

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**DNA čipy a jejich využití pro molekulární diagnostiku
a predikci u onkologických onemocnění**

Vedoucí bakalářské práce: Ing. *et* Ing. Božena Hosnedlová, Ph. D.

Autor bakalářské práce: Lucie Voráčková

České Budějovice 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 21.4.2016

.....

Lucie Voráčková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. *et* Ing. Boženě Hosnedlové, Ph.D. za vedení bakalářské práce, za cenné rady a připomínky. Také velmi děkuji za čas strávený při konzultacích a korekturách práce.

Abstrakt

Na onkologické onemocnění poukazuje mnoho viditelných faktorů vznikajících při karcinogenezi, např. pozměněná exprese genů, zvýšený počet miRNA atp. Lze ho tedy diagnostikovat pomocí analýzy exprese genů za použití různorodých metod, z nichž je DNA čipová analýza nejvýznamnějším pokrokem genetického výzkumu. Pomocí mikročipů lze detekovat velké množství nukleotidových sekvencí na jednom čipu za relativně krátkou dobu. Zavedení této analýzy do praxe znamená pro diagnostiku a predikci onemocnění pozitivní obrat.

Klíčová slova: DNA čipy, exprese, gen, karcinom, miRNA, onkologické onemocnění

Abstract

Many visible factors produced during carcinogenesis refer to oncological disease, e.g. modified gene's expression or increased number of miRNA. These factors can be diagnosed by analyzing of gene's expression. For this diagnostics, there are used many methods, of whom DNA microarray analysis is the most significant progress in genetic research. A large number of DNA sequences can be detected DNA with microarrays on a single microarray in a relatively short time. This analysis means a positive turnover for the diagnosis and prediction of disease.

Keywords: DNA microarrays, expression, gene, carcinoma, miRNA, oncological disease

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíl.....	9
3. Historie mikročipů	10
3.1 Vznik mikročipových technologií.....	10
3.2 Historie termínu mikročip.....	11
3.3 Historie užití mikročipů v onkogenetice	11
4. Technologie DNA čipů	13
4.1 Rozdělení mikročipů.....	14
5. Postup mikročipové analýzy	17
5.1 Jednotlivé fáze analýzy	17
5.1.1 Izolace, značení, hybridizace	18
5.1.2 Analýza obrazu	18
5.2 Statistická analýza.....	20
5.2.1 Normalizace dat	21
5.2.2 Testovací statistika.....	23
5.2.3 Shlukování	24
5.3 Meta-analýza.....	25
6. Vznik nádorového onemocnění	26
7. Onkologická onemocnění v ČR	31
7.1 Diagnostika onkologického onemocnění	33
7.2 microRNA.....	35
8. Vybrané typy karcinomů s nejvyšší incidencí v ČR	37
8.1 Kolorektální karcinom (CRC).....	37
8.1.1 Nejvýznamnější markery CRC	40
8.2 Karcinom prsu.....	43
8.2.1 Klasifikace karcinomu pomocí receptorů	46
8.2.2 Nádorové markery rakoviny prsu.....	47
8.2.3 Hypoxie a karcinom prsu	48
8.3 Karcinom prostaty.....	50
8.3.1 Nejvýznamnější markery CaP.....	52
9. Závěr	54
10. Seznam zkratk	55
11. Seznam použité literatury.....	57

1. Úvod

Lidský genom je tvořen 39 816 geny, z nichž strukturních je 19027 (HGNC, 2016). Poznání kompletní sekvence lidského genomu umožní identifikovat geny zodpovědné za lidská onemocnění a mělo by v budoucnu vést k úspěšné genové léčbě.

Na základě znalosti sekvence celého genomu je možné začít neprodleně studovat expresi jakéhokoliv genu v organismu (Snustad *et al.*, 2009). Genetické změny ovlivňující expresi genu způsobují nádorová onemocnění. Stále jsou objevovány a zkoumány nové geny, jejichž mutované formy zapříčiňují onkologická onemocnění.

Technologie, původně určená pro měření úrovně transkripce, je nyní používána pro srovnávání genomu mezi jednotlivci (Trevino *et al.*, 2007). Pro tuto analýzu mohou sloužit DNA mikročipy umožňující rychlé posouzení transkripční aktivity buňky, a proto se ukázaly užitečné při klasifikaci lidských nádorů (Miller *et al.*, 2002).

Metodou čipů můžeme nyní analyzovat většinu mRNA, proteinů, metabolitů, interakcí mezi proteiny, genomových mutací, polymorfizmů, epigenetických změn a microRNA v rámci jednoho experimentu. Za posledních 15 let se zvýšila kvalita standardizovaných hybridizačních protokolů, technologie skenování i výpočetních metod. Zatím jsou DNA čipové technologie nejrychleji se rozšiřující metodou genomické analýzy (Trevino *et al.*, 2007). Technologie DNA čipů využívá metody komparativní genomové hybridizace (CGH), která vyšetřuje chromozomové aberace, porovnáváním standardní DNA s DNA vyšetřovaného jedince. K vyšetření se používají vzorky DNA izolované z periferní krve (Behesti *et al.*, 2002).

2. Cíl

V současné medicínské praxi zaujímají molekulárně diagnostické analýzy nepostradatelnou úlohu. Cíl těchto technologií spočívá v detekci mutovaných forem, analýze diferenciální genové exprese a v potvrzení či vyvrácení diagnózy. Po potvrzení diagnózy napomáhají lékařům se sledováním průběhu onemocnění či úspěšnosti léčby. Jednou z metod diagnostiky mutací je analýza pomocí DNA čipů.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na obecnou charakteristiku DNA čipů, historii, technologii čipů a využití DNA čipů ve vybraných onkologických onemocněních. Hlavní část je věnována recentním poznatkům vyplývajícím z analýzy pomocí DNA čipů a shrnutí informací o nejnovějších markerech, které se uplatňují při diagnostice onemocnění. V závěru práce jsou zhodnocena negativa a pozitiva a nastíněna možná budoucí perspektiva této vyšetřovací metody.

3. Historie mikročipů

3.1 Vznik mikročipových technologií

Vývoj metod používaných k analýze pomocí DNA čipů započal již objevením struktury DNA. První zmínka o dvoušroubovici pochází z roku 1953 od Watsona a Cricka. Bylo prokázáno, že tato dvě vlákna lze oddělit působením tepla nebo alkálií (Watson *et al.*, 1953). Opačný proces, na němž stojí všechny metody založené na DNA renaturaci a molekulární hybridizaci, popsali Marmur a Doty (Marmur *et al.*, 1961). Poté bylo zjištěno, že obě sekvence podílející se na tvorbě duplexu musí mít určitý stupeň sekvenční komplementarity a stabilita vytvořeného duplexu závisí na rozsahu komplementarity. Tyto vlastnosti pomáhají analyzovat vztah mezi sekvencemi nukleových kyselin. Také slouží jako mechanismy analytických metod založených na molekulární hybridizaci a jsou aplikovatelné na řešení celé řady biologických otázek. Po roce 1960 objevili Pardue, Gall (Pardue *et al.*, 1969), Jones a Robertson (Jones *et al.*, 1970) možnost lokace specifických sekvencí v jádře či chromozomech provedením hybridizační reakce buňky upevněné na mikroskopickém sklíčku. Tato metoda je dnes známá jako fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH; *in situ* hybridization). Metoda umožňující upevnění chromozomů a buněčného jádra k mikroskopickému sklíčku takovým způsobem, který umožní DNA zúčastnit se duplexních formací se sondou, se nyní používá k upevnění DNA spotů na sklíčka v jedné mikročipové metodě (Southern, 2001).

Rok 1965 se stal významným pro analýzu DNA, kdy Gillespie a Spiegelman popsali metodu měření míry interakcí mezi RNA a DNA, z níž byla RNA transkribována. Po rozšíření této metody vznikl postup spočívající v DNA imobilizované na membráně, na níž se mohou vázat komplementární RNA nebo DNA řetězce pomocí specifické hybridizace (Singh *et al.*, 2013).

Až od roku 1980 se objevuje několik publikací popisujících použití těchto mikročipů při DNA mapování a sekvenování (Parinov *et al.*, 1996). O pět let později vědci začali pracovat na technice, kdy byly známé molekuly imobilizované na membráně či sklíčku a analyzovaný materiál byl označen a hybridizován na povrchu (Murillo *et al.*, 2008).

Tato práce vyvrcholila v roce 1991 popisem nukleotidového mikročipu v publikaci Fodor *et al.* (1991), v jehož znění je nastíněna konstrukce a použití prvního čipu, který vyrobili vědci v kalifornské biotechnologické společnosti Affymax (později přejmenované na Affymetrix) (Fodor *et al.*, 1991).

3.2 Historie termínu mikročip

Termín „mikročip“ popsal ve své publikaci až v roce 1995 Schena *et al.*, představil zde komplementární DNA čip (cDNA čip), na nějž byly fragmenty natištěny pomocí robotického tisku. Poté firma Affymetrix zavedla hromadnou výrobu komerčně dostupné mikročipové platformy, která se nazývala GeneChip (Jain, 2013). Zavedli tak novou techniku syntézy krátkých oligonukleotidů přímo na povrch skla za použití fotolitografické techniky místo „dot blotting“ metody (Patil *et al.*, 2015).

Termín mikro (čip) se u DNA mikročipu používá už od jeho vzniku, v budoucnu se pravděpodobně dočkáme varianty s předponou nano-. Někteří autoři rozlišují termíny array a čip, podle způsobu výroby sondy. V případě nanášení sondy na sklíčko ho pojmenovávají array, a při *in situ* syntetizování je to čip. Výrobci se drží termínu mikročip (microarray) (Slabý *et al.*, 2014).

3.3 Historie užití mikročipů v onkogenetice

Zvýšení znalosti o sekvenci DNA různých genomů poskytlo v 90. letech 20. století nové informace potřebné pro možnost výroby čipu, který by mohl zcela reprezentovat geny v genomu či všechny sekvence v genomu nebo velkou část odchylek sekvence genomu. Během této doby došlo k postupnému přechodu z natištění relativně dlouhé DNA na čip k vytváření polí pomocí 25–60 bp oligonukleotidů. Použití oligonukleotidů zvýšilo také specifčnost analýzy (Bumgarner, 2013).

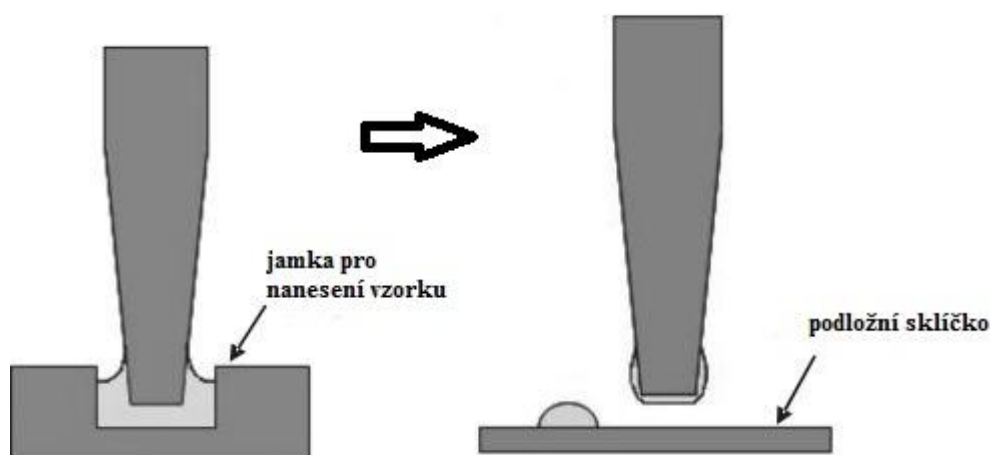
V prosinci 2002 vydal New England Journal of Medicine jako první studii 295 případů screeningu rakoviny prsu pomocí mikročipů (Vijver *et al.*, 2002). Od tohoto roku zaznamenalo užití expresních mikročipů pro klasifikaci pacientů s rakovinou prsu výrazný pokrok (Bertucci *et al.*, 2002; Verr *et al.*, 2002).

Institucí, která vykonala první analýzu pomocí mikročipů, byl nizozemský institut rakoviny (The Netherlands Cancer Institute). Tuto studii vedli Veer *et al.* (2002), kteří použili mikročip se sadou 70 genů, s nímž byli schopni predikovat s 89% přesností vznik metastáz.

Tato metoda je ve srovnání s dosud využívanými prognostickými ukazateli velmi přesná, a to hlavně v odhadu relapsu onemocnění, a pokud se onemocnění potvrdí, znamená to možnost výraznější individualizace protinádorové léčby. Z toho vyplývá, že by mnoho pacientů nemuselo podstupovat adjuvantní chemoterapii nebo hormonální terapii ke snížení rizika metastáz, jelikož 70–80 % pacientů užívajících tuto léčbu by bez ní přežilo a netrpělo by zbytečně doprovodnými vedlejšími účinky (Slabý *et al.*, 2002).

4. Technologie DNA čipů

DNA čip lze popsat jako pevný nosič, na kterém jsou imobilizované fragmenty nukleových kyselin, tzv. sondy se známými sekvencemi, uspořádané v mřížce (Sundberg, 2001). Sondy jsou na nosič naneseny natištěním či nasyntetizováním ve formě spotů (Druker *et al.*, 2001). Nejvýznamnější výrobní technologie DNA čipů je nejjednodušší princip nanášení již hotových sond na podklad, tzv. spotting. Jednotlivé sondy jsou nanášeny na podložní sklíčko tenkými jehlami či hroty (Obr. 1) - (Slabý *et al.*, 2014). Tyto sondy jsou syntetizované podle sekvencí genů, v nichž je obsažena informace, která nás zajímá (Pavlík, 1999). Sondy mohou obsahovat sekvence navržené komplementárně k analyzovaným sekvencím, tj. genům, mRNA, microRNA (miRNA), DNA lokusům či celému genomu. Před vlastní DNA čipovou analýzou se proto mohou využívat i analýzy typu Southern blot, Northern blot, hybridizace in situ nebo polymerázová řetězová reakce (Trevino *et al.*, 2007), tyto reakce probíhají před nanesením na mikročip.



Obr. 1 Proces tisku pevným hrotem (Barbulovic-Nad *et al.*, 2006).

Hrot nabere vzorek a přenesse ho na podložní sklíčko.

Podstatou mikročipové techniky je hybridizace testované nukleové kyseliny s komplementárními sondami lokalizovanými na čipu, tzn. sekvence jednořetězcové DNA k testování na její komplementární sekvenci (Mattick, 2008).

Pomocí technologie DNA čipů (DNA microarrays) je možné monitorovat velké množství DNA sekvencí, případně celý lidský genom v rámci jedné analýzy a ve velmi krátkém čase (Mattick, 2008). Technologie mikročipů nabízí současné studium tisíců genů v jediném experimentu párováním bází společně s hybridizací (González *et al.*, 2010). Analýza s takovýmto rozpětím genů se nepoužívá, jelikož vyhodnocení velkého počtu výsledků je velmi složité na zpracování a výsledky by mohly být nepoužitelné.

Technologie DNA čipů je aplikována v různých odvětvích od genetiky a farmacie po disciplíny jako je virologie, mikrobiologie, imunologie a neurobiologie (Li *et al.*, 2008).

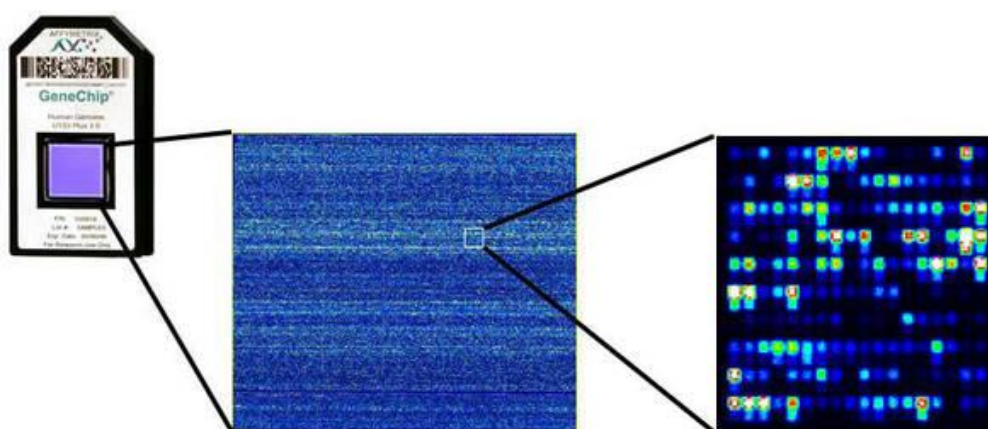
4.1 Rozdělení mikročipů

Mikročipová technologie může být všeobecně rozdělena na DNA čipy a proteinové mikročipy. DNA čipy lze dále rozdělit na cDNA čipy a čipy oligonukleotidové. Oligonukleotidové mikročipy jsou obvykle používány na detekci bodových mutací a nabízejí větší přesnost než cDNA čipy (Guo, 2003).

- **cDNA čipy** jsou vyráběny tisknutím fragmentů dvouvláknové DNA na pevný nosič, kterým může být sklo, silikon či nylon, za použití robotické jehlice (Gray *et al.*, 2000). Zvolení mikročipového sklíčka závisí na typu nukleové kyseliny, která je zde nanesena, a na použité metodě. Výhodou cDNA čipů je jejich nízká cena a flexibilita návrhů čipů. Nevýhoda spočívá v nutnosti využívání DNA knihoven při hodnocení analyzovaného vzorku (Schmidt *et al.*, 2003).
- **Oligonukleotidové čipy** jsou syntetizovány *in situ* pomocí litografie. Poskytují větší přesnost než cDNA, jelikož jsou přizpůsobeny tak, aby se minimalizovala pravděpodobnost křížové hybridizace. Obsahují velmi krátké sekvence, pouze cca 60 bází, tudíž mohou specifikovat pouze jeden cílový gen (Ramaswamy *et al.*, 2002, Snustad, 2009). Jeden z komerčně dostupných oligonukleotidových mikročipů je vyvinut firmou Affymetrix a nazývá se Gene Chips (Naidu *et al.*, 2012).

Zpočátku byly DNA čipy na nylonové membráně, ale později se začalo používat sklo, které poskytuje skvělou podporu pro připojení nukleotidové sekvence, je méně citlivé na světlo, je neporézní a umožňuje použití velmi malého množství vzorku (Yang, 2000).

Využívá se i jiná technika, která spočívá v uložení oligonukleotidových sond v kuličkách na nosiči. Tento typ polí poskytla firma Illumina a používají se zejména pro stanovení genotypu, sekvenování, detekci ztráty heterozygotnosti a detekci metylace. V případě klinického výzkumu se nejčastěji využívají technologie, jejichž předním poskytovatelem je firma Affymetrix (Obr. 2) - (Trevino *et al.*, 2007).



Obr. 2 DNA čip firmy Affymetrix (Affymetrix technology, 2012)

I když jsou DNA čipy velmi užitečné, mají některá omezení. Hladina exprese mnoha genů podléhá značné posttranskripční regulaci a mnohé proteiny jsou ovlivněny posttranslační modifikací jako je fosforylace, glykosylace, acetylace či proteolýza. Řešením tohoto problému je analýza pomocí proteinových mikročipů (Kodadek, 2001).

Vývoji proteinových mikročipů předcházela vývoj DNA čipů. Podstatou proteinových mikročipů je imobilizace proteinu na substrát pomocí nekovalentních interakcí. Na tuto vrstvu se často nanáší vrstva nějakého kovu, aby nedocházelo ke ztrátě kompaktnosti a k dehydrataci. Hydrofilní protein se poté na čip váže pomocí hydrofilního povrchu mikročipu. Proteinové mikročipy se často využívají v klinické biochemii či k mapování proteomů (Vacek, 2006).

Proteinové mikročipy jsou rozděleny na tři typy, a to na analytické mikročipy, funkční mikročipy a reverzní fázové mikročipy (Hall, 2007).

- **Analytické mikročipy** mají bimolekulární rozpoznávací molekuly imobilizované na heterogenní matrici za použití mikrotisku. Mezi nejběžnější analytické mikročipy patří protilátkové mikročipy a haptén mikročipy (Naidu, 2012). Haptény jsou nízkomolekulární substance, které mohou vázat protilátky, ale imunitní odpověď indikují pouze, když jsou navázány na molekulu, která zde funguje jako nosič (Panczak *et al.*, 2014).
- **Funkční mikročipy** jsou složeny z polí, které obsahují celou délku funkčních proteinů nebo proteinových domén (Naidu, 2012).
- **Reverzní fázové mikročipy (RPA)** zahrnují imobilizaci veškerých proteinů přítomných v individuální tkáni či populaci buněk na jedné sondě (Gyorgy *et al.*, 2010).

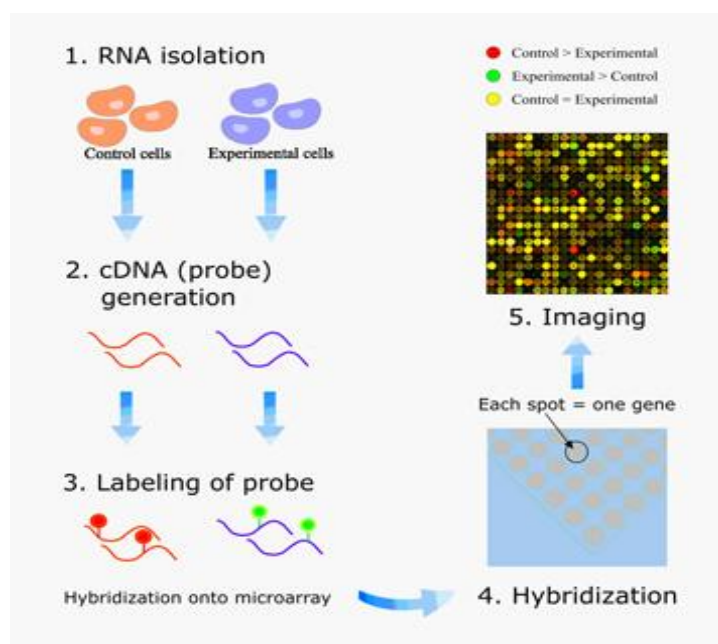
5. Postup mikročipové analýzy

Mikročip obsahuje nukleotidové sekvence specifické pro určitý gen ve specifickém pořadí neboli v maticích (arrays), jež obsahují fragment dvouřetězcové DNA. Matrice na sebe navazují v průběhu hybridizace radioaktivně či fluorescenčně označené cDNA. Množství navázaného materiálu se dá změřit pomocí charakteristického obrazu, který v tu chvíli vzniká (Slabý et al., 2014).

V průběhu hybridizace se naváže zkoumaný vzorek na specifickou sondu, která je lokalizována na určitém místě, čímž vznikne charakteristický obraz. Tento obraz je zachycen laserovým skenerem, který dokáže změřit množství radioaktivity nebo fluorescence. Množství se následně analyzuje pomocí počítačového programu na základě porovnání se signálem vytvářeným známými kontrolními sondami (Pavlík, 1999; Snustad *et al.*, 2009).

5.1 Jednotlivé fáze analýzy

Analýza začíná izolací RNA (1), poté následuje přepsání RNA za vzniku cDNA (2), značení (3), hybridizace (4) a analýza obrazu (5) (Obr. 3).



Obr. 3 Jednotlivé fáze analýzy na DNA čipu (Perez, *et al.*, 2015)

5.1.1 Izolace, značení, hybridizace

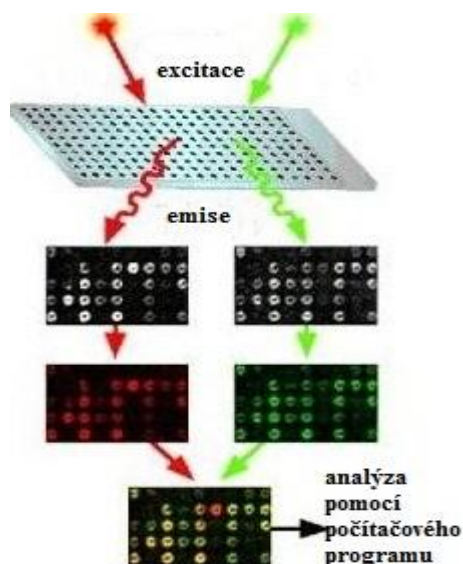
Jako první krok se provádí izolace mRNA. Pro tuto izolaci se používají tradiční metody často s použitím určených kitů (sad). Ve druhém kroku je mRNA přepsána pomocí enzymu reverzní transkriptáza za vzniku cDNA (Babu *et al.*, 2004).

Třetím krokem je značení. Provádí se fluorescenčně značenými nukleotidy. Nejběžněji používaná barviva u DNA čipů jsou indokarbocyanin Cy3 (zelená barva) a indodikarbocyanin Cy5 (červená barva). Většina analýz využívá červené značení kontrolního vzorku a naopak vyšetřovaný vzorek je značen zeleně (Trevino *et al.*, 2007).

Jako čtvrtý krok následuje hybridizace představující rozpojení (denaturaci) vodíkových vazeb a opětovné spojení (renaturace). Denaturace probíhá při vysokých teplotách nebo velmi alkalickém pH. Teploty hybridizace pro cDNA čipy jsou v rozmezí od 42 °C do 45 °C a pro oligonukleotidové mikročipy 42 °C až 50 °C (Trevino *et al.*, 2007). V této fázi se spárují komplementární části cDNA vzorku a sond. Výsledkem je hybridizace označených cDNA s příslušným komplementárním vláknem DNA (Wiltgen *et al.*, 2011).

5.1.2 Analýza obrazu

Po hybridizaci je čip vymyt solnými tlumiči s klesající koncentrací a vysuší se. Poté je přečten pomocí skeneru, jehož součástí je fluorescenční mikroskop propojený s laserem a digitální fotoaparát zaznamenávající fluorescenční excitace. Množství přeneseného signálu je přímo úměrné množství barviva na každém slotu mikročipu. Fluorescenčně značené molekuly hybridizované k sondám emitují pomocí laseru fotony. Emisní vlnová délka se liší pro každé barvivo, čímž mohou být emitované fotony selektivně filtrovány (Murillo *et al.*, 2008). Skener zachytí obraz pro každý kanál (fluorescenční barvivo) individuálně a oba obrazy jsou později v procesu analýzy obrazu sloučeny dohromady (Obr. 4). Výstupní barva (červená, zelená, žlutá) je vytvořena specializovaným softwarem pouze pro účely vizualizace. Relativní intenzity genové exprese jsou získány poměrem Cy5/Cy3 (Wiltgen *et al.*, 2011).



Obr. 4 Analýza obrazu (University of California, 2011)

Červená barva znamená v tomto místě vyšší expresi genů kontrolního vzorku. Zelená barva naznačuje menší aktivitu testovacího vzorku než ve vzorku kontrolním a žlutá barva nepředstavuje žádné změny, tzn., že v tomto bodě jsou geny testovacího a kontrolního vzorku regulovány stejným způsobem (Wiltgen *et al.*, 2011). Analýza dat je nezbytnou součástí mikročipové studie, její přesnost vede ke správné interpretaci výsledků experimentu a k odvození smysluplných závěrů. Při analýze dat se spojují bioinformatické metody a techniky, využívající znalosti z biologie, statistiky a matematiky. Nevyužívá se pouze jednoduchý počítačový software, ale náležitě ověřené algoritmy (Rueda, 2014).

Dalším krokem je analýza obrazu čili určení a identifikace jednotlivých spotů na mikročipu. V závislosti na použitém programu může vyžadovat určitý stupeň lidského zásahu. Ve specializovaném programu jsou předem nainstalované konstrukce mikročipu, které umožní vzít v úvahu počet, umístění, tvar a rozměr každého spotu (Trevino *et al.*, 2007). Cílem zpracování obrazu je najít pozici spotů a poté konkrétní pixely. Tento postup zahrnuje několik procesů vedoucích k oddělení smysluplné intenzity každého spotu od nezpracovaného obrazu (Rueda, 2014). Mezi základní etapy analýzy obrazu patří: rastrování, segmentace spotů a extrakce intenzity (Jatti *et al.*, 2013).

- **Rastrování** je proces přiřazení souřadnic ke každému jednotlivému místu. Každý spot je nutné řešit individuálně. Existují dva způsoby rastrování, a to manuální a automatické (Jatti *et al.*, 2013). Častěji se využívá automatické rastrování, kdy se nejprve pomocí celkového obrazu zjistí dílčí mřížky a poté se zjišťuje umístění spotů v každé dílčí mřížce. Tento postup slouží ke korekci potencionálního nesouladu a zvyšuje přesnost této metody (Rueda, 2011).
- **Segmentace** odlišuje intenzitu spotů od pozadí. Pozadí musí být odečteno či jinak vygenerováno z primárního signálu. Korekce pozadí se využívá k odstranění nespecifického signálu vznikajícího z nespecifické hybridizace na sklíčku či jiných materiálů na nosiči (Jatti *et al.*, 2013).
- **Extrakce intenzity** vyjadřuje intenzitu fluorescenčního záření ve spotu i na pozadí. Intenzita každého bodu je úměrná hybridizaci na konkrétním umístění. Intenzitu lze vyjádřit jako medián hodnot intenzit pixelů ve spotu (Karim *et al.*, 2011).

5.2 Statistická analýza

Mikročipy mohou současně kvantifikovat několik set až tisíc genů dohromady. Potřeba statistického vyhodnocení výsledků spočívá v ovlivnění přesnosti měření např. při přípravě RNA a při užití určité techniky mikročipové analýzy (Knudsen *et al.*, 2011).

Mikročipové datové soubory jsou běžně velice rozsáhlé a analytická přesnost je ovlivněna celou řadou proměnných. Proto je užitečné redukovat datové sady na ty geny, které jsou nejlépe odlišitelné mezi dvěma případy nebo kategoriemi (např. zdraví *vs.* nemocní). Taková analýza produkuje seznam odlišně exprimovaných genů. Odlišně exprimované geny jsou geny, jejichž průměrná exprese se značně liší mezi dvěma skupinami experimentů (Selvaraj *et al.*, 2011).

Převod údajů uvedených v datovém souboru mikročipů do smysluplné biologické informace zahrnuje několik kroků, včetně normalizace, predikce odlišně

exprimovaných genů s pomocí využití srovnávacích statistik, identifikace a rozdělení expresních vzorů na základě up a down regulace, rozsah a shlukování genů.

Přesná analýza obsahuje kontrolu kvality, normalizaci, statistické analýzy, shlukování a klasifikaci (Naidu *et al.*, 2012).

5.2.1 Normalizace dat

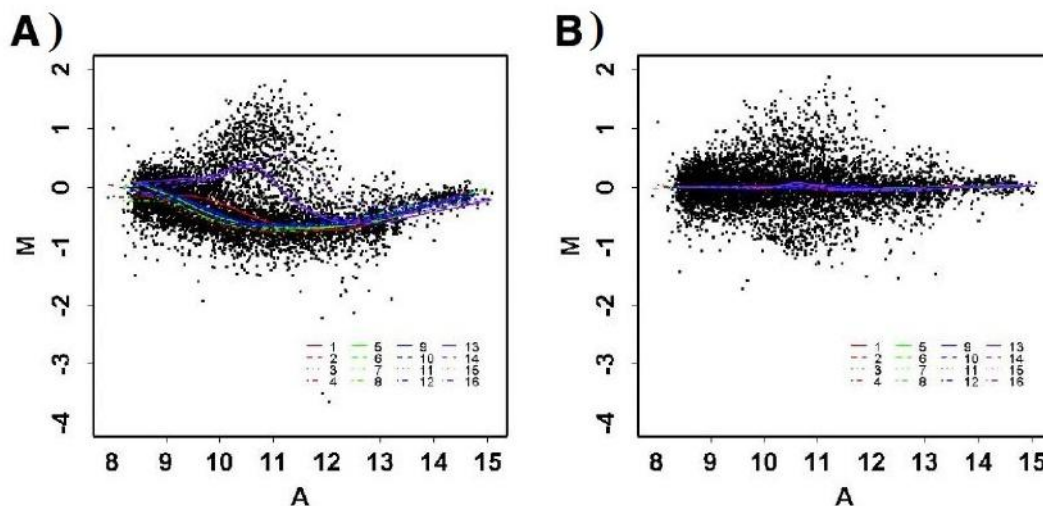
Před porovnáním hodnot genové exprese mezi čipy se musí čipy normalizovat, je zde totiž velmi pravděpodobná nerovnováha mezi vzorky RNA. Tato nerovnováha nemá nic společného s biologickou podstatou vzorků, ale vyskytují se zde různé technické problémy, např. rozdíly v absorpci barviv (Simon, 2003). Proto po analýze následuje normalizace napravující systematické chyby vzniklé odlišným značením, hybridizací a skenovacími postupy (Obr. 5) - (Trevino *et al.*, 2007).

Normalizace je pojem, používaný k popisu procesu eliminace takovýchto odlišností k umožnění přiměřeného porovnání dat získaných ze dvou vzorků, tzn. nastavení hodnoty genové exprese tak, že geny, které jsou rozdílně exprimovány, mají podobné hodnoty na čipu (Babu, 2004).

Prvním krokem normalizace je výběr sady genů, u kterých by se úroveň exprese ve zkoumaných podmínkách neměla změnit. Z této sady je vypočítán normalizační faktor, tj. faktor, který bere v úvahu variabilitu v této sadě. Poté je aplikován na ostatní geny v mikročipovém experimentu (Babu, 2004).

Normalizaci lze rozdělit podle místa vykonávání na normalizaci v rámci jednoho čipu a normalizaci mezi čipy.

Normalizace v rámci jednoho čipu (within array level) znamená vyrovnání technické variability uvnitř čipu. Normalizaci lze rozdělit na normalizaci prostorových odchylek, které jsou způsobovány nestejnou hybridizací, normalizaci pozadí pomocí odstranění fluorescence mezi spoty a normalizaci odchylek barviva (Yang *et al.*, 2002).



Obr. 5 Rozdíl datových bodů: A) před normalizací, B) po normalizaci (Speed, 2004)

Hodnoty genové exprese ze vzorků šetřených (T) a kontrolních (C) jsou obvykle zobrazeny vynesáním intenzit \log_2 nebo \log_{10} proti sobě (například $\log_2 T$ vs. $\log_2 C$). Tyto grafy mohou odhalit pouze lineární závislosti mezi oběma skupinami intenzity, tudíž mohou být maskovány důležité vlastnosti dat (Speed, 2004). K odhalené nelineární závislosti je mnohem lepší zobrazení na grafu, kde $M = \log_2(T/C)$ a $A = \log_2\sqrt{(T \times C)}$, který představuje otočení předchozího grafu a změnu rozsahu os (Yang *et al.*, 2002).

Normalizace mezi čipy (between array level) se používá, pokud bylo k analýze použito dva a více čipů. I přesto, že se skenují všechny čipy stejným skenerem, každý čip má upravené technické vlastnosti, tudíž není intenzita signálu mezi čipy stejná. Účel normalizace je minimalizace systematických změn měřených hladin exprese a sjednocení hodnot jednotlivých čipů z experimentu (Yang *et al.*, 2002).

Normalizace mezi čipy se provádí metodou globální normalizace, metodou škálování, Loess metodou a kvantilovou normalizací.

Při **globální normalizaci** jsou červená a zelená barviva spojena pomocí konstantního faktoru k podle vzorce $R=kG$, kde R představuje červenou barvu a G barvu zelenou. Hodnoty se upravují pomocí průměru, aby měly stejné intenzity (Yang *et al.*, 2003). **Škálování** znamená sjednocení variability jednotlivých mikročipů. Poměry logaritmu sledují průměr a odchylku (Yang *et al.*, 2002).

Loess metoda je používána na odhadnutí lokálních trendů pomocí metody posuvného okna. Odhadnutá křivka je výsledkem lokálních odhadů, která je pak odečtena od původních hodnot, tím vznikají normalizované hodnoty. Každá M hodnota je normalizována odečtením odpovídající hlavní hodnoty ze skupiny loess křivky. Tato normalizace opravuje prostorové variability M hodnoty. $N = M - \text{loess}_i(A)$, kde N je zbylá část z loess regrese a $\text{loess}_i(A)$ je loess křivka jako funkce A pro i -tou hlavní skupinu loess křivky (Smyth *et al.*, 2003). **Kvantilová normalizace** se nejčastěji používá při normalizaci údajů z Affimetrix mikročipů. Cílem této normalizace je, aby měl každý kanál stejný počet kvantilů. X_q (q je mezi 0 a 1) a q je kvantil souboru dat, pokud je podíl datových bodů x_q menší nebo rovnající se q a frakce z datových bodů x_q je vyšší nebo rovnající se $1 - q$ (Smyth *et al.*, 2003; Yang, 2003).

5.2.2 Testovací statistika

Z normalizovaných dat lze několika jednorozměrnými statistickými metodami určit expresi nebo relativní expresi genu. Mezi tyto metody můžeme zahrnout t-test (Troyanskaya, 2002), modifikovaný t-test známý jako SAM (Significance Analysis of Microarrays, signifikance analýz mikročipů) - (Tusher *et al.*, 2001), dvouvzorkový t-test (Fan *et al.*, 2005) a F-test (Cui *et al.*, 2003). U složitějších datových souborů s mnoho třídami se používá analýza rozptylu (ANOVA). Byla vyvinuta k identifikaci změn v expresi pomocí výše uvedených statistických metod různých softwarových souborů (Selvaraj *et al.*, 2011).

Jako nejobvyklejší metoda pro identifikaci rozdílně exprimovaných genů se používá t-test. Tento gen-specifický t-test není ovlivněn heterogenitou rozptylu všech genů, jelikož používá pouze informace z jednoho genu. Může mít však malý výkon, jelikož množství RNA vzorku zkoumané pro každý předpoklad je malé a kromě toho jsou odhadované odchylky z každého genu nestabilní, tzn., že t-test nemusí vykazovat správné hodnoty (Baldi *et al.*, 2001). Další velmi rozšířená testovací statistika je jen změněnou verzí t-testu a nazývá se S test (SAM). Kromě vlastních dat využívá informace o vzorcích. Liší se přidáním kladné konstanty do gen-specifického t-testu. S touto úpravou nejsou geny s malými změnami vybrané za významné, čímž se odstraňuje problém samotného t-testu (Ciu *et al.*, 2005).

Pro analýzu dat z mikročipového experimentu, k porovnání exprese šetřeného vzorku a vzorku kontrolního bez normalizace expresních hodnot, lze využít metodu analýzy rozptylu, kde se jedná o zjišťování průměru dvou hodnot pomocí nepárového t-testu (Pavlík *et al.*, 2006). Podstata této analýzy spočívá v tom, že je celkový rozptyl rozložen na dílčí rozptyly, které náleží určitým vlivům, podle nichž jsou roztrženy jednotlivé výchozí údaje (Pavelka *et al.*, 2000).

5.2.3 Shlukování

Metoda shlukování je používána v analýze datových matic genové exprese. Používá se pro nalezení současně regulovaných a funkčně příbuzných skupin. Podobná data se zobrazují blízko sebe, tzn., že tvoří shluky. Mezi důležité parametry patří střed shluku (těžiště) a rozptyl bodů okolo něj. Existují tři typy běžných shlukovacích metod tj. hierarchické shlukování, metoda k-průměrů a samoorganizující mapy (Eisen *et al.* 1998).

- **Hierarchické shlukování** je tzv. nekontrolovaná (un-supervised technika), která vytváří shluky genů s podobnými vzory exprese. Je to metoda, jejímž cílem je vytvoření hierarchie klastrů. Dendrogram zobrazující tuto hierarchii připomíná větvení stromu (Selvaraj *et al.*, 2011).
- **Metoda k-průměrů** se využívá v případě obsahu kvantitativních proměnných v datovém souboru. Metoda využívá rozdělení vzorků do skupin a vytěžuje data pomocí algoritmu použitého ke shlukování do souvisejících skupin bez předchozí znalosti z těchto vztahů (Řezanková *et al.*, 2009).
- **Samoorganizující mapa** je neuronová síť založená na nehierarchickém shlukování. Tyto mapy pracují podobným způsobem jako metoda k-průměrů (Tamayo *et al.*, 1999).

5.3 Meta-analýza

Hledání genomických změn odhalilo obrovskou heterogenitu nejen v rámci jednoho histologicky definovaného typu rakoviny, ale i v rámci celého individuálního nádoru.

K identifikaci genů potenciálně důležitých pro rakovinu, mají vědci srovnání s celosvětovými profily genové exprese rakovinné tkáně a odpovídající normální tkáně. Tyto analýzy obvykle generují stovky genů, rozdílně exprimovaných v nádorových onemocněních vzhledem k normální tkáni, tudíž je obtížné rozlišit geny, které hrají kritickou roli v nádorovém fenotypu nebo které jsou falešně exprimovány (Rhodes *et al.*, 2004).

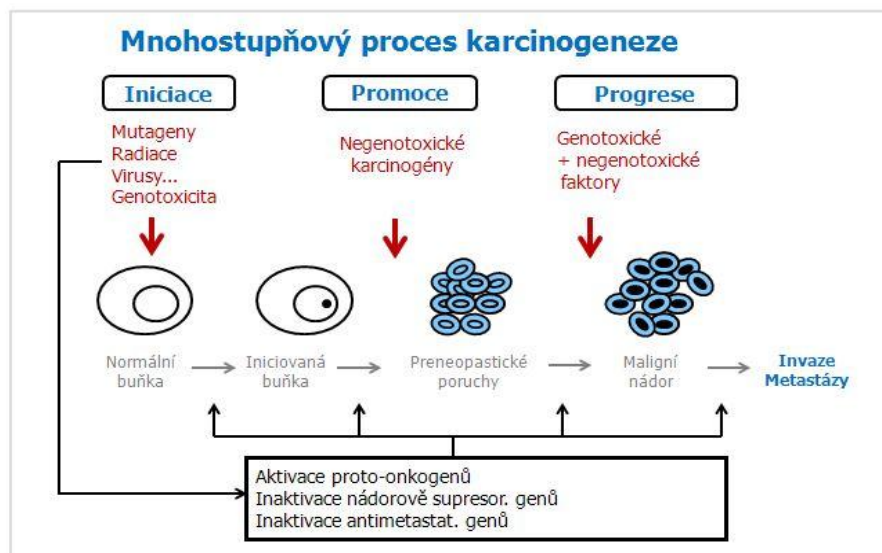
Rhodes *et al.* (2004) vyvinuli meta-analytické nástroje, srovnávací meta-analýzu, což je statistická metoda k charakterizaci společného transkripčního profilu, který je aktivován u většiny typů rakoviny vzhledem k normální tkáni, ze které vzniká a pravděpodobně odráží základní transkripční vlastnosti nádorových transformací.

Meta-analýza je vlastně soubor klasických statistických metod, které kombinují výsledky z několika nezávislých, ale souvisejících studií (Malinowski, 2007). Slouží ke kombinování výsledků mnoha různorodých procesů, které mají společné znaky. Metoda meta-analýzy kombinuje primární statistiku, např. P hodnotu, což je pravděpodobnost, že pozorovaná hladina diferenciální exprese mohla nastat náhodou (Walsch *et al.*, 2015). S rostoucím počtem veřejně dostupných datových souborů lze navrhnout meta-analýzu více souborů dat, které řeší podobné hypotézy a statisticky zhodnocují všechny pozitivní výsledky současně. Tato analýza by mohla přinést sady významných, odlišně exprimovaných genů jednotlivých studií (Ramasamy, 2008). Jednou z hlavních příčin úmrtí na rakovinu je proces metastazování. Stanovení mechanismů iniciace a růstu metastáz by mělo zlepšit léčbu. Rakovinné buňky mají vyvinuto mnoho mechanismů k odpojení od primárního tumoru, migraci a kolonizaci vzdálených orgánů (Pierre *et al.*, 2010). Meta-analýza může spojovat dva různé, ale biologicky související procesy, jako je např. metastáza a hypoxie (Pierre *et al.*, 2010). Díky této metodě existují důkazy pro familiární sdružení akutní myeloidní leukémie a kolorektální rakoviny. Muži s rodinnou anamnézou karcinomu prsu mají také zvýšené riziko rakoviny prostaty (Rhodes *et al.*, 2004).

6. Vznik nádorového onemocnění

6.1 Vznik nádorové buňky

Na rozvoji rakoviny se podílí jak dědičně získané predispozice, tak náhodné mutace v jednotlivých buňkách. Podobně jako všechny buňky, které tvoří lidské tělo, je rakovinná buňka přímý potomek mitotického dělení buněk, a proto nese kopii svého diploidního genomu (Stratton *et al.*, 2009). Přeměna normální buňky na nádorovou je většinou způsobena postupným hromaděním genetických změn, vícečetnými mutacemi genů, ke kterým dochází v průběhu stárnutí buněk (působením fyzikálních, chemických či biologických mutagenů), a to zpravidla současně v několika stupních (Obr. 6). Mutace vedou ke změnám v genech, které jsou důležité pro opravu DNA, regulaci buněčného cyklu a spuštění buněčné smrti (Svobodová *et al.*, 2012). K těmto změnám dochází běžně v každé buňce, avšak ne každá taková změna musí zákonitě vést k maligní transformaci. Pokud ale reparační procesy (buněčné či na úrovni organismu) nejsou schopny eliminovat vznik nádorové buňky, rozbíhá se kaskáda neregulovatelného růstu a dělení nádorových buněk, v nichž bývá mj. potlačen proces apoptózy (Král *et al.*, 2010).



Obr. 6 Mnohastupňový proces karcinogeneze (Hofmanová, 2013)

Fáze iniciacie je základem celého procesu karcinogeneze, při níž dochází ke změnám genetického materiálu buňky. Po působení tzv. nádorově promočních podnětů či po smrti buněk dochází v promoční fázi k růstu preneoplastických nebo neoplastických buněk. Fáze progrese je charakterizována akumulací mutací, vzrůstající rychlostí proliferace, invazitou a vznikem metastáz.

Mutace mohou způsobit nestabilitu a buňka ztrácí svůj přesný tvar, nereaguje na inhibiční signály a začne se nekontrolovaně dělit a postupně se změně na buňku nádorovou (Kočárek, 2008).

Vznik nádoru vyvolá poruchy regulace na úrovni buňky a je podmíněn několika kroky, které začínají změnami DNA způsobenými genotoxickými kancerogeny. Kancerogeny jsou mutagenní faktory, které svým účinkem způsobují či napomáhají vzniku nádorového onemocnění (Snustad *et al.*, 2009).

Mutace způsobující nádorová onemocnění lze rozdělit (Skříčková *et al.*, 2003):

- Malé mutace v sekvenci nukleotidů (včetně bodových mutací), které mohou být důsledkem neopraveného poškození DNA, například genů poškozených bodovými mutacemi *K-ras* a *p53*
- Amplifikace genů, představující aberantní vytvoření více kopií téhož genu. Typickým příkladem genu přispívajícího k procesu kancerogeneze je *N-myc*.
- Změny v počtu chromozomů (aneuploidie) - př. ztráta chromozomu 10 u glioblastomů způsobujících inaktivaci nádorového supresoru PTEN.
- Chromozomální translokace.

6.2 Původci nádorových buněk

Proces změny buňky na nádorovou se nazývá maligní transformace. Akumulací mutací ve specifických genech vzniká maligní transformace buňky. Tyto geny mohou posloužit v diagnostice rakoviny, jelikož hrají hlavní úlohu v procesu tvorby nádoru (Kočárek, 2008).

Specifické geny zahrnují:

- Protoonkogeny, které stimulují buněčné dělení a řídí diferenciaci buněk. Jsou odpovědné za přenos signálů mezi buňkami. Mutací se mění a mohou se stát karcinogenními onkogeny, které se podílejí na vzniku nádorových buněk.
- Supresorové geny, které působí jako inhibitor, tj. potlačují vznik nádorového onemocnění. Hlavní funkce je regulace buněčného cyklu. Mutace v těchto genech zamezí plnění jejich funkce (Kočárek, 2008).

Aby se mutace nádorového supresoru uplatnila v karcinogenezi, musí proběhnout inaktivace obou alel daného genu. Po mutaci první alely a navození heterozygotního stavu musí proběhnout mutace nebo ztráta i druhé alely, tzv. ztráta heterozygotnosti (loss of heterozygosity, LOH) (Skřičková *et al.*, 2003).

Buňky se změněným karyotypem i genotypem vytvářejí nádor, nemají kontrolu růstu buněk, tudíž nepřestávají růst ani při kontaktu se sousedními buňkami a později se krevním řečištěm šíří po celém organismu a mohou pak v různých orgánech vytvářet metastázy (Eckschlager *et al.*, 2002).

Nádor může být povahy nezhoubné (benigní) či zhoubné (maligní) (Komůrková, 2014). Benigní nádory rostou relativně pomalu a zachovávají si charakter tkáně, ze které vznikly. Růst maligních nádorů je invazní, uvolněné nádorové buňky se dostávají krevním řečištěm do jiných orgánů. Vznikající útvar poškozují okolní zdravé tkáně a může začít metastázovat, tj. tvořit v těle sekundární nádory ve vzdálených orgánech (Snustad *et al.*, 2009).

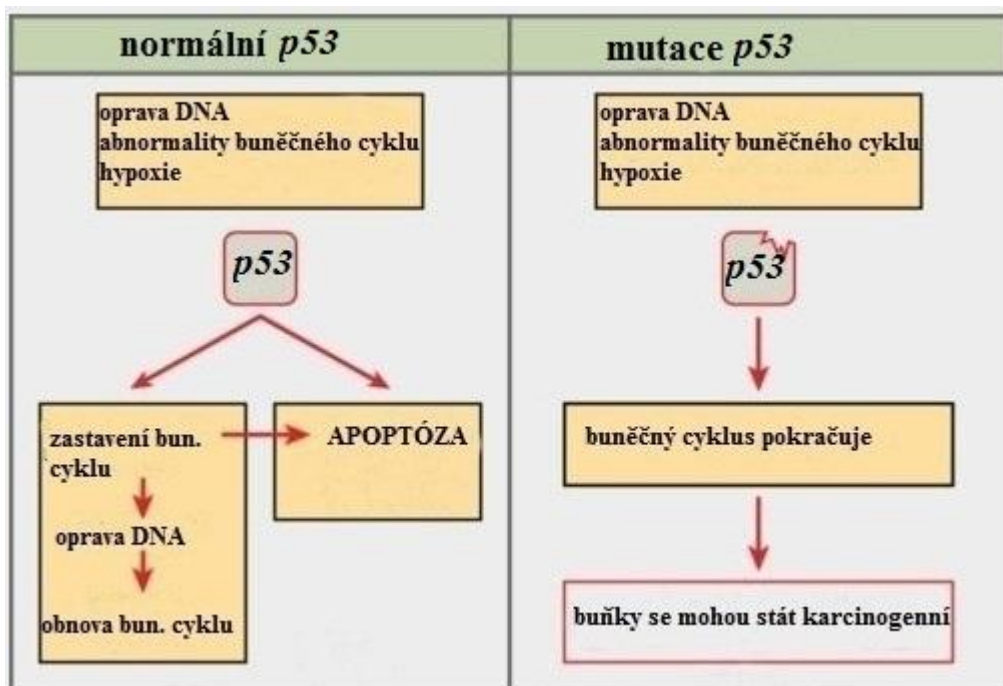
6.3 Buněčný cyklus a apoptóza

V některých případech mohou vzniknout při replikaci DNA náhodné změny, mutace, které narušují buněčný cyklus. Ve zdravé buňce je rovnováha stimulačních a inhibičních signálů pečlivě regulována, při mutaci se signální dráhy mění, což narušuje buněčný cyklus (Kočárek, 2004). Buněčný cyklus tvoří fáze růstu, syntézy DNA a dělení. Tento cyklus je regulován kontrolním bodem, který zastavuje další postup, pokud není dokončena určitá fáze, či není opravena poškozená DNA. Nádorové buňky mají tyto kontrolní body deregulované, a proto se mohou dále množit i s poškozenou DNA (Snustad, 2009).

Tělo produkuje řadu různých typů buněk. Normální zdravé buňky rostou a dělí se na nové podle potřeby organismu. Mají omezenou délku života, po určité době nastává buněčná smrt, tzv. apoptóza. Apoptóza je navozena aktivací exprese specifických genů a může nastat například v případě poškození buňky. Tím se buňka rozpadá na apoptické váčky a je rozštěpena endonukleázami (Rosypal, 2003).

Apoptózu mimo jiné řídí i protein p53, který se zahrnuje do skupiny nádorových supresorů a reguluje expresi genů, jež kontrolují růst buňky a zastavují buněčný cyklus (Allton *et al.*, 2013). Nádorový supresorový protein p53 je kódován nádorovým supresorovým genem *TP53* (tumor protein *p53*, antigen NY-CO-13, P53, P53 tumor suppressor, P53_HUMAN, TRP53, phosphoprotein p53) - (TP53, 2015). Hlavní rolí proteinu p53 je buněčná odpověď na stres.

V normálních buňkách je hladina p53 nízká, ale v buňkách s poškozenou DNA hladina proteinu narůstá. Jako odpověď na poškození DNA je p53 fosforylován a přeměněn na aktivní formu, čímž začne stimulovat transkripci genů, jejichž produkty zastavují buněčný cyklus (Obr. 7). V případě mutace proteinu p53 se buněčný cyklus nezastaví, tím pádem nelze opravit poškozenou DNA. Z toho vyplývá, že ztráta funkce proteinu p53 je klíčovým krokem karcinogeneze (Snustad *et al.*, 2009).



Obr.7 Důsledek mutace p53 (Boundless, 2003)

Při výskytu poškozené buňky supresorový gen p53 zastaví buněčný cyklus do doby, než je buňka opravena. V případě, že buňku nelze opravit, nastává apoptóza. V důsledku mutace supresorového genu k zastavení buněčného cyklu nedochází, a tím se poškozené buňky mohou dál dělit.

6.4 Epigenetické změny

Epigenetické změny postihují DNA nebo chromatin. Ovlivňují expresi genů. Jestliže tyto změny postihují geny zapojené v procesu růstu buněk a v regulaci buněčného cyklu, mohou se také podílet na procesu nádorové transformace. Epigenetické změny zahrnují (Svobodová *et al.*, 2012):

- Metylaci DNA, při které se metylová skupina naváže na vybrané nukleotidové báze.
- Remodelaci chromatinu, která spočívá v chemické modifikaci histonových proteinů.
- Interferenci RNA, jež reguluje miRNA, a tím blokuje tvorbu proteinů.

7. Onkologická onemocnění v ČR

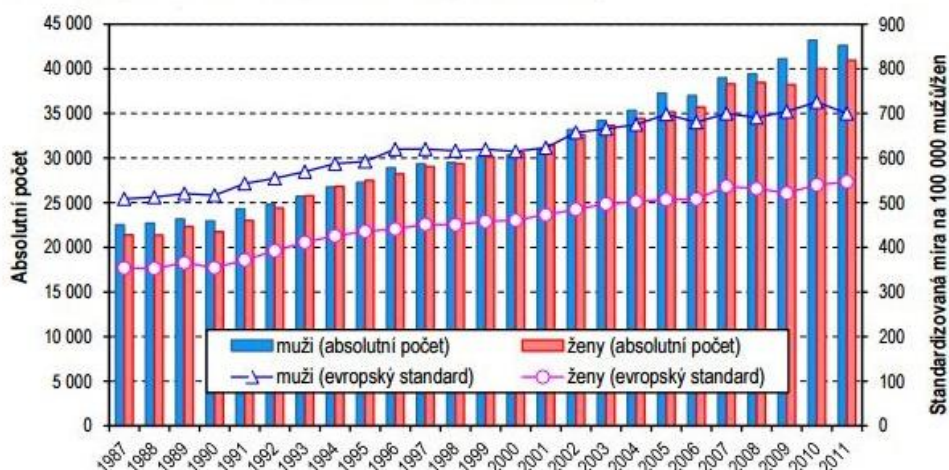
Zhoubné novotvary jsou v České republice evidovány od konce 50. let. V roce 1976 byl založen Národní onkologický registr (NOR), který eviduje všechna hlášená onemocnění a jejich průběh. Hlášení a registrace novotvarů je zde povinná. NOR spravuje Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky (ÚZIS). NOR je hlavním zdrojem dat o epidemiologii zhoubných nádorů a představuje plnohodnotný monitoring epidemiologie nádorových onemocnění včetně prediktivního hodnocení. Spolupracuje s Českým statistickým úřadem. Veřejnosti jsou zpracovaná data přístupná na portálu www.svod.cz. Data se zpracovávají jednou za 5 let zpětně (ÚZIS, 2015).

V České republice jsou nádorová onemocnění druhou nejčastější příčinou úmrtnosti. Ročně na ně umírá více než 27 000 osob. Tyto informace poskytuje Státní zdravotní ústav (SZÚ). ÚZIS ve spolupráci s NOR vydal v roce 2014 publikaci shrnující rok 2011, podle níž bylo v roce 2011 evidováno 83 581 případů zhoubných novotvarů (ZN) a novotvarů *in situ* (Zvolský, 2014). Za období let od roku 1977 až po rok 2007 je v databázi více než 1,6 milionu záznamů všech novotvarů (Dušek *et al.*, 2012).

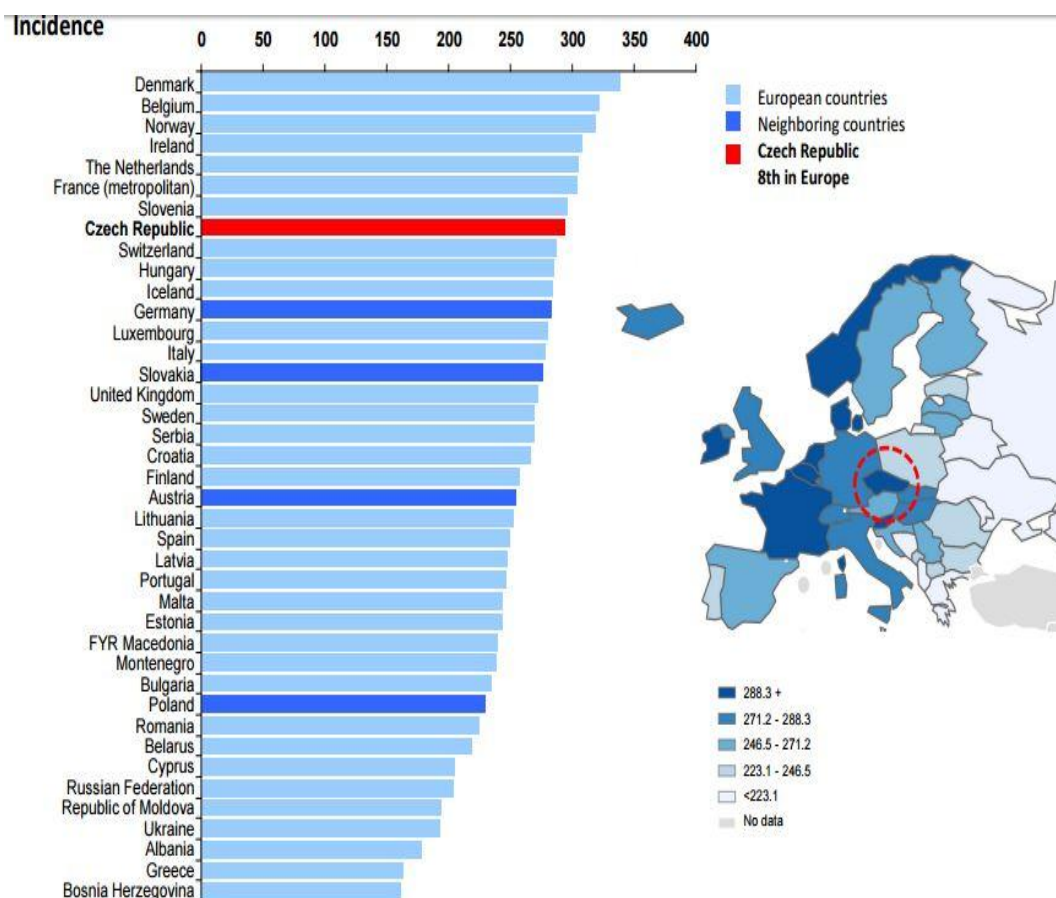
Incidence zhoubných novotvarů v dlouhodobém pohledu roste (Graf 1). U některých diagnóz, jako je ZN plic u mužů či ZN kolorekta, vykazují incidence trend stagnace či mírného poklesu, na druhé straně ZN prsu u žen a ZN prostaty u mužů toto tvrzení vyvažuje svým nárůstem (ÚZIS, 2015).

Ze stručného přehledu dat NOR ČR z roku 2013 vydaného 18.2.2016 lze vyčíst doposud nejnovější zpracovaná data o nádorových onemocněních. V roce 2013 bylo v České republice diagnostikováno 81 541 pacientů se zhoubným nádorem. Celkem k datu 31.12.2013 žilo v ČR 518 667 osob se zhoubným novotvarem nebo s minulostí tohoto onemocnění. Další data ještě zpracovaná nejsou (Dušek, 2015).

Graf 1 Vývoj incidence ZN u mužů a žen (1987–2011) v ČR (ÚZIS, 2015)



Česká republika se v roce 2013 zařadila se svým výskytem zhoubných nádorů na 8. místo v evropském měřítku incidencí. Tato pozice je velmi alarmující, jelikož se výskyt zhoubných nádorů v ČR staví před sousední (Německo, Slovensko, Rakousko, Polsko) a další evropské země (Obr. 8).



Obr. 8 Výskyt zhoubných nádorů v evropském měřítku (Ferlay *et al.*, 2013)

Ucelená publikace pochází z roku 2014, ve které se uvádí, že v roce 2011 bylo nejčastěji diagnostikovaným onkologickým onemocněním „jiný zhoubný novotvar kůže“, toto onemocnění bylo hlášeno u 24,7 % ze všech případů. Jedním z nejčastějších onkologických onemocnění v ČR byl ZN kolorekta s 11,3 % záznamů v národním registru. Česká republika má nejvyšší výskyt úmrtnosti na toto onemocnění v evropském i celosvětovém měřítku (Zavoral *et al.*, 2012; Zvolský, 2014).

U mužů byla nejčastější ZN prostaty a u žen ZN prsu, které společně tvořily třetinu všech záznamů v registru České Republiky. V posledních letech je výskyt ovlivněn screeningovým programem zahájeným od září 2002. Díky screeningu se zachycují nižší stadia onemocnění. Z grafu ZN prsu (Graf 6; kap 8.2) je patrné, že incidence od tohoto období měla vzrůstající tendenci. Přestože je raná léčba karcinomu velmi úspěšná, je ZN prsu stále nejčastější onkologickou příčinou smrti u žen v České Republice (Zvolský, 2014).

7.1 Diagnostika onkologického onemocnění

Vedle klasických metod biochemických a hematologických vyšetření je známa řada specifických nádorových markerů, které jsou laboratorně prokazatelné. Tyto markery souvisí spíše s určitou oblastí tkáně, kde může probíhat patologický děj.

Častou metodou diagnostiky je také analýza exprese onkologických markerů. K této metodě lze použít RT-PCR, FISH, CGH.

- RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction; reverzní transkripce - polymerázová řetězová reakce)

Umožňuje amplifikaci nukleové kyseliny DNA z výchozího vzorku RNA.

Pomocí reverzní transkriptázy je převedena templátová mRNA do cDNA, a ta je podrobena PCR (Bustin, 2002).

- FISH (Fluorescence *in situ* hybridization; fluorescenční *in situ* hybridizace)
FISH je založena na schopnosti jakýchkoliv jednořetězových DNA nebo RNA spolu navzájem hybridizovat, pokud jejich sekvence mají alespoň částečnou komplementaritu bází (Skřičková *et al.*, 2003).

Hybridizace in situ se provádí pomocí DNA- a RNA- sond značených fluorescenčním barvivem (Snustad *et al.*, 2009). Tyto sondy jsou poté detekovány fluorescenčním mikroskopem (Eckschlager *et al.*, 2002).

- CGH (Comparative genome hybridization; komparativní genomová hybridizace)

Metoda komparativní genomové hybridizace vyšetřuje chromozomové aberace pozorováním intenzit fluorescence dvou rozdílně fluorescenčně značených sond DNA pacienta a DNA zdravého jedince (Snustad *et al.*, 2009).

V oblasti výzkumu rakoviny se využívají expresní čipy, které se v současné době zavádějí i do klinické praxe (Miller *et al.*, 2002). Diagnostický postup pomocí čipů je založen na hybridizaci nukleových kyselin (obecný postup analýzy DNA čipů viz kap. 5).

Jedním z cílů molekulární analýzy je identifikace komplexních sítí molekul, které by mohly rozdělovat podskupiny nádorů s odlišným chováním a prognózou a umožnit tak lékařům indikovat pacientům adekvátní léčbu. Analýza využívá k identifikaci rakoviny data, která jsou uložena v TCGA (The Cancer Genome Atlas). TCGA je veřejná databáze, dostupná na webové stránce <http://cancergenome.nih.gov>, poskytující údaje o nádorových onemocněních (Mcledon *et al.*, 2008). Profiluje a analyzuje velký počet lidských karcinomů. Tato data napomáhají k odhalení molekulárních aberací na úrovni DNA, RNA a jejich dopadů na změnu funkce proteinů. Obsažená početná data poskytují ucelený obraz o společných a rozdílných prvcích. Analýza molekulárních aberací a jejich funkčních souvislostí napříč různými typy nádorů může pomoci rozšířit terapii, která je dosud účinná pouze u jednoho typu rakoviny, na léčbu ostatních typů s podobným genomovým profilem (Weisten *et al.*, 2013).

Analýza vedená laboratoří TCGA Research Network odhalila sedm nových molekulárních podtypů rakoviny prostaty na základě známých a nových řídicích genů pro rakovinu prostaty. Do těchto podtypů lze zařadit až 76 % z analyzovaných nádorů prostaty. Tyto podtypy mohou sloužit pro zlepšení odhadu prognózy a volby terapie.

Čtyři z nich jsou charakterizovány genovou fúzí zahrnující členy ETS transkripčních faktorů (ERG, ETV1, ETV4 a FLI1). Další tři jsou definovány mutacemi genů SPOP, FOXA a IDH1 (TCGA, 2015).

7.2 microRNA

Rakovina se zařazuje mezi genetické choroby vyplývající ze získané mutace a epigenetické změny, které ovlivňují expresi genů. Mezi epigenetické modifikace patří hypermetylace či hypometylace v určitých místech DNA nebo proteinu, acetylace či deacetylace histonů. Nádorové buňky exprimují jiné geny než zdravé buňky, což se projeví na množství exprimované mRNA. Změněné exprese microRNA (miRNA) se podílejí na posttranskripční regulaci genové exprese díky párování bází s komplementární sekvencí v cílové mRNA, jejich výsledkem je represe či snížení cílových mRNA, a proto hrají důležitou roli ve všech aspektech buněčné aktivity (Ye *et al.*, 2014).

miRNA jsou krátké nekódující RNA složené z 20–24 nukleotidů, které hrají důležitou roli ve všech biologických procesech, jako je vývoj, buněčný růst, diferenciace, apoptóza a rovněž vznik nádorů. Regulují více než 30 % všech lidských genů. Právě u rakoviny je hlavní funkcí miRNA vliv na důležité rakovinné procesy, jako je proliferace, řízení buněčného cyklu, apoptóza, diferenciace, migrace a metabolismus (Jansson *et al.*, 2012). Detekce miRNA umožňuje pomoc při diagnostice i návrhu léčebné strategie (Wang *et al.*, 2013). Aberantní miRNA lze zjistit intracelulárně z rakovinných buněk a extracelulárně z plazmy pacientů. Tím se stává miRNA slibným diagnostickým markerem, pomocí něhož lze stanovit terapeutické cíle (Luo *et al.*, 2011).

Přibližně 50 % miRNA genů se nachází na fragilních částech chromozomů, což v případě onkologických onemocnění vede k častým abnormalitám v počtu jejich kopií (jejich ztrátě či amplifikaci). V závislosti na charakteru cílových kódujících mRNA mohou mít miRNA funkci onkogenu či nádorového supresoru. Příklad miRNA s funkcí nádorového supresoru je *let-7*. Snížená exprese *let-7* v nádorech vede ke zvýšení hladiny RAS onkogenu a dále vede ke ztrátě proliferace (Slabý *et al.*, 2009).

Jako první miRNA spojené s kancerogenezí byly objeveny miRNA-15 a miRNA-16 lokalizované na chromozomu 13q14. Tyto miRNA byly objeveny při studiu chronické lymfoidní leukémie (Calin *et al.*, 2002).

8. Vybrané typy karcinomů s nejvyšší incidencí v ČR

DNA čipy jsou již úspěšně zahrnuty do výzkumu nádorových onemocnění. Pomocí DNA čipů byla identifikována celá řada genů a miRNA, která má prognostický význam u karcinomů. Lze do budoucna předpokládat, že se čipová technologie vedle histologického vyšetření uplatní stejnou měrou. Informace získané z čipové analýzy mohou být základem molekulární klasifikace nádorových onemocnění (Slabý, 2009).

Tato kapitola pojednává o nejnovějších výsledcích analýz pomocí DNA čipů u vybraných typů karcinomů, které jsou nejčastějšími onemocněními v ČR.

8.1 Kolorektální karcinom (CRC)

Kolorektální karcinom (CRC; colorectal carcinoma) je zhoubný nádor vznikající z buněk výstelky tlustého střeva či konečníku. Je jednou z hlavních příčin úmrtnosti po celém světě a v České republice patří k nejčastějším onemocněním trávicí soustavy.

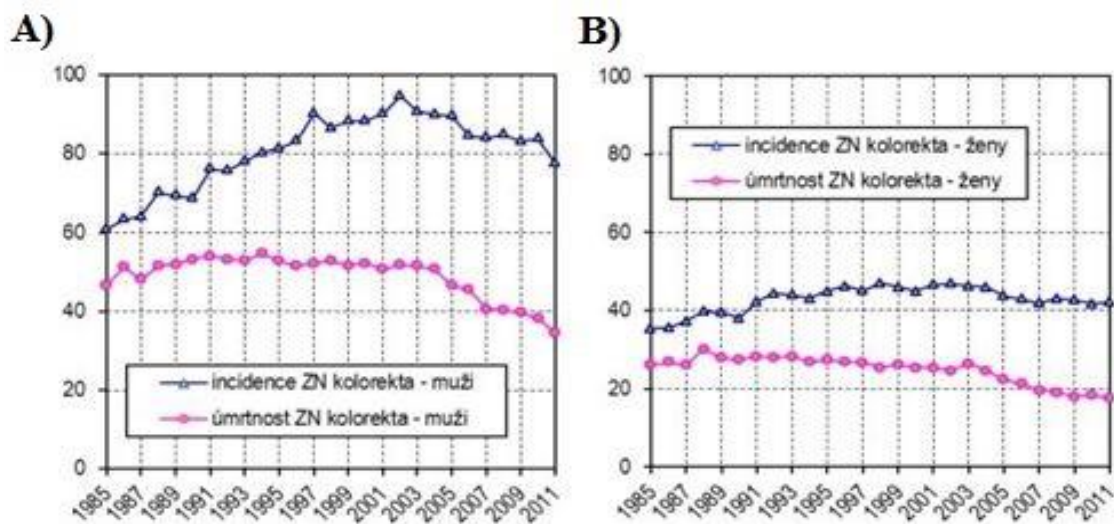
V roce 2007 bylo CRC diagnostikováno u 43 835 osob, ve srovnání s rokem 1995 vzrostla jeho incidence o 99,6 %. Národní program screeningu kolorektálního karcinomu v České republice byl zahájen v roce 2000. Iniciální metodou byl guajakový test na okultní krvácení do stolice (gTOKS), v případě positivity je následován kolonoskopií (Suchánek, 2011). Od roku 2009 má občan ČR nárok od věku 50–54 let každý rok nárok na provedení testu gTOKS. Od 55 let si mohou občané ČR vybrat mezi gTOKS nebo screeningovou kolposkopií, kterou stačí provést jednou za 10 let (ÚZIS, 2015).

V roce 2011 bylo hlášeno 8176 případů CRC, což představuje mírný pokles oproti předchozímu roku. V 54 % případů u mužů a 63 % u žen je novotvar lokalizován v tlustém střevě. Oproti roku 2010 míra incidence u mužů poklesla, naopak u žen mírně vzrostla. Úmrtnost u obou pohlaví mírně poklesla (Graf 2).

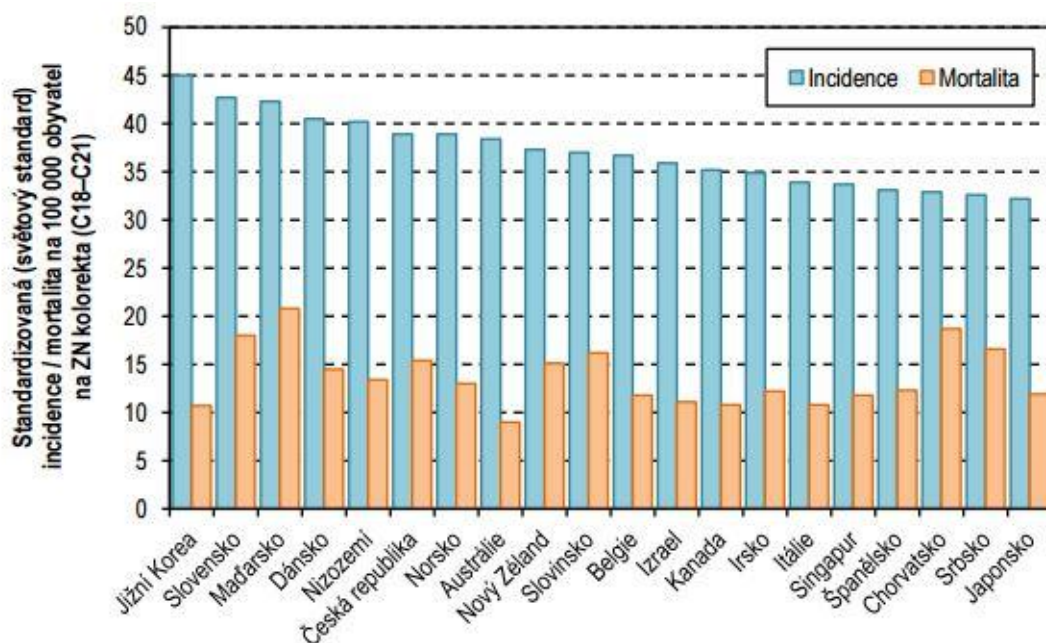
V celosvětovém srovnání za rok 2012 se Česká Republika svou incidencí zařadila na šesté místo (Graf 3). 80 % případů CRC je hlášeno u osob starších 60-ti let.

Mezi země s nejvyšším výskytem toho onemocnění patří Jižní Korea, Slovensko, Maďarsko, Dánsko a Nizozemí.

Graf 2 Míra incidence a úmrtnosti na CRC A) u mužů a B) žen (na 100 000 mužů/žen) (ÚZIS, 2015)



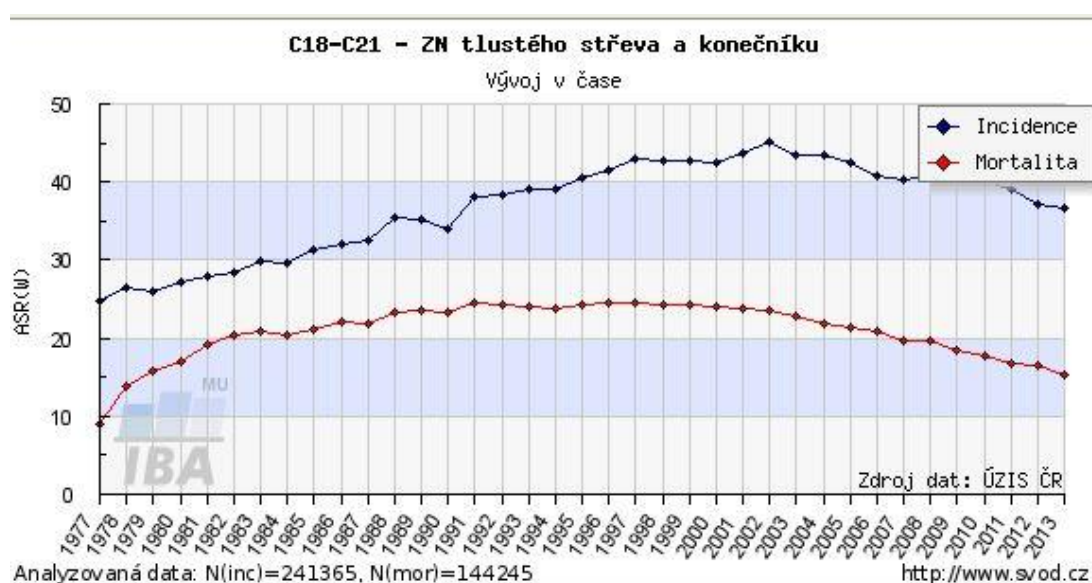
Graf 3 Porovnání incidence a mortality u CRC v celosvětovém měřítku za rok 2012 (ÚZIS, 2015)



Z grafu 4 je patrné zvyšování incidence případů ZN tlustého střeva do roku 2003, od tohoto roku naopak incidence pomalým tempem klesá. Mortalita od roku 1992 má ale sestupnou tendenci. Stav, který je zde znázorněn, lze vysvětlit zlepšením lékařské péče o pacienty, rychlejším odhalením ZN či použitím účinnější terapie než v letech předchozích.

Na zlepšení stavu mohou mít zásluhu právě i DNA čipy, díky nimž bylo analyzováno mnoho markerů CRC využívaných pro přesnější stanovení diagnózy či odpovídající léčby.

Graf 4 Vývoj ZN kolorekta v ČR v letech 1977–2013 (Dušek *et al.*, 2015)



CRC byl jedním z prvních epiteliálních nádorů, na kterém byly popsány molekulární změny během progresu onemocnění. Základní podmínkou vzniku nádoru je nestabilita genomu. V současné době známe tři možnosti genomové nestability, a to chromozomální nestabilitu, mikrosatelitovou nestabilitu a metylaci CpG ostrůvků. Všechny tyto mechanismy mohou vést ke vzniku CRC, proto slouží jako možné prekursor, které můžeme zkoumat, a tím i odhalit možné onemocnění (Suchánek, 2011).

Za relevantní prognostický faktor můžeme považovat i mikrosatelitovou nestabilitu. Je zřejmé, že odlišná exprese miRNA má výraznou funkci při iniciaci a progresi CRC. Konkrétní miRNA mohou působit jako nádorové supresory nebo onkogeny

v závislosti na buněčném prostředí, ve kterém jsou exprimovány (Schetter *et al.*, 2012).

Exprese miRNA se v CRC mění, množství exprimované miRNA lze na základě této skutečnosti využít pro diagnózu, prognózu a odhad terapeutického výsledku. S pomocí DNA čipů a RT-PCR byly shromážděny miRNA jako možné markery CRC. Tyto markery lze využívat pro včasné odhalení CRC (Schetter *et al.*, 2012).

Již v roce 1990 byl popsán vznik sporadického kolorektálního karcinomu na molekulární úrovni. Dle tzv. Vogelsteinova modelu je progresse z normálního epitelu přes adenom ke karcinomu spojena s inaktivací tumor supresorového genu *APC* (adenomatous polyposis coli), aktivací onkogenu *K-ras* do stavu hyperfunkce a následnou mutací *TGF- β* , *PIK 3CA* a *TP53* (Fearon *et al.*, 1990).

Následně bylo verifikováno 80 mutovaných genů, které se uplatňují v kolorektální karcinogenezi, nicméně pouze cca 15 z nich je zásadních (Wood *et al.*, 2007).

8.1.1 Nejvýznamnější markery CRC

Velký potenciál představuje výzkum miRNA, spojený s progresí CRC a reakcí na terapii. U některých miRNA byla zjištěna odlišná regulace v adenomu a v karcinomu. Pomocí expresních vzorů lze rozlišit normální sliznici tlustého střeva od adenomu či karcinomu, což dokazuje roli miRNA při iniciaci rakoviny. (Schetter *et al.*, 2012). Vývoj CRC je provázen změnami exprese několika genů. Jedna z epigenetických změn, která může přispět k tvorbě CRC je abnormální hypermetylace promotorů, která vede ke snížení či až absenci exprese genu (Kim *et al.*, 2010).

Studie z prosince roku 2015 poukazuje na možnost detekce miRNA aberací nacházejících se ve vzorcích lidské stolice. Tato neinvazní metoda by mohla být využita jako nový screening CRC. Cílem této studie bylo charakterizovat zvýšení exprese miRNA-20a ve srovnání se zdravými jedinci. V této studii bylo také zjištěno, že použití antibiotik nemá na miRNA-20a žádný vliv (Yau *et al.*, 2015).

Mezi nejvýznamnější miRNA patří mimo jiné miR-21, miR-155 a miR-92:

- miR-21 je jedním z nejvíce studovaných onkogenních miRNA, jejíž exprese je často zvýšena u CRC. miR-21 reguluje buněčnou proliferaci, buněčnou invazi a apoptózu. Hladina exprese miR-21 koreluje se stadiem onemocnění, zvyšuje se s pokročilostí onemocnění a její nárůst zkracuje celkovou dobu přežití (Ye *et al.*, 2014).
- Zvýšená regulace miR-155 v kolorektálních rakovinných buňkách napomáhá buněčné proliferaci, migraci a invazi a zvyšuje chemorezistenci (Ye *et al.*, 2014).
- Huang *et al.* (2010) zjistili, že při porovnání plazmy zdravých jedinců a pacientů s pokročilými nádory, je u nemocných výrazně zvýšena hladina miR-92. Zvýšené množství miR-92a je prokazatelná u karcinomu plic, kolorektálního karcinomu, lymfomu, mnohočetného myelomu a meduloblastomu (Nishida *et al.*, 2012).

Další miRNA spojené s iniciací či progresí CRC jsou uvedeny v Tab. 1.

Rakovinné buňky se skládají z nádorových buněk a stromálního okolí buňky, zahrnujícího imunokompetentní buňky, endoteliální buňky a fibroblasty. Stromální karcinom interaguje s karcinomem tkáně přímo nebo nepřímo pomocí cytokininů, a tím vytváří mezeru pro rakovinné buňky (Trimboli *et al.*, 2009). Stroma rakovinných buněk hraje důležitou roli v progresi rakoviny. Přestože byly změny v expresi miRNA zkoumány u různých druhů rakovin, exprese miRNA ve stromatu nebyla prozkoumána příliš podrobně. U CRC je v rakovinných stromálních tkáních exprese miRNA snížena ve srovnání s normální stromální tkání. Nishida *et al.* (2012) při svém výzkumu zjistil, že exprese stromální miRNA je při kolorektálním karcinomu velmi podobná jako v epitelových tkáních. Patologické analýzy ukázaly, že je exprese stromální miRNA spojena s maligním potenciálem rakoviny.

Tab. 1 miRNA spojené s CRC (Wu *et al.*, 2011)

miRNA	Deregulace	Vliv	Cílové geny
let-7a	snížená	proliferace	<i>c-Myc, DLD-1, Ras</i>
miRNA-9	snížená	metastáze	---
miRNA-17	zvýšená	---	<i>E2F1</i>
miRNA-21	zvýšená	proliferace, metastáze	<i>PTEN, CDC25A, PDCD4</i>
miRNA-31	snížená	---	<i>FIH-1</i>
miRNA-34a	snížená	proliferace, apoptóza	<i>E2F1, SIRT1</i>
miRNA-101	snížená	---	<i>COX-2</i>
miRNA-129	snížená	proliferace	<i>P85 β</i>
miRNA-133b	snížená	proliferace, apoptóza	<i>c-Met</i>
miRNA-135a	zvýšená	---	<i>APC</i>
miRNA-137	snížená	proliferace	<i>Cdc42, LSD-1</i>
miRNA-143	snížená	proliferace	<i>Ras, Erk5, DNMT3A</i>
miRNA-145	snížená	proliferace, apoptóza	<i>IRS1, STAT1, YES, FLI1</i>
miRNA-155	zvýšená	oprava DNA	<i>MSH2, MSH6, MLH1</i>
miRNA-181b	zvýšená	transformace	<i>CYLD</i>
miRNA-183	zvýšená	kmenovitost	<i>Sox2, Klf4</i>
miRNA-192	snížená	proliferace	<i>DHFR</i>
miRNA-195	snížená	apoptóza	<i>Bcl-2</i>
miRNA-200c	zvýšená	epiteliální- mezenchymový přechod	<i>TGFβ2, ZEB1</i>
miRNA-203	zvýšená	kmenovitost	<i>Sox2, Klf4</i>
miRNA-215	snížená	proliferace	---
miRNA-342	snížená	apoptóza	---

Kalmár *et al.* (2015) se snažili potvrdit vztah mezi expresí genů, DNA metylací, expresí miRNA a hladinou proteinu analyzovaných kandidátských markerů. Geny potencionálně regulované metylací byly v této analýze vybrány z dřívějších mikročipových experimentů.

Při kolorektální progresi adenom-karcinom byla snižená regulace u těchto genů: *BCL2*, *CDX1*, *ENTPD5*, *MAL*, *PRIMA1*, *PTGDR*, *SFRP1*, *SULT1A1*, zatímco u genů *ALDH1A3*, *COL1A2*, *CYP27B1*, *FADSI*, *PTGS2*, *SFRP2*, *SOCS3*, *SULF1*, *THBS2*, *TIMP1* byla regulace ve srovnání se vzorky od zdravých pacientů naopak zvýšená.

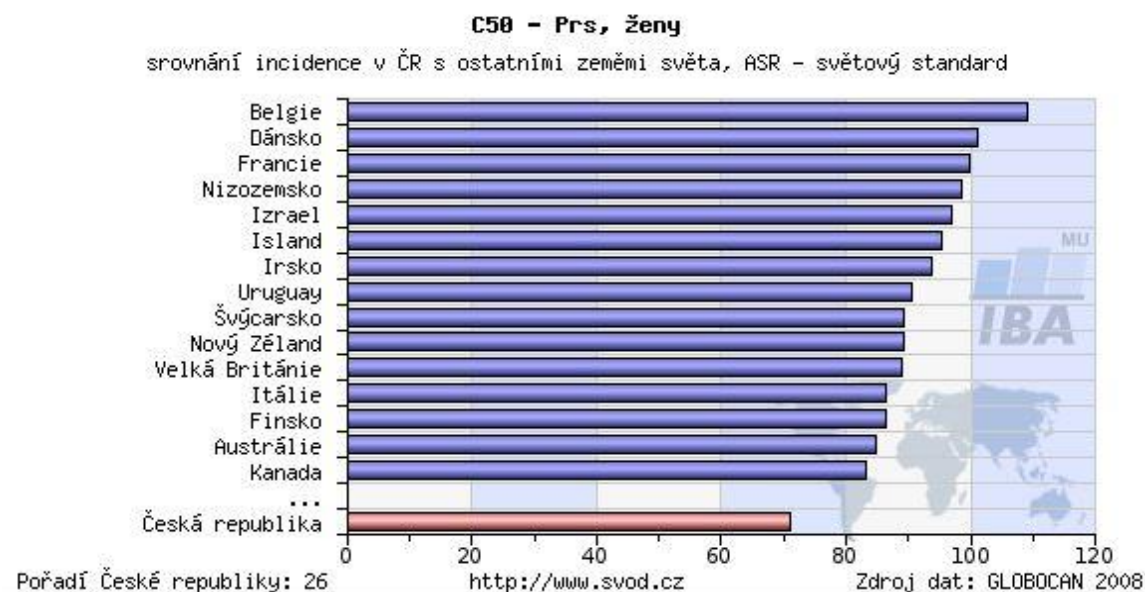
Mikročipový experiment odhalil 12 genů (*BCL2*, *CDX1*, *CYP27B1*, *ENTPD5*, *MAL*, *PRIMA 1*, *PTGDR*, *PTGS2*, *SFRP1*, *SOCS3*, *SULT1A1*, *TIMP1*) s výrazně odlišnými transkripčními funkcemi v adenomu ve srovnání s normálním vzorkem, zatímco 6 genů (*ALDH1A3*, *COL1A2*, *FADSI*, *SFRP1*, *SULF1*, *THBS2*) vykazovalo jedinečné změny genové exprese pouze ve vzorcích CRC. *COL1A2*, *SFRP2*, *SOCS3* vykazaly hypermetylací v adenomu a ve vzorcích CRC. Zatímco *BCL2*, *PRIMA 1*, *PTGDR* ukázaly hypermetylací jen u CRC. Zvýšená regulace zjištěného miRNA-21 byla jak u adenomu, tak i u karcinomu.

Dalším možným vhodným markerem CRC je mutace genu *K-ras*. Přibližně u 40 % pacientů s CRC bývá nalezena mutace genu *K-ras*, nejčastěji se jedná o bodovou mutaci kodonu 12 (záměna glycinu za valin/asparagin), následovanou mutacemi v kodonu 13 a 61. Gen *K-ras* kóduje na membránu vázaný protein s GTPázovou aktivitou, který zprostředkovává signální přenos mezi EGFR a dalšími proteiny proliferací kaskády Ras/Raf/MEK/ERK (Brand *et al.*, 2012).

8.2 Karcinom prsu

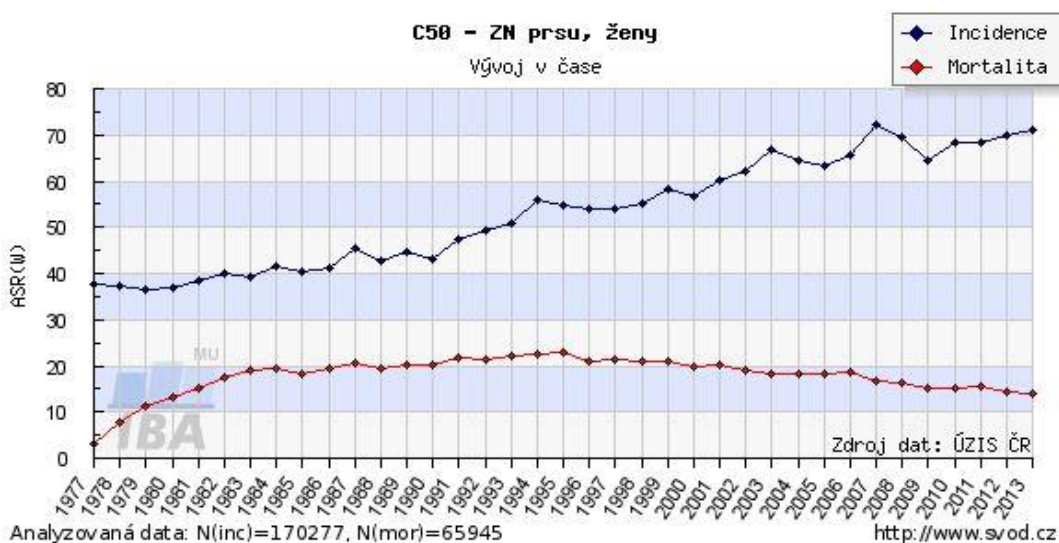
Nejčtenější ZN u žen v ČR je ZN prsu s 8 % záznamů v registru. Přestože je raná léčba karcinomu velmi úspěšná, je ZN prsu stále nejčastější onkologickou příčinou smrti u žen (Zvolský, 2014). Ve srovnání s ostatními zeměmi světa je Česká republika se svou incidencí ZN prsu na 26. místě (Graf 5).

Graf 5 Porovnání incidence rakoviny prsu v ČR a ve světě (Dušek *et al.*, 2015)



Od 80. let do poloviny 90. let 20. století lze sledovat mírně stoupající tendenci jak incidence, tak i mortality. Po tomto období incidence prudce vzrůstá a mortalita mírně klesá. V roce 2011 bylo zjištěno 6 620 nových případů ZN prsu, což představuje více než 16,2 % ze všech hlášených ZN u žen. Míra incidence oproti předchozímu roku vzrostla, pravděpodobně v souvislosti se zavedeným screeningovým programem (Graf 6). I když je léčba karcinomu prsu velmi úspěšná, i tak v roce 2011 zemřelo v ČR na toto onemocnění 1725 žen (ÚZIS, 2015).

Graf 6 Vývoj ZN prsu v ČR v letech 1977-2013 (Dušek *et al.*, 2015)



Zhoubnému onemocnění prsu neumíme předcházet, nádory jsou však zobrazitelné v časných stádiích i u žen bez klinických příznaků. Od 9.9.2002 byl schválen mamografický screening nádorů prsů u žen ve věku 45–69. V roce 2008 dosáhl mamografický screening pokrytí 50 % populace, od té doby dochází ke zvyšování. Počet vyšetřovaných žen se nejvíce navýšil v roce 2010, kdy byla zrušena věková hranice pro vstup do programu (Tab. 2) (Skovajsová *et al.*, 2014).

Tab. 2 Vývoj počtu vyšetřených žen pomocí screeningu karcinomu prsu a počtu zachycených ZN prsu v letech 2007–2012 (Skovajsová *et al.*, 2014)

Rok	2007	2008	2009	2010	2011	2012
počet vyšetřených žen	469 104	468 393	435 679	538 376	555 537	602 099
počet zachycených karcinomů	2 548	2 165	2 021	2 909	3 027	3 270
detekční míra (na 1 000 vyšetření)	5,4	4,6	4,6	5,4	5,4	5,4

Stanovení prognózy rakoviny prsu pomocí aplikace čipových technologií začalo přinášet povzbudivé výsledky. V nezávislé studii byly porovnávány výsledky DNA čipové analýzy a biopsie prsu. Expresní genový profil identifikovaný DNA čipy koreloval s klinickými výsledky biopsie prsu. Díky tomu se DNA čipy začaly využívat v klinické praxi (Malinowski, 2007; Fan *et al.*, 2010).

Rakovina prsu je heterogenní onemocnění a rozmanité molekulární změny v buňkách způsobují problémy v klasifikaci nádoru, která je velmi důležitá pro predikci onemocnění. Genová exprese pomocí mikročipů dává možnost nahlédnout na složitost nádoru a upřesňuje prognózu stanovenou na základě klinického hodnocení. Komerčně dostupných a používaných mikročipů je několik typů, např. MammaPrint 70-ti genový test, který byl schválen směrnicí FDA (Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) jako prognostický (Tian *et al.*, 2010).

8.2.1 Klasifikace karcinomu pomocí receptorů

Karcinom prsu lze klasifikovat podle přítomnosti některých receptorů, do nichž patří estrogenový receptor (ER), progesteronový receptor (PgR) a HER 2 (Palácová, 2008).

Jaderné transkripční faktory jsou přítomné jak ve zdravé prsní tkáni, tak i ve většině nádorových buněk. Jedná se o ER a PgR. Tyto receptory závisejí na vývoji mléčné žlázy a na expresi steroidních hormonů estrogenu a progesteronu. U 75 % případů karcinomu prsu jsou přítomny ER (Weigel *et al.*, 2010). Pomocí profilování genové exprese lze vymezit 5 subtypů rakoviny prsu. Skupiny luminální typ A a B jsou ER+, další skupina nadměrně exprimuje HER 2. Mezi skupinu bazálního typu patří nádory s vysokou expresí genů bazálních epiteliálních buněk. Poslední skupina, charakterizovaná pozitivou cytokeratinů a absencí ER a PgR, se nazývá basal-like. Většina basal-like nádorů jsou triple negativní s vysokou proliferací a expresí *p53* (Palácová, 2008).

Protoonkogen *HER2* kóduje transmembránový protein p185, patřící do rodiny receptorů pro epidermální růstový faktor (EGFR/ErbB). Za fyziologických podmínek reguluje buněčný růst, diferenciaci, proliferaci a apoptózu. Amplifikace způsobující nadměrnou expresi proteinu HER2 bývá nalezena přibližně u 15–20 % pacientů s karcinomem prsu. HER2 pozitivní nádory prsu jsou agresivnější, často metastazují do CNS a jsou méně citlivé na standardní chemoterapii (Koudeláková, 2012).

V roce 2012 byl vyvinut online nástroj pro diagnostiku rakoviny prsu pomocí mikročipů. Využívá se pro analýzu recidivy rakoviny prsu a stavu hormonálního receptoru. Obsahuje tři hlavní aplikace, a to predikci odpovědi na hormonální léčbu (stav ER), predikci odpovědi na cílenou terapii (stav *HER2*) a odhad přežití u pacientů (Ringnér *et al.*, 2011).

Pro odlišení nádorů bazálních od luminálních lze detekovat dysfunkci BRCA1 dráhy, způsobené metylací promotoru nebo transkripční inaktivací genu *BRCA1* (Sotiriou *et al.*, 2009). *BRCA1* je jedním z nejčastějších mutovaných genů u pacientů s rakovinou prsu. Nositelky se zárodečnou mutací v *BRCA1* mají vysoké riziko vzniku rakoviny prsu, rakoviny vaječníků a dalších typů rakoviny. *BRCA1* se podílí na udržování genomové integrity, účastní se oprav DNA v kontrolním bodu buněčného cyklu,

řízení apoptózy a segregace chromozomů. Jedním z nejdůležitějších úkolů je podpora homologní rekombinace při opravě poškozené DNA v průběhu buněčného cyklu (Odovan *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015).

Lee *et al.* (2015) zjistili, že heterochromatin protein 1 (HP1) je velmi důležitý pro správnou činnost BRCA1 při poškození DNA. Členové ze skupiny HP1 (HP1 α , β a γ) jsou většinou spojeny s heterochromatinem a hrají důležitou roli v genové regulaci a reakci na poškození DNA. Změněná exprese podtypu HP1 má vážný dopad na buněčnou proliferaci a vznik nádorů. Lee *et al.* (2015) analyzovali profil exprese skupiny HP1 pomocí publikovaných souborů dat z mikročipů spolu s analýzou retrospektivní imunohistochemie z archivovaných vzorků rakoviny prsu. Zjistili, že skupina pacientů s nadměrnou expresí *HP1 β* mRNA vykazuje spojení se zhoršenou diferenciací nádorů prsu a s výrazně nižší mírou přežití. Pozitivní stránka se ukrývá v možnosti využití HP1 β , nadbytek tohoto proteinu může sloužit jako prediktivní marker pro chemoterapii.

8.2.2 Nádorové markery rakoviny prsu

Nádorové markery hrají v diagnostice karcinomu velkou roli. Kromě samotné diagnostiky mohou být využity pro predikci prognózy a progresu onemocnění. Výsledky studií pomocí DNA čipů odhalily, že rakovina prsu zahrnuje molekulárně odlišné nádorové onemocnění.

V roce 2005 byla poprvé dokázána spojitost miRNA s rakovinou prsu. Tuto koleraci identifikovali Iorio *et al.* (2005) spojením mikročipového experimentu s Northern blotting analýzou. Zjistili 29 miRNA, jejichž exprese byla značně deregulována. Mezi zjištěná miRNA patřily miRNA-10b, miRNA-125b, miRNA-145, miRNA-155, miRNA-21.

Ve většině případů je rakovina prsu způsobena genetickými abnormalitami, např. změnami v penetranci genů *BRCA1*, *BRCA2*, *p53*, *PTEN*, *ATM*, *NBS1*, *LKB1*, *AR*, *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK2*, *DIRAS3*, *ERBB2*, *NBN*, *PALB2*, *RAD5* a *RAD51* (Kumar *et al.*, 2012).

Triple negativní karcinom prsu (Triple Negative Breast Cancer, TNBC) tvoří 15 % všech karcinomů prsu. Vyznačuje se nedostatkem receptorů ER, PgR a HER 2/neu, a proto je těžko specifikovatelný. V polovině roku 2015 Godfrey *et al.* porovnávali profily exprese miRNA z TNBC. Ukázalo se, že TNBC buňky mají ve srovnání s normálními buňkami rozdílnou expresi miRNA. Na základě této skutečnosti byla miRNA rozděleny na:

- miRNA, které mají sníženou expresi či jsou dokonce potlačeny v TNBC buněčných liniích: miRNA-27a, miRNA-29a, miRNA-100, miRNA-34a, let-7a, miRNA-125B, miRNA-203, let-7f, miRNA-503, miRNA-424;
- miRNA se zvýšenou regulací: miRNA-222, miRNA-16-1, miRNA-195, miRNA-155, miRNA-421, miRNA-126, miRNA-335, miRNA-145, miRNA-34b, miRNA-10b, miRNA-10.

8.2.3 Hypoxie a karcinom prsu

Buňky podléhají řadě biologických procesů, pokud jsou umístěny v hypoxických podmínkách, čili v nedostatku kyslíku (Harris, 2002). Tyto procesy řídí hypoxií indukovatelné faktory (HIF), tzv. kyslíkové faktory, které zajišťují komplexní transkripční odpověď, která ovlivňuje několik biologických procesů souvisejících s osudem buněk za těchto podmínek, včetně glykolýzy, abiogeneze a apoptózy (Hockel *et al.*, 2001; Harris, 2002). HIF faktory jsou heterodimery složené z α a β subjednotek, z nichž HIF-1 α a HIF-2 α zaujímají důležité regulační role v reakci na hypoxii. Hladina HIF- α proteinů je regulována proteinem Von Hippel Lindau (VHL), který zprostředkovává ubikvitinaci HIF- α specifickým rozpoznáním a navázáním na 2 zbytky prolylhydroxylázy, vznikající k rychlému odstranění HIF- α . HIF- α prolyl hydroxylace je katalyzována třemi homologními 2-oxoglutarát dependentními dioxygenázami (PHD1, PHD2 a PHD3). Další kontrola exprese HIF- α je uskutečňována dioxygenázou, zvanou HIF1 inhibující faktor (FIH1). FIH 1 katalyzuje tvorbu specifického zbytku hydroxyasparaginy v HIF- α , který snižuje vazbu na transkripční koaktivátor p300. Jelikož je hydroxylace zbytků HIF- α PHD a FIH závislá na kyslíku, HIF- α je schopen uniknout rozpoznání VHL a další

proteasomická degradace za hypoxických podmínek se váže na p300 a HIF- β a vyvolává transkripční změny, které ovlivňují miRNA (Camps et al., 2014).

Pokud hypoxie trvá, může dojít až k apoptóze buněk, ale rakovinné buňky jsou adaptabilní, což umožňuje nádorům přežití a dokonce i růst za hypoxických podmínek. Hypoxie nádoru je spojena se špatnou prognózou, jelikož má charakteristický rys lokálně pokročilých nádorů a může vést až k odolnosti vůči radiační terapii. Mnoho prvků hypoxické reakce jsou vhodnými kandidáty pro terapeutické zaměření (Harris, 2002). Hypoxické oblasti vznikají v důsledku nerovnováhy mezi dodáváním a spotřebou kyslíku. Zatímco v normálních tkáních je přívod kyslíku roven metabolickým požadavkům, v lokálně pokročilých nádorech může rychlost spotřeby kyslíku převážit omezený přísun kyslíku. Celý tento proces vede k rozvoji nádoru v částech tkání s nižší úrovní kyslíku (Vaupel et al., 2007).

Důkaz o hypoxii v lidských nádorových onemocněních provedli Vaupel *et al.* (2007), kteří studovali zásobování nádoru kyslíkem pomocí kyslíkové elektrody. Dokázali, že nízký tlak v nádorech je spojen se zvýšenými metastázemi a nízkým přežitím pacientů, kteří trpí nádory hlavy, krku, děložního čípku nebo prsu.

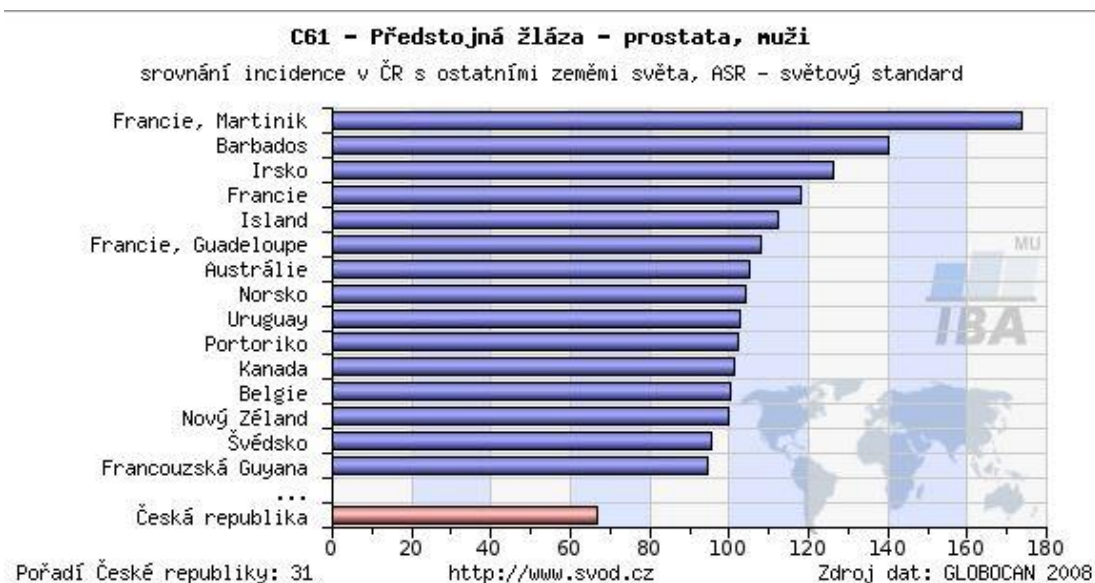
Z některých experimentů prováděných na DNA čípech lze vyvodit určité důkazy, že se HIF přímo podílí na regulaci exprese při hypoxii. Mnoho nádorů je charakterizováno oblastí hypoxie, zvýšeným množstvím HIF a zvýšenou expresí genů regulujících hypoxii. První screening pomocí mikročipů u rakoviny prsu regulované miRNA ukázal, že hypoxie by mohla být klíčovým faktorem miRNA k odlišení rakoviny. Vztah mezi vazbou HIF a regulací miRNA je velmi široký. Pomocí analýzy DNA čipů bylo zjištěno, že nejvýraznější změnou v hypoxii je indukce hsa-miR-210 (miRNA související s hypoxií). Regulace hypoxie hsa-miR-210 je zprostředkována HIF-1 alfa. Hladina hsa-miR-210 přímo koreluje s rozsahem hypoxie (Camps et al., 2014).

Další pozitivní korelace miRNA s hypoxií existuje u karcinomu prsu u hsa-miR-24-3p a hsa-miR-27-3p (Camps *et al.*, 2014).

8.3 Karcinom prostaty

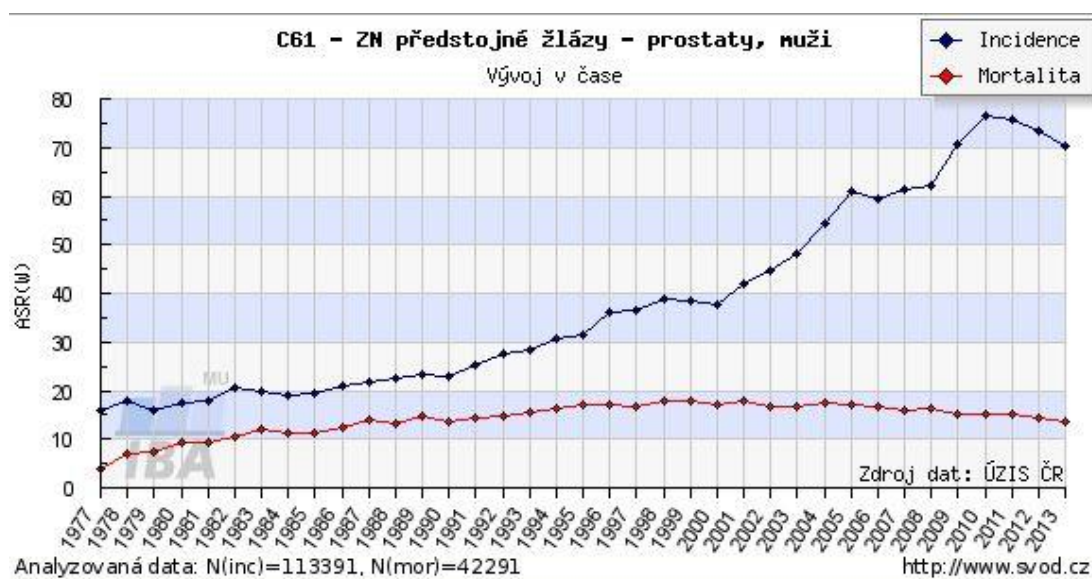
Karcinom prostaty je onemocnění charakterizované abnormálním dělením epitelálních prostatických buněk. Karcinom prostaty (CaP) je nejčastějším nádorem u mužů v Evropě a Spojených státech amerických. Česká republika je svou incidencí na 31. místě (Graf 7).

Graf 7 Porovnání incidence prostaty ve světě (Dušek *et al.*, 2015)



Od roku 2005 je i nejčastějším zhoubným nádorem u mužů v České Republice (Hradil *et al.*, 2014). V roce 2011 bylo nahlášeno 6964 případů ZN prostaty, což je o 1 % více než v roce 2010. Incidence CaP se neustále zvyšuje, ale mortalita zůstává na stejné úrovni a nezvyšuje se (Graf 8). Rápidní nárůst incidence je pozorován od začátku 90. let (ÚZIS, 2015). V roce 2013 bylo v ČR nově diagnostikováno 6846 pacientů se ZN prostaty, což představuje 7 % všech nově zjištěných nádorů (Dušek, 2015).

Graf 8 Vývoj ZN prostaty v ČR v letech 1977–2013 (Dušek *et al.*, 2015)



Zavedením rutinního preventivního testování prostatického antigenu (PSA) v 80. letech 20. století pravděpodobně vedlo ke zvýšení incidence tohoto onemocnění. Právě vyšetřování PSA vedlo k posunu v zastoupení jednotlivých stadií CaP směrem k časnějším formám, což ovlivnilo pozitivní mírou vyhlídky těchto pacientů (Král *et al.*, 2010). PSA byl identifikován v roce 1969 a je nejvýznamnějším nádorovým markerem včasné detekce CaP. Zvýšenou hladinu PSA můžeme detekovat i u jiných onemocnění, např. u zánětu prostaty a po některých urologických vyšetřeních. PSA je produkován epiteliálními buňkami prostaty. Z chemického hlediska je to jednořetězový glykoprotein s 237 aminokyselinami (Štern *et al.*, 2008)

V roce 2005 však byla publikována práce, která by mohla představovat zásadní průlom v této problematice. Pomocí nově vyvinuté metody COPA (Cancer Outlier Profile Analysis) bylo zjištěno, že u většiny prostatických nádorů jsou silně exprimovány transkripční faktory ERG nebo ETV1 patřící do rodiny ETS proteinů (Tomlins *et al.*, 2005).

8.3.1 Nejvýznamnější markery CaP

Do roku 2010 bylo provedeno pouze 5 mikročipových studií miRNA spojených s CaP (Porkka *et al.*, 2007). Další studii provedli Lein *et al.* (2010), kteří při porovnání s ostatními zjistili, že se některé výsledky liší. Čtyři miRNA se sníženou regulací (hsa-miRNA-16, hsa-miRNA-31, hsa-miRNA-181b, hsa-miRNA-184) byly v jiných studiích uvedené jako miRNA se zvýšenou regulací (Volinia *et al.*, 2006; Ambs *et al.*, 2008)

V roce 2011 bylo zveřejněno 25 miRNA spojených s CaP: let-7a, miR-101, miR-106a, miR-106b, miR-141, miR-145, miR-17, miR-182, miR-200c, miR-20a, miR-21, miR-214, miR-221, miR-222, miR375 a miR-93 (Wach *et al.*, 2011).

miRNA-135b byla dříve spojena s CRC a rakovinou prsu. V CaP buňkách je její exprese snižená (Bhattacharya *et al.*, 2012). miRNA-135b inhibuje migraci a invazi CaP buněk. Wang *et al.* (2015) identifikovali *STAT6* jako předpokládaný cíl miRNA-135b. Aktivovaný *STAT6* indukuje expresi různých genů zapojených do buněčné diferenciaci, proliferace, metastáze a rezistence apoptózy (Hebenstreit *et al.*, 2006).

Jejich cílem bylo zjistit souvislost mezi miRNA-135b a *STAT6*. Výsledky studie ukázaly, že zvýšená regulace miRNA-135b inhibuje expresi *STAT6* v CaP buňkách. Souhrnné údaje ukazují, že miRNA-135b upravují metastatickou schopnost CaP buněk regulací exprese *STAT6* (Wang *et al.*, 2015).

Xiaoli *et al.* (2015) zjistili 162 odlišně exprimovaných miRNA mezi vzorky normálními a CaP, 128 jich bylo se zvýšenou regulací a 38 sníženou regulací. Jako skvělé prognostické a prediktivní markery z nich identifikovali:

- hsa-miR-153-2, hsa-miR-92a-1 a hsa-miR-182 se zvýšenou regulací;
- hsa-miR-29a, hsa-miR-10a a hsa-miR-221 se sníženou regulací.

Mezi další markery můžeme zahrnout PSGR (Prostate Specific G protein Coupled Receptor), u kterého bylo zjištěno, že má omezenou expresi v prostatických tkáních. Míra *PSGR* mRNA se výrazně zvyšuje ve vzorcích CaP ve srovnání s kontrolním vzorkem, může tak hrát výraznou roli v rozvoji a progresi rakoviny (Xu *et al.*, 2000).

Cao *et al.* (2015) toto potvrdili svou studií, kde porovnávali velký soubor pacientů s intraepiteliální neoplazií (PIN) a CaP. Vysoká exprese PSGR byla pozorována v PIN, nikoliv však v CaP.

Hlavní klinické dilema při léčbě rakoviny prostaty je vysoký počet indolentních případů, se kterými se pojí významné riziko nadměrné léčby. Mortensen *et al.* (2015) provedli studii pro identifikaci transkriptů, které vymezují agresivní a indolentní rakovinu. Cílem studie bylo získat znalosti o biologických drahách spojených s agresivitou onemocnění. Identifikovali expresi *SFRP4*, *INHBA*, *COL1A2*, *IGFBP3* a *MSRI* spojenou s recidivou onemocnění.

9. Závěr

Diagnóza rakoviny a výběr vhodné terapie je jednou z neobtěžnějších oblastí medicíny. Velký optimismus je proto vkládán do nových technologií, jako je například využití DNA čipů, které by mohly být přínosem. Nicméně tato oblast výzkumu naráží i na překážky. V nedávné minulosti zpochybňovaly některé publikace jejich spolehlivost. Kritika byla na straně neschopnosti replikovat výsledky. Vzhledem k velkému počtu genů na mikročipu, vysoké korelaci mezi geny, malému počtu vzorků v souboru dat a velkému rozptylu mezi vzorky pacientů byl vidět malý přesah mezi genovými popisy identifikovanými různými výzkumnými skupinami. Tyto negativní faktory lze nyní pomocí jednotlivých technologií zčásti eliminovat. Nejvýznamnější je zde normalizace, která odstraní systematické chyby analýzy a umožňuje správné vyhodnocení pomocí statistické analýzy.

Zásadní revoluce v klinické analýze je poznání lidského genomu. Informace o sekvencích různých genů, které jsou zodpovědné za určité onemocnění, se získává molekulárně genetickými analýzami. Poté se ukládají do veřejných databází, díky nimž lze získat informace o dosud identifikovaných mutacích ve vazbě ke konkrétnímu onemocnění. Soubor dat se neustále rozrůstá, jelikož jsou neustále objevovány nové markery používané k detekci onkologického onemocnění.

Ve vývoji metody DNA microarray se dosáhlo během posledním let velkého pokroku. DNA čipy se dříve využívaly jen ve výzkumu onkologických onemocnění, ale za posledních 10 let má tato metoda prokazatelný úspěch i v klinické onkologii. Roku 2007 založil Americký úřad pro potraviny a léčiva první testování pomocí DNA čipu pro prognózu rakoviny prsu (Fan *et al.*, 2010). DNA čipy skýtají možnost urychlení diagnostiky a dalším pokrokem je využití meta-analýzy, která umožňuje identifikovat potenciální výskyt vzájemných sdružení konkrétních typů nádorů.

Do budoucnosti lze předpokládat vyšší využitelnost DNA čipů v diagnostice onkologických onemocnění, zvýšení účinnosti terapie, snížení její toxicity i nákladů na tuto terapii. Dalším přínosem by mohlo být sledování průběhu onemocnění a účinnosti léčby.

10. Seznam zkratek

ANOVA	Analysis of Variance; Metoda analýzy rozptylu
BRCA1	Breast cancer 1, Rakovina prsu 1
BRCA2	Breast cancer 2, Rakovina prsu 2
CaP	Prostatic carcinoma; Karcinom prostaty
cDNA	complementary DNA; komplementární DNA
CGH	Comparative Genomic Hybridization; Komparativní genomová hybridizace
COPA	Cancer outlier profile analysis; Analýza odlehlých hodnot
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine; cytosin-fosfát-guanin
CRC	Colorectal carcinoma; Kolorektální karcinom
Cy 3	Indokarbocyanin (zelené barvivo)
Cy 5	Indodikarbocyanin (červené barvivo)
DNA	Deoxyribonucleic acid; Deoxyribonukleová kyselina
E2F3	E2F transcription factor 3; E2F transkripční faktor 3
EGFR/ErbB	Epidermal Growth Factor Receptor; Epidermální růstový faktor
ER	Estrogen Receptor; estrogenový receptor
FDA	Food and Drug Administration; Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FIH1	Faktor inhibující HIF1
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization; Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
gTOKS	guajakový test na okultní krvácení do stolice
HER 2	Receptor tyrosin-protein kinase erbB-2; Receptor 2 pro lidský epidermální růstový faktor
HIF	Hypoxia Inducible Factor; Hypoxií indukovatelné faktory
HP1	Heterochromatin Protein 1; Heterochromatinový protein 1
hsa-miR	lidské miRNA

LOH	Loss of Heterozygosity; Ztráta heterozygotity
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA; mediátorová RNA
NOR	Národní onkologický registr
PIN	Prostatická intraepitální neoplazie
PSA	Prostatický antigen
PSGR	Prostate Specific G protein couple Receptor; Prostatický specifický G protein
RNA	Ribonucleic acid; Ribonukleová kyselina
PgR	Progesterone Receptor; Progesteronový receptor
RT-PCR	Reverse transkripce - Polymerase Chain Reaction; Reverzní transkripce - PCR
SAM	Significance Analysis of Microarrays; Signifikace analýz mikročipů
SZÚ	Státní zdravotnický ústav
TNBC	Triple Negative Breast Cancer; Triple negativní karcinom prsu
TOP2A	DNA topoisomerase 2-alpha; DNA topoizomeráza 2-a
TCGA	The Cancer Genome Atlas; Databáze rakovinných genomů
TSG	Tumor suppressor gene; Tumor supresorový gen
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky
VHL	Protein Von Hippel Lindau
ZN	Zhoubný novotvar

11. Seznam použité literatury

- AFFYMETRIX TECHNOLOGY [online], 2012, aktualizováno 4. 12. 2012. [cit. 2015-08-05]. Dostupné z: <http://www.dkfz.de/gpcf/24.html>
- ALLTON, K., *et al.* (2009): Trim24 targets endogenous p53 for degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 28: 11612-11616.
- AMBS, S., *et al.* (2008): Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Research*, 68, 15: 6162-6170.
- BABU, M. M. (2004): Introduction to microarray data analysis. *Computational Genomics: Theory and Application*, 225-249.
- BALDI, P., LONG, A. D. (2001): A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics*, 17, 6: 509-519.
- BARBULOVIC - NAD, I., *et al.*, (2006): Bio-microarray fabrication techniques - a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 26, 4: 237-259.
- BEHESHTI, B., PARK, P. C., BRAUDE, I., SQUIRE, J. A. (2003): Microarray CGH. *Molecular*, 191-207.
- BERTUCCI, F., *et al.* (2002): Gene expression profiles of poor-prognosis primary breast cancer correlate with survival. *Human Molecular Genetics*, 11, 8: 863-872.
- BHATTACHARYA, A., ZIEBARTH, J. D., CUI, Y. (2012): Systematic analysis of microRNA targeting impacted by small insertions and deletions in human *PLoS One*, 7:9.
- BOUNDLESS., Tumor supresor genes. [online], aktualizováno 8. 1. 2016 [cit 2016-03-20]. Dostupné z: <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/cell-reproduction-10/cancer-and-the-cell-cycle-90/tumor-suppressor-genes-401-11628/>
- BRAND, T. M., WHEELER, D. L. (2012): KRAS mutant colorectal tumors: past and present. *Small GTPases*, 3, 1: 34-39.
- BUMGARNER, R. (2013): Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1-22.
- BUSTIN, S. A. (2002): Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29,1: 23-39.
- CALIN, G. A., *et al.* (2002): Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 24: 15524-15529.
- CAMPS, C., *et al.* (2014): Integrated analysis of microRNA and mRNA expression and association with HIF binding reveals the complexity of microRNA expression regulation under hypoxia. *Molecular Cancer*, 13, 28: 1476-4598.
- CANCER GENOME ATLAS NETWORK, *et al.* (2012): Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487, 7407: 330-337.

- CAO, W., *et al.* (2015): Prostate specific G protein coupled receptor is associated with prostate cancer prognosis and affects cancer cell proliferation and invasion. *BioMed Central Cancer*, 15, 1: 915.
- CIU, X., *et al.* (2005): Improved statistical tests for differential gene expression by shrinking variance components estimates. *Biostatistics*, 6, 1: 59-75.
- CUI, X., CHURCHILL, G. A. (2003): Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biology*, 4, 4: 210.
- DRUKER, B. J., *et al.* (2001): Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 344, 14: 1031-1037.
- DUŠEK L., MUŽÍK J., MALÚŠKOVÁ D., MÁJEK O., PAVLÍK T., ABRAHÁMOVÁ J., VYZULA R., FÍNEK J. (2012): Epidemiologie kolorektálního karcinomu v ČR. In: DUŠEK L. *et al.* (eds.), Epidemiologie, prevence a léčba kolorektálního karcinomu dle dostupných českých a mezinárodních dat. Fakultní nemocnice v Motole, Praha, 204 s.
- DUŠEK L., MUŽÍK J., KUBÁSEK M., KOPTÍKOVÁ J., ŽALOUDEK J., VYZULA R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2015], [cit. 2016-3-03]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>.
- ECKSCHLAGER, T., PRŮŠA, R. (2002): Laboratorní vyšetření v onkologii: molekulárně biologické a imunologické vyšetření pacientů s nádory. 1.vyd. Praha: Triton, 254 s.
- EISEN, M. B., *et al.* (1998): Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 25: 14863-14868.
- Fan, Y. S. (2002): Molecular cytogenetics: protocols and applications. New Jersey: Humana Press, 204 s.
- FAN, J., *et al.* (2005): Removing intensity effects and identifying significant genes for Affymetrix arrays in macrophage migration inhibitory factor-suppressed neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 49: 17751-17756.
- FEARON, E. R., VOGELSTEIN, B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 5: 759-767.
- FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., ERVIK, M., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D.M., FORMAN, D., BRAY, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [online]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013. Dostupné z: <http://globocan.iarc.fr>, 2/4/2015
- FODOR, S. P. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel. *Science*, 767-773.
- GODFREY, S. S., *et al.* (2015): Microarray analysis reveal differential expression of microRNAs in triple negative breast cancer and normal breast cells, 6:1.
- GONZÁLEZ, S., *et al.* (2010): CliDaPa: A new approach to combining clinical data with DNA microarrays. *Intelligent Data Analysis*, 14, 2: 207.
- GRAY, J. W., COLLINS, C. (2000): Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis*, 21.3, 443-452.

- GUO, Q. M. (2003): DNA microarray and cancer. *Current Opinion in Oncology*, 15.1: 36-43.
- GYORGY, A. B., *et al.* (2010): Reverse phase protein microarray technology in traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Methods*, 192, 1: 96-101.
- HALL, D. A., PTACEK, J., SNYDER, M. (2007): Protein microarray technology. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128, 1: 161-167.
- HARRIS, A. L. (2002): Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*, 2, 1: 38-47.
- HEBENSTREIT, D., *et al.* (2006): Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 17, 3: 173-188.
- HGNC, Statistics & Downloads [online], aktualizováno 12. 12. 2015. [cit. 2015-12-12]. Dostupné z: <http://www.genenames.org/cgi-bin/statistics>
- HOFMANOVÁ J., Genotoxicita a karcinogeneze. [online], 2013 [cit 2016-02-20]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html
- HÖCKEL, M., VAUPEL, P. (2001): Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 4: 266-276.
- HRADIL, D., *et al.* (2014): Diagnostika a staging karcinomu prostaty. *Onkologie*, 8, 1: 15-18.
- HUANG, Z., *et al.* (2010): Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 127, 1: 118-126.
- IORIO, M. V., *et al.* (2005): MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*, 65,16: 7065-7070.
- JAIN, S., *et al.* (2013): B4: Experience with a globally-deployed software defined WAN. *ACM SIGCOMM Computer Communication Review*, 3-14.
- JANSSON, M. D., LUND, A. H. (2012): MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology*, 6, 6: 590-610.
- JATTI, A., AMRITHA, C. (2013): A Review on Segmentation & Intensity Extraction of cDNA Microarray Images. *International Journal of Innovative Research and Development*, 2, 2: 243-256.
- JONES, K. W., ROBERTSON, F. W. (1970): Localisation of reiterated nucleotide sequences in *Drosophila* and mouse by in situ hybridisation of complementary RNA. *Chromosoma*, 31, 3: 331-345.
- KALMÁR, A., *et al.* (2015): DNA hypermethylation and decreased mRNA expression of MAL, PRIMA1, PTGDR and SFRP1 in colorectal adenoma and cancer. *BioMed Central Cancer*, 15,1: 736.
- KARIM, R., KHALILUZZAMAN, Md, MAHMUD, S. (2011): A review of image analysis techniques for gene spot identification in cDNA Microarray images. In: Next Generation Information Technology (ICNIT), The 2nd International Conference on. IEEE, 36-41.

- KIM, M. S., LEE, J., SIDRANSKY, D. (2010): DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29, 1: 181-206.
- KNUDSEN, S. (2011): A biologist's guide to analysis of DNA microarray data. Technical University of Denmark: John Wiley & Sons, 144 s.
- KOČÁREK, E. (2008): Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika. Praha: Scientia, 211 s.
- KODADEK, T. (2001): Protein microarrays: prospects and problems. *Chemistry & Biology*, 8, 2: 105-115.
- KOMŮRKOVÁ, T. Nádorová onemocnění [online], aktualizováno březen 2014, [cit. 2015-01-15]. Dostupné z: <http://www.icm.cz/nadorova-onemocneni>
- KOUDELÁKOVÁ, V., KNEBLOVÁ, M., HAJDÚCH, M. (2012): Personalizovaná medicína a biomarkery v onkologii. *Klinická Farmakologie Farm*, 26, 4: 181-185.
- KRÁL, M., et al. (2010): Genetické riziko karcinomu prostaty. *Česká Urologie*, 14, 3: 139-147.
- KUMAR, R., SHARMA, A., TIWARI, R.K. (2012): Application of microarray in breast cancer: An overview. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 4, 1: 21.
- LEE, Y., et al. (2015): HP1 β is a biomarker for breast cancer prognosis and PARP inhibitor therapy. *PloS One*, 10, 3: e0121207.
- LI, S., LI, D. (2008): DNA microarray technology and data analysis in cancer research. *NJ:World Scientific*, 118 s.
- LUO, X., et al. (2011): MicroRNA signatures: novel biomarker for colorectal cancer?. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 20, 7:1272-1286.
- MALINOWSKI, D. P. (2007): Multiple biomarkers in molecular oncology. II. *Molecular Diagnostics Applications in Breast Cancer Management*, 7,3:269-280.
- MARMUR, J., DOTY, P. (1961): Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *Journal of Molecular Biology*, 3, 5: 585-594.
- MATTICK, J. (2008): The human genome as an RNA machine. *Febit Science Lounge Webinar*, June, 12.
- MCLENDON, R., et al. (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455, 7216: 1061-1068.
- MILLER, L. D., et al. (2002): Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer Cell*, 2, 5: 353-361.
- MORTENSEN, M. M., et al. (2015): Expression profiling of prostate cancer tissue delineates genes associated with recurrence after prostatectomy. *Scientific Reports*, 5.
- MURILLO, F. M., et al. (2008) The incredible shrinking world of DNA microarrays. *Molecular BioSystems*, 4,7: 726-732.
- NAIDU, C. N., SUNEETHA, Y. (2012): Review Article: Current Knowledge on Microarray Technology-An Overview. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11,1: 153-164.

- NISHIDA, N., *et al.* (2012): Microarray analysis of colorectal cancer stromal tissue reveals upregulation of two oncogenic miRNA clusters. *Clinical Cancer Research*, 18, 11: 3054-3070.
- O'DONOVAN, P. J.; LIVINGSTON, D. M. (2010): BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*, 31,6: 961-967.
- PALÁCOVÁ, M. (2008): Novinky v léčbě karcinomu prsu. *Onkologie*, 2.1: 49-52.
- PANCZAK, A., OTOVÁ, B. (ed.) (2014): Lékařská biologie a genetika (III. díl). Praha: Karolinum Press, 145 s.
- PARDUE, M. L., GALL, J. G. (1969): Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 64, 2: 600-604.
- PARINOV, S., *et al.* (1996): DNA sequencing by hybridization to microchip octa- and decanucleotides extended by stacked pentanucleotides. *Nucleic Acids Research*, 24, 15: 2998-3004.
- PATIL, M. R., BHONG, Ch. D. (2015): Veterinary Diagnostics and DNA Microarray Technology. *International Journal of Livestock Research*, 5, 4: 1-9.
- PAVELKA, F., KLÍMEK, P. (2000): Aplikovaná statistika. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta managementu a ekonomiky ve Zlíně, 130 s.
- PAVLÍK, E. (1999): Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku-část 3. Praha: Labor aktuell CS, 2: 22-25.
- PEREZ, D., SIMONIAN, D. Southern Blotting and DNA Microarray [online], 2015,[cit. 2015-01-15] Dostupné z: <https://mlalima.wikispaces.com>
- PIERRE, M., *et al.* (2010): Meta-analysis of archived DNA microarrays identifies genes regulated by hypoxia and involved in a metastatic phenotype in cancer cells. *BioMed Central Cancer*, 10, 1: 176.
- PORKKA, K. P., *et al.* (2007): MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer research*, 67, 13: 6130-6135.
- RAMASAMY, A., *et al.* (2008): Key issues in conducting a meta-analysis of gene expression microarray datasets. *PLoS Med*, 5, 9: e184.
- RAMASWAMY, S., GOLUB, T. R. (2002): DNA microarrays in clinical oncology. *Journal of Clinical Oncology*, 20, 7: 1932-1941.
- RHODES, D. R., *et al.* (2004): Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 25: 9309-9314.
- RINGNÉR, M., *et al.* (2011): GOBO: gene expression-based outcome for breast cancer online. *PloS One*, 6, 3: e17911.
- ROSYPAL, S. (2003): Nový přehled biologie. 1.vyd. Praha: Scientia, 797 s.
- RUEDA, L., REZAEIAN, I. (2011): A fully automatic gridding method for cDNA microarray images. *BioMed Central Bioinformatics*, 12, 1: 113.

- RUEDA, L. (ed.). (2014): *Microarray Image and Data Analysis: Theory and Practice*. Boca Raton: CRC Press. 520 s.
- ŘEZANKOVÁ, H., HÚSEK D., SNÁŠEL V. (2009): *Shluková analýza dat. 2., rozš. vyd.* Praha, Professional Publishing, 218 s.
- SELVARAJ, S., NATARAJAN, J. (2011): Microarray data analysis and mining tools. *Bioinformatics*, 6, 3: 95.
- SCHETTER, A. J., OKAYAMA, H., HARRIS, C. C. (2012): The role of microRNAs in colorectal cancer. *Cancer Journal* (Sudbury, Mass.), 18, 3: 244.
- SCHMIDT, U., BEGLEY, C. G. (2003): Cancer diagnosis and microarrays. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35, 2: 119-124.
- SINGH, A., KUMAR, N. (2013): A review on DNA microarray Technology. *International Journal of Current Research and Review*, 5, 22: 01-05.
- SIMON, R. M. (2003): *Design and analysis of DNA microarray investigations*. 1.vyd. New York: Springer Science & Business Media
- SKOVAJSOVÁ, M., *et al.* (2014): Výsledky Národního programu screeningu karcinomu prsu v České republice. *Klinická Onkologie*, 27, 2: 69-78.
- SKŘIČKOVÁ, J., TOMIŠKA, M., BABIČKOVÁ, L., ADAM, Z. (2003): Maligní pleurální výpotek. V: Z. Adam, J. Vorlíček, J. Koptíková: *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. 1. vyd. Praha: Grada.
- SLABÝ, O., *et al.* (2009): DNA a mikroRNA čipové technologie v diagnostice a predikci u pacientů s renálním karcinomem. *Klinická Onkologie*, 202 s.
- SLABÝ, O., *et al.*, (2014): *Molekulární medicína*. Praha, Galén, 598 s.
- SMYTH, G. K.; SPEED, T. (2003): Normalization of cDNA microarray data. *Methods*, 31,4: 265-273.
- SNUSTAD, D. P., *et al.* (2009): *Genetika*. 1. vyd., Brno: Masarykova univerzita, 871: 480-481.
- SOUTHERN, E. M. (2001): DNA microarrays. In: *DNA Arrays*. New Jersey: Humana Press. 1-15.
- SOTIRIOU, Ch., PUSZTAI, L. (2009): Gene-expression signatures in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 360,8: 790-800.
- SPEED, T. (ed.). (2004): *Statistical analysis of gene expression microarray data*. Boca Raton: CRC Press, 240 s.
- STRATTON, M. R., CAMPBELL, P. J., FUTREAL, P. A. (2009): The cancer genome. *Nature*, 458, 7239: 719-724.
- SUCHÁNEK, Š., *et al.* (2011): Epidemiologie, etiologie, screening a diagnostika kolorektálního karcinomu, včetně diagnosticko-terapeutických zákroků na tlustém střevě. *Onkologie*, 5, 5: 261-265.
- SUNDBERG, S. A., *et al.* (2001): Microchip-based systems for biomedical and pharmaceutical analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14, 1: 1-12.
- SVOBODOVÁ, Š., PEŠTA, M., TOPOLČAN, O., KINKOROVÁ, J. (2012): Biomarkery v onkologii, 17-40.

- ŠTERN, P., VRANOVSKÝ, K., ŠAFARČÍK, K. (2008): Karcinom prostaty–molekulární podstata, diagnostika a ekonomika prevence. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 16, 37: 19-26.
- TAMAYO, P., *et al.* (1999): Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 6: 2907-2912.
- TCGA, TCGA study identifies seven distinct subtypes of prostate cancer [online], aktualizováno 5.11.2015 [cit 2016-02-25]. Dostupné z: http://cancergenome.nih.gov/newsevents/newsannouncements/PRAD_2015
- TIAN, S., *et al.* (2010): Biological functions of the genes in the mammaprint breast cancer profile reflect the hallmarks of cancer. *Biomarker Insights*, 5: 129.
- TOMLINS, S. A., *et al.* (2005): Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, 310, 5748: 644-648.
- TP53 [online], aktualizováno 10.2015, [cit 2016-04-10]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53#synonyms> online
- TREVINO, V., FALCIANI, F., BARRERA-SALDAÑA, H. A. (2007): DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research. *Molecular Medicine*, 13, 9-10: 527.
- TRIMBOLI, A. J., *et al.* (2009): Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature*, 461, 7267: 1084-1091.
- TROYANSKAYA, O. G., *et al.* (2002): Nonparametric methods for identifying differentially expressed genes in microarray data. *Bioinformatics*, 18, 11: 1454-1461.
- TUSHER, V. G., TIBSHIRANI, R., CHU, G. (2001): Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 9: 5116-5121.
- UNIVERSITY OF CALIFORNIA, Diagnose the hereditary disease and viral infection at home:DNA Microarray aktualizováno 1.11.2011 [online], [cit 2016-02-20] Dostupné z: <http://bme240.eng.uci.edu/students/08s/jentel/Diagnose-hereditary-disease.htm>
- ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČESKÉ REPUBLIKY (ÚZIS). (2015): Novotvary 2011, 22-263.
- VACEK, J. (2006): Proteinové čipy v moderní klinické biochemii. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 14, 35: 25-30.
- VAUPEL, P., MAYER, A. (2007): Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26, 2: 225-239.
- VIJVER, M. J., *et al.* (2002): A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 347, 25: 1999-2009.
- VEER, L. J., *et al.* (2002): Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415, 6871: 530-536.
- VOLINIA, S., *et al.* (2006): A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 7: 2257-2261.

- WACH, S., *et al.* (2012): MicroRNA profiles of prostate carcinoma detected by multiplatform microRNA screening. *International Journal of Cancer*, 130, 3: 611-621.
- WALSH, Ch. J., *et al.* (2015): Microarray Meta-Analysis and Cross-Platform Normalization: Integrative Genomics for Robust Biomarker Discovery. *Microarrays*, 4,3: 389-406.
- WANG, B., XI, Y. (2013): Challenges for microRNA microarray data analysis. *Microarrays*, 2, 2: 34-50.
- WANG, N., *et al.* (2015): miR-135b inhibits tumour metastasis in prostate cancer by targeting STAT6. *Oncology Letters*, 11, 1: 543-550.
- WATSON, J. D., *et al.* (1953): Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171, 4356: 737-738.
- WEINSTEIN, J. N., *et al.* (2013): The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nature Genetics*, 45, 10: 1113-1120.
- WEIGEL, M. T.; DOWSETT, M. (2010): Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocrine-related Cancer*, 17,4: R245-R262.
- WILTGEN, M., TILZ, G. P. (2011): Molecular diagnosis and prognosis with DNA microarrays. *Hematology*, 16, 3: 166-176.
- WOOD, L. D., *et al.* (2007): The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*, 318, 5853: 1108-1113.
- WU, W. K., *et al.* (2011): MicroRNA in colorectal cancer: from benchtop to bedside. *Carcinogenesis*, 32, 3: 247-253.
- XIAOLI, Z., *et al.* (2015): Screening of Target Genes and Regulatory Function of miRNAs as Prognostic Indicators for Prostate Cancer. *Medical Science Monitor*, 21: 3748-3759.
- XU, L. L., *et al.* (2000): PSGR, a novel prostate-specific gene with homology to a G protein-coupled receptor, is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Research*, 60, 23: 6568-6572.
- YANG, Y. H., *et al.* (2002): Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Research*, 30, 4: e15-e15.
- YANG, Y. H., THORNE, N. P. (2003): Normalization for two-color cDNA microarray data. *Lecture Notes-Monograph Series*, 403-418.
- YAU, T. O., *et al.* (2015): microRNA-20a in human faeces as a non-invasive biomarker for colorectal cancer. *Oncotarget*, 7, 2:1559-1568
- YE, J-J., CAO, J. (2014): MicroRNAs in colorectal cancer as markers and targets: Recent advances. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 15: 4288.
- ZAVORAL, M., Suchánek, Š., Májek, O., Seifert, B., Dušek, L. (2012): Národní program screeningu kolorektálního karcinomu v České republice—minulost, přítomnost a budoucnost. *Gastroenterologická Hepatologie*, 66, 5: 345-349.
- ZVOLSKÝ M., Zhoubné nádory v roce 2011. [online], 2014, [cit. 2015-03-09]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/zhoubne-nadory-roce-2011>