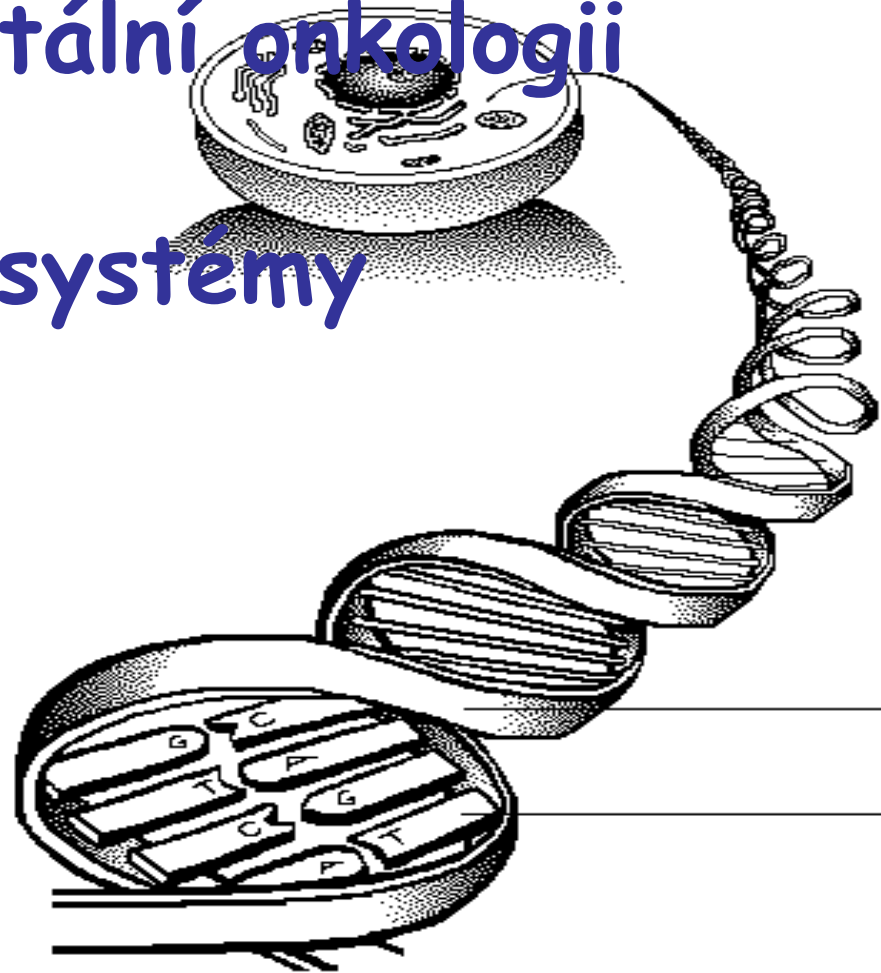


Základní metodické
přístupy v
experimentální onkologii
&
Modelové systémy



Experimentální modely v onkologii

Obecné zásady při výzkumu:

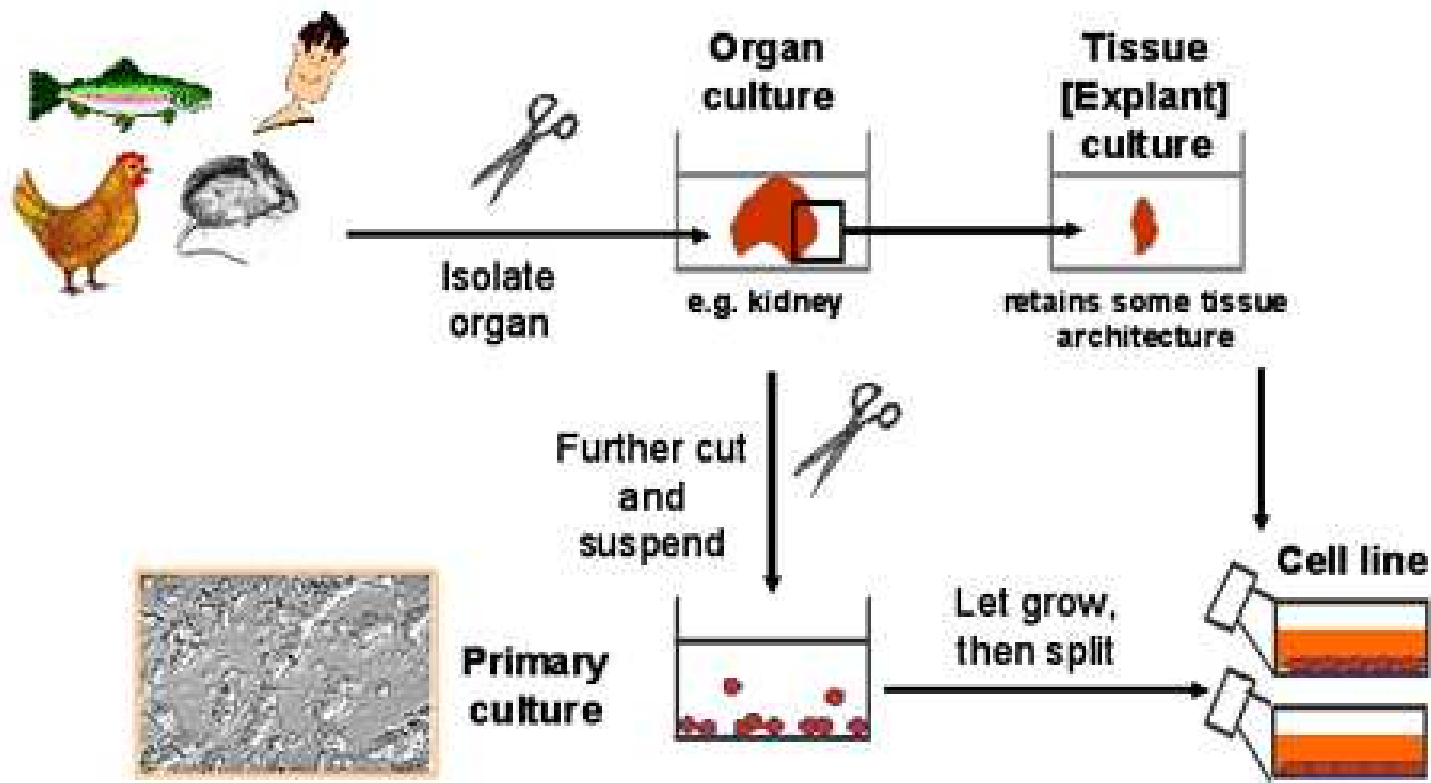
- Snaha porozumět fundamentálním procesům funkce a vývoje živých organismů
- Formulace přesně definovaných otázek ve vymezené oblasti výzkumu
- Výběr vhodného modelového systému (Mendel)
- Zjednodušený, ale impaktní systém umožňující testovat specifickou hypotézu a zda se dosáhne výsledného fenotypu

• Buněčné linie

- *Caenorhabditis elegans*
- *Drosophila melanogaster*
- Kvasinky
- *Danio rerio*

• *Mus musculus*

Příprava buněčných linií



Types of in vitro systems



Práce s eukaryotickými buněčnými liniemi

- Optimální podmínky kultivace (5-10% CO_2 , 37°C, pH, glukóza, růstové faktory, antibiotika)
- Nebezpečí kontaminace jinou buněčnou kulturou [DSMZ, ATCC (mikrosatelitní DNA fingerprinty)]

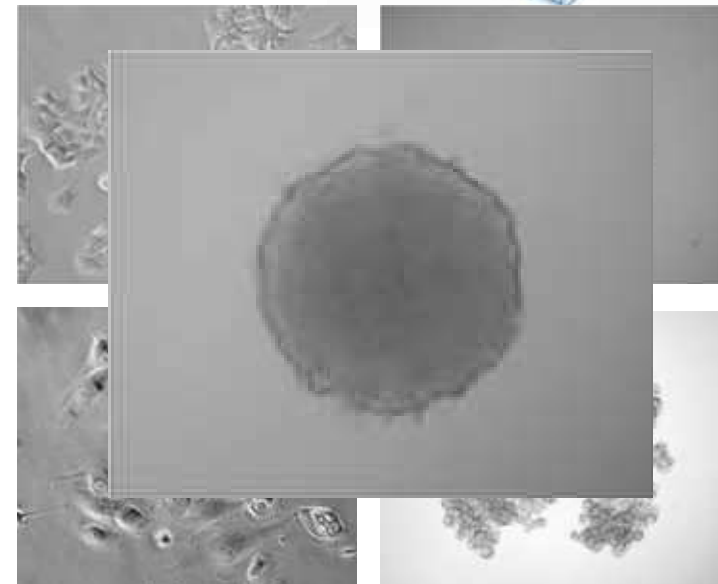
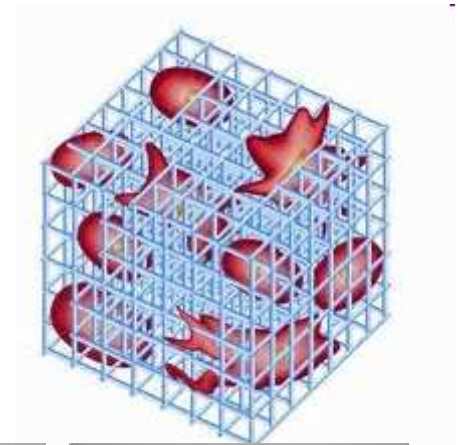
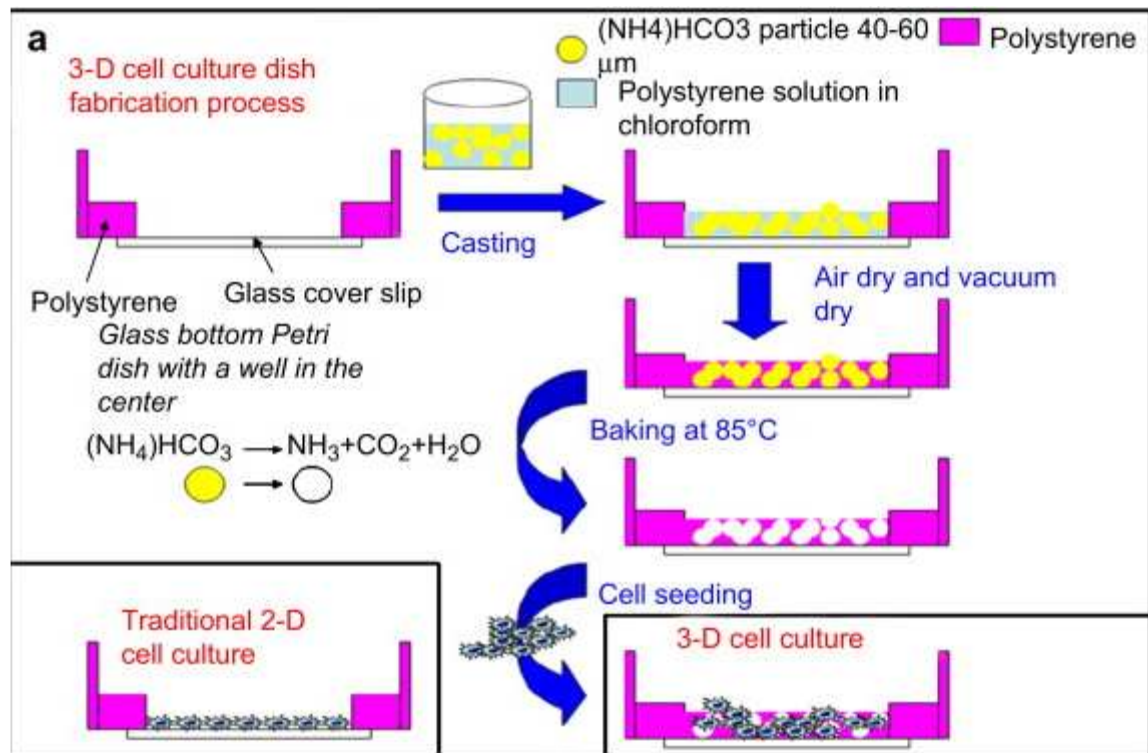
Buňky se dělí a rostou dokud neobsáhnou celý prostor, pak následuje:

- Zástava b. dělení kontaktní inhibicí
- - Indukce buněčné diferenciaci kontaktní inhibicí
 - Akumulace apoptotických a nekrotických buněk
 - Deplece nutričních faktorů
- Výměna média (pH), pasážování buněk, kryoprezervace

➤ Konfluencie buněk, suspenzní vs. adherentní buňky

➤ Genové manipulace

➤ 2D vs. 3D kultivace

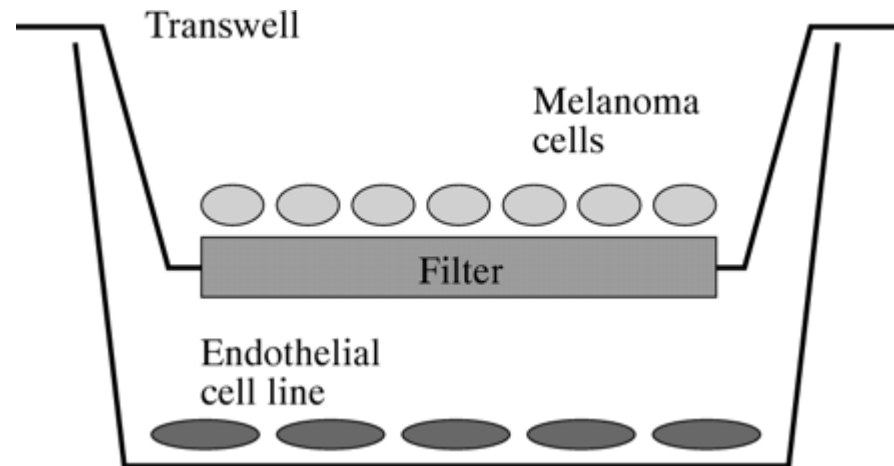


Výhody a nevýhody buněčných linií

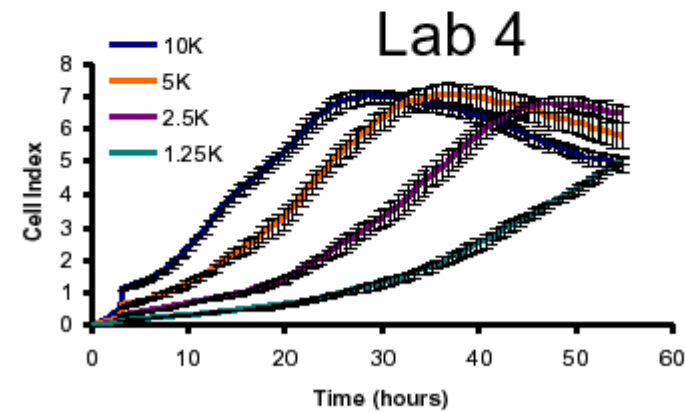
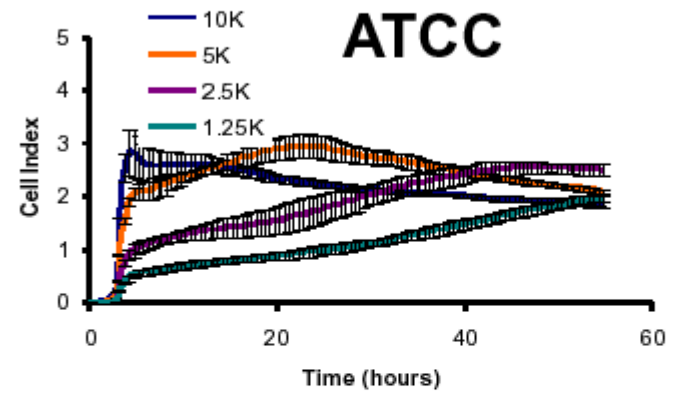
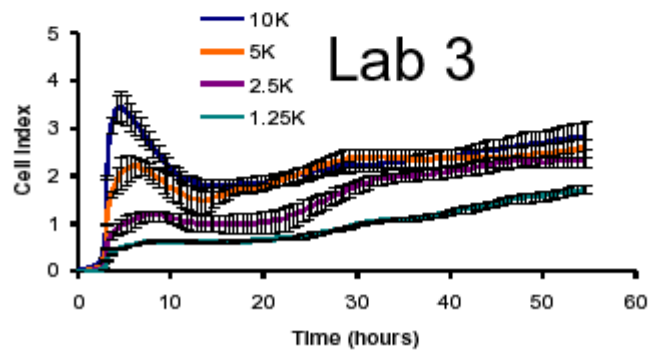
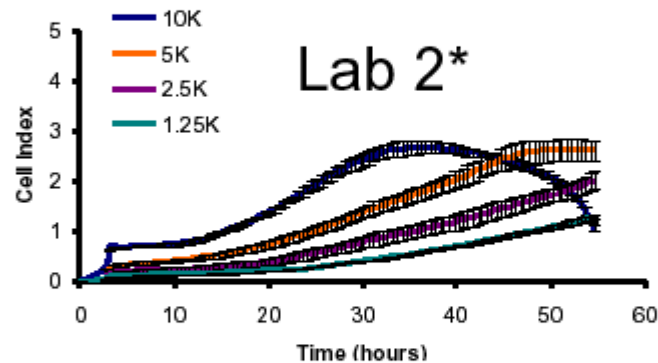
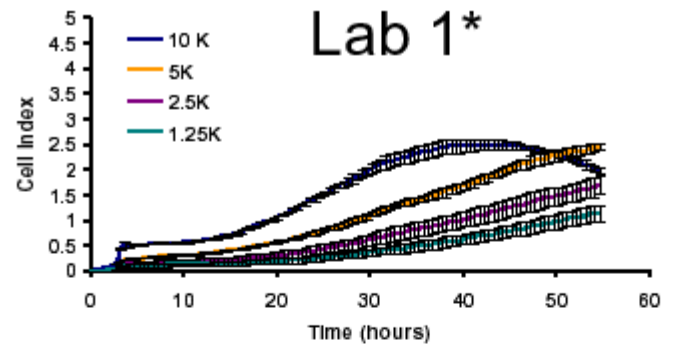
- Prakticky neomezená životnost
- Kontinuální a rychlá proliferace
- Snadná práce
- Možnost připravit stabilní KO, transientní transfekce, a další genetické manipulace



- Atypické okolí nádorových buněk
- Nebezpečí kros-kontaminací
- Kumulace dalších změn



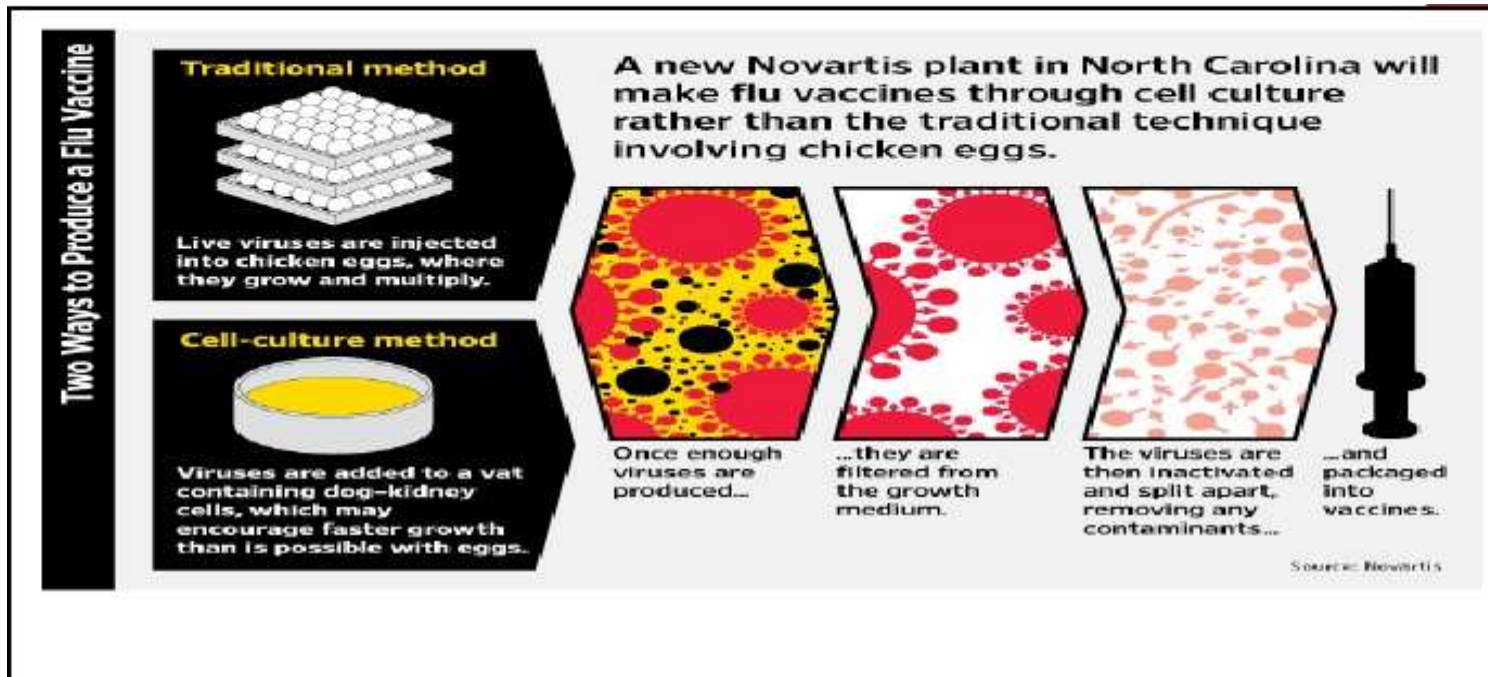
Buněčné linie



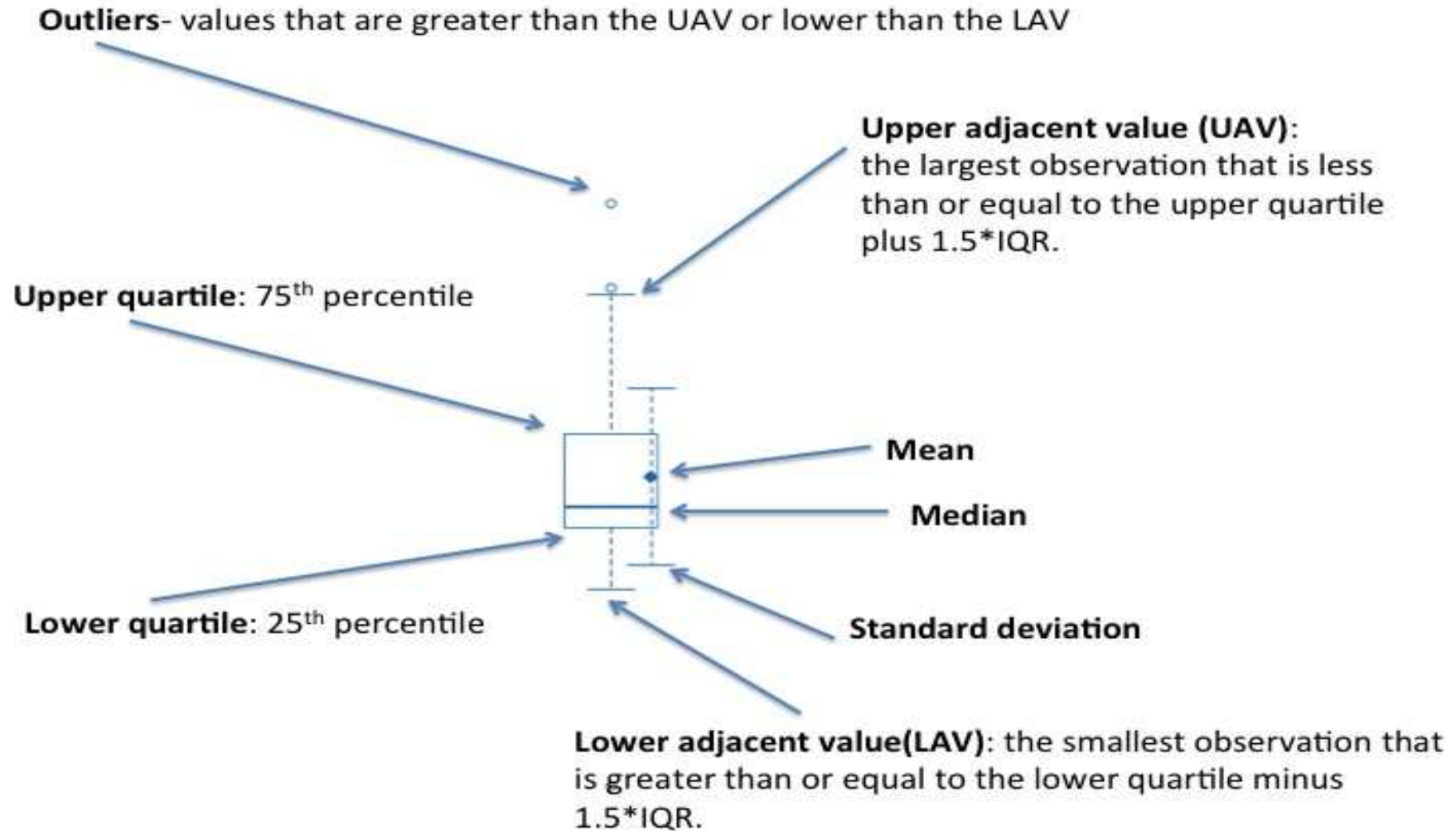
* These labs were from the same institute

Využití buněčných linií v biotechnologii

- Příprava monoklonálních protilátek
- Vývoj buněčných vakcín



Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) projekt



Kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*)

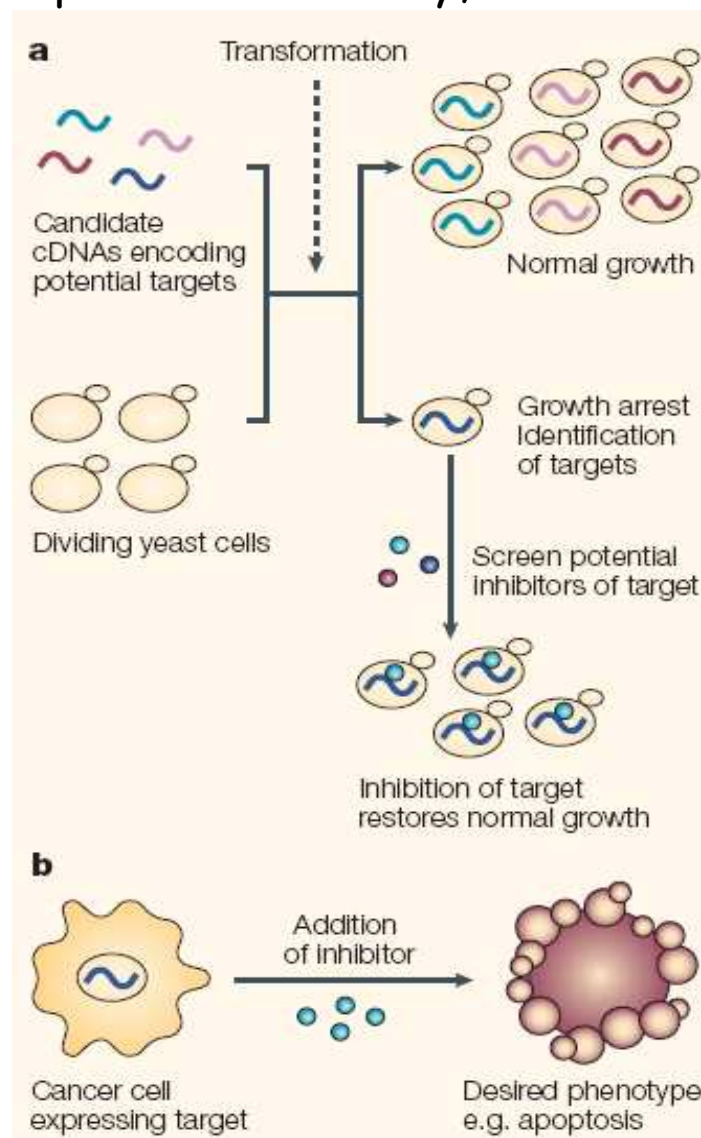
Snadno kultivovatelné, 1. eukaryotický organismus plně osekvenovaný, celá řada funkčních homologů se savčími buňkami

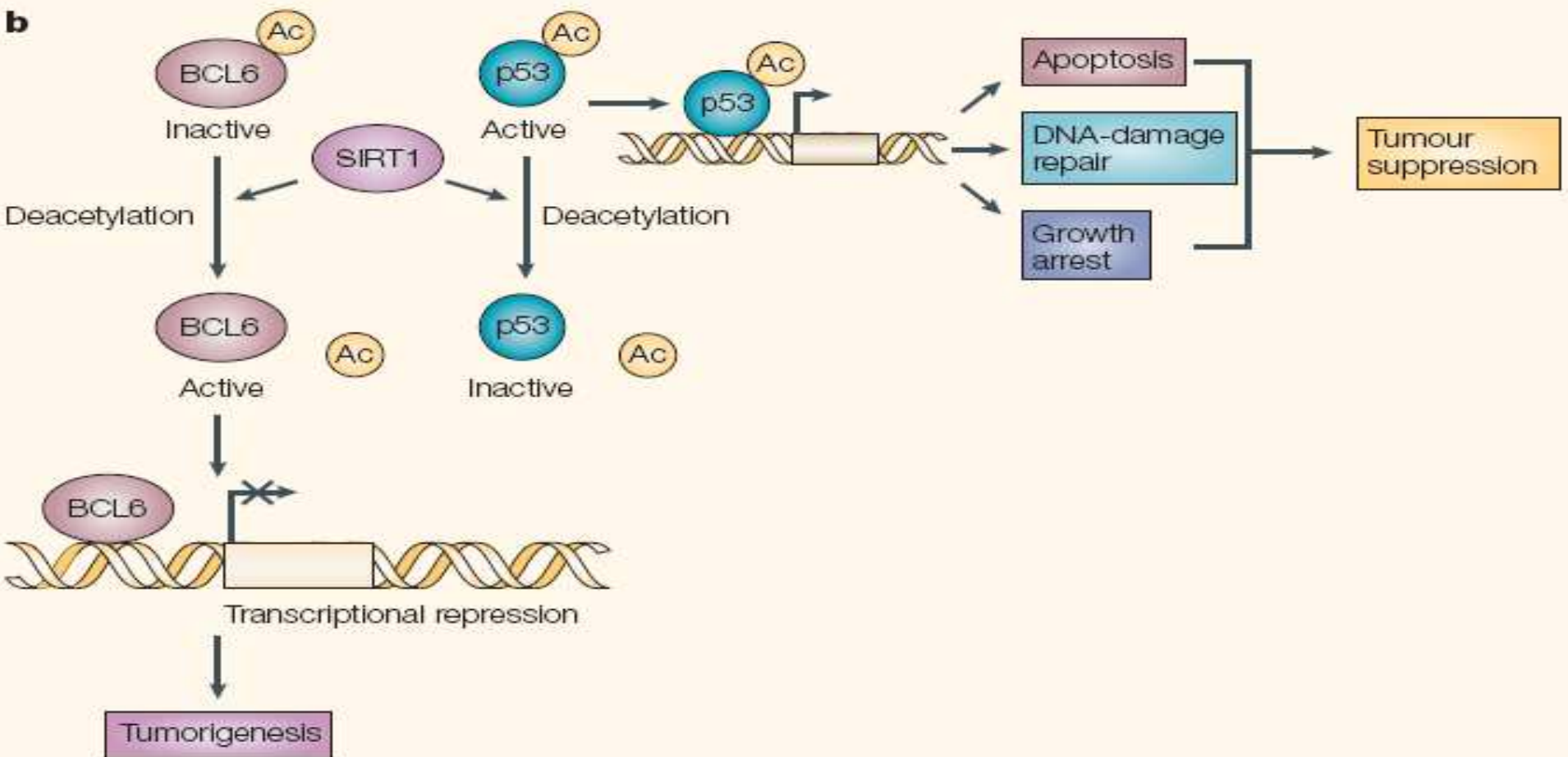
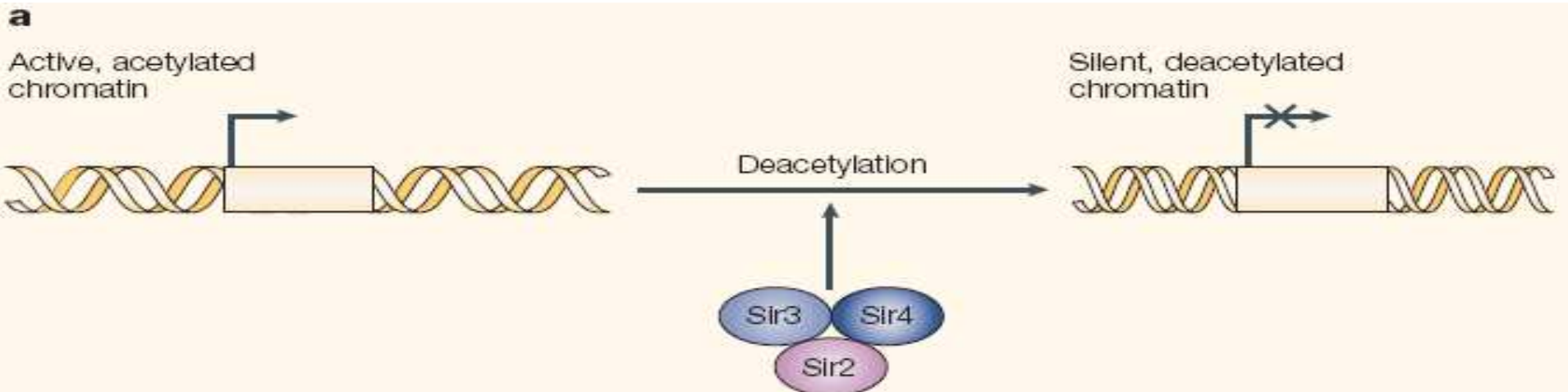
➔ Vhodný model pro screening protinádorových léčiv

Table 1 | Conservation between yeast and human pathways altered in cancer

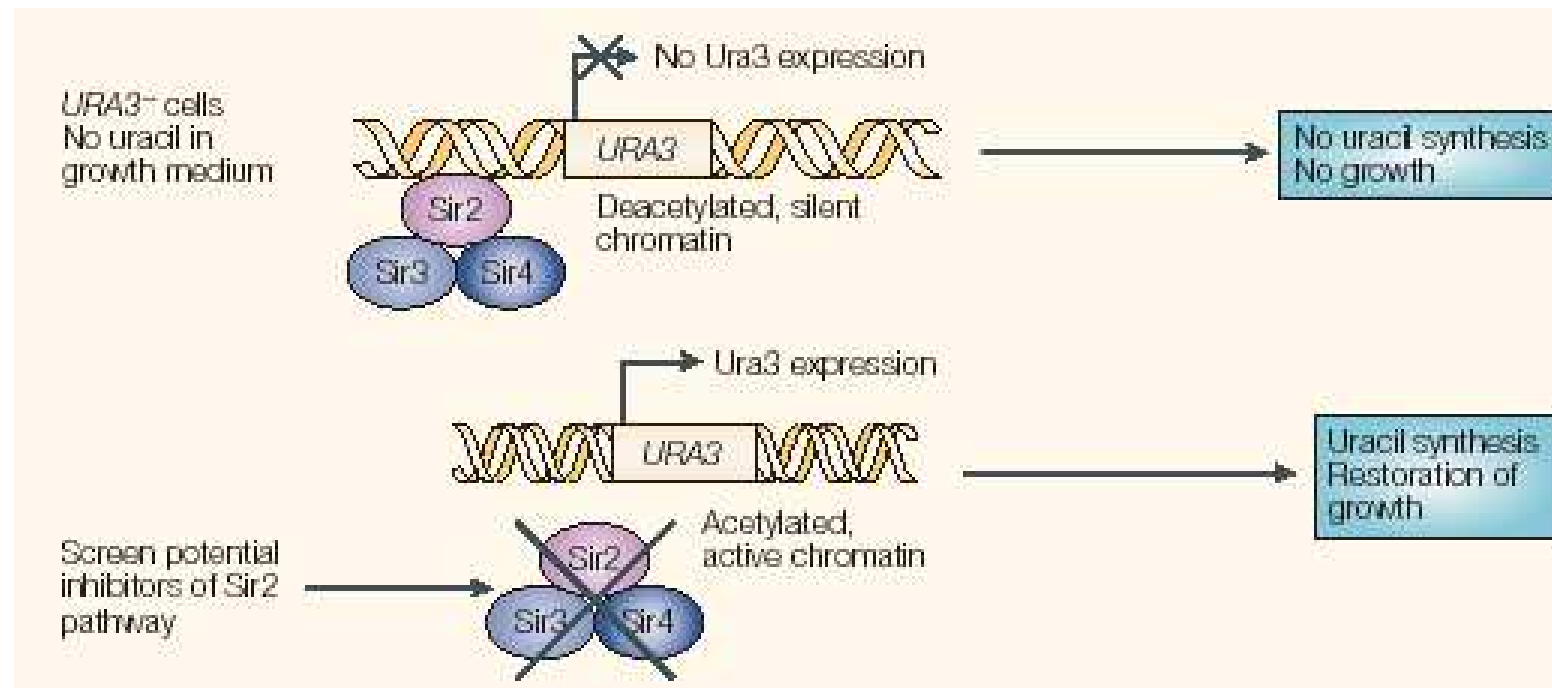
Cancer-related pathway	Human genes	Yeast genes
DNA-damage checkpoint	<i>ATM, ATR</i>	<i>RAD53</i>
Replication checkpoint	<i>BLM, WRN1</i>	<i>SGS1</i>
Mitotic-spindle-assembly checkpoint	<i>BUB1, BUBR1</i>	<i>BUB1</i>
Mismatch repair	<i>MLH1</i>	<i>MLH1</i>
Repair of DNA double-strand breaks	<i>BRCA1</i>	<i>RAD50, RAD52</i>
G1- to S-phase transition	<i>Cyclin D1, cyclin E</i>	<i>CLN2</i>
Response to mitogenic stimuli	<i>TOR</i>	<i>TOR1</i>

Pozitivní selekční screening





Příklad využití kvasinek při screeningu b. signalních drah při testování nových látek



Caenorhabditis elegans

Dobře pěstovatelný na petriho misce

Velikost genomu 8×10^7 bp

Pohlaví determinováno chromosomem X

Drosophila melanogaster

Malé, snadno pěstovatelné, krátký životní cyklus (2 týdny), relativně malý genom ($1,4 \times 10^8$ bp), existence polytenních chromosomů, řada mobilních genetických elementů.

Transformační systém využívající mobilní genetický element P, po injikaci do embrya - tvorba mozajek (využití např. při studiu tkáňově specifické exprese)

Danio rerio (Zebrafish) jako model pro p53

p53-mutant vznik tumorů ze Schwanných buněk

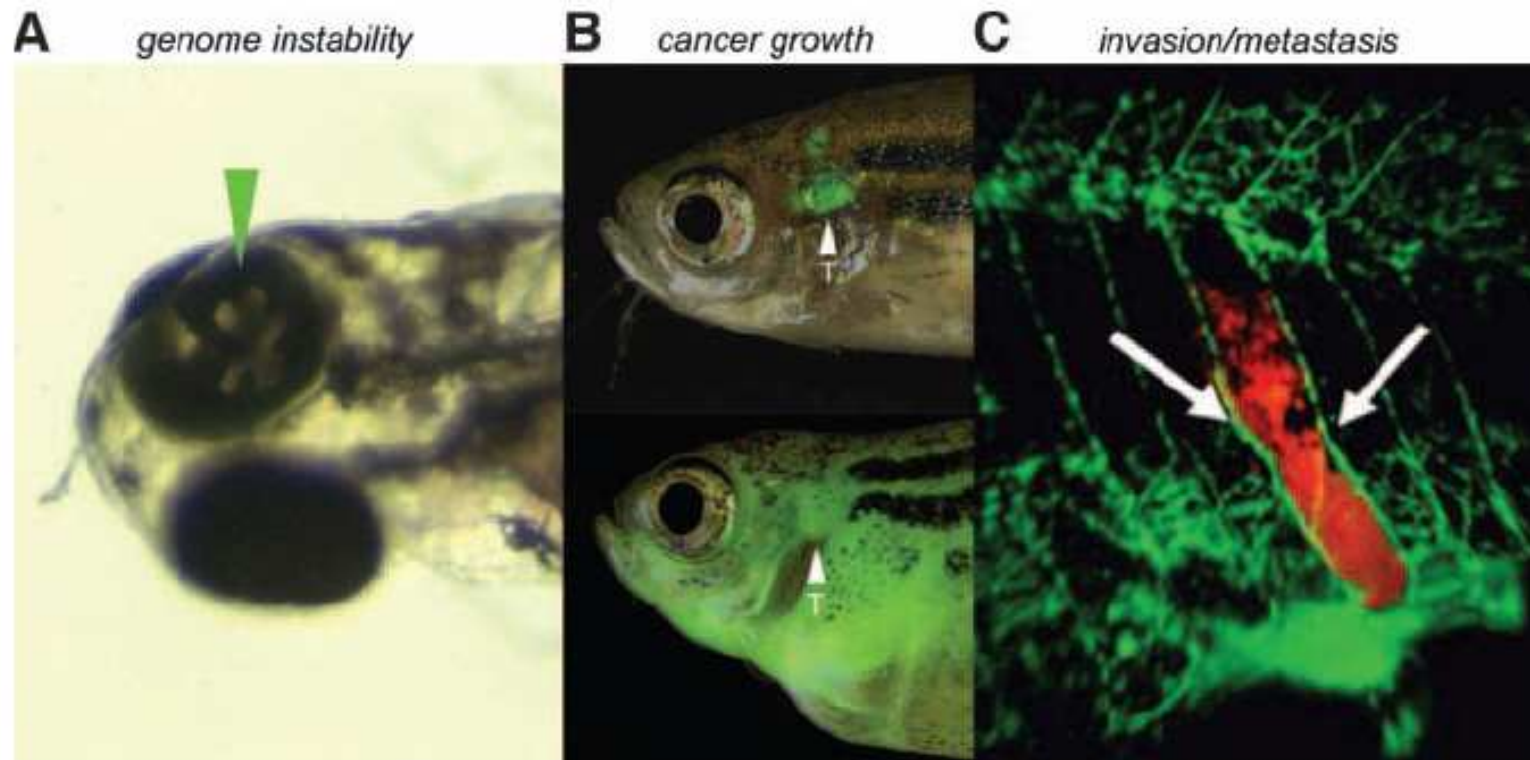
p53-mutace + mutace B-raf vznik maligního melanomu

Chemoterapie (jednoduchá aplikace, velké množství ryb, dlouhodobá léčba x nespecifická, predominance jaterních tumorů, potenciální riziko pro výzkumníka)

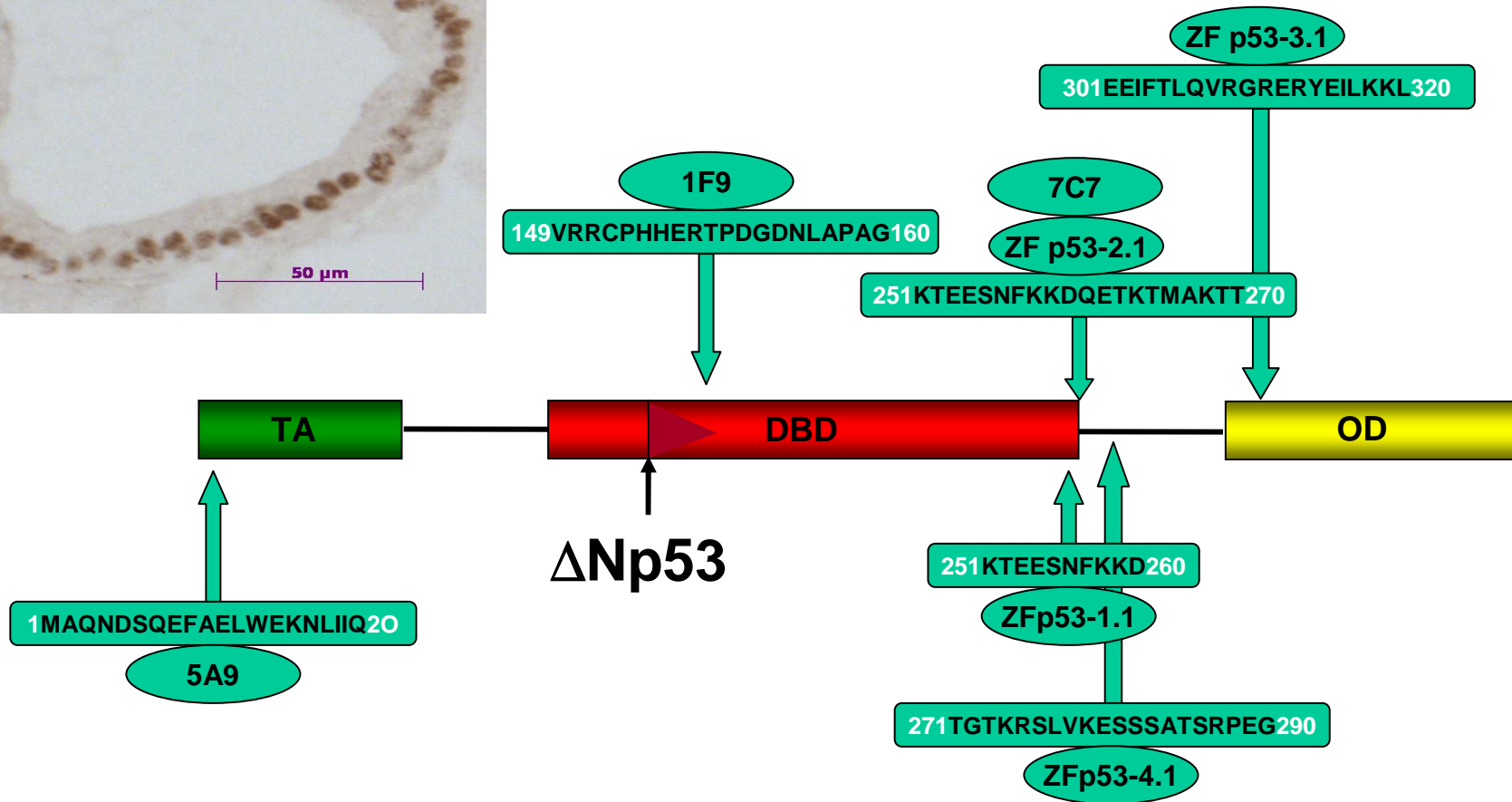
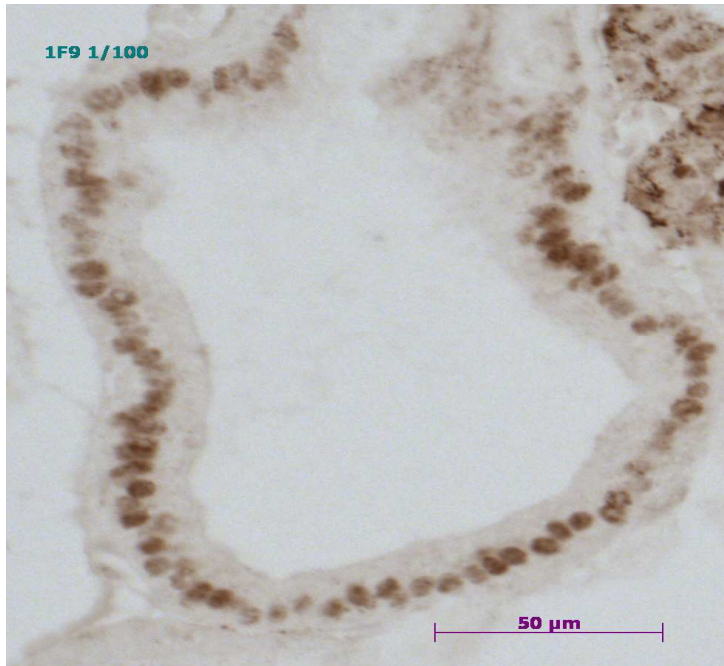
Transplantace savčích buněk (rychlost, průhledná embrya, lidské nádory, fluorescence x, nízká penetrance tumorů)

Genetické knockouty (Inaktivace jednoho specifického genu - N-ethyl-N-nitrosourea mutagenese, „Human-like cancer“ mutace x slabá penetrance, genové duplikace, rozdílné spektrum tumorů, „background“ mutace)

Expres transgenů (jednoduše generovatelné injekcí, použití lidských genů, použití fluorescence, tkáňově specifická exprese x nedostatek specifických promotorů)



Panel nových mAb proti p53



Mus musculus

Příprava inbredních kmenů - možnost pokusů na geneticky uniformních organismech (více jak 700 mutovaných kmenů).

Obvykle se provádí tzv. „gene knockout“, tzn. funkční geny jsou nahrazeny nefunkčními nebo mírně pozměněnými variantami jež odpovídají genetickým změnám vzniklým v nádorové buňce.

Nejvýznamnější příspěvek k pochopení mechanismů lidských nádorových onemocnění.

Mus musculus

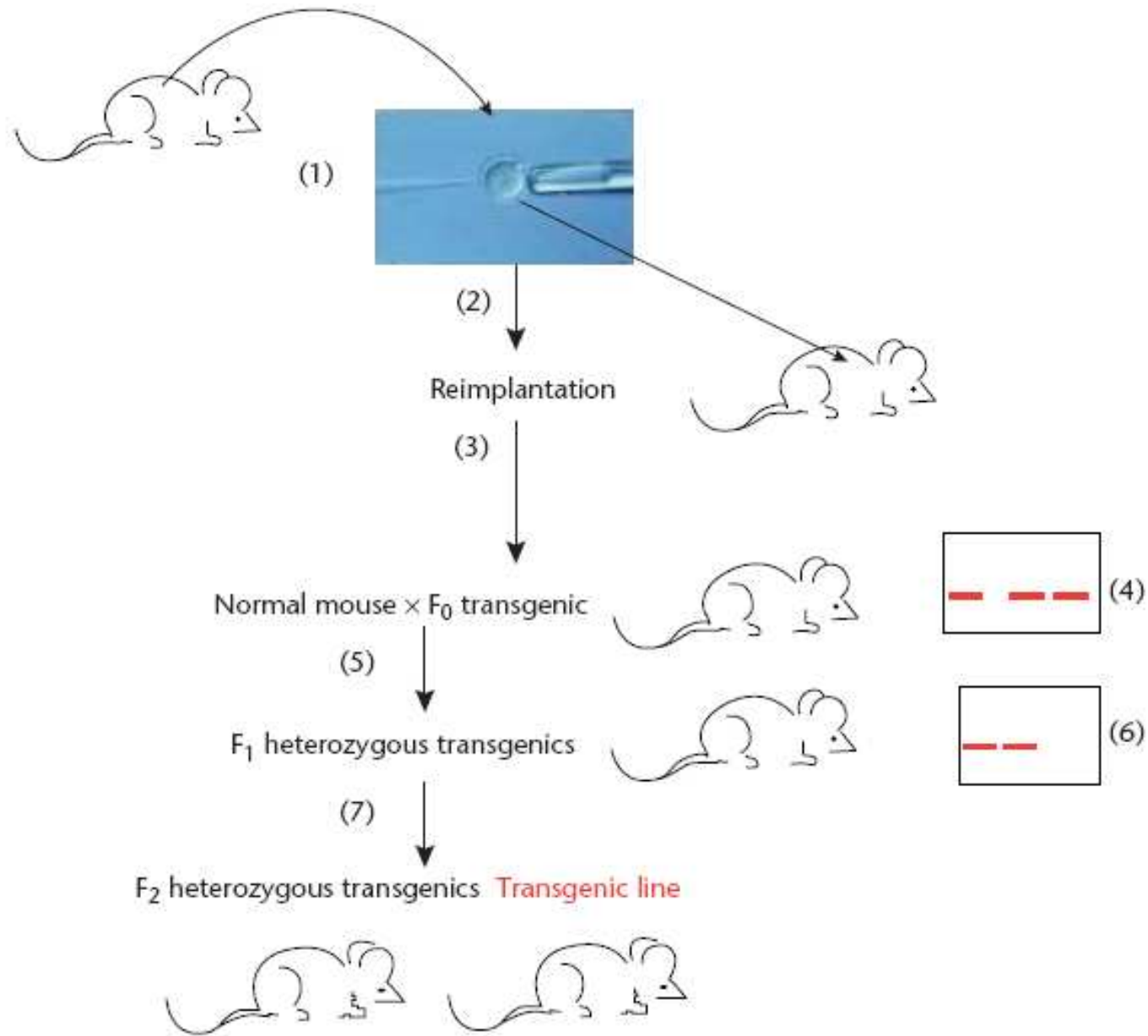
Příprava inbredních kmenů - možnost pokusů na geneticky uniformních organismech (více jak 700 mutovaných kmenů).

Obvykle se provádí tzv. „gene knockout“, tzn. funkční geny jsou nahrazeny nefunkčními nebo mírně pozměněnými variantami jež odpovídají genetickým změnám vzniklým v nádorové buňce.

Nejvýznamnější příspěvek k pochopení mechanismů lidských nádorových onemocnění.

4 metody přenosu GI:

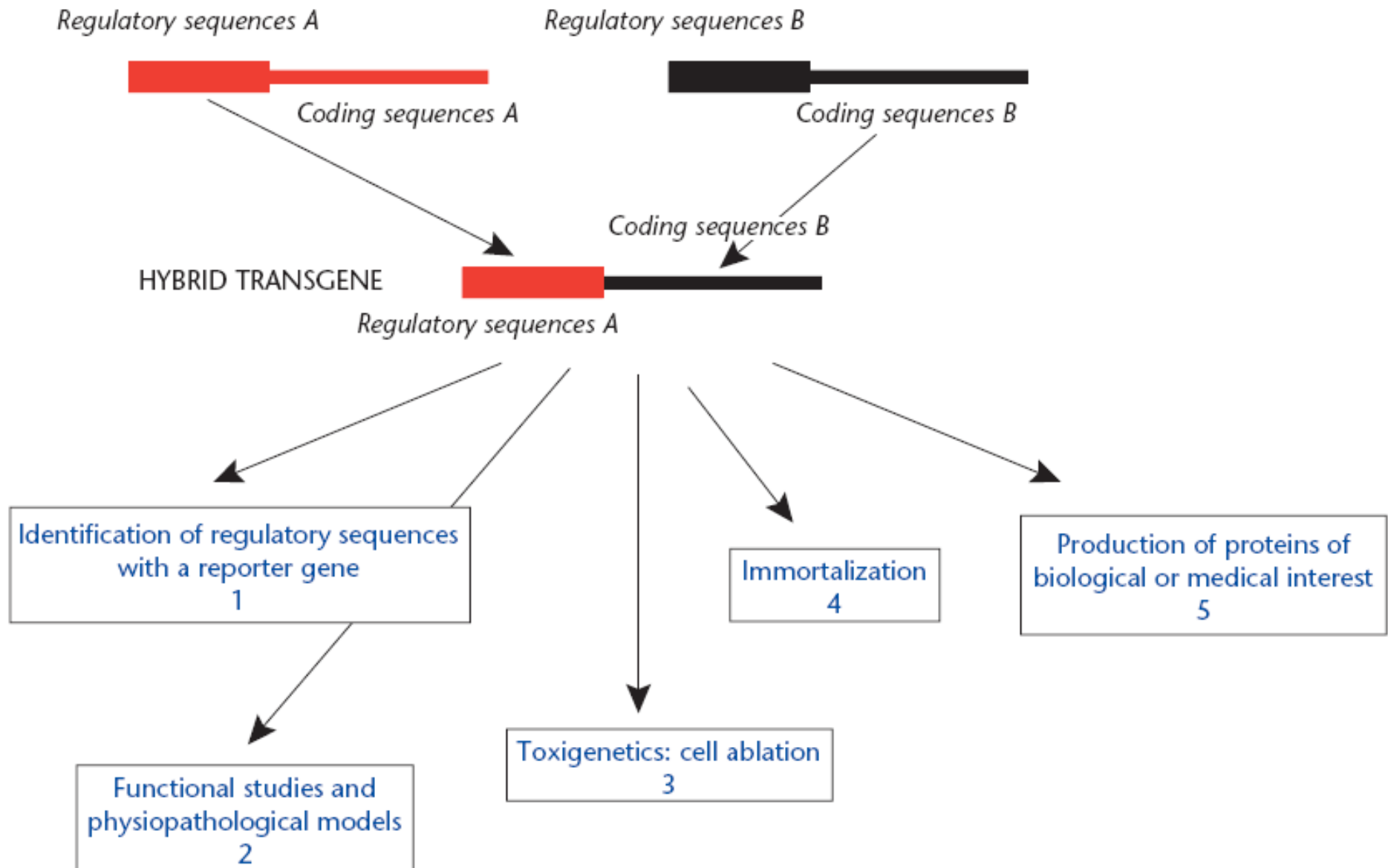
- Infekce buněk kostní dřeně rekombinantním retrovirem umožní expresi přeneseného genu v infikovaném zvířeti
- Infekce embrya pomocí rekombinantního retrovirového vektoru
- Transformace embryonálních kmenových buněk
- Klonovaná DNA může být mikroinjikována do fertilizovaných oocytů a přenesena do náhradní matky

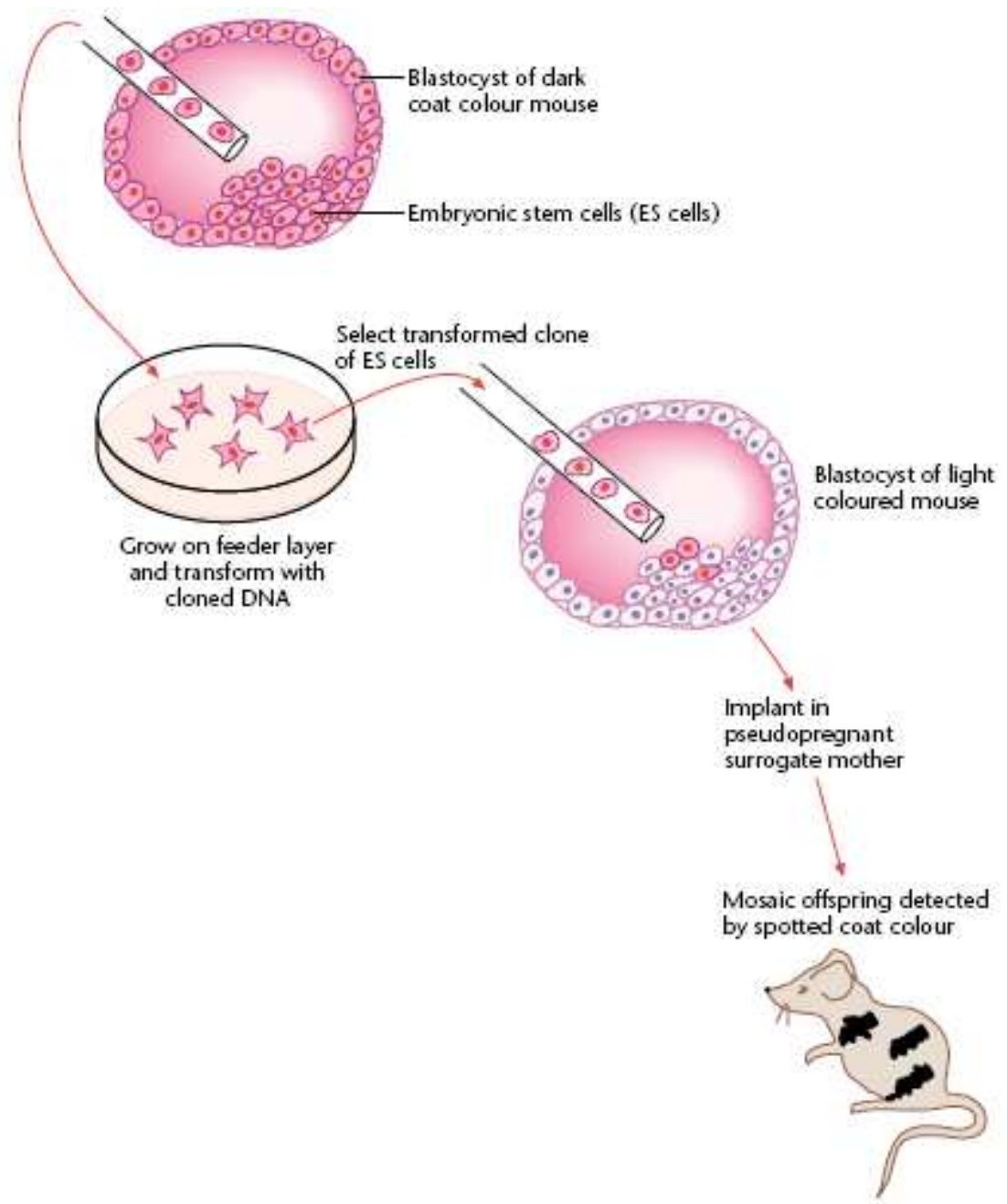


*Poprvé gen pro elastázu, nezbytná 134 bp regulační oblast pro správnou funkci

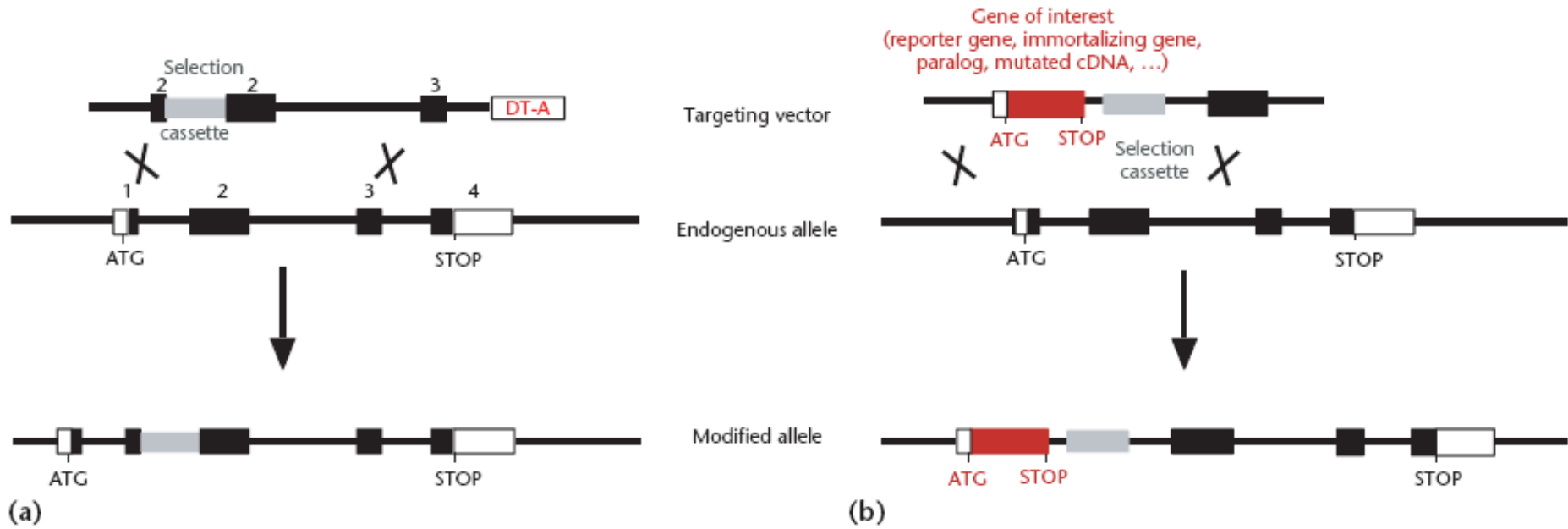
*Náhodný charakter integrace → poziční efekt !!! (YACs & BACs)

„Hybridní transgen“





Knockout and knockin

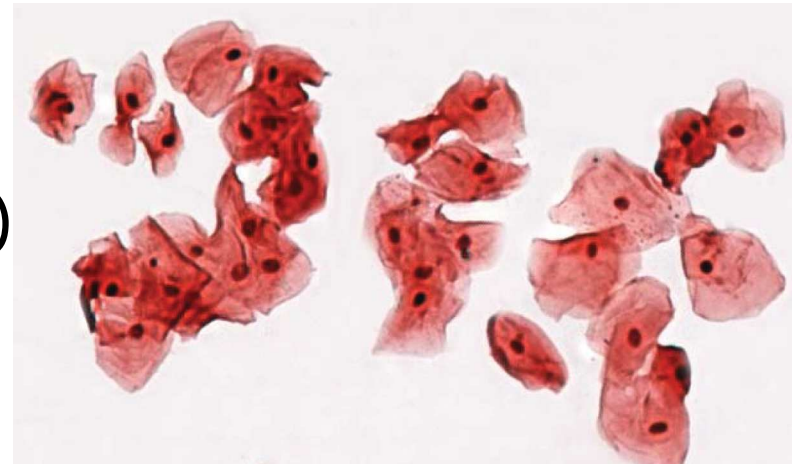


Využití homologní rekombinace u ES buněk (více jak 1000 genů "KO")

Odběr biologického materiálu

Biologický materiál pro genetickou analýzu

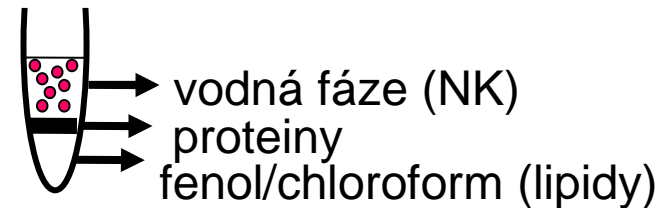
- Nesrážlivá krev
- Kostní dřeň
- Moč
- Sliny
- Bukální sliznice
- Fibroblasty (kožní biopsie)
- Tkáně - N2
 - FFPE



Izolace nukleových kyselin

- Umístění buněk/tkání do extrakčního pufru
- Dlouhodobé uchování (RNA later, chelatační činidla)

Fenol/chloroformová extrakce a následně etanolová nebo isopropanolová precipitace



Metody adsorpční

Adsorpce NK na silikagel v přítomnosti chaotropních solí (guanidin isothiokyanát, NaI), eluce přes kolonky

Metody vysolovací

obchází použití organických rozpouštědel, při izolaci z krve nejprve hemolýza, následuje izolace DNA z leukocytů

Koncentrace, kontrola čistoty a kvality DNA / RNA

A260 = 1, c(dsDNA) = 50 µg/ml

A260 = 1, c(ssDNA) = 33 µg/ml

A260 = 1, c(ssRNA) = 40 µg/ml

A260/A280 v rozmezí 1,7 - 1,8

A260/A280 < 1,7

A260/A280 > 1,9

čistá DNA

DNA znečištěná proteiny nebo organickými látkami

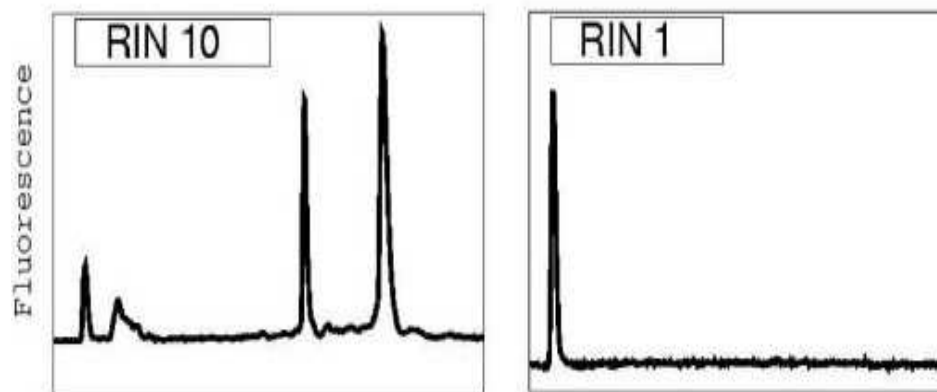
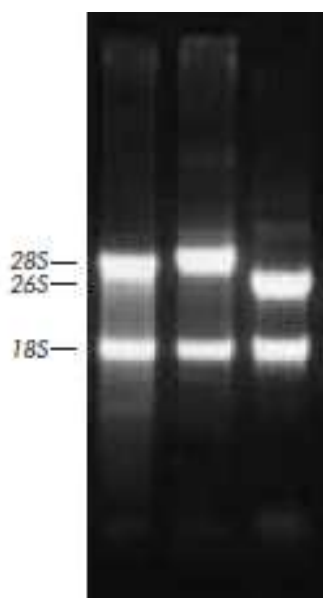
DNA znečištěná RNA nebo organickými látkami

A260/A280 = 1,9 – 2,1

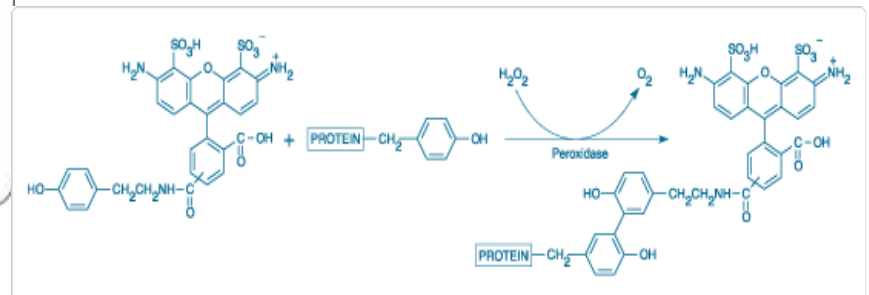
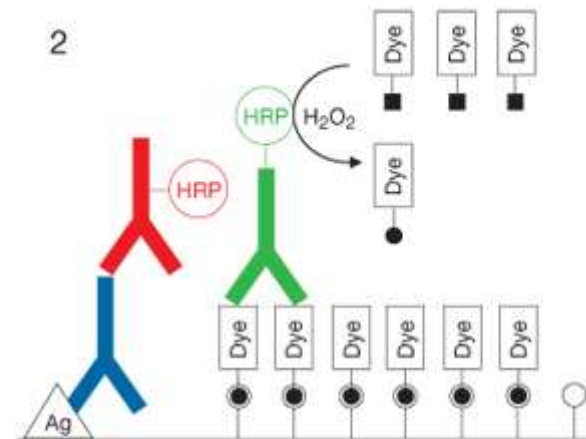
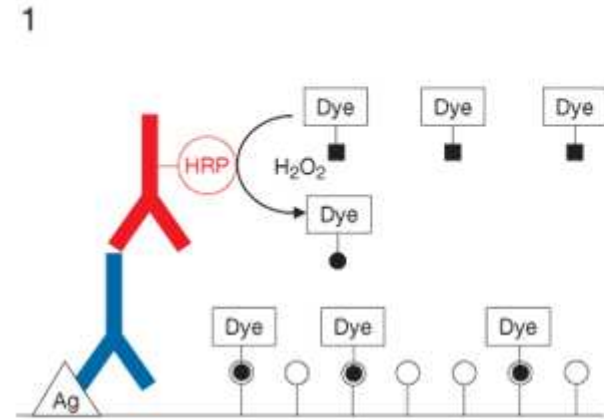
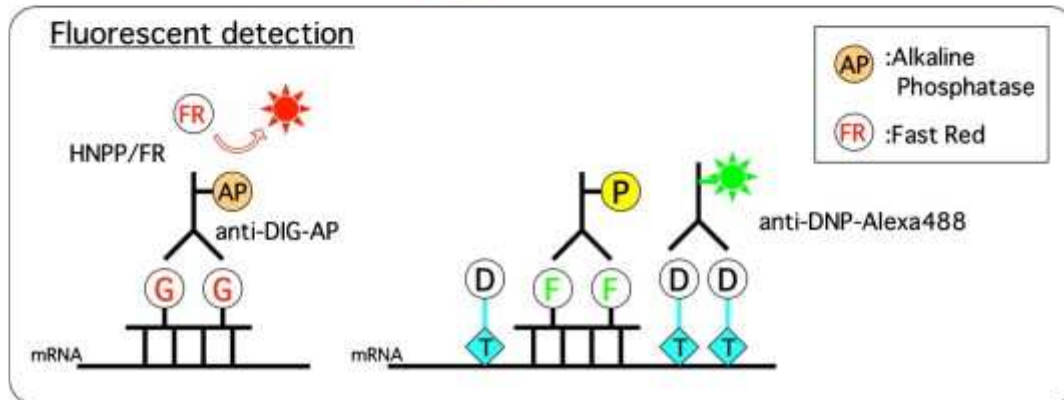
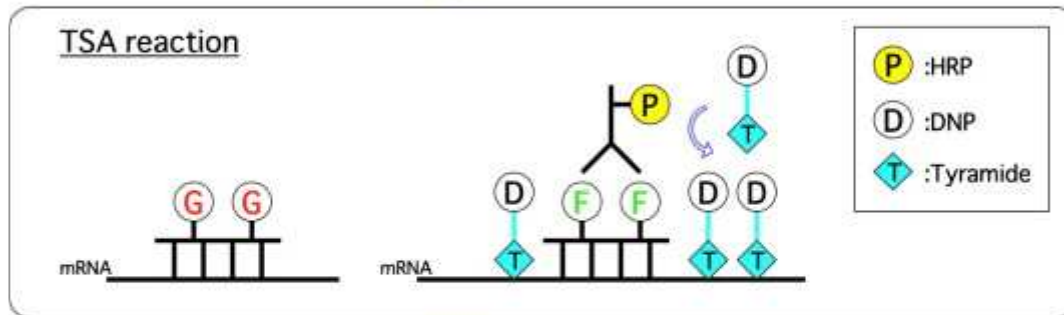
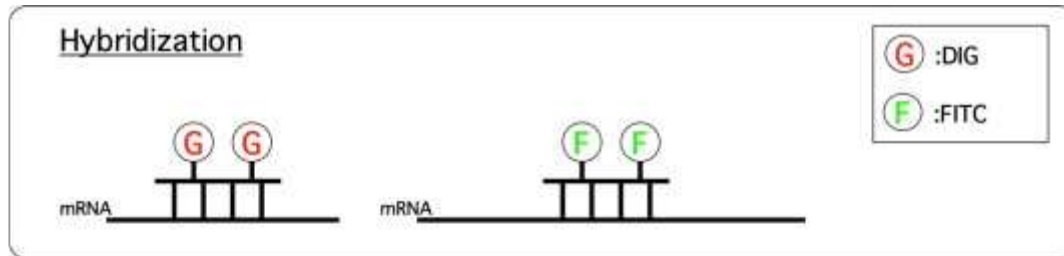
A260/A280 < 1,9

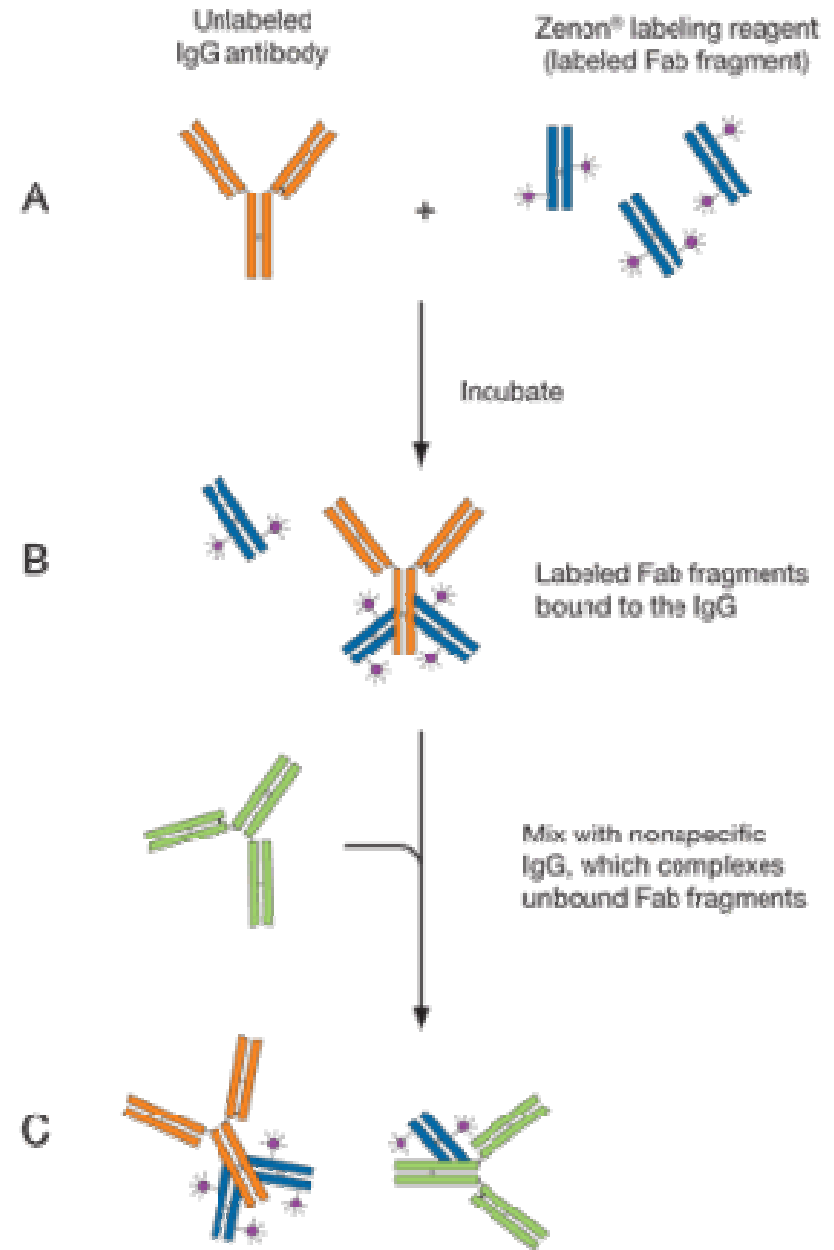
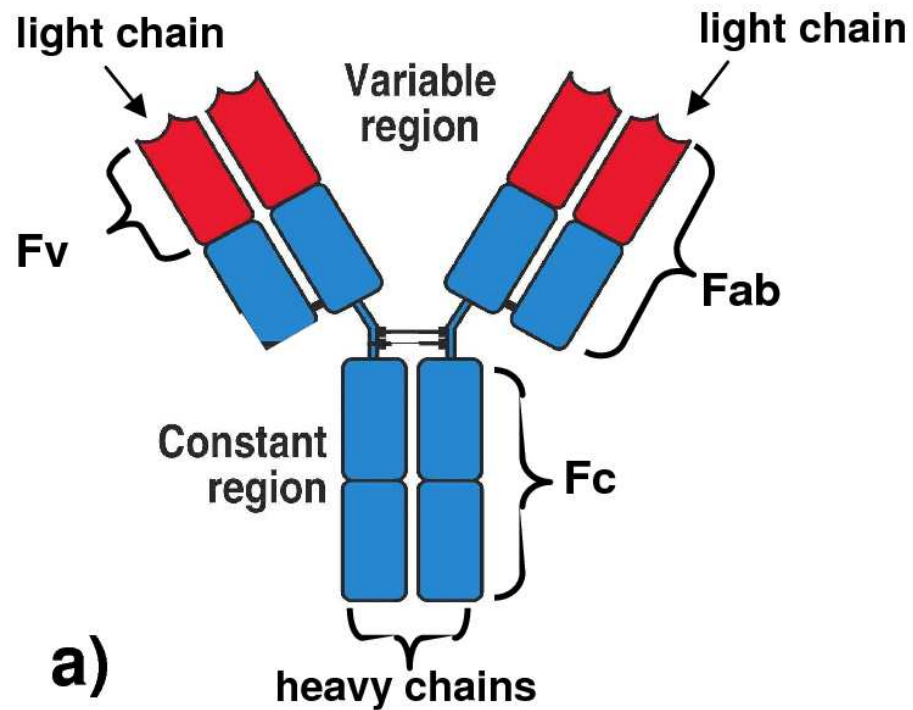
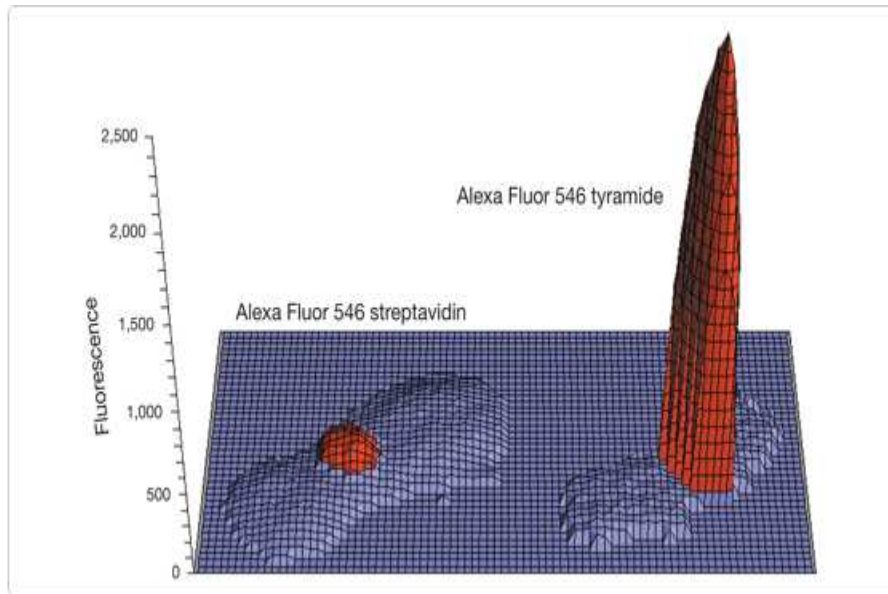
čistá RNA

RNA znečištěná proteiny nebo organickými látkami



Hybridizační metody

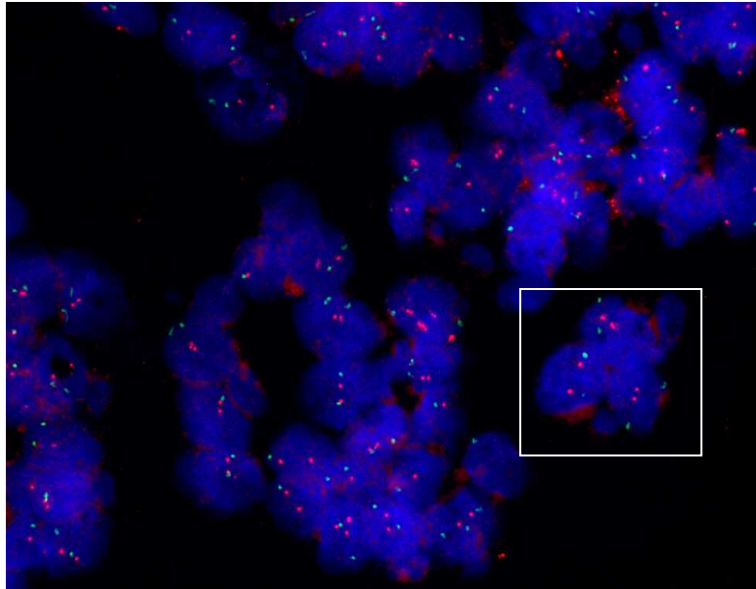




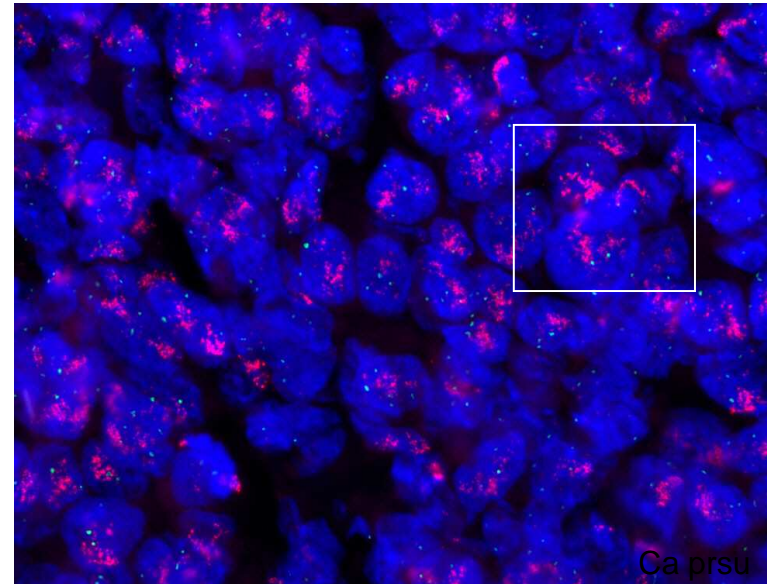
- **Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)**

- Lokalizace vybraných nukleotidových sekvencí přímo v buňkách
- Schopnost jednořetězcové sondy vázat komplementární úsek cílové DNA fixované na mikroskopickém skle
- TOP2A, EGFR, Her-2/neu

TOP2A normál

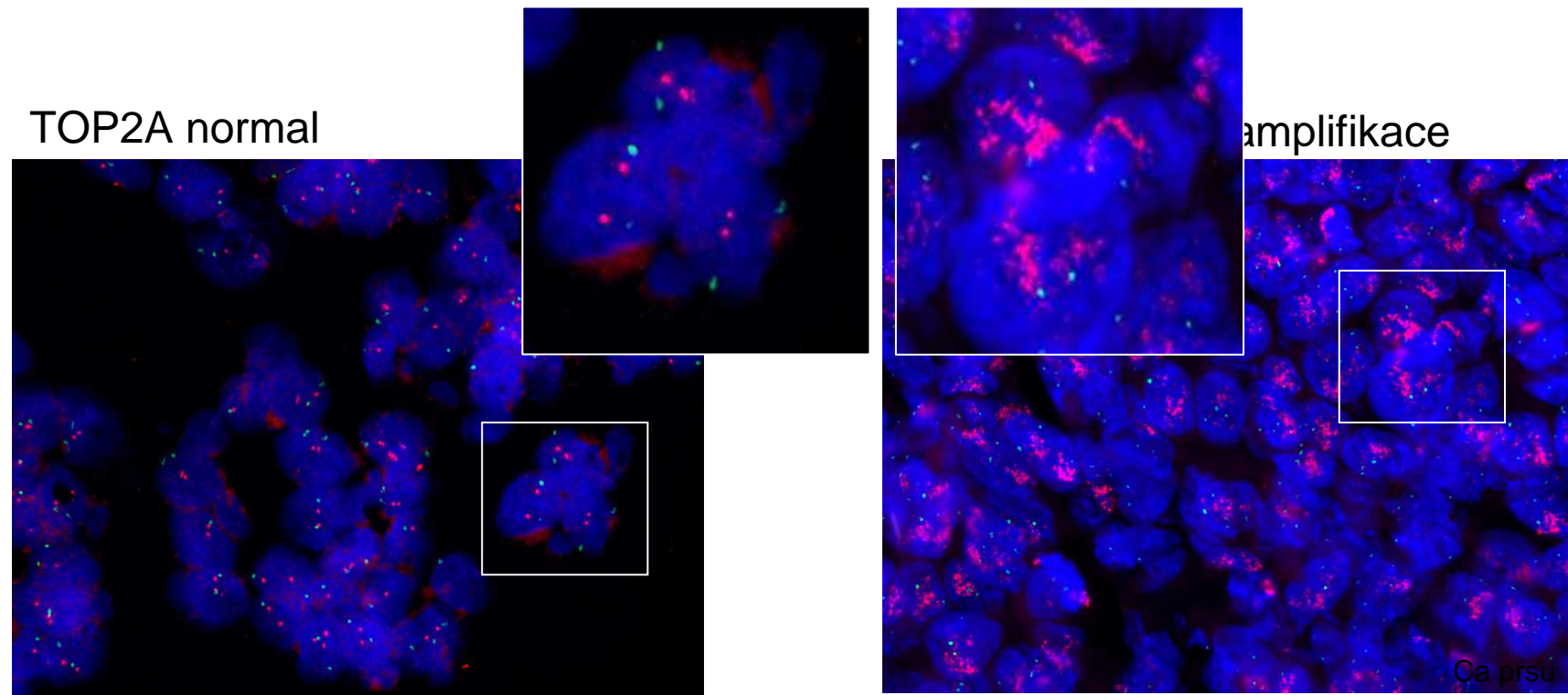


TOP2A rozsáhlá amplifikace

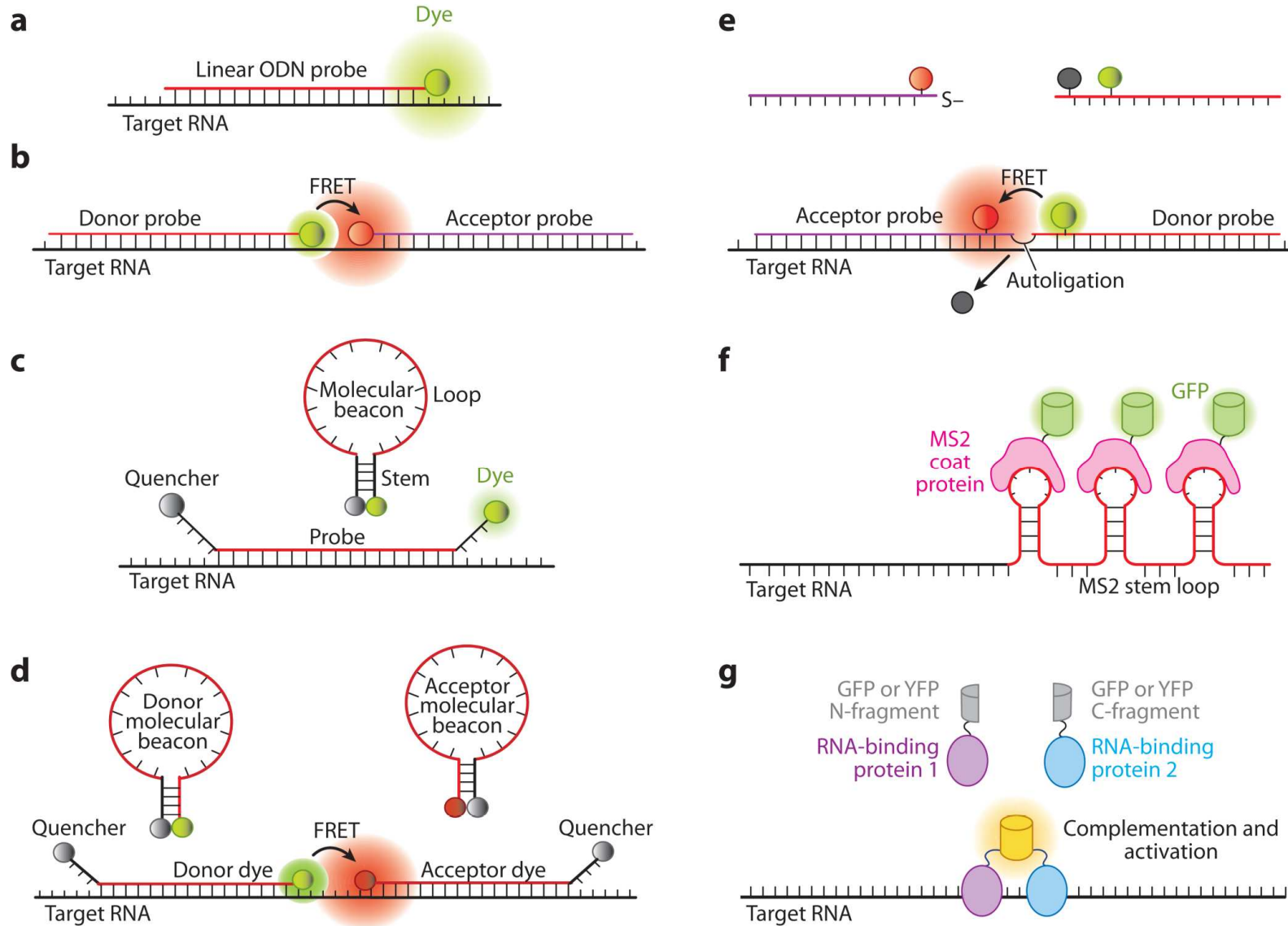


- **Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)**

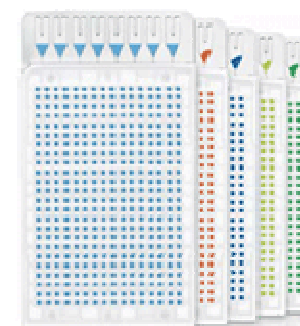
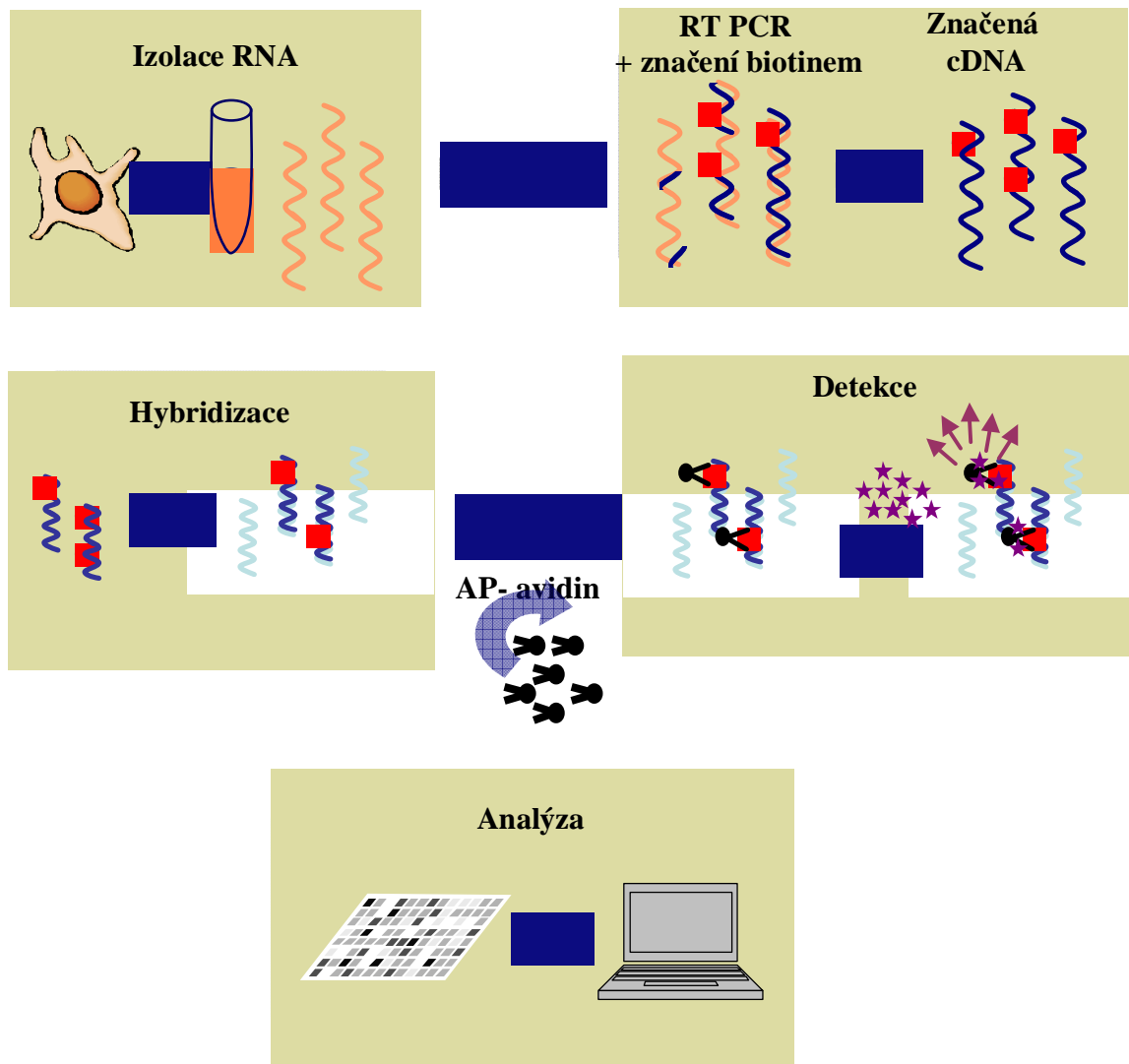
- Lokalizace vybraných nukleotidových sekvencí přímo v buňkách
- Schopnost jednořetězcové sondy vázat komplementární úsek cílové DNA fixované na mikroskopickém skle
- TOP2A, EGFR, Her-2/neu



RNA sondy



Nízkohustotní arrays

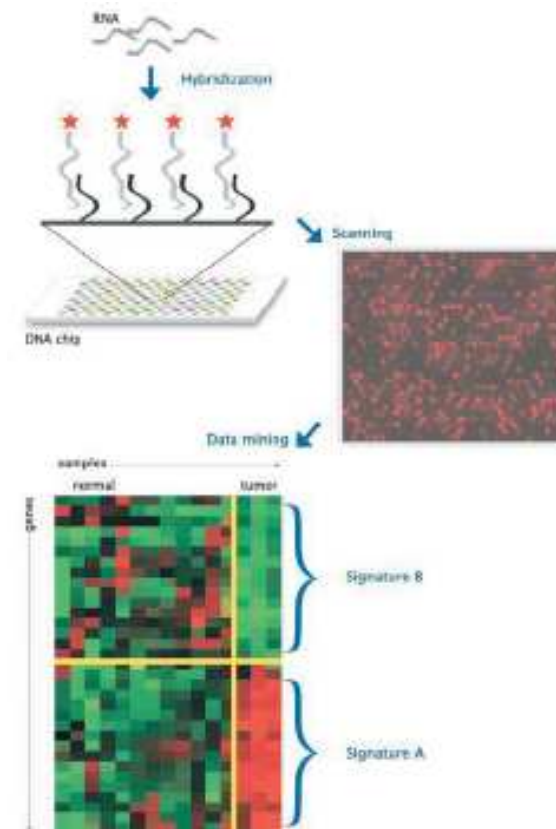


Průkaz onkologických markerů pomocí DNA-mikroarray testů

Tato technika spočívá v umístění tisíců imobilizovaných DNA sekvencí oligonukleotidových značek v miniaturizovaném čipu. Povrchy jako je sklo nebo plast umožnily využít fluorescenční signály, zvýšení reproducibility a rychlosti hybr. kinetiky.

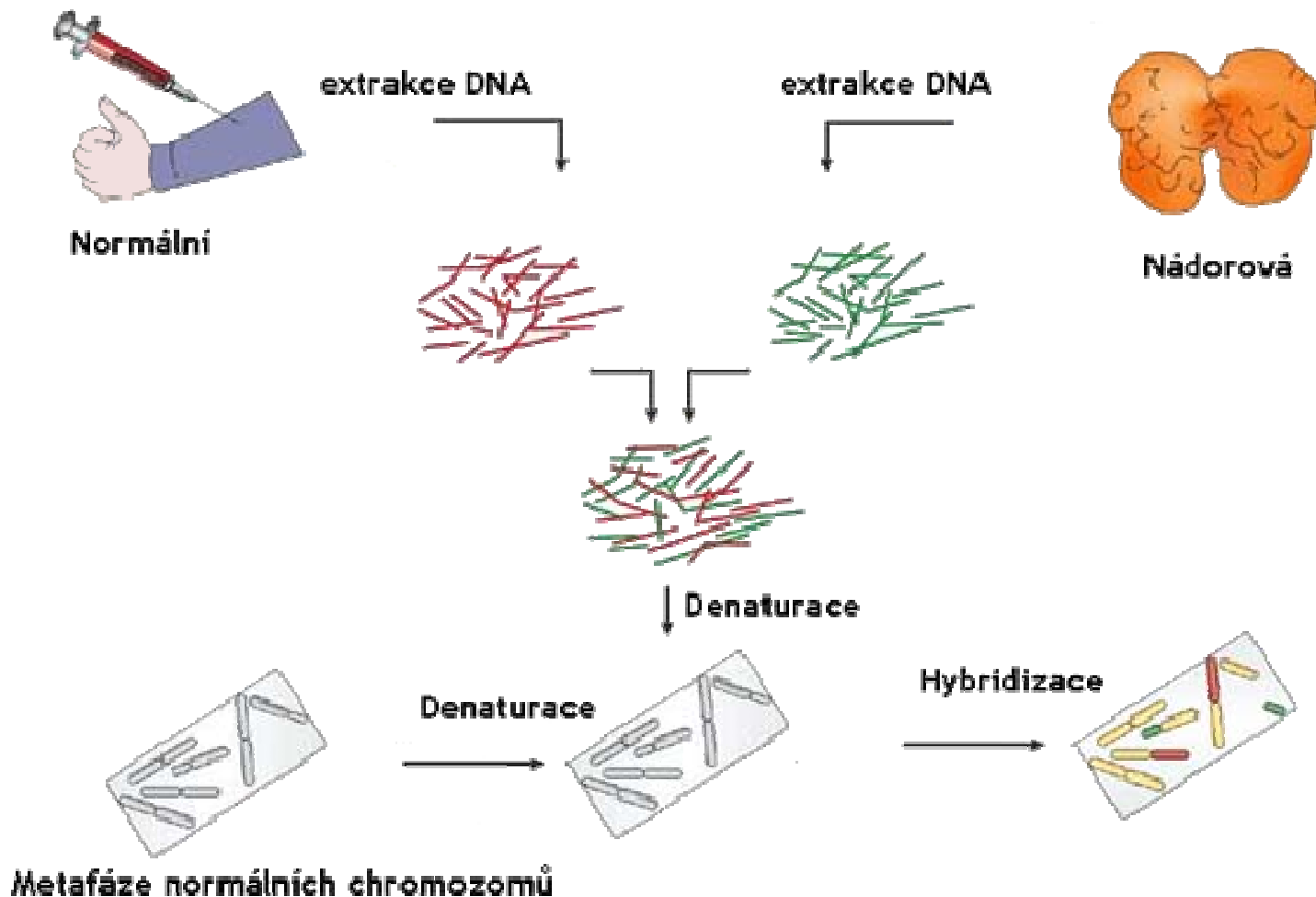
Velmi zjednodušeně lze princip metody: Nejprve se izoluje vzorek DNA z buněk odebraných vyšetřované osobě a ten se označí fluorescenčním činidlem. Označená DNA se pak hybridizuje se vzorky určitých DNA sekvencí (DNA array) na destičce. Po promytí se měří fluorescence na „DNA-array“ a hodnotí pomocí počítače.

- genová exprese
- komparativní genomická hybridizace
- SNP
- sekvenace

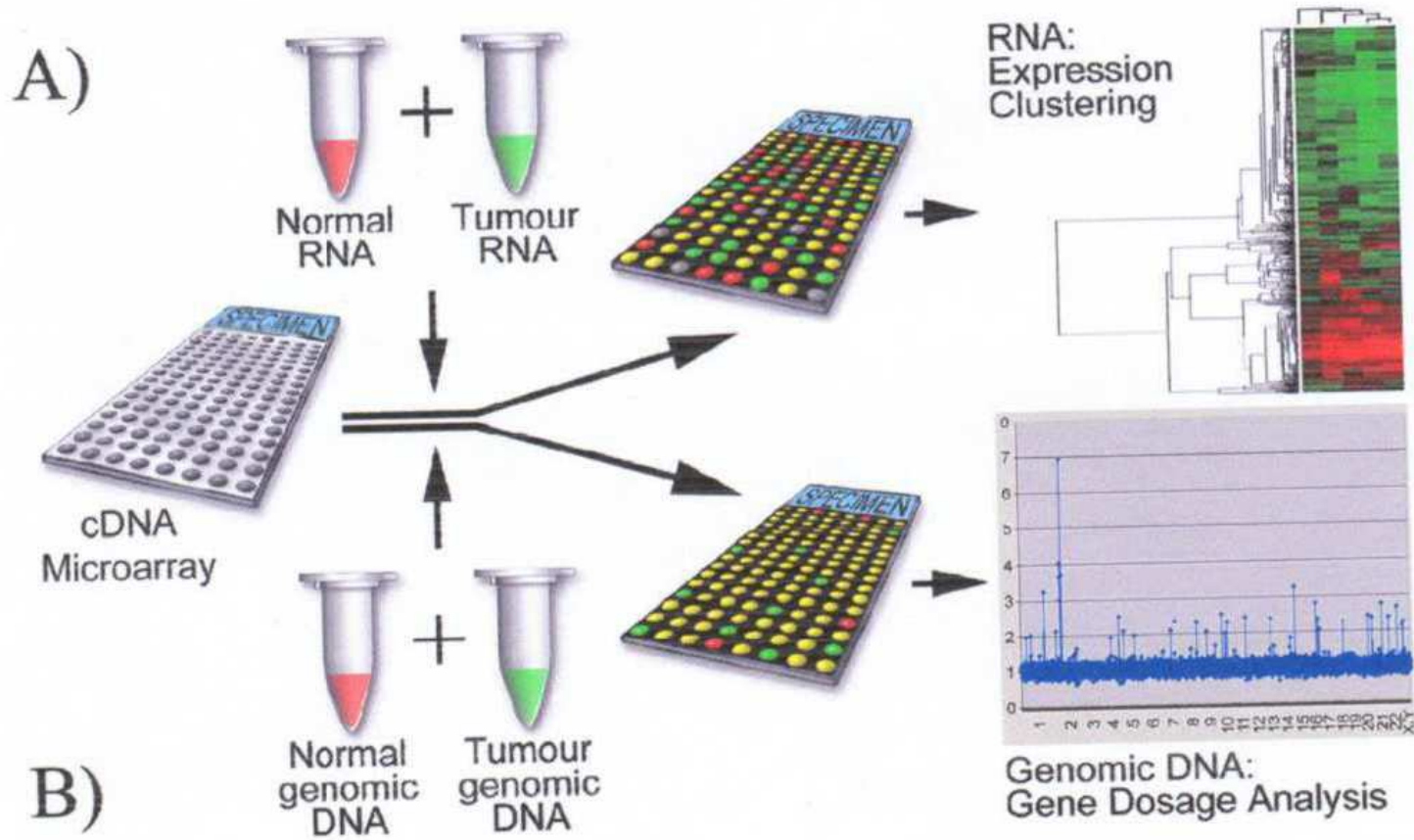


Komparativní genomová hybridizace

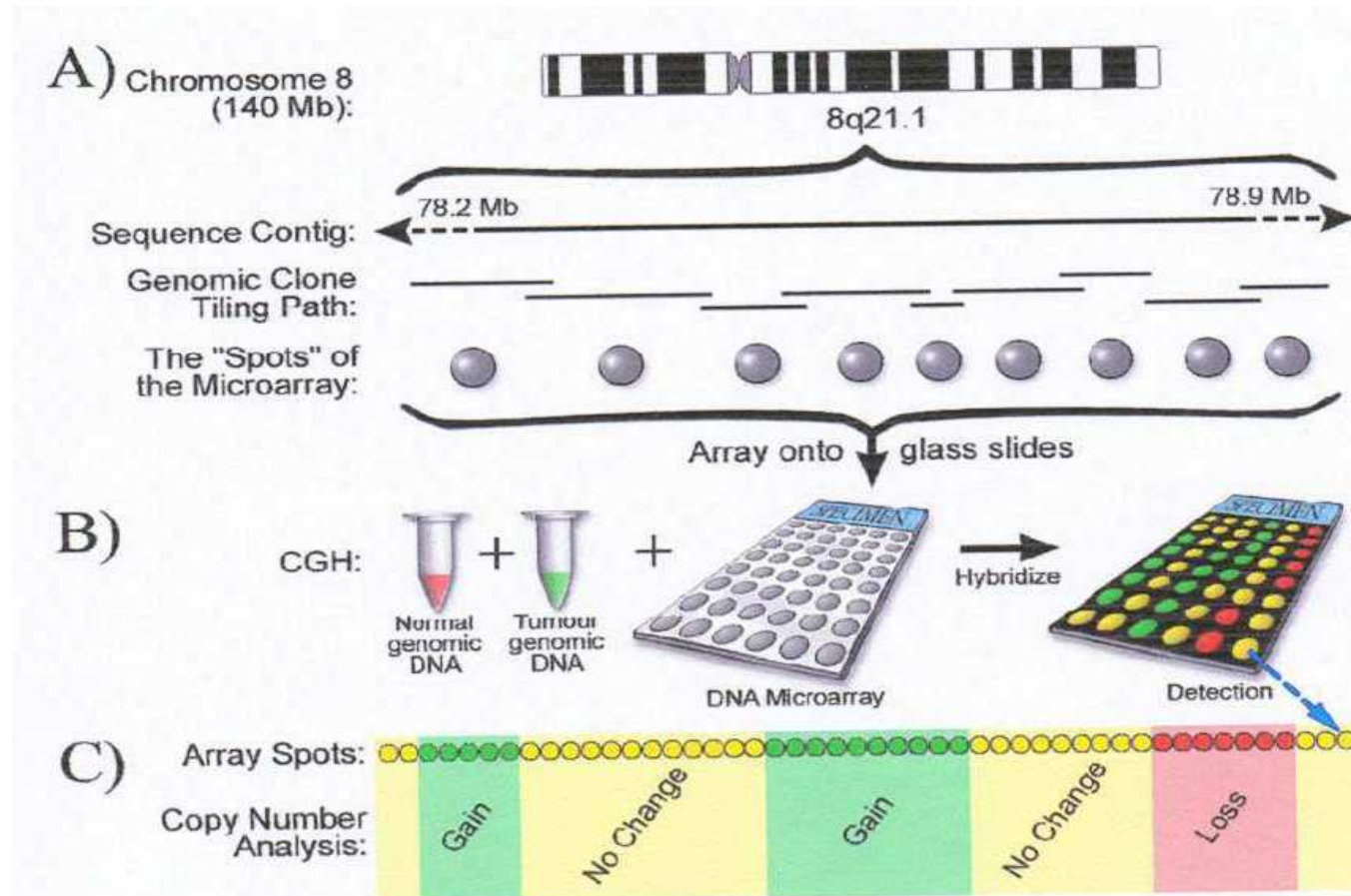
Současná hybridizace dvou vzorků DNA značených odlišnými fluochromy na normální metafázní chromozomy
DNA pacienta (nádorová) značena **zeleně** (FITC)
kontrolní DNA (zdr. jedinec) značena **červeně** (TRITC)



Komparativní genomová hybridizace



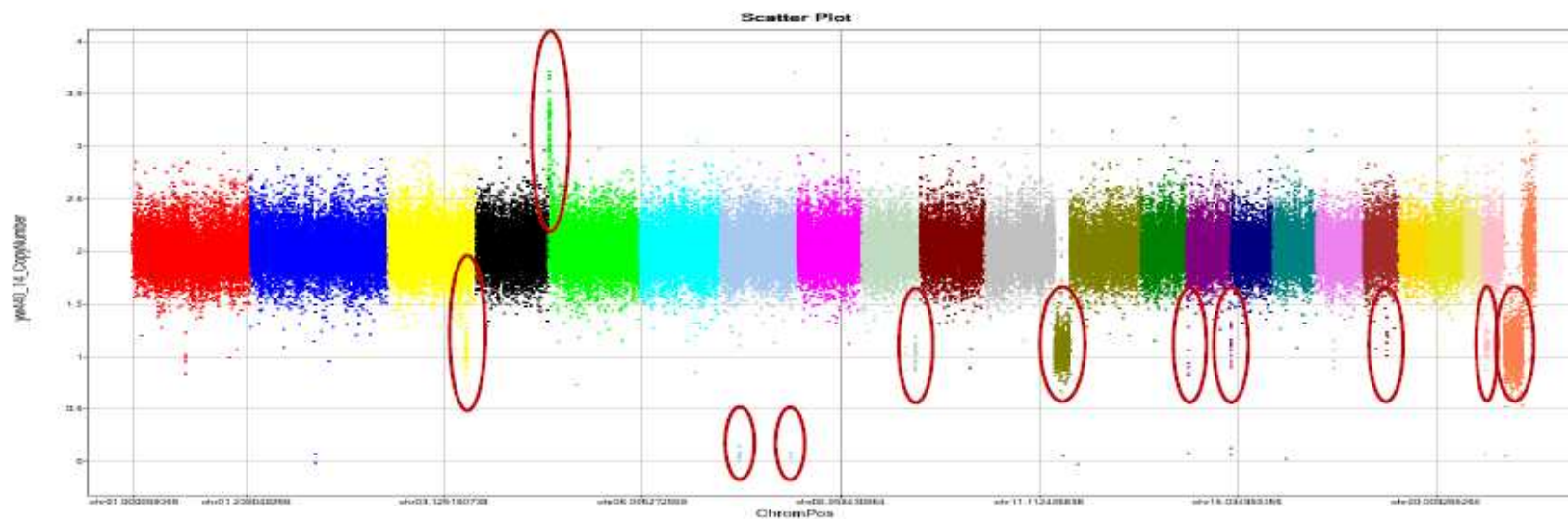
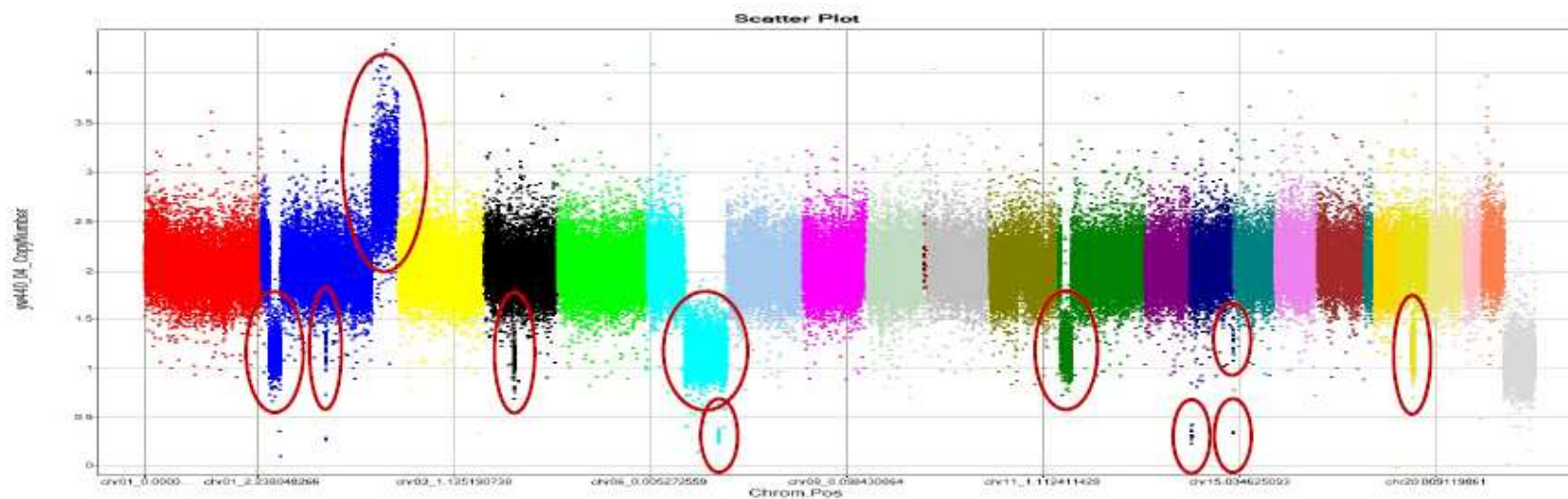
Genomová array CGH



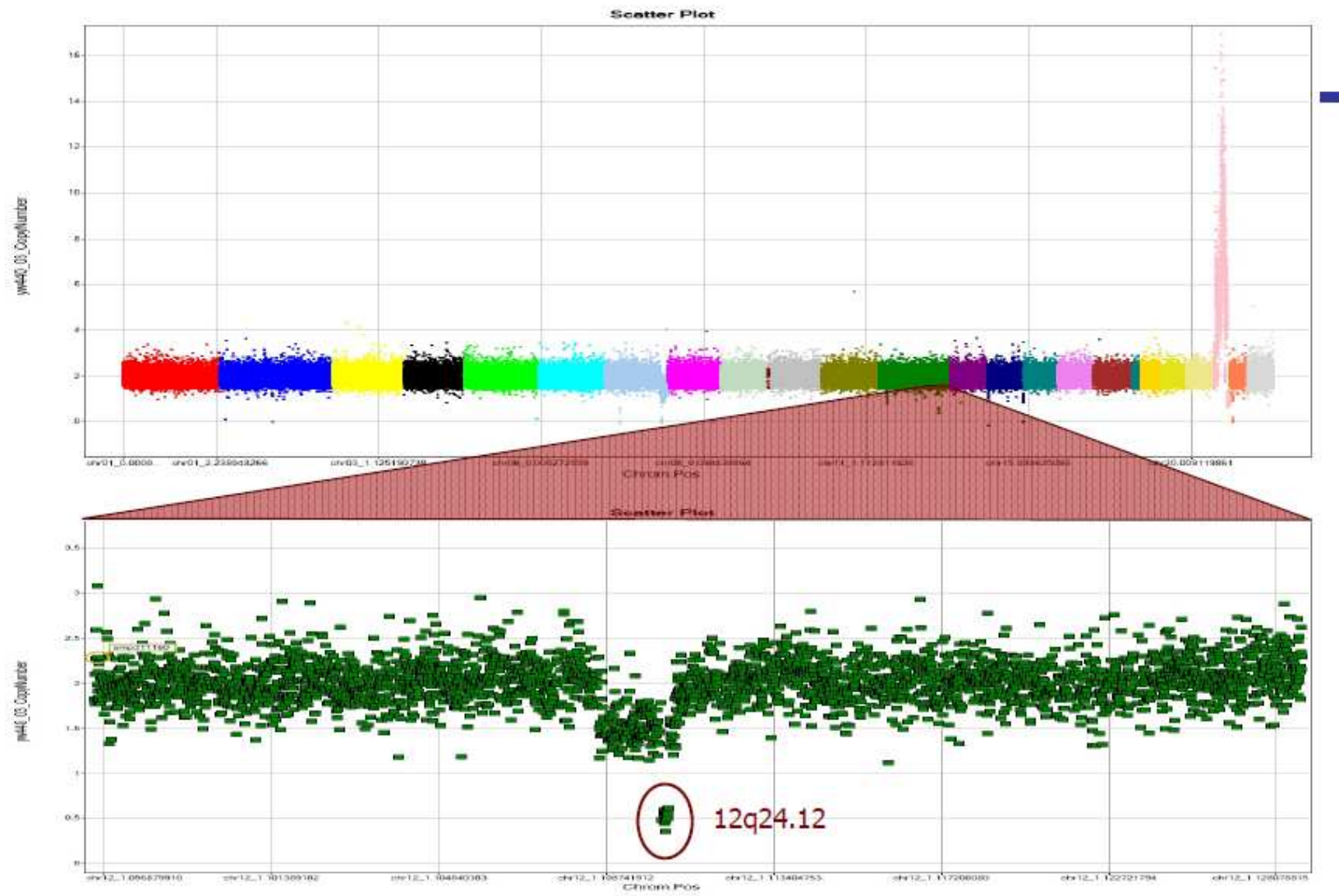
Výhody a nevýhody

- není zapotřebí kultivace buněk
- (použití interfázních chromozomů)
- odhalí delece a amplifikace všech chromozomů buňky v jednom pokusu
- možná diagnostika neznámé aberace
- malé množství vzorku lze amplifikovat PCR
- nelze zjistit balancované změny (translokace, inverze)
- nelze odlišit diploidní a tetraploidní tumory
- nelze vyšetřit změny v telomerických a v heterochromatinových pericentromerických oblastech
- nutné aby alespoň 50% buněk neslo změnu

CNAs in Leukemia FFPE Samples (ALL)



CNAs in Leukemia FFPE Samples (1)



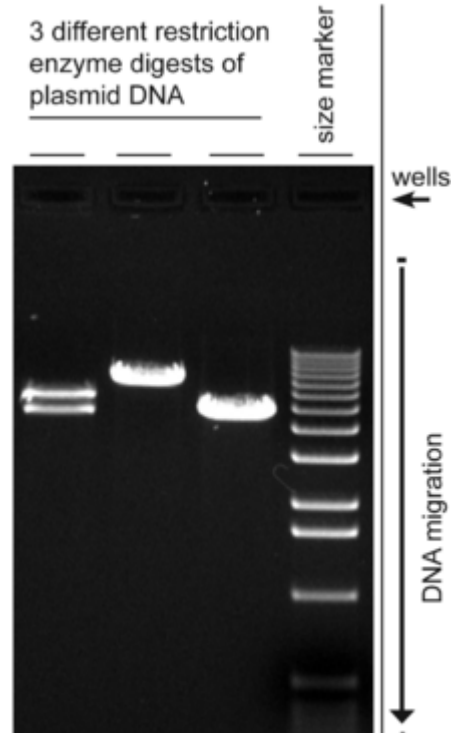
Elektroforetické metody

gelová elfo

PFGE

DGGE

Kapilární elfo



+

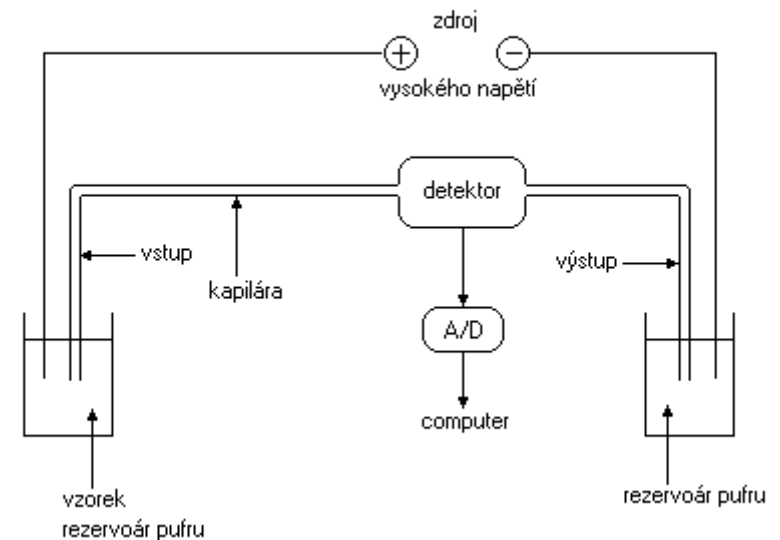
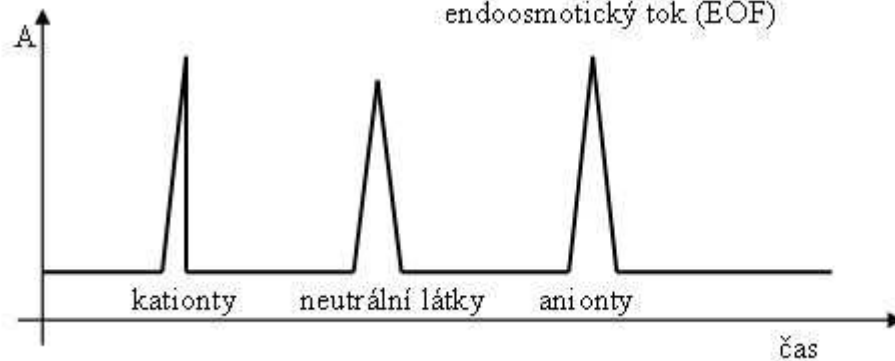
ani onty

neutrální látky

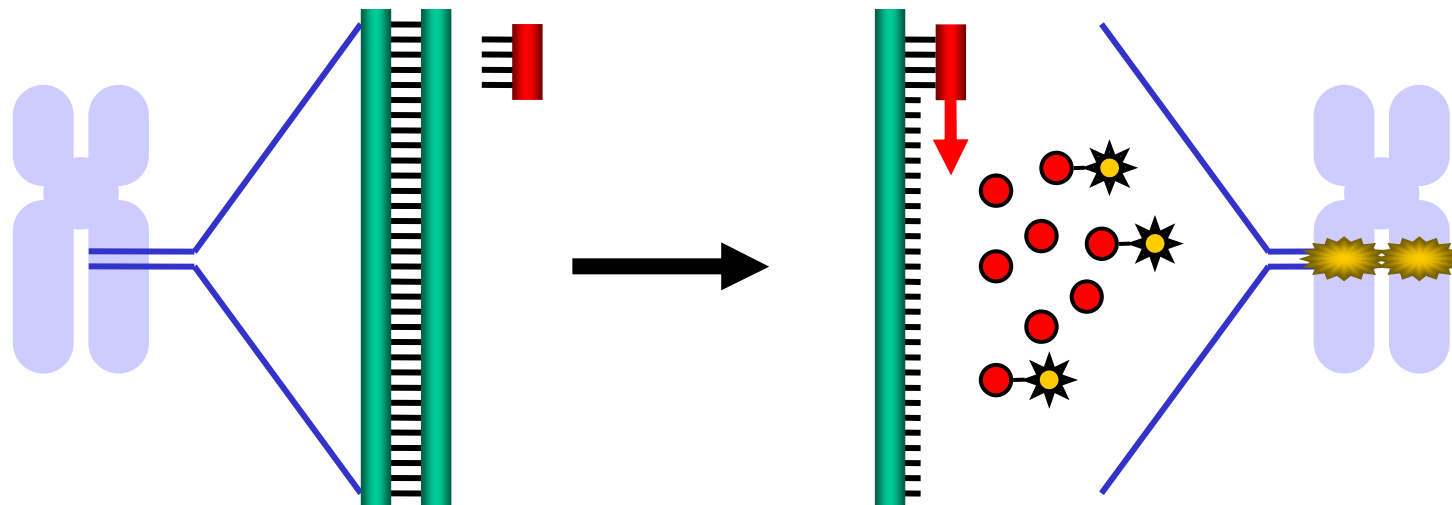
kati onty



endoosmotický tok (EOF)



- **PCR** umožňuje detekovat jediný leukocyt infikovaný HIV mezi 10^5 neinfikovaných bílých krvinek. K tomu je třeba onen jediný leukocyt, obsahující sekvenci typickou pro HIV, pomocí PCR rozmnožit. Při 30 PCR cyklech se původní počet cílových sekvencí znásobí 10^6 až 10^9 .
- Vzorky pro PCR jsou biologické kapaliny (celá krev, plasma, sérum, moč, sputum, sperma apod.), tkáně, vlasy a vousy, stěry biologických stop, suché skvrny biologického materiálu aj. Podle povahy vzorku se volí i postup jeho úpravy. V podstatě se jedná o převedení vzorku do suspenze či roztoku, popř. jeho homogenizaci, lýzu buněk a izolaci NA buď extrakcí, nebo sorpcí na vhodném sorbentu. Pro PCR je přibližně třeba 10 - 500 μg lidské DNA, 1 - 10 μg bakteriální DNA a 0,1 - 1 μg plasmidové DNA. Konkrétní koncentrace se řídí celkovým objemem reakční směsi v PCR. Např. z 1 ml celé krve se získá cca 20-200 μg DNA.



Multiplex PCR

Zpětná PCR (Reverse transcription)

PCR v reálném čase

- výhody: způsob detekce

měření kinetiky v

brzkých fázích

vyšší senzitivita

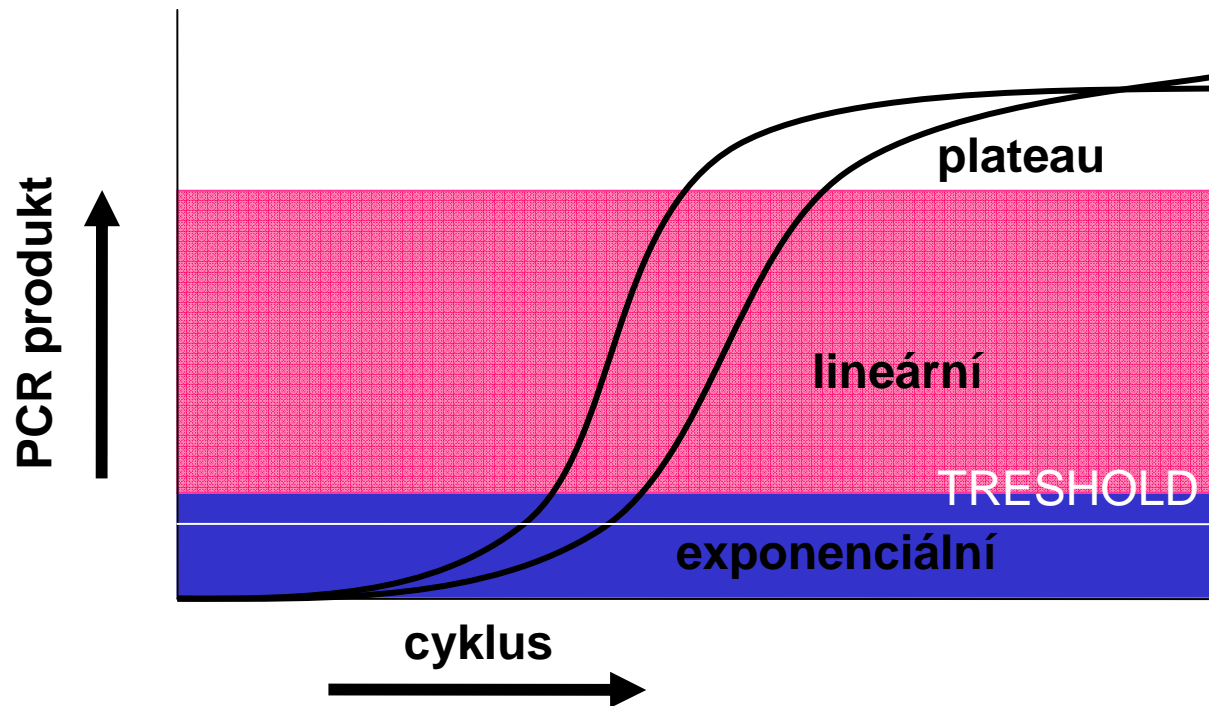
kvantitativní

charakter výsledků

- nevýhody: nákladnější

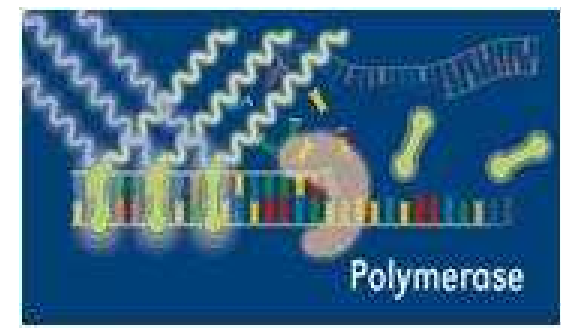
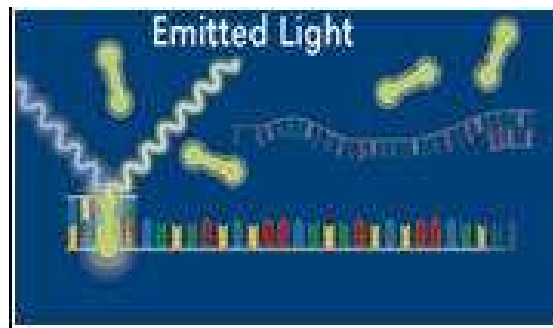
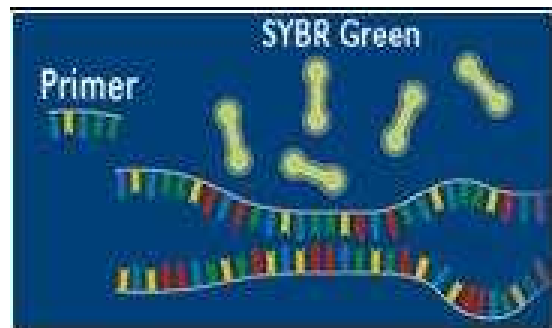
Průběh PCR reakce

- Fáze PCR reakce
- Treshold
- Nárůst fluorescence je přímo úměrný množství specificky naamplifikovaného produktu

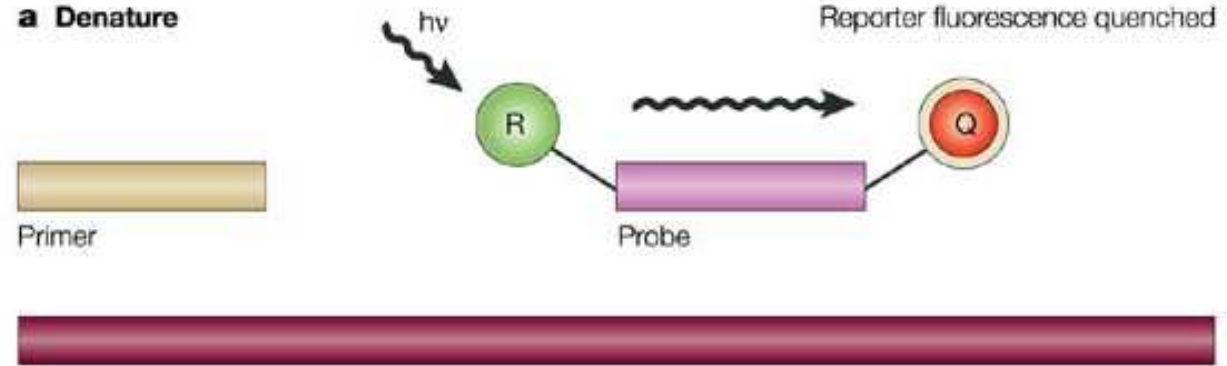


Typy sond

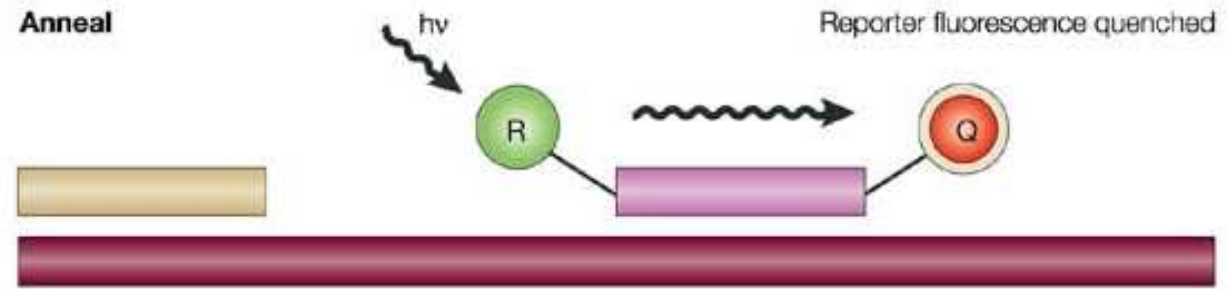
1. Nespecifické (např. interkalační barviva)
2. Specifické (fluorescenčně značené sondy)
3. Fluorescenčně značené primery



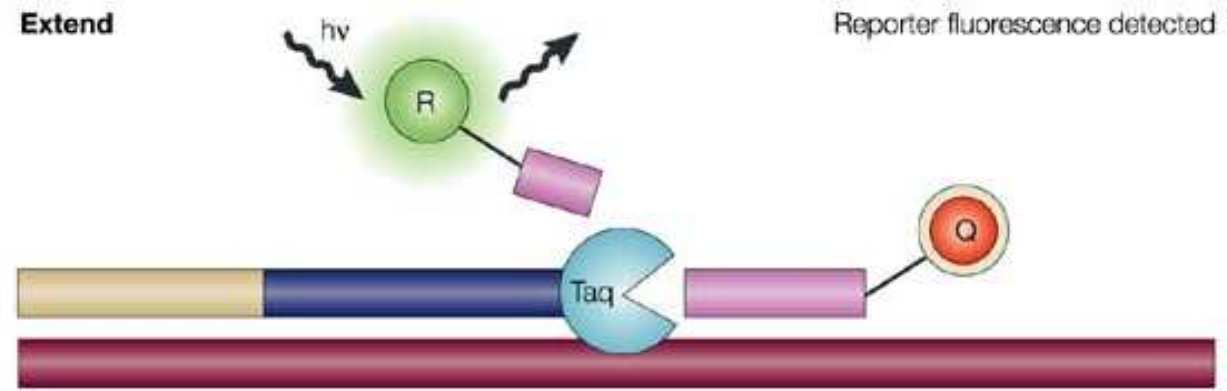
a Denature



Anneal



Extend



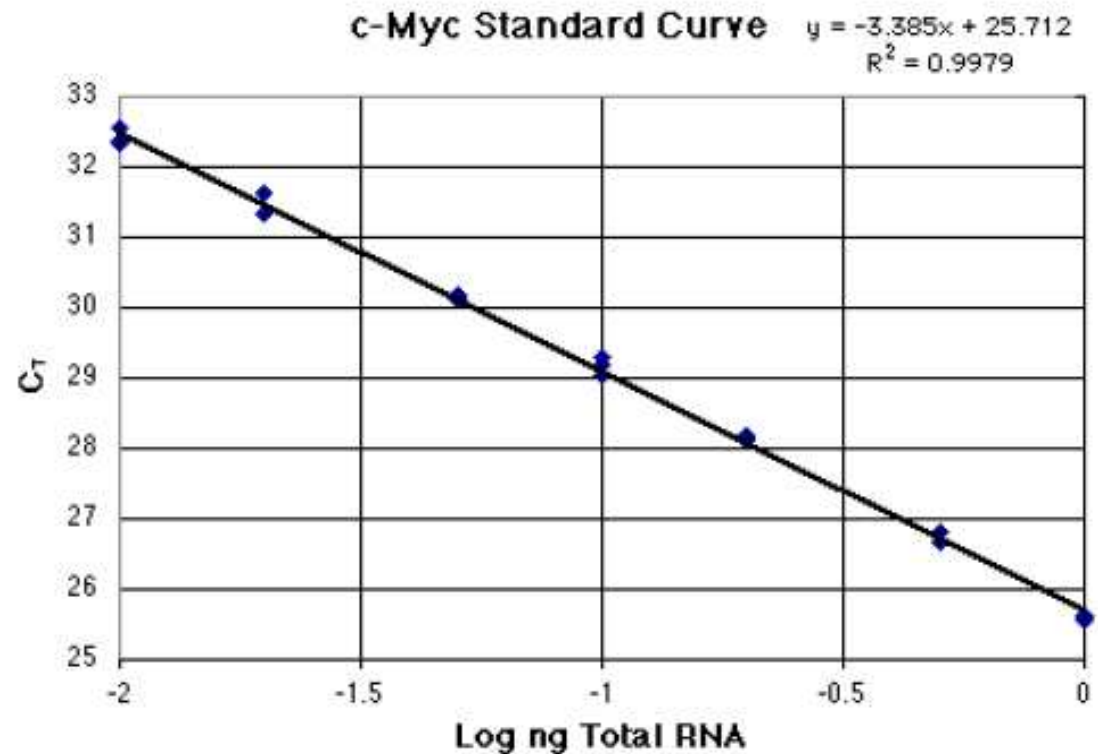
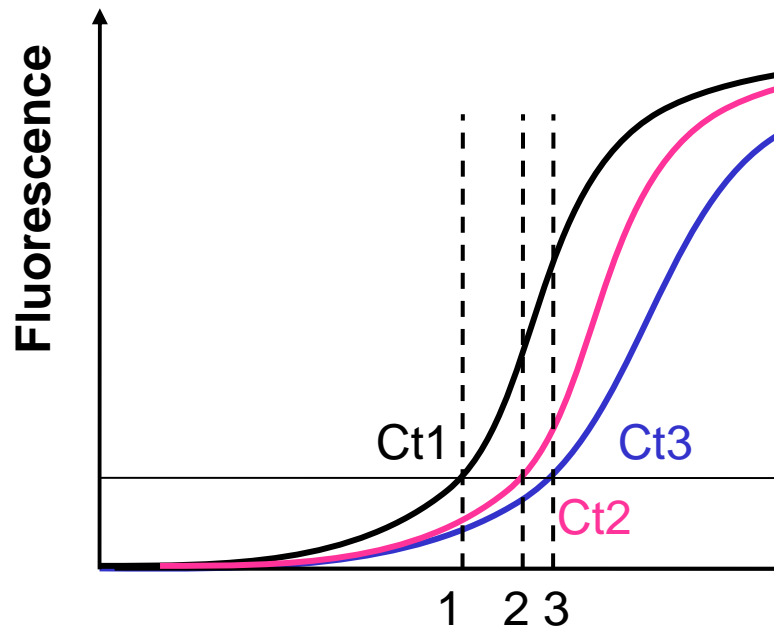
Analýza dat

Relativní

× Absolutní kvantifikace

$\Delta Ct = Ct \text{ cíl. gen} - Ct \text{ endog. kontrola}$
 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ vzorek} - \Delta Ct \text{ kontr. vz.}$
→ $2^{-\Delta\Delta Ct}$

$y = mx + b$
 $\log \text{ input} = (Ct_{\text{vzorku}} - b) / m$
množství vzorku = $10^{\log \text{ input}}$

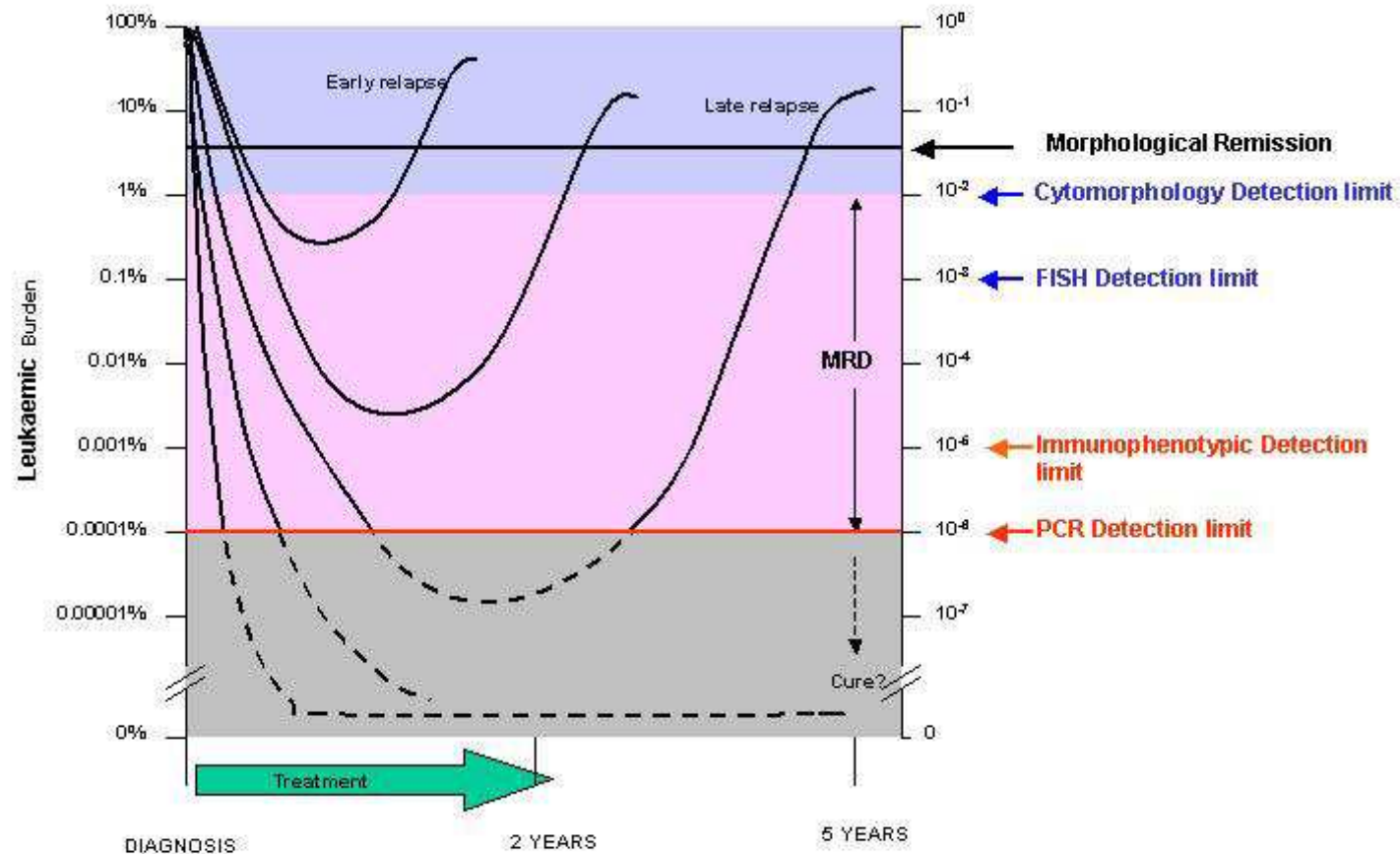


Analýza exprese u onkologických onemocnění

Rozdíl v expresních profilech zdravá x nádorová buňka

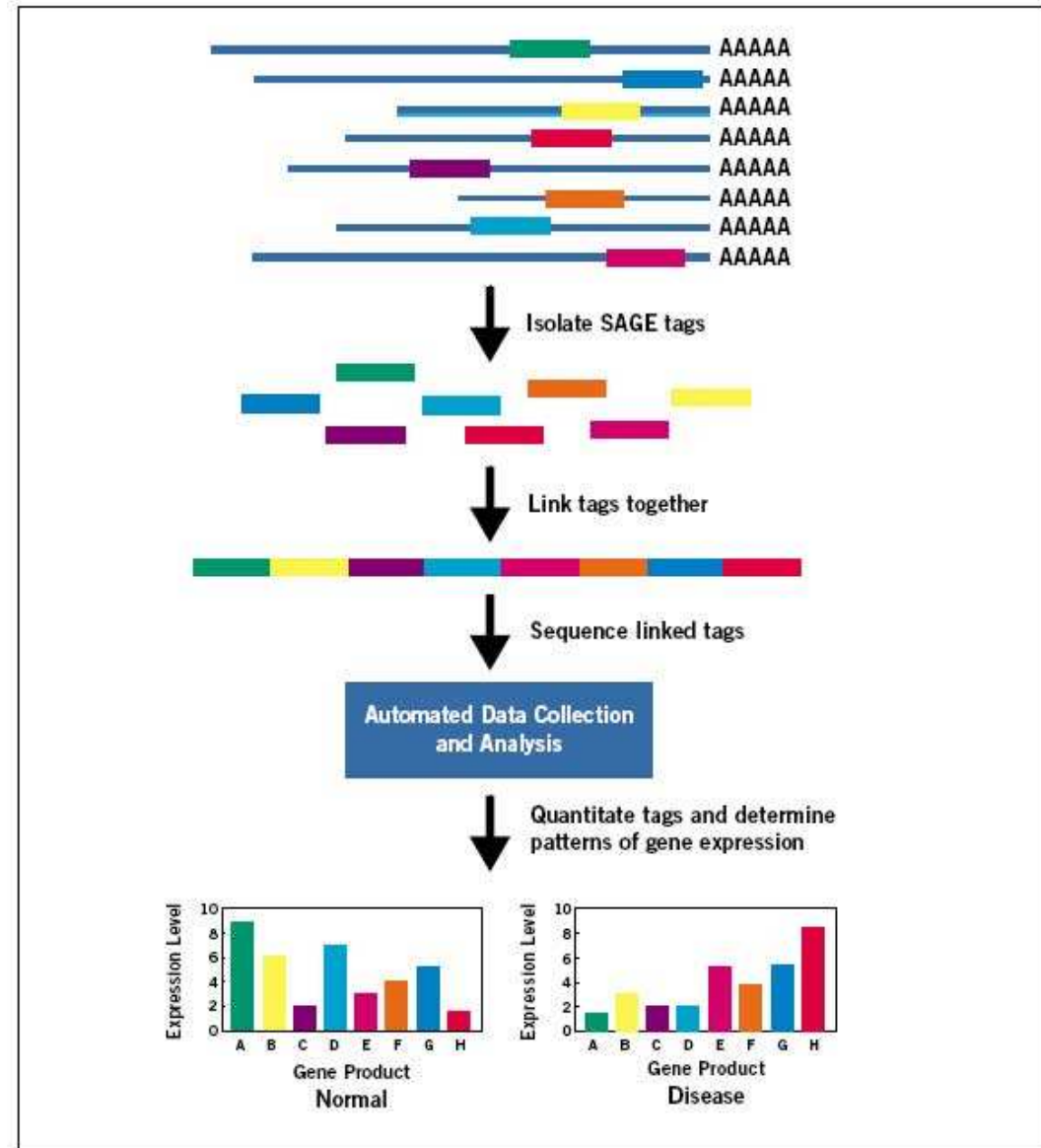
Nejčastější markery: MGB1, CEA, CK20, EGFR1, C-MYC, TH, TS, ...

Detekce MRD



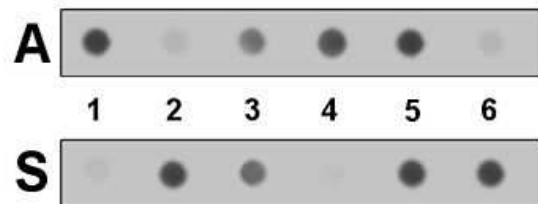
SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)

1. Z izolované mRNA je z každého transkriptu získán jedinečný tag.
2. Jednotlivé tagy jsou následně zligovány (spojeny), čímž vznikají dlouhé polynukleotidové sekvence, které mohou být následně klonovány, sekvencovány apod.
3. Ve finále je zastoupení jednotlivých tagů kvantifikováno, což podává informaci o míře exprese analyzovaných transkriptů.



Strategie v identifikaci DNA bodových mutací a delecí

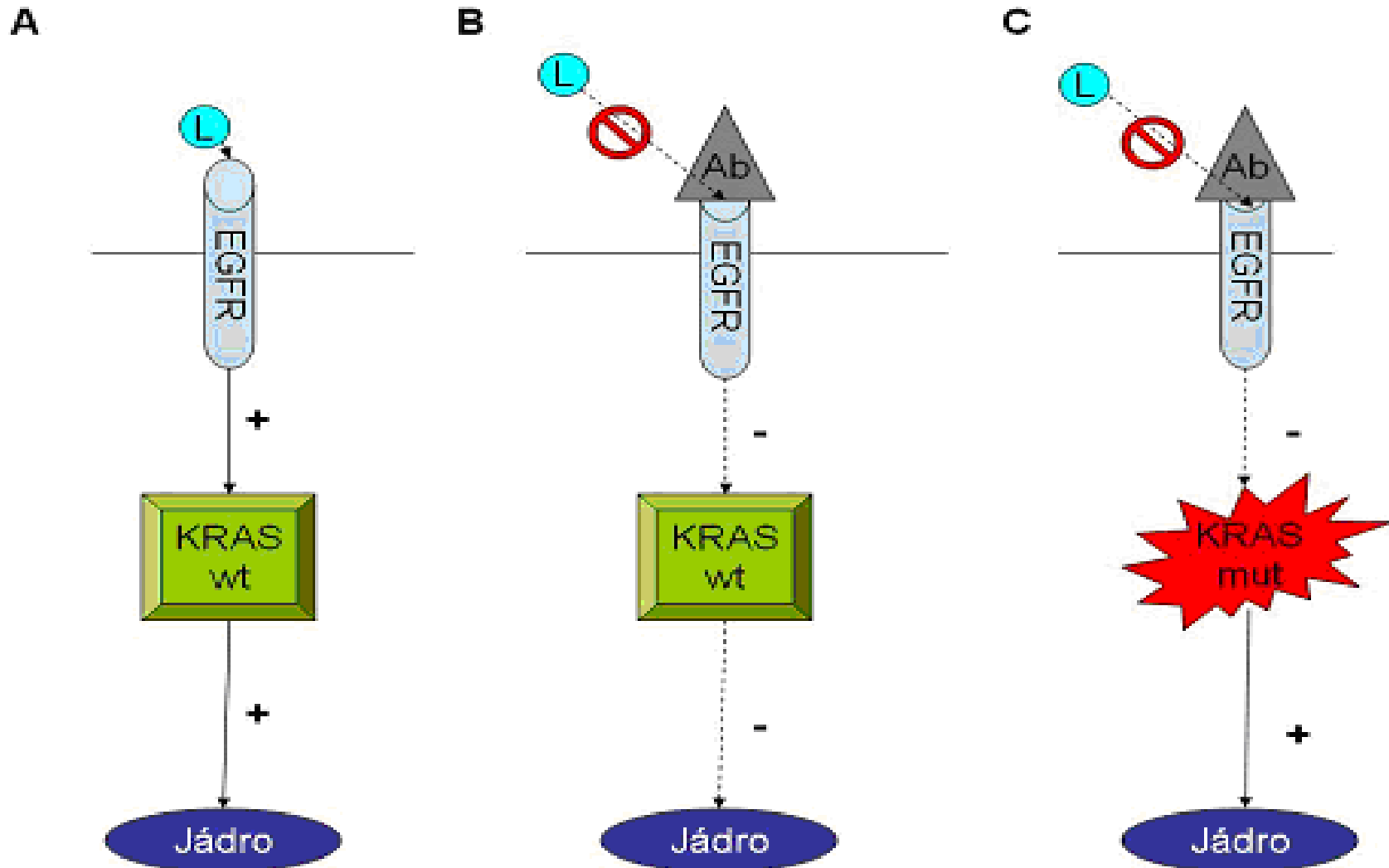
1. přístupy zaměřené na stanovení délky DNA fragmentů (RFLP)
2. techniky založené na hybridizaci
3. PTT test (Protein Truncation Test)
4. techniky založené na kvantifikaci DNA
5. DNA sekvencování
6. metody založené na principu heteroduplexní analýzy



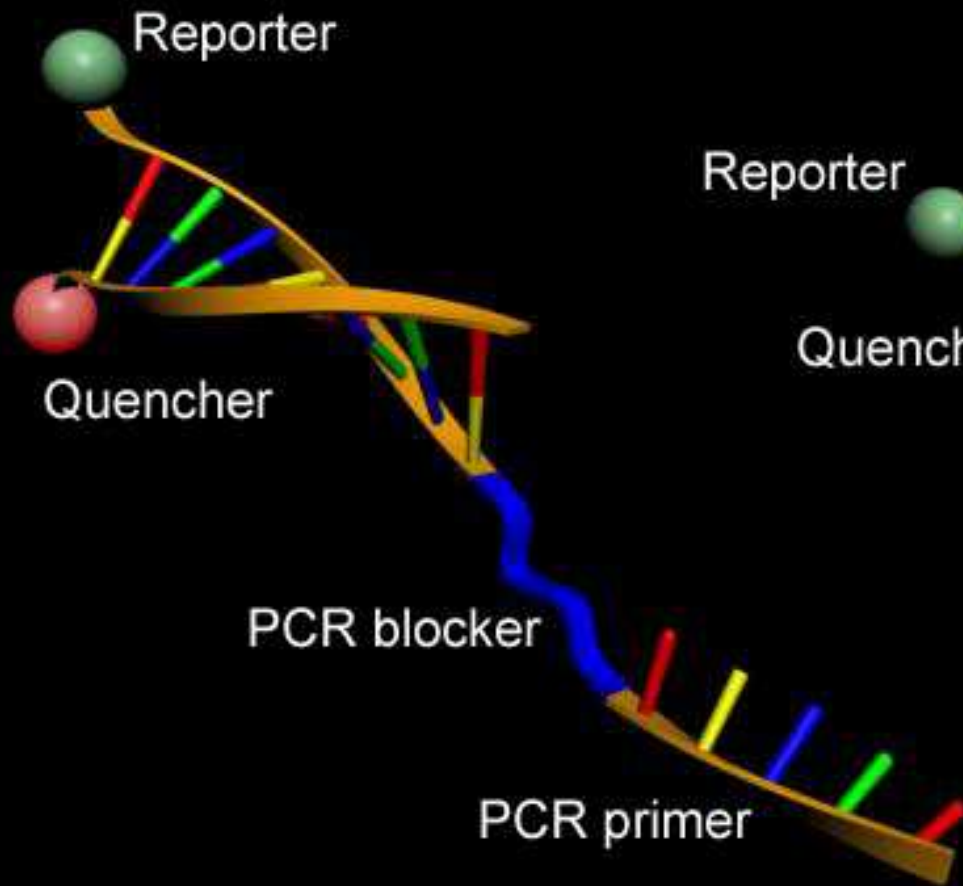
Ad 2) Metoda ASO (Allele-Specific Oligonucleotide). Vzorky 1-6 nakapány v duplikátu na membrány a hybridizovány s A a S oligonukleotidy. Vzorky 3 a 5 = heterozygoti; 1 a 4 homozygoti pro alelu A; 2 a 6 homozygoti pro alelu S;

Ad 4) techniky založené na kvantifikaci DNA

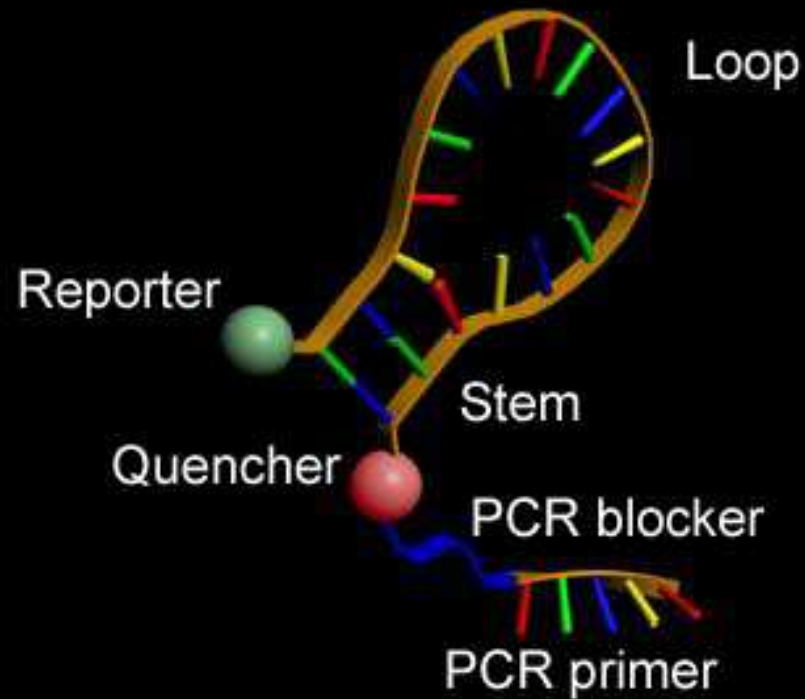
PCR s alelově-specifickými primery ARMS (Amplification Refractory Mutation System) v kombinaci se systémem „Scorpion“



Scorpions bi-probe



Scorpions uni-probe



Mutační analýza onkologických onemocnění

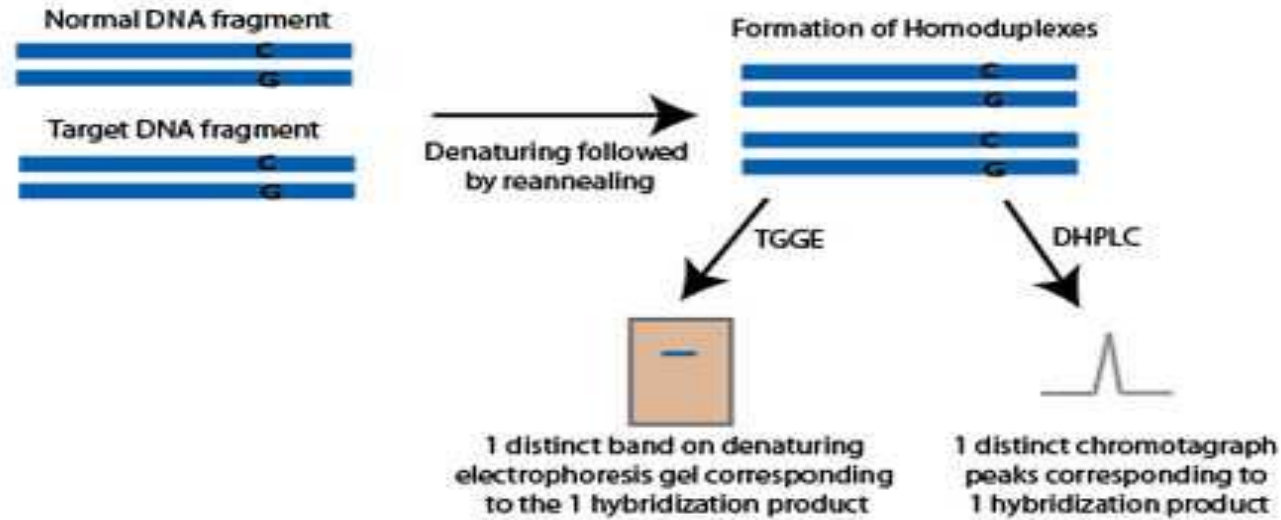
Kolorektální karcinom, který patří k nejrozšířenějším nádorovým onemocněním v rozvinutých zemích, může být při velmi časně diagnóze úspěšně léčitelný (v lokalizovaném stadiu až 90 %). Existují genetické abnormality, které vedou nejprve k benigní proliferaci buněk sliznice tlustého střeva tj. k tvorbě polypů, dále pak adenomů a nakonec ke vzniku adenokarcinomu, popřípadě adenokarcinomu brzy metastazujícímu.

Asi 1/3 populace mívá po padesátce adenomy tlustého střeva; ale jen u 10 % vznikne karcinom. Tyto adenomy možno klasifikovat podle jejich velikosti, patologie (makroskopická struktura) a dysplazie (mikroskopická struktura) na málo a na vysoce rizikové.

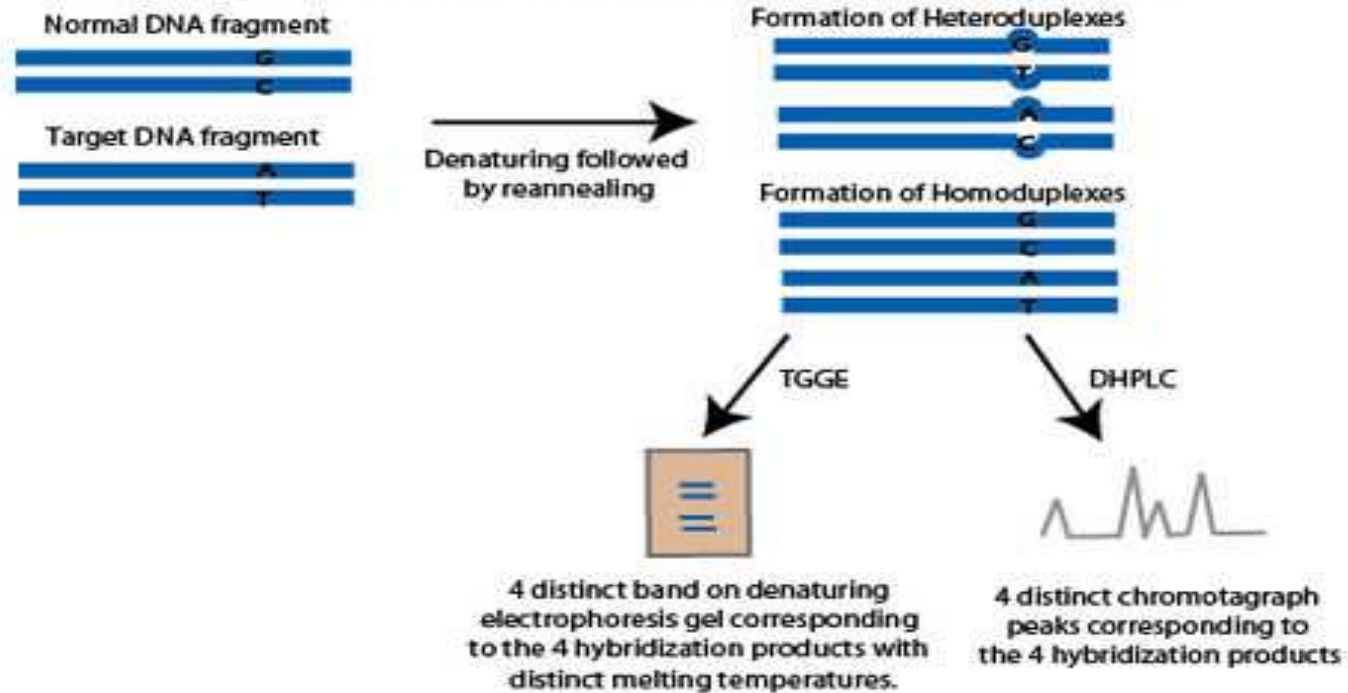
Histopatologická kritéria nejsou však dostatečně objektivní. Mnohem lepší je průkaz mutace genu K-ras, který patří k protoonkogenům, uplatňujícím se v kaskádě transdukce signálu a je tedy částečně odpovědný za přeměnu adenomu na adenokarcinom. Mutace genu K-ras se většinou objevují v exonu 1, a to buď na kodónu 12 (GGT) nebo 13 (GGC). Oba tripletety (GGT i GGC) kódují glycin. Vznikne-li mutace na jedné z obou bazí (kupř. GGT®GCT), pak v sekvenci polypeptidu je glycin nahrazen alaninem.

- SSCP
- DHPLC

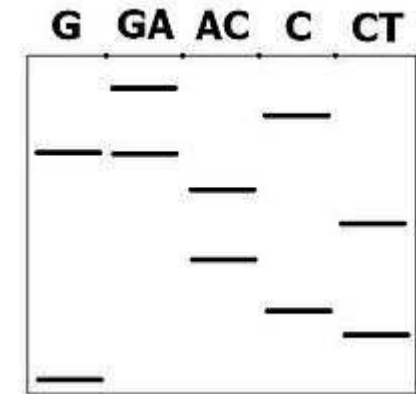
Target DNA identical to Normal allele-specific DNA



Target DNA not identical to Normal allele-specific DNA



Sekvencování

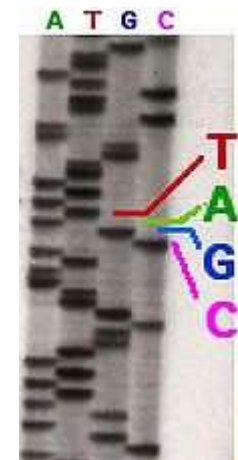


~ Chemické (Maxam-Gilbetovo) sekvencování

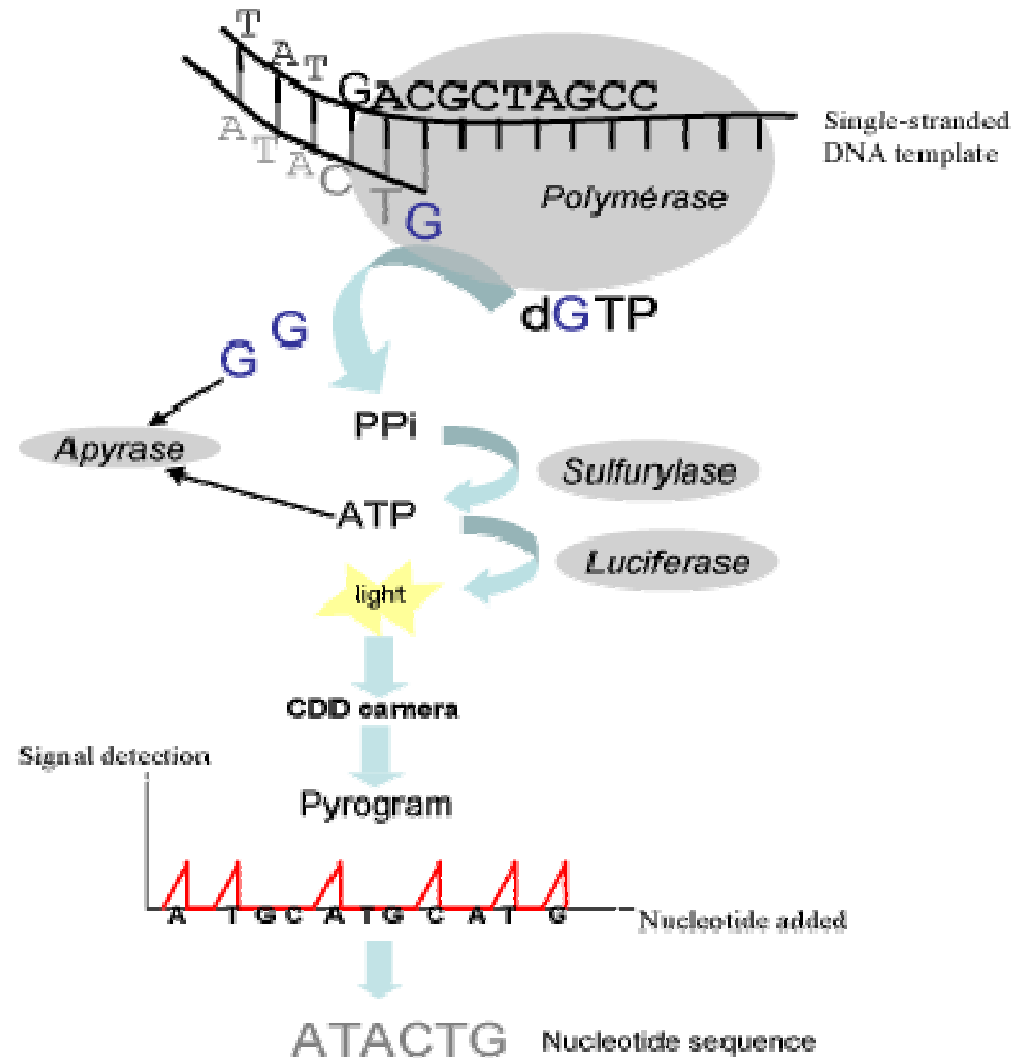
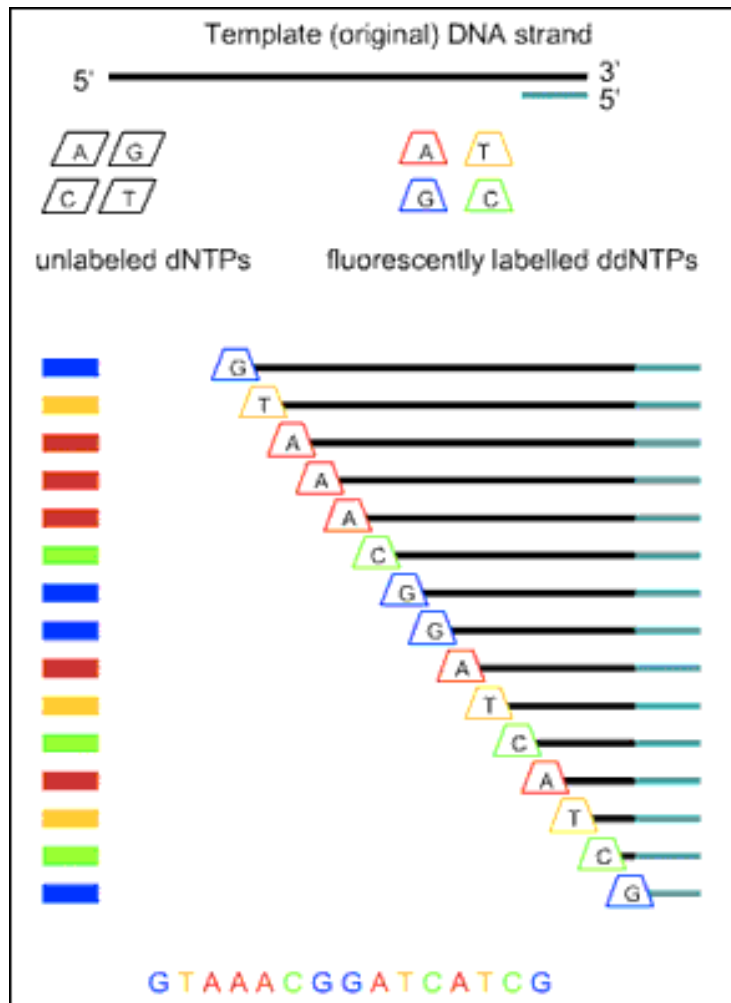
- příprava koncově značených jednořetězcových fragmentů
- 4 paralelní vzorky - modifikace jednoho typu báze, kde je fragment štěpen

~ Enzymatické (Sangerovo) sekvencování

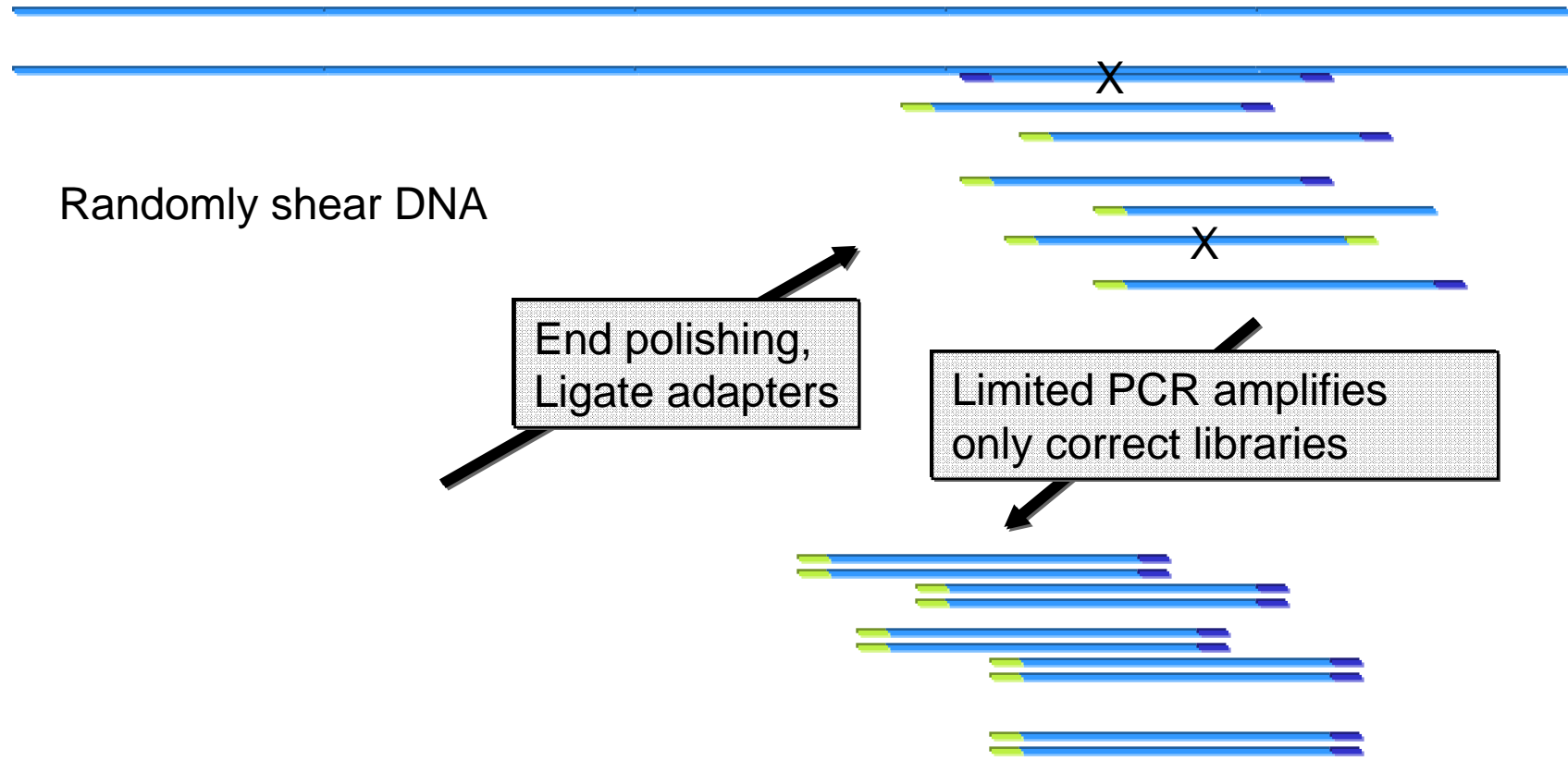
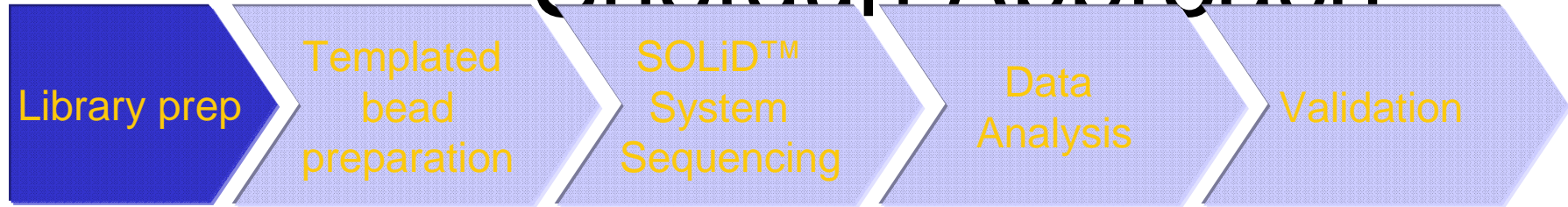
- Syntéza komplementárního vlákna k sekvenci kterou identifikujeme
- 4 paralelní vzorky - do každého jeden dideoxyribonukleotid



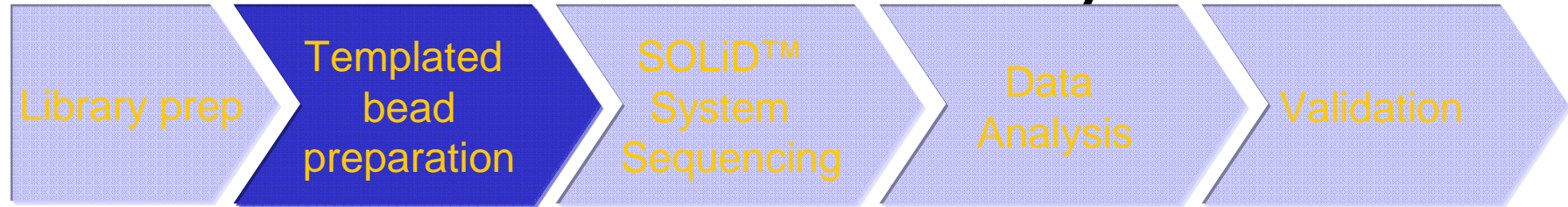
Pyrosekvencování



Library Preparation is a Shotgun Approach



ePCR Clonally Amplifies Library

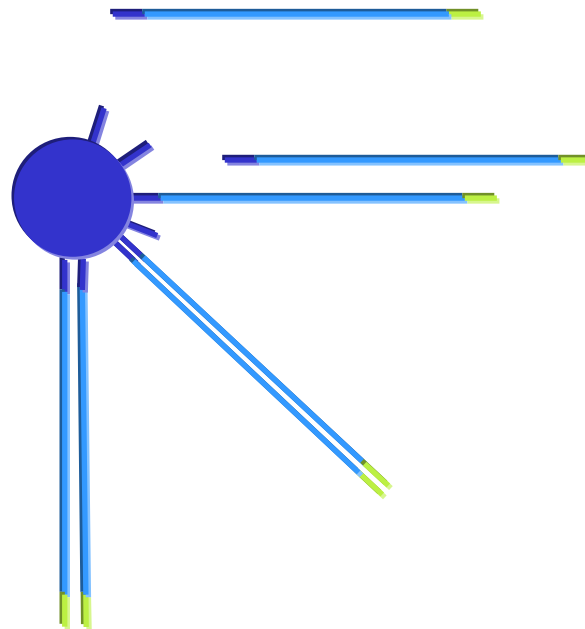


PCR synthesizes a perfect copy of the library fragment to the bead

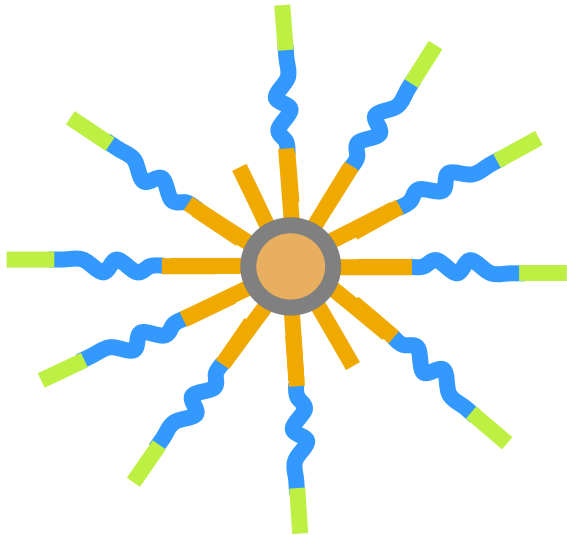
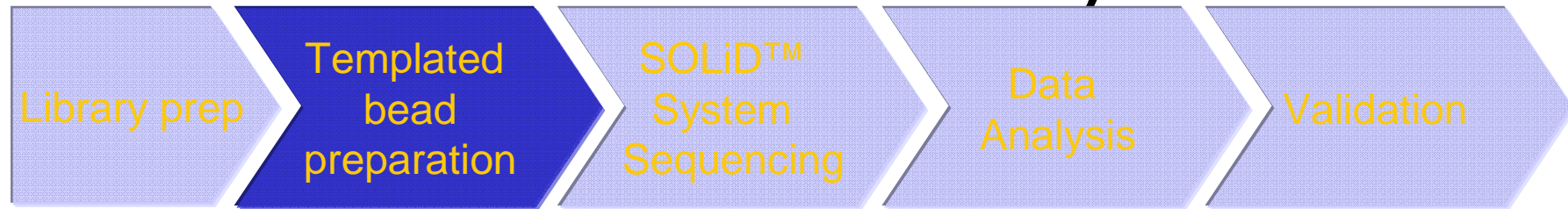
Simultaneously PCR amplifies the original library fragment

And enables further copies of the original library fragment to be synthesized to the bead

Beads are coated with P1 complementary adapters

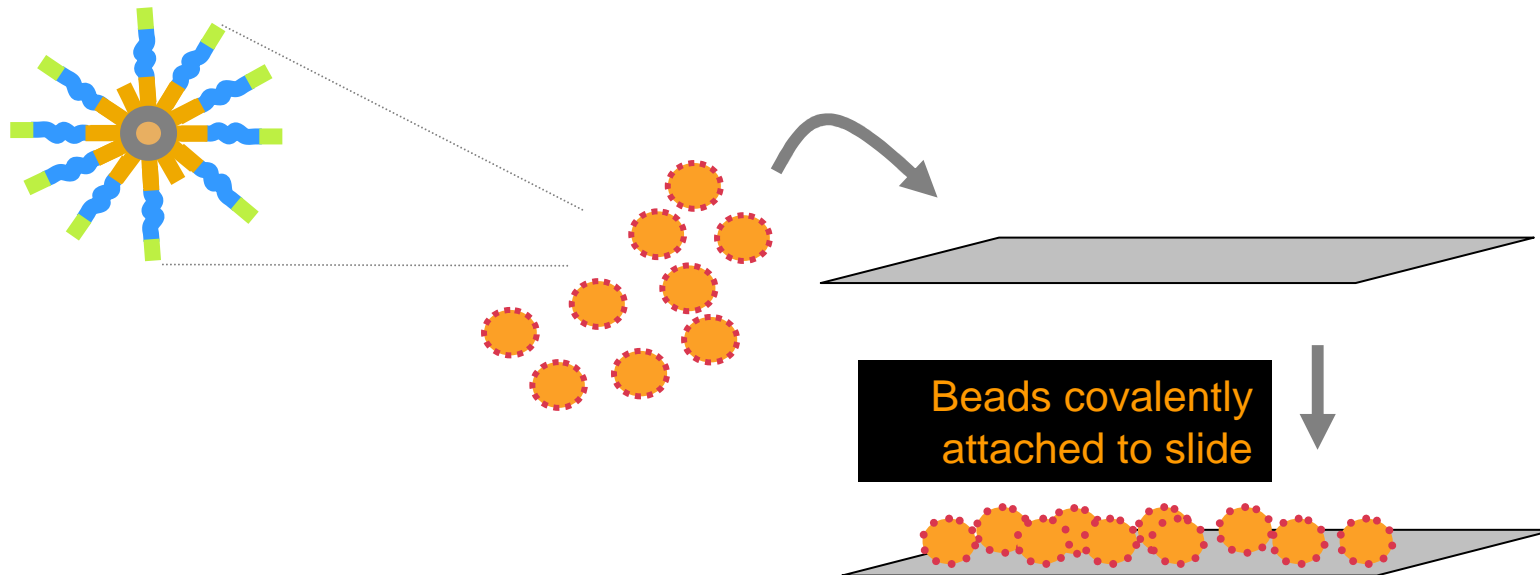
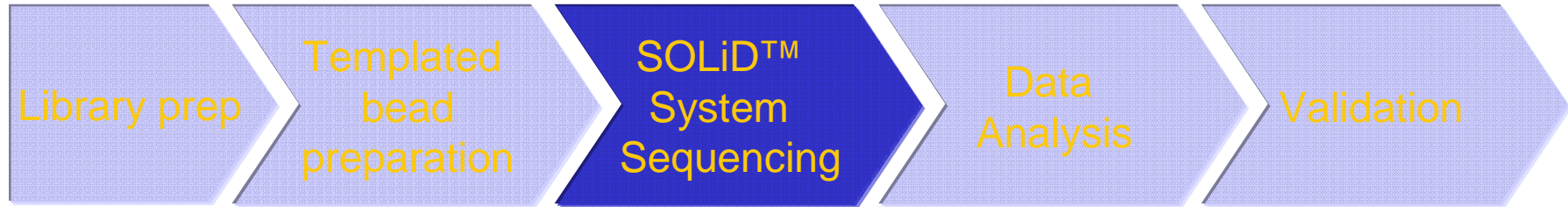


ePCR Clonally Amplified Library

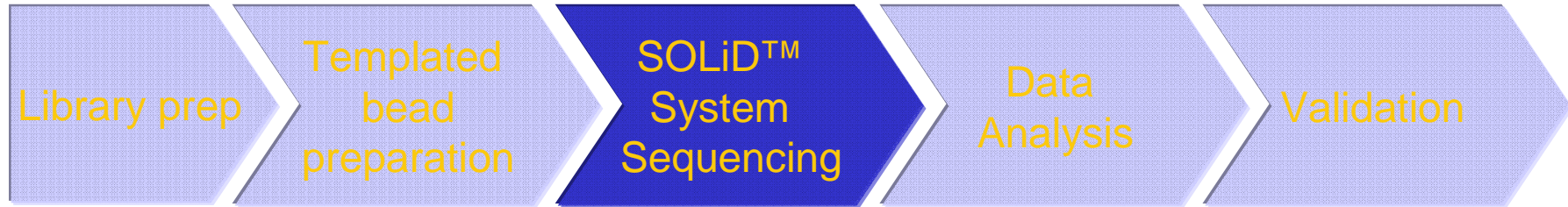


At the end the beads are covered with 20.000 to 40.000 clonal copies of the original library fragment.

Templated Beads are Attached to a Slide

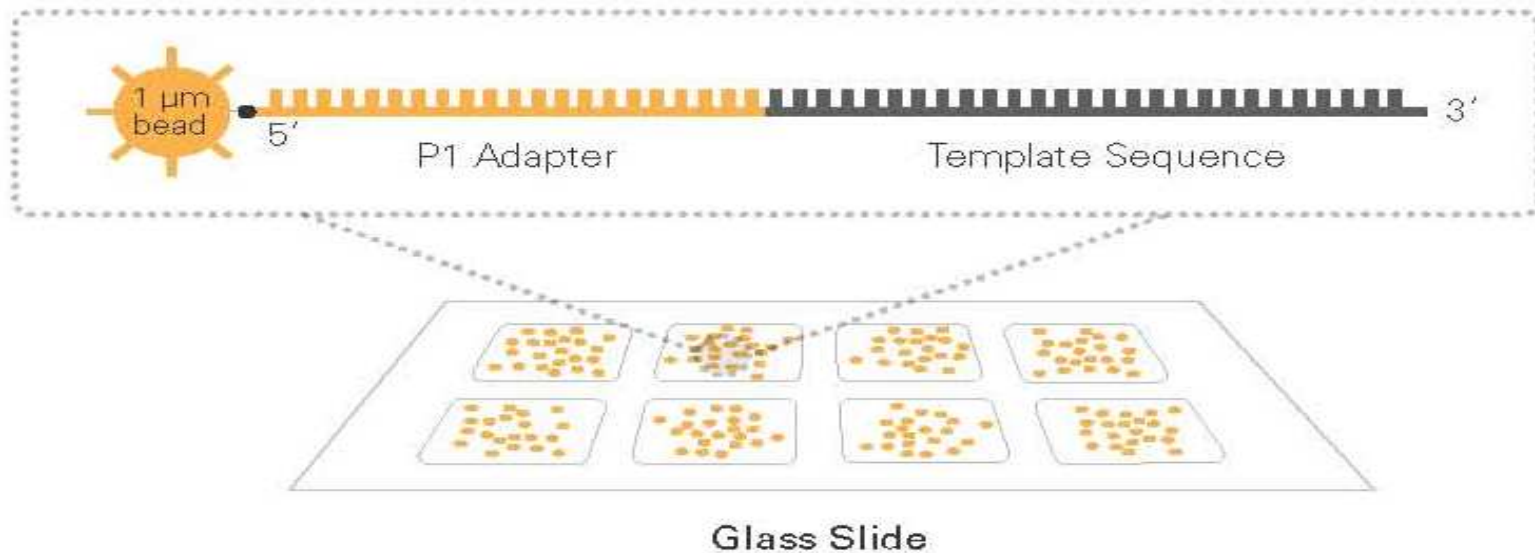


Sequencing by Ligation



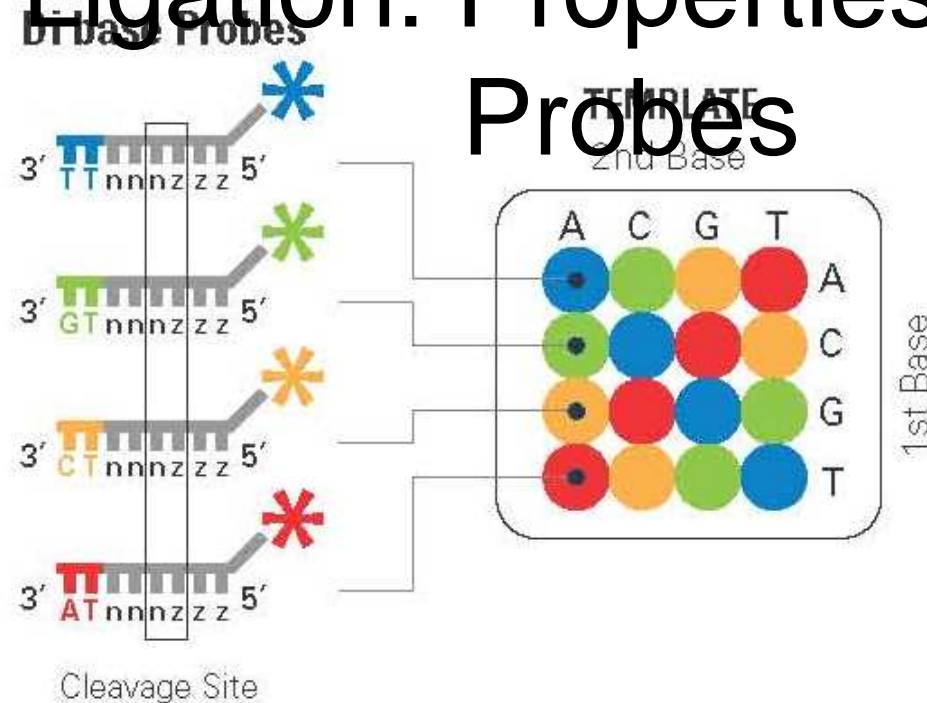
SOLiD™ Substrate

L



Sequencing

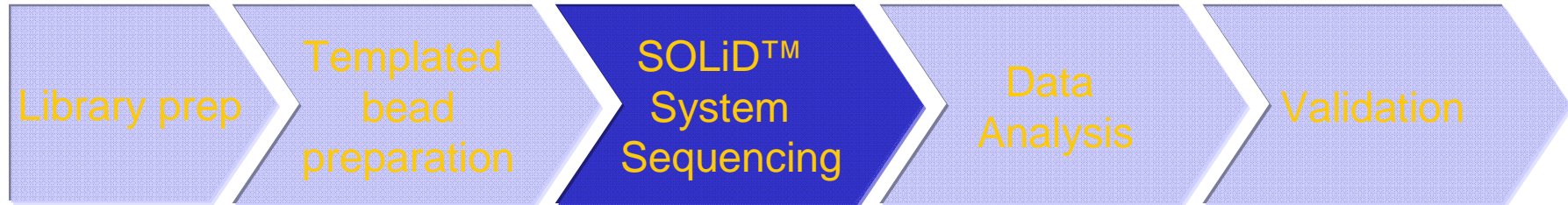
→ Sequencing by
Ligation: Properties of the
Probes



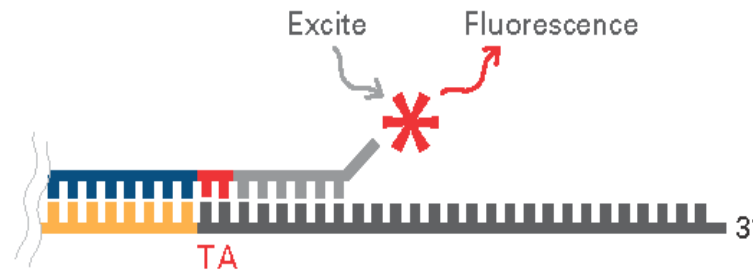
Probes are octamers:

- n = degenerate bases, z = universal bases
- 4^5 combinations = 1024 probes,
- 256 probes per color

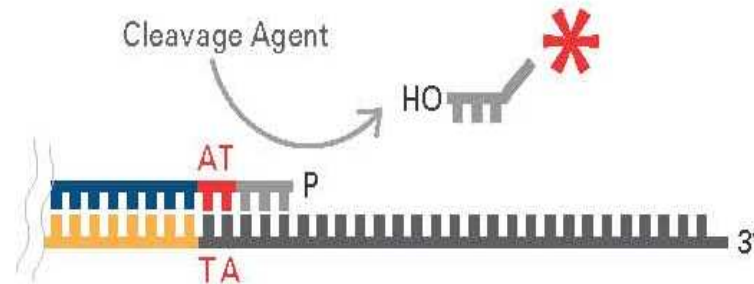
Sequencing by Ligation



Ligation and Imaging



Cleavage

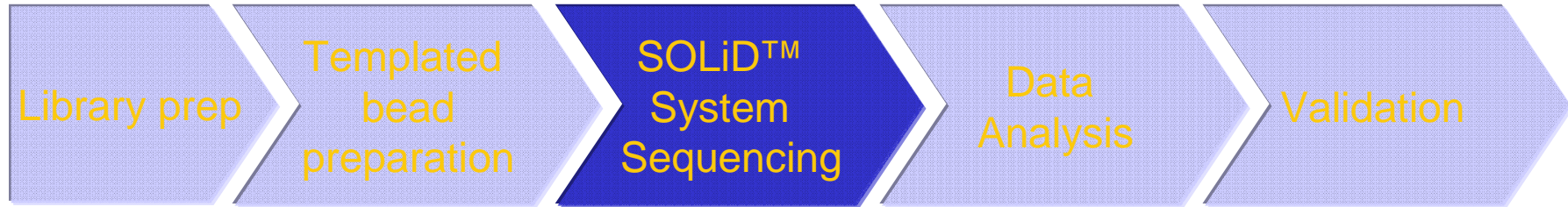


Repeat Ligation, Imaging, Cleavage

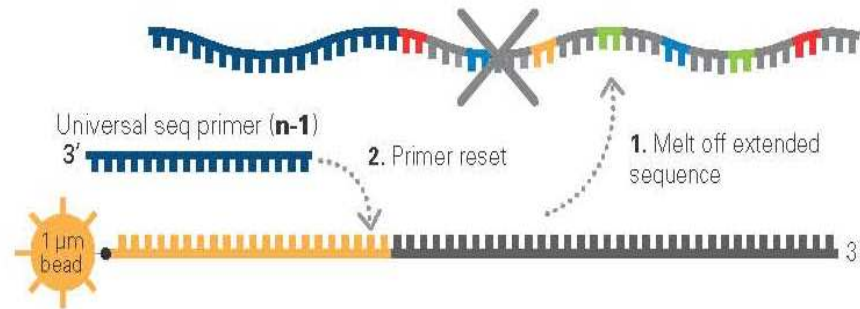
Ligation cycle 1 2 3 4 5 6 7 ... (n cycles)



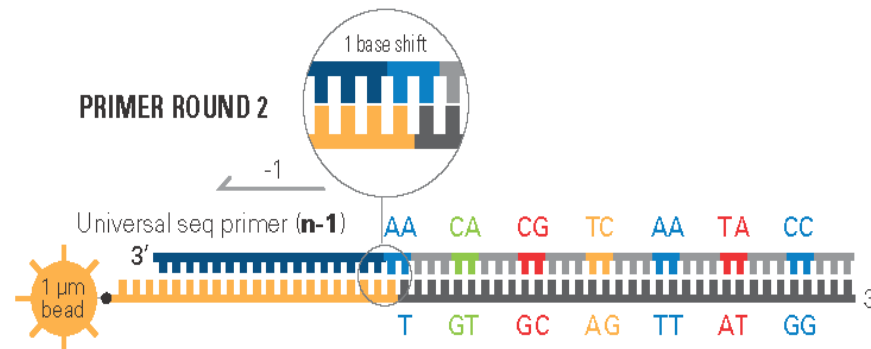
Sequencing by Ligation



Reset



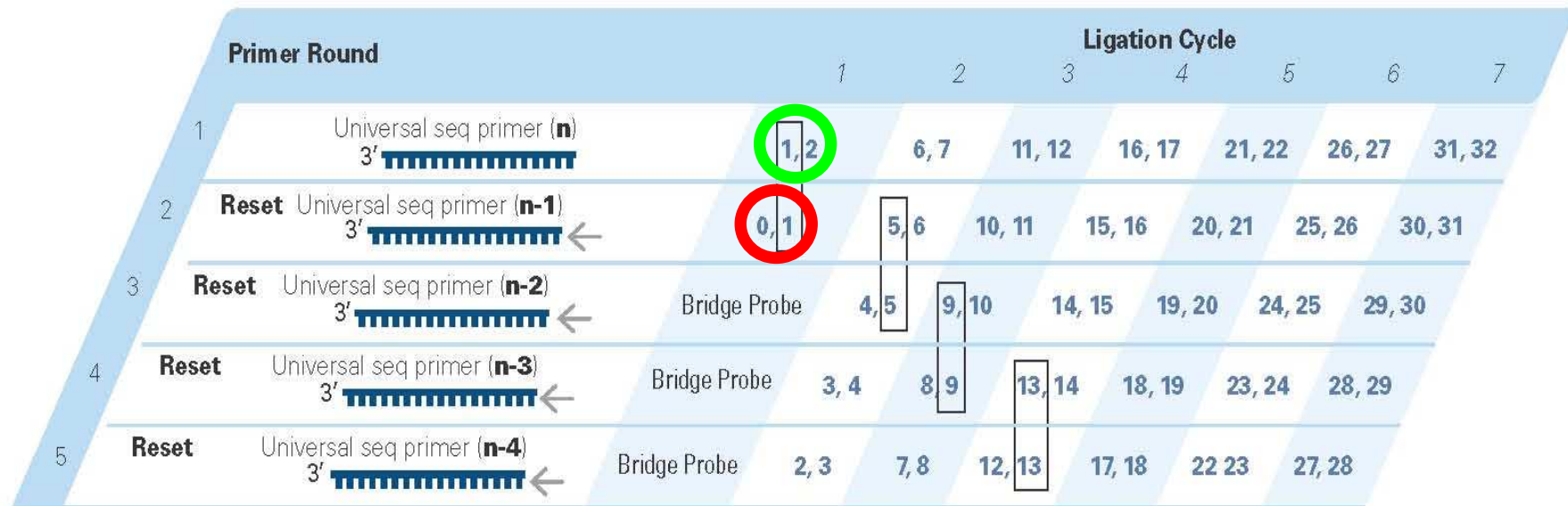
Repeat steps 1-6 with new primer repeat



Encoding



8. Repeat Reset with , n-2, n-3, n-4 primers



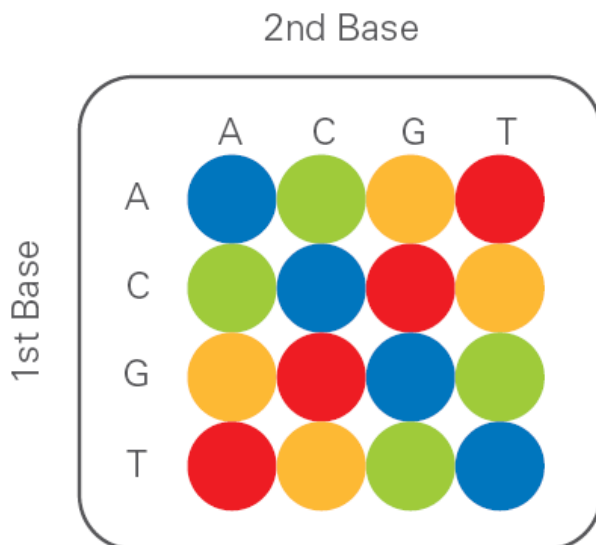
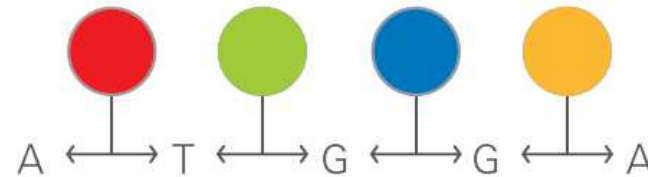
- Each position is **interrogated twice** in independent extension reactions with different primers
- Dual interrogation provides **increased confidence** in calls

SOLID™ System Sequencing

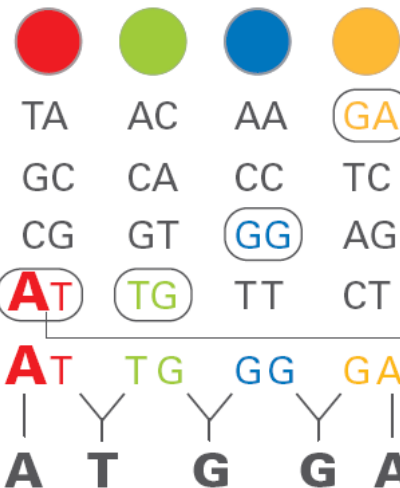
→ Sequencing by Ligation: 2 Base Encoding

Double Interrogation

With 2 base encoding each
base is defined twice



Decoding



Color Space Sequence

Possible Dinucleotides

Base Zero

Decoded Sequence

Base Space Sequence

Why Do We Use Color Space?

... you will always find a two color change



If you have a true base change....

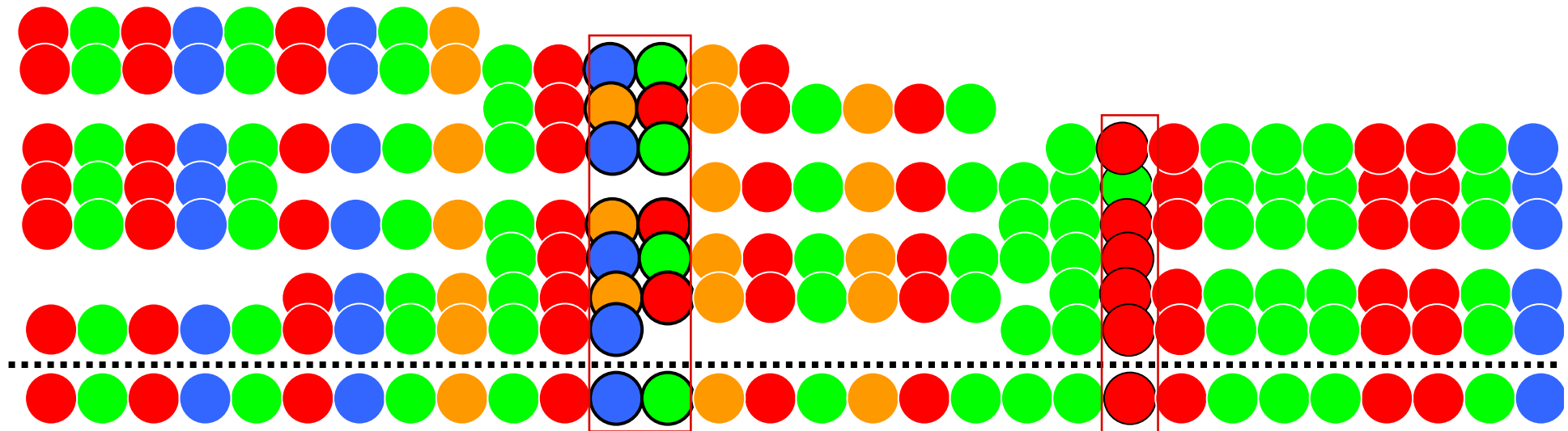
Single color changes can only come from sequencing errors and are corrected

Alignment of Sequencing Tags

and Differentiation of Real SNPs From Correctable Mis-reads

Sequence reads

Correctable Mis-reads



2 color change = SNP

1 color change = mis-read

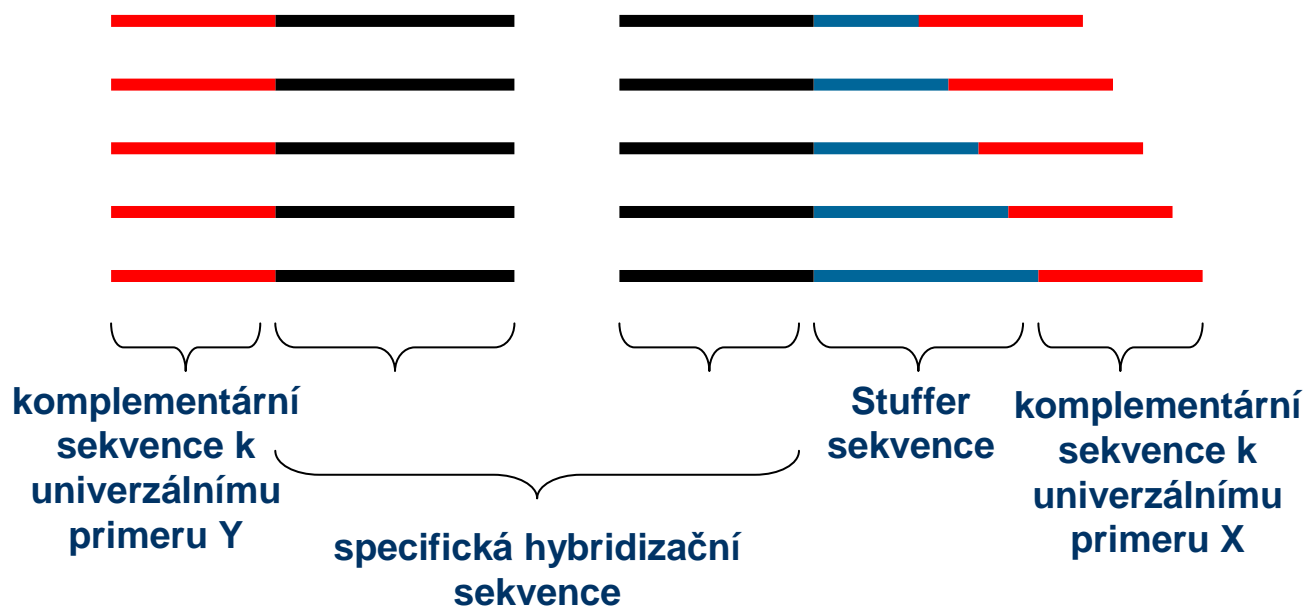
Reference sequence

Sekvencování v onkologii

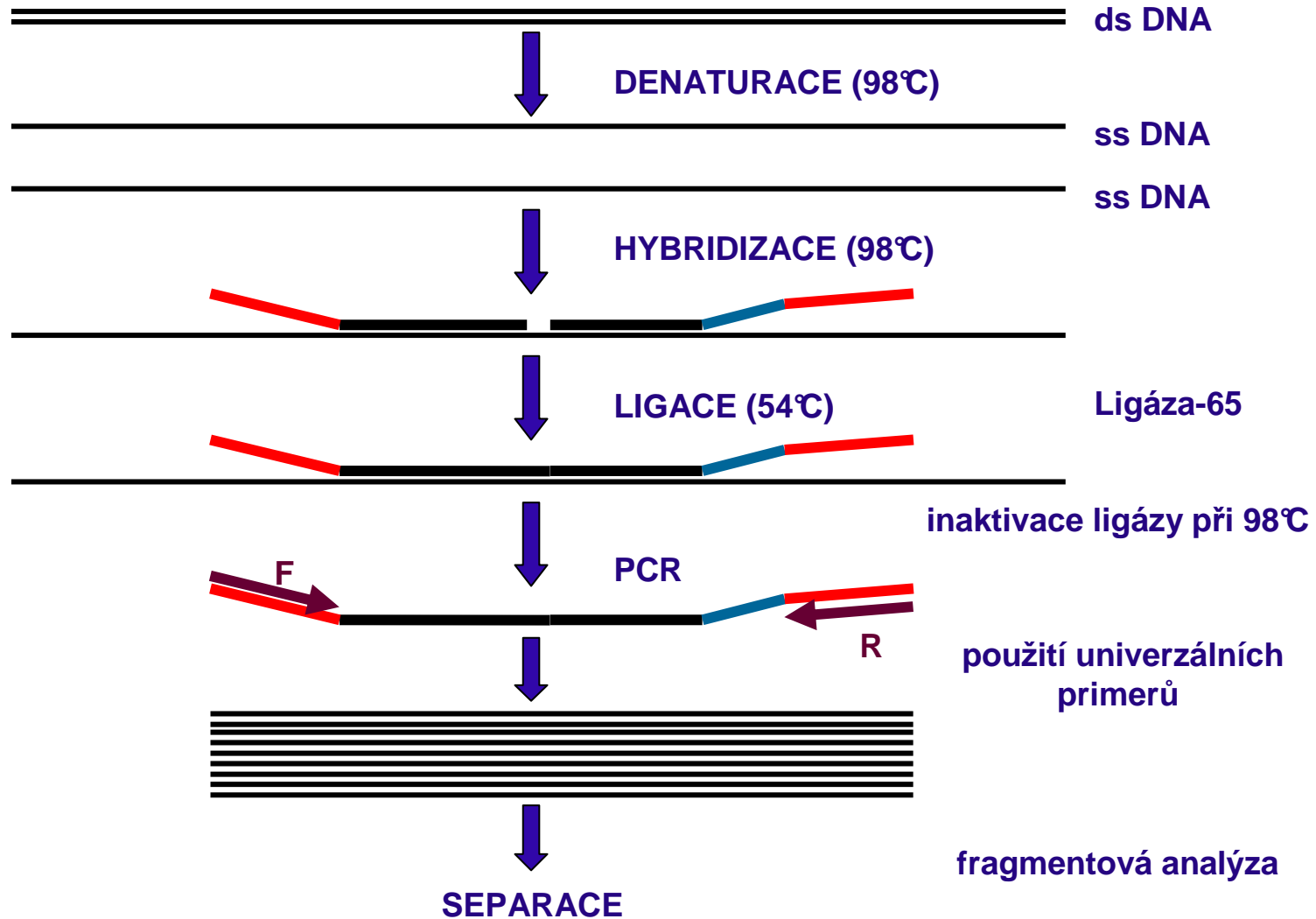
Studium mutací a polymorfismů (K-RAS, BRCA1, p53, RB1)

Fragmentační analýza např. RB1 - mutační scanning na úrovni DNA i RNA pomocí přímého sekvenování, vyhledávání velkých delecí pomocí MLPA analýzy, analýza metylace promotorové oblasti
vyšetření periferní krve / nádorové tkáně

Schéma konstrukce párů sond

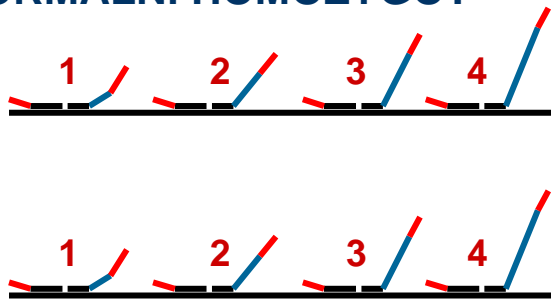


Princip MLPA

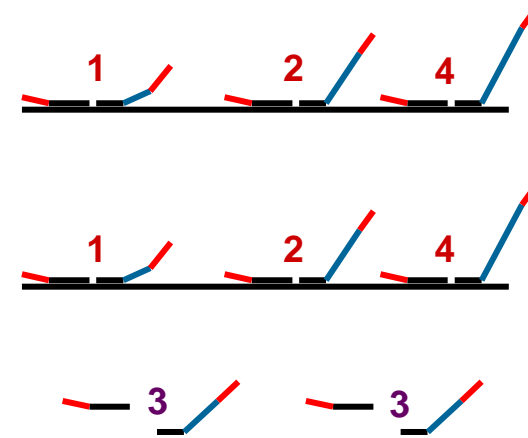


Detekce delecí

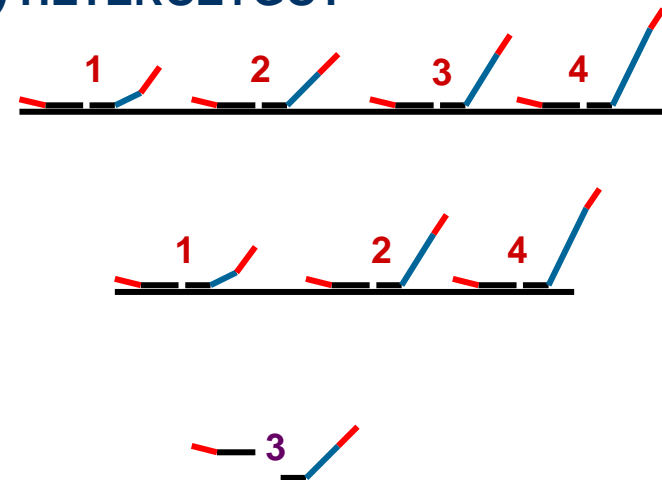
A) NORMÁLNÍ HOMOZYGOT



B) DELETOVANÝ HOMOZYGOT

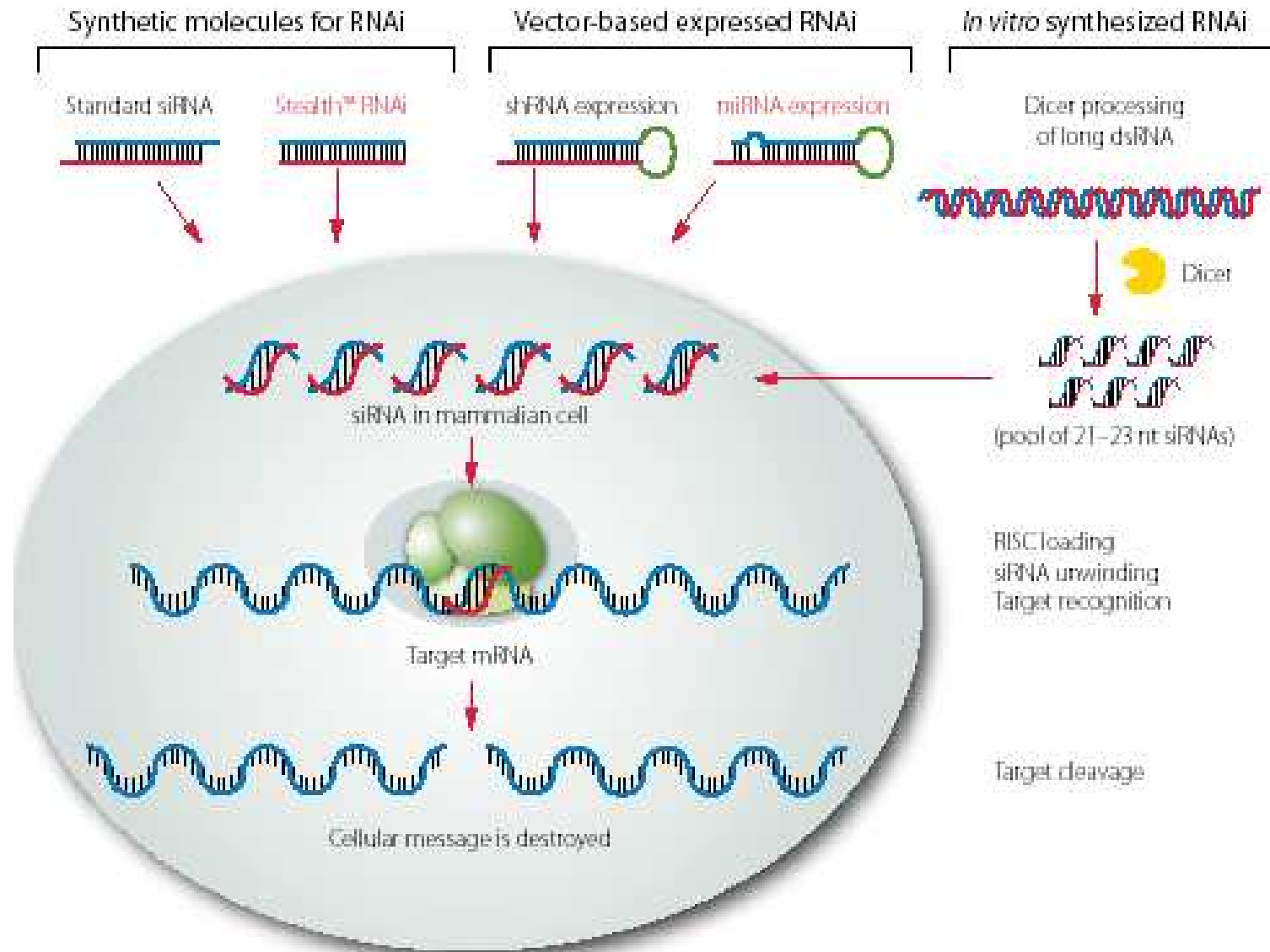


C) HETEROZYGOT

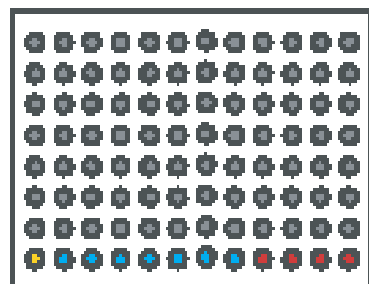


	A	B	C
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1	————	————	————
2	————	————	————
3	————		————
4	————	————	————

RNAi technologie



Stealth™ RNAi Collection



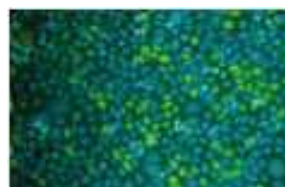
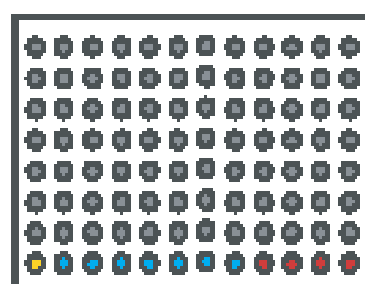
1. Transfer and dilute Stealth™ RNAi into transfection plate

2. Add Lipofectamine™

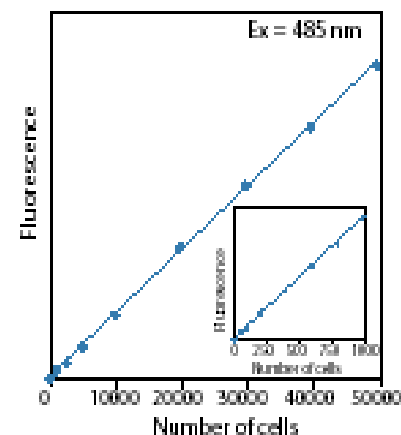
2000
Reagent

3. Add cells

Reverse transfection*

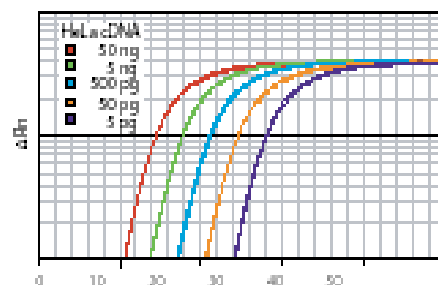


Reporter assay
CellSensor™ β-lactamase



Cell proliferation
CyQUANT® Cell
Proliferation Assay

- Stealth™ duplexes
- Fluorescent control
- Blank wells for custom controls
- Stealth™ RNAi Positive Control p53, Stealth™ RNAi Negative Control Low GC, Medium GC, and High GC



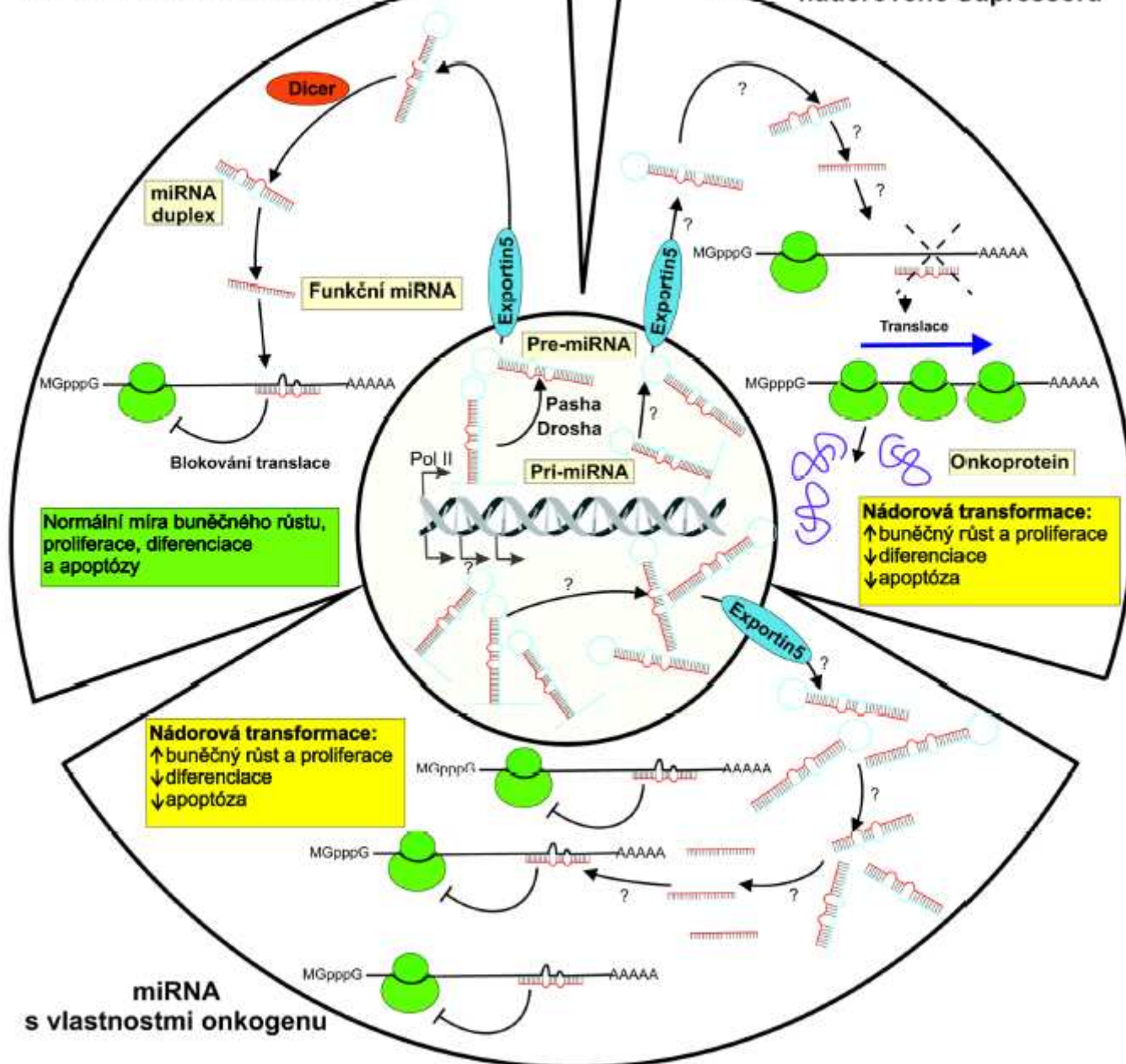
Gene expression
qPCR LUX™ Primers



Protein expression
Alexa Fluor®
immunocytochemistry

Funkce miRNA ve zdravé tkáni

miRNA s vlastnostmi nádorového supresoru



Normální míra buněčného růstu, proliferace, diferenciace a apoptózy

Nádorová transformace:
↑ buněčný růst a proliferace
↓ diferenciace
↓ apoptózy

Nádorová transformace:
↑ buněčný růst a proliferace
↓ diferenciace
↓ apoptózy

miRNA s vlastnostmi onkogenu

DNA metylace a nádory

Distribuce metylace je v genomu nádorových buněk často pozměněna:

rozsáhlé hypometylované
oblasti

v nádorových buňkách dochází k rozsáhlým **demetylacím repetitivních sekvencí** a stupeň hypometylace koreluje s progresí onemocnění.

hypometylace repetitivních sekvencí může být **časnou událostí** kancerogeneze a může predisponovat buňku k přestavbám genomu mechanismem rekombinace

změny **specifické genové exprese**

hypermetylace ve specifických
oblastech

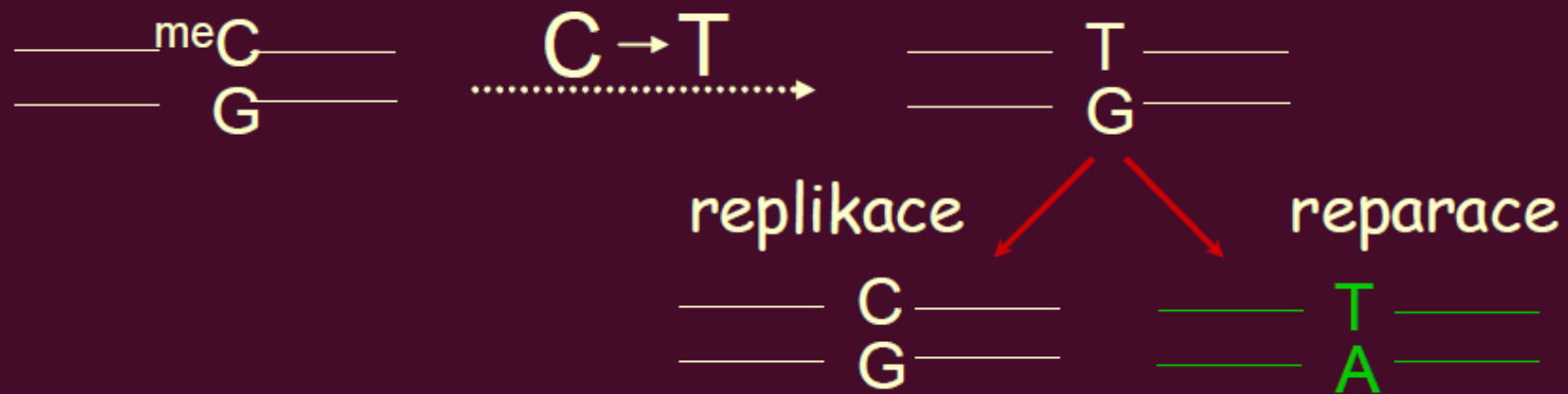
hypermetylace se v nádorových buňkách objevuje v promotorech genů pro nádorové supresory, genů účastnících se mezibuněčných adhezí, oprav DNA, ...

epigenetické změny mohou být **postupné**: DNA metylace a acetylace histonů fungují jako tzv. „transkripční reostat“

hypermetylace promotorů potenciálně **reverzibilní**: epigenetická plasticita může odrážet dynamiku některých procesů během kancerogeneze - např. během tvorby metastáz

změna aktivity i hladiny DNMT

Mutace zprostředkované metylací



Evolve genů x nádory:

- 1) amplifikace sekvencí navodí metylaci
 - 2) reverzibilní inaktivace
 - 3) mutace meC - irreverzibilní inaktivace
 - 4) vzniklý pseudogen - masivní mutace (bez selekčního tlaku)
 - 5) vznik a reaktivace genu s novou funkcí
- x) mutace u nádorů - nové funkce aktivovaných genů

Restrikční štěpení

