

POMEN GENETIKE IN VLOGA MOLEKULARNE DIAGNOSTIKE V ONKOLOGIJI

Srdjan Novaković

Povzetek. Rakave celice se razlikujejo od normalnih na več ravneh in zato lahko kot biološke označevalce za rakave celice uporabljamo spremembe v morfologiji celic, njihovih biokemičnih procesih ali genetske spremembe. Genetske spremembe, ki večajo verjetnost za razvoj raka, ali tiste, ki so značilne za rakave celice, določamo v različnih bioloških vzorcih z metodami molekularne diagnostike. Dedne oblike raka opredeljujemo po ugotovljenih mutacijah ali epigenetskih spremembah v vseh celicah v organizmu in zato uporabljamo DNA, izolirano iz vzorcev krvi (iz levkocitov), medtem ko genetske spremembe pri sporadičnih oblikah raka ugotavljamo v DNA, izolirani iz tumorskega tkiva. Molekularna diagnostika in genetski označevalci so nepogrešljivi za natančnejšo opredelitev in klasifikacijo tumorjev ter za izbiro najustreznejših zdravil in protokolov za zdravljenje, ki so prilagojeni posameznemu bolniku in njegovemu tumorju – t.i. personaliziranemu (naosebljenemu) zdravljenju.

Pomen določanja genetskih sprememb pri dednih oblikah raka je predvsem pravočasna in pravilna ocena ogroženosti nosilcev mutacij, da zbolijo za določeno vrsto raka, da omogočajo pripravo programa spremljanja nosilcev mutacij ter pretehtano izvedbo profilaktičnih ukrepov. Pri sporadičnih oblikah raka pa je vloga molekularne diagnostike predvsem pri napovedovanju prognoze bolezni, napovedovanju ponovitve bolezni ali odziva na zdravljenje.

UVOD

Klasična klasifikacija in diagnostika raka temeljita na določanju izvora rakavih celic, njihovi morfologiji oziroma izražanju značilnih membranskih, citoplazemskih in jedrnih proteinov. Najosnovnejše metode tovrstne diagnostike so mikroskopsko morfološko pregledovanje celic ter imunohistokemično barvanje z različnimi protitelesi. Napredek pri razumevanju mehanizmov nastanka in biologije raka na molekularni ravni je prinesel nova dejstva, ki so narekovala spremembe na tem področju. Sam izvor rakavih celic je sicer še vedno pomemben dejavnik za klasifikacijo raka, ni pa povsem zadosten. Postalo je jasno, da maligni tumorji niso enostaven skupek povsem enako spremenjenih rakavih celic s povsem istimi lastnostmi, temveč tkiva, sestavljena iz različnih tipov malignih in nemalignih celic, ki medsebojno komunicirajo in regulirajo celične procese. Vsi ti neposredni vplivi na rakavo celico, ki je v osnovi izrazito genetsko nestabilna in zaradi tega dobro prilagodljiva, so vzrok za kopičenje raznih sprememb na molekularni ravni v različnih rakavih celicah v istem tumorju. Torej: ne glede na dejstvo, da maligni tumorji nastanejo iz ene same spremenjene celice, se njihova genetska zasnova zaradi selektivnih pritiskov in prilagajanja celic zelo hitro spremeni (1–3). Rezultat različnih sprememb pa je tudi povsem različno obnašanje navidezno istovrstnih tumorjev ter različen odziv na enako zdravljenje (4).

Zaradi vse večjega pomena ugotavljanja sprememb na molekularni ravni je sledil tudi razvoj molekularne diagnostike raka. Gre za relativno mlado vedo,

zaenkrat še brez komercialnih diagnostičnih kompletov in protokolov za preprosto rutinsko rabo. Zato je za pravilno tehnično izvedbo preiskav in interpretacijo rezultatov nujno dobro poznavanje delovanja celice, karcinogeneze, celične signalizacije, mehanizmov razvoja odpornosti na zdravila ipd. Molekularna diagnostika raka je torej sinteza teoretičnega znanja o celični biologiji in karcinogenezi ter praktičnega znanja o tehnični izvedbi molekularno-bioloških preiskav.

KARCINOGENEZA KOT VEČSTOPENJSKI PROCES

Ob predpostavki, da tumor nastaja iz ene same spremenjene celice, je jasno, da je prvi pogoj za kopičenje in izražanje nastalih sprememb v celici njihovo dedovanje v naslednjih generacijah celic. Ob tem govorimo o dveh vrstah karcinogenih dejavnikov: prva vrsta deluje kot **mutageni** impulz in neposredno spremenijo celični genetski zapis; druga vrsta vpliva na izražanje cele vrste genov ali delov kromosomov, s tem da spremenijo metilacijski status in vezavo DNA na histonske proteine. Spremenjeno izražanje genov spremeni razmerja med proteini in v končni fazi brez neposrednega vpliva na zaporedje DNA delujejo kot karcinogeni. Ta način delovanja imenujemo **epigenetsko** delovanje. Tako pri epigenetskih spremembah kot pri genetskih spremembah je potrebno, da se novi vzorec »vtisne v na novo zasnovani celični spomin« in se kot tak prenese v naslednje generacije celic (5).

V grobem lahko karcinogenezo razdelimo v tri stopnje – **iniciacijo**, **promocijo** in **progresijo**, ki vključujejo vrsto različnih podstopenj. Med procesom iniciacije se v celicah nabirajo mutacije, ki povzročijo nenadzorovano ekspresijo genov, odgovornih za spodbujanje proliferacije celice, in inaktivacijo supresorskih genov, ki (v normalno delujočem stanju) zavirajo proliferacijo, nadzorujejo kakovost pomnožene DNA in sprožajo celično smrt, če so poškodbe DNA nepopravljive. Na isti skupini genov delujejo tudi epigenetski dejavniki, ki s spremembami v promotorskih regijah večajo izražanje genov za proliferacijske signale in zmanjšujejo ali celo onemogočajo izražanje supresorskih genov. V fazi promocije celica nabira nove mutacije, katerih število raste proporcionalno s številom celičnih delitev. Po tej fazi nastanejo celice z malignim fenotipom – t.i. **maligna konverzija**. Zadnja faza v procesu karcinogeneze je progresija. V njej se izrazijo pridobljene lastnosti malignega fenotipa, rakave celice pa oblikujejo tumor (5).

Pridobljene in osnovne lastnosti rakavih celic

Da bi celica »zaživela« kot rakava, mora torej nakopičiti celo vrsto sprememb in si pridobiti lastnosti, ki jo naredijo relativno neodvisno od ustaljenih mehanizmov v normalnih celicah. Ker so ti mehanizmi odvisni od vrste celice

oz. tkiva, iz katerega celica izhaja, so kombinacije sprememb oz. lastnosti, ki jih rakava celica mora pridobiti, različne za različne vrste raka. Pridobivanje novih lastnosti omogočita predvsem dve spremembi: nastanek **genomske nestabilnosti** in **možnost aktivnega vpliva na imunski sistem** (6, 7).

Genomska nestabilnost je vsekakor najpomembnejša pridobitev rakavih celic. Je več kot samo značilnost – je stanje, ki omogoča nabiranje različnih sprememb in zato hitrejše in boljše prilagajanje na vplive iz okolja. Možnost vplivanja na imunski sistem pa je druga pomembna pridobitev, s katero si rakave celice pripravijo in zagotovijo okolje za nemoten razvoj tumorja. Imunski sistem sicer aktivno eliminira tumorske celice, po drugi strani pa s selekcijskim pritiskom omogoča preživetje najbolj prilagojenih klonov tumorskih celic, ki tudi same neposredno vplivajo na delovanje imunskega sistema. Proces imenujemo imunsko preurejanje (ang. *immunoediting*) (7).

Osnovne lastnosti rakave celice so:

- samozadostnost za lastno proliferacijo,
- neodzivnost na signale, ki uravnavajo število celičnih delitev,
- neodzivnost na signale, ki sprožajo apoptozo,
- preureditev tvorbe citokinov in izražanja celičnih antigenov,
- zmožnost prehoda v limfni in krvni obtok *ter*
- zmožnost pritrditve v drugih organih in ponovna klonalna rast.

VRSTE MOLEKULARNO-BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV

Področje molekularno-bioloških označevalcev je obsežno in vključuje dejanske spremembe na molekularni ravni kot tudi metodološke pristope za dokazovanje razlik med rakavimi in normalnimi celicami. Če se omejimo na molekularno-biološke označevalce v najožjem smislu (in izpustimo citogenetiko), potem jih lahko delimo na:

- označevalce, ki so produkt sprememb v strukturnih delih genoma – **polimorfizmi**, razne **mutacije**;
- označevalce, ki odsevajo raven izražanja genov brez poseganja v samo strukturo produktov, ki jih ti geni kodirajo. Pri slednjih imam v mislih najprej epigenetske vplive na **metilacijski status** in znotrajcelične regulacijske mehanizme v sistemu delovanja **mikroRNA** (miRNA). Gre za kratke nekodirajoče RNA-fragmente (18–25 nukleotidov), ki so zmožni regulacije izražanja raznih pomembnih genov – od tistih, ki uravnavajo delitev celice, razvoj in diferenciacijo, do tistih, ki so nujni za apoptozo. Odvisno od tega, na katero mRNA se veže, lahko miRNA deluje kot klasični tumorski supresor ali kot onkogen. Trenutno je v podatkovni bazi opisanih nekaj čez 1000 humanih miRNA-genov (8);

- označevalce, ki kažejo na izvor celic. Ponavadi gre za izražanje genov, ki kodirajo različne membranske proteine – npr. imunoglobuline ali T-celične receptorje. Označevalci iz te skupine so največkrat nepogrešljivi pri diagnostiki (diagnostični označevalci). Uporabljamo jih za določanje **klonalnega izvora** celic ali za sledenje **minimalnega ostanka bolezni** (ang. *minimal residual disease*, MRD) pri krvnih rakih. V zadnjih letih je bila na osnovi molekularnih označevalcev spremenjena tudi klasifikacija nekaterih solidnih tumorjev.

Naslednja razdelitev molekularno-bioloških označevalcev temelji na njihovi klinični uporabnosti. Pri tem razlikujemo štiri skupine molekularno-bioloških označevalcev:

- geriminalne z znanim patološkim vplivom
Gre za dokazovanje geriminalnih mutacij v posameznih genih, ki so dokazano povezani z nastankom raka. Dober primer so BRCA1/2 (ang. *breast cancer*) za raka dojke in jajčnikov, APC (ang. *adenomatous polyposis coli*) za raka debelega črevesa in danke in CDK4 (ang. *cyclin-dependent kinase 4*) za melanom.

- prognostične

Vloga teh označevalcev je prognoza poteka bolezni (»dobra« – »slaba«) ne glede na zdravljenje. Za označevalca najpogosteje uporabljamo izražanje posameznega gena ali t.i. profilov genov. Primer je test *MammaPrint* – na osnovi izraženosti 70 genov opredelimo verjetnost razvoja metastaz raka dojke po kirurški odstranitvi primarnega tumorja.

Nekoliko bolj zapletena je vloga genetskega profila pri difuznih velikoceličnih B-limfomih (DVCBL). Ta panel lahko označimo kot diagnostično-klasifikacijski panel, saj omogoča razlikovanje treh skupin DVCBL – GCB (ang. *germinal center B-cell-like*), ABC (ang. *activated B-cell-like*) in druge. Prav tako lahko rečemo, da je prognostičen, ker dejansko napoveduje razliko v preživetju med GCB in ABC. Hkrati pa je ta panel tudi napovedni označevalec, saj napoveduje odziv na kemoterapijo (boljši odziv na kemoterapijo pri GCB) (9, 10).

Kot prognostične označevalce lahko uporabimo tudi nekatere strukturne spremembe, kot je mikrosatelitska nestabilnost (ang. *microsatellite instability*, MSI). Močno izražanje (ang. *microsatellite instability-high*, MSI-H) pomeni za bolnika boljšo prognozo (11).

Za določene vrste tumorjev se je kot prognostični dejavnik izkazal tudi mutacijski status posameznih genov – npr. mutirani BRAF (gen za protein B-Raf) kot negativni prognostični dejavnik pri bolnikih z rakom debelega črevesa in danke, ki nimajo izrazite mikrosatelitske nestabilnosti v tumorju (12).

- napovedne

Gre za označevalce, ki napovedujejo verjetnost koristnosti ali sploh ustreznosti kakega zdravljenja za posameznega bolnika. Te označevalce imenujemo tudi farmakogenomske označevalce. Taki so, na primer, mutacijski status gena KRAS pri bolnikih z metastatskim rakom debelega črevesa in danke, zdravljenih z zaviralci receptorjev za epidermalni rastni dejavnik, in mutacija v genu BRAF na kodonu V600, ki je pogoj za zdravljenje bolnikov z metastatskim melanomom s specifičnimi zaviralci kinaz.

- farmakodinamske

Tudi tukaj kot označevalce najpogosteje uporabljamo izražanje panelov genov. Gre za gene, ki predvsem nakazujejo, kakšna je optimalni odmelek kakega zdravila za doseganje maksimalnega terapevtskega učinka ob minimalnih neželenih učinkih. Prav tako so vse bolj zanimivi genski paneli, ki napovedujejo možnost nastanka rezistence na kakšna zdravila.

Opredelitve in razdelitve molekularno-bioloških označevalcev niso povsem usklajene, saj v literaturi redko najdemo dorečeno in s konsenzom sprejeto klasifikacijo označevalcev. Vzrokov za nedorečenost je več – vsekakor sodijo med pomembnejše prav velika heterogenost teh označevalcev ter »mladost vede«, ker nimamo na voljo dovolj podatkov za standardizacijo metod. Prav tako je velikokrat težko opredeliti posamezni označevalec izključno na osnovi ene klasifikacije (npr. kot diagnostičnega), saj ima istočasno tudi elemente prognostičnega ali napovednega označevalca. To so bili razlogi, da sem se v tem prispevku odločil za dvojno klasifikacijo označevalcev.

DEDOVANJE IN RAK

Rak je genska bolezen, ki po danes veljavnih teorijah nastane iz ene same spremenjene celice. Pri tem razlikujemo **dedne oblike** raka, ki so posledica genetskih sprememb v zarodnih celicah, kar neposredno pomeni tudi v spolnih celicah, ter **sporadične oblike** raka, ki nastanejo zaradi genskih sprememb v somatskih celicah (različne celice tkiv in organov). Kot spremembe pojmuje tiste, ki neposredno spremenijo zapis v dednem materialu (na prvem mestu mutacije), in tiste, ki spremenijo izražanje nekaterih genov z vplivom na njihovo strukturo in vezavo na nosilne histonske proteine. Pri sporadičnih oblikah raka se te spremembe ne prenašajo (dedujejo) na potomce, medtem ko se spremembe v spolnih celicah dedujejo, t.j. prenašajo na potomce. Zaradi takšnega prenosa je pri nosilcih teh sprememb čas, potreben za nastanek raka, krajši, in ogroženost z rakom večja.

Dedne oblike raka

Med dedne oblike raka štejemo tiste, za katere obstajajo dokazi, da so neposredno povezane s spremembami v značilnih genih. Dedne oblike raka so bile klinično prepoznane v sklopu raznih dednih sindromov. Ponavadi so germinalne (dedne) mutacije v značilnih genih povezane z večjo verjetnostjo za nastanek raznih vrst raka. Osnovne značilnosti dednih oblik raka so, da je zbolenje zgodnejše, da je v družini več članov z isto ali kako drugo vrsto raka, ki sodi v sklop sindroma, več istovrstnih ali raznovrstnih rakov pri isti osebi. Na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana določamo mutacije v genih, ki so povezani z različnimi dednimi sindromi (13).

Sindrom BRCA1/2. Tako kot je iz imena razvidno, gre za sindrom, ki prizadene osebe z mutacijami v genih BRCA1 in BRCA2. Mutacije v teh genih so najpogosteje vzrok za nastanek raka dojke in jajčnikov. Redkeje so povezane tudi z nastankom raka prostate, črevesa in trebušne slinavke. Primeri dednega raka dojke obsegajo 5–10 % vseh rakov dojke. Za več kot polovico od njih so odgovorne mutacije v genih BRCA1 in BRCA2. Nosilke in nosilci mutacij v teh genih v povprečju zbolijo celo desetletje prej, kot splošna populacija.

Čprav **dedni melanom** ni sindrom, je več kot v 10 % vseh primerov melanoma podedovana bolezen. Nastane kot posledica mutacij v genih CDKN2A in CDK4, redko v genu MC1R. Dedna oblika malignega melanoma se značilno pojavi 10–20 let prej kot sporadičnih oblika, poleg tega pa so dedni melanomi pogosto multipli.

Cowdenov sindrom. Nastanek tega sindroma je povezan z mutacijami v genu PTEN. Osebe s Cowdenovim sindromom najpogosteje zbolevajo za rakom dojk, maternične sluznice, ščitnice, ledvic ter rakom debelega črevesa in danke. Verjetnost, da bodo nosilci mutacij v genu PTEN zboleli za katero koli vrsto raka je velika – do 85-odstotna –, kar po novejši literaturi velja predvsem za raka dojk. Rak dojk se pri nosilkah mutacij v genu PTEN pojavi zelo zgodaj, povprečno v starosti med 30 in 40 let.

Družinska adenomatozna polipoza (ang. *familial adenomatous polyposis*, FAP) nastane kot posledica mutacij primarno v genu APC in redkeje v genu MUTYH. Za bolezen je značilno zgodnje pojavljanje številnih polipov (adenomov) v debelem črevesu (lahko že pri starosti 15 let). Poznamo tudi blažjo, atenuirano obliko z manjšim številom polipov (AFAP). Bolniki z diagnozo družinske adenomatozne polipoze zbolijo za rakom debelega črevesa in danke v povprečju pred 40. letom starosti. Penetranca mutacij v genu APC je 100-odstotna.

Sindrom Li-Fraumeni je posledica germinalnih mutacij v genu Tp53, ki povzročajo zbolevanje za različnimi vrstami raka. Najpogostejši so rak dojk

in razni sarkomi – mehkih tkiv in osteosarkomi. Sledijo levkemije, možganski tumorji, rak želodca, debelega črevesa in danke, melanom, Wilmsovi tumorji ter limfomi. Za sindromom Li-Fraumeni ljudje običajno zbolijo zgodaj v življenju – pred 45. letom starosti – in imajo večkrat multiple primarne tumorje.

Lynchev sindrom ali **HNPCC** (ang. *hereditary non-polyposis colon cancer*). Lynchev sindrom nastane kot posledica mutacij v genih, ki so odgovorni za popraviljanje neujemanja pri podvojevanju DNA. Najpogosteje mutirani ali hipermetilirani geni MMR (ang. *mismatch repair*) so MLH1, MSH2, MSH6 in PMS2. Mutacije v genih MLH1 in MSH2 so vzrok za nastanek Lynchevega sindroma pri 80–90 % oseb, najpogosteje z rakom debelega črevesa in danke; kar 4–6 % bolnikov z rakom debelega črevesa in danke ima ta sindrom. Povprečna starost ob diagnozi raka debelega črevesa in danke pri osebah z Lynchevim sindromom je 45 let. Ostale vrste raka, ki se pojavljajo pri tem sindromu, so rak maternične sluznice, jajčnikov, urogenitalnega trakta, želodca, žolčnika, trebušne slinavke, tankega črevesa ali možganov.

Peutz-Jeghersov sindrom nastane kot posledica mutacij v genu STK11. Najpogosteje gre za raka debelega črevesa in danke, dojk, želodca, tankega črevesa in trebušne slinavke, redkeje pa za raka jajčnikov in materničnega vratu ter raka testisov.

Nosilci mutacij v genu STK11 zbolevajo za rakom zelo zgodaj – povprečno pri 42 letih.

Vzrok za **sindrom von Hippel-Lindau** so mutacije v genu VHL. V njegovem sklopu je slaba tretjina primerov hemangioblastoma osrednjega živčevja, več kot polovica angiomov mrežnice, polovica družinsko povezanih feokromocitomov in 1 % raka ledvičnih celic.

SPORADIČNE OBLIKE RAKA

Sporadične oblike raka so (zaenkrat) pogostejše od dednih. Zanimivo je, da so pogosto geni, ki so mutirani pri dednih rakih, nemutirani pri sporadičnih vrstah rakov. Zaradi tega se uporaba molekularno-bioloških označevalcev pri sporadičnih rakih nekoliko razlikuje od uporabe pri dednih rakih. Pri sporadičnih rakih trenutno uporabljamo molekularno-biološke označevalce predvsem za boljše opredeljevanje klasifikacije tumorjev in – pri hematoloških rakih – tudi za spremljanje minimalnega ostanka bolezni (minimalne rezidualne bolezni). Prav tako je pomembna uporaba teh označevalcev za prognozo bolezni in napoved uspešnosti zdravljenja z zdravili (farmakogenomika). V tem prispevku predstavljamo uporabo molekularno-bioloških označevalcev, ki jih spremljamo na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana.

Maligni limfomi nastanejo iz različno diferenciranih celic limfatične vrste B, T ali naravnih celic ubijalk. So klonске bolezni, pri katerih delamo dve vrsti preiskav – določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij in dokazovanje specifičnih genetskih sprememb (nekaterih kromosomskih translokacij, značilnih za posamezne vrste limfomov).

Določanje genotipa KRAS. Značilne mutacije v tem protoonkogenu so na kodonih 12, 13 in 61. Aktivacijske mutacije povzročijo nenehno signalizacijo znotraj t.i. signalne poti RAS-RAF-MAPK.

Genotip KRAS določamo pri bolnikih z metastatskim rakom debelega črevesa in danke pred uvedbo biološkega zdravljenja. Določanje genotipa KRAS omogoča ustrezno izbiro tarčnega zdravljenja.

Določanje genotipa BRAF. Značilne mutacije v tem protoonkogenu so na kodonu V600. Gre za aktivacijske mutacije, ki povzročijo nenehno signaliziranje po signalni poti RAS-RAF-MAPK. Mutacije v genu BRAF najdemo pri raznih vrstah raka, kot so melanom, rak debelega črevesa in danke, papilarni rak ščitnice, rak ledvic, rak jeter, nedrobnocelični rak pljuč in serozni rak jajčnikov.

Genotip BRAF določamo pri bolnikih z metastatskim melanomom in metastatskim rakom debelega črevesa in danke pred uvedbo biološkega zdravljenja. Po dogovoru z napotnim zdravnikom določamo genotip BRAF tudi pri bolnikih z drugimi vrstami raka (npr. papilarnim rakom ščitnice).

Določanje genotipa PIK3CA. Najpogosteje mutirana mesta v tem protoonkogenu sta kodona 542 in 545 v eksonu 9 ter kodon 1047 v eksonu 20. Mutacije v tem genu najdemo pri raznih vrstah raka: raku dojke, maternične sluznice, glave in vratu, debelega črevesa in danke, jajčnikov itd. Mutacijski status gena PIK3CA uporabimo kot prognostični in napovedni dejavnik.

Določanje genotipa c-KIT. Značilne mutacije v tem protoonkogenu so odvisne od vrste raka: gastrointestinalni stromalni tumorji (GIST) – mutacije v eksonih 9, 11, 13 in 17; sistemska mastocitoza – D816V v eksonu 17; mieloidna levkemija – eksona 8 in 17. Sicer so mutacije v tem genu najpogostejše pri GIST (80–90 % bolnikov ima mutacijo v tem genu). Rezultate določanja genotipa c-KIT uporabljamo kot prognostični in napovedni dejavnik za zdravljenje z zaviralci tirozinske kinaze.

Določanje genotipa PDGFRA. Značilne mutacije v tem protoonkogenu so v eksonih 18 (najpogosteje D842V), 12 (večinoma V561D) in (redko) 14 (večinoma N659X). Aktivacijske mutacije povzročijo stalno signalizacijo v signalni poti PDGFR/ERK (spodbujanje proliferacije, apoptoze, angiogeneze), ne da bi bil navzoč ligand. Mutacije v PDGFRA so dokazljive pri 5–10 % oseb z GIST. Rezultate določanja genotipa PDGFRA uporabljamo kot napovedni dejavnik za zdravljenje z zaviralci tirozinske kinaze.

Molekularno-diagnostične tehnike in biološki materiali, ki jih najpogosteje uporabljamo na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana

Navajam (po vrstnem redu poteka procesa) samo nazive molekularno-bioloških tehnik, ki jih uporabljamo:

- izolacija genomske DNA,
- verižna reakcija s polimerazo (ang. *polymerase chain reaction*, PCR),
- ločevanje molekul z gelsko elektroforezo,
- sekvenciranje,
- fragmentna analiza in od ligacije odvisno hkratno pomnoževanje sond (ang. *multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA),
- alelna diskriminacija,
- kvantitativna PCR v realnem času (ang. *quantitative PCR*, Q-PCR),
- metoda ločevanja fluorescenčno označenih produktov PCR na osnovi analize talitvene krivulje z veliko ločljivostjo (ang. *high resolution melt*, HRM),
- spremljanje izražanja genov.

Najpogosteje uporabljeni biološki materiali:

- kri, plazma,
- tkivo, vklopljeno v parafin (FFPE),
- tkivo, pridobljeno z aspiracijsko biopsijo s tanko iglo,
- punktati kostnega mozga,
- drugi: sveže in zmrznjeno tkivo, celične suspenzije, eksudat, likvor ali kakršen koli biološki vir, iz katerega je mogoče izolirati DNA.

PRIHODNOST

Največji izzivi na področju molekularne diagnostike so: narediti to področje cenejše in dostopnejše za širšo uporabo, prilagoditi metode vzorčenja, tako da bi bile čim manj agresivne, standardizirati postopke v laboratorijih za dokazovanje specifičnih sprememb in – morda najpomembnejše – izpopolniti baze podatkov za vse genomske spremembe in jih opremiti z nedvoumnimi razlagami o njihovem vplivu. Verjamem, da nam bo v bodoče v veliko pomoč nova tehnologija sekvenciranja – *next generation sequencing*, novi pristopi k vzorčenju (jemanje vzorcev iz krožečih tumorskih celic, iz eksosomov – majhnih mikroveziklov, ki se sproščajo iz tumorja) ter seveda nova dejstva, ki nam bodo pomagala, da zapolnimo ogromne luknje v svojem mozaiku (ne)znanja.

LITERATURA

1. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability – an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11 (3): 220–8.
2. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 2010; 40 (2): 179–204.
3. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; 461 (7267): 1071–8.
4. Gonzalez de Castro D, Clarke PA, Al-Lazikani B, Workman P. Personalized cancer medicine: molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 93 (3): 252–9.
5. Novaković S. Molekularni mehanizmi nastanka raka – kancerogeneza. In: Novaković S, Hočevar M, Jezeršek-Novaković B, Strojan P, Žgajnar J, editors. *Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. 1. ed. Ljubljana: Mladinska knjiga, 2009: 24–35.
6. Novaković S. Rakasta pretvorba celice – kancerogeneza in nastanek tumorjev – tumorigeneza = Malignant transformation of cell – cancerogenesis and tumor formation – tumorigenesis. In: Virant-Klun I, Smrkolj Š, editors. *Matične celice v reproduktivni medicini: od gametogeneze in vitro do nastanka raka = from gametogenesis in vitro to manifestations of cancer*. Znanstveno srečanje: Ljubljana, 2011 Dec 9. Ljubljana: Slovensko društvo za reproduktivno medicino, 2011: 130–42.
7. Novaković S. Imunologija tumorjev. In: Novaković S, Hočevar M, Jezeršek Novaković B, Strojan P, Žgajnar J, editors. *Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. 1st ed. Ljubljana: Mladinska knjiga, 2009: 36–41.
8. MicroRNA database. Available online at <http://www.mirbase.org/>
9. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503–11.
10. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; 8: 68–74.
11. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28 (20): 3219–26.
12. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010; 28 (3): 466–74.
13. Available online at <http://www.uptodate.com/contents/search>.