiele sond, najczęściej używane to:

- sondy centromeryczne (wykorzystywane są głównie do badania zmian liczbowych chromosomów)
- sondy „malujące” indywidualne chromosomy (ang. *whole chromosome painting probes*)
- sondy specyficzne dla określonych genów lub sekwencji nukleotydowych (używane do wykrywania aberracji strukturalnych chromosomów) (Varella-Garcia et al. 2009, Dedes et al. 2010, Gerami i Zembowicz 2011).

Przy pomocy FISH można analizować aberracje ilościowe (z sondami molekularnymi komplementarnymi do centromerycznych sekwencji satelitarnych) oraz obecność lub brak określonych genów, np. fuzyjnych (z sondami specyficznymi dla genów biorących udział w fuzyji) (Haus 2001, Horbinski et al. 2011). Zaletą metody interfazowej FISH jest to, że można zanalizować do kilku tysięcy komórek i stosować również do rutynowych hematologicznych rozmazów krwi oraz szpiku. „Natomiast FISH do chromosomów metafazowych, z zestawem 2 – 3 sond malujących, komplementarnych do całej długości chromosomu, pozwala na obiektywne zanalizowanie obecności poszukiwanych, ściśle określonych aberracji strukturalnych w kilkuset komórkach uzyskanych z hodowli” (Haus 2001).

Technikę FISH używa się w diagnostyce białaczek. Przykładem tego jest identyfikacja swoistej translokacji t(9;22)(q34;q11) (Tab. 2) w przewlekłej białaczce szpikowej (Bridge i Cushman-Vokoun 2011). Dzięki zastosowaniu różnych fluorochromów do znakowania sond umożliwiające jednoczesną detekcję przynajmniej dwóch sond na jednym preparacie powstały techniki: M-FISH (ang. *multipler FISH*) i

SKY (ang. *spectral karyotyping*). Umożliwiają one zastosowanie ponad 24 kolorów do jednoczesnej identyfikacji wszystkich chromosomów człowieka. Pozwalają na analizę całości zmian cytogenetycznych zachodzących w komórkach białaczkowych, porównywalną z cytogenetyką klasyczną, ale o wiele bardziej obiektywną i pozwalającą na ocenę o wiele większej (kilkaset) liczby komórek (Haus 2001).

W mięsach Ewinga w 85% przypadków obserwuje się translokację (Tab. 3), w wyniku której gen EWS łączy się z genem FLI1 należącym do rodziny czynników transkrypcyjnych ETS. Wyizolowano i sklonowano gen fuzyjny tej translokacji. Znakowana sonda komplementarna do tego genu jest stosowana w technice FISH w analizie chromosomów i jąder interfazowych komórek nowotworowych, a także w technice PCR w identyfikacji DNA genu FLI1-EWS izolowanego z tych komórek (Siedlecki i Limon 2006).

Zaletą FISH jest możliwość monitorowania chromosomów na płytkach metafazalnych i w nie dzielących się komórkach interfazalnych (izolowane jądra komórkowe, rozmazy szpiku, krwi). Metoda ta jest jedną z najbardziej użytecznych technik badawczych i diagnostycznych w onkologii dzięki czułości, szybkości i wysokiej specyficy (Włodarska 2006, Bridge i Cushman-Vokoun 2011, Kluin i Schuurin 2011).

Tab. 7. Zalety i wady metody FISH (Bridge i Cushman-Vokoun 2011)

ZALETY	WADY
<ul style="list-style-type: none"> Wykorzystanie preparatów z komórek metafazowych i interfazowych materiał może być świeży, mrożony, zawieszony w parafinie pozwała zlokalizować zmianę w obrębie danego typu komórek lub tkanki 	<ul style="list-style-type: none"> Podejście bardziej ukierunkowane wymaga znajomości ogólnej informacji o zmianie poszukiwanej nowotworowej
<ul style="list-style-type: none"> Metoda czuła i specyficzna może dać pozytywne wyniki w przypadku kiedy konwencjonalne metody cytogenetyczne zawiodą 	<ul style="list-style-type: none"> Użycie mikroskopii fluorescencyjnej (słabnięcie sygnału) częste trudności w interpretacji sygnału (autofluorescencja, fluorescencja tła)

3.7.2. Southern blotting

Procedura, obejmująca etap kapilarnego przenoszenia (wsiąkania) DNA z żelu na filtr, zwana jest hybrydyzacją Southerna (od nazwiska jej odkrywcy E. M. Southerna). Technika ta polega na fragmentaryzacji badanego DNA enzymami restrykcyjnymi, rozdziale elektroforetycznym uzyskanych fragmentów, wybarwieniu żelu w celu uwidocznienia prążków, przeniesieniu rozdzielonych fragmentów z żelu na filtr nylonowy lub nitrocelulozowy i hybrydyzacji unieruchomionego na filtrze DNA z wyznakowaną sondą komplementarną do badanych sekwencji nukleotydów (Włodarska 2006). Sonda wiąże się tylko z komplementarną do niej sekwencją, dlatego badanie

można wykonywać na całym komórkowym DNA lub RNA. Inkubacja filtru, na którym jest DNA z radioaktywną sondą, umożliwia zwiążanie się sondy z fragmentami zawierającymi sekwencję do niej komplementarne i uwidocznienie ich położenia. Powyższa metoda wykrywa rearanżacje genów zaangażowanych w translokacje chromosomowe w sytuacjach, kiedy miejsca złamań DNA skupiają się na stosunkowo niewielkiej przestrzeni (w obrębie jednego lub najwyżej kilku intronów) i dlatego mogą być pokryte przez jedną albo kilka sond DNA. Taka sytuacja dotyczy większości translokacji występujących w białaczkach limfatycznych i chłoniakach. Technika ta znajduje szerokie zastosowanie (Włodarska 2006, Varsale et al. 2010).

Wadami Southern blotting są: potrzeba izolacji stosunkowo dużej ilości DNA (10 – 15 µg na jeden eksperyment) ze świeżego lub zamrożonego materiału nowotworowego, długi czas trwania badania (2 – 4 tygodnie), stosowanie izotopów i granica wykrywalności na poziomie około 5%. Jednak zastosowanie technik chemiluminescencyjnych do znakowania i detekcji sond DNA znacznie skraca czas trwania badania. Natomiast zaletą tej metody jest wysoka wykrywalność rearanżacji genów (Włodarska 2006, Varsale et al. 2010).

3.8. Technika mikromacierzy

Stworzenie mikromacierzy (ang. *microarray cDNA*, *DNA chip technology*) oligonukletydów umożliwiło obserwacje zmian w wielu genach równocześnie. Dzięki niej można obserwować również poziom ekspresji, a co za tym idzie, także różnice w ekspresji między komórką prawidłową i nowotworową. Interpretacja tak ogromnej ilości danych, które jednorazowo otrzymuje się z mikromacierzy, opiera się na komputerowej analizie przeprowadzonej za pomocą specjalistycznych programów statystycznych (Siedlecki i Limon 2006, Thorgeirsson et al. 2006, Castorina et al. 2010).

Metoda mikromacierzy umożliwia badanie ekspresji tysięcy genów w czasie jednego badania lub sekwencjonowania DNA. Analiza nowotworów za pomocą *array-cDNA* pozwala na określenie profili transkrypcyjnych poszczególnych typów nowotworów. Dostarcza również obszernych danych na temat molekularnych mechanizmów onkogenezy. Dzięki tej technice udało się wyodrębnić nowe molekularne podtypy nowotworów oraz identyfikację nowych markerów diagnostycznych, rokowniczych, a także terapeutycznych. Mimo tego, iż obecnie profilowanie nowotworów przy użyciu *array-cDNA* prowadzi się głównie w celach badawczych, potencjalne znaczenie tej metody w wykrywaniu i monitorowaniu swoistych zmian genetycznych w nowotworach jest ogromne (Perez-Diez et al. 2007). Technikę tę można wykorzystać do wczesnego wykrycia markera mRNA komórek nabłonkowych raka okrężnicy. Wczesna diagnostyka tego nowotworu jest kluczem do zredukowania zgonów przez niego wywoływanych (Solmi et al. 2006, van Malenstein et al. 2011).

Microarray DNA jest metodą przyszłościową. „Dzięki jednoczesnemu zastosowaniu wielu sond molekularnych przytwierdzonych do stałego podłoża i hybrydyzacji z materiałem genetycznym chorego, będzie można zaobserwować całokształt zmian molekularnych w komórkach nowotworowych albo przynajmniej najistotniejsze z nich” (Haus 2001). Wprowadzenie do diagnostyki molekularnej techniki mikromacierzy może w najbliższej przyszłości uprościć zarówno sekwencjonowanie danego genu, jak i jego przeszukiwanie pod kątem obecności dowolnie dużej liczby znanych mutacji (Perez-Diez et al. 2007).

Najnowszą techniką wykorzystującą mikromacierze jest technika *Protein microarray* – mikromacierzy białkowych. Jest to całościowe podejście pozwalające przeprowadzić równoległą analizę wielu białek. Możliwe jest jednoczesne określenie ilości, podobieństwa, wzajemnego powinowactwa oraz funkcji białek. Inaczej niż w technice mikromacierzy DNA, gdzie wykorzystywane są zalety hybrydyzacji sekwencji komplementarnych, w *Protein microarray* istotnym jest równoczesne wykrycie interakcji cząsteczek poszczególnych białek z wybranymi przeciwciałami, peptydami oraz kwasami nukleinowymi (Lin 2010, Matarraz et al. 2011).

4. Podsumowanie

Rozwój rozmaitych technik genetyki molekularnej, umożliwiających dokładniejszą i szybszą analizę kwasów nukleinowych jest bardzo ważny we współczesnej medycynie. Coraz powszechniej w diagnostyce rutynowej stosowane są badania cytogenetyczne oraz analiza DNA. Szeroki zakres zastosowań analizy molekularnej obejmuje diagnostykę chorób uwarunkowanych genetycznie, w tym chorób dziedzicznych i nowotworowych, a także chorób infekcyjnych oraz sprawdzanie pokrewieństwa osób, zgodności genetycznej tkanek (Bal i Mazurczak 2006).

Sekwencjonowanie DNA i hybrydyzacja *in situ* są już rutynowymi technikami diagnostycznymi. Także w Polsce metody te są wprowadzane do codziennej praktyki badawczej w wielu laboratoriach. Zwiększający się zakres badań molekularnych w medycynie zawdzięczamy głównie zastosowanie do celów diagnostyki laboratoryjnej techniki PCR, która umożliwiła zwiększenie czułości i specyficzności badań. Technika ta uprościła również procedury badawcze, umożliwiając ich automatyzację i wytworzenie wielu rodzajów testów dostępnych w handlu (Bal i Mazurczak 2006).

Przedstawione metody diagnostyczne pozwalają w wielu przypadkach na wczesne rozpoznanie obecności komórek nowotworowych, określenie przebiegu choroby, a w licznych – wybranie najskuteczniejszego rodzaju terapii. Wykrywane mutacje i zmiany polimorficzne w specyficznych genach określają podatność na zachorowania na niektóre typy nowotworów np. raka sutka, raka gruczołu krokowego, czerniaka (Bal i Mazurczak 2006). Obecnie diagnostyka molekularna koncentruje się na określeniu predyspozycji genetycznych. Dzięki temu w przyszłości będzie można bardzo szybko identyfikować liczne choroby uwarunkowane genetycznie np. chorobę Alzheimera, choroby serca, wiele nowotworów. Uzyskane wczesnie informacje są bardzo cenne, ponieważ umożliwią świadomą eliminację tych czynników ryzyka, które przynajmniej częściowo są odpowiedzialne za ujawnienie się określonych fenotypów. Dzięki temu zmniejsza się szansa na zachorowanie. Poznanie pełnej sekwencji nukleotydów genomu jądrowego człowieka przyspieszyło wykrywanie takich zmian w DNA, które mogą być pomocne w ocenie wczesnego ryzyka wystąpienia określonej choroby uwarunkowanej genetycznie. Dzięki temu możliwa jest kontrola członków rodzin wysokiego ryzyka genetycznego (Bal i Mazurczak 2006).

Wartość diagnostyki molekularnej nowotworów wydaje się być ogromna, chociaż w dzisiejszych czasach jeszcze nie zawsze doceniana. Obecnie stosowana w większości przypadków diagnostyka nowotworów opiera się głównie na metodach obrazowych i pozwala jedynie stwierdzić ich obecności lub brak oraz określić lokalizację. Natomiast, diagnostyka genetyczna stwarza możliwości przewidywania ryzyka zachorowania. Niestety, wiąże się z tym również pewne zastrzeżenia – w jaki

sposób tak ogromną wiedzę wykorzysta człowiek? Wyniki tego typu badań powodują powstanie wielu problemów socjalnych, psychologicznych i prawnych. Z jednej strony takie badania przyczyniają się do zastosowania odpowiedniego postępowania pozwalającego na ograniczenie ryzyka zachorowania na nowotwory, czy niektóre choroby genetyczne, a z drugiej – mogą być przyczyną dyskryminacji wielu osób. Mimo licznych wątpliwości i problemów (w tym finansowych) molekularna diagnostyka daje ogromną szansę na szybkie wykrywanie chorób nowotworowych i skuteczniejsze ich leczenie.

Bibliografia

- Bai L., Zhu W. 2006. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *Journal of Cancer Molecules*, 2(4): 141-153.
- Bal J., Mazurczak T. 2006. Zakres zastosowań diagnostyki molekularnej w medycynie. Uwarunkowanie genetyczne chorób dziedzicznych i ich rozpoznawanie. In: Bal J. (ed.), *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*: 15-18, 137-141. PWN, Warszawa.
- Balgosklonny M. 2002. p53: an ubiquitous target of anticancer drugs. *International Journal of Cancer*, 98: 161-166.
- Beroukhim R., Lin M., Park Y., Hao K., Zhao X., Garraway L.A., Fox E.A., Hochberg E.P., Mellinghoff I.K., Hofer M.D., Descazeaud A., Rubin M.A., Meyerson M., Wong W.H., Sellers W.R., Li C. 2006. Inferring loss-of-heterozygosity from unpaired tumors using high-density oligonucleotide SNP arrays. *PLoS Computational Biology*, 2(5): 323-332.
- Bębenek M., Błaszczak M., Antczak A. 2006. Znaczenie rodowodu onkologicznego w identyfikacji rodzinnej agregacji nowotworów złośliwych. *Onkologia Polska*, 9(2): 41-46.
- Będkowska G.E., Ławicki S., Szmitkowski M. 2007. Markery nowotworowe przydatne w diagnostyce i monitorowaniu raka endometrium i szyjki macicy. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 61(1): 122-128
- Bocian E., Limon J. 2006. Metody badań cytogenetycznych. In: Bal J. (ed.), *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*: 162-188. PWN, Warszawa.
- Bridge J.A., Cushman-Vokoun A.M. 2011. Molecular Diagnostics of Soft Tissue Tumors. *Archives of pathology and laboratory medicine*, 135(1): 588-601.
- Castorina S., Barresi V., Luca T., Privitera G., Musso N., Capizzi C., Condorelli D.F. 2010. Recent advances in molecular diagnostics of colorectal cancer by genomic arrays: proposal for a procedural shift in biological sampling and pathological report. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 115(1-2): 39-45.
- Chetverina E.V., Chetverin A.B. 2010. Nanocolonies and diagnostics of oncological diseases associated with chromosomal translocations. *Biochemistry (Mosc)*, 75(13): 1667-91.

- Chung C.C., Chanock S.J. 2011. Current status of genome-wide association studies in cancer. *Human Genetics*, 130(1): 59-78.
- Dadras S.S. 2011. Molecular diagnostics in melanoma: current status and perspectives. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 135(7): 860-869.
- Dedes K.J., Lopez-Garcia M.A., Geyer F.C., Lambros M.B., Savage K., Vatcheva R., Wilkerson P., Wetterskog D., Lacroix-Triki M., Natrajan R., Reis-Filho J.S. 2010. Cortactin gene amplification and expression in breast cancer: a chromogenic in situ hybridisation and immunohistochemical study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 124(3): 653-66.
- Dick F. 2007. Structure-function analysis of the retinoblastoma tumor suppressor protein – is the whole a sum of its parts? *Cell Devision*, 2(26): 1-15.
- Downs-Holmes C., Silverman P. 2011. Breast cancer: Overview & updates. *The Nurse Practitioner*, 36(12): 20-6.
- Eddy J.A., Sung J., Geman D., Price N.D. 2010. Relative expression analysis for molecular cancer diagnosis and prognosis. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 9(2): 149-59.
- Efeyan A., Serrano M. 2007. p53: Guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*, 6(9): 1006-1010.
- Fearon E., Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5): 759 -767.
- Gerami P., Zembowicz A. 2011. Update on fluorescence in situ hybridization in melanoma: state of the art. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 135(7): 830-837.
- Gibbs J.R., Singleton A. 2006. Application of genome-wide single nucleotide polymorphism typing: simple association and beyond. *PLoS Genetics*, 2(10):e150.
- Gooderham N., Carmichel P., Schwartz J., Newton R. 2007. *The Cancer Handbook*: 273-278, 307-311, 335- 336.
- Hahn W.C., Weinberg R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1): 57-70.
- Hahn W.C., Weinberg R. A. 2002. Rules for making human tumor cells. *The New England Journal of Medicine*, 347(20): 1593-1603.
- Haus O. 2001. Zmiany cytogenetyczne i molekularne w ostrych białaczkach szpikowych. In: Kulpa J. (ed.) *Diagnostyka laboratoryjna*, 37(2): 234-244. Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej, Kraków.
- Hegi M.E., Diserens A.C., Gorlia T., Hamou M.F., de Tribolet N., Weller M., Kros J.M., Hainfellner J.A., Mason W., Mariani L., Bromberg J.E., Hau P., Mirimanoff R.O., Cairncross J.G., Janzer R.C., Stupp R. 2005. MGMT gene silencing and benefit from

- temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10): 997-1003.
- Hewish M., Lord Ch., Martin S., Cunningham D., Ashworth A. 2010. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(4): 197-208.
- Hilkens J. 2006. Recent translational research: Oncogene discovery by insertional mutagenesis gets a new boost. *Breast Cancer Research*, 8(1): 102.
- Horbinski C., Miller C.R., Perry A. 2011. Gone FISHing: clinical lessons learned in brain tumor molecular diagnostics over the last decade. *Brain Pathology*, 21(1): 57-73.
- Huang Z.Q., Wang J.L., Pan G.G., Wei Y.S. 2011. Association of single nucleotide polymorphisms in IL-12 and IL-27 genes with colorectal cancer risk. *Clinical Biochemistry*, doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.10.004.
- Kanaji N., Bandoh S., Ishii T., Kushida Y., Haba R., Kohno K., Dobashi H., Ohnishi H., Matsunaga T. 2011. Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in a Few Cancer Cells from Transbronchial Cytologic Specimens by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 15(6):353-9.
- Kinzler K., Vogelstein B. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2): 159- 170.
- Kluin P., Schuurin E. 2011. Molecular cytogenetics of lymphoma: where do we stand in 2010? *Histopathology*, 58(1): 128-44.
- Knudson A. G. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(4): 820-823.
- Knudson A.G. 2001. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews*, 1(2): 157- 170.
- Kochańska-Dziurawicz A., Jankowski T., Bijak A. 2003. Przydatność oznaczeń surowicznych stężeń markerów nowotworowych CA 15.3, CEA i TPA w diagnostyce różnicowej raka i łagodnej dysplazji piersi. In: Kulpa J. (ed.), *Diagnostyka laboratoryjna*, 39(4): 455-463. Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej, Kraków.
- Kopański Z. 1994. Wartość kliniczna oznaczeń 5' nukleotyduzy u kobiet z rakiem sutka. In: Kulpa J. (ed.), *Diagnostyka laboratoryjna*, 30(3): 253-258. Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej, Kraków.
- Kopański Z. 1995. Diagnostyka przydatności oznaczeń CEA, CA 19-9, AFP i 5'NU w nowotworach tarczycy. In: Kulpa J. (ed.), *Diagnostyka laboratoryjna*, 31(3): 419-423. Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej, Kraków.
- Kopczyńska E., Tyrakowski T. 2006. Kliniczna użyteczność surowiczej zewnątrzkomórkowej domeny receptora HER2 (ECDHER2) w raku piersi. In:

- Kulpa J. (ed.), Diagnostyka laboratoryjna, 42(4): 495-501. Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej, Kraków.
- Kopnin B. 2000. Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, 65(1): 5-33.
- Krokan H., Nilsen H., Skorpen F., Otterlei M., Slupphaug G. 2000. Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Letter*, 476(1): 73-77.
- Kubben F.J., Sier C.F., Meijer M.J., van den Berg M., van der Reijden J.J., Griffioen G., van de Velde C.J., Lamers C.B., Verspaget H.W. 2006. Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer. *British Journal of Cancer*, 95(6): 744-751
- Li G. 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18(1): 85-98.
- Lin J.C. 2010. Protein microarrays for cancer diagnostics and therapy. *Medical Principles and Practice*, 19(4): 247-54.
- Ławicki S. 2005. Cytokiny hematopoetyczne (HGFs) jako markery raka piersi. In: Kulpa J. (ed.), Diagnostyka laboratoryjna, 41(2): 231-233. Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej, Kraków.
- Łącka K., Małkowska J., Włoch J., Stawny B., Jarząb B. 2000. Przydatność badań ekspresji mRNA tyreoglobuliny w diagnostyce raka tarczycy. In: Kulpa J. (ed.), Diagnostyka laboratoryjna, 36(1): 67-72. Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej, Kraków.
- Van Malenstein H., van Pelt J., Verslype C. 2011. Molecular classification of hepatocellular carcinoma anno 2011. *European Journal of Cancer*, 47(12): 1789-97.
- Matarráz S., González-González M., Jara M., Orfao A., Fuentes M. 2011. New technologies in cancer. Protein microarrays for biomarker discovery. *Clinical and Translational Oncology*, 13(3): 156-61.
- Niezabitowski A., Kulpa J., Wójcik E., Stasik Z., Ryś J., Kruczak A., Markiewicz D., Kołodziejcki L. 2000. Ekspresja komórkowa a stężenie w osoczu wybranych markerów nowotworowych u chorych operowanych z powodu niedrobokomórkowego raka płuca. In: Kulpa J. (ed.), Diagnostyka laboratoryjna, 36(1): 73-84. Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej, Kraków.
- Northcott P.A., Rutka J.T., Taylor M.D. 2010. Genomics of medulloblastoma: from Giemsa-banding to next-generation sequencing in 20 years. *Neurosurgical Focus*, 28(1): E6.
- Novakofski J. 1991. Role of proto-oncogenes in normal growth and development. *Journal of Animal Science*, 69(1): 56-73.

- Nowsheen S., Aziz K., Panayiotidis M.I., Georgakilas A.G. 2011. Molecular markers for cancer prognosis and treatment: have we struck gold? *Cancer Letters*, doi:10.1016/j.canlet.2011.11.022.
- Oesterreich S., Fuqua S. 1999. Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 6(1): 405-419.
- Palacios J., Robles-Frías M.J., Castilla M.A., López-García M.A., Benítez J. 2008. The molecular pathology of hereditary breast cancer. *Pathobiology*, 75(2): 85-94.
- Perez-Diez A., Morgun A., Shulzhenko N. 2007. Microarrays for cancer diagnosis and classification. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 593: 74-85.
- Pidgeon G.P., Lysaght J., Krishnamoorthy S., Reynolds J.V., O'Byrne K., Nie D., Honn K.V. 2007. Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Reviews*, 26(3-4): 503-24.
- Pitot H.C., Dragan Y.P. 1991. Fact and theories concerning the mechanism of carcinogenesis. *FASEB Journal*, 5(1): 2280-2286.
- Ralhan R., Nath N., Agarwal S., Mathur M., Wasylyk B., Shukla N. 1998. Circulating p53 antibodies as early markers of oral cancer. *Clinical Cancer Research*, 4(1): 2147-2152.
- Reuter C.W.M., Morgan M.A., Bergmann L. 2000. Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood*, 96(5): 1655-1669.
- Siedlecki J.A., Limon J. 2006. Choroby nowotworowe. In: Bal J. (ed.) *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*: 336-409. PWN, Warszawa.
- Słomski R., Kwiatkowska J., Chlebowska H. 1996. Diagnostyka molekularna. In: Braciszewski J., Łastowski K., Twardowski T. (ed.) *Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie*, T2: 315-334. Wyd. Sorus, Poznań.
- Solmi R., Ugolini G., Rosati G., Zanotti S., Lauriola M., Montroni I., del Governatore M., Caira A., Taffurelli M., Santini D., Coppola D., Guidotti L., Carinci P., Strippoli P. 2006. Microarray-based identification and RT-PCR test screening for epithelial-specific mRNAs in peripheral blood of patients with colon cancer. *BMC Cancer*, 6(1): 250.
- Soumaoro L.T., Iida S., Uetake H., Ishiguro M., Takagi Y., Higuchi T., Yasuno M., Enomoto M., Sugihara K. 2006. Expression of 5-Lipoxygenase in human colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 12(39): 6355-60.
- Srebrniak M., Gnyś A., Tomaszewska A., Wiczkowski A. 2006. Laboratoryjna diagnostyka cytogenetyczna wrodzonej niestabilności

- chromosomów. In: Kulpa J. (ed.), Diagnostyka laboratoryjna, 42(3): 319-334. Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej, Kraków.
- Ståhlberg A., Bengtsson M. 2010. Single-cell gene expression profiling using reverse transcription quantitative real-time PCR. *Methods*, 50(4): 282-8.
- Steffen J. 1994. Interleukiny i ich receptory w nowotworach u ludzi: synteza, uwalnianie, występowanie w surowicy krwi. In: Kulpa J. (ed.), Diagnostyka laboratoryjna, 30(3): 221-240. Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej, Kraków.
- Sugimura T., Inoue R., Ohgaki H., Ushijima T., Canzian F., Nagao M. 1995. Genetic polymorphism and susceptibility to cancer development. *Pharmacogenetics*, 5(S): 161-165.
- Śliwowska I., Kopczyński Z., Grodecka-Gazdecka S. 2005. Ocena przydatności testów do oznaczania markerów nowotworowych CA 15-3, TPS i TPA w diagnostyce laboratoryjnej raka piersi. In: Kulpa J. (ed.), Diagnostyka laboratoryjna, 41(4): 357-366. Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej, Kraków.
- Thorgeirsson S.S., Lee J.S., Grisham J.W. 2006. Molecular prognostication of liver cancer: end of the beginning. *Journal of Hepatology*, 44(4): 798-805.
- Urbain J. 1999. Oncogenes, cancer and imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, 40(3): 498-504.
- Valdiglesias V., Pásaro E., Méndez J., Laffon B. 2011. Assays to determine DNA repair ability. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 74(15-16): 1094-109.
- Varella-Garcia M., Diebold J., Eberhard D.A., Geenen K., Hirschmann A., Kockx M., Nagelmeier I., Rüschoff J., Schmitt M., Arbogast S., Cappuzzo F. 2009. EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 62(11): 970-7.
- Varsale A.R., Wadnerkar A.S., Mandage R.H. 2010. Cancer investigation: A genome perspective. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 5(5): 79-86.
- Verdine G., Bruner S. 1997. How do DNA repair proteins locate damaged bases in the genome? *Chemistry and Biology*, 4(5): 329-334.
- Weitzel J.N., Blazer K.R., Macdonald D.J., Culver J.O., Offit K. 2011. Genetics, genomics, and cancer risk assessment: State of the Art and Future Directions in the Era of Personalized Medicine. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 61(1): 327-359.
- Włodarska I. 2006. Znaczenie badań genetycznych i molekularnych w onkologii. In: Krzakowski M. (ed.), *Onkologia kliniczna*, T I: 70-100. Wyd. Med. Borgis, Warszawa.

- Wood R. 1997. Nucleotide excision repair in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(1): 23465-23468.
- Wójcik E. 1994. Mucyno-podobny antygen nowotworowy (MCA). In: Kulpa J. (ed.), *Diagnostyka laboratoryjna*, 30(3): 295-299. Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej, Kraków.
- Wójcik E., Kruczak A., Stasik Z., Mituś J., Karolewski K., Ryś J., Kulpa J. 2006. Ocena stężenia w surowicy CEA, CA 15-3 i sHER2 u chorych na raka piersi w zależności od stanu receptorów steroidowych. In: Kulpa J. (ed.), *Diagnostyka laboratoryjna*, 42(4): 415-426. Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej, Kraków.