

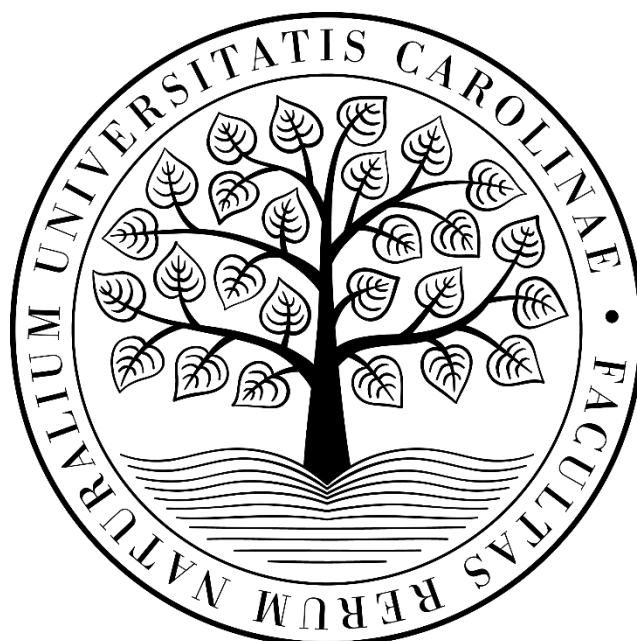
UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Lukáš Koblíček

**Vývoj metod pro detekci cirkulujících nukleových kyselin u pacientů
s nádorovým onemocněním**

Development of methodology for detection of circulating nucleic acids in cancer
patients

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.

Praha 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis:

Abstrakt

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější příčiny úmrtí na světě, s čímž je spjata také neustále rostoucí incidence dokonce i některých hůře léčitelných variant. Mezi jeden z nejčastějších typů nádorového onemocnění na světě patří kolorektální karcinom, který z pohledu mortality zaujímá druhé místo. Z těchto důvodů došlo k rozvoji různých metod sloužících pro včasnou diagnostiku onemocnění. Jednou z moderních a neinvazivních metod je tzv. kapalná biopsie využívající detekci cirkulujících nukleových kyselin DNA a RNA z krve pacientů. Tato metoda je vhodná také pro výběr terapie, sledování její účinnosti a pozorování návratu onemocnění. V této práci byl vytvořen metodický postup pro sledování cirkulujících nukleových kyselin k jejímu dalšímu použití u kohorty pacientů s kolorektálním karcinomem.

Pro izolaci cirkulujících nukleových kyselin z plasmy zdravých kontrol byly využity různé komerční kity, mezi nimiž byl zvolen ten nejlepší z hlediska kvality a kvantity. Pomocí vzorků od zdravých dárců byla také stanovena hranice pro detekci hemolýzy pomocí qPCR. Vše bylo poté použito na vzorky RNA izolovaných z plasmy onkologických pacientů, z nichž byla připravena knihovna krátkých molekul RNA pro následnou sekvenaci. Po zpracování výsledků bylo stanoveno zastoupení miRNA molekul v celkovém objemu krátkých RNA vyskytujících se v plasmě a určeny miRNA s nejvyšším výskytem a variabilitou. Závěrem pak byla porovnána citlivost detekce miRNA pomocí qPCR, dPCR a sekvenování nové generace stanovením exprese hsa-miR-16.

Klíčová slova

nádorové onemocnění, plasma, volná cirkulující DNA, mikroRNA, digitální PCR, sekvenování nové generace, optimalizace

Abstract

Cancer diagnosis represents one of the most common causes of death in the world, also linked to an ever-increasing incidence of even some more difficult-to-treat variants. One of the most common types of cancer in the world is colorectal cancer, which ranks second in terms of mortality. For these reasons, various methods have been developed for an early diagnosis of the disease. One of the modern and non-invasive methods is the so-called liquid biopsy, based on the detection of circulating DNA and RNA from the blood of patients. This method is also suitable for choosing a therapy, monitoring its effectiveness, and observing the relapse of the disease. In this work, a methodical workflow was created for the monitoring of circulating nucleic acids for its further use in a cohort of patients with colorectal cancer.

Various commercial kits were used for the isolation of circulating nucleic acids from plasma of healthy controls, among which the best ones, in terms of quality and quantity, was chosen. The threshold for hemolysis detection by qPCR was also determined using samples from healthy donors. Everything was then applied to RNA samples extracted from plasma of cancer patients, from which a library of short RNA molecules was prepared for subsequent sequencing. After processing the results, the representation of miRNA molecules within short RNAs in plasma was determined including the identification of miRNAs with the highest expression and variability. In conclusion, the sensitivity of qPCR, dPCR, and next generation sequencing detection was evaluated using determination of hsa-miR-16 expression.

Key words

cancer, plasma, cel-free DNA, microRNA, digital PCR, next generation sequencing, optimization

[IN CZECH]

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Pavlu Součkovi, CSc. za vedení diplomové práce a poskytnuté rady. Dále také konzultantce Mgr. Veronice Bouškové, PhD. za její ochotu, trpělivost a znalosti, které mi byly předány při vypracování této práce. Rád bych také poděkoval Servisní laboratoři funkční genomiky a bioinformatiky (Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.) za provedení sekvenace vzorků. Velký dík patří i celému kolektivu laboratoře Toxikogenomiky (SZÚ) za poskytnutí přátelského prostředí a rad, kdykoli bylo potřeba. Závěrem bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1. Teoretický úvod	11
1.1 Kolorektální karcinom	11
1.1.1 Epidemiologie	12
1.1.2 Etiologie	13
1.1.3 Léčba	17
1.1.4 Biomarkery kolorektálního karcinomu	20
1.2 Volně cirkulující nukleové kyseliny v krvi	22
1.2.1 miRNA	23
1.2.2 DNA	24
1.2.3 Význam miRNA a cfDNA jako krevních biomarkerů u CRC	25
1.3 Metody analýz volně cirkulující miRNA a DNA v krvi	27
1.3.1 Metody izolace	27
1.3.2 Metody detekce a kvantifikace	27
2. Cíle práce	32
3. Materiál	33
3.1 Chemikálie	33
3.2 Přístroje a laboratorní vybavení	34
3.3 Softwarové prostředky	35
3.4 Pacienti a zdraví dobrovolníci	35
4. Metody	36
4.1 Separace plasmy/séra	36
4.2 Izolace RNA a DNA z plasmy/séra	36
4.2.1 Příprava exogenních miRNA a vzorků k izolaci	37
4.2.2 miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen)	38
4.2.3 miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen)	38
4.2.4 Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma Kit (Zymo Research)	39
4.2.5 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen)	40
4.3 Měření koncentrace RNA a DNA	41
4.3.1 Koncentrace miRNA	41
4.3.2 Koncentrace celkové RNA	42
4.3.3 Koncentrace DNA	42
4.3.4 Agilent High Sensitivity DNA Kit	44
4.4 Reverzní transkripce a RT PCR	44
4.4.1 Reverzní transkripce	44

4.4.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR)	45
4.5 Stanovení hemolýzy	46
4.5.1 Příprava vzorků	46
4.5.2 Měření absorbance.....	47
4.5.3 qPCR	47
4.6 Příprava knihovny	48
4.6.1 NEXTFLEX Small RNA-Seq Kit.....	48
4.6.2 QIAseq miRNA UDI Library Kit.....	52
4.6.3 Sekvence a bioinformatická analýza	55
4.7 Digitální PCR	56
5. Výsledky	58
5.1 Optimalizace izolace RNA	58
5.2 Optimalizace izolace DNA	60
5.3 Detekce hemolýzy.....	63
5.4 Optimalizace sekvenace krátkých RNA molekul.....	65
5.4.1 Kontrola kvality sekvenace krátkých RNA molekul	67
5.4.2 Kvantifikace miRNA.....	70
5.5 Optimalizace a stanovení miRNA exprese pomocí dPCR.....	74
5.6 Srovnání stanovení exprese hsa-miR-16 pomocí qPCR, dPCR a sekvenace krátkých RNA molekul.....	79
6. Diskuze	82
7. Závěr	86
Seznam citované literatury	87

Seznam použitých zkratek

% v/v	objemová procenta
APC	adenomatózní polypózní coli (z angl. adenomatous polyposis coli)
BRAF	serin/threonin-proteinová kinasa B-Raf
cDNA	komplementární DNA (z angl. complementary DNA)
CEA	karcinoembryonální antigen
cfDNA	volně cirkulující DNA (z angl. cell-free DNA)
CIMP	CpG methylátorový fenotyp (z angl. CpG island methylator phenotype)
CIN	chromosomová nestabilita (z angl. chromosome instability)
CPM	počet kopií na milion (z angl. counts per million)
CT	počítačová tomografie (z angl. computer tomography)
Ct	prahový cyklus (z angl. cycle threshold)
CRC	kolorektální karcinom (z angl. colorectal carcinoma)
ctDNA	volně cirkulující tumorová DNA (z angl. circulating tumour DNA)
DCC	netrinový receptor DCC (z angl. Deleted In Colorectal Carcinoma)
DDR	dráha aktivovaná poškozením DNA (z angl. DNA damage response)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ddPCR	kapková digitální PCR (z angl. droplet digital PCR)
dPCR	digitální PCR
dsDNA	dvouvláknová DNA (z angl. double-strand DNA)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (z angl. epidermal growth factor receptor)
FAP	familiární adenomatózní polypóza
FOBT	test okultního krvácení ve stolici (z angl. fecal occult blood test)

FOLFIRI	režim chemoterapie zahrnující leukovorin, 5-fluorouracil a irinotekan
FOLFOX	režim chemoterapie zahrnující leukovorin, 5-fluorouracil a oxaliplatinu
FU	5-fluorouracil
GIT	gastrointestinální trakt
HNPCC	dědičný nepolypózní kolorektální karcinom (z angl. hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma)
HS	vysoká citlivost (z angl. high sensitivity)
KRAS	Kirsten krysí sarkomový virový onkogen
LOH	ztráta heterozygoty (z angl. loss of heterozygosity)
LV	leukovorin
MAP	MUTYH-spjatá polypóza
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinová kinasa
mCRC	metastatický CRC
miRNA	mikroRNA
MLH1	MutL homolog 1
MMR	mismatch repair geny
mRNA	messenger RNA
MSH2	MutS homolog 2
MSH6	MutS homolog 6
MSI	mikrosatelitová nestabilita (z angl. microsatellite instability)
MSI-H	MSI-high
MUTYH	MutY DNA glykosylasa
NGS	sekvenování nové generace (z angl. next-generation sequencing)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PET	pozitronová emisní tomografie

PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
piRNA	piwi-interagující RNA
PMS1	postmeioticky zvýšená segregace homolog 1 (z angl. postmeiotic segregation increased 1)
PMS2	postmeoiticky zvýšená segregace homolog 2 (z angl. postmeiotic segregation increased 2)
qPCR	kvantitativní PCR (z angl. quantitative real-time PCR)
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální RNA
ssDNA	jednovláknová DNA (z angl. single-strand DNA)
TE pufr	Tris/EDTA pufr
TGF- β	transformující růstový faktor beta (z angl. transforming growth factor beta)
TNM	klasifikační systém tumorů (z angl. tumour, node and metastasis)
TP53	tumorový protein 53
tRNA	transferová RNA
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (z angl. vascular endothelial growth factor)
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky
Wnt	bezkrídlý/integrovaný (z angl. Wingless/Integration)

1. Teoretický úvod

Nádorová onemocnění představují významný celosvětový socioekonomický problém. Každoročně onemocní téměř 20 miliónů obyvatel světa a zhruba 10 miliónů pacientů na onkologická onemocnění zemře [1]. Náklady na diagnostiku, léčbu a sledování zdravotního stavu pacientů jsou astronomické a sekundární náklady vznikající pracovní neschopností a úbytkem práceschopného obyvatelstva jsou též nezanedbatelné. Velké obavy vzbuzuje predikce velkého nárůstu incidence nádorů v zemích se střední a nízkým indexem rozvoje, kde žije značná část obyvatel planety [2] a rovněž i predikce incidence těžko léčitelných nádorů jako jsou karcinomy slinivky břišní, žaludku a jater [3]. Jakýkoliv pokrok v prevenci malignit by mohl zdravotním systémům i celosvětové ekonomice výrazně ulevit. V zásadě jsou tři cesty jak omezit neustále vzrůstající incidenci a snížit stále vysokou mortalitu nádorových onemocnění. V rámci primární prevence je třeba odhalovat jedince a populace se zvýšeným rizikem vzniku, uplatnit u nich preventivní opatření, např. úpravy životního stylu, aby k onemocnění, pokud možno, vůbec nedošlo. Sekundární prevence, ve formě screeningu diagnostických opatření by pak měla umožnit zjištění probíhajícího onemocnění v raném stádiu, kdy je většina nádorů ještě léčitelných. V neposlední řadě pak terciární prevence vede k vylepšení léčebných možností směrem k přijatelnějším výsledkům léčby a nižšímu riziku vzniku a snížení závažnosti nežádoucích vedlejších účinků, které každá léčba zákonitě přináší. V takzvané precisi onkologii došlo v poslední době k rozmachu velmi citlivých a robustních metod umožňujících detekci genových mutací, epigenetických změn nebo změn v expresních profilech, které mají prognostický nebo dokonce prediktivní charakter s dopadem na individualizovanou terapii podle genotypu a fenotypu nádoru a jeho mikroprostředí. Jedním z moderních přístupů je sledování podpisu nádoru v cirkulaci pacientů, tzn. kapalná biopsie [4]. Tento přístup je vhodný nejen k diagnostice, ale i k individualizaci terapie, ke sledování její účinnosti a k monitorování návratu onemocnění (tzv. molekulární relaps). Tato práce si vytyčila za hlavní cíl vypracovat metodický postup ke sledování cirkulující RNA i DNA k jejímu dalšímu použití, pro výše zmíněné účely, u kohorty pacientů s kolorektálním karcinomem.

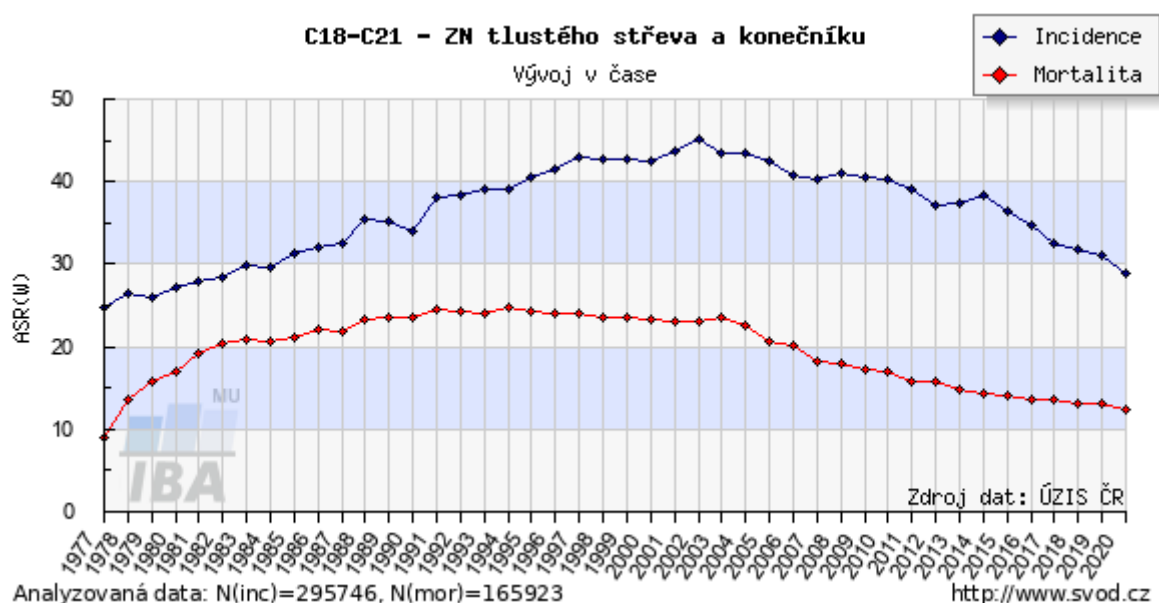
1.1 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (CRC z angl. colorectal carcinoma) je nádorové onemocnění, které vzniká postupnou transformací benigního adenomu (polyp), na vnitřní straně sliznice tlustého střeva nebo konečníku, v maligní adenokarcinom. Tato karcinogeneze trvá mnohdy několik

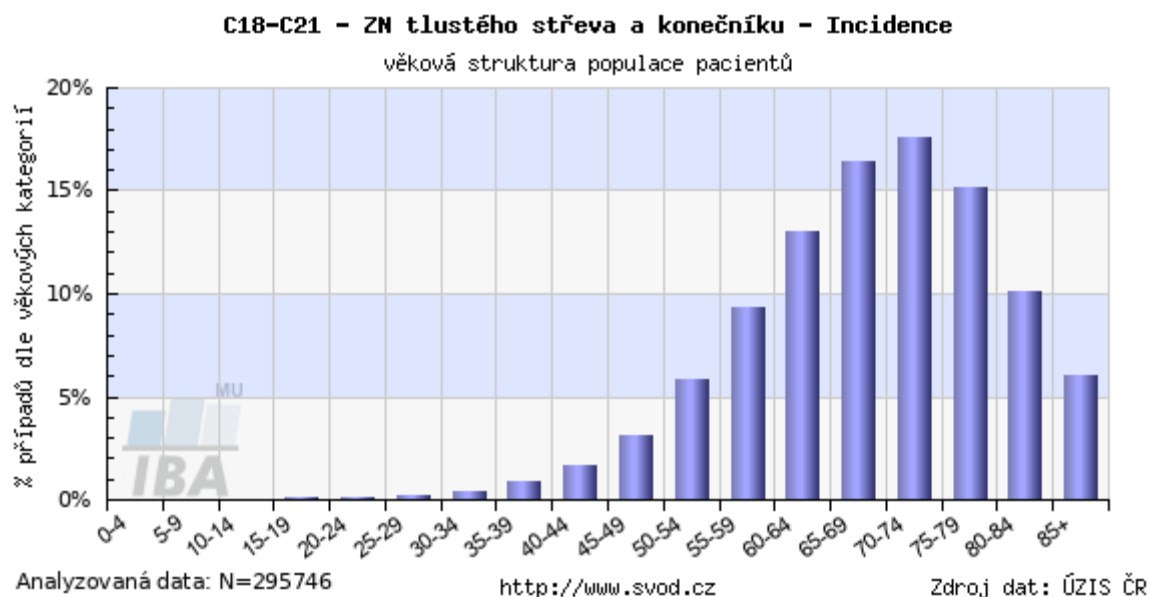
dekád, a pokud není diagnostikována včas, dále pokračuje invazí nádorových buněk do okolních struktur, včetně lymfatických cév, kterými se šíří dál. Může dojít až k tvorbě vzdálených metastáz [5]. Nejčastější maligní formou je adenokarcinom následovaný karcinoidním tumorem, gastrointestinálním stromálním tumorem, lymfomem a sarkomem [6].

1.1.1 Epidemiologie

CRC je jedním z nejčastějších typů nádorového onemocnění na světě. Klinická diagnóza je značena C18-C21. Incidence se pohybuje v rozmezí jednoho až dvou milionů nových případů ročně a jedná se o třetí nejčastější nádor a druhou nejčastější příčinu smrti spjaté s maligním onemocněním na světě [7, 8]. U mužů je CRC třetím nejčastějším nádorem (1 065 960 nových případů ročně ve světě k r. 2020), přičemž na prvních dvou místech jsou nádory plic a prostaty. U žen je toto onemocnění na druhém místě (865 630 nových případů ročně k r. 2020) předchází mu jen karcinom prsu. Nejvyšší incidence na světě je v Austrálii s Novým Zélandem (36,7 případů na 100 000 obyvatel) následovanými Evropou (28,8-32,1 případů na 100 000 obyvatel), východní Asií (26,5) a severní Amerikou (26,2), zatímco nejnižší je v Africe (6,4-9,2) a jihocentrální Asii (4,9). Celosvětové riziko vzniku CRC je 2,27 % (2,75 % u mužů a 1,83 % u žen) pro věk 0-74. Riziko se zvyšuje s věkem a je častější u osob starších 50 let. Věkový medián diagnózy je 72 let u žen a 68 let u mužů. V České republice tomu je velmi podobně jako ve světě (viz *Obr. 1 a 2*, str. 13) [6, 8]. Od roku 1990 do roku 2012 ve světě vzrostla incidence o více než 200 000 nových případů ročně [7].



Obrázek 1 – Dlouhodobý vývoj incidence a mortality CRC v ČR. Převzato z ÚZIS.



Obrázek 2 – Věková struktura populace pacientů s CRC v ČR. Převzato z ÚZIS.

1.1.2 Etiologie

Ke vzniku nádorových onemocnění mohou vést mutace ve specifických genech. Tyto mutace se mohou objevit v onkogenech, tumor supresorových genech a genech souvisejících s mechanismy DNA opravy. Podle původu mutace se CRC může dělit na sporadický, dědičný a familiární. Bodové mutace, které vznikají sporadicky v průběhu života, tj. somatické mutace nejsou spjaty s dědičnými onemocněními a zasahují pouze individuální buňky. Nádory odvozené z bodových somatických mutací se proto nazývají sporadické a patří mezi ně přibližně 70 % všech CRC. První mutace se obvykle objevuje v tumor supresorovém genu *APC* (adenomatous polyposis coli), který se podílí na vzniku benigní formy adenomů nazývaných se polypy. K mutacím dále dochází v genech *KRAS*, *TP53* a *DCC* [7]. Dědičné nádory zaujímají pouze 5 % z celkového počtu případů CRC. Tato onemocnění jsou způsobena zděděnými mutacemi jedné z alel (kopií) genu, obvykle tumor supresorového. Bodová mutace nebo epigenetická inaktivace druhé alely pak přispívá ke vzniku nádorové buňky a následně i samotného karcinomu. Dědičné případy se dělí na dvě skupiny a to polypózní a nepolypózní formy. Polypózní formy z větší části zahrnují familiární adenomatózní polypózu (FAP), která je typická vznikem několika potenciálně maligních polypů ve střevě. Naopak dědičný nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) je spojen s mutacemi v genech opravy DNA. Hlavním důvodem vzniku HNPCC je Lynchův syndrom, který je způsobený zděděnými mutacemi v jedné z alel kódujících proteiny pro DNA opravu jako je například *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* a *PMS2*. Lynchův syndrom může být objeven u 2-3 % pacientů z celkového

počtu případů, což činí tento syndrom nejčastějším u HNPCC. Familiární kolorektální karcinom zaujímá až 25 % všech případů a je také způsobena zděděnými mutacemi [7].

Familiární adenomatózní polypóza (FAP)

Jedná se o onemocnění, při kterém vznikají stovky až tisíce adenomů ve střevě a rektu. Incidence při narození je okolo 1/8300, projevuje se stejně u žen i mužů a tvoří přibližně 1 % případů CRC [9]. Většina pacientů je asymptomatická i několik let dokud nejsou adenomy dost velké a početné a způsobí krvácení z rektu či anémii. Pokud nedojde k včasné diagnóze a léčbě, je zde až 100% riziko vzniku CRC do 40 let a výskytu maligního nádoru střev po 10 letech od vzniku polypů. FAP je dědičné autosomálně dominantní onemocnění způsobené mutací *APC* genu [10]. Bylo popsáno více než 800 různých mutací *APC* genu spojených s FAP a většina z nich zahrnuje posunové mutace [11]. U zdravého jedince tumor supresorový protein APC reguluje degradaci beta-kateninu ve Wnt signalizaci. Beta-katenin je transkripční faktor proliferčních genů. Jeho akumulaci je zabráněno produkty *APC* genu a při jeho mutaci tato regulace nefunguje. Pro rozvoj nádoru musí dojít k dalším mutacím [10].

MUTYH-spjatá polypóza (MAP)

Mutace genu *MUTYH* způsobuje recesivně dědičnou formu polypózy, která se projevuje zvýšeným rizikem vzniku CRC a polypů v GIT. Diagnostika se provádí na základě rodinné anamnézy, klinických nálezů a endoskopie/kolonoskopie [9].

Dědičný nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC)

Prevalence se pohybuje okolo 1-5 % případů CRC. U většiny pacientů s HNPCC byla zaznamenána mikrosatelitová nestabilita (MSI), což vedlo k objevu, že je toto onemocnění způsobeno defektem DNA mismatch repair genů (MMR). Bylo nalezeno 5 HNPCC genů: *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6*, *hPMS1* a *hPMS2* [12].

Rizikové faktory a prevence

Ve světě se celoživotní pravděpodobnost vzniku CRC pohybuje mezi 4-5 %. Hlavním rizikovým faktorem je věk, přičemž riziko rozvoje CRC je větší po dovršení 50 let a diagnóza před tímto milníkem se považuje za vzácný případ (na rozdíl od dědičných forem). Mezi další neovlivnitelné faktory patří rodinná anamnéza či zánětlivé onemocnění jako je například Crohnova choroba, kdy má postižený 2,5% vyšší riziko vzniku na vývoj CRC. Toto riziko lze redukovat změnou životního stylu a to jak co se týče stravování, tak fyzických aktivit. Například červené maso uvolňuje ve střevě hemové skupiny, které zde podporují tvorbu karcinogenních

N-nitroso sloučenin a stejně tak cytotoxických a genotoxických aldehydů vznikajících při lipoperoxidaci. Příprava masa při vysokých teplotách produkuje potenciální karcinogeny, např. heterocyklické aminy a polycyklické uhlovodíky. Alkohol a kouření také zvyšují riziko vzniku CRC. Hlavní metabolit alkoholu je acetaldehyd, u kterého bylo prokázáno, že zvyšuje riziko vzniku CRC u lidí s polymorfismem enzymů účastnících se odbourávání alkoholu [7]. Alkohol je navíc metabolizován na acetaldehyd i mikrobiálně, což vede k degradaci folátu *in vivo* [5]. Folát je potřebný pro syntézu a opravu DNA, takže jeho nedostatek může vést k chromosomálním zlomům a dalším nedostatkům prekursoru DNA, což může přispět ke karcinogenezi [5]. Kouření zvyšuje toto riziko až o 10,8 %, neboť cigareta obsahuje mnoho karcinogenů, mezi které patří také nikotin, jehož metabolity mohou ve střevě způsobit tvorbu polypů [7]. Při srovnání bývalých kuřáků s těmi současnými bylo zjištěno, že ukončení kouření je spojeno s delším celkovým přežitím a to o 10 a více let od ukončení [13]. Rizikovým faktorem je také vysoká hladina insulinu v krvi a gastrointestinální zánět. Hyperinsulinémie zvyšuje riziko promoci proliferace střevních buněk a redukci apoptózy [5].

Na druhou stranou existují faktory, které toto riziko snižují. Jednou z možností může být zavedení ryb a rybího oleje do jídelníčku, jelikož potlačují promoci střevních nádorů, čímž snižují jejich incidenci. Dalšími zaznamenanými faktory jsou zvýšený příjem vitamínu D a vápníku [5].

Screening

Screening CRC zahrnuje analýzu polypů před rozvojem nebo v brzkých stádiích tvorby nádoru než se začnou projevovat symptomy nebo než se začne nemoc šířit. Pro muže a ženy ve věku 50-75 je doporučeno podstoupit test okultního krvácení ve stolici, sigmoidoskopii nebo kolonoskopii. Při testu okultního krvácení ve stolici se detekuje krev pomocí protilátky nebo enzymaticky [5, 14]. Enzymová detekce je založena na aktivitě hemoglobinu podobné peroxidasam, nicméně může dojít k falešně pozitivním výsledkům, což bývá způsobeno požitím některých potravin či jiným krvácením v GIT [14]. U kolonoskopie doktor zavede úzkou hadici do rekta pacienta a kontroluje, případně odebírá, polypy nebo jakékoli známky potenciální karcinogeneze. Pacientům je doporučeno podstoupit toto vyšetření jednou za 10 let. FOBT je levnější a méně citlivější metoda v porovnání s kolonoskopií a při pozitivním výsledku jsou pacienti odesláni k dalšímu vyšetření, nejčastěji právě kolonoskopii [5, 15].

Molekulární dráhy CRC

Genomická nestabilita je důležitým prvkem stojícím za CRC. Patogenní mechanismy vedoucí k jejímu vzniku jsou chromosomová nestabilita (CIN), mikrosatelitová nestabilita (MSI) a CpG methylátorový fenotyp (CIMP). CIN dráha je považována za hlavní, jelikož je nalézána u 80-85 % případů CRC. CIN je způsobena změnou počtu chromosomů vedoucí k aneuploidii buněk a ke ztrátě heterozygoty (LOH). Mechanismus tohoto děje zahrnuje změny v segregaci chromosomů, dysfunkci telomer a odpověď na poškození DNA (DDR), což zvyšuje pravděpodobnost vzniku mutací v genech zasahujících do udržení správné funkce buněk jako *APC*, *KRAS*, *PI3K* a *TP53*. *APC* mutace způsobují translokaci beta-kateninu do jádra a řídí transkripci genů účastnících se tumorigeneze a invaze, zatímco *KRAS* a *PI3K* mutace vedou k aktivaci MAPK a tudíž zvýšení buněčné proliferace. Mutace v *TP53* způsobuje nekontrolovatelný vstup buněk do buněčného cyklu [7].

MSI je typ nestability, který se projeví při mutaci nukleotidových repetitivních sekvencí v genomu [14]. Tyto sekvence se nazývají mikrosatelity a jsou složeny z 1-6 bazí. Schopnost opravy krátkých úseků DNA či repetitivních úseků je u nádorů díky tomu snížena a mutace mají sklon se v těchto úsecích hromadit. Tyto mutace mohou ovlivnit jak nekódující oblasti, tak ty kódující mikrosatelity. Ztráta exprese MMR může být zapříčiněna spontánními událostmi (hypermethylace promotoru) nebo germinálními mutacemi, jež byly nalezeny u Lynchova syndromu. Tyto nádory jsou převážně diploidní a mají méně LOH. Geny mutované v tumorech s MSI zahrnují právě geny MMR - *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* a *PMS2*. MSI-H (MSI-high) tumory mají lepší prognózu než ostatní sporadické tumory [7].

Epigenetická nestabilita je zodpovědná za CIMP, která je způsobena hypermethylací promotorů genů, což vede k umlčení jejich exprese [7].

I přesto, že mutace jsou nejčastějšími genetickými alteracemi, mohou být nalezeny i některé chromosomální změny (delece ramének např. 1p či 18q) a translokace (např. NAV2-TCF7L1) [7, 16]. Všechny tyto aberace mohou ovlivnit důležité signalizace a buněčné funkce, při jejichž mutaci může dojít ke vzniku maligní tkáně např. Wnt signalizace, TGF- β signalizace či p53 [7, 14].

Wnt signalizace hraje důležitou roli při diferenciaci kmenových buněk a buněčném růstu. Z toho důvodu změny v této signalizaci mohou vést ke vzniku nádoru. Změny jsou spojené i s oslabením úzkých spojení (tight junctions), což způsobuje sníženou buněčnou adhezi a tudíž upřednostňuje migraci a metastázování. Hlavní aberací spjatou s Wnt signalizací u CRC je *APC* mutace. Jedná se o nejčastěji mutovaný gen u CRC, avšak nejedná se

o spolehlivý prognostický marker CRC. β -katenin, který se také účastní Wnt signalizace rovněž není obecně užitečný, jelikož jeho exprese je u CRC obvykle zvýšená. Na druhou stranu zvýšená exprese c-MYC, který je aktivován Wnt signalizací, je považována za marker metastazování a za pozitivní prognostický faktor zvyšující šanci na dlouhodobé přežití [7].

MAPK a PI3K signalizace se účastní buněčné proliferace a přežití buňky. Změny u těchto signalizací stojí za zvýšenou proliferací nádorových buněk. *KRAS*, *BRAF* a *PIK3CA* mutace jsou dalšími často se vyskytujícími událostmi u CRC a jednotlivé mutace mohou mít pro prognózu i léčbu odlišný význam. Mutace *KRAS* se typicky vyskytují v kodonu 13 exonu 2 a v kodonu 12 exonu 2, jehož mutace jsou spojeny s pokročilým stadiem a metastázami. *BRAF* mutace jsou také spojeny se špatnou prognózou a s vyšším rizikem úmrtí, zejména u tumorů s MSI-H. Nejčastější mutací je *BRAF* V600E, která představuje slibný cíl personalizované medicíny, kdy kombinace inhibitorů *BRAF* V600E, např. vemurafenibu s dalšími inhibitory MAPK/PI3K signalizace, např. kobimetinibem se ukázala jako účinnější než použití pouze jednoho z inhibitorů [7].

TGF- β signalizace se účastní buněčných procesů jako růst, diferenciace či apoptóza. Sporadické mutace v TGF- β a její signalizaci nejsou u CRC běžné, a proto nejsou důležité jako prognostický marker. Nicméně chromosomální změny zahrnující TGF- β jsou spjaté s CIN. Ztráta 18q je jednou z hlavních genomových aberací spojených s TGF- β signalizací u CRC. Chromosom 18q kóduje dva důležité tumor supresorové geny známé jako *SMAD2* a *SMAD4*, jejichž ztráta umožňuje nádorové buňce vyhnout se apoptóze a přispívá k deregulaci buněčného cyklu [7].

TP53 je jedním z nejdůležitějších tumor supresorových genů a hlavním kontrolním bodem buněčného cyklu, tudíž jeho ztráta souvisí s nádorovou progresí, protože umožňuje nadměrnou proliferaci [7]. p53 je transkripční faktor, který je kódován genem *TP53* a aktivován např. poškozením DNA, hypoxií nebo některými onkogeny. Regulace p53 zahrnuje různé modifikace včetně fosforylace, methylace a acetylace [7, 14].

Bylo zjištěno, že mutační zátěž u nádorů (TMB), která je definována jako celkový počet somatických chyb v kódování nebo substitucí bází nalezených na milion bází DNA, by mohla hrát důležitou roli při odhadu prognózy jednotlivých pacientů. Z některých studií vyplývá, že vyšší TMB (TMB-high) koreluje s lepší prognózou, avšak další studie souvislost mezi prognózou a TMB nepotvrdily [17].

1.1.3 Léčba

Strategie léčby se odvíjí od vlastností nádoru (velikost, poloha, přítomnost metastáz) a faktorů spjatých s anamnézou pacienta (prognóza, komorbidita a celkový zdravotní stav). V současné

době je používán komplexní onkochirurgický přístup zahrnující, u některých nádorů, i radioterapii. Pokud jsou u jediného polypu nalezeny patologické projevy karcinogeneze (adenokarcinom), je obvykle doporučeno částečné nebo úplné odstranění střeva bez následné onkologické léčby [7].

Podezření na metastázy by mělo být vždy potvrzeno adekvátním radiologickým zobrazením (počítačová tomografie (CT), magnetická rezonance (MRI)). Možností je také využití spojení fluorodeoxyglukosy s pozitronovou emisní tomografií (PET) nebo i kombinaci PET-CT. Vždy je potřeba provést histologii primárního tumoru nebo metastázy před nasazením chemoterapie [18]. Optimální strategie pro léčbu CRC by měla zahrnovat staging, rozbor krve, otestování funkce jater a ledvin, karcinoembryonální antigen (CEA) a zobrazovací metody. Mezi známé laboratorní prognostické faktory patří počet bílých krvinek, hladina alkalické fosfatasy, LDH, sérový bilirubin a albumin [18].

Mnoho výzkumů se zaměřuje na vývoj terapie, která má vyšší účinnost a menší vedlejší účinky. Mezi ty stojící za zmínku patří využití agarosových makrokuliček, protizánětlivých léčiv a léčiv založených na zlatu [7].

U pacientů v brzkých stádiích (první a druhé stadium bez rizikových faktorů) se volí chirurgický zákrok, kdy není doporučena následná doplňková léčba [18, 19]. Terapie používané při léčbě se rozlišují na neoadjuvantní, adjuvantní a paliativní. Neoadjuvantní terapie, obvykle konkomitantní chemoradioterapie, je typicky používána na karcinom rekta II-IV stádia a hlavním cílem je minimalizace lokální recidivy, případně zvýšení resekability. Adjuvantní chemoterapie slouží jako doplňková léčba primární terapie (chirurgický zákrok) k maximalizaci její účinnosti, kdy může pomoci minimalizovat recidivu nádoru a prodloužit přežití, a je prováděna u pacientů s karcinomem střeva ve třetím stádiu a u pacientů ve druhém stádiu s rizikovými faktory, přičemž u karcinomu rekta II nebo III stádia se nedoporučuje. Délka chemoterapie se mění v závislosti na případě a nabízí se tři možnosti: léčba trvající 3-6 měsíců, indukční léčba následovaná udržující léčbou nebo léčba trvající do projevu toxicity nebo progresu [20, 21]. Většina pacientů s metastatickým CRC (mCRC) není vhodnými kandidáty pro resekci. U těch bez možnosti resekce se volí léčba paliativní a jejím cílem je ulehčení od symptomů, snížení agresivity a šíření onemocnění [7, 18]. Hlavním cílem u takovýchto pacientů je zvýšit resekabilitu zavedením kombinované chemoterapie [18].

Radioterapie

Radioterapie je široce používána u pacientů s pokročilým karcinomem rekta a využívá rentgenové paprsky k usmrcení buněk. K biologickému působení radioterapie dochází přímým

nebo nepřímým poškozením. V případě přímého působení poškozuje ozáření různé biomolekuly, jako jsou proteiny, lipidy a hlavně DNA. Poškození mohou způsobovat i reaktivní formy kyslíku (ROS), jež představují sekundární účinky ozáření. Přestože je radioterapie klíčovou složkou léčby buď samostatně, nebo v kombinaci s chirurgickým zákrokem nebo chemoterapií, radiorezistence je hlavní příčinou terapeutického selhání [5, 22].

Chemoterapie

Základním prvkem chemoterapie je 5-fluorouracil (i. v. FU) v různých dávkách a kombinacích s ostatními cytostatiky nebo cílenou léčbou [18]. Po vstupu do buňky se přemění na svůj aktivní metabolit, 5-fluor-2-deoxyuridinmonofosfát (FdUMP), jehož primárním mechanismem účinku je inhibice thymidylátsyntasy (TS) tvorbou ternárního komplexu. To blokuje de novo syntézu thymidinu, základní složky pro syntézu DNA, a iniciuje poškození DNA [23]. Aktivita FU byla zvýšena přidáním biochemického modulátoru leukovorinu (kyselina listová, LV), který zvyšuje účinek a toxicitu FU zvýšením afinity léčiva k TS. Při testování bylo zjištěno, že kombinace těchto dvou látek měla dvakrát vyšší odpověď než při podání samotného FU [24]. Chemoterapeutická činidla jsou klasifikována dle jejich mechanismu účinku. Nejčastěji používanými chemoterapeutiky jsou deriváty platiny (oxaliplatin), antimetabolity (kapecitabin, FU) a inhibitory topoizomerázy (irinotekan). Chemoterapie první linie u pokročilého CRC je založena na FU s LV, samostatně nebo v kombinaci s oxaliplatinou, případně s irinotekánem [21]. Irinotekan je inhibitor topoisomerasy I a na základě získaných dat, kdy jeho využití vedlo k delšímu přežití než při využití FU/LV, byl využit u pacientů, u kterých léčba FU/LV selhala. Oxaliplatin je derivát cisplatin, který inhibuje růst kolorektální nádorové buněčné linie rezistentní na cisplatinu a karboplatinu. Je využívána v kombinaci s FU/LV v režimu FOLFOX. Kombinace FU/LV s irinotekánem představuje režim FOLFIRI. Kapecitabin je orálně podávaný fluoropyrimidinový karbamát původně navržený pro lepší přenos FU hlavně do nádorových buněk a jedná se o proléčivo, které je přeměňováno na svůj jediný aktivní metabolit, FU, thymidinfosforylasou [24, 25]. Chemoterapeutika ovlivňují nejen nádorové buňky, jelikož ničí rychle se dělící buňky, mezi které patří i buňky vlasového folikulu, sliznice dutiny ústní a trávicího traktu, erytrocyty a leukocyty [20].

Cílená léčba

Cílená terapie využívá léčiva nebo jiné metody, které atakují pouze nádorové buňky, aniž by došlo k poškození okolní tkáně [5]. Byl zaznamenán výsledek s dobrou účinností při kombinaci

tradiční chemoterapie s cílenou terapií monoklonálními protilátkami nebo inhibitory proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (anti-VEGF) a receptoru epidermálního růstového faktoru (anti-EGFR). Nejvyužívanější anti-VEGF strategií je monoklonální protilátka bevacizumab, která cílí na cirkulující VEGF-A a rekombinantní fúzní protein aflibercept, který blokuje VEGF-A, VEGF-B a placentární růstový faktor [24]. Tato strategie je využívána u pacientů s RAS mutacemi [26]. Bylo prokázáno, že prodlužuje přežití v kombinaci s FU/LV, FOLFIRI nebo samotným kapecitabinem. VEGF je specifický mitogen endoteliální buňky a jeden z proangiogenních faktorů. Inhibuje apoptózu a má významnou roli při mobilizaci prekursorů endoteliálních buněk do míst angiogeneze. Jeho vysoká hladina byla nalezena u většiny lidských nádorů, včetně CRC, kdežto u zdravých jedinců je jeho hladina nízká [24].

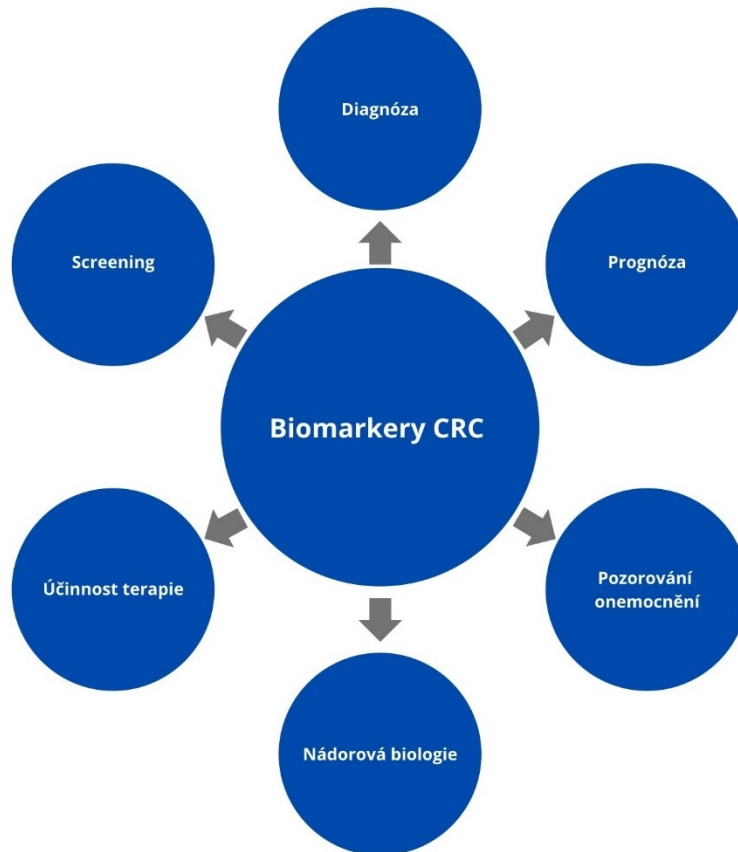
Cetuximab

Důležitou roli při nádorovém růstu a progresi různých nádorů, včetně CRC, zaujímá HER-1/EGFR signalizace. HER-1/EGFR patří do rodiny HER receptorů, což jsou glykoproteiny složené z extracelulární ligand-vazebné domény, intracelulární tyrosin-kinasové domény a transmembránového segmentu. Vazba ligandu na extracelulární doménu způsobí aktivaci tyrosinkinásové aktivity, což vede k proliferaci nádorových buněk, migraci, adhezi, angiogenezi a inhibici apoptózy. Nízká exprese těchto receptorů je spjata s progresí onemocnění, špatnou prognózou a sníženou citlivostí k chemoterapii. Strategii anti-EGFR lze použít pouze v nepřítomnosti *RAS* mutací buď samostatně, nebo v kombinaci s cytotoxickými molekulami. Mezi nejdůležitější anti-EGFR látky patří monoklonální protilátky cetuximab či panitumumab. Tyto kombinace představují jednu z možností pro pacienty s mCRC. Cetuximab se váže na extracelulární doménu EGFR a tím blokuje přenos signálu (cytostatická aktivita) [24, 27]. Mezi další využívané látky patří nilotinib a erlotinib, které působí jako tyrosinkinásové inhibitory a blokují intracelulární kinasovou doménu EGFR [28].

1.1.4 Biomarkery kolorektálního karcinomu

Biomarker je molekula, kterou lze využít k diagnostice onemocnění, pro stanovení prognózy neboli rizika progresse onemocnění případně časného úmrtí nebo k predikci účinků léčby (viz *Obr. 3*, str. 21). Ideální biomarker by měl mít vysokou citlivost, specifitu a měl by být snadno měřitelný. Jak už bylo dříve zmíněno, mezi hlavní molekulární změny u CRC patří MSI, CIN, CIMP a genové mutace. Tyto změny produkují modifikovanou DNA, RNA, proteiny nebo metabolity, které lze měřit v nádorové tkáni, krvi či stolici a mohou být tedy využity jako

biomarkery. Mezi nejvyužívanější biomarkery u CRC patří stanovení MSI a *KRAS* mutací v nádorových vzorcích. Některé onkomarkery užívané pro určení diagnózy vykazují vysokou specifitu ale nízkou citlivost, což je důvod, proč vědci hledají vhodnější molekuly pro časnou diagnózu. V tomto ohledu stojí za zmínku testy využívající kity k vyhodnocení CIMP a genové či mikroRNA exprese, které lze použít i v krvi a stolici [7].



Obrázek 3 – Schematické znázornění využití biomarkerů CRC. Převzato z [29].

Biomarkery se dělí na prognostické a prediktivní. Prognostický biomarker poskytuje informaci o pravděpodobném průběhu onemocnění v době diagnózy. Naopak prediktivní biomarker poskytuje informaci o předpokládané odpovědi na konkrétní léčbu a umožňuje tak vyhodnotit její účinnost a zvážit její indikaci [30].

Stádium představuje nejdůležitější prognostický faktor. Využívá se TNM klasifikační systém, který je založen na popisu míry invaze ve střešní stěně, rozšíření do mizních uzlin a přítomnost vzdálených metastáz. Míru invaze představuje písmeno T a nabývá hodnot 0-4. Zasažení mizních uzlin popisuje písmeno N nabývající hodnot 0-2 a přítomnost metastází představuje písmeno M nabývající hodnot 0 nebo 1 [31].

APC mutace jsou spojeny se vznikem a progresí CRC a jednalo by se o dobrého kandidáta na diagnostický nebo prognostický biomarker. Nicméně mutace byly nalezeny v celé kódující oblasti genu, čímž jej jako biomarker činí technicky hůře využitelným [14]. Mutace p53 jsou spojeny s pozdními změnami, pročež nejsou vhodným kandidátem. Jako onkomarker je využíván CEA, což je glykoprotein o velké molekulové hmotnosti. Jeho vysoká hladina je spojena ale i s jinými nemocemi, jako je hepatitida a nemá tak dostatečnou specifitu pro screening. Hlavní využití má pro pooperační sledování recidivy u asymptomatických pacientů [14].

DNA Mismatch Repair geny (MMR)

MMR geny jsou zapojeny do opravy chybně vložených basí v DNA. Inaktivace MMR genů byly zaznamenány u HNPCC i sporadických CRC. Tumory s defektem MMR (dMMR) mohou být identifikovány testováním mikrosatelitové nestability pomocí sekvenace nebo imunohistochemicky detekovatelné ztráty exprese proteinů účastnících se těchto oprav [32]. Jedná se o prediktivní biomarker, který lze využít při volbě terapie karcinomu střeva, např. k nasazení tzv. immune checkpoint inhibitorů [33, 34]. Nicméně, mechanismus, proč tomu tak je, není stále jasný [33].

KRAS

KRAS patří do rodiny *RAS* onkogenů spolu s geny *HRAS* a *NRAS*. Mutované onkogeny mají schopnost přeměnit buňku v nádorovou, přičemž nejčastějším mutovaným onkogenem *RAS* rodiny u CRC je *KRAS*. Bodové mutace jsou nejčastější na kodonech 12,13 (exon 2), 61 (exon 3) a 146 (exon 4). Mutace *KRAS* vedou k aktivaci GTP vazebného proteinu, který přenáší signál na *BRAF* a ten ovlivňuje MAPK signalizační kaskádu [34].

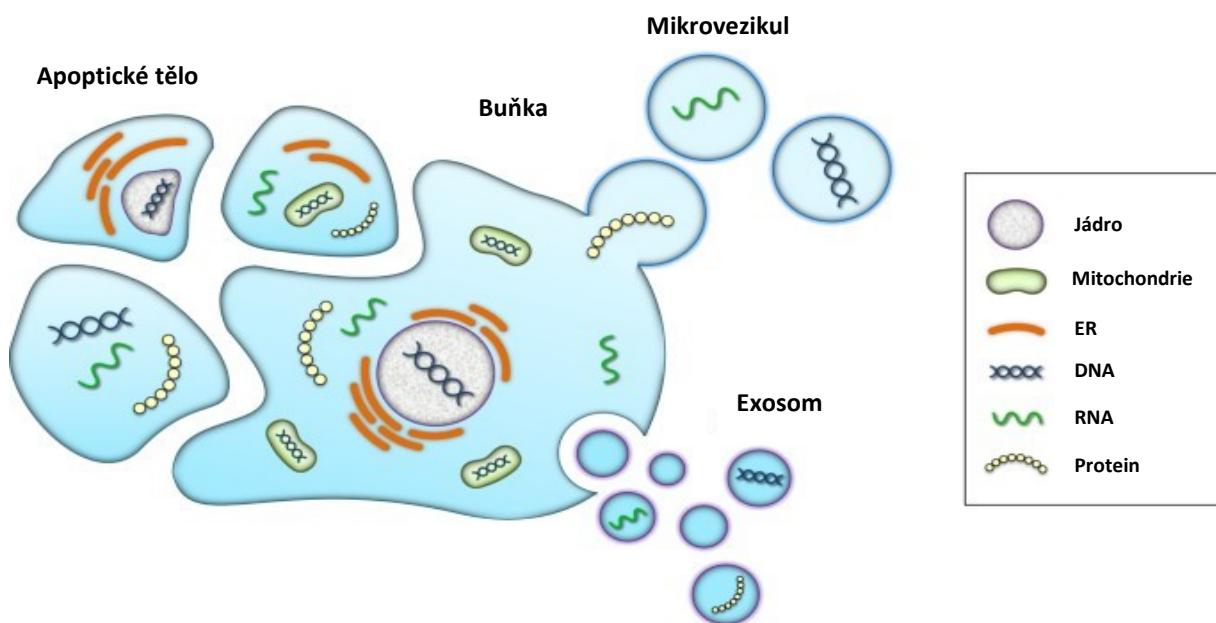
Hodnota *KRAS* byla intenzivně zkoumána u terapie zaměřené na EGFR. Je předpokládáno, že ligand navázaný na EGFR aktivuje kaskádu Ras-Raf-MEK (MAPK). Bylo zjištěno, že pacienti s metastatickým CRC, kteří nesou mutace *KRAS* v kodonech 61 a 146, vykazují rezistenci k léčbě anti-EGFR [32]. *KRAS* je v klinické praxi využíván jako prediktivní biomarker, avšak jeho prognostická hodnota není stále jasně popsána [7, 32].

1.2 Volně cirkulující nukleové kyseliny v krvi

Důležitost volně cirkulujících nukleových kyselin byla rozpoznána v roce 1994, kdy byla nalezena přítomnost mutovaných onkogenních genů v plasmě pacientů s rakovinou pankreatu. V dalších letech bylo provedeno několik dalších výzkumů, při kterých byla zaznamenána

vysoká frakční koncentrace tumorové DNA v plasmě pacientů s rakovinou různého původu [35].

Volně cirkulující nukleové kyseliny zahrnují několik typů DNA (genomová, mitochondriální, virová) a RNA molekul (mRNA, miRNA), jež jsou přítomny v extracelulárních tekutinách. Do tekutin jsou uvolňovány smrtí buňky jako je nekróza a apoptóza nebo buněčnou sekrecí a to nejen nádorovými buňkami, ale také buňkami v mikroprostředí nádoru či endoteliálními buňkami a lymfocyty [36]. V tělních tekutinách se vyskytují ve třech formách: volné, vázané na proteiny (nukleosomy) nebo vázané na extracelulární vezikuly (exosomy) [36]. Volné DNA/RNA fragmenty jsou sekvence, které nejsou vázány na nic, což vede k jejich štěpením DNAsami/RNAsami přítomným v cirkulaci. Tomu lze zabránit zabalením nukleových kyselin do extracelulárních membránových vezikul nebo vazbou na proteiny (nukleosom). Podle velikosti vezikulu se rozlišují mikrovezikuly (50-3000 nm), exosomy (40-100 nm) a apoptická těla (800-5000 nm) (viz *Obrázek 4*). Vezikuly mohou být uvolňovány jak zdravou buňkou, tak nádorovou [37].



Obrázek 4 – Tvorba extracelulárních membránových vezikul. Převzato z [37].

1.2.1 miRNA

MikroRNA (miRNA) jsou malé molekuly složené z 18-23 nukleotidů, které zasahují do postranskripční genové regulace. V lidském genomu bylo identifikováno více jak 2500 miRNA (miRBase v22.1), které se účastní regulačních mechanismů řady biologických procesů včetně vývoje, buněčného cyklu a apoptózy. Hlavním úkolem miRNA je regulovat translaci proteinů vazbou na komplementární sekvence cílové messenger RNA [38]. Jedna molekula miRNA

může cílit na více mRNA a zároveň může mít jedna molekula RNA několik cílových míst pro různé miRNA molekuly [36]. Extracelulární miRNA lze snadno detekovat v tělních tekutinách díky jejich relativně vysoké stabilitě v porovnání s ostatními typy RNA. To je způsobeno jejich krátkou délkou, vazbou na proteiny (Argonaut 2) či enkapsulací exosomy [39]. Vykazují proto vyšší rezistenci na endogenní a exogenní ribonukleasovou aktivitu, extrémní pH podmínky a teplotní změny při rozmrazování [40]. Tyto vlastnosti činí z miRNA potenciální biomarkery pro různé typy onemocnění, včetně nádorových onemocnění. Příkladem může být miR-10b, jejíž zvýšená hladina byla popsána u pacientů s karcinomem vaječníku, plic či u glioblastomu v porovnání se zdravými kontrolami nebo miR-16, jejíž různá exprese, v porovnání nemocných jedinců se zdravými kontrolami, byla popsána u karcinomu prsu, prostaty či jater [41]. Nevýhodou miRNA jako krevních biomarkerů je jejich nižší specifita, která je dána jejich fyziologickou funkcí [42].

Pro sledování změn genetických biomarkerů v plasmě/séru lze využít miRNA molekuly pro detekci hemolýzy [43]. Pro tyto účely mohou být využity miRNA, o kterých je známo, že jsou zastoupeny v červených krvinkách jako miR-451 nebo miR-144. Jelikož celkové množství miRNA v krvi může být ovlivněno i jinými faktory, například preklinickými či nějakým poraněním, je potřeba zároveň analyzovat i miRNA, která není ovlivněna hemolýzou. Takovou molekulou je miR-23a, která je stabilní v plasmě a séru [41].

1.2.2 DNA

Volná cirkulující DNA (cell free DNA, cfDNA) je přítomna v plasmě, moči a dalších tělních tekutinách člověka. cfDNA je tvořena dvouvláknovými fragmenty o délce méně než 200 páru bazí a o velmi nízké koncentraci [36]. *In vivo* dochází k zániku cfDNA nukleasovou aktivitou a následně je vylučována do moči ledvinami nebo je absorbována játry a slezinou, kde je degradována makrofágy. Hladina cfDNA je zvýšena při některých patologických a fyziologických podmínkách včetně cvičení, zánětu, diabetu a nádorového onemocnění [42]. Podle studií se koncentrace cfDNA u zdravých jedinců pohybuje v rozmezí 0-100 ng/ml s průměrnou hodnotou 30 ng/ml. Naopak u pacientů se toto rozmezí pohybuje od 0 do 1000 ng/ml s průměrnou hodnotou 180 ng/ml. Také bylo zjištěno, že hladina cfDNA souvisí s velikostí a stádiem tumoru. U pacientů se stádiem IV různých karcinomů bylo pozorováno 100-1000 kopií cirkulující nádorové DNA (circulating tumor DNA, ctDNA), část cfDNA pocházející přímo z nádoru, v 5 ml krve a naopak pouze 10 kopií ctDNA u pacientů v začínajícím stádiu [38]. Zvýšené množství ctDNA je také pozorováno u pacientů s metastatickými nádory. Kvantifikace u pacientek s relapsem ovariálního karcinomu ukázala zvýšení o šest kopií ctDNA na ml krve za přidání 1 cm³ nádoru [44]. U pacientů s různým

typem nádoru byla také pozorována snížená aktivita DNase v plasmě, což může mít také vliv na zvýšenou hladinu cfDNA v plasmě [40]. Hladiny cfDNA v krvi ovlivňuje i umístění nádoru, jelikož například u pacientů s primárním tumorem mozku byla hladina ctDNA vyšší v mozkomíšním moku než v plasmě [45].

CtDNA může obsahovat specifické variace, které souvisejí s nádorem pacienta jako například mutace v tumor supresorových genech nebo onkogenech, alterace počtu kopií genu (CNA), MSI, změny v methyloci DNA či chromosomální aberace [38].

1.2.3 Význam miRNA a cfDNA jako krevních biomarkerů u CRC

Diagnostika

Několik studií se zabývalo potenciálem miRNA jako diagnostického biomarkeru u CRC. Huang et al. byl prvním, kdo zkoumal diagnostickou hodnotu miRNA v plasmě. Byla nalezena zvýšená exprese miR-29a a miR-92a u 37 pacientů s pokročilým stádiem adenomu v porovnání se zdravými kontrolami. To vedlo k dalším studiím, které objevily mnoho dalších miRNA, jež mají zvýšenou hladinu u pacientů s CRC či naopak mají hodnotu nižší v porovnání se zdravými kontrolami. Některé z těchto miRNA molekul již byly navrženy pro včasnou diagnostiku CRC více než jednou studií (např. miR-17-3p, miR-18a, miR-21, miR-29a, miR-92, miR-106a, miR-29b a miR-145) [46]. Studie, které navíc kombinují různé miRNA, při detekci CRC v brzkých stádiích, dosahují vysoké přesnosti i specifity (nad 80 %) [39].

MiRNA molekuly se také podílejí na procesech odpovědných za šíření nádorů do okolních tkání a krevního řečiště (tzv. metastazování). Tento fakt byl využit při zkoumání hladiny exprese miRNA u pacientů s pokročilým stádiem CRC v porovnání s pacienty se vzdálenými metastázami. Jedním z nich byla miR-141, u které bylo zjištěno, že její hladina je schopna rozlišit IV stádium od těch ostatních. Lze proto uvažovat o využití stanovení miR-141 v plasmě v kombinaci s CEA pro včasnou detekci metastáz u CRC pacientů. Dalšími zástupci, jejichž hladina byla zvýšena u pacientů s pokročilým stádiem v porovnání se zdravými jedinci, byli například miR-96 či miR-22 [39].

V případě využití cfDNA pro diagnostiku CRC byl v roce 2016 vyvinut první FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, Food and Drug Administration) schválený methylační test, Epi proColon®, určený pro detekci methylované DNA genu *SEPT9* ze vzorků lidské plasmy. Obdobně je studován methylační profil genů *VIM* a *SFRP2* [42, 44].

Několik studií také poukazuje na možnost detekce mutací v genech spojených s rozvojem CRC v cfDNA (např. *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* a *EGFR*) pro diagnostické účely. Nicméně je několik překážek, které je potřeba vyřešit než bude možné využít cfDNA jako

biomarker pro časnou diagnózu v klinickém prostředí. Jednou z nich je limitace technologická a analytická. Dále šum při odběru vzorků kvůli omezené dostupnosti krve, která omezuje citlivost detekce. Problém je také nižší specifita a citlivost testů u raných stadií onemocnění [45].

Odhad prognózy

Hladiny některých pro diagnostiku využitelných miRNA také významně souvisí s prognózou onemocnění (miR-17-3p, miR-21, miR-92). V tomto směru jsou například intenzivně studovány miRNA patřící do rodiny miR-200 (miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429). Vyšší hladiny již dříve zmíněné miR-141 v krvi byly spjaty s horší prognózou pacientů s mCRC. Zkoumána byla také miR-221, jejíž vysoké hladiny v krvi odpovídaly horší prognóze pacientů a souvisely s expresí proteinu p53. Naopak u některých miRNA byla popsána souvislost nižších hladin v krvi s horší prognózou CRC pacientů, například miR-23b či miR-194 [39].

CfDNA je také studována v souvislosti s prognózou. Při analýze vzorků pacientů s CRC před a po obdržení chemoterapie bylo zjištěno, že u CRC případů byla hladina cfDNA výrazně vyšší. Nicméně hladina cfDNA nebyla významně spojena s pohlavím, věkem, stadiem TNM či lokalizací nádoru, ale naopak korelovala s expresí CEA [47].

Predikce a sledování odpovědi na terapii

MiRNA molekuly byly také zkoumány jako potenciální prediktivní biomarkery pro odhad citlivosti CRC vůči chemoterapii. Chen et al. studovali vzorky séra u pacientů s CRC léčených režimem FOLFOX. U pacientů špatně odpovídajících na léčbu byla významně zvýšená exprese miR-19a oproti pacientům dobře odpovídajícím na danou terapii. Další studie se zabývala analýzou exprese miRNA u pacientů léčených oxaliplatinou. V této práci bylo nalezeno pět miRNA (miR-20a, miR-130, miR-145, miR-216 a miR-372) potenciálně využitelných pro predikci chemosenzitivity k oxaliplatině u CRC pacientů. V jiné práci byl studován význam miR-126 pro predikci odpovědi pacientů s mCRC na chemoterapii (kapecitabin, oxaliplatin) v kombinaci s anti-angiogenní terapií (bevacizumab). U pacientů, kteří špatně odpovídali na anti-angiogenní terapii byla detekována stejná nebo zvýšená hladina miR-126 oproti snížení hladin této miRNA u pacientů dobře odpovídajících. Hladiny miR-126 v plasmě také korelovaly s velikostí tumoru a celkovou prognózou pacientů [39]. Pozdější práce ukazují, že cirkulující miRNA by mohly být využitelné jako prediktivní i prognostické markery samostatně u karcinomu rekta [39, 48].

Pro predikci a sledování účinků terapie se ukazuje jako slibné sledování obsahu ctDNA v celkové cfDNA. Tento přístup je zvláště účinný u pacientů s metastatickým onemocněním [49]. Pacienti jsou indikováni k sekvenčním odběrům krve během terapie, což umožňuje sledovat změny v nádorové DNA (v případě pacientů s CRC převážně mutace v genech RAS/BRAF), jejich vliv na účinnost aktuální léčby a predikci účinnosti další terapie [44].

1.3 Metody analýz volně cirkulující miRNA a DNA v krvi

Pro analýzu nukleových kyselin v krvi je důležité uchovávání odebraných vzorků s ohledem na výskyt nukleas. Jednou možností jsou EDTA zkumavky a druhou zkumavky obsahující stabilizující reagenty. Faktorem ovlivňujícím kvalitu krve je také způsob transportace, kdy by mělo dojít k zabránění třesu a pohybu se vzorkem, jelikož dochází k lýzi buněk (hemolýza) a kontaminaci séra a plasmy DNA a RNA z krevních buněk [50]. To je také ovlivněno časem mezi odebráním vzorku a samotným zpracováním. Z toho důvodu se používají i speciální odběrové zkumavky, např. PAXgene Blood ccfDNA (PreAnalytiX GmbH, Švýcarsko) nebo RNA Complete BCT (Streck, USA), které stabilizují leukocyty a zabráňují kontaminaci, přičemž vzorky lze použít do jednoho týdne od odebrání [51].

1.3.1 Metody izolace

Samotná izolace je uskutečněna převážně z plasmy či séra [51]. Protokoly pro izolaci nukleových kyselin využívají různých technik, ale obecně zahrnují lýzi, která je následována odstraněním proteinů a dalších makromolekul. Pro odstranění proteinů je využívána proteinasa K, vysolování (chlorid cesný), extrakce (fenol-chloroformová) či vazba na pevnou fázi. DNA je získána precipitací za použití ethanolu či isopropanolu. Je doporučeno provádět co nejméně kroků, jelikož velké množství získaných nukleových kyselin může být ztraceno v procesu [52]. Hlavní metody pro izolaci využívají magnetické kuličky nebo kolony s křemičitou (silikátovou) membránou. Často je obtížnější zvolit komerční kit nebo metodiku pro získání nukleových kyselin o největší kvalitě, jelikož jich je k dispozici velké množství. Mezi ty nejpoužívanější patří kity od společností QIAGEN a Thermo Fisher Scientific [51].

1.3.2 Metody detekce a kvantifikace

Koncentrace nukleových kyselin v plasmě je nízká a je zapotřebí využít sensitivních metod ke kvantifikaci. Běžně používané metody zahrnují fluorescenční barviva, spektrofotometrii a qPCR [50].

1.3.2.1 Kvantifikace nízko koncentrovaných nukleových kyselin

Standardem pro hodnocení koncentrace nukleových kyselin je měření fluorescence. Interkalující barviva, které selektivně váží dsDNA, např. PicoGreen nebo Qubit Fluorometer kity, umožňují kvantifikaci DNA v koncentracích 50 pg/μl respektive 5 pg/μl primárního vzorku. Výsledky mohou být ovlivněny fluorescencí pozadí, která je způsobena nenavázanými molekulami barviva a interferencí s kontaminanty jako jsou soli, detergenty či volné nukleotidy (vysokomolekulární DNA). Separace cfDNA je možná také na systému Agilent (Agilent Technologies), která umožňuje posouzení velikosti, kvantifikaci a rozlišení fragmentů cfDNA i při nízkých koncentracích v řádu pikogramů. qPCR s interkalujícími barvivy (např. SYBR Green) nebo sondami jsou využívány pro kvantifikaci různých nukleových kyselin a patří mezi nejvyužívanější metody [50, 51].

1.3.2.2 qPCR

Důležitým milníkem ve využití PCR bylo zavedení pozorování amplifikace DNA v reálném čase prostřednictvím monitorování fluorescence. Při qPCR (také označované jako PCR v reálném čase) se fluorescence měří po každém cyklu a intenzita fluorescenčního signálu odráží momentální množství DNA amplikonů ve vzorku v daný čas. V počátečních cyklech je fluorescence příliš nízká na to, aby byla odlišitelná od pozadí. Nicméně bod, ve kterém se intenzita fluorescence zvýší nad detekovatelnou úroveň (exponenciální fáze amplifikační reakce), odpovídá úměrně počátečnímu počtu molekul templátové DNA ve vzorku. Tento bod se nazývá kvantifikační cyklus (C_q) a umožňuje stanovení absolutního množství cílové DNA ve vzorku podle sestavené kalibrační křivky sériově řaděných standardních vzorků (obvykle dekadická ředění) se známými koncentracemi nebo počty kopií. Kromě toho může qPCR také poskytnout semikvantitativní výsledky bez standardů pouze s kontrolami použitými jako referenční materiál. V tomto případě mohou být pozorované výsledky vyjádřeny jako vyšší nebo nižší násobky vzhledem ke kontrole. Tato aplikace qPCR je široce používána pro studie genové exprese. Existují dvě strategie pro vizualizaci amplifikovaných fragmentů DNA v reálném čase – nespecifická fluorescenční barviva DNA a fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy. Sondy jsou více využívány díky jejich vyšší specifitě, která vyplývá z použití fluorescenčně značené sondy cílené mezi pár primerů ohraničující kvantifikovaný úsek, což vylučuje současnou detekci případných nespecifických PCR produktů např. primer dimerů [53].

1.3.2.3 Sekvenování nové generace (NGS)

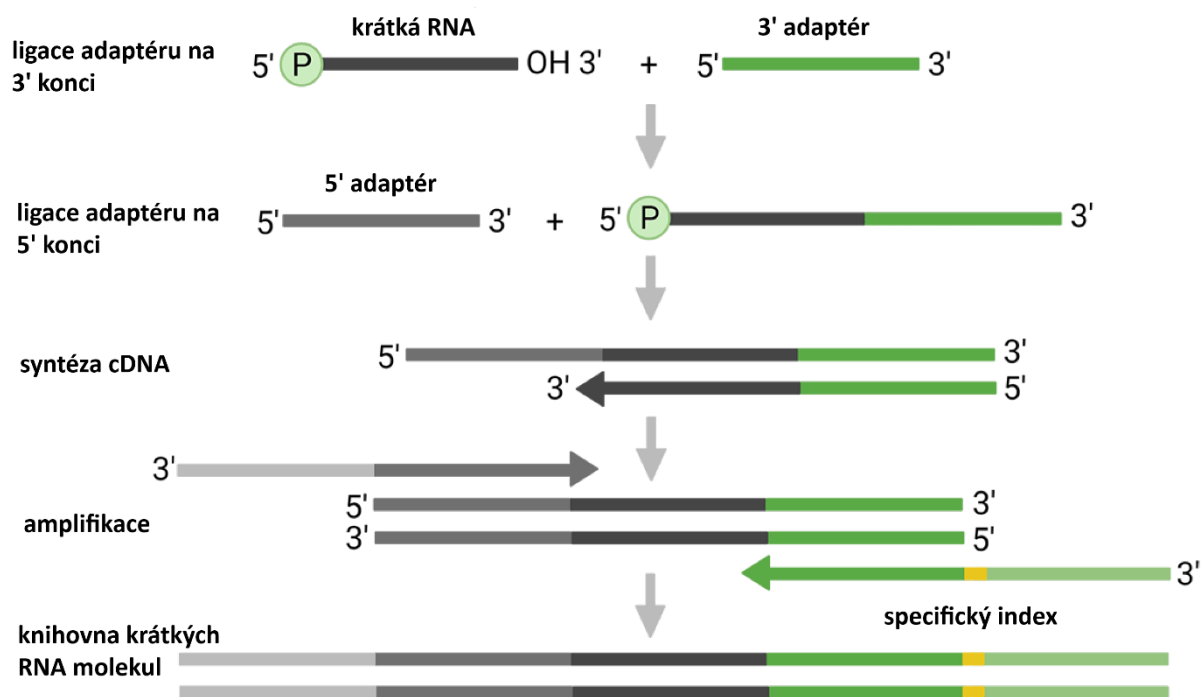
NGS je technologie využívaná pro DNA a RNA sekvenaci a detekci mutací, malých inzercí a delecí (indelů), CNA nebo genových fúzí. Tato technologie umožňuje sekvenaci nukleových kyselin různých délek i celého genomu v relativně krátkém časovém úseku [54]. Prerekvizitou pro NGS je příprava kvalitní knihovny. Tato příprava zahrnuje nejprve získání templátu, který odpovídá sledovaným molekulám a následně přípravu fragmentů pro sekvenování. Nejčastěji je využíváno sekvenování krátkých DNA úseků (tzv. short-read sekvenování), proto se před přípravou knihovny provádí fragmentace DNA na několik krátkých segmentů, často o délce 100-300 bp. Toho je docíleno různými metodami např. mechanickými metodami (sonikace) nebo enzymatickým štěpením. Protokoly pro přípravu knihoven se liší podle typu analýzy [54]. Velikost a kvalita knihovny se obecně kontroluje na Bioanalyzeru (Agilent Technologies, USA) pomocí vysoce citlivých DNA čipů (Agilent Technologies, USA) nebo HS DNA ScreenTape kitu na TapeStation 2200/4200 (Agilent Technologies, USA) [51].

DNA sekvenování (DNA-seq) může zahrnovat cílenou sekvenaci vybraných genů (targeted sequencing, TS), sekvenaci exomu (whole exom sequencing, WES), celého genomu (whole genome sequencing, WGS) či epigenomu. U WES a TS protokolů pro přípravu knihoven se pro namnožení templátů zpravidla využívá záchytová hybridizace (tzv. hybrid-capture), při které vzniká méně PCR duplikátů než při klasickém namnožení jen cílenou PCR amplifikací. Na cílové sekvence jsou hybridizovány komplementární sondy a následně jsou tyto komplexy izolovány za využití magnetických kuliček (často obalené streptavidinem) [55].

RNA sekvenování (RNA-seq) je užitečné pro funkční genomické studie, jako je genová exprese, alternativní sestřih a objevování sekvenčních variant. Rozlišuje se sekvenování celého transkriptomu (whole transcriptome sequencing, WTS), mRNA a sekvenování krátkých RNA molekul. Příprava vzorku zahrnuje izolaci RNA a reverzní transkripci RNA na komplementární DNA (cDNA). Jelikož přibližně 90 % získané celkové RNA z buněk či tkáně zaujímá rRNA, je nutné ji odstranit. U kitu od společnosti Illumina pro přípravu knihovny pro WTS dochází nejprve k odstranění rRNA, chemické fragmentaci zbylé RNA a reverzní transkripci. Ve výsledku je přichystána cDNA knihovna. Pro přípravu vzorku pro sekvenování mRNA jsou využity magnetické kuličky pro oddělení poly(A) molekul od celkové RNA a příprava knihovny poté probíhá podobně jako u WTS. K dispozici je i cílené RNA sekvenování, které umožňuje analyzovat jen některé vybrané geny [55].

Sekvenování krátkých RNA molekul, tzv. small RNA sekvenování, umožňuje detekovat různé typy krátkých RNA (miRNA, piRNA, tRNA, siRNA, snoRNA, apod.). Nejčastěji

studovanými krátkými RNA molekulami jsou miRNA vzhledem k jejich významu v řadě onemocnění. Tradiční příprava knihovny krátkých RNA molekul začíná prodloužením RNA molekuly ligací adapterů (umožňující nasednutí primerů pro reverzní transkripci i nasednutí primerů pro samotnou sekvenaci), reverzní transkripcí a amplifikací cDNA (viz Obr. 5) [55]. Novější protokoly pro přípravu knihoven krátkých RNA molekul se liší využitím různých přístupů snižující nerovnoměrné zastoupení jednotlivých molekul a potenciální zkreslení výsledků, které často vzniká při procesu ligace a amplifikace. K takovým přístupům patří např. využití unikátních molekulárních identifikátorů, tzv. UMI, nebo randomizovaných adapterů [56].



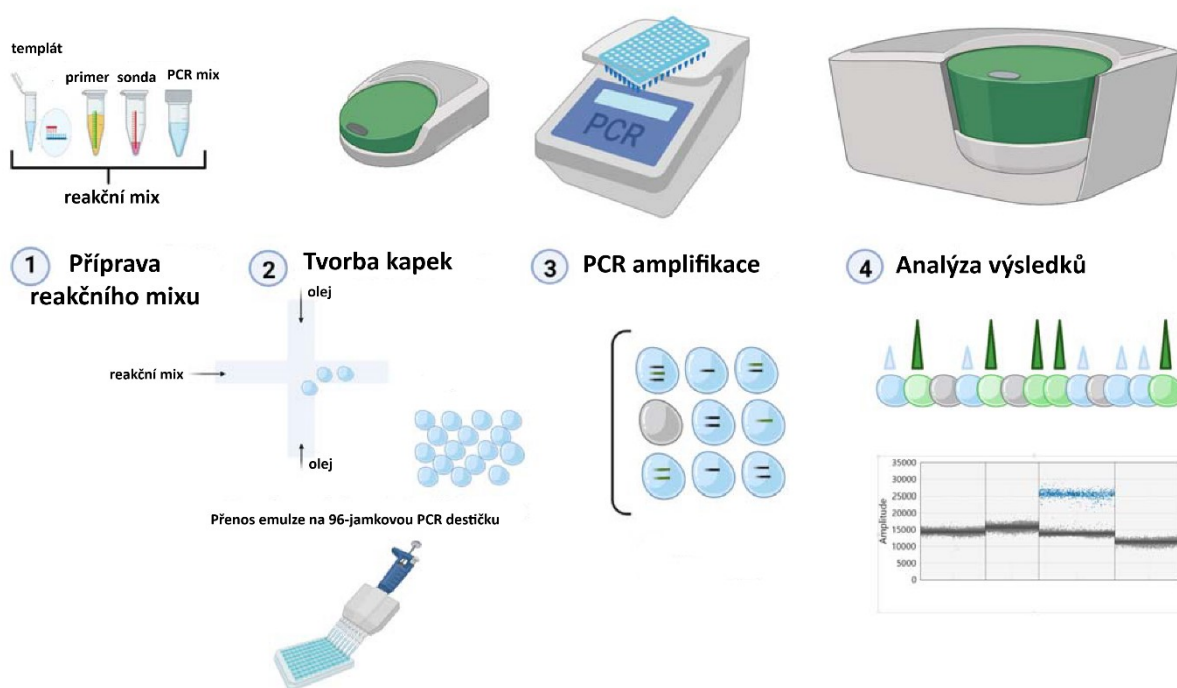
Obrázek 5 – Schematické znázornění přípravy knihovny krátkých RNA molekul. Převzato z [56].

Příprava NGS knihoven dále zahrnuje ligaci specifických indexů (tzv. barcodů), které umožňují identifikaci jednotlivých vzorků po sekvenaci. Nakonec jsou přidány adaptéry pro hybridizaci fragmentů na povrch amplifikační destičky („flow-cell“) [55].

Protokol vlastního sekvenování se liší podle použitého typu sekvenátoru. Illumina NGS sekvenátor využívá destiček s oligonukleotidy a pro amplifikaci knihovny tzv. můstkovou PCR. Sekvence probíhá formou syntézy postupným připojováním fluorescenčně značených dNTP. Výsledkem je masivně paralelní sekvenování všech DNA segmentů najednou. Získaná data jsou následně bioinformaticky zpracována [54].

1.3.2.4 Droplet-based digitální PCR (ddPCR)

ddPCR je typ digitální PCR, která umožňuje absolutní kvantifikaci DNA nukleových kyselin bez nutnosti použití standardní křivky. Principem ddPCR je rozdělení DNA nebo cDNA fragmentů do několika tisíců samostatných PCR reakcí. Pro rozdělení objemu vzorku do jednotlivých až pikolitrových objemů je používán buď princip rozdělení vzorku do kapiček pomocí disperzního oleje za vzniku emulze (např. QX200/600 Droplet Digital PCR Systém, Biorad) nebo rozdělení do komůrek pomocí speciálních destiček (QIAcuity Digital PCR Systém, Qiagen) [57]. Předpokladem ddPCR je náhodné rozdělení cílových molekul do jednotlivých reakčních kompartmentů tak, aby každá reakce obsahovala jednu nebo méně kopií templátu DNA. Následuje tzv. end-point amplifikace, kdy je po skončení reakce stanoven počet pozitivních a negativních signálů. Pro vyhodnocení výsledků se používá korekce vycházející z tzv. Poissonova rozdělení pravděpodobnosti, které zohledňuje možné vyšší množství cílových molekul v reakčních kompartmentech (viz Obr. 6). K dalším komerčním přístrojům umožňující ddPCR patří BioMark HD dPCR (Fluidigm) nebo QuantStudio 12K Flex dPCR (Life Technologies) [58].



Obrázek 6 – Schematické znázornění průběhu ddPCR. Převzato z [59].

2. Cíle práce

1. Výběr a optimalizace metod pro izolaci cfDNA a miRNA z plasmy/séra a jejich charakterizace z hlediska kvantity a kvality
2. Optimalizace metody stanovení hemolýzy v plasmě/séru pomocí qPCR
3. Výběr a optimalizace metody stanovení hladin cirkulujících miRNA pomocí sekvenování krátkých RNA molekul

3. Materiál

3.1 Chemikálie

Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies, USA
dH ₂ O	Thermo Fisher Scientific, USA
ethanol	Sigma Aldrich, USA
glykogen	Thermo Fisher Scientific, USA
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Qiagen, Německo
QIAseq miRNA UDI Library kit	Qiagen, Německo
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen, Německo
Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit and Reagent	Invitrogen™, USA
Quant-it™ RiboGreen RNA Assay Kit and Reagent	Invitrogen™, USA
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen™, USA
Qubit™ microRNA Assay Kit	Invitrogen™, USA
Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma Kit	Zymo Research, USA
Isopropanol	Sigma Aldrich, USA
miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit	Qiagen, Německo
miRNeasy Serum/Plasma Kit	Qiagen, Německo
mirVana® miRNA mimic	Thermo Fisher Scientific, USA
NEXTFLEX Small RNA-Seq kit	PerkinElmer, USA
NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 bp)	Illumina, USA
probe PCR master Mix (4×)	Qiagen, Německo
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
TaqMan® Small RNA Assay (20x)	Thermo Fisher Scientific, USA
TaqMan® Universal Mastermix	Thermo Fisher Scientific, USA

TE pufr

Invitrogen™, USA

3.2 Přístroje a laboratorní vybavení

Agilent 2100 Bioanalyzeru

Agilent Technologies, USA

Automatické pipety

Eppendorf, Německo

Centrifuga Hettich MIKRO 200R

Schoeller Instruments, s.r.o., ČR

Centrifuga Hettich UNIVERSAL 320 R

Schoeller Instruments, s.r.o., ČR

dPCR destička (8,5k)

Qiagen, Německo

Infinite200

Tecan, Švýcarsko

Laminární box

Schoeller Instruments, s.r.o., ČR

Magnetický stojan

Thermo Fisher Scientific, USA

Mastercycler™ Nexus Thermal Cycler

Eppendorf, Německo

Mikrotitrační destička

Greiner Bio-One, Rakousko

NanoDrop2000

Thermo Fisher Scientific, USA

NextSeq 500 sekvenátor

Illumina, USA

Odběrové zkumavky

Greiner Bio-One, Rakousko

PCR mikrozkušavky

Thermo Fisher Scientific, USA

QIAcuity Digital PCR System

Qiagen, Německo

QIAvac vakuový systém

Qiagen, Německo

Qubit 4.0 Fluorometer

Invitrogen™, USA

Qubit assay tubes

Thermo Fisher Scientific, USA

RotorGene

Qiagen, Německo

Stolní minicentrifuga minispin

Eppendorf, Německo

Strip 4 PCR zkumavek s víčky

Thermo Fisher Scientific, USA

Termoblok

Eppendorf, Německo

Vortex V-1 plus

Biosan, Lotyšsko

3.3 Softwarové prostředky

2100 Bioanalyzer Expert Software

Agilent Technologies, USA

BWA (Burrow-Wheeler Aligner, v0.7.17)

<https://github.com>

ComplexHeatmap (v2.14.0)

<https://bioconductor.org>

Cutadapt (v4.2)

<https://github.com>

edgeR (v3.40.2)

<https://bioconductor.org>

FastQC (v0.11.9)

<https://github.com>

ggpubr (v0.6.0)

<https://bioconductor.org>

QIAcuity software suite (v2.1.8.23)

Qiagen, Německo

MultiQC (v1.14)

<https://github.com>

R (v4.2.2)

<https://cran.r-project.org>

RotorGene Q Software

Qiagen, Německo

Samtools (v1.6)

<https://github.com>

3.4 Pacienti a zdraví dobrovolníci

Pro optimalizaci metod izolace a kvantifikace nukleových kyselin byly využity vzorky periferní krve získané od dobrovolných dárců - zaměstnanců SZÚ a EUC kliniky ve Zlíně. Vzorky byly odebrány v roce 2016 - 2017. K optimalizaci metody sekvenování krátkých RNA molekul byly použity vzorky periferní krve získané od pacientů s karcinomem prsu diagnostikovaných v letech 2012 až 2019 (Onkocentrum, Medicon a.s. a Ústav pro péči o matku a dítě, Podolí - ÚPMD). Všichni dobrovolní dárci a pacienti zařazení do studie podepsali Informovaný souhlas schválený Etickou komisí Státního zdravotního ústavu nebo ÚPMD.

4. Metody

4.1 Separace plasmy/séra

Vzorky periferní krve byly odebrány do 9 ml K3EDTA (plasma) a 9 ml Serum Vacuette (serum) odběrových zkumavek (Greiner Bio-One). Vzorky byly centrifugovány 5 minut na 2200 rpm při 4°C, horní fáze plasmy a séra byly přeneseny do 10 ml zkumavek a znovu centrifugovány 5 minut na 2200 rpm při 4°C. Získané vzorky plasmy, séra a suspenze krevních buněk zbylá po prvním kroku centrifugace v K3EDTA zkumavce, byly rozděleny do 3 alikvotů o objemu 0,5 – 1,5 ml do 1,5 ml a zamraženy na -80°C do dalšího zpracování.

4.2 Izolace RNA a DNA z plasmy/séra

K porovnání metod určených k izolaci nukleových kyselin z plasmy nebo séra byly využity vzorky plasmy získaných od zdravých kontrol (n=4), označené dle abecedy A-D. Samotná izolace byla realizována pomocí 4 kitů:

1. miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen)
2. miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen)
3. Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma Kit (Zymo Research)
4. QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen)

MiRNeasy Serum/Plasma Kit a miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit byly užity pouze k izolaci RNA, Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma Kit k izolaci RNA i DNA a QIAamp Circulating Nucleic Acid kit pouze k izolaci DNA. Protokol MiRNeasy Serum/Plasma Kitu byl již dříve v laboratoři Toxikogenomiky zoptimalizován s využitím glykogenu pro zvýšení precipitace RNA u nízko-koncentrovaných vzorků [60]. Využití glykogenu bylo proto otestováno i u novějšího miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kitu (viz *Tabulka 1*, str. 37). Jednotlivé kity byly mezi sebou porovnány tak, aby mezi nimi byl vybrán ten nejlepší z hlediska kvality a výtěžnosti pro izolaci RNA a/nebo pro izolaci DNA.

Tabulka 1 – Přehled využitých kitů k izolaci nukleových kyselin včetně objemu plasmy

	izolace RNA	izolace DNA	
objem plasmy	200 μ l	200 μ l	1 ml
izolační kity	<ol style="list-style-type: none"> 1. miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) 2. miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen) 3. Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma Kit (Zymo Research) 	Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma Kit (Zymo Research)	<ol style="list-style-type: none"> 4. QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen)

4.2.1 Příprava exogenních miRNA a vzorků k izolaci

Jako exogenní kontroly pro kontrolu homogenity izolací byly využity dvě synteticky připravené miRNA molekuly, cel-miR-39-3p (dále uváděna jako cel-miR-39) a ath-miR-159a (mirVana® miRNA mimic, Thermo Fisher Scientific) [60]. Lyofilizované miRNA molekuly (5 nM) byly rozpuštěny (20 min při pokojové teplotě na rotační třepačce) na 50 μ M koncentraci do 100 μ l dH₂O (Thermo Fisher Scientific) a zamraženy v alikvotech jako koncentrované standardy na -80°C. Jeden z alikvotů byl dále naředěn na 0,4 μ M koncentraci (2 μ l koncentrovaného standardu byly rozpuštěny ve 248 μ l dH₂O), rozaliquotován a zamražen na -80°C. Tyto alikvoty ředěných standardů byly dále ředěny na pracovní koncentraci (0,4 μ M) těsně před použitím a to následovně. Cel-miR-39 byl naředěn 100 \times na 4 nM koncentraci a ath-miR-159a 10 000 \times na 0,04 nM koncentraci.

Optimální ředění exogenních miRNA bylo stanoveno ředící řadou, kdy byla provedena reverzní transkripce dané miRNA molekuly, v rozmezí 14,3 – 0,00143 fmol/reakci odpovídající 2 pmol – 0,2 fmol dané miRNA teoreticky přidané k izolaci spolu s 2 ng celkové RNA a jejich detekcí pomocí qPCR. Pro sledování homogenity izolací bylo zvoleno 20 fmol/izolaci v případě cel-miR-39 a 0,2 fmol/izolaci v případě ath-miR-159a.

Vzorky plasmy byly na ledu rozmraženy a centrifugovány po dobu 5 minut na 16 000 \times g při 4 °C pro odstranění případných buněčných zbytků a kryoprecipitátů.

4.2.2 miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen)

Vzorky byly izolovány podle protokolu výrobce s výjimkou primární centrifugace (viz kapitola 4.2.1), přidání exogenních miRNA molekul a glykogenu (viz dále). Tento kit kombinuje lýzi vzorků založenou na fenolu a guanidinu a purifikaci celkové RNA zprostředkovanou pomocí křemičité membrány.

Po primární centrifugaci plasmy (4.2.1) bylo přeneseno 200 μ l supernatantu do 2ml zkumavky s 1 ml QIAzolou, vzorky byly promíchány na vortexu a inkubovány při pokojové teplotě 5 minut. Mezitím bylo ke vzorkům přidáno 5 μ l exogenních miRNA (20 fmol/izolaci cel-miR-39 a 0,2 fmol/izolaci ath-miR-159a), vzorky byly promíchány na vortexu a krátce centrifugovány. Ke vzorkům bylo přidáno 200 μ l chloroformu, byly promíchány na vortexu a inkubovány 3 minuty při pokojové teplotě. Po centrifugaci (15 minut, 12 000 \times g, 4 °C) byla opatrně pipetou přenesena horní vodná fáze (700 μ l) do nových 2ml zkumavek tak, aby do špičky nebyla napipetována mezifáze. Všechny následné kroky protokolu a centrifugace probíhali již při pokojové teplotě. Do zkumavek s přenesenou horní fází byl přidán 1 μ l glykogenu (20 μ g/ μ l, Thermo Fisher Scientific) a ethanol, jehož pipetovaný objem byl v poměru 1,5:1 s přeneseným supernatantem. Roztok byl promíchán a postupně (po 700 μ l) přenesen na RNeasy MinElute spin kolonku ve 2ml zkumavce pro navázání RNA na silikagelovou membránu. Kolonky byly centrifugovány 15 s na 8000 \times g a při pokojové teplotě dokud nebyl přenesen celý objem daného vzorku. Kolonky byly postupně promyty 700 μ l RWT pufru s následnou centrifugací (15 s, 8000 \times g), 500 μ l RPE pufru (15 s, 8000 \times g) a 500 μ l 80% ethanolu (2 min, 8000 \times g). Poté byly vloženy do nových 2ml zkumavek a membrána byla vysušena centrifugací na maximální otáčky (27670 \times g) 5 minut. Po centrifugaci byly vzorky vloženy do 1,5ml zkumavek a na silikagelovou membránu bylo nanášeno 14 μ l dH₂O. RNA byla eluována centrifugací na maximální otáčky 1 minutu, přenesena do 0,2ml zkumavek a zamrazena na -80 °C.

4.2.3 miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen)

Vzorky byly izolovány podle protokolu výrobce s výjimkou primární centrifugace (4.2.1), přidání exogenních miRNA molekul a glykogenu (viz dále). Tento kit kombinuje lýzi vzorků založenou na guanidinu, krok na odstranění inhibitorů a purifikaci celkové RNA zprostředkovanou pomocí křemičité membrány. Všechny kroky protokolu a centrifugace probíhali při pokojové teplotě.

Po primární centrifugaci (4.2.1) bylo 200 μ l supernatantu přeneseno do 2ml zkumavky s 60 μ l RPL pufru a vzorky byly promíchány na vortexu a inkubovány při pokojové teplotě

3 minuty. Ke vzorkům bylo přidáno 5 μ l exogenních miRNA (20 fmol/izolaci cel-miR-39 a 0,2 fmol/izolaci ath-miR-159a), vzorky byly promíchány na vortexu a krátce centrifugovány. Ke vzorkům bylo přidáno 20 μ l RPP pufru, byly promíchány na vortexu, inkubovány 3 minuty a následně centrifugovány (3 minuty, 12000 \times g) Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a byl přidán stejný objem isopropanolu. Po promíchání na vortexu byl celý objem nanesen na RNeasy UCP MinElute kolonku s následnou centrifugací 15 s na 8000 \times g. Kolonky byly promyty 700 μ l RWT pufru (15 s, 8000 \times g), 500 μ l RPE pufru (15 s, 8000 \times g) a 500 μ l 80% ethanolu (2 min, 8000 \times g). Následně byly kolonky vloženy do nových 2ml zkumavek a silikagelové membrány s navázanou RNA vysušeny centrifugací na maximální otáčky (27670 \times g) 5 minut. Poté byly kolonky vloženy do nových 1,5ml zkumavek a na silikagelovou membránu bylo naneseo 20 μ l dH₂O. RNA byla eluována centrifugací na maximální otáčky 1 minutu, přenesena do 0,2ml zkumavek a zamražena na -80 °C.

4.2.4 Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma Kit (Zymo Research)

Vzorky byly izolovány podle protokolu výrobce s výjimkou primární centrifugace (4.2.1) a přidání exogenních miRNA molekul (viz dále). Tento kit je založen na lýzi vzorků proteinasou K, následným navázáním na membránu a postupnou elucí RNA a DNA. Vzhledem k vstupnímu objemu 1 ml plasmu byl pro přenos vzorků a promývacích pufrů přes kolonky v první polovině protokolu využit QIAvac vakuový systém (Qiagen), který lze využít pro vakuové paralelní zpracování až 24 kolonek při 800 mbar.

Kromě inkubace vzorku s proteinasou K probíhaly všechny kroky protokolu při pokojové teplotě.

Po primární centrifugaci (4.2.1) byl 1 ml supernatantu přenesen do 5ml zkumavky s 1 ml Quick-cfDNA/cfRNA Digestion pufru a roztok byl promíchán. Bylo přidáno 50 μ l proteinasy K, vzorky byly promíchány na vortexu a inkubovány 2 hodiny při 37 °C na termobloku. Po uplynutí inkubace bylo ke vzorkům přidáno 5 μ l exogenních miRNA (20 fmol/izolaci cel-miR-39 a 0,2 fmol/izolaci ath-miR-159a), vzorky byly promíchány a poté byl přidán Quick-cfDNA/cfRNA Binding pufr v poměru 1:1 a vše bylo promícháno na vortexu. Byl přidán isopropanol v poměru 1,5:1 se směsí namíchanou v předchozím kroku a vzorky byly opět promíchány na vortexu. Spin-Away filtr spolu s 25ml rezervoárem (součástí QIAvac vakuového systému) byl připojen na manifold vakuové pumpy, celý vzorek byl přenesen do rezervoáru a pomocí vakua přefiltrován přes membránu (vakuová pumpa byla vypnuta vždy až po přefiltrování veškerého objemu ve vzorcích). Na filtr bylo naneseo 600 μ l RNA Prep pufru a pomocí vakua byl filtr promyt.

Všechny další centrifugační kroky byly provedeny po dobu 30 s na 12000× g při pokojové teplotě. Spin-Away filtr byl centrifugován 2 minuty a následně vložen do nové zkumavky. Na membránu bylo přidáno 200 µl Cell-free Recovery pufru, následovala inkubace a centrifugace 3 minuty. K získanému filtrátu s RNA bylo přidáno 300 µl ethanolu, roztok byl promíchán a celý objem byl přenesen na ZymoSpin IC kolonu, která byla následně centrifugována pro zachycení RNA na membráně. ZymoSpin IC kolonka byla do doby finálního promytí a eluce uchována při 4°C pro izolaci RNA. Mezitím byl Spin-Away filtr vložen do nové sběrné zkumavky a membrána byla postupně promyta 600 µl RNA Prep pufru a dále dvakrát pomocí 700 µl RNA Wash pufru s následnou centrifugací. Kolonka byla vložena do nové zkumavky, na membránu bylo nanášeno 100 µl dH₂O, následovala inkubace po dobu 2 minut a centrifugace. K filtrátu bylo přidáno 200 µl Cell-free Recovery pufru a roztok byl promíchán. Bylo přidáno 300 µl ethanolu, roztok byl opět promíchán, přenesen na ZymoSpin IC kolonu a centrifugován pro zachycení DNA na membráně.

Kolonky s navázanou RNA i DNA byly dále zpracovávány současně. Membrány byly promyty 400 µl RNA Wash pufru, centrifugovány 2 minuty a kolonky byly následně vloženy do nových zkumavek.

Nukleové kyseliny byly eluovány do 15 µl dH₂O (2 minuty inkubace s následnou centrifugací), přeneseny do 0,2ml zkumavek a zamraženy na -80 °C.

4.2.5 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen)

Vzorky byly izolovány podle protokolu výrobce s výjimkou primární centrifugace (4.2.1). Tento kit využívá 4 kroků: lýze vzorků za přítomnosti proteinasy K, vazbu na křemičitou membránu, promývání a samotnou eluci nukleových kyselin. Vzhledem k vstupnímu objemu 1 ml plasmy byl pro přenos vzorků a promývacích pufrů přes kolonky využit QIAvac vakuový systém stejně jako u předchozího kitu.

Do 2ml zkumavky bylo napipetováno 100 µl proteinasy K a k ní 1 ml supernatantu získaného po primární centrifugaci plasmy. Dále bylo přidáno 0,8 ml ACL obsahujícího 1 µg RNA a roztok byl pečlivě promíchán na vortexu. Vzorky byly inkubovány 30 minut při 60 °C na termobloku. Lyzát byl přenesen do 5ml zkumavky a bylo k němu přidáno 1,8 ml ACB pufru. Roztok byl promíchán na vortexu a inkubován 5 minut na ledu. 20ml rezervoár byl vložen do QIAamp Mini kolony a ta na vakuovou pumpu. Celý vzorek byl přenesen do rezervoáru a přefiltrován přes membránu. Do kolonky bylo postupně nanášeno 600 µl ACW1 pufru, 750 µl ACW2 pufru a 750 µl ethanolu vždy s následným přefiltrováním přes membránu pomocí vakua. Dále byla kolonka vložena do 2ml zkumavky a centrifugována 3 minuty na 20 000× g.

Kolona byla vložena do nové 2ml zkumavky a s otevřeným víčkem byla membrána sušena 10 minut při 56 °C. Poté byla kolonka vložena do nové 1,5ml zkumavky a DNA byla eluována pomocí 50 µl AVE pufru (s následnou inkubací 3 minuty a centrifugací 1 minutu na 20 000× g) a eluovaná DNA byla přenesena do 0,2ml zkumavek a zamražena na -80 °C.

4.3 Měření koncentrace RNA a DNA

U zizolovaných vzorků jednotlivými kity byla sledována jejich výtěžnost a kvalita měřením koncentrace miRNA, celkové RNA a DNA (viz *Tabulka 2*). U DNA byla zároveň sledována velikost fragmentů.

Tabulka 2 – Přehled metod využitých pro kvantifikaci nukleových kyselin

Měření koncentrace RNA		Měření koncentrace DNA
miRNA	celková RNA	dsDNA
Qubit™ microRNA Assay Kit (Invitrogen™)	Quant-it™ RiboGreen RNA Assay Kit and Reagent (Invitrogen™)	Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit and Reagent (Invitrogen™) Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™)

4.3.1 Koncentrace miRNA

Pro kvantifikaci byl využit Qubit™ microRNA Assay Kit (Invitrogen™) s rozsahem měření od 25 pg/µl do 150 ng/µl původního vzorku (0,5 – 150 ng v 200 µl reakční směsi). Tento kit je dle výrobce vysoce selektivní pro miRNA oproti rRNA či dlouhým mRNA.

Qubit microRNA pufr (komponent B) a Qubit microRNA reagent (komponent A) byly vytemperovány na pokojovou teplotu, přičemž reagent obsahující fluorescenční barvu byl uchováván ve tmě. Nejprve byl připraven pracovní roztok smícháním Qubit microRNA pufru a Qubit microRNA reagentu 200:1 v objemu požadovaném dle počtu vzorků. Do 0,5ml zkumavek (Qubit assay tubes, Thermo Fischer Scientific) bylo napipetováno 199 µl pracovního roztoku pro vzorky a 190 µl pro 2 standardy (komponent C a D). Vzorky RNA byly rozmraženy na ledu a do odpovídajících zkumavek byl přidán 1 µl vzorku a 10 µl standardu. Všechny vzorky byly promíchány na vortexu po dobu 3 s a inkubovány při pokojové teplotě 2 minuty. Měření bylo provedeno na přístroji Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen™), kdy byla na displeji zvolena možnost měření miRNA. Nejprve byly změřeny standardy a následně jednotlivé vzorky.

4.3.2 Koncentrace celkové RNA

Pro kvantifikaci celkové RNA byl využit Quant-it™ RiboGreen RNA Assay Reagent and Kit (Invitrogen™) s rozsahem měření od 2 pg/μl do 200 ng/μl původního vzorku (0,2 – 200 ng v 200 μl reakční směsi). Tento kit obsahuje Quant-iT RiboGreen RNA reagent, který je jeden z nejcitlivějších fluorescenčních barviv pro detekci RNA. Při měření byl využíván rozsah pro nízké koncentrace RNA (low range protokol) 1-50 ng.

Nejprve byly připraveny jednotlivé roztoky dle počtu vzorků a to konkrétně 1× koncentrovaný TE (Tris/EDTA) pufr z 20× koncentrovaného zásobního roztoku (komponent B), Quant-iT RiboGreen RNA Reagent (komponent A) pracovní roztok smícháním 1× koncentrovaného TE pufru s komponentem A (2000:1) a Ribosomal RNA Standard pracovní roztok smícháním 1× koncentrovaného TE pufru s komponentem C (100 μg/ml v TE pufru) (ředění 1000×, pro koncentraci 100 ng/ml). Byla připravena černá mikrotitrační destička (Greiner Bio-One), do které byl rozpipetován TE pufr 99 μl pro vzorky a pro standardy dle *Tabulky 3* (vše v duplikátech). Do destičky byl napipetován pracovní roztok pro standardy (*Tabulka 3*) a 1 μl vzorků, které byly rozmrazeny na ledě (promíchány a centrifugovány), k TE pufru. Do všech jamek bylo napipetováno 100 μl pracovního roztoku RiboGreen a následně byla destička vložena do temna na míchačku na 10 minut. Měření fluorescence bylo provedeno na přístroji Infinite200 (excitace 480 nm, emise 520 nm). Pomocí kalibrační křivky a získaných hodnot byly vypočítány koncentrace vzorků.

Tabulka 3 – Příprava standardů na kalibrační křivku

pozice	objem 1x TE pufru (μl)	objem RNA pracovního roztoku standardu (μl)	koncentrace RNA (ng/ml)
A1	0	100	50
A2	50	50	25
A3	90	10	5
A4	98	2	1
A5	100	0	blank

4.3.3 Koncentrace DNA

Pro kvantifikaci DNA byl využit Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Reagent and Kit (Invitrogen™) s rozsahem měření od 0,05 pg/μl do 200 ng/μl původního vzorku (5 pg - 200 ng v 200 μl reakční směsi). Tento kit obsahuje fluorescenční barvivo PicoGreen, které je specifické

pro kvantifikaci dsDNA v přítomnosti RNA. Při měření byl využíván rozsah pro nízké koncentrace dsDNA (tzv. low range protokol) s rozsahem 0,025-25 ng.

Byly připraveny jednotlivé roztoky dle potřeby a to konkrétně 1× koncentrovaný TE pufr z 20× koncentrovaného zásobního roztoku (komponent B), Quant-iT PicoGreen DNA Reagent pracovní roztok smícháním 1× koncentrovaného TE pufru s Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagentem (komponent A) (200:1) a Lambda dsDNA Standard pracovní roztok smícháním 1× koncentrovaného TE pufru s Lambda DNA standardem (100 µg/ml) (komponent C) (ředění 50×, pro koncentraci 2 µg/ml). Standardy na kalibrační křivku byly připraveny dle *Tabulky 4* a rozpipetovány po 100 µl v duplikátech do jamek na černou mikrotitrační destičku. Pro vzorky bylo do jamek napipetováno 99 µl 1× koncentrovaného TE pufru a 1 µl DNA vzorků, které byly před měřením rozmrazeny na ledu, promíchány a centrifugovány. Do všech jamek bylo napipetováno 100 µl PicoGreen pracovního roztoku a destička byla vložena do temna na míchačku na 10 minut. Měření fluorescence bylo provedeno na přístroji Infinite200 (Tecan) (excitace 480 nm, emise 520 nm). Pomocí kalibrační křivky a získaných hodnot byly vypočítány koncentrace vzorků.

Tabulka 4 – Příprava standardů na kalibrační křivku

pozice	objem 1x TE pufru (µl)	lambda dsDNA standard (µl)	koncentrace RNA (ng/ml)
A1	1950	50 (zásobní roztok)	25
A2	450	50 (A1)	2,5
A3	450	50 (A2)	0,25
A4	450	50 (A3)	0,025
A5	400	0	blank

Pro kvantifikaci dsDNA byl také použit Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™) s rozsahem měření od 5 pg/µl do 120 ng/µl původního vzorku (0,1 ng – 120 ng v 200 µl reakční směsi). Kit je velmi selektivní pro dsDNA oproti ssDNA, RNA či proteinu.

Qubit dsDNA HS pufr (komponent B) a Qubit dsDNA HS reagent (komponent A) byly předem naředěny v lahvičce v poměru 200:1 a následně roztok vytemperován na pokojovou teplotu. Do 0,5ml zkumavek (Qubit assay tubes, Thermo Fischer Scientific) bylo napipetováno 199 µl pracovního roztoku pro vzorky a 190 µl pro 2 standardy (komponent C a D). Vzorky DNA byly rozmrazeny na ledu a do odpovídajících zkumavek byl přidán 1 µl vzorku a 10 µl standardu. Všechny vzorky byly promíchány na vortexu po dobu 3 s a inkubovány při pokojové

teplotě 2 minuty. Měření bylo provedeno na přístroji Qubit 4.0 Fluorometer, kdy byla na displeji zvolena možnost měření dsDNA jako typ dsDNA High Sensitivity. Nejprve byly změřeny standardy a následně jednotlivé vzorky.

4.3.4 Agilent High Sensitivity DNA Kit

DNA byla analyzována také pomocí Agilent High Sensitivity DNA Kitu na Agilent 2100 Bioanalyzeru, kde byla primárně sledována velikost DNA fragmentů a dále koncentrace. DNA Gel byl vytemperován na pokojovou teplotu a spolu se standardem (DNA žebříčkem) promíchán na vortexu. Nový HS DNA čip byl vložen do pipetovacího stojanu s připevněnou a nastavenou aplikační stříkačkou dle protokolu pro HS DNA kit. Do jamky pro gel bylo napipetováno 9 μ l gelu, čip byl uzavřen a stříkačka stlačena na pozici dle protokolu pro HS DNA kit. Po uplynutí 60 s byla stříkačka uvolněna a po dalších 5 s opatrně vysunuta na původní pozici 1 ml. Čip byl odkryt a v pravém sloupci bylo dopipetováno 9 μ l gelu do zbylých 3 jamek. Do jamek určených pro vzorky a standard bylo napipetováno 5 μ l markeru. Do jamek pro vzorky byl napipetován 1 μ l odpovídajícího vzorku a do jamky pro standard 1 μ l DNA standardu. Takto připravený čip byl vložen na vortex na 60 s a poté do přístroje. Výsledky byly získány pomocí programu 2100 Bioanalyzer Expert Software (Agilent).

4.4 Reverzní transkripce a RT PCR

Z izolovaných vzorků RNA byl proveden přepis miRNA do cDNA pomocí reverzní transkripce za využití specifických „stem-loop“ primerů a následně byla provedena amplifikace v reálném čase, při které byly detekovány 3 miRNA, hsa-miR-16-5p (dále uváděna jako hsa-miR-16) jako endogenní kontrola, a ath-miR-159a s cel-miR-39 jako exogenní kontroly.

4.4.1 Reverzní transkripce

Izolovaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kitu (Thermo Fisher Scientific). Izoláty byly ředěny 25 \times (1 μ l vzorku:24 μ l dH₂O) a byl připraven mix pro požadovaný počet vzorků s odpovídajícím specifickým primerem (*Tabulka 5*, str. 45). Do každé mikrozkušavky ve stripu bylo napipetováno 5 μ l mixu a 2,5 μ l vzorku (celkový objem reakčního mixu byl tedy 7,5 μ l). Stripy byly promíchány a krátce centrifugovány. Následně byly vloženy do cykléru Mastercycler™ Nexus Thermal Cycler (Eppendorf) a byl nastaven požadovaný program (*Tabulka 6*, str. 45). Po ukončení byla cDNA zamražena na -20 °C.

Tabulka 5 – Objemy roztoků pro přípravu mixu pro reverzní transkripci

složka	objem pro 1 vzorek (μl)
10x koncentrovaný pufr	0,750
100mM dNTP	0,075
inhibitor (20 U/ μl)	0,095
transkriptasa (50 U/ μl)	0,500
dH ₂ O	2,080
specifický primer	1,500

Tabulka 6 – Program pro provedení reverzní transkripce na cykléru

čas	teplota
30 minut	16 °C
30 minut	42 °C
5 minut	85 °C
-	4 °C

4.4.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR)

Komplementární DNA byla rozmrazena, promíchána, krátce centrifugována a na ledu naředěna 3× pomocí dH₂O na objem potřebný pro počet měřených miRNA molekul. Vzorky byly promíchány, centrifugovány a ponechány na ledu. Poté byly připraveny mixy (pro každou měřenou miRNA zvlášť) v objemu pro požadovaný počet vzorků měřených v duplikátech, které obsahovaly TaqMan Small RNA Assay (20x) (se specifickými primery a probou pro danou miRNA), TaqMan Universal Mastermix (2x) (obojí Thermo Fisher Scientific) a dH₂O (Tabulka 7, str. 46). Do mikrokumavek pro qPCR bylo napipetováno 8 μl mixu a 2 μl ředěné cDNA k získání celkového objemu reakce 10 μl. Komplementární cDNA byla v qPCR reakci naředěna tedy celkem 15×. Mikrokumavky byly vloženy do přístroje RotorGene (Qiagen) a byl nastaven program (Tabulka 8, str. 46). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu RotorGene Q Software (Qiagen).

Tabulka 7 – Objemy potřebné pro přípravu mixu pro qPCR

složka	objem pro 1 vzorek (μ l)
dH ₂ O	2,5
TaqMan Small RNA Assay (20x)	0,5
TaqMan Universal Mastermix (2x)	5,0

Tabulka 8 – Program pro provedení qPCR

čas	teplota
10 minut	95 °C
40 cyklů: 15 sekund	95 °C
60 sekund	60 °C

4.5 Stanovení hemolýzy

Pro optimalizaci stanovení míry hemolýzy v plasmě pomocí qPCR byla použita směs plasmy a suspenze krevních buněk v různých koncentracích, přičemž hemolýza byla detekována měřením absorbance při 414 nm a pomocí qPCR detekcí dvou miRNA, hsa-miR-451 (přítomna v červených krvinkách) a hsa-miR-23-3p (dále uváděna jako hsa-miR-23a, konstantní exprese v plasmě) [61]. Měření bylo provedeno v triplicátech.

4.5.1 Příprava vzorků

Pro přípravu ředící řady směsi plasmy a krevních buněk byly použity vzorky plasmy od zdravých kontrol (n=8) Vzorky byly nejdříve zkontrolovány okometricky a pomocí měření absorbance při 414 nm (viz 4.5.2). Pro vyloučení případné hemolýzy byly použity jen vzorky s absorbancí < 0,1. Vzorky byly centrifugovány (5 minut na 16 000× g při 4 °C) a smíseny do tří samostatných vzorků o minimálním objemu 2 ml. Dále byla použita suspenze krevních buněk zbylá po separaci plasmy při primárním zpracování krve (viz 4.1), která byla před použitím min 10 minut vortexována a minimálně jednou zamrazena a rozmrazena k zajištění lýze buněk. Následně byla připravena ředící řada dle *Tabulky 9* (str. 47).

Tabulka 9 – Postup přípravy vzorků pro detekci hemolýzy v plasmě

vzorek	suspenze krevních buněk (v/v, %)	postup
S1	2	8 µl suspenze krevních buněk + 392 µl plasma
S2	1	200 µl S1 + 200 µl plasma
S3	0,5	200 µl S2 + 200 µl plasma
S4	0,2	200 µl S3 + 200 µl plasma
S5	0,125	200 µl S4 + 200 µl plasma
S6	0,0625	200 µl S5 + 200 µl plasma
S7	0,03125	200 µl S6 + 200 µl plasma
S8	0	200 µl plasma

4.5.2 Měření absorbance

Hemolýza byla měřena v plasmě při 414 nm na přístroji NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific). Z každého vzorku byly odebrány 2 µl do 0,2ml zkumavky a vzorky byly ponechány minimálně 10 minut při pokojové teplotě. Před použitím byl přístroj očištěn 5 µl dH₂O a poté bylo postupně pipetováno po 1 µl každého vzorku a byla měřena absorbance. Absorbance byla měřena z plasmy před i po primární centrifugaci plasmy.

4.5.3 qPCR

Ze vzorků ředící řady směsi plasmy a suspenze krevních buněk byla bezprostředně po přípravě izolována RNA pomocí metody miRNAeasy Serum/Plasma kit (viz 4.2.2) a následně byla provedena reverzní transkripce a qPCR pro exogenní kontroly (ath-miR-159a a cel-miR-39), hsa-miR-451 a hsa-miR-23a (viz 4.3.1 a 4.3.2). V případě hsa-miR-451 a hsa-miR-23a byla ještě před měřením qPCR samotných vzorků ověřena účinnost tzv. esejí (TaqMan Small RNA Assay). Účinnost byla pozorována při třech různých teplotách pro nasednutí primerů a amplifikaci a to při 60 °C, 58 °C a 56 °C. Pro hsa-miR-23a i hsa-miR-451 byla zvolena teplota pro nasednutí primerů a amplifikaci 56 °C.

Výsledek byl určen jako rozdíl $\Delta Cq = Cq(\text{hsa-miR-451}) - Cq(\text{hsa-miR-23a})$.

4.6 Příprava knihovny

Pro přípravu knihovny krátkých RNA molekul byly použity vzorky plasmy od pacientů s karcinomem prsu (n=8). Ze 400 μ l plasmy byla izolována RNA (4.2.2) a zkontrolována koncentrace a kvalita měřením koncentrace miRNA pomocí kitu Qubit™ microRNA Assay Kit (viz 4.3.1), absorbance při 414 nm (viz 4.5.2) a detekcí 3 miRNA (hsa-miR-16, cel-miR-39 a ath-miR-159a) pomocí reverzní transkripce a qPCR (viz 4.4). Pro samotnou přípravu knihovny krátkých RNA molekul byly použity 2 kity, NEXTFLEX Small RNA-Seq kit (PerkinElmer) a QIAseq miRNA UDI Library kit (Qiagen). Oba kity jsou založeny na vlastnosti maturovaných miRNA molekul, které jsou na svých 3' a 5' koncích ukončeny hydroxylovou resp. fosfátovou skupinou, což umožňuje specifickou ligaci adaptérů a univerzální reverzní transkripci. Při reverzní transkripci jsou u druhého kitu do sekvence navíc zařazeny unikátní molekulární indexy (UMI) a při amplifikaci jsou využity univerzální duální indexy (UDI) (viz 1.3.2.3).

4.6.1 NEXTFLEX Small RNA-Seq Kit

Ligace prvního adaptéru

Do stripu bylo napipetováno 11 μ l RNA, následně byla provedena inkubace při 70 °C na 2 minuty (denaturace DNA) a po vložení na led byly vzorky inkubovány 5 minut. Byl naředěn 4N Adenylated Adapter v poměru 1:4 (3 μ l adaptéru + 9 μ l dH₂O), který byl použit pro přípravu mixu (*Tabulka 10*). Do jamek bylo pipetováno 9,5 μ l připraveného mixu do celkového objemu 20,5 μ l. Do posledního vzorku bylo přidáno pouze 4,5 μ l směsi z důvodu nedostatku chemikálií mastermixu v kitu a celkový objem byl proto doplněn 5 μ l dH₂O. Vzorky byly pečlivě promíchány pipetou a byly inkubovány přes noc při 20 °C.

Tabulka 10 – Objemy potřebné pro přípravu mixu pro ligaci na 3' konci

složka	objem pro 8 vzorků (μ l)
naředěný 4N Adenylated Adapter	9
3' Ligation Buffer	63
3' Ligation Enzyme Mix	13,5

Odstranění adaptéru

Druhý den byl připraven mix smícháním 25 μ l Adapter Depletion Solution s 40 μ l magnetických kuliček a 60 μ l isopropanolu. Ke každému vzorku RNA bylo napipetováno 125 μ l tohoto mixu a vše bylo promícháno pipetou. Vzorky byly inkubovány 5 minut a poté byly vloženy na magnetický stojánek na 5 minut. Supernatant byl odstraněn a kuličky byly 2 \times opláchnuty 180 μ l 80% ethanolu. Ethanol byl odebrán po 30 s inkubace a po další 3minutové inkubaci byl pipetou opatrně odstraněn zbytek kapaliny. Strip byl odstraněn ze stojánku a kuličky byly resuspendovány ve 22 μ l resuspendačního pufru. Po 2minutové inkubaci byl strip vložen zpět na magnetický stojánek na 3 minuty a bylo odebráno 20 μ l supernatantu do nového stripu. Poté byl připraven další mix smícháním 25 μ l Adapter Depletion solution s 40 μ l magnetických kuliček a 60 μ l isopropanolu. Ke vzorkům bylo napipetováno 125 μ l tohoto mixu, vzorky byly promíchány, inkubovány 5 minut a vloženy na magnetický stojánek na 5 minut nebo do doby, kdy byl roztok čirý. Po odstranění supernatantu byl proveden opět dvojitý oplach 180 μ l 80% ethanolu. Po 3minutové inkubaci byl pipetou odstraněn zbytek kapaliny. Vzorky byly přesunuty ze stojánku a kuličky byly resuspendovány ve 13 μ l dH₂O. Byla provedena 2minutová inkubace, vzorky byly vloženy na magnetický stojánek na 3 minuty a bylo odebráno 11,5 μ l supernatantu do nové řady stripu.

Inaktivace adaptéru

Dále byl připraven mix pro inaktivaci adaptéru podle *Tabulky 11* a ke každému vzorku bylo přidáno 2,5 μ l tohoto mixu. Vzorky byly promíchány a inkubovány 15 minut při 12 °C, 20 minut při 50 °C a ochlazeny na 4 °C v cykléru. Poté byl naředěn 5' 4N Adapter v poměru 1:4 a byl inkubován 2 minuty při 70 °C, přičemž byl následně hned vložen na led.

Tabulka 11 – Objemy potřebné pro přípravu mixu pro inaktivaci adaptéru

složka	objem pro 8 vzorků (μ l)
Adapter Inactivation Buffer	18
Adapter Inactivation Enzyme	4,5

Ligace druhého adaptéru

Byl připraven mix pro ligaci adaptéru na 5' konci (*Tabulka 12*), ke každému vzorku bylo přidáno 11 μl tohoto mixu a vzorky byly promíchány pipetou. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 20 °C.

Tabulka 12 – Objemy potřebné pro přípravu mixu pro ligaci na 5' konci

složka	objem pro 8 vzorků (μl)
naředěný 5' 4N Adapter	13,5
5' Ligation Buffer	67,5
5' Ligation Enzyme Mix	18

Reverzní transkripce

Podle *tabulky 13* byl připraven mix pro reverzní transkripci. Ke každému vzorku bylo přidáno 15 μl tohoto mixu, vzorky byly promíchány pipetou a inkubovány 30 minut při 42 °C a 10 minut při 90 °C.

Tabulka 13 – Objemy potřebné pro přípravu mixu pro reverzní transkripci

složka	objem pro 8 vzorků (μl)
RT Buffer	117
M-MuLV Reverse Transcriptase	18

Přečištění magnetickými kuličkami

Po reverzní transkripci RNA byl připraven mix smícháním 10 μl Adapter Depletion Solution s 40 μl magnetických kuliček a 90 μl isopropanolu a ke každému vzorku bylo přidáno 140 μl tohoto mixu. Po promíchání a 5minutové inkubaci byly vzorky vloženy na magnetický stojánek, dokud nebyl roztok zcela čirý. Supernatant byl odstraněn a byl proveden dvojitý oplach 180 μl 80% ethanolu. Byla provedena 3minutová inkubace a pipetou byl opatrně odstraněn zbytek kapaliny na dně stripu. Strip byl odebrán ze stojánku a kuličky byly resuspendovány ve 20 μl

dH₂O. Byla provedena 2minutová inkubace a strip byl vložen zpět na stojánek, kde byl tak dlouho, dokud nebyl roztok čirý. Bylo odebráno 18 µl supernatantu do nové řady stripu.

PCR amplifikace

K 18 µl cDNA získaným z předchozího kroku byl napipetován 1 µl universálního primeru, 1 µl identifikátoru („Barcoded Primer“, pro každý vzorek byl použit jiný identifikátor) a 5 µl Small RNA PCR Master Mixu. Na cykléru byl nastaven program (*Tabulka 14*) a po ukončení bylo provedeno přečištění s využitím magnetických kuliček.

Tabulka 14 – Program pro provedení amplifikace

čas	teplota
2 minuty	95 °C
25 cyklů: 20 sekund	95 °C
30 sekund	60 °C
15 sekund	72 °C
2 minuty	72 °C

Přečištění magnetickými kuličkami

Ke každému vzorku bylo napipetováno 62,5 µl kuliček (Cleanup Beads) a vzorek byl promíchán pipetou. Dále byly vzorky inkubovány 5 minut a poté vloženy na magnetický stojánek na dalších 5 minut (dokud se roztok nejevil čirý). Supernatant byl odebrán a magnetické kuličky dvakrát opláchnuty 80% ethanolem (přidání 180 µl 80% ethanolu, inkubace 30 sekund, odstranění ethanolu). Nakonec byly vzorky inkubovány 2 minuty a všechna zbylá tekutina na dně byla opatrně odstraněna. Vzorky byly odstraněny ze stojánku a magnetické kuličky s navázanou DNA byly resuspendovány ve 13,5 µl pufru (Resuspension Buffer). Po 3minutové inkubaci na magnetickém stojánku bylo přeneseno 12 µl supernatantu do nového stripu. Takto byla připravena knihovna k sekvenování. Kontrola kvality knihovny byla provedena pomocí změření koncentrace Qubit™ dsDNA HS Assay Kitem (viz 4.3.3) a následně pomocí Agilent High Sensitivity DNA Kitu na přístroji Agilent Bioanalyzer (viz 4.3.4).

4.6.2 QIAseq miRNA UDI Library Kit

3' ligace

Nejprve byl naředěn QIAseq miRNA 3' Adapter v poměru 1:5 (2,2 μ l adaptéru + 8,8 μ l dH₂O) a poté připraven a opatrně promíchán ligační mix (*Tabulka 15*). Do stripu bylo napipetováno 20 μ l tohoto mixu a do každé jamky bylo napipetováno 5 μ l RNA. Vzorky byly promíchány, centrifugovány a inkubovány 1 hodinu při 28 °C, 20 minut při 65 °C. Po ukončení byly vzorky ochlazeny na 4 °C v cykléru.

Tabulka 15 – Objemy potřebné pro přípravu mixu pro ligaci na 3' konci

složka	objem pro 8 vzorků (μ l)
naředěný QIAseq miRNA 3' Adapter	11
QIAseq miRNA RI	11
QIAseq miRNA 3' Ligase	11
QIAseq miRNA 3' Buffer	22
Ligation Activator	110

5' ligace

UDI 5' Adapter byl naředěn v poměru 1:2,5 (4,4 μ l adaptéru + 6,6 μ l dH₂O) a ligační mix připraven mix na ledu dle *Tabulky 16*. Ke každému vzorku bylo přidáno 20 μ l tohoto mixu a byly inkubovány 30 minut při 28 °C, 20 minut při 65 °C a po ukončení ochlazeny na 4 °C v cykléru.

Tabulka 16 - Objemy potřebné pro přípravu mixu pro ligaci na 5' konci

složka	objem pro 8 vzorků (μ l)
naředěný UDI 5' Adapter	11
QIAseq miRNA RI	11
QIAseq miRNA 5' Ligase	11
QIAseq miRNA 5' Buffer	22
dH ₂ O	165

Reverzní transkripce

Ke vzorkům byly přidány 2 μl UDI RT iniciátoru, které byly poté promíchány a centrifugovány. Vzorky byly inkubovány dle *Tabulky 17*. QIAseq miRNA RT Primer byl naředěn v poměru 1:5 (4,4 μl primeru + 17,6 μl dH₂O) a mix pro reverzní transkripci připraven na ledu (*Tabulka 18*), přičemž ke každému vzorku bylo napipetováno 18 μl tohoto mixu.

Tabulka 17 – Inkubační časy s UDI RT iniciátorem

čas	teplota
2 minuty	75 °C
2 minuty	70 °C
2 minuty	65 °C
2 minuty	60 °C
2 minuty	55 °C
5 minut	37 °C
5 minut	25 °C

Tabulka 18 – Objemy potřebné pro přípravu mixu pro reverzní transkripci

složka	objem pro 8 vzorků (μl)
QIAseq miRNA RT Primer	22
dH ₂ O	22
QIAseq miRNA RT Buffer	132
QIAseq miRNA RI	11
QIAseq miRNA RT Enzyme	11

Vzorky byly promíchány pipetou, inkubovány 1 hodinu při 50 °C, 15 minut při 70 °C a po ukončení ochlazeny na 4 °C v cykléru.

Příprava QIAseq miRNA magnetických kuliček

Magnetické kuličky byly pečlivě promíchány na vortexu a bylo odebráno 2 \times 1,6 ml a 800 μl do 2ml zkumavek. Strip byl vložen na magnetický stojánek, a jakmile byl roztok zcela čirý, byl supernatant odebrán. Ke kuličkám bylo napipetováno 2 \times 600 μl a 300 μl QIAseq Bead Binding pufu. Kuličky byly resuspendovány, krátce centrifugovány na stolní centrifuze a odděleny

vložení na magnetický stojánek. Po vzniku čirého roztoku byl odebrán supernatant a kuličky byly resuspendovány v 1,6 ml a 800 µl QIAseq Bead Binding pufru.

Přečištění cDNA

Vzorky cDNA byly krátce centrifugovány a ke každému bylo napipetováno 143 µl kuliček. Vzorky byly promíchány na vortexu 3 s, krátce centrifugovány a inkubovány 5 minut při pokojové teplotě. Vzorky byly vloženy na magnetický stojánek do té doby, dokud nevznikl zcela čirý roztok. Supernatant byl odebrán a magnetické kuličky dvakrát opláchnuty 80% ethanolem (přidání 200 µl 80% ethanolu a okamžité odebrání ethanolu). Všechna zbylá tekutina na dně byla opatrně odstraněna. Kuličky byly sušeny při pokojové teplotě 10 minut. Ke vzorkům bylo přidáno 17 µl dH₂O a byly promíchány na vortexu, dokud se kuličky neresuspendovaly. Vzorky byly krátce centrifugovány a inkubovány 2 minuty při pokojové teplotě. Strip byl vrácen zpět na magnetický stojánek a po migraci kuliček bylo odebráno 15 µl vzorku do nové řady.

Amplifikace s využitím indexů

Amplifikační mix byl připraven dle *Tabulky 19* a ke každému vzorku bylo přidáno 33 µl. Dále byly ke vzorkům napipetovány 2 µl nukleotidového indexu (UDI) jako identifikátoru (pro každý vzorek byl použit jiný identifikátor). Na cykléru byl nastaven program pro amplifikaci (*Tabulka 20*, str. 55). Po ukončení byly vzorky krátce centrifugovány a ke každému bylo přidáno 47 µl magnetických kuliček a byly promíchány 3 sekundy na vortexu a krátce centrifugovány. Dále byly vzorky inkubovány 5 minut při pokojové teplotě a vloženy na magnetický stojánek.

Tabulka 19 – Objemy potřebné pro přípravu mixu pro amplifikaci

složka	objem pro 8 vzorků (µl)
QIAseq miRNA Library Buffer	80
HotStarTaq DNA Polymerase	12
dH ₂ O	172
Index z 1 jamky QIAseq miRNA 12 UDI Index destičky	2

Tabulka 20 – Program pro provedení amplifikace na cykléru

čas	teplota
15 minut	95 °C
22 cyklů: 15 sekund	95 °C
30 sekund	60 °C
15 sekund	72 °C
2 minuty	72 °C
-	4 °C

Po sedimentaci kuliček bylo odebráno 92 µl supernatantu do nového stripu a bylo k nim přidáno 83 µl kuliček, přičemž vzorky byly opět promíchány na vortexu a krátce centrifugovány. Vzorky byly opět inkubovány 5 minut a vloženy na magnetický stojánek. Po migraci kuliček byl odstraněn supernatant a bylo provedeno opětovné opláchnutí 200 µl 80% ethanolu. Po druhém oplachu byly pečlivě odstraněny zbytky tekutiny na dně a peleta byla při pokojové teplotě vysušena (cca 10 minut). Vzorky byly ponechány na stojánku a DNA navázaná na kuličky byla resuspendována v 17 µl dH₂O. Následně byly vzorky sundány, inkubovány 2 minuty a vloženy zpět na stojan. Po migraci kuliček bylo odebráno 15 µl supernatantu do nové řady stripu. U některých vzorků nebylo možné odebrat celých 15 µl a tak bylo chybějící množství doplněno dH₂O. Takto připravená knihovna byla analyzována pomocí měření koncentrace Qubit™ dsDNA HS Assay Kitem (viz 4.3.3) a následně pomocí Agilent High Sensitivity DNA Kitu na přístroji Agilent Bioanalyzer (viz 4.3.4).

4.6.3 Sekvence a bioinformatická analýza

Připravené vzorky knihoven byly naředěny na 4nM koncentraci v 1× TE pufru (Invitrogen™) a ekvimolárně smíseny. Takto připravená směs knihoven (tzv. pool) byla osekvenována v Servisní laboratoři funkční genomiky a bioinformatiky (Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.) pomocí kitu NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 bp) a NextSeq 500 sekvenátoru (Illumina).

Získaná hrubá a „demultiplexovaná“ sekvenační data ve formátu FASTQ byla zpracována programem Cutadapt (v4.2), pomocí kterého byly postupně odstraněny 1) adaptorové sekvence, 2) sekvence < 16 bp a 3' konce s kvalitou pod Q20 (Phred Quality Score) a 3) sekvence > 28 bp pro selekci miRNA molekul. Zbylé sekvence byly přiřazeny k referenčním sekvencím databáze miRBase v22.1 pomocí programu BWA (Burrow-Wheeler

Aligner, v0.7.17) a sečteny pomocí programu samtools (v1.6). Kvalita dat byla kontrolována pomocí programů FastQC (v0.11.9) a MultiQC (v1.14). Získané sekvence byly dále zpracovány v R (v4.2.2). Počty sekvencí byly normalizovány metodou CPM (counts per million) pomocí R balíčku edgeR (v3.40.2) Pro zobrazení dat byly využity balíčky ggpubr (v0.6.0) a ComplexHeatmap (v2.14.0).

4.7 Digitální PCR

Komplementární DNA byla rozmražena, promíchána, krátce centrifugována a na ledu naředěna na požadovanou koncentraci pomocí dH₂O na objem potřebný pro počet měřených miRNA molekul. Vzorky byly promíchány, centrifugovány a ponechány na ledu. Poté byly připraveny mixy (pro každou měřenou miRNA zvlášť) v objemu pro požadovaný počet vzorků měřených v duplikátech, které obsahovaly TaqMan Small RNA Assay (20x), 4× probe PCR master Mix (Qiagen) a dH₂O (*Tabulka 21*, str. 57). Objem jednotlivých reagensů byl zvýšen o 10 % z důvodu následného přepipetování na dPCR destičku. Do PCR destičky bylo napipetováno 10,56 µl mixu a 2,64 µl ředěné cDNA. Po promíchání a krátké centrifugaci bylo přepipetováno 12 µl do dPCR destičky o formátu 8,5K (8500 kompartmentů). Destička byla vložena do přístroje QIAcuity (Qiagen) a byl nastaven program (*Tabulka 22*, str. 57). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu QIAcuity software suite (v2.1.8.23, Qiagen). Hranice (cut-off) pro oddělení kompartmentů s pozitivní expresí od kompartmentů s negativní expresí byla volena manuálně na základě výsledků negativních kontrol obsahující dH₂O namísto vzorku.

Účinnost použitých esejí (TaqMan Small RNA Assays) s mastermixem pro dPCR (4× probe PCR master Mix) byla před použitím na dPCR ověřena pomocí dekadicky naředěných kontrolních vzorků na přístroji RotorGene. Jako kontrolní vzorek pro cel-miR-39 byl použit vzorek cDNA s exogenní cel-miR-39 (viz kapitola 4.2.1). Jako kontrolní vzorek pro hsa-miR-16 byl použit jeden ze vzorků cDNA připravený z RNA izolované z plasmy (viz kapitola 3.5).

Tabulka 21 – Objemy potřebné pro přípravu mixu pro qPCR

složka	objem pro 1 vzorek (μ l)	navýšený objem o 10 % (μ l)
dH ₂ O	6,0	6,6
TaqMan Small RNA Assay (20x)	0,6	0,66
4× probe PCR master Mix	3,0	3,3
objem cDNA	2,4	2,64
celkový objem reakce	12	13,2

Tabulka 22 – Program pro provedení qPCR

čas	teplota
2 minut	95 °C
40 cyklů:	
15 sekund	95 °C
60 sekund	60 °C

5. Výsledky

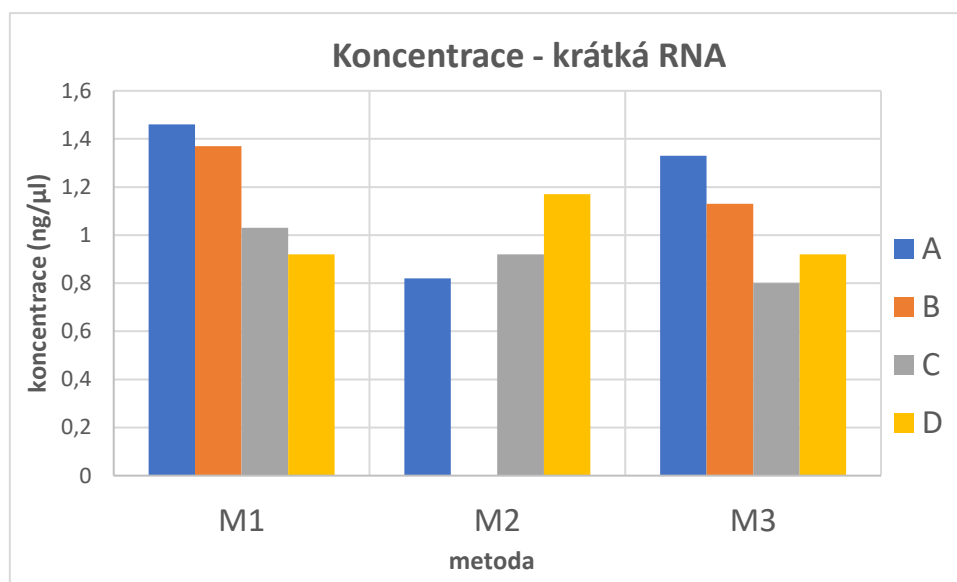
5.1 Optimalizace izolace RNA

K izolaci RNA z plasmy byly využity 3 kity: miRNeasy Serum/Plasma Kit (metoda, M1), miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (metoda 2, M2) a Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma Kit (metoda 3, M3). Bylo využito jednotné značení kitů a vzorků pro lepší přehlednost (viz *Tabulka 23*). Následně byly mezi sebou porovnávány pomocí kvantifikace izolované RNA dvěma kity: Qubit™ microRNA Assay Kit (kvantifikace krátkých RNA, 20 bp) a Quant-it™ RiboGreen RNA Assay Kit and Reagent (kvantifikace celkové RNA). Dále pak pomocí qPCR, kvantifikací exogenních kontrol a endogenní miRNA hsa-miR-16-5p, která se v plasmě vyskytuje přirozeně. Byly použity 4 vzorky, které byly popsány abecedně. Výsledky jsou shrnuty v *Tabulce 24* (str. 60) a na *obrázcích 7-9* (str. 59-60). Nejvyšší hodnoty koncentrací krátkých RNA molekul jsme získali metodou 1 (miRNeasy Serum/Plasma Kit), průměrně $1,195 \pm 0,226$ ng/ μ l, nejnižší výtěžky byly naopak u metody 2 (miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit), průměrně $0,728 \pm 0,439$ ng/ μ l. Metodou 2 se podařilo oproti tomu izolovat nejvíce celkové RNA (u tří ze čtyř izolovaných vzorků), průměrná hodnota $0,424 \pm 0,270$ ng/ μ l. Nejnižší hodnoty ct endogenní hsa-miR-16-5p, odpovídající vyšší koncentraci RNA, byly naměřeny u vzorků izolovaných metodami 1 a 3, nicméně rozdíly u jednotlivých izolačních metod nebyly výrazné. Vzhledem k nejvyšším hodnotám koncentrací krátkých RNA molekul a odpovídajícím nízkým hodnotám ct pro hsa-miR-16-5p byla pro další izolace RNA zvolena metoda 1. U metody 2 byl také sledován vliv glykogenu na izolaci. Hodnoty ct endogenní hsa-miR-16-5p neukázaly výrazné zlepšení výtěžnosti po přidání glykogenu ($26,14 \pm 3,22$) v porovnání s variantou, kdy glykogen nebyl použit ($24,59 \pm 2,35$).

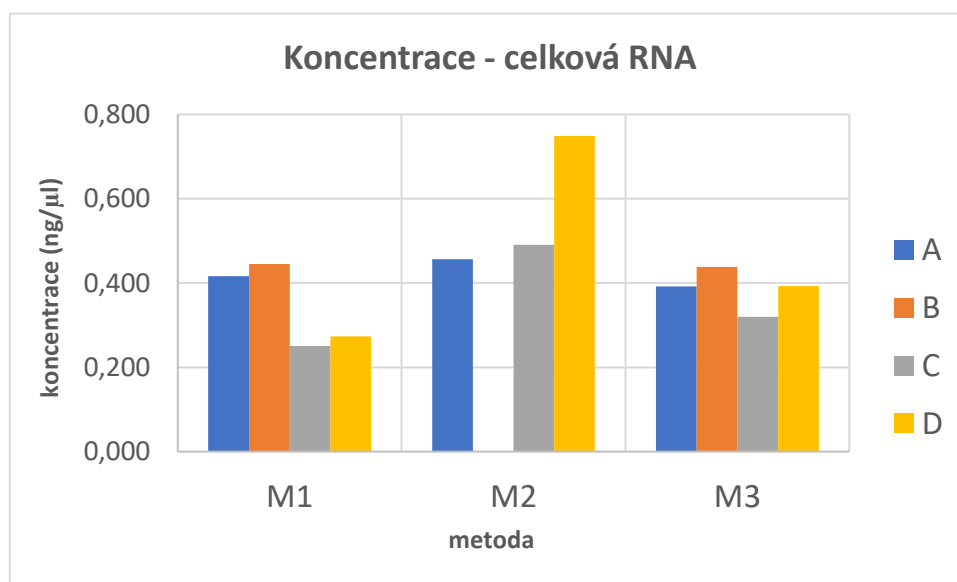
Tabulka 23 – Jednotné značení kitů a vzorků pro lepší přehlednost

izolační kity	miRNeasy Serum/Plasma Kit	M1
	miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit	M2
	Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma Kit	M3
	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	M4

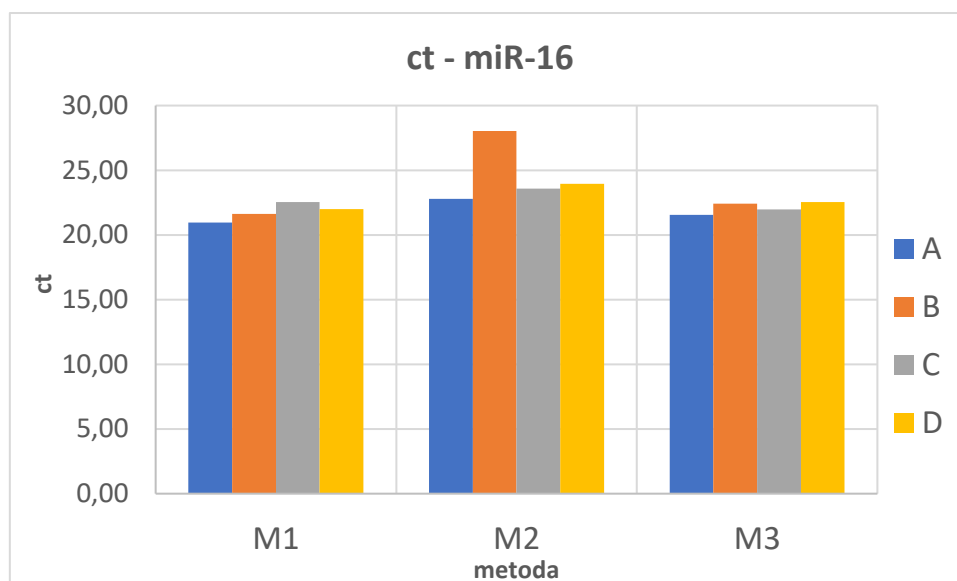
vzorky	vzorek 1	A
	vzorek 2	B
	vzorek 3	C
	vzorek 4	D



Obrázek 7 – Hodnoty koncentrací krátkých RNA molekul (ng/μl) izolované ze vzorků A-D třemi izolačními kity. Chybějící hodnoty v grafech odpovídají hodnotám, které byly pod limitem detekce.



Obrázek 8 - Hodnoty koncentrací celkové RNA (ng/μl) izolované ze vzorků A-D třemi izolačními kity. Chybějící hodnoty v grafech odpovídají hodnotám, které byly pod limitem detekce.



Obrázek 9 – Hodnoty ct získané při detekci hsa-miR-16 pomocí qPCR.

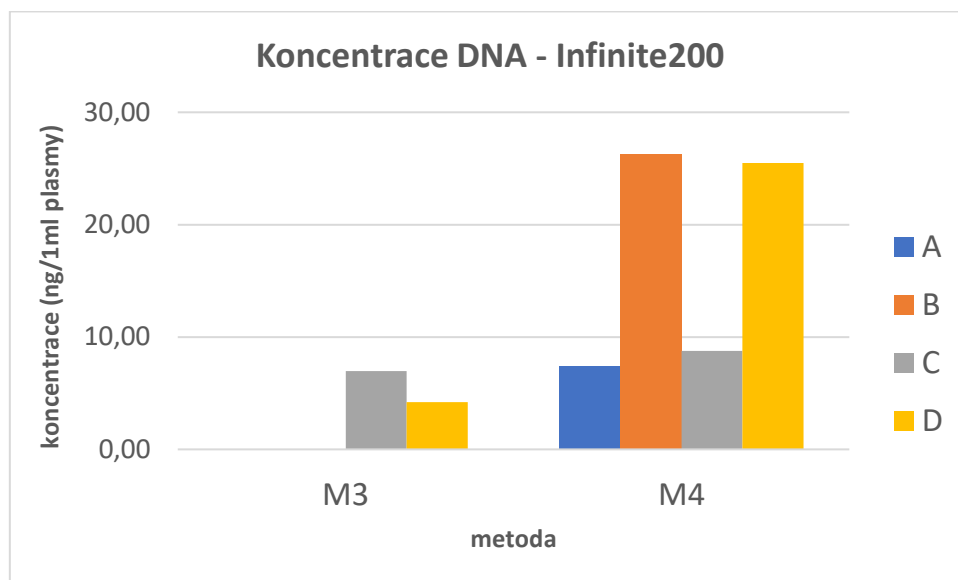
Tabulka 24 – Průměrné hodnoty koncentrací celkové RNA, krátkých RNA molekul a hsa-miR-16 (ct) získané různými izolačními kity M1-M3

	M1	M2	M3
celková RNA (ng/μl)	0,347 ± 0,085	0,424 ± 0,270	0,386 ± 0,043
krátká RNA (ng/μl)	1,195 ± 0,226	0,728 ± 0,439	1,045 ± 0,203
hsa-miR-16 (ct)	21,78 ± 0,58	24,60 ± 2,03	22,12 ± 0,39

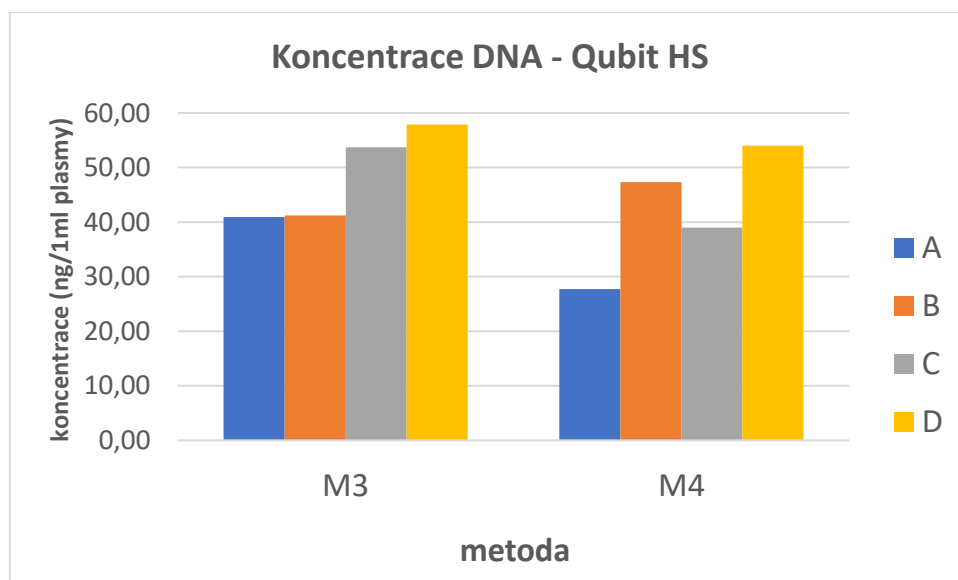
5.2 Optimalizace izolace DNA

K izolaci DNA z plasmy byly využity 2 kity: Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma Kit (M3) a QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (metoda 4, M4). Získané výtěžky DNA byly porovnány měřením koncentrace DNA pomocí 2 kitů: Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit and Reagent a Qubit™ dsDNA HS Assay Kit. Použity byly stejné 4 vzorky (A-D) jako v případě izolace RNA. Výsledky jsou shrnuty na *obrázku 10 a 11* (str. 61) a *Tabulce 25* (str. 62). Průměrné množství DNA získané z 1 ml plasmy měřené kitem Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit na Infinite200 bylo významně vyšší u izolační metody 4 ($17,00 \pm 8,92$ ng/ml plasmy) v porovnání s metodou 3 ($2,80 \pm 2,96$ ng/ml plasmy). Výsledky získané kitem Qubit™ dsDNA HS Assay Kit byly oproti tomu podobné, s mírně vyššími výtěžky získanými izolační metodou 3 ($48,45 \pm 7,50$ vs $42,00 \pm 9,82$ ng/ml plasmy). Vzhledem k výrazně odlišným výsledkům koncentrací izolované DNA při použití dvou odlišných kvantifikačních kitů, byla DNA navíc analyzována na vysoce citlivé automatické elektroforéze pomocí kitu Agilent High Sensitivity DNA na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer, který umožňuje zobrazení DNA, odečtení velikosti fragmentů i stanovení množství DNA. Výsledky jsou zobrazeny na *obr. 12* (str. 62), na kterém jsou viditelné DNA fragmenty o velikosti 150-180 bp a to převážně u vzorků

izolovaných metodou 4, což odpovídá výsledkům naměřeným kitem Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay. Přibližné hodnoty získaných koncentrací se pohybovaly od 57,6-372,5 ng/1 ml plasmy, při započtení fragmentů od 100 – 250 bp, a od 89,8 – 598,4 ng/ 1 ml plasmy, při započtení fragmentů od 100 – 600 bp. Pro izolaci DNA byla tedy zvolena metoda 4 (QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit).



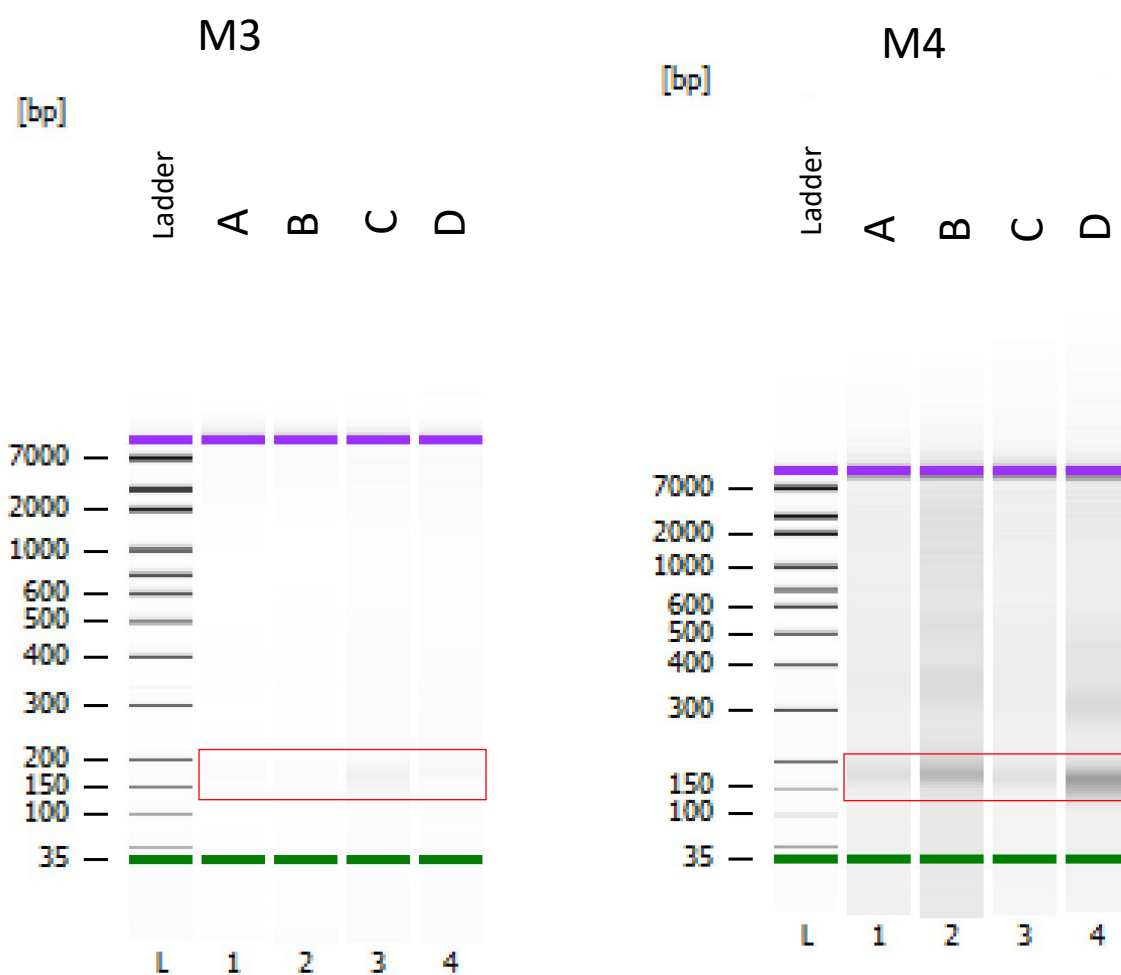
Obrázek 10 – Hodnoty koncentrací DNA (ng/ml plasmy) izolované ze vzorků A-D izolačními kity M3 a M4 na přístroji Infinite200. Chybějící hodnoty v grafech odpovídají hodnotám, které byly pod limitem detekce.



Obrázek 11 - Hodnoty koncentrací DNA (ng/ml plasmy) izolované ze vzorků A-D izolačními kity M3 a M4 na přístroji Qubit.

Tabulka 25 – Průměrné koncentrace DNA získané izolačními kity M3 a M4

typ měření	M3	M4
DNA (ng/ml plasmy) PicoGreen, Infinite200	2,80 ± 2,96	17,00 ± 8,92
DNA (ng/ml plasmy) Qubit HS assay	48,45 ± 7,50	42,00 ± 9,82



Obrázek 12 – Elektroferogramy, zobrazující izolovanou DNA ze vzorků A-D dvěma izolačními kity (M3 – Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma Kit, M4 – QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit), získaný automatickou elektroforézou na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer. Zvýrazněné pruhy DNA odpovídají přibližně velikosti 150 – 180 bp.

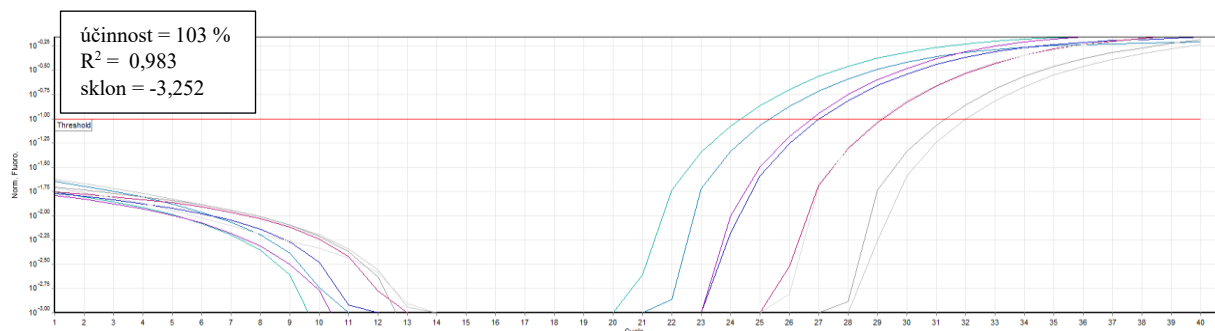
5.3 Detekce hemolýzy

Měření absorbance

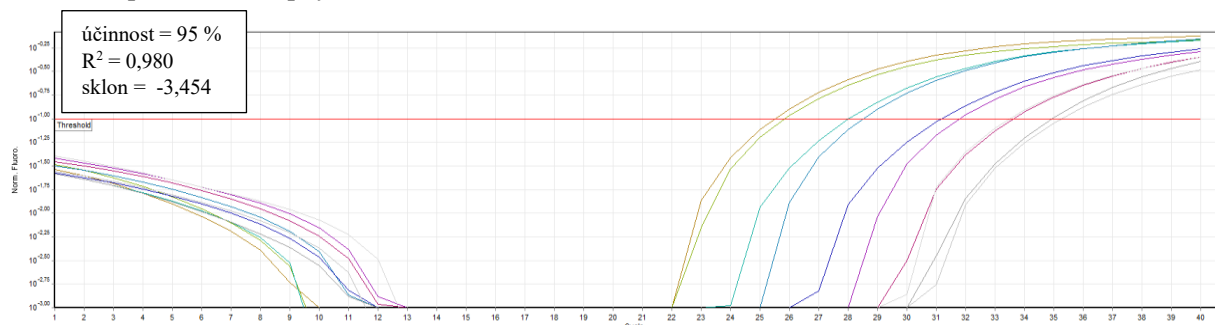
Hemolýza byla detekována měřením absorbance při 414 nm na přístroji NanoDrop2000 před i po primární centrifugaci. Centrifugace na hodnoty neměla vliv. Jako hraniční hodnota pro detekci hemolýzy byla použita absorbance 0,25 [62].

qPCR

Druhou metodou pro detekci hemolýzy byla qPCR, kdy byly detekovány dvě endogenní miRNA molekuly – hsa-miR-451 (přítomna v červených krvinkách) a hsa-miR-23a (konstantní exprese v plasmě). Nejprve byla provedena izolace vzorků připravených z konstantního objemu plasmy a suspenze krevních buněk od 2 – 0,03 % (v/v) následovaná samotnou detekcí miRNA molekul (viz kapitola 3.6). Pro tyto účely byla ještě ověřena účinnost esejí pro detekci hsa-miR-23a a hsa-miR-451 pomocí různých teplotních profilů pro nasednutí a elongaci primerů. Pro obě eseje byla zvolena teplota pro nasednutí primerů a amplifikaci 56 °C s účinností 103 % pro esej hsa-miR-451 a 95 % pro esej hsa-miR-23a (viz Obr. 13 a 14).



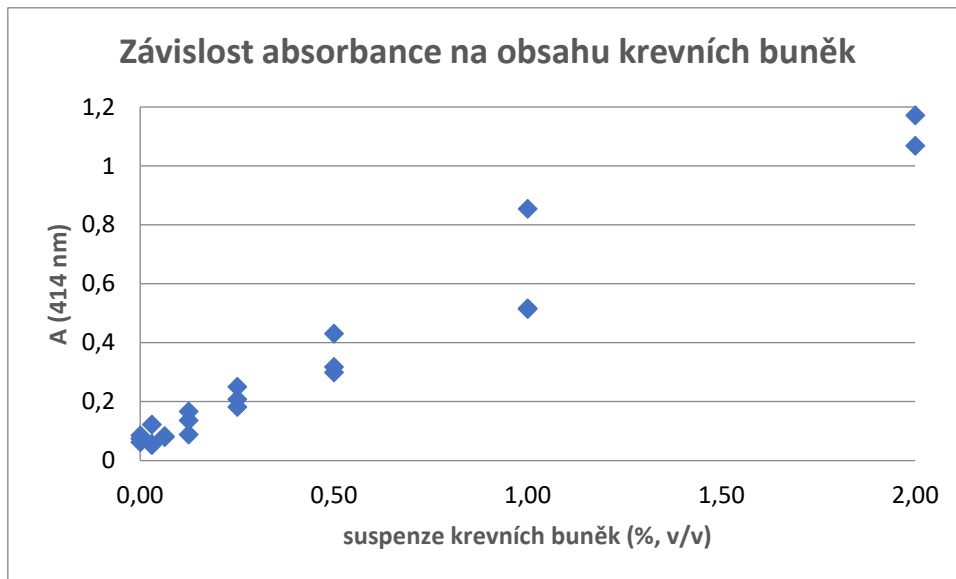
Obrázek 13 - Amplifikační křivky ředící řady endogenní miRNA hsa-miR-45 při teplotě 56 °C pro nasednutí primerů a amplifikaci.



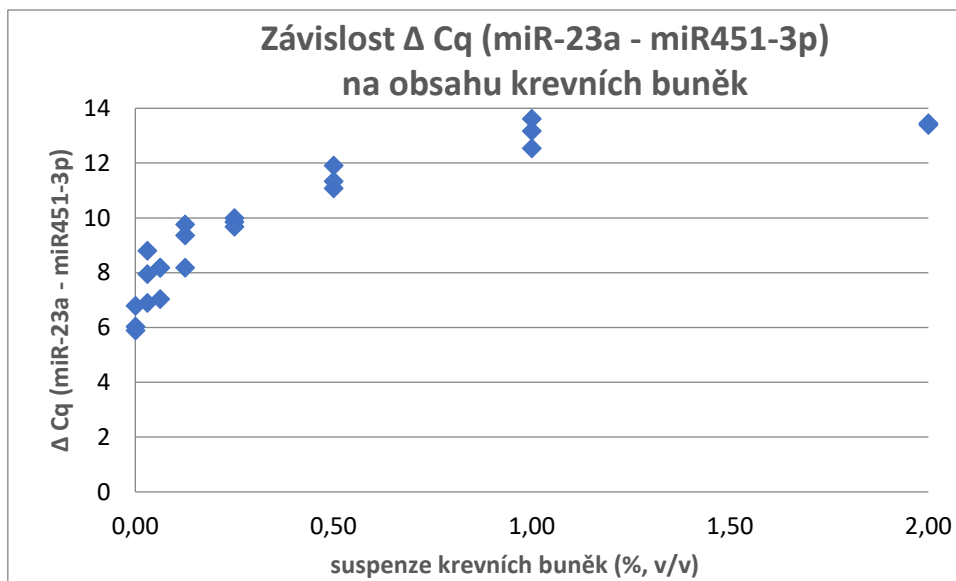
Obrázek 14 - Amplifikační křivky ředící řady endogenní miRNA hsa-miR-23a při teplotě 56 °C pro nasednutí primerů a amplifikaci.

Výsledky získané měřením absorbance a qPCR byly graficky zpracovány (viz Obrázek 15 – 17, str. 64-65). Z grafu na Obrázku 17 lze určit hraniční hodnotu pro detekci hemolýzy,

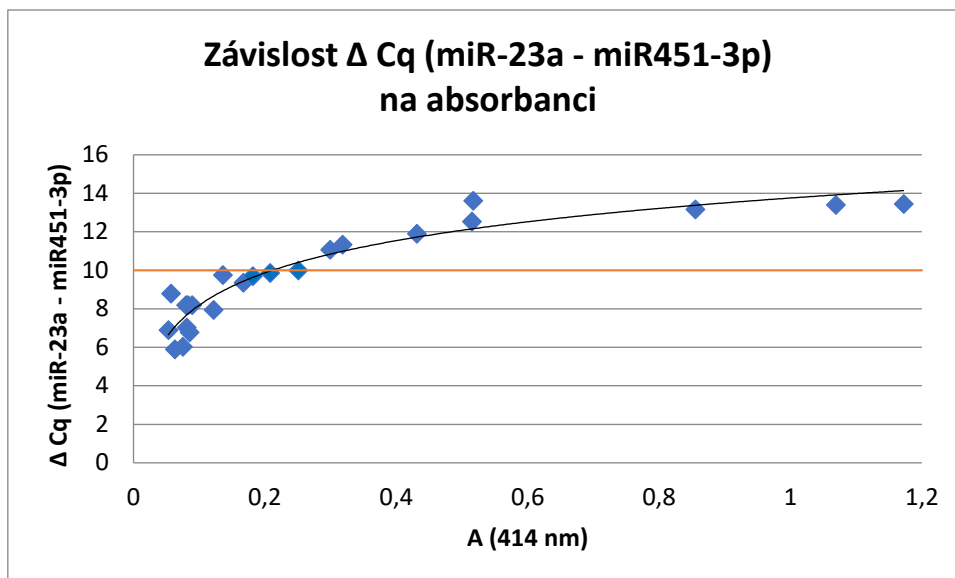
kteřá byla stanovena na $\Delta Cq=10$ odpovídatjící absorbanco 0,25, přičemž této absorbanco odpovídal 0,25% suspenze krevních buněk.



Obrázek 15 – Graf závislosti absorbanco při 414 nm na obsahu krevních buněk ve vzorku.



Obrázek 16 – Graf závislosti ΔCq na obsahu krevních buněk ve vzorku.



Obrázek 17 – Graf závislosti ΔCq na absorbanci při 414 nm s vyznačenou hraniční hodnotou odečtenou na základě proložené křivky.

5.4 Optimalizace sekvenace krátkých RNA molekul

Pro přípravu knihoven pro NGS sekvenování krátkých RNA molekul byly použity dva kity: NEXTFLEX Small RNA-Seq kit a QIAseq miRNA UDI Library kit. Byla použita DNA izolovaná z celkem 8 vzorků plasmy (viz kapitola 4.6), kdy byl každý z těchto vzorků před izolací RNA ekvimolárně rozdělen do dvou alikvotů pro zpracování dvěma různými kity pro přípravu knihoven. Výsledky kontroly kvantity a kvality izolované RNA jsou obsahem *tabulky 26*.

Tabulka 26 – Hodnoty koncentrací miRNA (ng/μl) a ct (hsa-miR-16-5p, cel-miR-39-3p, ath-miR-159a) u 8 vzorků sloužících pro následnou přípravu knihovny pomocí dvou kitů

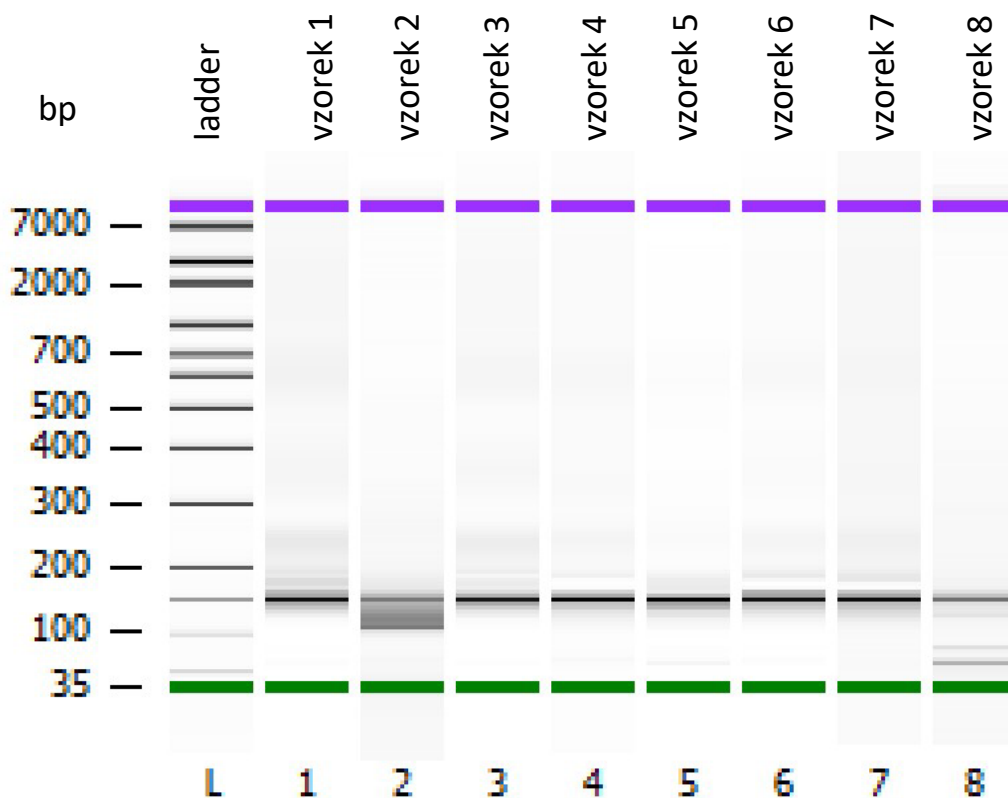
Vzorky pro NEXTFLEX Small RNA-Seq kit					Vzorky pro QIAseq miRNA UDI Library kit				
vzorek	koncentrace (ng/μl)	ct (hsa-miR-16-5p)	ct (cel-miR-39-3p)	ct (ath-miR-159a)	vzorek	koncentrace (ng/μl)	ct (hsa-miR-16-5p)	ct (cel-miR-39-3p)	ct (ath-miR-159a)
1	2,98	20,54	20,05	27,74	1	2,20	21,41	20,95	27,80
2	2,20	21,42	20,28	27,92	2	2,24	21,61	20,56	27,47
3	2,86	20,60	20,20	27,83	3	2,96	20,72	20,88	27,01
4	3,02	20,90	20,10	27,55	4	3,24	20,96	20,30	27,42
5	2,28	21,68	19,65	27,27	5	2,56	21,42	20,44	27,43
6	2,12	21,30	20,47	27,35	6	2,02	21,64	20,02	27,25
7	2,96	21,47	20,42	27,59	7	2,98	21,80	21,26	27,24
8	2,32	22,00	20,28	28,28	8	2,32	22,41	20,82	28,62

Pozn.: Jedná se o vzorky nehemolytické, které měly absorbanci pod hranicí 0,25.

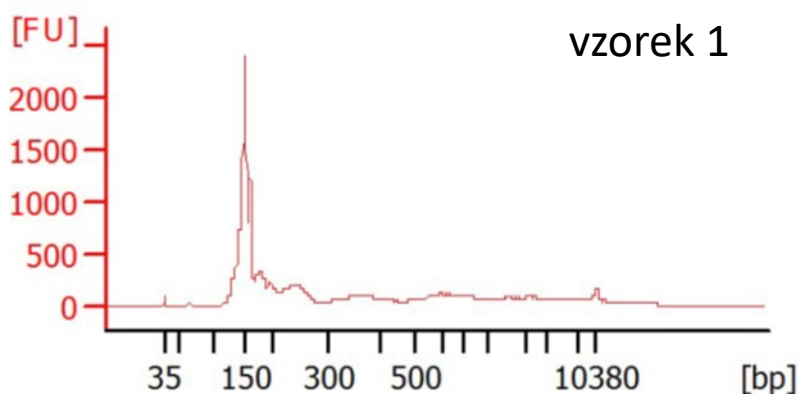
Pomocí kitu NEXTFLEX Small RNA-Seq kit se podařilo připravit knihovny s dostatečnou koncentrací a velikostí fragmentů 150 bp (*Tabulka 27* a *Obrázek 18* a *19*, str. 67). Druhým kitem na přípravu knihoven (QIAseq miRNA UDI Library kit) nebyly získány dostatečně vysoké koncentrace knihoven ani odpovídající velikost fragmentů a to ani při opakovaném pokusu o přípravu knihovny.

Tabulka 27 – Hodnoty koncentrací a velikosti fragmentů DNA knihovny (ng/μl) připravené z 8 vzorků NEXTFLEX Small RNA-Seq kitem - měřeno na přístroji Agilent Bioanalyzer

vzorek	koncentrace (ng/μl)	velikost fragmentů (bp)
1	44,20	152
2	1,93	152
3	41,20	150
4	40,80	152
5	22,60	151
6	38,20	152
7	44,00	152
8	1,12	152



Obrázek 18 – Elektroferogram, zobrazující knihovnu připravenou NEXTFLEX Small RNA-Seq kitem, získaný automatickou elektroforézou na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer. Výrazné pruhy DNA odpovídají přibližně velikosti 150 bp.



Obrázek 19 - Křivka zobrazující měření připravené knihovny na přístroji Agilent Bioanalyzer – ukázáno na prvním vzorku

5.4.1 Kontrola kvality sekvenace krátkých RNA molekul

V rámci sekvenace krátkých RNA molekul se podařilo získat v průměru 16,9 milionů sekvencí na vzorek (od 4,9 do 24,2 mil) z nichž v průměru 2,5 mil (14,9 %) sekvencí bylo unikátních (Tabulka 28, str. 68). Po odstranění adaptorů, nekvalitních sekvencí, sekvencí mitochondriální

rRNA a tRNA, a sekvencí kratších 16 bp nebo delších 28 bp z hrubých dat (Obrázek 20 a 21, str. 69-70) zbylo v průměru 12 mil (od 3,9 do 17,2 mil) sekvencí pro následné mapování a kvantifikaci (filtrovaná data).

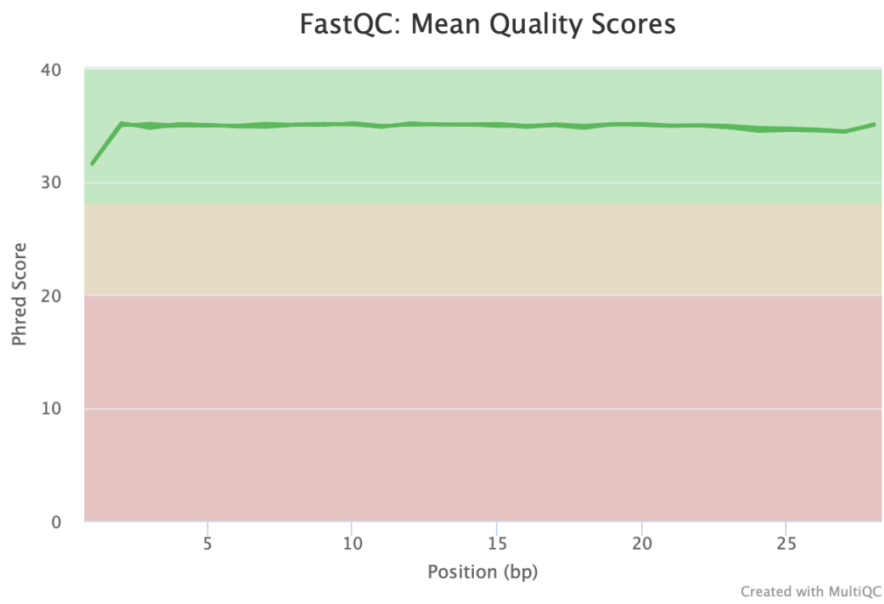
Tabulka 28 – Porovnání celkového počtu sekvencí a podílu unikátních sekvencí u hrubých a filtrovaných dat získaných ze sekvenace krátkých RNA molekul

vzorek	Hrubá data			Filtrovaná data		
	počet sekvencí (mil)	duplicitní sekvence (%)	unikátní sekvence (%)	počet sekvencí (mil)	duplicitní sekvence (%)	unikátní sekvence (%)
1	23,9	83,8	16,2	16,0	99,1	0,9
2	4,9	78,3	21,7	3,9	98,6	1,4
3	24,2	84,8	15,2	17,2	99,1	0,9
4	18,2	83,9	16,1	14,0	99,2	0,8
5	17,5	88,9	11,1	11,6	99,2	0,8
6	20,7	83,9	16,1	14,8	99,1	0,9
7	16,8	85,0	15,0	12,4	99,1	0,9
8	9,1	92,4	7,6	6,1	99,1	0,9

(A)

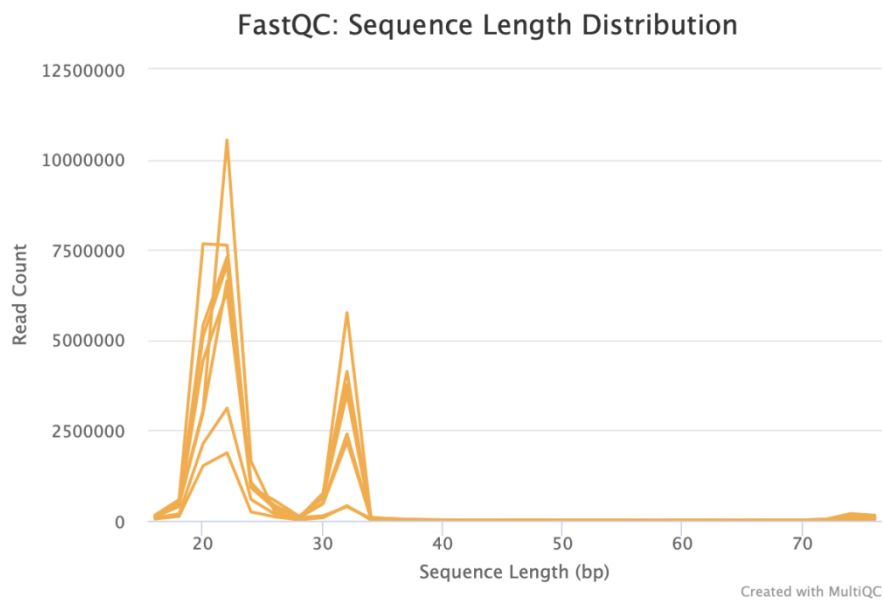


(B)

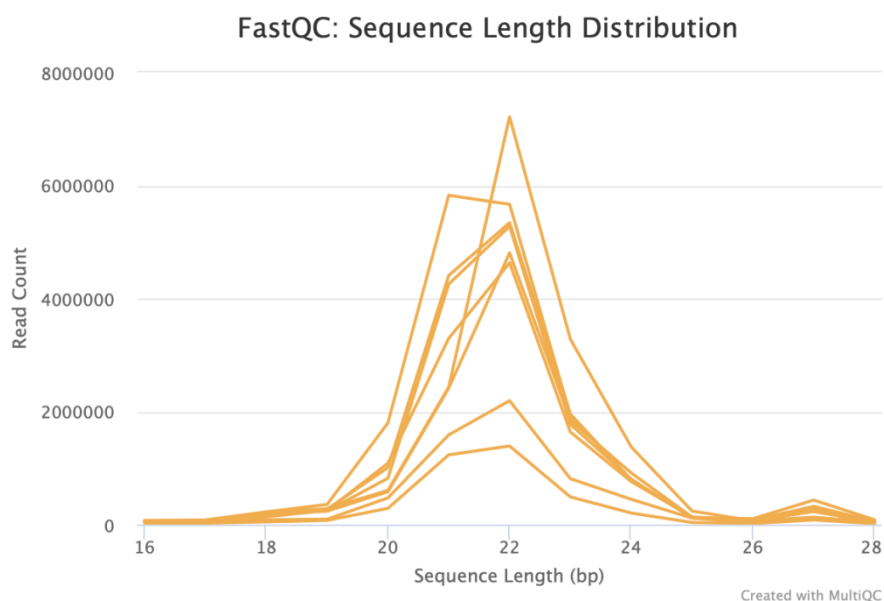


Obrázek 20 – Průměrná bázová kvalita (phred score) sekvenovaných vzorků u hrubých (A) a filtrovaných (B) dat.

(A)



(B)



Obrázek 21 – Počet a rozsah délky fragmentů získaných (A) po primární filtraci (filtrace adapterů, krátkých a nekvalitních sekvencí, mitochondriální rRNA a tRNA sekvencí), a (B) po odfiltrování fragmentů delších 28bp (selektce miRNA molekul).

5.4.2 Kvantifikace miRNA

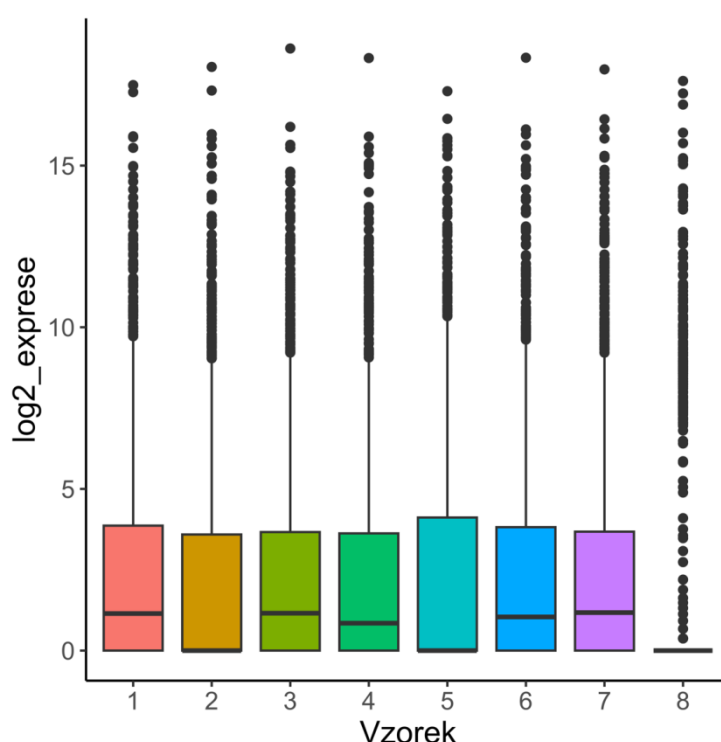
Sekvence zbylé po základní kontrole kvality byly následně přiřazeny (namapovány) na referenční sekvence 2656 miRNA molekul zahrnutých v databázi miRBase v22.1. V průměru se podařilo přiřadit 67,5 % sekvencí (od 55 – 75,5 %) (Tabulka 29).

Tabulka 29 – Množství úspěšně přiřazených sekvencí k referenčním miRNA sekvencím zahrnutých v miRBase databázi

vzorek	celkový počet sekvencí po filtraci	počet namapovaných sekvencí	podíl namapovaných sekvencí (%)	počet detekovaných unikátních miRNA
1	15987185	9898468	61,9	651
2	3927213	2806850	71,5	530
3	17246531	13020918	75,5	640
4	14025158	10009122	71,4	598
5	11563124	7359664	63,6	543
6	14825589	10404374	70,2	617
7	12392284	8745976	70,6	648
8	262125	144258	55,0	161

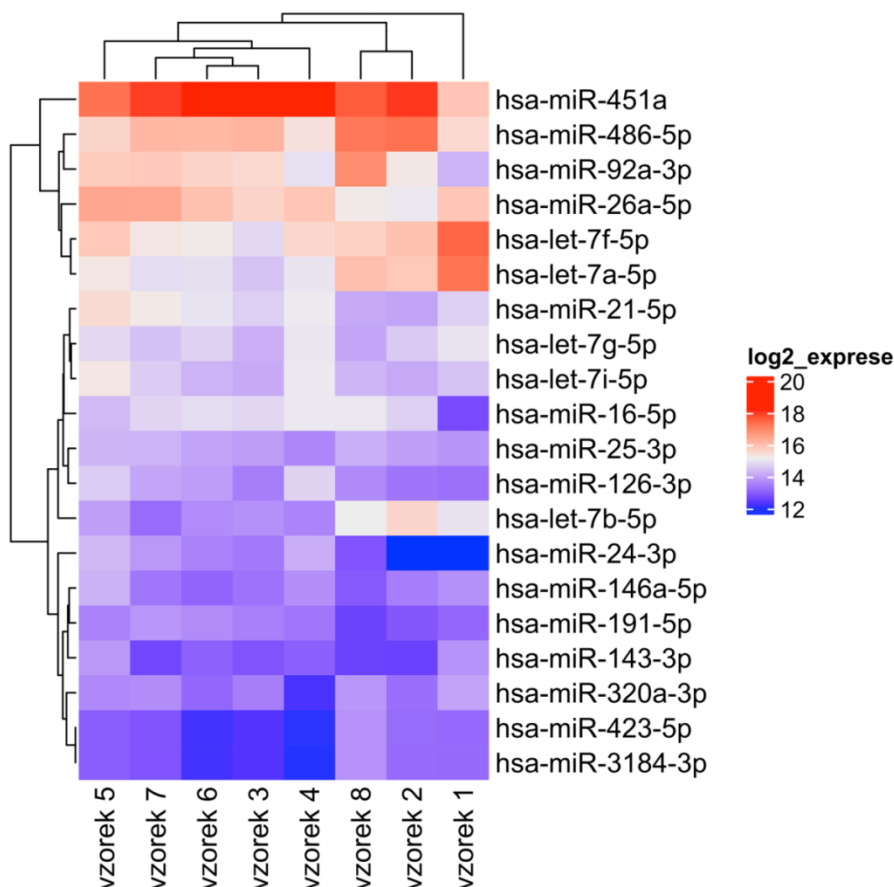
Namapované sekvence byly sečteny a normalizovány pomocí metody CPM. Výsledkem je počet sekvencí pro určitý gen při teoretické velikosti knihovny 1 milion, čímž se normalizují rozdíly v počtech sekvencí vzniklé různou hloubkou sekvenace u jednotlivých vzorků. Celkem se podařilo detekovat 1228 miRNA molekul s pozitivní expresí alespoň v jednom vzorku. V průměru se podařilo detekovat 549 ± 153 miRNA z 2658 zahrnutých v databázi miRBase v22.1 (Tabulka 29, str. 70).

Dále byla získaná data zlogaritmována pro kontrolu distribuce dat po normalizaci. Rozptyl expresí u jednotlivých vzorků je znázorněn na *Obrázku 22*. U vzorku 8 je vidět výrazně snížená exprese miRNA oproti ostatním vzorkům, která pravděpodobně souvisí s technickými problémy při přípravě knihovny u tohoto vzorku (viz kapitola 4.6.1).

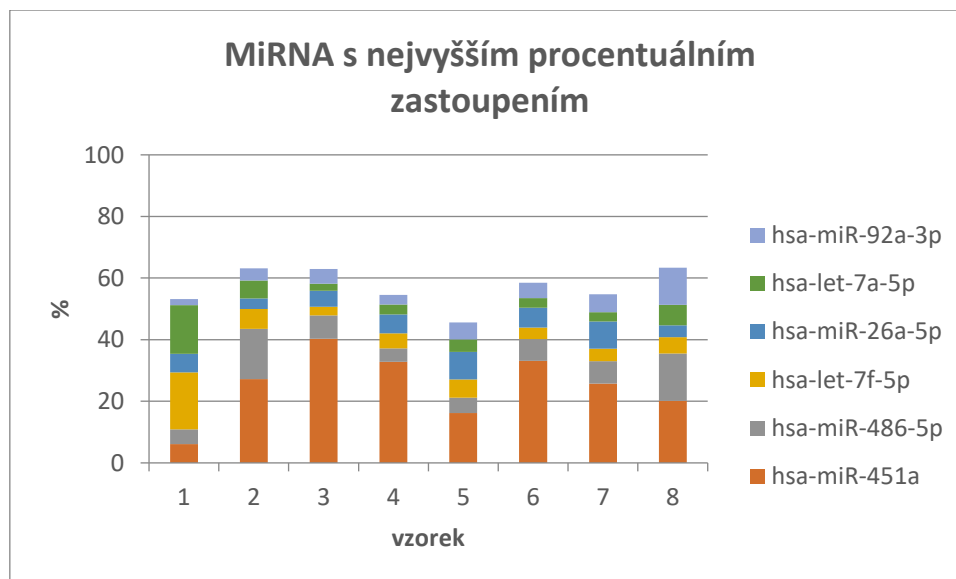


Obrázek 22 – Krabicové grafy zobrazující distribuce log2 transformovaných expresí všech detekovaných miRNA u jednotlivých vzorků.

Jako nejčastěji zastoupené miRNA molekuly v plasmě pacientů s nádorovým onemocněním (karcinom prsu) byly detekovány hsa-miR-451a, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-26a-5p a hsa-let-7f-5p. Expres dvaceti miRNA s nejvyšší souhrnou expresí ve vzorcích plasmy jsou znázorněny na *Obrázku 23* (str. 72). MiRNA s podílem sekvencí vyšším než 5 % z celkového počtu sekvencí daného vzorku jsou zobrazeny na *Obrázku 24* (str. 72).



Obrázek 23 – Heatmapa znázorňující log₂ transformované exprese a shlukovou analýzu na základě Euklidovské vzdálenosti dvaceti nejvíce zastoupených miRNA molekul v plasmě.

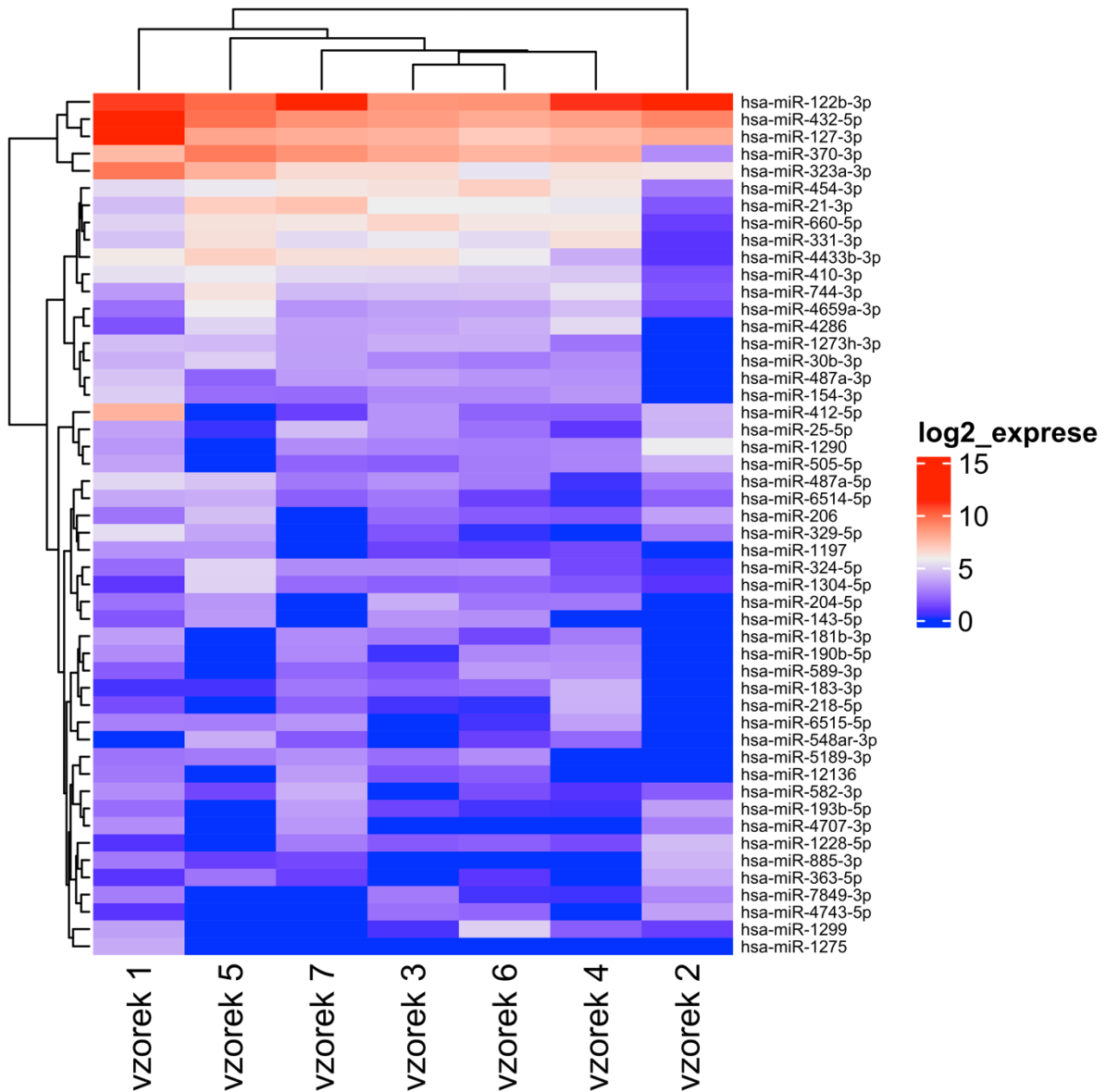


Obrázek 24 – MiRNA s podílem sekvencí vyšším než 5 % z celkového počtu sekvencí daného vzorku.

Mezi miRNA s nejvyšší variabilitou v plasmě byly identifikovány hsa-miR-370-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-4433b-3p, hsa-miR-412-5p a hsa-miR-329-5p. Expresní hladiny

padesáti miRNA s nejvyšší variabilitou ve studovaných vzorcích jsou znázorněny na *Obrázku 25*. Vzorek 8 byl vyřazen kvůli možnému zkreslení variability způsobenému technickými artefakty.

V *tabulce 30* (str. 74) jsou uvedeny CPM hodnoty u miRNA, jež sloužila jako exogenní (cel-miR-39 a ath-miR-159a) a endogenní (hsa-miR-16) kontrola homogenity izolací a u miRNA, která byla využita při stanovení míry hemolýzy (hsa-miR-23a a hsa-miR-451a).



Obrázek 25 - Heatmapa znázorňující log₂ transformované exprese a shlukovou analýzu na základě Euklidovské vzdálenosti padesáti miRNA s nejvyšší variabilitou.

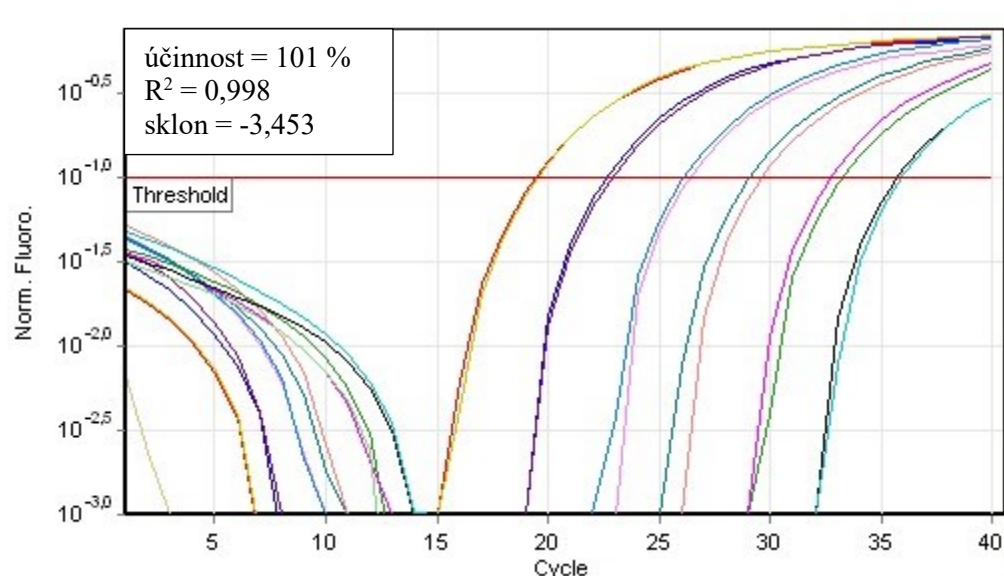
Tabulka 30 – Hodnoty CPM pro vybrané miRNA

vzorek	ath-miR-159a	cel-miR-39-3p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-451a
1	173,36	184,98	6677,60	5981,83	61375,96
2	390,83	674,78	26363,36	4145,22	271627,63
3	83,40	615,01	28311,60	7277,98	403372,48
4	57,95	386,85	33773,59	8296,23	328632,72
5	126,23	675,44	20805,57	11818,75	161446,09
6	136,48	813,89	29896,18	8578,32	330839,22
7	117,65	949,47	27642,88	7031,69	257760,48
8	824,24	1496,15	33663,27	3797,47	201086,51

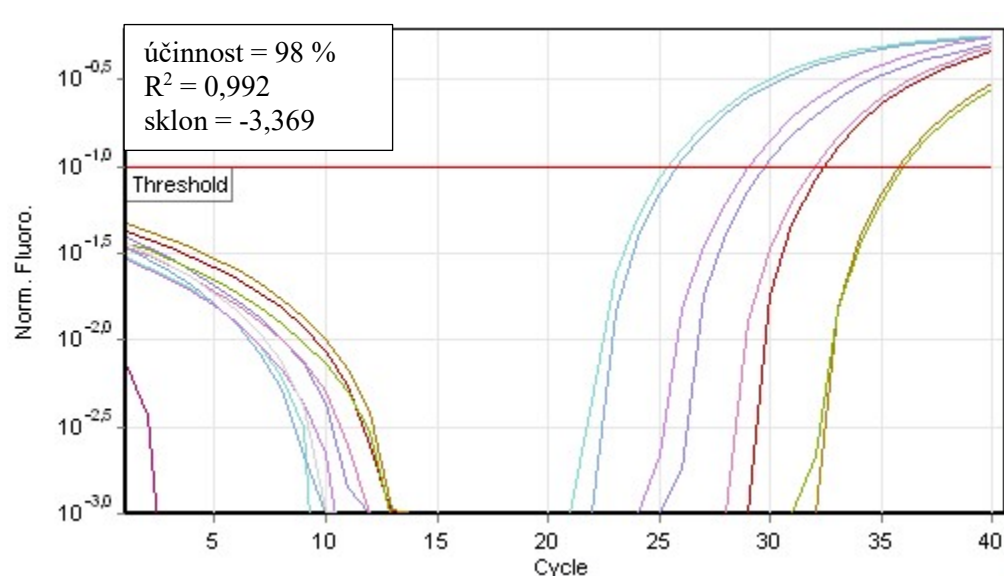
5.5 Optimalizace a stanovení miRNA exprese pomocí dPCR

Pro optimalizaci stanovení exprese miRNA genů pomocí digitální PCR byly vybrány dvě miRNA, cel-miR-39 a hsa-miR-16. Účinnost TaqMan esejí pro obě miRNA v kombinaci s mastermixem určeným pro dPCR byla nejdříve ověřena pomocí klasické qPCR a dekadických ředících řad (kalibračních křivek) vybraných cDNA vzorků (viz Metody). Kalibrační křivka pro cel-miR-39 byla připravena z kontrolní cDNA obsahující synteticky připravenou miRNA cel-miR-39 v koncentracích od $1,27 \times 10^{-3}$ - $1,27 \times 10^{-8}$ fmol/ μ l dPCR reakce. Účinnost amplifikace obou esejí byla mezi předpokládanými 90 – 110 % (Obrázek 26, str 75).

(A)



(B)



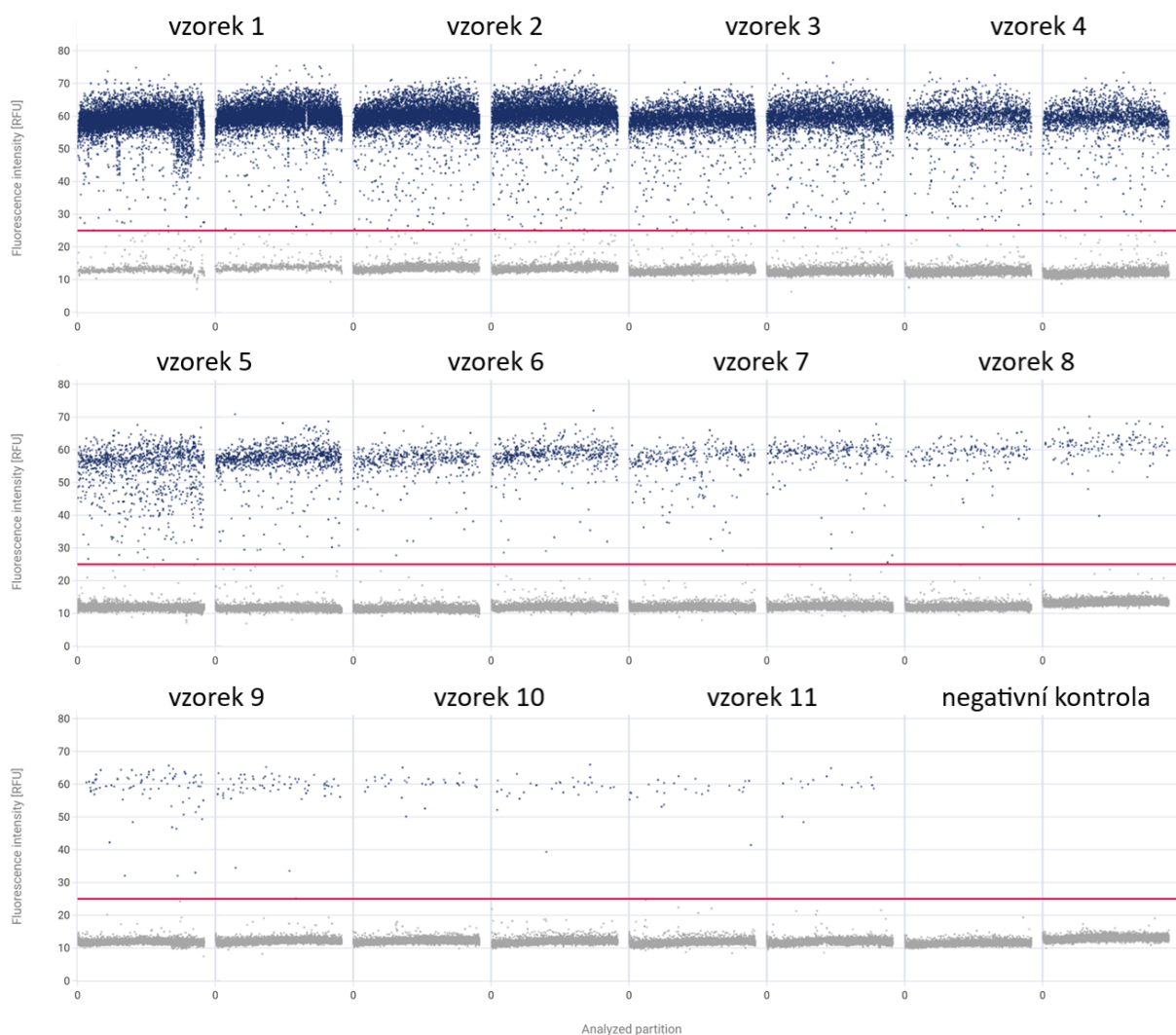
Obrázek 26 - Amplifikační křivky kalibrační řady (A) cel-miR-39 a (B) miR-16 se stanovenými účinnostmi amplifikace.

Pro stanovení dynamického rozsahu dPCR v porovnání s qPCR byl použita kontrolní cDNA obsahující cel-miR-39, která byla připravena dvojkovou ředící řadou s koncentracemi o rozsahu $1,27 \times 10^{-4} - 1,24 \times 10^{-7}$ fmol/ μ l dPCR nebo qPCR reakce, odpovídající přibližně 8000 – 8 kopiím/ μ l reakce (vzorek 1 – 11). Detekované počty kopií cel-miR-39 pomocí dPCR jsou shrnuty v *Tabulce 31* (str. 76) a zobrazeny na *Obrázku 27* (str. 77). Průměrné hodnoty kopií detekované dPCR, přesnost kvantifikace dPCR na základě predikovaného počtu kopií ve vzorcích a průměrné hodnoty Ct získané pomocí qPCR jsou zobrazeny na *Obrázku 28* (str. 79).

Tabulka 31 – Počet kopií cel-miR-39 detekovaný pomocí dPCR u dvojkové ředící řady (měřeno v duplikátech)

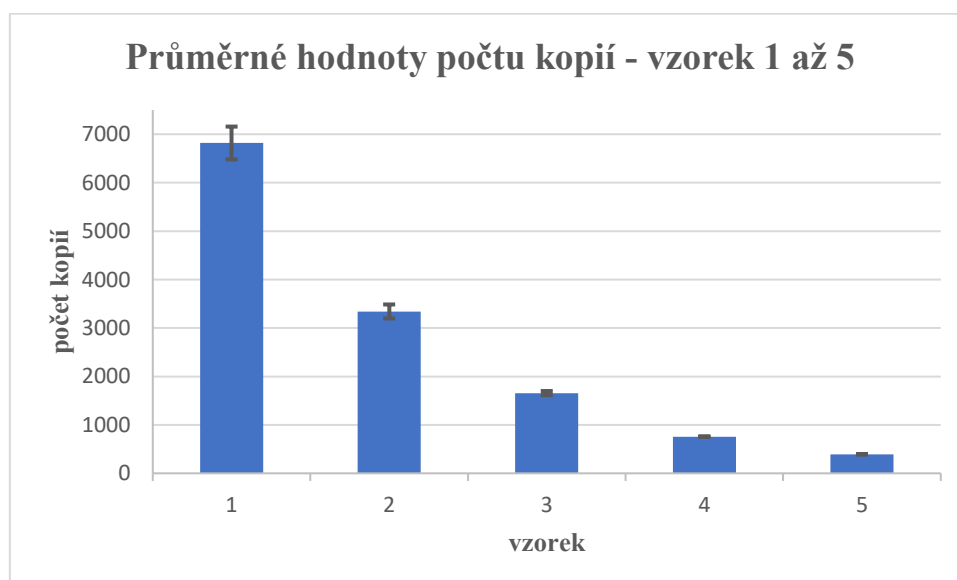
vzorek	počet kopií/ μ l rxn	CI (95%) ¹	počet validních kompartmentů	počet pozitivních kompartmentů	počet negativních kompartmentů	pravděpodobný počet kopií na kompartment	celkový počet kopií ve všech validních kompartmentech	celkový počet kopií v reakci
1	6579,9	2,90%	7874	7163	711	2,405	18934,2	78958,8
	7058,6	2,90%	8153	7460	693	2,465	20098,1	84703,2
2	3239,4	2,80%	8260	5579	2681	1,125	9294,4	38872,8
	3443,3	2,70%	8273	5713	2560	1,173	9704,1	41319,6
3	1686,3	3,30%	8282	3620	4662	0,575	4759,2	20235,6
	1626,5	3,30%	8253	3546	4707	0,562	4634,3	19518,0
4	757,8	4,50%	8188	1896	6292	0,263	2156,6	9093,6
	757,4	4,50%	8147	1945	6202	0,273	2222,3	9088,8
5	391,6	6,10%	8156	1020	7136	0,134	1089,7	4699,2
	394,7	6,20%	8250	986	7264	0,127	1050,1	4736,4
6	183,8	9,10%	8243	464	7779	0,058	477,6	2205,6
	193,6	8,80%	8255	494	7761	0,062	509,4	2323,2
7	104,1	12,00%	8237	268	7969	0,033	272,5	1249,2
	93,0	12,60%	8247	241	8006	0,030	244,6	1115,5
8	55,8	16,10%	8254	149	8105	0,018	150,4	669,6
	48,8	16,90%	8248	135	8113	0,017	136,1	585,36
9	28,9	21,60%	8187	82	8105	0,010	82,4	347,28
	24,5	23,90%	8250	67	8183	0,008	67,3	293,52
10	12,0	34,60%	8246	32	8214	0,004	32,1	143,76
	11,6	35,20%	8232	31	8201	0,004	31,1	139,44
11	9,9	38,40%	8252	26	8226	0,003	26,0	119,268
	6,6	47,50%	8115	17	8098	0,002	17,0	78,612

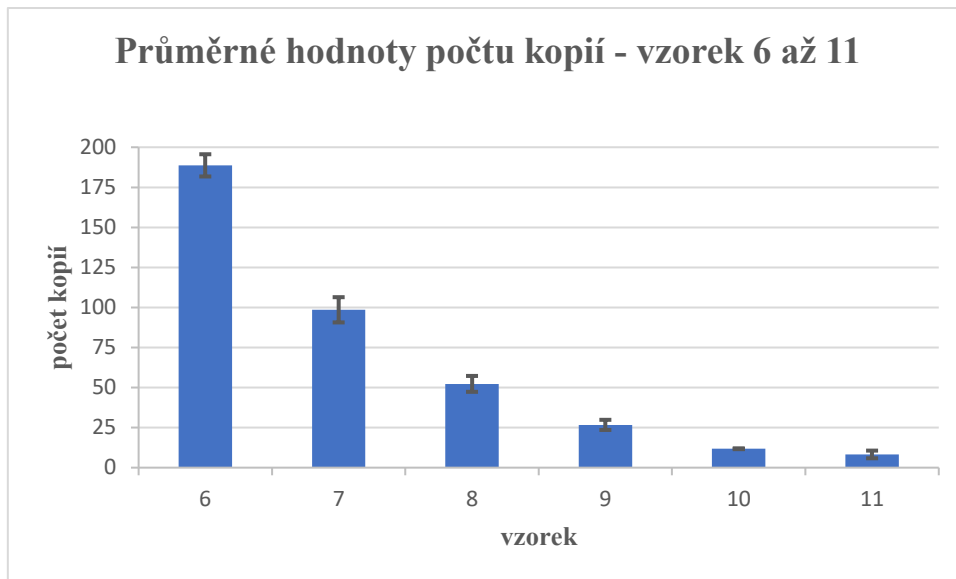
¹ CI (95%) značí konfidenční interval Poissonovy distribuční funkce



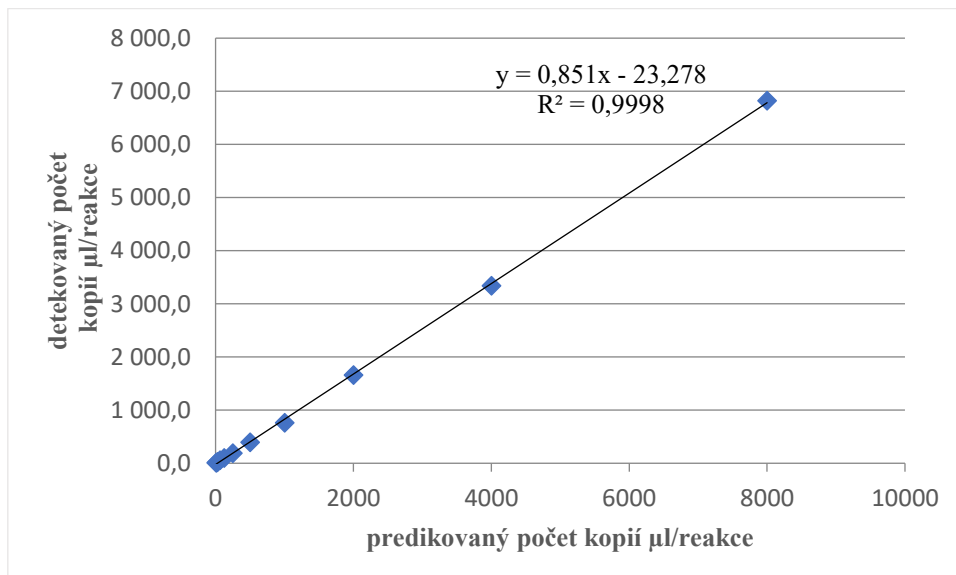
Obrázek 27 – Grafické znázornění detekovaného počtu kopií cel-miR-39 pomocí dPCR u jednotlivých vzorků. Měření bylo provedeno v duplikátech.

(A)

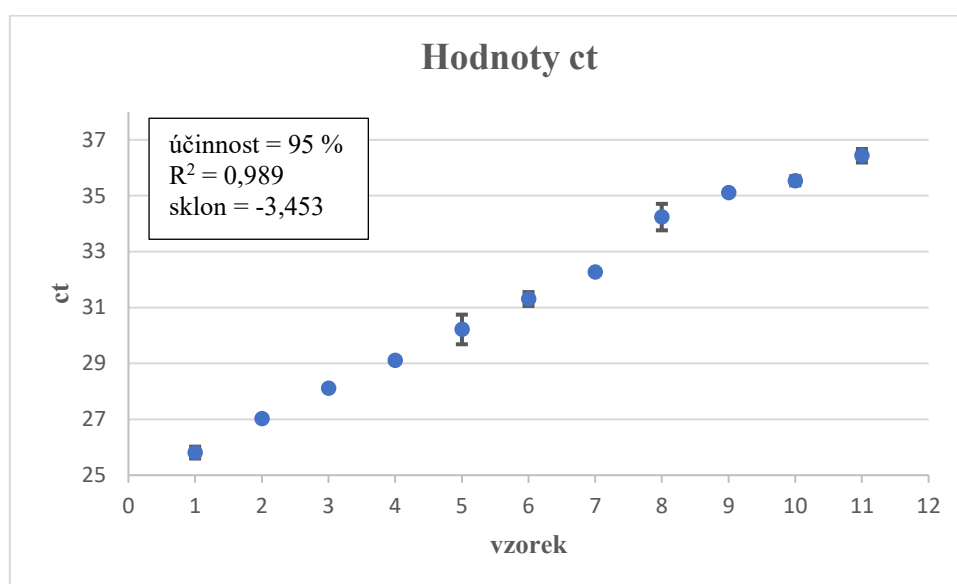




(B)



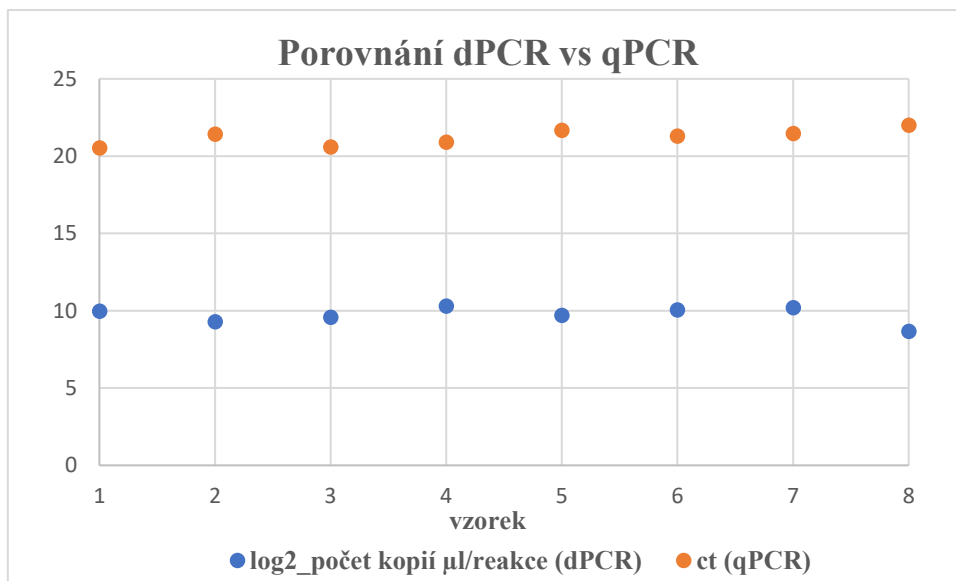
(C)



Obrázek 28 – Průměrné hodnoty kopií cel-miR-39 detekované dPCR (A), přesnost detekce na základě predikovaného počtu kopií ve vzorcích (B) a průměrné hodnoty Ct získané pomocí qPCR (C). Chybové úsečky značí směrodatné odchylky vypočtené ze dvou technických replikátů.

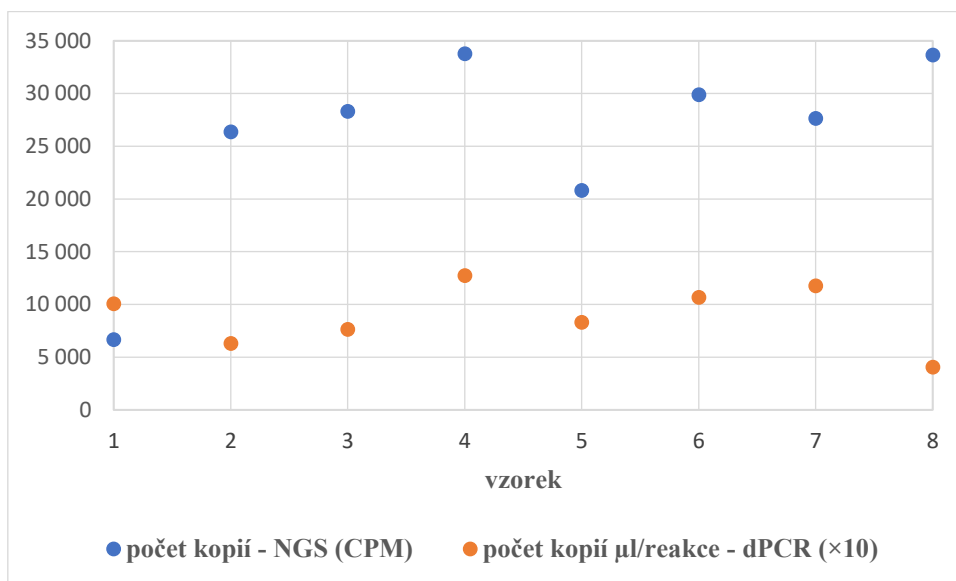
5.6 Srovnání stanovení exprese hsa-miR-16 pomocí qPCR, dPCR a sekvenace krátkých RNA molekul

Pro srovnání exprese miRNA genů pomocí qPCR, digitální PCR a NGS byla vybrána hsa-miR-16. Byla použita DNA izolovaná z celkem 8 vzorků plasmy (viz kapitola 4.6). Komplementární DNA pro dPCR a qPCR byla připravena z 2,5 μ l 25 \times ředěného izolátu získaného ze 400 μ l plasmy. Celkové ředění cDNA bylo 15 \times v případě qPCR a 50 \times v případě dPCR. Pro přípravu knihovny bylo použito 11 μ l izolátu. Porovnání jednotlivých metod je zobrazeno na obrázku 29 (str. 80) a 30 (str. 81). Ze získaných hodnot je viditelné, že pro detekci rozdílů v expresi mezi jednotlivými vzorky jsou dPCR i NGS výrazně citlivější metody v porovnání s qPCR. Při NGS došlo k detekci většího počtu kopií v porovnání s dPCR, nicméně i při vyřazení vzorku 8 jsme získali slabou pozitivní korelaci těchto dvou metod ($r = 0,2$, Obrázek 30 B, str. 82).

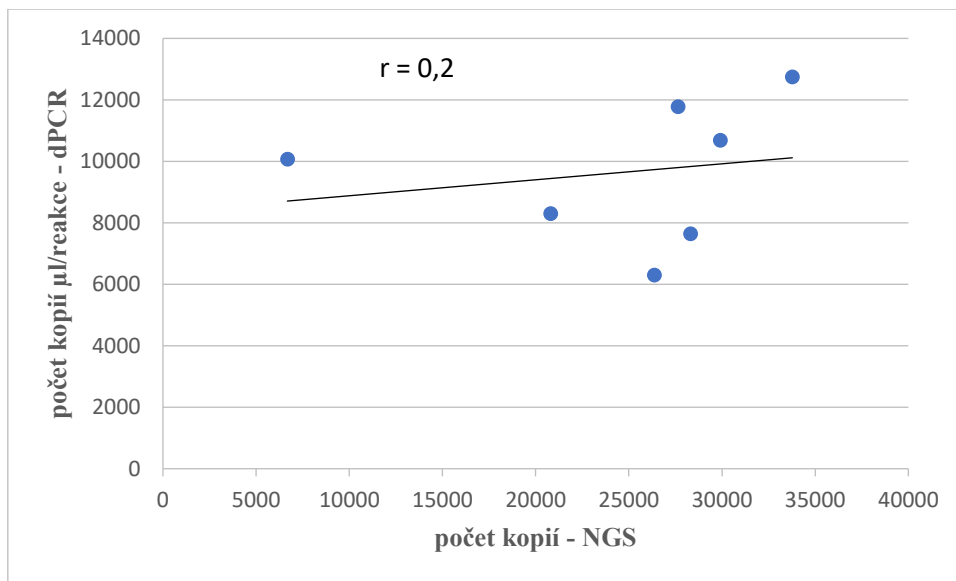


Obrázek 29 – Srovnání qPCR a dPCR při stanovení exprese hsa-miR-16. Vyšší hodnoty ct znamenají nižší expresi, zatímco nižší hodnoty ct naopak vyšší expresi.

(A)



(B)



Obrázek 30 – Stanovené počty kopií hsa-miR-16 pomocí NGS a dPCR (A), pro účely grafického srovnání byly počty kopií získané dPCR vynásobeny $10\times$, a jejich korelace (B), kdy r je Pearsonův korelační koeficient. Vzorek 8 byl vyřazen kvůli možnému zkreslení způsobenému technickými artefakty vzniklými při přípravě NGS knihovny.

6. Diskuze

Hlavním cílem diplomové práce bylo vypracovat metodický postup ke sledování cirkulující RNA i DNA pro její další použití u pacientů s nádorovým onemocněním. Prvním úkolem byla optimalizace izolace RNA a DNA z plasmy/séra. K izolaci RNA byly využity 3 kity a 4 vzorky plasmy získané od zdravých jedinců. Výťažnost kitů pro krátké RNA se mezi těmito kity výrazně nelišila. V průměru nejvyšší koncentrace a celkové výtěžky krátkých RNA molekul z 200 μ l plasmy jsme získaly pomocí metody M1 (miRNeasy Serum/Plasma Kit s využitím, $16,7 \pm 3,2$ ng). Tomuto výsledku odpovídaly i v průměru nejnižší hodnoty ct (nejvyšší exprese) získané pro hsa-miR-16. Naopak v průměru nejmenší, i když podobné množství krátkých RNA jsme získali metodou M2 (miRNeasy Serum/Plasma Advanced kit, $14,6 \pm 8,8$ ng). Tímto kitem se naopak podařilo izolovat nejvíce celkové RNA ($8,5 \pm 5,4$ ng oproti $4,9 \pm 1,2$ ng získaných předchozím kitem). Nicméně u 1 ze 4 vzorků izolovaným tímto kitem nebyla naměřena koncentrace celkové RNA ani miRNA (hodnoty pod limitem detekce), s čímž koreluje i vysoká hodnota ct u hsa-miR-16 (nižší exprese). Lze uvažovat o nějaké technické či manuální chybě při samotné izolaci vzorku, případně o nižší spolehlivosti izolační metody, jelikož při izolaci pomocí zbylých dvou kitů byla koncentrace v daném vzorku naměřena. Pomocí třetí testované metody M3 (Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma Kit) jsme získali obdobné výsledky jako u metody M1 ($15,7 \pm 3,0$ ng krátkých RNA a $1,2 \pm 0,1$ ng celkové RNA). Výsledky jedné ze studií uvádí M1 také jako nejlepší kit, kdy byl porovnáván s dalšími 5 kity včetně M2 a M3, které vyšly jako druhý respektive třetí nejlepší. Z porovnání M2 a M3 vyšla lépe M2, nicméně při našem porovnání vyšel tento kit nejhůře. V rámci porovnání byla dokonce zkoumána účinnost izolace při využití čerstvé a zmrazené plasmy a jediný kit M1 prokázal podobné výsledky v porovnání se zbytkem, u kterých bylo izolované množství RNA menší při využití zmrazené plasmy [63]. Z další studie porovnávající šest různých izolačních kitů vyšel opět kit M1 jako jeden ze dvou nejlepších, co se týče výtěžnosti a čistoty získané RNA [64].

Výhodou metody M3 je možnost současné izolace RNA a DNA z jednoho vzorku. Tuto metodu jsme proto porovnali s kitem QIAamp Circulating Nucleic Acid (M4), který je v praxi převážně využíván pro izolaci ctDNA [51]. Při kvantifikaci DNA pomocí kitů Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay a Qubit™ dsDNA HS Assay jsme překvapivě získali výrazně odlišné výsledky, proto byl pro kvantifikaci navíc využit kit Agilent High Sensitivity DNA umožňující zobrazení délky fragmentů izolované DNA. Získané koncentrace korelovaly s výtěžky získanými metodou využívající PicoGreen, což odpovídá vyšší výtěžnosti kitu QIAamp Circulating Nucleic Acid oproti kitu Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma

($17,0 \pm 8,9$ ng vs $2,80 \pm 3,0$ ng/ml plasmy). Co se týče výtěžnosti, je na kit M4 nahlíženo jako na zlatý standard, což potvrzuje i jedna ze studií, která zaznamenala nejvyšší výtěžnost právě při využití tohoto kitu. Jedním z dalších kitů, který byl porovnáván v této studii, je též M3. Tento kit ostatní předčil v extrakci dlouhých fragmentů, zatímco M4 naopak v extrakci těch krátkých [65]. Další studie popsala mimo jiné kit M3 a M4 jako nejlepší pro izolaci cfDNA s následným využitím ddPCR. Kitem M3 bylo dosaženo nejvyšších absolutních i relativních koncentrací cfDNA izolované z plasmy. Nicméně vzorky izolované M4 a kvantifikované ddPCR vykazovaly nejnižší variační koeficient pro pozitivní i celkový počet kompartmentů. Ze získaných výsledků bylo usouzeno, že se jedná o kit s vysokou konzistencí, která je u diagnostiky nádorových onemocnění velmi důležitá [66].

Dalším cílem této práce bylo vybrat a optimalizovat metodiku stanovení hladin cirkulujících miRNA pomocí sekvenování krátkých RNA molekul. Pro tento účel byly využity vzorky plasmy získané od pacientů s diagnostikovaným nádorovým onemocněním v době odběru krve, konkrétně s karcinomem prsu, jelikož původně plánované vzorky od pacientů s kolorektálním karcinomem nebyly včas k dispozici díky zpoždění hlavní studie v souvislosti s pandemií. Knihovny krátkých RNA k sekvenování byly připraveny pomocí kitů QIAseq miRNA UDI Library kit a NEXTFLEX Small RNA-Seq kit z duplicitně izolované RNA pro každého pacienta. Kitem QIAseq se nepodařilo získat knihovny o dostatečné koncentraci a vzorky neobsahovaly fragmenty s předpokládanou velikostí. Při opakovaném pokusu byl získán stejný výsledek, což vylučuje technickou chybu při přípravě knihovny. Jedna z možných příčin by mohla být vyšší citlivost v rámci protokolu používaných enzymů k inhibitorům, které mohou být teoreticky izolovány spolu s RNA. Čistota nukleových kyselin je klasicky sledována pomocí stanovení poměru absorbance při 260 a 280 nm, případně 260 a 230 nm pro sledování kontaminace proteiny, nicméně toto stanovení je nevhodné pro vzorky o nízké koncentraci (<10 ng/ μ l, NanoDrop 2000, ThermoFisher Scientific). V naší práci se výtěžky krátkých RNA izolovaných z plasmy zdravých dárců pohybovaly okolo $1,0 \pm 0,4$ ng/ μ l (nezávisle na izolační metodě) a okolo $2,6 \pm 0,4$ ng/ μ l od pacientů s karcinomem prsu, tedy jejich čistota nemohla být touto metodou ověřena. Možnost kopurifikace inhibitorů mohla být zvýšena i navýšením objemu plasmy pro izolaci z doporučených 200 μ l na 400 μ l. Určitě by bylo vhodné tento postup ještě optimalizovat.

Kitem NEXTFLEX Small RNA-Seq byly získány knihovny o dostatečné koncentraci pro sekvenování. U vzorku 2 a 8 jsme nicméně získali výrazně nižší výtěžky v porovnání s ostatními vzorky. U vzorku 8 tuto skutečnost nejspíše zapříčinilo nedostatečné množství chemikálií v NEXTFLEX Small RNA-Seq kitu pro přípravu mastermixu, u vzorku 2 mohla být

příčinou náhodná chyba případně vliv inhibitorů, jak bylo diskutováno výše. U těchto dvou vzorků jsme detekovali i vyšší zastoupení fragmentů kratších než požadovaných 150 bp pro knihovny připravené NEXTFLEX protokolem, které pravděpodobně odpovídají artefaktům, jež mohou vzniknout při přípravě knihoven z adapterů (130 bp) nebo primerů (65 bp). Nicméně u všech vzorků se při sekvenaci podařilo získat dostatečné množství sekvencí (> 4,9 mil.) pro následnou analýzu.

Ze získaných sekvencí byly nejprve odstraněny adaptory, sekvence mitochondriální rRNA a tRNA, sekvence kratší než 16 bp a nekvalitní sekvence. Nejvyšší počet sekvencí jsme získali u fragmentů o délce 20 – 24 bp, odpovídající délce většiny miRNA molekul, a dále u fragmentů o délce 30 – 34 bp. Tyto fragmenty nebyly v rámci této práce dále analyzovány, ale předpokládáme, že se jedná z části o další typy krátkých RNA molekul, jako jsou piRNA nebo fragmenty tRNA [67], dále fragmenty středně dlouhých RNA molekul, zejména v plasmě výrazně zastoupené fragmenty Y-RNA [68], případně fragmenty degradované mRNA. Tyto sekvence byly před dalšími analýzami odstraněny a zbylé namapovány na referenční miRNA. V průměru se podařilo přiřadit 67,5 % z filtrovaných sekvencí. Po přepočtu na celkový počet sekvencí, tvořily miRNA v průměru 50 % ($\pm 8,8$ %) ze všech získaných sekvencí u vzorku 1 - 7 a jen 1,6 % u vzorku 8, což potvrzuje chybu při přípravě knihovny. Průměrně se podařilo detekovat 549 unikátních miRNA molekul. Počet miRNA molekul detekovaný v plasmě je ovlivněn řadou faktorů, jako je typ analyzovaných vzorků, preanalytické zpracování vzorků, účinnost izolační metody, typ kitu na přípravu knihovny, i metodika a podmínky vlastního mapování [63, 67, 69, 70, 71]. Zastoupení miRNA detekovaných v plasmě pomocí sekvenování krátkých RNA se proto v literatuře výrazně liší [67, 72, 73]. Např. v práci Coenen-Stass et al. tvořily miRNA přibližně 41 % všech sekvencí získaných ze vzorků plasmy zdravých jedinců při použití stejného kitu na přípravu knihovny jako byl použit v naší práci [67]. Naopak v práci Yeri et al. byly miRNA zastoupeny 75 % při využití stejného typu vzorků a kitu na přípravu knihovny jako v předchozí práci [72]. Na rozdílech v míře identifikovaných miRNA se může podílet i přítomnost délkových a sekvenčních isoformů miRNA molekul, tzv. isomiRů, a způsob jejich mapování k referenčním sekvencím [74].

Nejčastěji zastoupenými miRNA molekulami byly detekovány hsa-miR-451a, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-26a-5p a hsa-let-7f-5p. Mezi miRNA s nejvyšší variabilitou v plasmě byly identifikovány hsa-miR-370-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-4433b-3p, hsa-miR-412-5p a hsa-miR-329-5p. Některé studie uvádí specifické miRNA, jejichž exprese je významně změněna v tkáni karcinomu prsu oproti zdravé tkáni a je pro toto onemocnění typická [75, 76]. Mezi 20 nejvíce zastoupenými molekulami miRNA

detekovanými v této práci se nachází tři takové a to hsa-let-7, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-21, hsa-miR-126 [75, 76]. V případě hsa-miR-451a a hsa-miR-486-5p se jedná o dvě z nejvíce zastoupených molekul miRNA v lidské krvi, jelikož pochází z červených krvinek a jsou běžně detekovány jako miRNA s nejvyšším zastoupením v plasmě nezávisle na původu vzorků nebo použitých kitech na přípravu knihovny [74, 77]. Protože jejich vysoká exprese může komplikovat detekci či způsobovat nedostatečnou kvantifikaci méně zastoupených miRNA molekul, jsou vyvíjeny postupy, jak se těchto molekul zbavit např. jejich blokací komplementárními oligonukleotidy během přípravy knihovny [77].

Při porovnání stanovení exprese hsa-miR-16 pomocí qPCR, dPCR a NGS byla sice nalezena slabá pozitivní korelace mezi NGS a dPCR, nicméně byla zaznamenána vyšší chybovost NGS. Ta mohla být zapříčiněna např. použitím malého objemu DNA [72] či užitou normalizační metodou [71]. Normalizace je důležitou součástí před samotnou analýzou dat, nicméně v případě analýzy krátkých RNA je účinnost normalizačních metod více závislá na konkrétních vstupních datech, a proto zatím nebyl zaveden postup, který by fungoval systematicky nejlépe [78]. Přestože metoda CPM, kterou jsme použili v naší studii, patří k nejpoužívanějším [74, 77, 78], je k dispozici řada dalších metod např. TMM (trimmed mean of M values), UQ (upper quartile) nebo komplexnější postupy jako DANA (DATA-driven Normalization Assessment) [71, 79]. Výsledky naší práce ukazují na nutnost zavedení optimálního postupu analýzy dat získaných sekvenací krátkých RNA izolovaných ze vzorků plasmy.

Hlavní úkoly diplomové práce, což bylo zavedení kompletního metodického postupu izolace, kontroly kvality a kvantifikace cfDNA a cfRNA, s důrazem na miRNA, z lidské plasmy, se podařilo splnit a byly získány cenné zkušenosti. Zejména srovnání tří metod kvantifikace miRNA z tak limitního materiálu jako je plasma onkologických pacientů představuje unikátní příspěvek této práce. Vytvořený metodický postup je nyní k dispozici pro studium průběhu onemocnění u kohorty pacientů s kolorektálním karcinomem.

7. Závěr

Cílem této práce bylo vytvořit metodický postup pro izolaci nukleových kyselin z plasmy/séra pro jejich následnou detekci u pacientů s nádorovým onemocněním. Nejprve byly porovnány tři různé kity pro izolaci RNA (miRNeasy Serum/Plasma Kit, miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit a Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma Kit) a dva různé kity pro izolaci DNA (Quick-cfDNA/cfRNA Serum/Plasma Kit a QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit) z plasmy zdravých kontrol z hlediska kvality a kvantity. Kvantifikace byla provedena pomocí dvou různých kitů u RNA (Qubit™ microRNA Assay Kit a Quant-it™ RiboGreen RNA Assay Kit) i u DNA (Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay a Qubit™ dsDNA HS Assay) a pomocí RT-qPCR stanovením exprese exogenní (cel-miR-39 a ath-miR-159a) a endogenní miRNA (hsa-miR-16) sloužících jako kontroly. Po vyhodnocení výsledků byly vybrány kity miRNeasy Serum/Plasma pro izolaci RNA a QIAamp Circulating Nucleic Acid pro izolaci DNA.

Po optimalizaci izolace RNA a postupu ověření její kvantity a kvality byla izolována RNA ze vzorků plasmy od pacientů s karcinomem prsu.

Vzorky byly následně využity k přípravě knihovny krátkých molekul RNA pomocí kitů NEXTFLEX Small RNA-Seq a QIAseq miRNA UDI Library. Knihovna byla úspěšně připravena pouze kitem NEXTFLEX Small RNA-Seq. Po provedení sekvenace bylo u všech vzorků získáno dostatečné množství sekvencí pro následnou analýzu. Nejčastěji zastoupenými miRNA molekulami byly detekovány hsa-miR-451a, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-26a-5p a hsa-let-7f-5p a mezi miRNA s nejvyšší variabilitou v plasmě byly identifikovány hsa-miR-370-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-4433b-3p, hsa-miR-412-5p a hsa-miR-329-5p.

V neposlední řadě mezi sebou byly porovnány tři metody kvantifikace miRNA (NGS, qPCR a dPCR) pomocí stanovení exprese hsa-miR-16. Nejméně citlivou metodou bylo qPCR a po vyřazení jednoho vzorku byla získána slabá pozitivní korelace mezi NGS a dPCR. Vytvořený metodický postup bude dále v laboratoři školitele využit u kohorty pacientů s kolorektálním karcinomem.

Seznam citované literatury

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, **71**(3), 209–249.
- [2] The Cancer Atlas [online]. (citováno 20. 7. 2023) Dostupné z: <https://canceratlas.cancer.org/>
- [3] International Agency for Research on Cancer [online]. Global Cancer Observatory, (citováno 20. 7. 2023) Dostupné z: <https://gco.iarc.fr/>
- [4] Nikanjam, M., Kato, S. & Kurzrock, R. (2022). Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol*, **15**, 131.
- [5] Marley, A. R., & Nan, H. (2016). Epidemiology of colorectal cancer. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, **7**(3), 105–114.
- [6] Mattiuzzi, C., Sanchis-Gomar, F., & Lippi, G. (2019). Concise update on colorectal cancer epidemiology. *Annals of translational medicine*, **7**(21), 609.
- [7] Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodriguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**(1).
- [8] World Cancer Research Fund International [online]. Worldwide Cancer Data, (citováno 5. 1. 2023) Dostupné z: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/>
- [9] Half, E., Bercovich, D., & Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet journal of rare diseases*, **4**, 22.
- [10] Bogaert, J., & Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of gastroenterology*, **27**(1), 9–14.
- [11] Zeichner, S. B., Raj, N., Cusnir, M., Francavilla, M., & Hirzel, A. (2012). A De Novo Germline APC Mutation (3927del5) in a Patient with Familial Adenomatous Polyposis: Case Report and Literature Review. *Clinical Medicine Insights. Oncology*, **6**, 315–323.
- [12] Marra, G., & Boland, C. R. (1995). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *Journal of the National Cancer Institute*, **87**(15), 1114–1125.

- [13] Ordóñez-Mena, J. M., Walter, V., Schöttker, B., Jenab, M., O'Doherty, M. G., Kee, F., Bueno-de-Mesquita, B., Peeters, P. H. M., Stricker, B. H., Ruiter, R., Hofman, A., Söderberg, S., Jousilahti, P., Kuulasmaa, K., Freedman, N. D., Wilsgaard, T., Wolk, A., Nilsson, L. M., Tjønneland, A., Quirós, J. R., ... Consortium on Health and Ageing: Network of Cohorts in Europe and the United States (CHANCES) (2018). Impact of prediagnostic smoking and smoking cessation on colorectal cancer prognosis: a meta-analysis of individual patient data from cohorts within the CHANCES consortium. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, **29**(2), 472–483.
- [14] Harrison, S., & Benziger, H. (2011). The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review. *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*, **9**(4), 200–210.
- [15] Bevan, R., & Rutter, M. D. (2018). Colorectal Cancer Screening-Who, How, and When?. *Clinical endoscopy*, **51**(1), 37–49.
- [16] Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, **487**(7407), 330–337.
- [17] Wang, J., Song, J., Liu, Z., Zhang, T., & Liu, Y. (2022). High tumor mutation burden indicates better prognosis in colorectal cancer patients with KRAS mutations. *Frontiers in oncology*, **12**, 1015308.
- [18] Van Cutsem, E., Cervantes, A., Nordlinger, B., & Arnold, D. (2014). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*, **25**.
- [19] Chakrabarti, S., Peterson, C. Y., Sriram, D., & Mahipal, A. (2020). Early stage colon cancer: Current treatment standards, evolving paradigms, and future directions. *World journal of gastrointestinal oncology*, **12**(8), 808–832.
- [20] Rejhová, A., Opattová, A., Čumová, A., Slíva, D., & Vodička, P. (2018). Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **144**, 582–594.
- [21] Xie, YH., Chen, YX. & Fang, JY. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Sig Transduct Target Ther*, **5**, 22.

- [22] Tessmann, J. W., Rocha, M. R., & Morgado-Díaz, J. A. (2023). Mechanisms of radioresistance and the underlying signaling pathways in colorectal cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*, **124**(1), 31–45.
- [23] Wilson, P. M., Ladner, R. D., & Lenz, H. J. (2007). Predictive and prognostic markers in colorectal cancer. *Gastrointestinal cancer research : GCR*, **1**(6), 237–246.
- [24] Venook, A. (2005). Critical Evaluation of Current Treatments in Metastatic Colorectal Cancer. *The Oncologist*, **10**(4), 250–261.
- [25] Walko, C. M., & Lindley, C. (2005). Capecitabine: a review. *Clinical therapeutics*, **27**(1), 23–44.
- [26] Nicolazzo, C., Belardinilli, F., Vestri, A., Magri, V., De Renzi, G., De Meo, M., Caponnetto, S., Di Nicolantonio, F., Cortesi, E., Giannini, G., & Gazzaniga, P. (2022). RAS Mutation Conversion in Bevacizumab-Treated Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Liquid Biopsy Based Study. *Cancers*, **14**(3), 802.
- [27] García-Foncillas, J., Sunakawa, Y., Aderka, D., Wainberg, Z., Ronga, P., Witzler, P., & Stintzing, S. (2019). Distinguishing Features of Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *Frontiers in oncology*, **9**, 849.
- [28] Pote, M. S., & Gacche, R. N. (2023). ATP-binding cassette efflux transporters and MDR in cancer. *Drug Discovery Today*, **28**(5), 103537.
- [29] Coghlin, C., & Murray, G. I. (2015). Biomarkers of colorectal cancer: recent advances and future challenges. *Proteomics. Clinical applications*, **9**(1-2), 64–71.
- [30] Lee, J. K., & Chan, A. T. (2011). Molecular Prognostic and Predictive Markers in Colorectal Cancer: Current Status. *Current Colorectal Cancer Reports*, **7**(2), 136–144.
- [31] TNM klasifikace zhoubných novotvarů 2018 (8. vydání)
- [32] George, B., & Kopetz, S. (2011). Predictive and Prognostic Markers in Colorectal Cancer. *Current Oncology Reports*, **13**(3), 206–215.
- [33] Hou, W., Yi, C., & Zhu, H. (2022). Predictive biomarkers of colon cancer immunotherapy: Present and future. *Frontiers in immunology*, **13**, 1032314.
- [34] Overman, M. J., McDermott, R., Leach, J. L., Lonardi, S., Lenz, H. J., Morse, M. A., Desai, J., Hill, A., Axelson, M., Moss, R. A., Goldberg, M. V., Cao, Z. A., Ledezne, J. M., Maglinte,

- G. A., Kopetz, S., & André, T. (2017). Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *The Lancet. Oncology*, **18**(9), 1182–1191.
- [35] Swarup, V., & Rajeswari, M. R. (2007). Circulating (cell-free) nucleic acids – A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Letters*, **581**(5), 795–799.
- [36] Szilágyi, M., Pös, O., Márton, É., Buglyó, G., Soltész, B., Keserű, J., Penyige, A., Szemes, T., & Nagy, B. (2020). Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(18).
- [37] Pös, O., Biró, O., Szemes, T., & Nagy, B. (2018). Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *European journal of human genetics : EJHG*, **26**(7), 937–945.
- [38] Hayes, J., Peruzzi, P. P., & Lawler, S. (2014). MicroRNAs in cancer: Biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine*, **20**(8), 460–469.
- [39] Rapado-González, Ó., Álvarez-Castro, A., López-López, R., Iglesias-Canle, J., Suárez-Cunqueiro, M. M., & Muínelo-Romay, L. (2019). Circulating microRNAs as Promising Biomarkers in Colorectal Cancer. *Cancers*, **11**(7).
- [40] González-Masiá, J. A., García-Olmo, D., & García-Olmo, D. C. (2013). Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): Applications in oncology. *Oncotargets and Therapy*, **6**, 819–832.
- [41] Larrea, E., Sole, C., Manterola, L., Goicoechea, I., Armesto, M., Arestin, M., Caffarel, M. M., Araujo, A. M., Araiz, M., Fernandez-Mercado, M., & Lawrie, C. H. (2016). New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *International journal of molecular sciences*, **17**(5), 627.
- [42] Gao, Q., Zeng, Q., Wang, Z., Li, C., Xu, Y., Cui, P., Zhu, X., Lu, H., Wang, G., Cai, S., Wang, J., & Fan, J. (2022). Circulating cell-free DNA for cancer early detection. *The Innovation*, **3**(4), 100259.
- [43] Blondal, T., Jensby Nielsen, S., Baker, A., Andreasen, D., Mouritzen, P., Wrang Teillum, M., & Dahlsveen, I. K. (2013). Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods (San Diego, Calif.)*, **59**(1), S1–S6.

- [44] Yan, Y., Guo, Q., Wang, F., Adhikari, R., Zhu, Z., Zhang, H., Zhou, W., Yu, H., Li, J., & Zhang, J. (2021). Cell-Free DNA: Hope and Potential Application in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**.
- [45] Bronkhorst, A. J., Ungerer, V., & Holdenrieder, S. (2019). The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomolecular Detection and Quantification*, **17**, 100087.
- [46] Carter, J. V., Galbraith, N. J., Yang, D., Burton, J. F., Walker, S. P., & Galandiuk, S. (2017). Blood-based microRNAs as biomarkers for the diagnosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *British journal of cancer*, **116**(6), 762–774.
- [47] Wu, Z., Yu, L., Hou, J., Cui, L., Huang, Y., Chen, Q., Sun, Y., Lu, W., Zhang, C., & Sun, D. (2022). Plasma cfDNA for the Diagnosis and Prognosis of Colorectal Cancer. *Journal of oncology*, **2022**, 9538384.
- [48] Cervena, K., Novosadova, V., Pardini, B., Naccarati, A., Opattova, A., Horak, J., Vodenkova, S., Buchler, T., Skrobanek, P., Levy, M., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2021). Analysis of MicroRNA Expression Changes During the Course of Therapy In Rectal Cancer Patients. *Frontiers in Oncology*, **11**.
- [49] Tie, J., Kinde, I., Wang, Y., Wong, H. L., Roebert, J., Christie, M., Tacey, M., Wong, R., Singh, M., Karapetis, C. S., Desai, J., Tran, B., Strausberg, R. L., Diaz, L. A., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Gibbs, P. (2015). Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, **26**(8), 1715–1722.
- [50] Volckmar, A-L, Sülthmann, H, Riediger, A, et al. (2018). A field guide for cancer diagnostics using cell-free DNA: From principles to practice and clinical applications. *Genes Chromosomes Cancer*, **57**, 123– 139.
- [51] Cirmena, G., Dameri, M., Ravera, F., Fregatti, P., Ballestrero, A., & Zoppoli, G. (2021). Assessment of Circulating Nucleic Acids in Cancer: From Current Status to Future Perspectives and Potential Clinical Applications. *Cancers*, **13**(14), 3460.
- [52] Urbanova, M., Plzak, J., Strnad, H., & Betka, J. (2010). Circulating nucleic acids as a new diagnostic tool. *Cellular & molecular biology letters*, **15**(2), 242–259.

- [53] Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in microbiology*, **8**, 108.
- [54] Qin, D. (2019). Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer biology & medicine*, **16**(1), 4–10.
- [55] Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, **82**(11), 801–811.
- [56] Benesova, S., Kubista, M., & Valihrach, L. (2021). Small RNA-Sequencing: Approaches and Considerations for miRNA Analysis. *Diagnostics*, **11**(6), 964.
- [57] Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., Wittmann, D. K., ... Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry*, **83**(22), 8604–8610.
- [58] Kojabad, A. A., Farzanehpour, M., Galeh, H. E. G., Dorostkar, R., Jafarpour, A., Bolandian, M., & Nodooshan, M. M. (2021). Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives. *Journal of medical virology*, **93**(7), 4182–4197.
- [59] Lambrescu, I., Popa, A., Manole, E., Ceafalan, L. C., & Gaina, G. (2022). Application of Droplet Digital PCR Technology in Muscular Dystrophies Research. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**(9), 4802.
- [60] Shah, J. S., Soon, P. S., & Marsh, D. J. (2016). Comparison of Methodologies to Detect Low Levels of Hemolysis in Serum for Accurate Assessment of Serum microRNAs. *PloS one*, **11**(4), e0153200.
- [61] Tay, J. W., James, I., Hughes, Q. W., Tiao, J. Y., & Baker, R. I. (2017). Identification of reference miRNAs in plasma useful for the study of oestrogen-responsive miRNAs associated with acquired Protein S deficiency in pregnancy. *BMC research notes*, **10**(1), 312.
- [62] Ford, K. L., Anwar, M., Heys, R., Ahmed, E. M., Caputo, M., Game, L., Reeves, B. C., Punjabi, P. P., Angelini, G. D., Petretto, E., & Emanuelli, C. (2019). Optimisation of laboratory methods for whole transcriptomic RNA analyses in human left ventricular biopsies and blood samples of clinical relevance. *PloS one*, **14**(3), e0213685.

- [63] Wright, K., de Silva, K., Purdie, A. C., & Plain, K. M. (2020). Comparison of methods for miRNA isolation and quantification from ovine plasma. *Scientific reports*, **10**(1), 825.
- [64] Meerson, A., & Ploug, T. (2016). Assessment of six commercial plasma small RNA isolation kits using qRT-PCR and electrophoretic separation: Higher recovery of microRNA following ultracentrifugation. *Biology Methods and Protocols*, **1**(1), bpw003.
- [65] van der Leest, P., Boonstra, P. A., ter Elst, A., van Kempen, L. C., Tibbesma, M., Koopmans, J., Miedema, A., et al. (2020). Comparison of Circulating Cell-Free DNA Extraction Methods for Downstream Analysis in Cancer Patients. *Cancers*, **12**(5), 1222.
- [66] van Ginkel, J. H., van den Broek, D. A., van Kuik, J., Linders, D., de Weger, R., Willems, S. M., & Huibers, M. M. H. (2017). Preanalytical blood sample workup for cell-free DNA analysis using Droplet Digital PCR for future molecular cancer diagnostics. *Cancer medicine*, **6**(10), 2297–2307.
- [67] Coenen-Stass, A. M. L., Magen, I., Brooks, T., Ben-Dov, I. Z., Greensmith, L., Hornstein, E., & Fratta, P. (2018). Evaluation of methodologies for microRNA biomarker detection by next generation sequencing. *RNA biology*, **15**(8), 1133–1145.
- [68] Yeri, A., Courtright, A., Reiman, R., Carlson, E., Beecroft, T., Janss, A., Siniard, A., Richholt, R., Balak, C., Rozowsky, J., Kitchen, R., Hutchins, E., Winarta, J., McCoy, R., Anastasi, M., Kim, S., Huentelman, M., & Van Keuren-Jensen, K. (2017). Total Extracellular Small RNA Profiles from Plasma, Saliva, and Urine of Healthy Subjects. *Scientific reports*, **7**, 44061.
- [69] Matias-Garcia, P. R., Wilson, R., Mussack, V., Reischl, E., Waldenberger, M., Gieger, C., Anton, G., Peters, A., & Kuehn-Steven, A. (2020). Impact of long-term storage and freeze-thawing on eight circulating microRNAs in plasma samples. *PloS one*, **15**(1), e0227648.
- [70] Srinivasan, S., Yeri, A., Cheah, P. S., Chung, A., Danielson, K., De Hoff, P., Filant, J., Laurent, C. D., Laurent, L. D., Magee, R., Moeller, C., Murthy, V. L., Nejad, P., Paul, A., Rigoutsos, I., Rodosthenous, R., Shah, R. V., Simonson, B., To, C., Wong, D., ... Laurent, L. C. (2019). Small RNA Sequencing across Diverse Biofluids Identifies Optimal Methods for exRNA Isolation. *Cell*, **177**(2), 446–462.e16.
- [71] Tam, S., Tsao, M.-S., & McPherson, J. D. (2015). Optimization of miRNA-seq data preprocessing. *Briefings in Bioinformatics*, **16**(6), 950–963.

- [72] Yeri, A., Courtright, A., Danielson, K., Hutchins, E., Alsop, E., Carlson, E., Hsieh, M., Ziegler, O., Das, A., Shah, R. V., Rozowsky, J., Das, S., & Van Keuren-Jensen, K. (2018). Evaluation of commercially available small RNASeq library preparation kits using low input RNA. *BMC genomics*, **19**(1), 331.
- [73] El-Mogy, M., Lam, B., Haj-Ahmad, T. A., McGowan, S., Yu, D., Nosal, L., Rghei, N., Roberts, P., & Haj-Ahmad, Y. (2018). Diversity and signature of small RNA in different bodily fluids using next generation sequencing. *BMC genomics*, **19**(1), 408.
- [74] Androvic, P., Benesova, S., Rohlova, E., Kubista, M., & Valihrach, L. (2022). Small RNA-Sequencing for Analysis of Circulating miRNAs: Benchmark Study. *The Journal of Molecular Diagnostics*, **24**(4), 386–394.
- [75] Beňačka, R., Szabóová, D., Guľašová, Z., Hertelyová, Z., Radoňák, J. (2022). Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer. *Cancers*, **14**, 5444.
- [76] Wu, H., Wang, Q., Zhong, H., Li, L., Zhang, Q., Huang, Q., & Yu, Z. (2020). Differentially expressed microRNAs in exosomes of patients with breast cancer revealed by next-generation sequencing. *Oncology reports*, **43**(1), 240–250.
- [77] Juzenas, S., Lindqvist, C. M., Ito, G., Dolshanskaya, Y., Halfvarson, J., Franke, A., & Hemmrich-Stanisak, G. (2020). Depletion of erythropoietic miR-486-5p and miR-451a improves detectability of rare microRNAs in peripheral blood-derived small RNA sequencing libraries. *NAR Genomics and Bioinformatics*, **2**(1), lqaa008.
- [78] Valbuena, G. N., Apostolidou, S., Roberts, R., Barnes, J., Alderton, W., Harper, L., Jacobs, I., Menon, U., & Keun, H. C. (2019). The 14q32 maternally imprinted locus is a major source of longitudinally stable circulating microRNAs as measured by small RNA sequencing. *Scientific reports*, **9**(1), 15787.
- [79] Düren, Y., Lederer, J., & Qin, L. X. (2022). Depth normalization of small RNA sequencing: using data and biology to select a suitable method. *Nucleic acids research*, **50**(10), e56.