

# Molekulárně biologické a cytogenetické metody

Molekulárně biologickému vyšetření obvykle předchází na rozdíl od všech předcházejících izolace nukleových kyselin, což je ve většině případů DNA jako nositelka genetické informace. Izolace DNA patří k prvním a základním krokům molekulárně-biologických analýz. Kvalita a množství izolované DNA výrazně ovlivňuje využitelnost dalších laboratorních technik a pochopitelně i správnou interpretaci výsledku. Existuje celá řada rozlišných izolačních technik, které se liší jak finanční nákladností, tak časovou náročností. Pro izolaci DNA se využívá krev, zmrazená tkáň, popřípadě tkáň zalitá v parafínových blocích. Podle typu tkáně volíme vhodnou **izolační metodu**. Nicméně lze obecně říci, že existují dva základní přístupy. Prvním je tzv. fenolchloroformová extrakce, od které se v současné době upouští díky zdravotní závadnosti používaných chemických látek. Mnohem častěji a finančně v dnešní době dobře dostupná je druhá metoda, při které se využívají komerčně dodávané soupravy a izolace se tak stává mnohem pohodlnější, rychlejší a výsledný izolát má požadovanou kvalitu. Obecným principem izolace nukleových kyselin je natrávení buněk enzymy, které zpřístupní buněčné jádro pro další chemikálie. Těmi jsou solné roztoky, které DNA vysráží. Následně je DNA opětovně rozpuštěna v stabilizačním roztoku.

Při získání kvalitní nukleové kyseliny v dostatečném množství nastupují pokročilejší molekulárně-biologické metody, které umožňují studium genetické informace na úrovni genů. Metod existuje nepřeberné množství a jejich počet vzrůstá se vzrůstající přesností a reprodukovatelností. Není v možnostech tohoto textu se jimi zabývat podrobně, ale zmíním se pouze o základních.

Nejpoužívanější metodou v molekulárně-biologické laboratoři je **PCR (polymerase chain reaction)**, která umožňuje namnožení požadovaného úseku DNA. Klasická PCR má řadu modifikací, ale výsledkem všech typů PCR namnožení úseku DNA, který je předmětem zájmu. Podrobněji je možno napsat, že principem metody je opakovaná denaturace (rozvolnění) dvouvláknové DNA při 94 – 95 °C následovaná ochlazením reakční směsi na teplotu většinou 50 – 60 °C, kdy se k jednořetězcové DNA připojí specifické uměle připravené krátké úseky DNA (primery). Od nich potom začíná syntéza požadovaného úseku. K syntéze dochází při 72 °C. Tyto tři teploty se opakují 20x – 40x, což má za následek milionové až miliardové zmožení cílové sekvence.

Po proběhnutí PCR se vzorek nanese na gelovou elektroforézu, která patří k nejpoužívanějším separačním technikám. Principem metody je pohyb záporně nabitých molekul nukleových kyselin. Pomocí gelové elektroforézy můžeme separovat molekuly DNA na základě rozdílných rychlostí

pohybu molekul DNA v gelu. Po skončení elektroforetické separace je nutné separované fragmenty DNA zviditelnit. Pro vizualizaci DNA se používá značení barvivem, které se k DNA váže, např. etidiumbromid nebo SYBR Green a v ultrafialovém záření potom dochází k zviditelnění DNA.

Další vyšetřované metody nepatří ani tak do spektra molekulárně-biologických metod, protože nedochází k izolaci nukleových kyselin, ale pracuje se s mikroskopickými sklíčky s fixovanými tkáněmi. Rozdíl od dříve popsaných imunohistochemických metod je v tom, že se preparát pozoruje pod mikroskopem fluorescenčním, a proto mohou být lokalizovány mnohem menší struktury než u světelného mikroskopu. K základním cytogenetickým vyšetření patří metoda FISH. FISH je zkratka počátečních písmen anglického názvu „**fluorescence in situ hybridization**“ a umožňuje identifikovat řadu chromozomálních změn, např. zjištění počtu kopií genů, zjištění počtu chromozomů, stanovní chromozomálních zlomů a translokací a dalších změn na úrovni nukleových kyselin přímo *in situ* ve tkáni. Principem FISH je vazba sondy, kterou si připravíme v laboratoři nebo je komerčně dodávaná, s vláknem nukleové kyseliny. Sonda se k vlákně nukleové kyseliny váže principem komplementarity. To znamená, že o sebe jednotlivé stavební kameny kyseliny a sondy přesně zapadnou. Vzhledem k tomu, že je sonda fluorescenčně značená, můžeme ji sledovat pod fluorescenčním mikroskopem a z toho usuzovat na pořadí kamenů v molekule DNA, sledovat stupeň zmožení genů nebo sledovat dynamiku buněčného jádra.

**Molekulárně-biologických** vyšetření se na Ústavu klinické a molekulární patologie provádí celá řada. Vedle vyšetření pro diagnostické účely jsou však molekulární metody využívány i ve výzkumné části zaměřené ústavu

Vyšetřování **přestaveb genů pro imunoglobuliny** patří k základní metodě k zlepšení diagnostiky a klasifikaci lymfoproliferativních onemocnění. Lymfoproliferativní onemocnění jsou nádory lymfatických uzlin a extranodální lymfatické tkáně. Molekulárně biologická analýza genů kódujících těžké řetězce imunoglobulinů (IgH) B- buněk a genů kódujících buněčné receptory pro antigen T- buněk (TCR) metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Principiálně jde o mnohonásobné namnožení zkoumaného úseku DNA metodou PCR, které umožňuje vyšetření jednak těžko hodnotitelných případů, kdy jsou ostatní (tzn. morfologická i imunohistochemická) vyšetření nejednoznačná, a dále pak umožňuje vyšetření i z archivních materiálů, tedy tkání fixovaných formalínem a zalitých do parafínu. B a T lymfocyty, tedy buňky imunitního systému, jsou schopné reagovat na vstup cizorodých látek nebo antigenů do organismu. S vysokou specifitou mohou rozpoznat neomezené množství cizích buněk a látek. Přesto, že T buňky zprostředkovávají buněčnou imunitu a B buňky humorální, jsou T buněčné receptorové geny velice podobné imunoglobulinovým a jejich organizaci. Je však nutné zdůraznit, že tyto geny, které kódují polypeptidové řetězce

imunoglobulinů a TCR receptorů se nedědí jako celé geny, dědí se pouze genové segmenty neboli subgeny, které však ještě nepředstavují funkční gen, nejsou tedy schopné kódovat funkční polypeptid. Teprve během zrání B a T lymfocytů dochází k přeskupení subgenů, tzv.V(D)J rekombinaci a vytvoření funkčního strukturního genu kódujícího funkční polypeptidy. Toto přeskupení subgenů IgH a TCR představuje unikátní klonální marker a PCR technika se využívá k detekci klonality u lymfoproliferativních onemocnění.

Druhým typem, při kterém se využívají metody molekulární biologie je **vyšetření genu PCA3 ze vzorků lidských tkání metodou kvantitativní RT-PCR**. Tento typ vyšetření se používá pro diagnostiku a stanovení agresivity nádorů prostaty. Karcinom prostaty je nejčastější zhoubný nádor v našich zemích a v absolutních číslech patří mezi nádory s nejvyšší mortalitou. Jedná se o poměrně novou metodu, protože standardní vyšetření jako je *per rectum* nebo stanovení hladiny PSA (prostatický specifický antigen) nedávaly přesvědčivé výsledky. PCA3 (prostate cancer gene 3) je gen, který je ve zvýšené míře přítomen v raných fázích vývoje prostaty, a to pouze v buňkách nádoru. Jiné orgány tento gen neobsahují. Vyšetření genu se provádí ze vzorků moče, která obsahuje po masáži prostaty určité množství prostatických buněk. Bližší porozumění molekulárních změn souvisejících se vznikem a rozvojem karcinomu prostaty může poskytnout racionální podklad pro vývoj nových způsobů léčby.

Dalším vyšetřením prováděným na Ústavu klinické a molekulární patologie je vyšetření na **přítomnost DNA *Mycobacterium tuberculosis complex* metodou PCR**. *Mycobacterium tuberculosis* je původcem závažného převážně respiračního onemocnění - tuberkulózy. Význam tuberkulózy v současnosti stoupá v souvislosti s výskytem nových odolných kmenů mykobakterií, se vzrůstajícím počtem pacientů se sníženou imunitou a v souvislosti se zvýšenou migrací populace. Infekce je lokalizována převážně v plicích. Klasické testy pro diagnostiku tuberkulózy jsou založeny na technice barvení a kultivace mykobakterií. Tyto tradiční metody jsou časově velmi náročné (kultivace vyžaduje 2-4 týdny) a jejich senzitivita je nízká. Proto se v diagnostice tuberkulózy stávají standardem citlivé a rychlé metody PCR, schopné zachytit i minimální množství mykobakterií v jakémkoliv klinickém materiálu. Popisovaná metoda je určena pro detekci specifické sekvence DNA *Mycobacterium tuberculosis* metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Maximální citlivost metody je 3-10 bakterií v 1ml tělních tekutin nebo řádově do 10<sup>1</sup> v 1 ml sputa. Metoda specificky detekuje druhy, spadající do skupiny *Mycobacterium tuberculosis complex* (především *M. tuberculosis* a *M. bovis*).

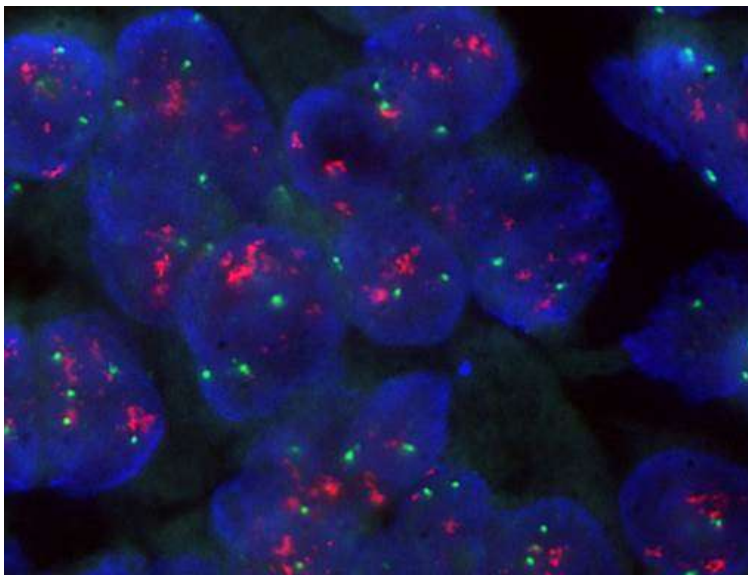
V rámci **cytogenetického** vyšetření se na Ústavu klinické a molekulární patologie provádí 2 metody, a to: vyšetření genu HER2/neu (c-erbB-2) ze vzorků lidských tkání metodou FISH a detekce EBV infekce *in situ* hybridizací v parafínových řezech. Co se týče prvního vyšetření, je třeba si uvědomit, že na rozdíl od klasické imunohistochemie, kdy je detekována bílkovina, je v případě FISH detekován gen,

resp. jeho zmnožení (amplifikace). Pro biologickou léčbu jsou indikovány pacientky, které mají jak zvýšenou hladinu proteinu HER2/neu a/nebo zvýšený počet kopií genu *HER2/neu*. Principem druhé metody je detekce specifických RNA Eppstain-Barrové viru přímo na řezech tkáně. EBV je typ herpetického viru, který se podílí na vzniku některých typů nádorů lymfatické tkáně a infekční mononukleóze.

Ročně se na ústavu provede kolem 250 molekulárně-biologických vyšetření.



obr. 1 Pohled do molekulárně-biologické laboratoře



obr. 2 FISH genu *HER2/neu* (červená) na interfázních jádrech karcinomu prsu

