

Extracelulárna mitochondriálna DNA ako neinvazívny biomarker nádorových ochorení

Silvia Bokorová^{1,2}, Katarína Suroviaková³, Ondrej Pös^{1,2}, Werner Krampfl^{1,2,3},
Jakub Styk^{1,2,4}, Tomáš Szemes^{1,2,3}

¹Geneton, s. r. o., Bratislava, Slovensko

²Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava, Slovensko

³Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko

⁴Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko

Mitochondrie zohrávajú esenciálnu úlohu v energetickom metabolizme bunky a tak ovplyvňujú dôležité bunkové funkcie, ktoré môžu súvisieť s rozvojom nádorových ochorení. Molekuly mitochondriálnej DNA (mtDNA) môžu byť aktívnou alebo pasívnou cestou vylučované z buniek do extracelulárneho priestoru, čím sa z nich stáva cirkulujúca mtDNA (cf-mtDNA). Tento fakt otvára nové možnosti pre včasnú a neinvazívnu analýzu nádorového genetického profilu z tekutých biopsií. Súčasné metódy umožňujú analyzovať hneď niekoľko parametrov, ako sú tumorovo špecifické mutácie mtDNA, zmena počtu kópií mtDNA alebo rozdielne dĺžky fragmentov cf-mtDNA v cirkulácii. Jednotlivé metódy analýzy cf-mtDNA sa neustále vyvíjajú, a preto by implementácia získaných poznatkov mohla byť základom pre efektívnejšiu prevenciu a celkový manažment nádorových ochorení. Aj keď využiteľnosť cf-mtDNA stále varíruje pri rôznych typoch nádorových ochorení, a jej analýza čelí limitáciám, ako je heteroplasmia, definitívne možno vyhlásiť, že cf-mtDNA má diagnostický a/alebo prognostický potenciál ako neinvazívny biomarker nádorových ochorení.

Kľúčové slová: mitochondria, cf-mtDNA, heteroplasmia, biomarker

Extracellular mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker of cancer

Mitochondria play an essential role in the energy metabolism of cells and thus affect essential cellular functions possibly associated with cancer development. Mitochondrial DNA (mtDNA) molecules can be released from cells into the extracellular space by an active or passive mechanism, making them circulating mtDNA (cf-mtDNA). This fact opens up new possibilities for early and non-invasive analysis of the tumour genetic profile from liquid biopsies. Current methods allow the analysis of several parameters, such as tumour-specific mtDNA mutations, mtDNA copy number changes, or different lengths of cf-mtDNA fragments in circulation. Methods of cf-mtDNA analysis are constantly evolving. Thus, implementing the acquired knowledge could be the basis for more effective prevention and overall management of cancer. Although the utility of cf-mtDNA still varies in various types of cancer, and its analysis faces limitations such as heteroplasmy, it can be declared that cf-mtDNA has diagnostic and/or prognostic potential as a non-invasive biomarker of cancer.

Keywords: mitochondria, cf-mtDNA, heteroplasmy, biomarker

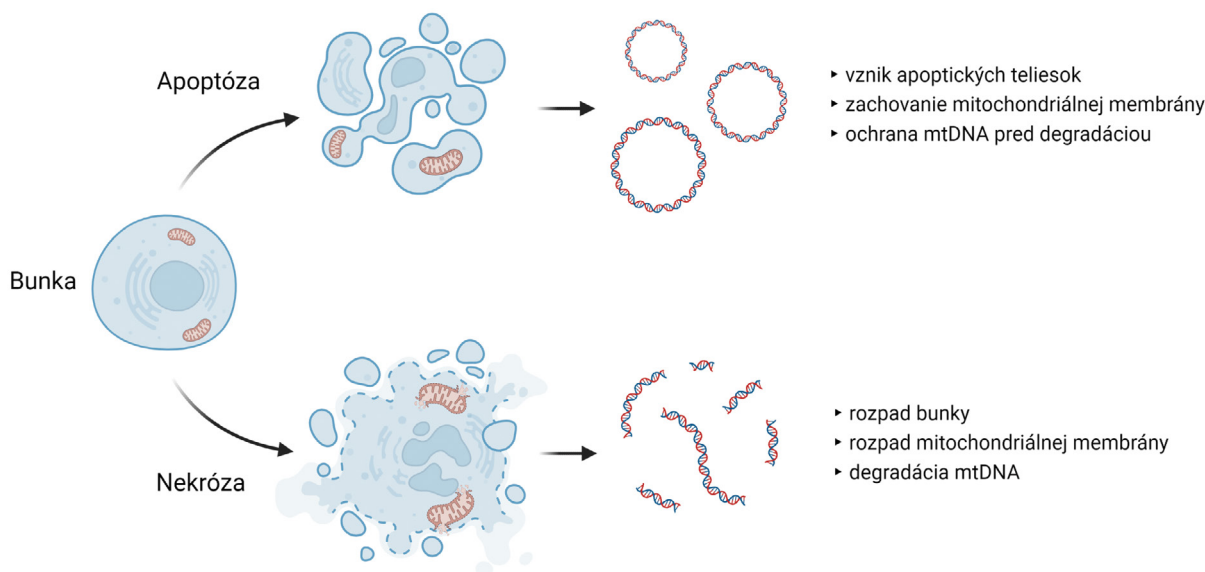
NewsLab, 2022; roč. 13 (1): 31 – 36

Úvod

Mitochondria ako semiautonómna organela obsahuje vlastný genóm v podobe 100 – 10 000 kópií cirkulárnych molekúl mitochondriálnej DNA (mtDNA) s dĺžkou 16 569 bp, ktorá je organizovaná do nukleoproteínových štruktúr (tzv. nukleoidov). Mitochondriálny genóm je charakteristický tým, že nemá intróny, no obsahuje 37 génov kódujúcich 13 polypeptidov dýchacieho reťazca, 22 tRNA a 2 rRNA. Táto organela sa podieľa na produkcii energetických metabolitov a molekúl, prostredníctvom ktorých ovplyvňuje dôležité bunkové funkcie vrátane aktivity enzýmov, epigenetických modifikácií či apoptózy. Je zrejmé, že efektívnosť týchto procesov varíruje pre genetické zmeny v mtDNA, v dôsledku čoho môžu vznik-

núť rôzne ochorenia, ktoré zvyčajne postihujú tkanivá s vysokými energetickými požiadavkami, ako sú mozog, srdce alebo svaly^(1,2). Dysfunkcie mitochondrií sú časté aj pri ochoreniach, ako je rakovina. Aberácie mtDNA boli identifikované takmer v každom type nádoru a predpokladá sa, že by mohli prispievať k rozvoju rakovinového fenotypu. Zároveň však nemožno vylúčiť, že tieto aberácie vznikajú práve v dôsledku rakovinových zmien, ktoré prebiehajú v nádorových bunkách⁽³⁾. Na objasnenie úlohy týchto mutácií v karcinogenéze bude potrebné podrobnejšie štúdium, no ukazuje sa, že ich detekcia by mohla byť potenciálnym markerom pre skorú diagnostiku nádorových ochorení.

Obrázok 1. Fragmentácia cf-mtDNA v závislosti od typu bunkovej smrti. Apoptóza je kontrolovaný proces, pri ktorom si mitochondrie zachovávajú membránu a mtDNA je tak chránená pred degradáciou. Rakovinové bunky však bežne podliehajú nekróze, keď dochádza k aktívnej degradácii mtDNA (Created with BioRender.com).



Je známe, že nádorové bunky uvoľňujú svoje nukleové kyseliny do extracelulárneho prostredia. K tomuto javu dochádza pri bunkovej smrti, ale taktiež prostredníctvom iných biologických mechanizmov, ktoré boli podrobnejšie opísané v predchádzajúcich prácach⁽⁴⁾. Výsledkom je zmes rôznych typov extracelulárnych nukleových kyselín vrátane mtDNA v telových tekutinách, ktoré vykazujú genetické črty pôvodných, teda aj rakovinových buniek. Analýza týchto molekúl, ktoré možno extrahovať napríklad z krvnej plazmy, má preto potenciál ako neinvazívny prístup pre diagnostiku, sledovanie progresie ochorenia či monitorovanie liečby daného ochorenia⁽⁵⁾.

Pri analýze cirkulujúcej mtDNA (cf-mtDNA) by sa však mali zohľadňovať štrukturálne rozdiely medzi mitochondriálnou a jadrovou DNA. Keďže mtDNA je malá molekula a nie je chránená histónmi ako jadrová DNA, tak aj fragmenty cf-mtDNA sú odlišné⁽⁶⁾. Veľkosť fragmentov cf-mtDNA v biologických tekutinách sa pohybuje väčšinou v rozsahu 20 až 80 bp, no bola opísaná aj existencia celých intaktných molekúl cf-mtDNA v ľudskej plazme. Na základe zistených poznatkov sa predpokladá, že cirkulárny tvar mtDNA má protektívny charakter⁽⁷⁾. Podobne ako jadrová DNA aj mtDNA môže byť transportovaná pomocou extracelulárnych membránových vezikúl (EMV)⁽⁸⁾. Tieto vezikuly môžu obsiahnuť aj celý mitochondriálny genóm, ktorý dokážu preniesť do buniek s poškodeným metabolizmom, a tak obnoviť ich metabolickú aktivitu. Na druhej strane takýto horizontálny transfer mtDNA pomocou EMV môže prebudiť dormantné nádorové bunky a vyvolať ich rezistenciu proti terapii⁽⁹⁾.

Fragmentácia cf-mtDNA

Molekuly cf-mtDNA môžu byť do cirkulácie uvoľňované aktívne zo živých buniek napr. prostredníctvom exozómov alebo pasívne prostredníctvom bunkovej smrti. Pri apoptóze buniek nedochádza k porušeniu mitochondriálnej membrány, v dôsledku čoho ostáva mtDNA intaktná. Zatiaľ čo

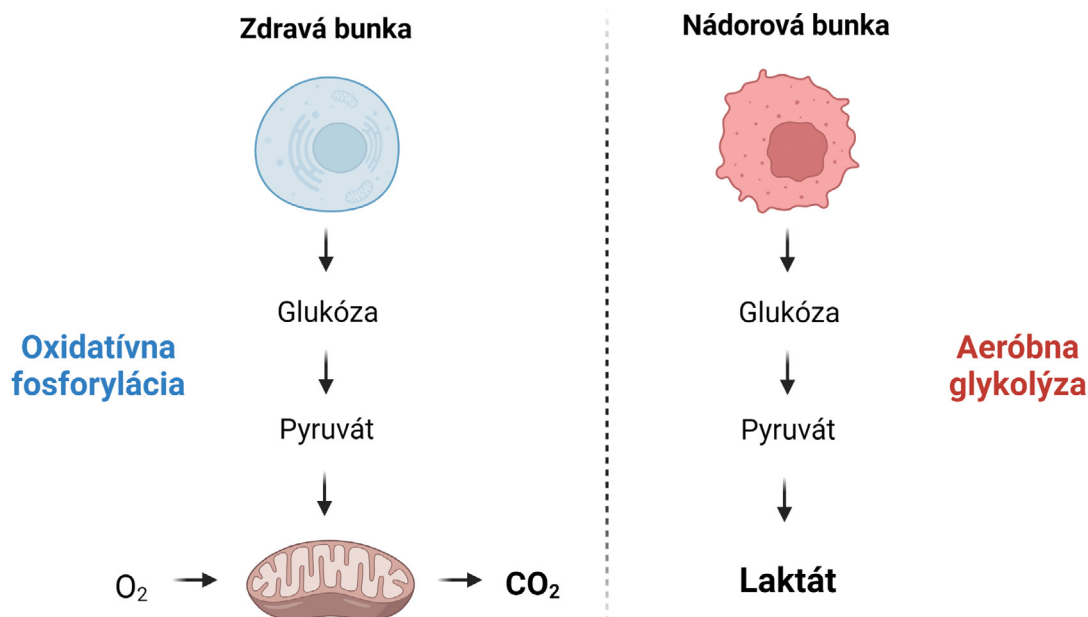
apoptická forma bunkovej smrti je bežná v normálnych bunkách, tak pre nádorové bunky je charakteristická nekróza. Počas nekrózy dochádza k rozrušeniu mitochondrií, uvoľneniu mtDNA a následne k jej degradácii na kratšie fragmenty (**obrázok 1**). Preto pacienti s rakovinou vykazujú kratšiu dĺžku cf-mtDNA (109,15 bp) v porovnaní so zdravými jedincami (142,62 bp), pričom dĺžka fragmentov navyše koreluje s nádorovou záťažou a relapsom ochorenia. Analýza dĺžkového profilu cf-mtDNA by preto mohla slúžiť ako ukazovateľ na sledovanie nádorovej záťaže a progresie rakoviny⁽¹⁰⁾.

Spolu s nárastom objemu nádorovej masy sa zvyšuje úroveň nekrózy v nádore⁽¹¹⁾, čo vedie k zvýšeniu zastúpenia cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA) a zároveň poklesu dĺžky fragmentov cf-mtDNA. Fragmentačný profil cf-mtDNA predstavuje užitočný parameter na vyhodnotenie nádorovej záťaže na základe inverznej korelácie medzi objemom nádorovej masy a koncentráciou ctDNA. Využitie fragmentačného profilu na analýzu nádorovej záťaže sa potvrdilo aj v prípade pacientov s hepatocelulárnym karcinómom. Priemerná dĺžka cf-mtDNA fragmentov z krvi pacientov (162,41 bp) bola kratšia ako v kontrolných vzorkách (173,25 bp). Navyše fragmenty cf-mtDNA pacientov s percentuálnym zastúpením ctDNA viac ako 5 % vykazovali priemernú dĺžku 153,62 bp na rozdiel od pacientov so zastúpením ctDNA menej ako 5 % s priemernou dĺžkou fragmentov cf-mtDNA 164,36 bp⁽¹⁰⁾. Podobne to bolo v ďalšej štúdii, kde sa vedci zamerali na pacientov s karcinómom obličiek. Zistili, že koncentrácia cf-mtDNA v plazme mala vyššie hodnoty u pacientov s metastatickou formou ochorenia oproti pacientom bez metastáz a zdravým jedincem, a zároveň u nich pozorovali pokles indexu integrity (pomer dlhých a krátkych fragmentov)⁽¹²⁾.

Mutácie v mtDNA

Pri zmenách energetického a biosyntetického metabolizmu nádorových buniek zohrávajú centrálnu úlohu mitochondrie. Jednou z typických zmien je tzv. Warburgov efekt

Obrázok 2. Rozdiel v metabolizme glukózy medzi zdravými a nádorovými bunkami. V prítomnosti kyslíka prebieha v zdravých bunkách OXPHOS, pričom sa produkuje oxid uhličitý. Za rovnakých podmienok rakovinové bunky využívajú proces glykolýzy, keď namiesto oxidácie pyruvátu v mitochondriách, dochádza k jeho fermentácii v cytosole, pričom sa produkuje kyselina mliečna (Created with BioRender.com).



(obrázok 2), keď rakovinové bunky namiesto oxidatívnej fosforylácie (OXPHOS) uprednostňujú pri získavaní energie anaeróbnú glykolýzu, a to aj v podmienkach s dostatočným množstvom kyslíka⁽¹³⁾. Gény, kódované v mtDNA sú nevyhnutné pre správny priebeh OXPHOS, a preto mutácie v nich môžu prispieť k rozvoju rakovinového fenotypu buniek. Tieto mutácie môžu spadať do dvoch hlavných tried: (1) závažné mutácie (tumorigénne), ktoré inhibujú OXPHOS, zvyšujú produkciu reaktívnych foriem kyslíka a podporujú proliferáciu nádorových buniek, a (2) miernejšie mutácie (adaptívne), ktoré umožňujú nádorom prispôbiť sa novému prostrediu⁽¹⁴⁾.

Zatiaľ, čo v každej bunke existuje iba jedna kópia gDNA, v prípade mtDNA ich môže existovať viacero. V závislosti od úrovne metabolickej aktivity môže mať bunka stovky mitochondrií, z ktorých každá má 1 až 10 kópií mtDNA. Ak má bunka všetky kópie mtDNA identické, hovoríme o tzv. homoplazmii⁽¹⁵⁾. Pôsobením zvýšeného oxidačného stresu spojeným so starnutím dochádza k poškodeniu mtDNA. Nedostatočné reparačné mechanizmy napokon vedú ku kumulácii mutácií mtDNA v bunke⁽¹⁶⁾. Keď je v jednej bunke zmes mutovanej mtDNA spolu s nemutovanou, nastáva heteroplazmia⁽¹⁷⁾. Počas bunkového delenia dochádza k náhodnej distribúcii heteroplazmatickej mtDNA do dcérskych buniek. Bunky môžu tolerovať iba určitú úroveň heteroplazmie, kým sa neobjaví aberantný fenotyp⁽¹⁵⁾, ktorý závisí od pomeru týchto molekúl mtDNA⁽¹⁸⁾. Patogénne mutácie v mtDNA sa môžu vyskytovať v rôznych pomeroch a klinické dôsledky mutovanej mtDNA sa prejavujú až po prekročení prahovej hodnoty⁽¹⁹⁾. Ukázalo sa, že heteroplazmia komplikuje detekciu tumorovo špecifických mutácií v cf-mtDNA^(20,21). Preto ju treba zohľadňovať na intracelulárnej aj medzibunkovej úrovni⁽²²⁾. Ak sa zdá, že mutácia detegovaná v cf-mtDNA je heteroplazmatická, v skutočnosti môže byť výsledkom kontaminácie

mtDNA z rôznych buniek (medzibunková heteroplazmia). To vysvetľuje, prečo aj zdánlivo nízka úroveň heteroplazmatickej mutácie môže hrať funkčnú úlohu vo vývoji alebo progresii nádoru na lokálnej úrovni⁽²⁰⁾.

Napriek týmto limitáciám sa ukazuje, že mutácie v cf-mtDNA majú potenciál ako neinvazívny biomarker, ktorý možno využiť pri predikcii, diagnostike a monitorovaní nádorových ochorení. Jeden z príkladov môže predstavovať detekcia mutácií v cf-mtDNA v oblasti D-slučky z plazmy pacientov so skvamóznym karcinómom hlavy. Ukázalo sa, že detekcia somatických mutácií umožňuje skoré zavedenie preventívnych opatrení, preto by cf-mtDNA mohla predstavovať biomarker včasnej detekcie ochorenia⁽²³⁾. Liu et al. 2021 predstavil optimalizovaný prístup na báze NGS pre detekciu nádorovo špecifických mutácií v cf-mtDNA z plazmy pacientov s hepatocelulárnym karcinómom. Na druhej strane sa mu týmto prístupom nepodarilo detegovať mutácie u pacientov s kolorektálnym karcinómom, čo naznačuje že existujú rakovinovo špecifické rozdiely v množstve nádorovej mtDNA, ktorá sa uvoľňuje do plazmy pacientov⁽²⁴⁾. Výsledky porovnávacích NGS analýz mtDNA sú limitované schopnosťou sledovať tumorovo špecifické varianty v cf-mtDNA. Väčšina variantov, ktoré boli identifikované v nádorovom tkanive, nebola detegovateľná v plazme príslušného pacienta, pričom zhoda medzi variantmi bola iba na úrovni 17 %⁽²¹⁾ až 25 %⁽²⁵⁾. V súčasnosti stále nie je jasné, prečo je detekcia variantov z plazmatickej cf-mtDNA taká náročná, preto zostáva jednou z hlavných výziev v aplikáciách tekutej biopsie.

Počet kópií mtDNA

Jedinečné vlastnosti mitochondriálneho genómu, ako jeho krátka dĺžka, jednoduchá molekulárna štruktúra a vysoký počet kópií, z neho robia vhodný nástroj na včasnú detekciu

Tabuľka 1. Porovnanie zmien v počte kópií mtDNA, v príkladoch rôznych typov nádorových ochorení. Referencie (Ref.)

Typ rakoviny	Materiál	Vzorka	Lokus	Počet kópií	Senzitivita (%)	Špecifita (%)	Ref.
rakovina vaječníkov	plazma	cf-mtDNA	MT-ATP8	↑	63 – 79	62 – 67	33
rakovina vaječníkov (neskoré štádium)	plazma	exozómy	ND1, ND5	↑	–	–	34
rakovina semenníkov	sérum	cf-mtDNA	mtDNA-79	↑	59,5	94,3	35
		cf-mtDNA	mtDNA-220	↑	70,2	77,1	
rakovina prostaty	plazma	cf-mtDNA	16S rRNA	↑	80	58	36
non-Hodgkinov lymfóm	plná krv	mtDNA	MT-ND1	↑	–	–	37
rakovina hlavy a krku	sliny	mtDNA	MT-CO1/ MT-CO2	↑	–	–	38
urologické malignity	sérum	cf-mtDNA	16S rRNA	↑	84	97	39
rakovina žalúdka	mononukleárne bunky periférnej krvi	mtDNA	12S rRNA	↑	47	80	40
skvamózny karcinóm hltana	krv, tkanivo	mtDNA	D-slučka	↑	–	–	30
rakovina pľúc	plazma	cf-mtDNA	16S rRNA	↑	–	–	41
hepatocelulárny karcinóm	plazma	cf-mtDNA	–	↑	80	94	42
rakovina prsníka	plazma	cf-mtDNA	MT-ATP8	↓	53	87	43
	plná krv	mtDNA	MT-ATP8	↓	–	–	44
	plná krv	mtDNA	MT-ATP8	↓	73	78	45
hepatocelulárny karcinóm	sérum	cf-mtDNA	MT-ND1	↓	–	–	46
karcinóm obličky	plná krv	mtDNA	MT-ND1	↓	–	–	47
Ewingov sarkóm	sérum	cf-mtDNA	16S rRNA	↓	76,1	68,4	48

↑ – zvýšený/↓ – znížený počet kópií mtDNA

nádorových ochorení⁽²⁶⁾. Počet kópií mtDNA je v bunkách rôznych tkanív odlišný a je významne ovplyvnený aj rozdielnymi podmienkami vnútorného a vonkajšieho mikroprostredia⁽²⁷⁾. Na rozdiel od jadrovej DNA je mtDNA extrémne náchylná na oxidačné a iné genotoxické poškodenia pre nedostatok ochranných histónov a účinných mechanizmov opravy DNA⁽²⁸⁾. Zmeny v počte kópií mtDNA boli asociované s rozvojom rôznych typov nádorových ochorení vrátane rakoviny hrubého čreva, konečníka, prsníka a pľúc, pričom tieto zmeny možno detegovať pomocou analýzy cf-mtDNA⁽⁶⁾. Existuje predpoklad, že počet kópií mtDNA v organizme jedinca je ovplyvnený špecifickým miestom na mitochondriálnom génome, v ktorom vznikla mutácia asociovaná s konkrétnym nádorovým ochorením. Mutácie v oblasti D-slučky zodpovednej za reguláciu replikácie mtDNA by podľa tohto predpokladu mali spôsobiť zníženie počtu kópií mtDNA v bunke. Naopak, zvýšený počet kópií mtDNA na bunku môže byť dôsledkom mutácie v génoch pre proteíny podieľajúce sa na oxidačnej fosforylácii. V tom prípade by mohlo ísť o kompenzačný mechanizmus, čiže reakciu na mitochondriálnu dysfunkciu⁽²⁹⁾. Na druhej strane existujú aj štúdie, ktoré upozorňujú na to, že somatické mutácie v oblasti D-slučky môžu zapríčiniť nárast počtu kópií mtDNA, čo by mohlo byť spôsobené zvýšením replikácie v dôsledku mutácie v tejto oblasti⁽³⁰⁾. Mechanizmus, prostredníctvom ktorého môže byť znížený počet kópií mtDNA spojený s karcinogenezou, nie je úplne jasný, no predpokladá sa, že nízka hladina fyzickej aktivity u mladých jedincov vedie k zníženiu počtu kópií mtDNA a zníženej produkcii ATP, výsledkom čoho sa zvyšuje riziko rakoviny⁽³¹⁾. Tieto výsledky naznačujú, že abnormálny počet kópií mtDNA by mohol slúžiť ako potenciálny marker pre poškodenia DNA a dysfunkciu mitochondrií, ktoré pravdepodobne prispievajú ku karcinogéze.

Zmeny v počte kópií cf-mtDNA boli opísané pri rôznych typoch nádorových ochorení (**tabuľka 1**), preto by kvantifikácia cf-mtDNA vo vzorkách telových tekutín mohla poslúžiť na rozlíšenie pacientov s nádorovým ochorením od zdravých jedincov alebo ako marker na monitorovanie progresie nádoru či predikciu reakcie pacienta na liečbu⁽³²⁾.

Zmeny v počte kópií mtDNA sa obvyčajne počítajú ako relatívny pomer množstva konkrétneho génu kódovaného mitochondriálnym genómom k množstvu génu kódovanému jadrovou DNA. Presnosť a efektivita tejto metódy môžu byť obmedzené, čo sa môže odzrkadliť na dôveryhodnosti výsledkov⁽²⁶⁾. Variácie v počte kópií cf-mtDNA sa môžu výrazne líšiť pri rôznych typoch nádorových ochorení. Na overenie presnosti informácií o priebehu ochorenia je preto potrebné výsledky získané z analýzy cf-mtDNA vyhodnocovať spolu s výsledkami už osvedčených biomarkerov⁽⁴⁹⁾.

Rozsiahle delécie mtDNA

V porovnaní s bodovými mutáciami sú rozsiahle delécie v rámci mtDNA menej časté, zato však výraznejšie prispievajú k rozvoju mitochondriálnych ochorení, rakoviny alebo k stárnutiu⁽⁵⁰⁾. Ich vplyv na karcinogézu nie je dostatočne objasnený a jeho prediktívny a prognostický potenciál je stále predmetom štúdia. S viacerými typmi nádorových ochorení je často spájaná delécia mtDNA 4 977 bp medzi nukleotidmi 8 470 až 13 447, ktorá postihuje dôležité gény zodpovedné za správnu funkciu OXPHOS⁽⁵¹⁾. Štúdia Nie et al. ukázala, že miera týchto delécií bola významne vyššia v krvi pacientov s karcinómom prsníka v porovnaní s benígnym ochorením, príslušným tkanivom, aj so zdravými kontrolami, čo poukazuje na potenciál delécie mtDNA 4 977 ako neinvazívneho biomarkera pre detekciu rakoviny prsníka⁽⁵²⁾. Známa je tiež delécia mtDNA 4 576 bp, ktorá bola opísaná ako potenciál-

ny biomarker pre skrining rakoviny prsníka, a to dokonca vo vzorkách telových tekutín⁽⁵³⁾. Vhodným príkladom je aj delécia 3397 bp (3.4kbΔ) v pozícii 10 743 až 14 125, ktorá je užitočným biomarkerom pre diagnostiku rakoviny prostaty⁽⁵⁴⁾. Okrem tkanív bol preskúmaný potenciál tejto delécie v moči a sére, no napriek sľubným výsledkom je potrebné overiť využiteľnosť tekutých biopsií na analýzu 3.4kbΔ na rozsiahlejších štúdiách⁽⁵⁵⁾.

Mikrosatelitová instabilita mtDNA

Mitochondriálna mikrosatelitová instabilita (mtMSI) je definovaná ako zmena dĺžky v rámci krátkych tandemových repetícií (mikrosatelitov) veľkosti 1 - 6 bp, pozorovaná medzi nádorovým a zdravým tkanivom. Časté variácie v týchto lokusoch (delécie/inzercie) vznikajú v dôsledku neefektívneho mitochondriálneho systému opravy replikačných chýb. Mechanizmy zodpovedné za opravu mtDNA však doposiaľ nie sú príliš známe⁽⁵⁶⁾. Častý výskyt mtMSI bol opísaný v súvislosti s viacerými typmi nádorových ochorení vrátane rakoviny prsníka, ovárií, endometria či kolorektálneho karcinómu (CRC)⁽⁵⁷⁾. Výskum mtMSI v spojitosti s možnými klinickými dôsledkami preukázal, že pacienti s CRC v III. štádiu s mutáciami v regióne D-slučky sa vyznačujú zlou prognózou a rezistenciou proti adjuvantnej chemoterapii na báze 5-fluorouracilu⁽⁵⁸⁾. Práve vysoko polymorfné oblasti v rámci D-slučky, akými sú D310 (poly(C)) a D16184 (poly(C) prerušené T) sú najčastejšími regiónmi, ktoré sa spájajú s mtMSI⁽⁵⁶⁾. Napriek sľubným výsledkom pri nádorových ochoreniach, mtMSI nebola dostatočne preskúmaná v telových tekutinách.

Epigenetické modifikácie mtDNA

Podobne ako jadrová tak aj mtDNA je vystavená rôznym epigenetickým modifikáciám, ktoré ovplyvňujú dôležité procesy ako replikácia a transkripcia mtDNA. Dong et al. podrobne opísal viaceré modifikácie, medzi ktoré patria metylácie a hydroxymetylácie, posttranslačné modifikácie proteínov v mitochondriálnych nukleoidoch a tiež posttranskripcné modifikácie mitochondriálnych RNA (mtRNA). Boli opísané aj nekódujúce RNA odvodené od mtDNA, ktoré hrajú dôležité

tú úlohu pri regulácii translácie a funkcie mitochondriálnych génov⁽⁵⁹⁾. V tejto spojitosti vznikol koncept mitoepiggenetiky, ktorá študuje mitochondriálne modifikácie ovplyvňujúce dedičný fenotyp bez zmeny samotnej sekvencie mtDNA. Keďže dysfunkcie mitochondrií ako dôsledok epigenetických zmien môžu prispievať ku karcinogéze⁽⁶⁰⁾, ich analýza má potenciál pre klinické aplikácie v onkológii. Mohd Khair et al. zhrnuli rôzne typy nádorových ochorení, ktoré boli študované v spojitosti s epigenetickými modifikáciami na úrovni bunkovej mtDNA a mtRNA⁽⁵⁶⁾, avšak potenciál extracelulárnych biomarkerov zatiaľ nebol u onkologických pacientov dostatočne preskúmaný.

Záver

Použitie kvantitatívnych a kvalitatívnych charakteristík cf-mtDNA pre diagnostiku nádorových ochorení sa v posledných rokoch stalo cieľom záujmu mnohých výskumov. Je to najmä vďaka možnosti minimálne invazívneho zákroku odobratia vzorky z telových tekutín a výhodám, ktoré ponúka kompaktný mitochondriálny genóm. Moderné prístupy umožňujú analýzu rôznych parametrov, ako je detekcia mutácií, počet kópií mtDNA či fragmentačný profil cf-mtDNA, ktoré je navyše možné kombinovať s cieľom vytvoriť robustnejší nástroj pre diagnostiku ochorenia. Molekuly cf-mtDNA preukázali diagnostickú a/alebo prognostickú hodnotu pre viaceré nádorové ochorenia, no ich využiteľnosť stále varíruje pri rôznych typoch rakoviny. Aby mohla byť zavedená do rutínnej praxe, je ešte potrebné pochopiť jej úlohu pri rozvoji nádorového fenotypu a zrealizovať rozsiahlejšie štúdie v kombinácii so zavedenými biomarkermi, ktoré sa používajú pri manažmente onkopacientov v súčasnosti.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekty: ITMS: 313011V446 (40 %); ITMS: 313011V578 (40 %) a ITMS: 313011ATL7 (20 %) spolufinancované zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. F C Lopes A. Mitochondrial metabolism and DNA methylation: a review of the interaction between two genomes. *Clin Epigenetics*. 2020; 12(1): 182.
2. Srinivasan S, Guha M, Kashina A, Avadhani NG. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2017; 1858(8): 602-614.
3. Lund M, Melbye M, Diaz LJ, Duno M, Wohlfahrt J, Vissing J. Mitochondrial dysfunction and risk of cancer. *Br J Cancer*. 2015; 112(6): 1134-1140.
4. Pös O, Biró O, Szemes T, Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *Eur J Hum Genet*. 2018; 26(7): 937-945.
5. Szilágyi M, Pös O, Márton É, et al. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(18). doi: 10.3390/ijms21186827
6. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 2016; 35(3): 347-376.
7. Newell C, Hume S, Greenway SC, Podemski L, Shearer J, Khan A. Plasma-derived cell-free mitochondrial DNA: A novel non-invasive methodology to identify mitochondrial DNA haplogroups in humans. *Mol Genet Metab*. 2018; 125(4): 332-337.
8. Soltész B, Buglyó G, Németh N, et al. The Role of Exosomes in Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2021; 23(1). doi: 10.3390/ijms23010008
9. Sansone P, Savini C, Kurelac I, et al. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114(43): E9066-E9075.
10. An Q, Hu Y, Li Q, et al. The size of cell-free mitochondrial DNA in blood is inversely correlated with tumor burden in cancer patients. *Precis Clin Med*. 2019; 2(3): 131-139.
11. Milross CG, Tucker SL, Mason KA, Hunter NR, Peters LJ, Milas L. The effect of tumor size on necrosis and polarographically measured pO₂. *Acta Oncol*. 1997; 36(2): 183-189.
12. Lu H, Busch J, Jung M, et al. Diagnostic and prognostic potential of circulating cell-free genomic and mitochondrial DNA fragments in clear cell renal cell carcinoma patients. *Clin Chim Acta*. 2016; 452: 109-119.
13. Lytovchenko O, Kunji ERS. Expression and putative role of mitochondrial transport proteins in cancer. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2017; 1858(8): 641-654.
14. Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*. 2006; 25(34): 4647-4662.

15. Atilano SR, Udar N, Satalich TA, Udar V, Chwa M, Kenney MC. Low frequency mitochondrial DNA heteroplasmy SNPs in blood, retina, and [RPE+choroid] of age-related macular degeneration subjects. *PLoS One*. 2021; 16(1): e0246114.
16. Bua E, Johnson J, Herbst A, et al. Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am J Hum Genet*. 2006; 79(3): 469-480.
17. Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet*. 1997; 13(11): 450-455.
18. Patananan AN, Wu TH, Chiou PY, Teitell MA. Modifying the Mitochondrial Genome. *Cell Metab*. 2016; 23(5): 785-796.
19. Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*. 2003; 370(Pt 3): 751-762.
20. Triska P, Kaneva K, Merkurjev D, et al. Landscape of Germline and Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Pediatric Malignancies. *Cancer Res*. 2019; 79(7): 1318-1330.
21. Weerts MJA, Timmermans EC, van de Stolpe A, et al. Tumor-Specific Mitochondrial DNA Variants Are Rarely Detected in Cell-Free DNA. *Neoplasia*. 2018; 20(7): 687-696.
22. Aryaman J, Johnston IG, Jones NS. Mitochondrial Heterogeneity. *Front Genet*. 2018; 9: 718.
23. Kumar M, Srivastava S, Singh SA, et al. Cell-free mitochondrial DNA copy number variation in head and neck squamous cell carcinoma: A study of non-invasive biomarker from Northeast India. *Tumor Biology*. 2017; 39(10): 101042831773664. doi: 10.1177/1010428317736643
24. Liu Y, Zhou K, Guo S, et al. NGS-based accurate and efficient detection of circulating cell-free mitochondrial DNA in cancer patients. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2021; 23: 657-666.
25. Haupts A, Vogel A, Foersch S, et al. Comparative analysis of nuclear and mitochondrial DNA from tissue and liquid biopsies of colorectal cancer patients. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 16745.
26. Yu M. Circulating cell-free mitochondrial DNA as a novel cancer biomarker: opportunities and challenges. *Mitochondrial DNA*. 2012; 23(5): 329-332.
27. Clay Montier LL, Deng JJ, Bai Y. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J Genet Genomics*. 2009; 36(3): 125-131.
28. Chandra D, Singh KK. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1807(6): 620-625.
29. Modica-Napolitano JS, Kulawiec M, Singh KK. Mitochondria and human cancer. *Curr Mol Med*. 2007; 7(1): 121-131.
30. Guo W, Yang D, Xu H, et al. Mutations in the D-loop region and increased copy number of mitochondrial DNA in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep*. 2013; 40(1): 13-20.
31. Melkonian SC, Wang X, Gu J, et al. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood leukocytes and the risk of clear cell renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2015; 36(2): 249-255.
32. Yu M. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. *Life Sci*. 2011; 89(3-4): 65-71.
33. Zachariah RR, Schmid S, Buerki N, Radpour R, Holzgreve W, Zhong X. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors. *Obstet Gynecol*. 2008; 112(4): 843-850.
34. Detection of cell-free, exosomal and whole blood mitochondrial DNA copy number in plasma or whole blood of patients with serous epithelial ovarian cancer. *J Biotechnol*. 2019; 298: 76-81.
35. Ellinger J, Albers P, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU Int*. 2009; 104(1): 48-52.
36. Mehra N, Penning M, Maas J, van Daal N, Giles RH, Voest EE. Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007; 13 (2 Pt 1): 421-426.
37. Lan Q, Lim U, Liu CS, et al. A prospective study of mitochondrial DNA copy number and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008; 112(10): 4247-4249.
38. Jiang WW. Increased Mitochondrial DNA Content in Saliva Associated with Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(7): 2486-2491.
39. Ellinger J, Müller DC, Müller SC, et al. Circulating mitochondrial DNA in serum: a universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies. *Urol Oncol*. 2012; 30(4): 509-515.
40. Fernandes J, Michel V, Camorlinga-Ponce M, et al. Circulating mitochondrial DNA level, a noninvasive biomarker for the early detection of gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014; 23(11): 2430-2438.
41. Bulgakova O, Kausbekova A, Kussainova A, Kalibekov N, Serikbailuly D, Bersimbaev R. Involvement of Circulating Cell-Free Mitochondrial DNA and Proinflammatory Cytokines in Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021; 22(6): 1927-1933.
42. Jiang P, Chan CWM, Chan KCA, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(11): E1317-E1325.
43. Kohler C, Radpour R, Barekati Z, et al. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer*. 2009; 8: 105.
44. Iqbal S, Raina V, Balani S, et al. Higher Mitochondrial DNA Content in Peripheral Blood of Stage III Breast Cancer Patients. *Austin Oncol*. 2017; 2(1): 1014.
45. Xia P, An HX, Dang CX, et al. Decreased mitochondrial DNA content in blood samples of patients with stage I breast cancer. *BMC Cancer*. 2009; 9(1). doi: 10.1186/1471-2407-9-454
46. Li L, Hann HW, Wan S, et al. Cell-free circulating mitochondrial DNA content and risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic HBV infection. *Sci Rep*. 2016; 6(1): 69.
47. Xing J, Chen M, Wood CG, et al. Mitochondrial DNA content: its genetic heritability and association with renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100(15): 1104-1112.
48. Yu M, Wan YF, Zou QH. Cell-free circulating mitochondrial DNA in the serum: a potential non-invasive biomarker for Ewing's sarcoma. *Arch Med Res*. 2012; 43(5): 389-394.
49. Afrifa J, Zhao T, Yu J. Circulating mitochondria DNA, a non-invasive cancer diagnostic biomarker candidate. *Mitochondrion*. 2019; 47: 238-243.
50. Chen T, He J, Huang Y, Zhao W. The generation of mitochondrial DNA large-scale deletions in human cells. *J Hum Genet*. 2011; 56(10): 689-694.
51. Yusoff AAM, Abdullah WSW, Khair SZNM, Radzak SMA. A comprehensive overview of mitochondrial DNA 4977-bp deletion in cancer studies. *Oncol Rev*. 2019; 13(1): 409.
52. Nie H, Chen G, He J, et al. Mitochondrial common deletion is elevated in blood of breast cancer patients mediated by oxidative stress. *Mitochondrion*. 2016; 26: 104-112.
53. Zhu W, Qin W, Sauter ER. Large-scale mitochondrial DNA deletion mutations and nuclear genome instability in human breast cancer. *Cancer Detect Prev*. 2004; 28(2): 119-126.
54. 瑞安·帕尔, 罗伯特·塞耶, 加百利·道库博, et al. 3.4 kb mitochondrial DNA deletion for use in the detection of cancer. *Patent*. Published online October 27, 2010. Accessed August 8, 2022. <https://patentimages.storage.googleapis.com/c5/66/26/b443d5e5fe30e6/CN101874119A.pdf>
55. Maragh S, Veltri RW, Lund SP, et al. Evaluation of two mitochondrial DNA biomarkers for prostate cancer detection. *Cancer Biomark*. 2015; 15(6): 763-773.
56. Mohd Khair SZN, Abd Radzak SM, Mohamed Yusoff AA. The Uprising of Mitochondrial DNA Biomarker in Cancer. *Dis Markers*. 2021; 2021: 7675269.
57. Venderbosch S, van Vliet S, Craenmehr MHC, et al. Mitochondrial microsatellite instability in patients with metastatic colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2015; 466(5): 495-502.
58. Lièvre A, Chapusot C, Bouvier AM, et al. Clinical value of mitochondrial mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23(15): 3517-3525.
59. Dong Z, Pu L, Cui H. Mitoepigenetics and Its Emerging Roles in Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 4.
60. Sharma N, Pasala MS, Prakash A. Mitochondrial DNA: Epigenetics and environment. *Environ Mol Mutagen*. 2019; 60(8): 668-682.

Mgr. Silvia Bokorová

Geneton, s. r. o.

Ilkovičová 8, 841 04 Bratislava

e-mail: silvia.bokorova@geneton.sk