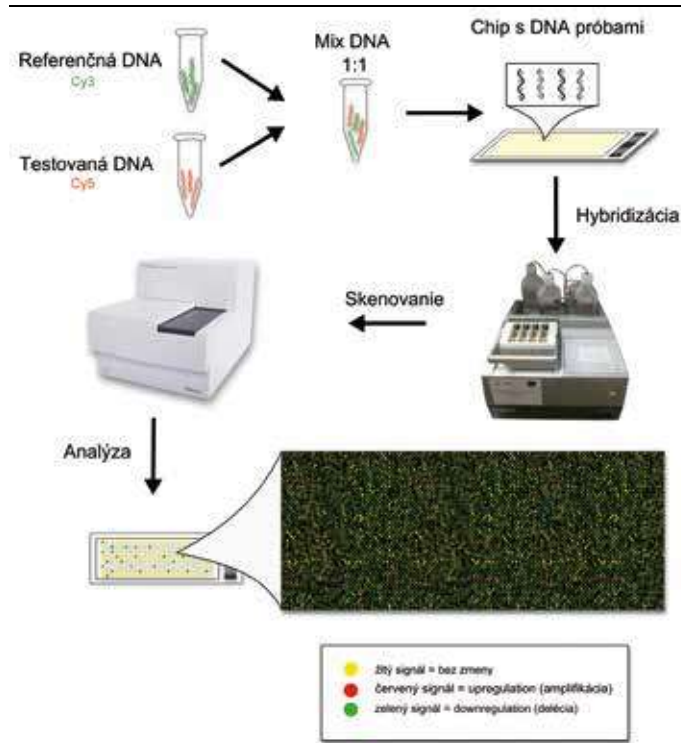
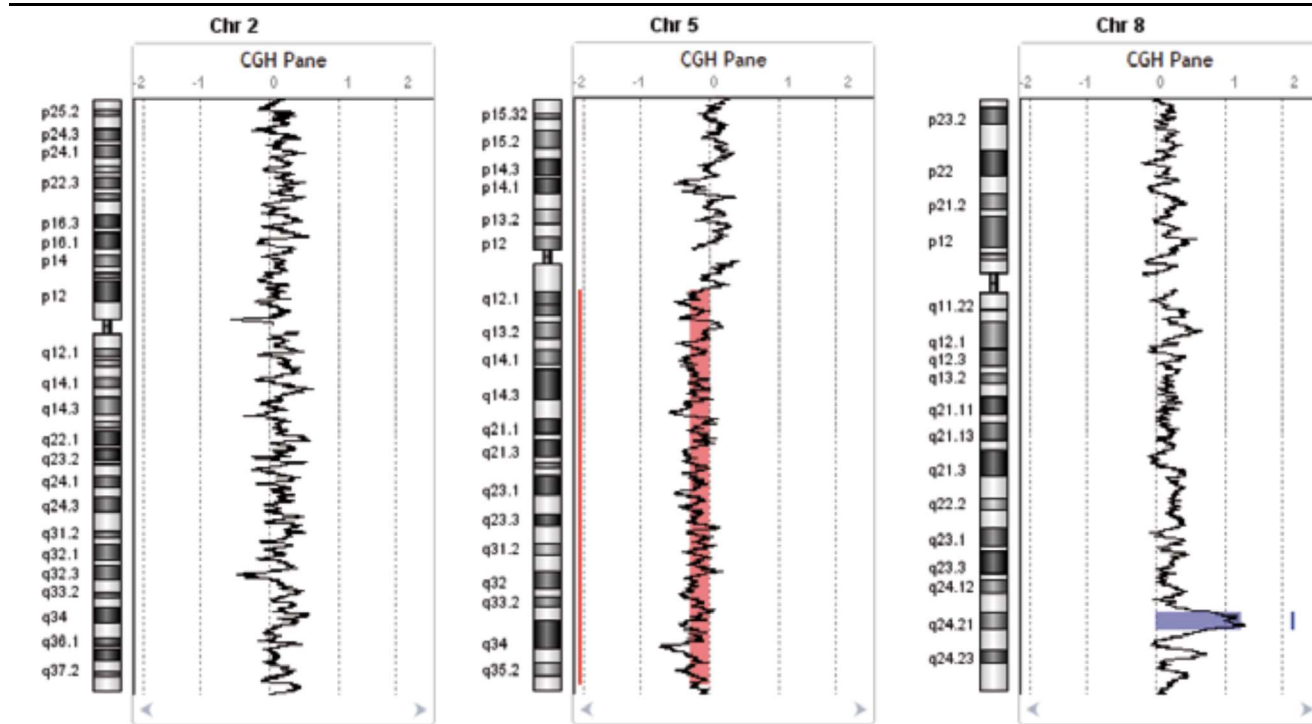


Obrázok 1. Schematické znázornenie metodiky array CGH.

DNA. Hybridizáciu testovanej a referenčnej DNA sondy hodnotili podľa intenzity výsledného farebného signálu. Oblasť chromozómov, ktoré stratili, alebo, naopak, získali genetický materiál, mali v porovnaní s normálnou referenčnou vzorkou zmenený pomer intenzít oboch signálov, čo sa prejavilo vo výslednej farbe signálu (4).

Obrázok 2. Obrázok ilustruje genetické aberácie u testovaného pacienta. Červeným pruhom označená oblasť chromozómu č. 5 zodpovedá strate genetického materiálu v tejto oblasti chromozómu. Chromozóm č. 8 vykazuje získanie genetického materiálu, ktorý je označený modrým pruhom. Chromozóm č. 2 nevykazuje žiadnu abnormalitu genetického materiálu. Získané výsledky boli potvrdené sekvenovaním.

V roku 1997 autorský kolektív z Heidelbergu publikoval upravený variant CGH. Namiesto hybridizácie DNA sond s chromozómami použili na matriku naviazané krátke úseky DNA a tie hybridizovali s testovanou a referenčnou DNA. Metodiku tak zjednodušili a značne zvýšili jej rozlišovaciu schopnosť (5). Dnes technológia array CGH (alebo matrix CGH) dosahuje rozlišovaciu schopnosť na úrovni 100 kb (6). Publikovaná metodika položila základ automatizácii procesu CGH a otvorila tým dvere do rutinných diagnostických laboratórií.

Princíp aCGH

Oba typy metodiky CGH, konvenčná na chromozómoch, aj array CGH na báze DNA, sú založené na rovnakom princípe (obrázok 1). Testovaná a referenčná DNA je špecificky fluorescenčne značená. Testovaná DNA sa obvyčajne značí červeným farbivom (Cyanín-5) a referenčná DNA zeleným fluorofórom (Cyanín-3). Obe DNA sú spoločne a v rovnakom pomere nanosené na sklíčko (DNA microarray), ktoré obsahuje presne špecifikované jednovláknové úseky DNA, tzv. sondy, alebo klony. Ich dĺžka sa u jednotlivých výrobcov líši (napr. Agilent ponúka 60 básových sondy).

Hybridizácia prebieha pri presne regulovaných podmienkach niekoľko hodín (24 – 56 hodín), najčastejšie v poloautomatických hybridizačných peciach. Po hybridizácii je sklíčko prenesené do počítačom riadeného skenera, kde je obraz nasnímaný a softvérovo vyhodnotený. Pre každý gén je vypočítaný normalizovaný pomer intenzít červeného a zeleného signálu, ktorý indikuje zmenu v množstve genetického materiálu na jednotlivých úsekoch DNA (tzv. CNV – Copy Number Variation). Ak je normalizovaný pomer < 1 , hovoríme o strate genetického materiálu (t. j. deľcia), ak je, naopak, pomer > 1 , ide o získanie genetického materiálu (t. j. amplifikácia) (obrázok 2).

Silné a slabé stránky aCGH

Každá metodika má svoje výhody aj nevýhody. Slabá stránka metodiky je neschopnosť odhaliť balansované alterácie, ako sú recipročné translokácie alebo inverzie. Tieto anomálie nemenia počet kópií v genóme, a tak ostávajú pre CGH nedetegovateľné.

Nedetegovateľné ostávajú aj mutácie, ktoré sú mimo detekčný rozsah metodiky. Zavedením aCGH sa rozlíšenie metodiky zvýšilo na teoretickú hodnotu 100 kb. Rozlíšenie aCGH je primárne určené dvoma faktormi: dĺžkou cieľovej DNA a hustotou pokrytia genómu sondami. Z toho vyplýva, že čím sú cieľové sondy DNA na matrixe kratšie a čím hustejšie je nimi pokrytá daná oblasť, tým je rozlíšenie vyššie (7).

Medzi najväčšie prednosti aCGH patrí schopnosť simultánnej detekcie aneuploidii, delécií, inzercii a duplikácií v rámci celého genómu. Vhodným navrhnutím prekrývajúcich sa DNA sond môže byť určitá oblasť v rámci genómu pokrytá na 100 %. To môže byť výhodné pri skríningu špecifických oblastí chromozómov, ktoré sú priamo dotknuté pri konkrétnych druhoch ochorenia. Technika aCGH tak spája výhody lokusovo špecifickej FISH analýzy s možnosťou skríningu celého genómu.

aCGH v diagnostike

Metodika aCGH našla svoje uplatnenie v prenatalnej a postnatalnej diagnostike, v preimplantačnom skríningu, ale aj v diagnostike nádorových ochorení.

Prenatálna a postnatálna diagnostika sa zameriava na vývinové a mentálne poruchy zapríčinené aberáciami genetického materiálu. Samotná analýza sa vykonáva na vzorkách plodovej vody, choriových klvkov, ale aj periférnej krvi embrya a neskôr novorodenca. Kan et al. (8) uvádzajú, že pomocou aCGH bolo identifikovaných 20 % (44/220) klinicky významných CNV pri abnormalných, ultrazvukom detegovaných nálezoch. Z tohto množstva 21 patrilo aneuploidiam a 23 iným chromozómovým imbalanciám. Zaujímavosťou je, že 3,2 % vzoriek (7/220) s CNV bolo detegovaných iba prostredníctvom aCGH, a nie použitím konvenčných cytogenetických techník ako G-banding a kvantitatívna fluorescenčná PCR. Z toho dôvodu navrhujú nahradiť karyotyping za metodiku aCGH a využiť ju ako voľbu prvostupňového skríningu. Konvenčná cytogenetika by sa mala použiť následne pri vizualizácii klinicky významných CNV (8). Napriek tomu, že pomocou metodiky aCGH nie je možné zistiť všetky druhy poškodenia genetického materiálu, je schopná odhaliť približne dvakrát viac chromozómových abnormalít ako G-prúžkovanie (7).

Citlivosť metodiky aCGH dokumentuje jej využitie v preimplantačnom skríningu, kde je k dispozícii len minimálne množstvo materiálu. Pomocou aCGH je možné odhaliť chromozómové imbalancie v rozsahu cca 1 Mb z jediného lymfoblastu, fibroblastu alebo blastoméry (9).

Hoci aCGH hrá nezastupiteľnú úlohu najmä pri skríningu aberácií spôsobujúcich vývinové a mentálne poruchy, svoje miesto si našla aj pri skríningu nádorových ochorení. V tejto oblasti však skríning nie je vždy jednoduchý. Heterogenita buniek spôsobená ich klonálnou povahou, nedostatok materiálu (biopsia), jeho znížená kvalita (FFPE bločky), spolu so samotným typom aberácie (nízky počet kópií, aberácie na krátkom úseku), môžu metodike aCGH spôsobiť problémy. Napriek tomu sa aCGH s úspechom používa pri detekcii genomických abnormalít v hematolo-

gických ochoreniach, ako sú CLL (chronická lymfocytová leukémia), MDS (myelodysplastický syndróm), MM (mnohobodný myelóm), ALL (akútna lymfoblastová leukémia), AML (akútna myeloidná leukémia) a CMML (chronická myelomonocytová leukémia) (10).

Technológia aCGH sa osvedčila pri charakterizovaní genetických abnormalít zodpovedných napríklad za zhubný nádor močového mechúra (11), kolorektálnych nádorov (12), nádorov pľúc (13), pri identifikácii nových génov zodpovedných za vznik nádorov prostaty (15) a mnohých ďalších.

Metodika aCGH hrá svoju úlohu aj pri štúdiu najčastejšie sa vyskytujúcich nádorových ochorení žien. Ako je známe, nádory prsníka sú heterogénnou skupinou, v ktorej etiológii nachádzame mutácie génov ako *BRCA1*, *BRCA2*, ale aj zmeny v počte génov *LSM1*, *BAG4* a *C8ORF4* pozorované pomocou aCGH (15). Francúzska štúdia v 18 medicínskych centrách sledovala 423 pacientov s metastatickými nádormi, pričom používali Sangerovo sekvenovanie a aCGH. Genomické alterácie odhalili u 195 (46 %) pacientov. Najčastejšie išlo o aberácie génov *PIK3CA*, *CCND1* a *FGFR1*, ale aj zriedkavé mutácie v géne *AKT1* a zriedkavé amplifikácie v génoch *EGFR*, *MDM2*, *FGFR2*, *AKT2*, *IGF1R* a *MET*. Vybraní pacienti (55 zo 423) boli podrobení personalizovanej liečbe s rôznym výsledkom (16).

Nádory vaječníkov sú taktiež spojené s mutačným vyradením tumor supresorových génov *BRCA1/2*, ale vyskytujú sa aj ako súčasť Li-Fraumeniho syndrómu, v ktorom dôležitú úlohu hrá gén *TP53*. Špecifické genetické alterácie boli pomocou aCGH odhalené aj v prípade ovariálnych nádorov, ktoré vykazovali rezistenciu na chemoterapiu (17). Metodikou aCGH bol realizovaný skríning vybraných onkogénov z endometriálnych nádorov, pričom bola pozorovaná amplifikácia onkogénov *AR*, *PIK3CA*, *MET*, *HRAS*, *NRAS*, *D17S1670*, *FGFR1*, *CTSB*, *RPS6KB1*, *LAMC2*, *MYC*, *PDGFRA*, *FGF4/FGF3*, *PAK1* a *FGR* (18). Metodika aCGH zachytila CNV v 73 % (19/26) vzoriek aj v prípade cervikálnych nádorov. Amplifikácia bola zistená najmä v oblastiach 3q (50,0 %), 1q (42,4 %), 19q (23,1 %), kým strata v oblastiach 11q (30,8 %), 4q (23,1 %) a 13q (19,2 %). Zvýšený výskyt amplifikácie 3q bol pozorovaný v pozitívnych vzorkách na HPV 16 a HPV 18, čo len potvrdzuje závažnosť infekcie HPV pri tomto nádorovom ochorení (19).

Záver

Onkologické ochorenia aj napriek dokázateľným úspechom v diagnostike a liečbe predstavujú vážny problém nielen z medicínskeho hľadiska. So zvyšujúcim sa priemerným vekom populácie môžeme predpokladať, že incidencia týchto ochorení bude aj naďalej stúpať. Z toho dôvodu je žiaduce, aby klinické laboratória mali k dispozícii moderné metodiky, ktoré umožňujú odhaliť ochorenie na základnej, molekulovej úrovni. Komparatívna genómová hybridizácia tieto podmienky spĺňa.

Hoci použitie aCGH v skríningu onkologických ochorení je v niektorých prípadoch komplikované, výsledky získané touto metodikou majú vysokú výpovednú hodnotu a pravdepodobne budú postupne nahrádzať metodiky klasickej cytogenetiky. Odporúčania medzinárodného konzorcia pre štandardizáciu cytogenomických arraí – ISCA (International Standard Cytogenomic Array) použiť CGH ako prvú skríningovú metódu a G-banding používať iba v prípadoch, ako sú Downov syndróm a v prípadoch rodinného výskytu chromozómových aberácií (20), je len krokom k tomuto prechodu. Výsledkom zavedenia nových technológií do

diagnostiky a skríningu nádorových ochorení by mal byť genetický profil pacienta, ktorý v konečnom dôsledku vyústi do personalizovanej terapie.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie technickej infraštruktúry v oblasti výskumu diagnostických postupov a metód v rámci včasnej diagnostiky najčastejších onkologických ochorení žien, ITMS 26210120026, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra:

1. Safaei D, Plesko I. Incidencia zhubných nádorov v Slovenskej republike 2008. Národný onkologický register SR. NCZI; 2014.
2. Theisen A. Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). *Nature Education* 2008;1:45.
3. Han R, Li Z, Fan Y, Jiang Y. Recent advances in super-resolution fluorescence imaging and its applications in biology. *J Genet Genomics*. 2013;40(12):583-595.
4. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258(5083):818-821.
5. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997;20(4):399-407.
6. Friedman JM, Baross A, Delaney AD, et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2006;79(3):500-513.
7. Bejjani BA, Shaffer LG. Application of Array-Based Comparative Genomic Hybridization to Clinical Diagnostics. *J Mol Diagn*. 2006;8(5):528-533.
8. Kan AS, Lau ET, Tang WF et al. Whole-genome array CGH evaluation for replacing prenatal karyotyping in Hong Kong. *PLoS One*. 2014;9(2):e87988. doi: 10.1371/journal.pone.0087988. eCollection 2014.
9. Greco E, Bono S, Ruberti A, et al. Comparative genomic hybridization selection of blastocysts for repeated implantation failure treatment: a pilot study. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:457913. doi: 10.1155/2014/457913. Epub 2014 Mar 23.
10. Simons A, Sikkema-Raddatz B, de Leeuw N, et al. Genome-wide arrays in routine diagnostics of hematological malignancies. *Hum Mutat*. 2012;33(6):941-948.
11. Conconi D, Panzeri E, Redaelli S, et al. Chromosomal imbalances in human bladder urothelial carcinoma: similarities and differences between biopsy samples and cancer stem-like cells. *BMC Cancer*. 2014;14:646. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/646>
12. Brim H, Lee E, Abu-Asab MS, et al. Genomic aberrations in an African American colorectal cancer cohort reveals a MSI-specific profile and chromosome X amplification in male patients. *PLoS One*. 2012;7(8):e40392. doi:10.1371/journal.pone.0040392
13. Lo FY, Chang JW, Chang IS, et al. The database of chromosome imbalance regions and genes resided in lung cancer from Asian and Caucasian identified by array-comparative genomic hybridization. *BMCCancer*. 2012;12:235. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/235>
14. Kamradt J, Jung V, Wahrheit K, et al. Detection of novel amplicons in prostate cancer by comprehensive genomic profiling of prostate cancer cell lines using oligonucleotide-based arrayCGH. *PLoS One*. 2007;2(8):e769. doi: 10.1371/journal.pone.0000769
15. Yang ZQ, Streicher KL, Ray ME, et al. Multiple interacting oncogenes on the 8p11-p12 amplicon in human breast cancer. *Cancer Res*. 2006;66(24):11632-11643.
16. André F, Bachelot T, Commo F, et al. Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol*. 2014;15(3):267-274.
17. Osterberg L, Levan K, Parheen K, et al. Specific copy number alterations associated with docetaxel/carboplatin response in ovarian carcinomas. *Anticancer Res*. 2010;30(11):4451-4458.
18. O'Toole SA, Dunn E, Sheppard BL, et al. Genome-wide analysis of deoxyribonucleic acid in endometrial cancer using comparative genomic hybridization microarrays. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16(2):834-842.
19. Kuglik P, Smetana J, Vallova V, et al. Genome-wide screening of DNA copy number alterations in cervical carcinoma patients with CGH+SNP microarrays and HPV-FISH. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(8):5071-5082.
20. Coppinger J, Alliman S, Lamb AN, et al. Whole-genome microarray analysis in prenatal specimens identifies clinically significant chromosome alterations without increase in results of unclear significance compared to targeted microarray. *Prenatal Diagnosis*. 2009;29(12):1156-1166.



RNDr. Miroslav Tomka, PhD.

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o. člen MEDIREX GROUP
Galvaniho 17/C, 821 04 Bratislava
miroslav.tomka@medirex.sk