

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni

Disertační práce

Plzeň 2021

Kateřina Houfková

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni

Studijní obor: Anatomie, histologie a embryologie

Predikce efektu léčby u solidních nádorů
Prediction of treatment effect in solid tumors

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Školitel specialista: MUDr. Vlastimil Kulda, Ph.D.

Plzeň, 2021

RNDr. Kateřina Houfková

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Zároveň prohlašuji, že práce nebyla využita k získání stejného ani jiného akademického titulu.

V Plzni dne 14. 7. 2021

RNDr. Kateřina Houfková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především doc. RNDr. Martinovi Peštovi, Ph.D. za odborné vedení celého mého doktorského studia i za příležitost pracovat na Ústavu biologie. Děkuji mu za odbornou pomoc při psaní mé disertační práce, obětování času a velice přátelský přístup.

Mé velké poděkování patří i doc. Ing. Jiřímu Hatinovi, CSc. nejen za pomoc při psaní této práce, ale i za předávání jeho bohatých znalostí a zkušeností během každodenní vědecké práce.

Děkuji všem kolegům, kteří se podíleli na odborných publikacích, které jsou součástí této práce, především pak MUDr. Vlastimilovi Kuldovi, Ph.D. Velké díky patří mé kolegyni Mgr. Tereze Knížkové za plno cenných rad a občasnou pomoc při práci v laboratoři.

V neposlední řadě děkuji mému manželovi Honzovi za velkou podporu, a ještě větší trpělivost.

Seznam zkratek

3' UTR	3' untranslated region, 3' nepřekládaná oblast
ABC	ATP binding cassette
ASCs	Adipose stromal cells, stromální buňky odvozené z adipózní tkáně
ALDH	Aldehyde dehydrogenase, aldehyddehydrogenáza
ASCO	American Society of Clinical Oncology, Americká onkologická společnost
BM-MSC	Bone marrow-derived mesenchymal stem cell, mezenchymální kmenové buňky odvozené z kostní dřeně
CA 19-9	Cancer antigen 19-9, nádorový antigen 19-9
ccRCC	Clear cell renal cell carcinoma, světlobuněčný renální karcinom
CD	Cluster of differentiation, diferenciační skupina
cDNA	Complementary DNA, komplementární DNA
CEA	Carcinoembryonic antigen, karcinoembryonální antigen
ceRNA	Competing endogenous RNA, kompetující endogenní RNA
cfDNA	Circulating free DNA, cirkulující volná DNA
Cf-mRNA	Cell-free messenger RNA, bezbuněčná mediátorová RNA
Cf-ncRNA	Cell-free non-coding RNA, bezbuněčná nekódující RNA
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	Chromosomal instability, chromozomová instabilita
CINSARRC	Complexity Index in Sarcomas
CK 19	Cytokeratin 19

CNAPS	Circulating nucleic acids on plasma and serum, cirkulující nukleové kyseliny v plazmě a séru
CNS	Central nervous system, centrální nervová soustava
CNV	Copy number variation, variabilita počtu kopií
CRC	Colorectal cancer, kolorektální karcinom
CSC	Carcinoma stem cells, nádorové kmenové buňky
CTC	Circulating tumor cells, cirkulující nádorové buňky
ctDNA	Circulating tumor DNA, cirkulující nádorová DNA
ddPCR	Droplet digital PCR, kapková digitální PCR
DFS	Disease-free survival, délka přežití bez nemoci
DNA	Deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
EJC	Exon-junction complex, exonový spojovací komplex
EMT	Epithelial-mesenchymal transition, epitelo-mezenchymální tranzice
ESMO	European Society for Medical Oncology, Evropská onkologická společnost
Exp5	Exportin-5
FA	Fraction abundance, frakční abundance
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded, fixovaný ve formalínu a zalitý v parafínu
FIGO	International Federation of Gynaecology and Obstetrics, Mezinárodní federace pro gynekologii a porodnictví
FNCLCC	Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre Le Cancer
H&E	Hematoxylin-eosin
HIF	Hypoxia-induced factor, hypoxií indukovaný faktor
hnRNA	Heterogeneous nuclear RNA, heterogenní nukleární RNA

IHC	Imunohistochemie
LDH	Lactate dehydrogenase, laktátdehydrogenáza
lncRNA	Long non-coding RNA, dlouhá nekódující RNA
m7G	7-methylguanosine, 7-metylguanosen
MAPK	Mitogen activated kinase-like protein, mitogenem aktivovaná protein kináza
MET	Mesenchymal-epithelial transition, mezenchymo-epiteliální tranzice
miRISC	MiRNA-induced silencing complex, miRNA indukovaný umlčující komplex
miRNA	MicroRNA - micro ribonucleic acid, mikroRNA – mikro ribonukleová kyselina
MMR	Mismatch repair
mRNA	Messenger RNA, mediátorová RNA
MSC	Mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky
MSI	Microsatellite instability, mikrosatelitová instabilita
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre
NCI	National Cancer Institute, Národní institut pro výzkum rakoviny
ncRNA	Non-coding RNA, nekódující RNA
NGS	Next Generation Sequencing, sekvenování nové generace
NHGRI	National Human Genome Research Institute, Národní výzkumný ústav pro lidský genom
NMD	Nonsense mediated decay
NOR	National Oncology Registry, Národní onkologický registr
NSCLC	Non small cell lung cancer, nemalobuněčný plicní karcinom
OS	Overall survival, celkové přežití

OSNA	One-step Nuclei Acid Amplification
PCR	Polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PFI	Progression-free interval, interval bez progrese
PPPM	Preventive, predictive and personalized medicine, preventivní, prediktivní a personalizovaná medicína
pre-miRNA	Precursor-microRNA, prekurzorová miRNA
Pre-mRNA	Precursor mRNA, prekurzorová mRNA
pri-miRNA	Primary-microRNA, primární miRNA
PTC	Premature termination codon, předčasně zařazený terminační kodon
pVHL	protein VHL
Ran	Ras-related nuclear protein, s Ras související jaderný protein
RBP	Retinol-binding proteins, retinol vazebný protein
RCC	Renal cell carcinoma, renální buněčný karcinom
RISC	RNA-induced silencing complex, RNA indukovaný umlčující komplex
RNA	Ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
rRNA	Ribosomal RNA, ribozomální RNA
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction, reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce
SCLC	Small cell lung cancer, malobuněčný plicní karcinom
SP	Side population, vedlejší populace
SLN	Sentinel lymph node, sentinelová lymfatická uzlina
snRNA	Small nuclear RNA, malá nukleární RNA
snRNP	Small nuclear ribonucleoprotein, malý nukleární ribonukleoprotein

SNV	Single nucleotide variant, jednonukleotidová varianta
TCGA GBM	The Cancer Genome Atlas Glioblastoma Multiforme
TCGA KIRC	The Cancer Genome Atlas Kidney Renal Clear Cell Carcinoma
TCGA LUAD	The Cancer Genome Atlas Lung Adenocarcinoma
TCGA	The Cancer Genome Atlas, atlas rakovinového genomu
TCGA	The Cancer Genome Atlas, atlas rakovinového genomu
TEPs	Tumor educated platelets
TNM	Tumor – nodus – metastasis, tumor – regionální mízní uzliny – vzdálené metastázy
TRBP	TAR RNA binding protein, TAR RNA vazebný protein
tRNA	Transfer RNA, transferová RNA

Seznam uvedených genů

ABCB1	ATP binding cassette subfamily B member 1
ABCG2	ATP binding cassette subfamily G member 2
Ago2	Argonaute 2
ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase 1 family member A1
ALDH1A3	Aldehyde dehydrogenase 1 family member A3
ANGPT2	Angiopoietin 2
BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1
CCL-8	C-C motif chemokine ligand 8
CCR5	C-C motif chemokine receptor 5
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EPHB2	Ephrin Type-B Receptor 2
FGF4	Fibroblast growth factor 4
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MLH1	MutL homolog 1
MMP-13	Matrix metalloproteinase 13
MMP-3	Matrix metalloproteinase 3
MSH2	MutS homolog 2
MSH6	MutS homolog 6
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
PBMR1	Polybromo 1

PDGFB	Platelet-derived growth factor subunit B
SEMA3A	Semaphorin 3A
TP53	Tumor protein P53
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFD	Vascular endothelial growth factor-D
VHL	von Hippel-Lindau
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family
Xist	X-inactive specific transkript

1 Obsah

1 Obsah	12
2 Abstrakt	14
3 Summary	16
4 Úvod	18
5 Uvedení do problematiky	20
5.1 Expresní hladiny RNA	21
5.2 mikroRNA (miRNA)	23
5.2.1 Biogeneze miRNA	23
5.3 Mediátorová RNA	27
5.3.1 hnRNA	28
5.4 Posttranskripční úpravy pre-mRNA	29
5.4.1 Připojení čepičky a polyadenylace	29
5.4.2 Sestřih prekursorové mRNA	29
5.4.3 Alternativní sestřih	30
5.4.4 Editace mRNA	31
5.4.5 Nonsense mediated decay	31
5.5 Metody stanovení exprese RNA	33
5.6 Tekutá biopsie	36
5.6.1 Komponenty tekuté biopsie	38
6 Cíle práce a hypotéza	40
7 Solidní nádory	41
7.1 Plicní nádory	42
7.1.1 OSNA pro detekci nádorových buněk v uzlinách plicních nádorů	47
7.2 Karcinom endometria	50
7.3 Kolorektální karcinom	54
7.4 Jaterní metastázy kolorektálního karcinomu	60
7.5 Světlobuněčný renální karcinom	63
7.5.1 Atlas rakovinového genomu (The Cancer Genome Atlas, TCGA)	66
7.6 Sarkomy	67
7.6.1 Mezenchymální kmenové buňky a sarkomové kmenové buňky	70

8 Závěrečné shrnutí	75
9 Nejvýznamnější výsledky	78
10 Použitá literatura	79
11 Seznam příloh	89

2 Abstrakt

Současný výzkum léčby onkologických onemocnění je zaměřen na identifikaci změn, ke kterým dochází v procesu karcinogeneze a dále na hledání terapeutik, která by projev těchto změn umožnila eliminovat. Včasná diagnostika, stanovení prognózy, sledování průběhu onemocnění a predikce účinku léčby jsou čím dál tím více spojeny se stanovením příslušných biomarkerů. Stanovení prediktivních biomarkerů by se mělo stát neoddělitelnou součástí rozhodnutí o způsobu léčby a ve výsledku tak pacientům pomoci prodloužit délku života a zvýšit jeho kvalitu.

A právě nalezení prognostických a prediktivních biomarkerů pro efektivnější léčbu onkologických pacientů bylo cílem této disertační práce. Ve spolupráci s řadou klinických pracovišť Fakultní nemocnice v Plzni jsem se na Ústavu biologie zabývala touto problematikou u nemalobuněčného plicního karcinomu, karcinomu endometria, kolorektálního karcinomu, jaterních metastáz kolorektálního karcinomu, světlobuněčného renálního karcinomu a sarkomů.

Zaměřili jsme se především na hledání takových molekul, které jsou zapojené v procesu karcinogeneze a jejichž hladiny v tělních tekutinách nebo přímo v nádorové tkáni by byly schopné předpovědět další vývoj onemocnění nebo léčebnou odpověď. Pomocí molekulárně biologických metod jsme detekovali zejména molekuly na úrovni exprese RNA ale i proteinu, a také v podobě cirkulující nádorové DNA (ctDNA).

Identifikovali jsme molekuly miRNA s prognostickým významem stanovované jak ve tkáňových ve formalinu fixovaných vzorcích, tak v krevní plazmě. Zjistili jsme přínos kombinace klasických markerů s molekulami miRNA pro stanovení prognózy. Některé naše výsledky podporují tzv. ceRNA hypotézu. Navrhli jsme způsob použití metody OSNA při absenci konceptu sentinelové uzliny u pacientů s NSCLC. Metodou ddPCR jsme prokázali prognostický význam ctDNA u pacientů s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu. Zjistili jsme, že v případě absence tkáňového vzorku nádoru pro vyšetření přítomnosti mutací KRAS genu, je možno tento vzorek do určité míry nahradit analýzou ctDNA.

Výsledky prezentuji formou komentovaných publikovaných prací. Pojítkem jednotlivých prací je účel zkoumaných markerů a metodický přístup.

3 Summary

Current research of treatment of oncological diseases is focused on the identification of changes that occur in the process of carcinogenesis and on the search for therapeutics that would make it possible to eliminate the manifestation of these changes. Early diagnosis, estimating prognosis, monitoring of the course of the disease and prediction of the effect of treatment are increasingly associated with the determination of appropriate biomarkers. The assessment of predictive biomarkers should become an integral part of treatment decisions and, as a result, help patients to prolong life and improve quality of life.

The aim of my thesis was to find prognostic and predictive biomarkers for more effective treatment of cancer patients. In cooperation with a number of clinical departments of the University Hospital in Pilsen, I focused on the research of these biomarkers at the Department of Biology, especially in non-small cell lung cancer, endometrial cancer, colorectal cancer, liver metastases of colorectal cancer, clear cell renal cell carcinoma and sarcomas.

We focused on the research of molecules that are involved in the process of carcinogenesis and whose levels in body fluids or directly in tumor tissue would be able to predict further disease development or therapeutic response. Using molecular biological methods, we detected molecules at the level of expression of RNA, protein or circulating tumor DNA (ctDNA).

We identified miRNA molecules with prognostic significance, both determined in formalin-fixed tissue samples and in blood plasma. We found the benefit of combining classical markers with miRNA molecules for estimation of prognosis. Some of our results support the so-called ceRNA hypothesis. We proposed how to use the OSNA method in the absence of the sentinel node concept in patients with NSCLC. We used the ddPCR method to show the prognostic significance of ctDNA in patients with colorectal cancer liver metastases. We found in certain cases, it may be more appropriate to determine the presence of a KRAS mutation based on plasma results instead of tissue sample results, if tissue samples are not available.

I present the results in the form of annotated published articles. The connection between each article is the purpose of the investigated markers and the methodological approach.

4 Úvod

Výzkum příčin onkologických onemocnění je hybnou silou pochopení řízení buněčného cyklu a řady dalších základních biologických dějů. Onkologická onemocnění patří celosvětově mezi hlavní příčinu úmrtí. Vzhledem k tomu, že celosvětová populace neustále roste, stárne a osvojuje si životní styl, který zvyšuje riziko vzniku rakoviny, dá se očekávat, že počet nově diagnostikovaných případů a počet úmrtí se bude neustále zvyšovat [Torre et al., 2016]. Odhaduje se, že do roku 2025 bude každoročně odhaleno více než 20 milionů nových případů, pro srovnání například s rokem 2012, kdy bylo diagnostikováno zhruba 14 milionů případů [Fidler et al., 2016]. Současný výzkum léčby onkologických onemocnění je zaměřen na identifikaci změn, ke kterým dochází v procesu karcinogeneze a nalezení terapeutik, která by projev těchto změn umožnila eliminovat a pomohla tak optimalizovat onkologickou léčbu.

K prvnímu velkému posunu v onkologické léčbě došlo v 70. letech minulého století, když tehdejší americký prezident Richard Nixon v prosinci 1971 podepsal zákon podporující boj proti nádorovým onemocněním a začaly tak plynout investice do výzkumu a vývoje léčiv [DeVita, 2004]. V současné době nabývá stále většího významu cílená léčba a stále více využívaná imunoterapie. I přes zavedení těchto léčebných režimů, zůstává dosud nenahraditelnou součástí onkologické léčby pacientů se solidními nádory chemoterapie. Cílená léčba umožňuje přímé ovlivnění signálních drah v nádorových buňkách ve prospěch potlačení růstu nádorových buněk.

V klinické praxi u pacientů stejného stádia onemocnění, kterým je podána stejná onkologická léčba, je pozorována různá úspěšnost léčby. Proto zde vyvstává otázka, jakým způsobem předpovědět vhodnost daného léčebného režimu. Jedním ze směrů výzkumu je nalezení vhodných prognostických biomarkerů a prediktivních biomarkerů efektu terapie. Jejich stanovení by se mělo stát neoddelitelnou součástí volby vhodné léčby a ve výsledku tak pacientům prodloužit délku života a zvýšit jeho kvalitu.

Výzkum biomarkerů, který je tématem této disertační práce, probíhal v geneticko-molekulární laboratoři na Ústavu biologie LF UK v Plzni. Výsledky našeho výzkumu vznikly na základě

spolupráce Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni s řadou klinických pracovišť plzeňské Fakultní nemocnice, konkrétně Chirurgické kliniky, Onkologické a radioterapeutické kliniky, Kliniky pneumologie a ftizeologie, Gynekologicko-porodnické kliniky a Urologické kliniky a byly financovány z grantů řešených na pracovišti Ústavu biologie a grantů ve spolupráci s uvedenými pracovišti.

Cílem této disertační práce s názvem „Predikce efektu léčby u solidních nádorů“ bylo nalezení biomarkerů exprimovaných zejména na úrovni RNA, předpovídajících průběh onemocnění a biomarkerů predikujících efekt léčby, a to u nemalobuněčného plicního karcinomu, karcinomu endometria, kolorektálního karcinomu, jaterních metastáz kolorektálního karcinomu, světlobuněčného renálního karcinomu a sarkomů. Zaměřili jsme se na hledání biomarkerů, které by měly pomoci optimálnímu výběru léčby, tedy ty, které by mohly být ve vztahu k prognóze onemocnění a predikci léčby, a to zejména na úrovni exprese RNA ale i proteinu, a také v podobě cirkulující nádorové DNA (ctDNA), tzv. tekuté biopsie (liquid biopsy). Výsledky prezentuji formou komentovaných publikovaných prací. Pojítkem jednotlivých prací je účel zkoumaných markerů a metodický přístup.

5 Uvedení do problematiky

Přestože onkologická onemocnění stále zůstávají spolu s kardiovaskulárními chorobami hlavní příčinou úmrtí, pokroky v jejich diagnostice a léčbě v posledních dekáдах zásadně prodloužily přežití pacientů a zlepšily kvalitu jejich života.

Klíčové organizace určující a udávající trendy v léčebných postupech jsou Americká onkologická společnost (ASCO) a Evropská onkologická společnost (ESMO). Tyto organizace se aktivně podílejí na výrazném vývoji onkologie, díky kterému dochází k neustálému rozšiřování léčebných možností. Současná onkologická léčba v České republice vychází z doporučených postupů popsaných v Modré knize [dostupné z: 20.pdf (linkos.cz)] každoročně vydávané Českou onkologickou společností, která zde shrnuje doporučení pro léčbu onkologických onemocnění. Jsou zde popisovány doporučené postupy, které se na základě aktualizací podílejí na léčbě jednotlivých nádorových onemocnění.

Kromě zavedených postupů, jako je chirurgická léčba, která je stále základním pilířem léčby onkologických pacientů, nebo chemoterapie a radioterapie, je v posledních letech stále větší snaha o personalizovaný přístup, který díky identifikaci vhodných cílů prostřednictvím biomarkerů umožňuje větší individualizaci léčby a její optimální zvolení.

Národní onkologický institut definuje biomarkery jako molekuly nacházející se v tělních tekutinách nebo tkáních, jejichž hladina slouží jako indikátor biologického stavu za fyziologických i patologických podmínek [Henry a Hayes, 2012]. Nádorové biomarkery jsou látky, které jsou produkovány přímo buňkami nádoru nebo buňkami nenádorovými jako odpověď na změny vlastních nádorových buněk. Přítomnost nádorových biomarkerů nebo jejich zvýšená či naopak snížená hladina může mít diagnostickou, prediktivní nebo prognostickou výpovědní hodnotu. Prediktivní markery slouží pro predikci léčby a přímo tak předpovídají účinnost léčiva. Zatímco prognostické markery určují prognózu onemocnění a pomáhají tak na základě znalosti vývoje onemocnění zvolit vhodnou léčbu. Jako nádorové biomarkery jsou využívány zejména různé druhy bílkovin a nukleových kyselin, které jsou stanovovány jak v nádorové tkáni, tak v tělních tekutinách. V současné době jsou jednou z dynamicky se rozvíjejících oblastí výzkumu biomarkerů pro časný záchyt onemocnění,

diagnostiku, prognózu a predikci léčby, molekuly RNA, a to zejména molekuly patřících do skupiny nekódujících RNA.

Nekódující RNA (ncRNA) jsou typem funkčních molekul RNA, které nepodléhají procesu translace a svojí fyziologickou, případně patofyziologickou roli vykonávají přímo. Mezi tyto molekuly patří molekuly mikroRNA (miRNA) a dlouhé nekódující RNA (lncRNA), jejichž podíl v procesu nádorové transformace je více jak 15 let intenzivně zkoumán.

5.1 Expresní hladiny RNA

Intenzivní rozvoj zkoumání využití molekul mikroRNA jako biomarkerů po roce 2005 byl umožněn v té době již dobře zavedenou metodou RT real-time PCR, která se začala vyvíjet a zpřesňovat po roce 1990. První komerčně dostupný přístroj pro real-time PCR byl na trh zaveden v roce 1996 firmou Applied Biosystems a tak začala být tato metoda hojně využívána zejména vědeckými pracovišti [Valasek a Repa, 2005]. Do stanovení biomarkerů na úrovni exprese mRNA se vkládaly velké naděje, a to z několika důvodů. Prvním byla očekávána vysoká senzitivita díky metodě RT-PCR. Dalším důvodem byla možnost rychlého stanovování nových molekul vzhledem k možnosti rychlého dodání daných primerů, což byl zásadní pokrok vzhledem k délce přípravy nových protilátek při stanovení hladiny proteinu. V neposlední řadě syntéza primerů a celá metodika stanovení byla levnější než v případě stanovení nových proteinů pomocí protilátek. Cena přístrojů pro real-time PCR rovněž strmě klesala na přibližně pětinovou hodnotu u prvních dostupných přístrojů. Tyto faktory se stále uplatňují při hledání odpovědí na predikci léčby či sledování minimální reziduální choroby pomocí biomarkerů stanovovaných na úrovni exprese RNA.

Jak již bylo zmíněno, regulace buněčného cyklu a apoptózy může být v případě nádorových onemocnění změněna v důsledku narušení kontrolních mechanismů buněčného dělení, reparačních procesů DNA nebo narušením rovnováhy proapoptotických a antiapoptotických regulátorů.

Výzkum biomarkerů u onkologických onemocnění se zaměřuje právě na stanovení exprese těchto genů na úrovni mRNA, a to pro predikci léčby, kdy je v případě predikce účinku

chemoterapie stanovována exprese genů účastnících se reparace DNA nebo metabolismu a vstřebávání chemoterapeutik. Dále pro prognózu onemocnění, kdy jsou zkoumány téměř všechny geny, o nichž je znám vztah ke karcinogenezi. Pro stanovení minimální reziduální choroby nebo pro stanovení přítomnosti nádorových buněk například v lymfatických uzlinách.

5.2 mikroRNA (miRNA)

Posledních 15 let je věnována intenzivní pozornost výzkumu molekul miRNA ze skupiny ncRNA, které mají pro svou patofyziologickou roli, stabilitu v biologických vzorcích a svou poměrně snadnou stanovitelnost, potenciál stát se cennými diagnostickými, prognostickými a prediktivními markery. První miRNA byla popsána v roce 1993 týmem Leeho a jeho spolupracovníků u háďátka obecného *Caenorhabditis elegans* [Bhaskaran a Mohan, 2014]. Po dlouhou dobu však nebyla tomuto objevu věnována pozornost. Výrazný posun ve výzkumu nastal teprve v roce 2002, kdy George Calin popsal ve své práci vztah molekul miRNA k nádorové patogenezi [Calin et al., 2002]. Od této doby probíhá intenzivní výzkum molekul miRNA, můžeme říci u všech onkologických onemocnění.

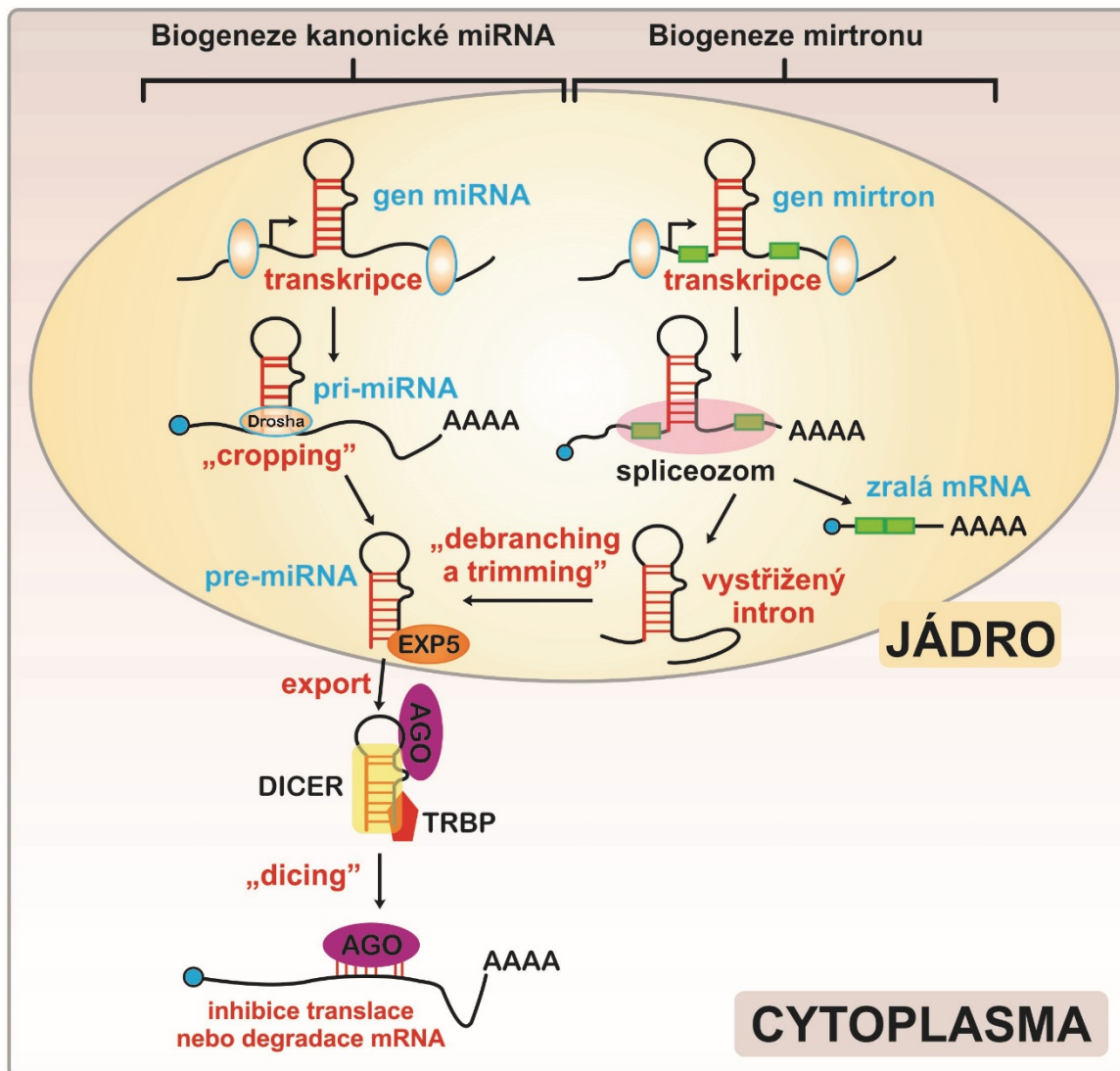
miRNA jsou krátké nekódující molekuly RNA o velikosti 19 až 25 nukleotidů, které negativně regulují genovou expresi degradací nebo represí translace mRNA. Právě degradace nebo represe translace cílové mRNA brání vzniku proteinu [Baek et al., 2008]. miRNA bývají aktivně vylučovány buňkami do tělních tekutin a jejich hladiny lze snadno a opakovaně stanovovat [Inamura et al., 2016]. Asi nejdůležitější pro jejich klinické využití je, že hladiny miRNA nacházející se v extracelulárním prostoru odrážejí děje odehrávající se uvnitř buněk organismu [Mitchell et al., 2008].

5.2.1 Biogeneze miRNA

Molekuly miRNA jsou kódované jaderným genomem, dosud bylo popsáno více než 2,5 tisíce genů pro různé miRNA. Jejich biogeneze probíhá jak v jádře, tak v cytoplazmě [Lee et al., 2002]. Prvním krokem biogeneze miRNA je transkripce primární miRNA (pri-miRNA) v jádře. Pri-miRNA má vlásenkovou strukturu, která je ohraničena na 5' konci 7-metylguanosem (m7G) a na 3' konci polyA sekvencí. Tato až několik set nukleotidů dlouhá molekula je dále sestřižena v prekurzorovou miRNA (pre-miRNA) a poté exportována pomocí proteinu exportin-5 do cytoplazmy. Exportin-5 je v přítomnosti kofaktoru Ran (Ras-related nuclear protein) vázán s GTP. Pomocí enzymu Ran-GTPáza dochází k hydrolýze Ran-GTP na Ran-GDP, což způsobí aktivaci proteinu exportin-5, který poté exportuje pre-miRNA do cytoplazmy, kde dochází

k maturaci do dvouřetězcové miRNA. Jeden řetězec bývá označován jako vedoucí řetězec (guide strand) a je vkládán za účasti komplexu Dicer(RNáza III)-TRBP (Transactivating Response RNA-Binding Protein) do multiproteinového komplexu RISC (RNA-induced silencing complex). Druhý řetězec se označuje jako doprovodný řetězec (passenger strand) a podléhá degradaci [Ro et al., 2007; Chendrimada et al., 2005; Bohnsack et al., 2004]. miRISC je multiproteinový komplex obsahující molekulu miRNA, která realizuje svou funkci komplementárním navázáním na konkrétní místo na mRNA. Většina molekul miRNA realizuje svoji regulační funkci prostřednictvím vazby v 3' nepřekládané oblasti (3'UTR, untranslated region) mRNA, kde je regulace genové exprese nejúčinnější [Schwarz et al., 2003]. Hlavní součástí multiproteinového komplexu miRISC, která umožňuje jeho funkci, jsou proteiny rodiny Argonaut (Ago). Ago proteiny mají endonukleázovou aktivitu, kterou pak uplatňují proti cílové mRNA. Interakce miRNA s komplexem RISC je zprostředkována navázáním proteinu Ago2 ke komplexu Dicer-TRBP. Poté dojde k navázání na řetězec miRNA, který je přenesen s Ago2 do RISC komplexu (RNA-induced silencing complex), [Chendrimada et al., 2005; Gregory et al., 2005]. V závislosti na komplementaritě vazby mezi miRNA a cílovou mRNA dochází buď k degradaci mRNA katalyzovanou proteinem Ago2 při úplné komplementaritě, zatímco neúplná komplementarita bývá spojena s inhibicí translace [Carthew a Sontheimer, 2009].

Kromě výše popsané kanonické biogeneze existují i alternativní, méně časté cesty biogeneze miRNA. Méně častou, nekanonickou biogenezí je mikroprocesor-independentní cesta, kdy je pre-miRNA vystřižena z mirtronů. V tomto případě je genetická informace pro miRNA uložena v intronu a po sestřihu již funguje jako pre-miRNA. Pre-miRNA je poté přenesena pomocí proteinu exportin-5 do cytoplazmy a dále už biogeneze pokračuje stejným způsobem jako u kanonické dráhy (Obrázek 1), [Okamura et al., 2007; Yang a Lai, 2011]. Další možností biogeneze je dicer-independentní dráha, kde se na pre-miRNA po jejím přenesení do cytoplazmy váže Ago2 a poly(A)-specifická ribonukleáza PARN, které ji zkrátí a rozdělí na vedoucí a doprovodné vlákno [Cifuentes et al., 2010].



Obrázek 1 – Kanonická a nekanonická cesta biogeneze miRNA (upraveno podle Huang et al., 2013)

Molekuly miRNA se tedy nepochybně významně podílejí na posttranskripční regulaci genové exprese. Bylo zjištěno, že regulace prostřednictvím molekul miRNA je velice komplexní a provázaná. Daný typ molekuly miRNA může regulovat stovky genů a zároveň jeden gen může být regulován více různými molekulami miRNA [Lu et al., 2018]. Pro popsání tohoto komplexního způsobu regulace genové exprese byla vytvořena tzv. ceRNA hypotéza (competing endogenous RNA). Tato hypotéza se snaží mechanismus regulace biologických procesů a vztah mezi mRNA a miRNA objasnit pomocí tzv. MRE elementů (miRNA response elements). miRNA se párují s komplementárními místy cílových RNA, MRE elementy a regulují tak genovou expresi [Jiang et al., 2020]. Již bylo zmíněno, lidský genom obsahuje více než 2500

genů pro miRNA, které, jak se postupně ukazuje, regulují přibližně 60 % protein kódujících genů.

Jako regulátory genové exprese se miRNA podílí na řízení všech základních buněčných funkcí a jejich dysregulace byla popsána u řady nejen onkologických onemocnění. Mnoho studií popsalo změny v expresi miRNA a jejich zapojení do karcinogeneze, progresu nádoru, vývoje metastáz a jejich vztahu k prognóze a účinkům léčby u řady nádorových onemocnění [Inamura et al., 2016; Montagnana et al., 2017]. MiRNA v karcinogenezi mohou vykazovat jak onkogenní, tak tumor supresorovou funkci. Jako onkogenní miRNA označujeme ty, které převážně regulují expresi tumorsupresorových genů nebo genů, které kontrolují buněčnou diferenciaci a apoptózu. Onkogenní miRNA bývají v nádorech nadměrně exprimovány [Espinosa a Slack, 2006]. Naopak, jako tumor supresorové miRNA označujeme ty, které regulují expresi protoonkogenů. Hladiny tumorsupresorových miRNA bývají v nádorové tkáni oproti normální tkáni výrazně snižené [Shenouda a Alahari, 2009].

Existuje několik mechanismů podílejících se na vzniku aberantních expresních hladin miRNA. Příčinou mohou být genetické změny zahrnující chromozomální aberace, nebo mutace genů pro miRNA, či epigenetické změny, především hypermetylace promotorů a změny v biogenezi miRNA [Lee a Dutta, 2009]. Studium miRNA v různých typech nádorů ukázalo velkou variabilitu v dysregulaci miRNA. Nicméně se zdá pravděpodobné, že určité typy nádorů mají charakteristický profil exprese miRNA. Bylo zjištěno, že některé miRNA jsou specifické pro konkrétní typ nádoru, jiné se vyskytují ve více nádorových typech [Wu et al., 2007].

5.3 Mediátorová RNA

mRNA jsou jednovláknové molekuly RNA, které společně s nekódujícími molekulami RNA vznikají procesem transkripce, tedy přepisem molekuly DNA do molekuly RNA. Primární transkript (pre-mRNA) vzniká na principu komplementarity k antisense vlákně DNA a polymerace probíhá, stejně jako při syntéze vlákna DNA, ve směru 5' → 3'. Svoji sekvencí odpovídá sense vlákně DNA a obsahuje i nepřekládané, tzv. intervenující sekvence, které jsou následně vystřiženy působením komplexu zvaného spliceozom. Výsledkem úprav molekuly pre-mRNA je molekula mRNA, která vstupuje za účasti exportního faktoru Mex67 do cytoplazmy eukaryotických buněk, kde je její informace během procesu translace překládána do molekuly proteinu [Xie a Ren, 2019]. Bylo zjištěno, že více než 98 % veškeré transkribované RNA není translatováno v protein, většina transkriptů je představována nekódující RNA (ncRNA). V posledních dvou dekadách byly objeveny tisíce genů pro nekódující RNA zahrnující zejména geny pro miRNA a lncRNA. S uvedeným souvisí zjištění, že přestože kódující sekvence DNA zahrnují pouze 1,5 % genomu, celkově je transkripčně aktivních 80 % genomu.

Ukázalo se, že velká část nekódujících RNA hraje zásadní roli v transkripční a postranskripční regulaci genové exprese, tzn. ve fyziologii normálního buněčného vývoje a procesech probíhajících v buňce, ale i patologických procesech, jako je deregulace buněčného cyklu a apoptózy, tedy procesech nádorové transformace [Taft et al., 2010].

Transkripce je u eukaryotických buněk iniciována navázáním několika transkripčních faktorů a RNA polymerázy II v oblasti promotoru pracovního vlákna DNA. RNA polymeráza rozeznává specifické sekvence promotoru a váže se tak na DNA. Jedna z nejčastějších promotorových sekvencí je TATA-box, jeho konsenzuální sekvence je TATAAAA. Další častým úsekem DNA ležícím v eukaryotickém promotoru je CAAT-box, jehož sekvence je GGCCAATC a váže se na něj transkripční faktor CTFNF1 nebo GC-box se sekvencí GGCGG, na který se váže transkripční faktor SP1. Jednotlivé interakce s promotorem vedou ke změnám konformací jednotlivých proteinů, což podněcuje vznik nových vazebných míst pro další faktor. Faktory ovlivňující genovou expresi rozlišujeme na tzv. cis a trans elementy. Jako Cis regulační elementy, označujeme sekvence promotorů, enhancerů nebo silencerů, jsou to oblasti nekódující DNA, které regulují transkripci blízkých genů. Oproti tomu, trans regulační elementy jsou sekvence

DNA kódující regulátory (trans působící faktory, např. transkripční faktory), které modifikují nebo regulují expresi vzdálených genů. Ve většině případů, trans působící faktory interagují s cis regulačními sekvencemi a regulují tak genovou expresi [Wang et al., 2019]. Fosforylace RNA polymerázy II vyvolá významnou konformační změnu celého komplexu a zahájí tak transkripci. Transkripcí genu vzniká primární transkript pre-mRNA, který podléhá dalším posttranskripčním úpravám a je upraven na funkční molekulu mRNA.

V eukaryotických buňkách se na rozdíl od prokaryotických buněk na transkripci podílí transkripční faktory a 3 typy RNA polymeráz. Všechny mRNA a většina regulačních, nepřekládaných RNA jsou syntetizovány RNA polymerázou II, tyto transkripty obvykle nízké hladiny expresí a tvoří pouze zhruba 5-10 % všech buněčných RNA. Nejhojnějším typem RNA je ribozomální RNA (rRNA), která je produkována RNA polymerázou I. Krátké nekódující RNA (především tRNA a 5S rRNA) jsou syntetizované RNA polymerázou III [Khatter et al., 2017].

5.3.1 hnRNA

V literatuře se můžeme také setkat s termínem heterogenní jaderná RNA (hnRNA). Jak již bylo zmíněno výše, transkripcí eukaryotického genu vzniká prekurzor budoucí mRNA, primární transkript pre-mRNA. Soubor všech pre-mRNA z mnoha genů v buněčném jádře označujeme termínem heterogenní jaderná RNA (hnRNA). Jedná se o směs primárních transkriptů RNA molekul různých délek, které ještě nepodstoupily posttranskripční úpravy a jsou tak podstatně delší než délka vlastních mRNA [Alberts et al., 2013].

5.4 Posttranskripční úpravy pre-mRNA

Cílem postranskripčních úprav je stabilizace molekuly RNA a dosažení struktury, připravené pro translaci genetické informace. Oddělení transkripce a translace jadernou membránou umožňuje spojitější řízení genové exprese, které je zřejmě jedním z faktorů evoluce organismů od jednobuněčných ke složitým mnohobuněčným organismům, jako je lidský druh.

5.4.1 Připojení čepičky a polyadenylace

První postranskripční úpravy se týkají obou konců primárního transkriptu. Nejdříve dochází k navázání nukleosidu 7-methylguanosu (m⁷G) na první nukleotid 5'-konce primárního transkriptu, který je následně methylován a vzniká tzv. čepička, která chrání řetězec před štěpením exonukleáz. Ihned po dokončení transkripce dochází i k výrazné úpravě 3'-konce primárního transkriptu, kde dochází k polyadenylaci. 3'-konec naštěpen specifickou ribonukleázou a následně je na tento nově vytvořený konec přidána sekvence až 250 nukleotidů adeninu. Vzniká tzv. poly(A)-konec, který také chrání molekulu mRNA před enzymatickým působením exonukleáz a podílí se na řízení transportu mRNA z jádra [Alberts et al., 2013].

5.4.2 Sestřih prekurzorové mRNA

Sestřih pre-mRNA je přísně regulovaný proces, který následuje po transkripci genů a předchází translaci mRNA do proteinů. Primární transkript obsahuje kódující sekvence - exony, přerušované nekódujícími sekvencemi - introny. Ještě v jádře prodělává pre-mRNA proces splicing neboli sestřih, kdy dochází k vystřížení intronů a spojení exonů ligací za vzniku mRNA, která je poté transportována do cytoplazmy, kde dochází k translaci do proteinu.

Sestřih probíhá působením spliceozomů, jaderných enzymových komplexů, které obsahují malé jaderné RNA (snRNA) a řadu dalších proteinů [Lund a Kjems, 2002]. U většiny

eukaryotních organismů existují dva typy spliceozomů, U2-dependentní a U12-dependentní. U2-dependentní spliceozom se skládá z U1, U2, U4, U5 a U6 snRNA a účastní se tzv. kanonického sestřihu, který zajišťuje vystřížení U2 typu intronů, které se vyskytují ve většině eukaryotních genů. U12-dependentní spliceozom skládající se z U11, U12, U4atac, U5 a U6atac snRNP, se podílí na sestřihu U12 typu intronů, které tvoří minoritní podíl intronů v eukaryotních genech [Sheth et al., 2006].

K sestřihu dochází na rozhraní 3' konce exonu a 5' konce intronu, kde se nachází 5' sestřihové místo, jehož obecná konsenzuální sekvence je u obratlovců AAG/GUAAGU. Rozpoznání tohoto místa je zcela klíčové pro správně probíhající sestřih, který zajišťuje U1 snRNA.

Introny jsou z pre-mRNA odstraňovány ve dvou po sobě jdoucích transesterifikačních reakcích, při kterých dochází k přeměně fosfátového esteru. Při první reakci dochází k vytvoření 2'-5' fosfodiesterové vazby mezi 2' hydroxylovou skupinou adenosinu ve větvicím se bodě a 5' koncovým nukleotidem intronu, čímž vzniká lasovitá struktura intronu. Druhá reakce probíhá mezi 3' hydroxylovou skupinou na 3' konci exonu před odstraňovaným intronem. Dochází k rozštěpení fosfodiesterové vazby a vytváří se nová fosfodiesterová vazba mezi 5' exonem a 3' exonem. Dochází tedy ke spojení exonů dohromady a k uvolnění intronu z lasa. Po dokončení druhé reakce dochází k rozvolnění spliceozomu a jeho komponenty obnoveny pro další sestřih [Nilsen, 2003; Padgett et al., 1984].

5.4.3 Alternativní sestřih

Sestřih pre-mRNA může probíhat dvěma způsoby – konstitutivně nebo alternativně. Některé exony se v mRNA vyskytují vždy a jejich sestřih je konstitutivní. Některé exony se mohou vyskytovat alternativně, to znamená, že určitá sekvence se v jedné molekule může chovat jako exon, zatímco v jiné jako intron. To může probíhat ve stejné buňce, takže z jednoho genu, jedné pre-mRNA, mohou vzniknout různé formy mRNA, které pokud kódují proteiny, přispívají k rozmanitosti a specializovanosti proteomu. Jeden gen se může odlišně exprimovat v různých tkáních. V takovém případě se jedná o tkáňově specifický alternativní sestřih. Alternativní sestřih odpovídá za fakt, že počet různých proteinů je výrazně vyšší než počet genů [Alberts et al., 2013; Johnson et al., 2003].

5.4.4 Editace mRNA

Během sestřihových procesů dochází k výraznému zkrácení primárního transkriptu a jeho reorganizaci do finální translatované sekvence. Je velmi zajímavé, že i v této fázi genové exprese může být upravována také sekvence finální mRNA, a to procesem editace RNA. Při tomto procesu dochází k záměně některých nukleotidů, čímž dochází ke změně sekvence, která byla původně přepsaná podle DNA a mění se tak její původní smysl. Sekvence RNA už tedy zcela neodpovídá sekvenci genu, který jí byl předlohou. Podle editované RNA následně probíhá translace do proteinu. V důsledku editace RNA může tedy dojít k translaci různých proteinů podle původně jediného genu a představuje tak další zdroj variability proteomu [Zadražil, 2007].

5.4.5 Nonsense mediated decay

Během genové exprese může docházet k procesním chybám na různých molekulárních úrovních. Z tohoto důvodu si eukaryotické buňky vytvořili různé kontrolní mechanismy, jedním z těchto mechanismů je nonsense mediated decay (NMD), posttranskripční proces, který kontroluje kvalitu transkriptu a udržuje buněčnou homeostázu eliminací transkriptů, které obsahují předčasně zařazené terminační kodony (PTC, premature termination codon) v mRNA. Takové defektní mRNA degraduje.

Předčasně zařazené terminační kodony mohou vznikat v důsledku nonsense a posunových mutací v sekvenci DNA nebo v důsledku abnormálního splicingu nebo transkripce. Funkcí NMD je zabránit translaci aberantních transkriptů, které by mohly produkovat C-terminálně zkrácené a potenciálně škodlivé proteiny [Chang et al., 2007].

NMD chrání buňku před působením zkrácených proteinů, které mohou mít dominantně negativní efekt nebo se mohou projevovat mechanismem gain-of function. Tento kontrolní mechanismus je schopen regulovat fenotyp různých genetických onemocnění včetně nádorových onemocnění [Frischmeyer a Dietz, 1999].

Za předčasně zařazený terminační kodon se považuje triplet ležící více jak 50 nukleotidů protisměrně od 5' konce posledního exonu. Před samotným rozpoznáním takového kodonu dochází k sestřihu pre-mRNA na mRNA. Při sestřihu se odstraní introny a jednotlivé spoje mezi exony se označí navázáním EJC komplexu (exon-junction complex). EJC je proteinový komplex nacházející se ve spliceozomu 20 - 24 nukleotidů protisměrně od exonových spojů. Ribozom posouvá EJC komplexy po molekule mRNA, dokud nenarazí na terminační kodon. Pokud se terminační kodon nachází v blízkosti konce exonu, je funkcí ribozomu odstranit všechny EJC komplexy. Po odstranění EJC komplexů proběhne translace molekuly mRNA v protein. Pokud při translaci ribozomem nedojde k odstranění tohoto komplexu, aktivuje se NMD mechanismus a dojde k degradaci molekuly. To nastane v případě, že se terminační kodon nachází více jak 50 nukleotidů protisměrně od 5' konce exonu. Ribozom se zastaví na předčasně zařazeném kodonu, nedojde k vyvázání EJC komplexu a molekula mRNA podléhá degradaci prostřednictvím NMD mechanismu [Hillman et al., 2004].

5.5 Metody stanovení exprese RNA

Jak již bylo zmíněno, poslední dvě dekády jsou nejčastěji používané metody pro hodnocení genové exprese založeny na reverzní transkripci následované polymerázovou řetězovou reakcí (RT real-time PCR). Tento přístup umožňuje kvantifikaci genové exprese na úrovni mRNA, miRNA, stanovení počtu kopií sledovaného genu, ale i kvalitativní analýzu například při stanovení mutací nebo polymorfismů. Výhodou této metody je absolutní kvantifikace pomocí standardní křivky, tedy stanovení absolutního množství určité cílové sekvence nukleové kyseliny ve vzorku. Podstatou metody PCR je mnohonásobná amplifikace sekvence molekuly DNA ohraničené tzv. primery – krátkými syntetickými oligonukleotidy sloužícími také jako startovací očka. Syntéza nového vlákna probíhá za střídání teplot a pomocí termostabilní DNA polymerázy, která přidává nové nukleotidy na 3' konec nově vznikajícího vlákna. Nicméně, jak bude zmíněno dále, k detekci markerů na úrovni exprese RNA se používají také metody izotermické amplifikace s odlišnou koncepcí primerů.

Metoda RT real-time PCR se běžně využívá při detekci miRNA. Vzhledem k jejich krátké velikosti, ale není možno použít standardní primery, protože by pokrývaly jejich téměř celou sekvenci anebo by byly naopak moc krátké, a tedy málo specifické. Proto je potřeba použít speciální prodlužující primery.

V současné době se rozvíjí metoda digitální PCR (ddPCR), někdy označovaná jako třetí generace PCR. Princip digitální PCR spočívá v rozdělení analyzovaného vzorku do velkého počtu reakčních alikvótů (lipidickou membránou obalených kuliček), ve kterých proběhne vlastní amplifikace. Tato metoda umožňuje absolutní kvantifikaci hladin DNA bez nutnosti kalibrační křivky a vzhledem ke své vysoké citlivosti, dokáže detekovat i nízké hladiny DNA, což je ideální pro detekci ctDNA jako biomarkeru u nádorových onemocnění. Digitální PCR můžeme použít i pro detekci amplifikace genů, které se podílejí na nádorové transformaci, především onkogenů, jejichž detekce může přispět k diagnostice onemocnění a může mít prognostický nebo prediktivní význam [Fialová et al., 2019].

Novější přístupy v experimentální onkologii využívají modernější technologie umožňující paralelní analýzu velkého počtu genů nebo proteinů během jediného experimentu – tzv. funkční genomiku a proteomiku. Mezi tyto metody se řadí expresní microarraye neboli DNA

čipy, které dokáží paralelně analyzovat expresi tisíců genů a detekovat změny v expresi těchto genů u dvou či více vzorků, např. mezi nádorovou a zdravou tkání. Princip techniky spočívá v hybridizaci mezi vzorkem DNA (například cDNA) a sekvenčně specifickými DNA sondami, které jsou navázány na povrchu čipu.

Při použití tzv. cDNA čipu je potřeba fluorescenčně značená cDNA pomocí fluorochromů. Pro hybridizaci k DNA čipu se používají dva vzorky, jeden kontrolní (nenádorový) a druhý zkoumaný (nádorový) vzorek, který se porovnává s kontrolním vzorkem. Každá cDNA populace je značená jiným fluorescenčním barvivem, obě populace jsou následně smíchány v poměru 1:1 a po nanesení hybridizačního roztoku nanесeny na čip, kde pobíhá hybridizace k sondám na povrchu čipu. Z poměrů fluorescenčních signálů na hybridizovaném čipu lze potom identifikovat geny nadměrně nebo naopak redukovaneě exprimované v příslušných vzorcích. Druhým možným typem jsou oligonukleotidové čipy vyráběné např. firmami Affymetrix nebo Agilent. Tyto DNA čipy jsou založené na syntéze 25 nukleotidových sond přímo na povrchu čipu [Čížková, 2005; Hatina, 2005].

V poslední dekádě je do klinické praxe zaváděna vysoce citlivá metoda OSNA, která je založena na reverzní transkripci následované izotermickou amplifikací cytokeratinu 19 (CK 19) mRNA pomocí metodiky tzv. izotermické amplifikace zprostředkované smyčkou (LAMP). Stanovení markeru CK 19 je provedeno touto metodou pomocí tří párů CK 19 specifických primerů. Metoda OSNA detekuje prostřednictvím tohoto markeru přítomnost nádorových buněk epiteliálního původu v lymfatických uzlinách. Hlavní výhodou tohoto metodického přístupu je, že analýza je provedena v kompletní vyšetřované tkáni (homogenát), nikoli v řezech získaných prokrájením vyšetřované tkáně, což vede k eliminaci možnosti minutí mikrometastázy uložené mimo zkoumanou linii řezů. Cytokeratin 19 (CK19) je keratin typu I, který je přítomný jak v normálních epiteliálních buňkách, tak v buňkách epiteliálních tumorů a jejich metastáz, nikoliv ale v lymfatických uzlinách, proto je vhodným biomarkerem pro detekci mikrometastáz a makrometastáz [Peréz et al., 2019].

V současné době jsou stále více využívány technologie umožňující detekci exprese celého lidského genomu, které nabízejí značné možnosti pro onkologický výzkum i klinickou praxi. Tyto metody patří mezi metody sekvenování nové generace (NGS). Oproti tradičním sekvenačním metodám, které jsou vždy cílené na konkrétní gen (výjimečně geny), dokáží

sekvenační metody nové generace analyzovat více genů, případně celý genom během jediného experimentu. Pomocí NGS lze analyzovat sekvenaci genomové DNA nebo její části s cílem identifikovat jednonukleotidové záměny (SNV), variabilitu v počtu kopií genů (CNV) nebo krátké inserce a delece (*indels*). Druhou možností je sekvenace transkriptomu (RNA-sequencing), soubor všech transkriptů v buňce, díky které můžeme detekovat fúzní geny pomocí analýzy nádorové RNA. Jedná se vlastně o analýzu sekvence cDNA přepsané RNA reverzní transkripcí. Prvním krokem NSG je příprava vzorku DNA, kdy je DNA fragmentovaná na úseky několik set bází dlouhé. Na konce vzniklých fragmentů se poté navážou adaptorové sekvence, které umožní jejich amplifikaci pomocí PCR metody a fixaci na solidní povrch. Ve druhém kroku jsou pak amplifikované fragmenty DNA paralelně sekvenovány a následně analyzovány. Vyšetřované sekvence jsou porovnávány s referenčním genomem. Poté se hledají případné změny v sekvenovaném vzorku DNA [Slabý, 2018].

5.6 Tekutá biopsie

S rozvojem znalostí procesu karcinogeneze a s tím související identifikací mutací DNA, které jsou jednou z hybných sil tohoto procesu, jsou hledány a nacházeny látky, schopné interagovat a blokovat příslušné onkoproteiny a aktivované dráhy a tím blokovat proliferaci a růst nádorových buněk. S uplatněním těchto léčiv je spojeno stanovení přítomnosti příslušných mutací jako prediktorů léčby. Pro klinické uplatnění je samozřejmě vhodné získat možnost opakovaného testování přítomnosti daných mutací – biomarkerů. Z tohoto hlediska se pro odběr jako nejvhodnější jeví periferní krev. Obor dlouhodobě se věnující stanovení nukleových kyselin jako biomarkerů v krvi působil pod zkratkou CNAPS (Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum). Nicméně v současnosti se pro stanovení těchto biomarkerů (a nejen nukleových kyselin) vžil termín tekutá biopsie (liquid biopsy).

Tekutá biopsie umožňuje detekovat, analyzovat a monitorovat nádorové onemocnění na základě analýzy molekul a struktur uvolněných z nádorové tkáně do různých tělních tekutin jako je např. periferní krev nebo moč. Tekutá biopsie představuje minimálně invazivní metodu.

Tento přístup dříve zaměřoval především na detekci cirkulujících nádorových buněk (CTC), tzn. buněk v periferní cirkulaci pocházejících z primárního nádoru nebo metastazující léze, které putují krevním oběhem do dalších částí těla. Hladiny cirkulujících nádorových buněk jsou popisovány jako prognostický marker pro pacienty různých nádorových onemocnění a po detekci jejich hladin a zahájení léčby představují vhodný marker monitorování odpovědi na léčbu [Alimirzaie et al., 2019].

V současné době se přístup tekuté biopsie zaměřuje zejména na analýzu nukleových kyselin uvolňovaných nádorem, označovaných jako ctDNA (cirkulující nádorová DNA), což je DNA obsahující stejné změny jako v nádorové tkáni, cf-mRNA nebo nekódující cf-ncRNA [Poulet et al., 2019].

Nukleové kyseliny v krvi nemusí být pouze v podobě volných molekul, mohou být také obsaženy v extracelulárních membránových vezikulech, kde jsou chráněny před působením nukleáz. Tyto membránové struktury zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci a mohou

být uvolňovány jak ze zdravých, tak nádorových buněk. Na základě jejich velikosti a původu se dělí na exozomy, mikrovezikuly a apoptotická tělíska.

Exozomy jsou typem extracelulárních vezikulů endocytického původu o velikosti zhruba 30 až 100 nm, které hrají důležitou roli při výměně molekulárních informací mezi buňkami. Jak za fyziologických, tak patologických podmínek mohou být exozomy uvolňovány různými typy buněk včetně buněk imunitního systému, kmenových buněk a nádorových buněk. Exozomy odvozené od normálních buněk se uplatňují při udržování homeostázy [Cui et al., 2017]. Exozomy odvozené od nádorových buněk jsou detekovatelné v krvi onkologických pacientů obsahující řadu molekul, jak již bylo řečeno nukleové kyseliny, proteiny a lipidy, které jak se ukázalo, dobře korelují s progresí nádoru, angiogenezí nebo výskytem metastáz. Exozomy jsou považovány za mediátory genetické výměny mezi heterogenními populacemi nádorových buněk. Druhým typem membránových vezikulů jsou mikrovezikuly, které vznikají pučením plazmatické membrány.

Apoptotická tělíska vznikají při rozpadu buněk programovanou buněčnou smrtí a obsahují fragmenty původních buněk včetně DNA, RNA, proteinů a buněčných organel. Apoptotická tělíska jsou uvolňována všemi typy buněk a jsou postupně odstraňována fagocytózou [Pös et al., 2018].

DNA může být uvolňována také z cirkulujících nukleozomů, což jsou komplexy DNA a proteinů, které jsou výsledkem štěpení chromozomální DNA během apoptózy. Jedná se o fragmenty dvouvláknové DNA, které jsou obaleny kolem histonového oktameru. DNA, která se přímo váže na nukleozomy, je chráněna před působením nukleáz, a proto se v cirkulaci vyskytuje ve formě mono a oligonukleozomových fragmentů. Nukleozomové uspořádání se liší mezi různými buňkami v závislosti na tkáňově specifické genové expresi. To je způsobeno tím, že se nukleozomy nacházejí v blízkosti míst, kde začíná transkripce, v místech, kde se transkripční faktory váží na DNA. Tyto faktory chrání DNA před působením nukleáz během apoptózy vedoucí ke specifické fragmentační struktuře, která poskytuje informace o původu tkáně této cfDNA [Pös et al., 2018].

Výše uvedené ukazuje, jak pestrá paleta částic a molekul je uvolňována nádorovou tkání. Předpokládá se, že tekutá biopsie svým způsobem odráží komplexně molekuly obsažené v celé nádorové tkáni, myšleno ve všech částech a tím pádem svým způsobem odráží i nádorovou

heterogenitu. Dále je možno také říct, že tekutá biopsie umožňuje sledování vývoje nádoru v reálném čase.

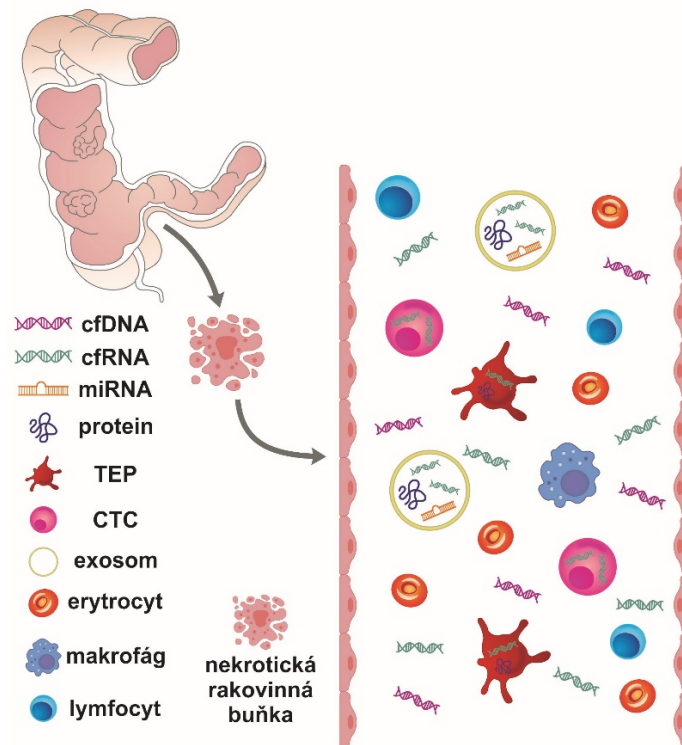
5.6.1 Komponenty tekuté biopsie

Vzhledem ke vztahu efektivního podání cílené léčby a přítomnosti, resp. absenci mutací DNA daného genu, upíná se pozornost, i z důvodu vysoké stability molekul DNA v tělních tekutinách, především ke stanovení volné cirkulující DNA, resp. volné nádorové DNA. Jde o krátké extracelulární fragmenty dvouvláknové molekuly DNA, které jsou volně přítomné v krvi a dalších tělních tekutinách. U zdravých jedinců se cfDNA vyskytuje v krvi ve velmi nízkých koncentracích. K uvolnění těchto fragmentů do krve dochází apoptózou nebo nekrózou. Výrazně zvýšené hladiny cfDNA jsou často detekované u pacientů s nádorovým onemocněním, především pak u pacientů s metastázami [Jahr et al., 2001]. Nicméně pouze detekce cirkulující nádorové DNA (ctDNA), představuje dostatečně specifický a senzitivní přístup. CtDNA tvoří minoritní subpopulaci celkové cirkulující DNA u jedinců s nádorovým onemocněním. Zvýšené hladiny cfDNA v krvi mohou sloužit jako diagnostický nástroj, zatímco analýza ctDNA může sloužit i jako prediktivní a prognostický nástroj. Vzhledem k tomu, že ctDNA má v krvi krátký poločas rozpadu, je možné pomocí těchto hladin sledovat dynamický vývoj nádorové tkáně [Alimirzaie et al., 2019].

Na rozdíl od DNA, jsou delší molekuly RNA relativně nestabilní a náchylné k degradaci odolnějšími ribonukleázami. Volná cirkulující cfRNA může také nacházet v extracelulárních vezikulech, kde je mnohem stabilnější, protože je chráněna před degradací působením nukleáz [Pös et al., 2018]. Předpokládá se také přítomnost neobalené cfRNA, v tomto případě je zřejmě stabilita podmíněna tvorbou ribonukleoproteinových komplexů. cfRNA může být detekována také v krevních destičkách, které mohou obsahovat RNA sekretovanou nádorovou hmotou. Tato nádorová RNA je schopná různými mechanismy změnit aktivitu krevních destiček, které pak jak naznačují mnohé studie, hrají významnou roli v progresi a růstu nádoru, migraci a metastazování. Tyto typy krevních destiček jsou označovány jako „tumor-educated platelets“ (TEPs), [Alimirzaie et al., 2019].

Detekce a analýza cfRNA zahrnující jak kódující, tak nekódující RNA, by mohly poskytovat cenné informace týkající se profilu genové exprese nádoru, které nemusí odrážet jen somatické mutace na úrovni DNA, ale i epigenetické změny a změny v buněčné signalizaci. Analýza protein kódující cf-mRNA je výhodná díky její relativně vyšší koncentraci v krvi ve srovnání s ctDNA, a to především u pacientů v raném stádiu onemocnění. Izolace RNA z cirkulujících nádorových buněk může být také užitečná během sledování léčby a rezistence nádoru na léčbu.

Molekuly cf-mRNA jsou však oproti molekulám miRNA fragmentované a méně zastoupené v tělních tekutinách. To je jeden z důvodů proč se v současnosti velká část studií zaměřuje na analýzu malých nekódujících RNA, zejména miRNA, které jsou v tělních tekutinách stabilnější a hojnější, což usnadňuje jejich detekci. I přes tyto limity, byla cf-mRNA detekována v krvi onkologických pacientů a ukázalo se, že může hrát důležitou roli v diagnostice a monitorování nádorového onemocnění. Hladiny konkrétních cf-mRNA jsou u onkologických pacientů zvýšené, a proto detekce těchto hladin může sloužit jako vhodný biomarker (Obrázek 2), [Pös et al., 2018].



Obrázek 2 – Komponenty tekuté biopsie (upraveno podle Sánchez-Herrero et al., 2020)

6 Cíle práce a hypotéza

Cílem disertační práce bylo nalezení prognostických a prediktivních biomarkerů pro efektivnější léčbu onkologických pacientů, a to u nemalobuněčného plicního karcinomu, karcinomu endometria, kolorektálního karcinomu, jaterních metastáz kolorektálního karcinomu, světlobuněčného renálního karcinomu a sarkomů. Jako potenciální biomarkery byly detekovány molekuly RNA, a to jak mRNA, tak molekuly mikroRNA ze skupiny ncRNA, dále ctDNA a některé proteiny. Zároveň jsem volila nejvhodnější způsob pro zpracování biologického materiálu a detekci vybraných biomarkerů.

Zaměřili jsme se především na ty molekuly, které jsou u solidních nádorů zapojené v procesu karcinogeneze a jejichž hladiny v tělních tekutinách nebo přímo v nádorové tkáni by byly schopné zpřesnit staging onemocnění, předpovědět další vývoj onemocnění nebo odpověď pacienta na léčbu.

Identifikace konkrétních biomarkerů by měla přispět k jejich zavedení do klinické praxe a zlepšit tak kvalitu a délku života onkologických pacientů.

7 Solidní nádory

Nádorová onemocnění představují z hlediska incidence a dopadů, a to jak na život jedince, tak na společnost, globálně významný epidemiologický problém. Celosvětově nejčastější výskyt vykazují karcinomy plic následované na druhém místě karcinomy prsu u žen a kolorektálními karcinomy na třetím místě. Spolu s nádory prsu patří mezi nejrozšířenější nádorová onemocnění u žen také gynekologické zhoubné nádory, u mužů potom rakovina prostaty. Na předních příčkách výskytu i mortality se u obou pohlaví vyskytuje i rakovina jater a renální karcinom [Bray et al., 2018]. Podle Národního onkologického registru (NOR) České republiky, patří Česká republika mezi onkologicky více zatížené populace Evropy a incidence nádorových onemocnění u nás z dlouhodobého pohledu stále roste.

Všechna tato výše popsaná nádorová onemocnění reprezentují solidní nádory. Jak již bylo zmíněno v úvodu, výzkumná práce na Ústavu biologie LF UK probíhá za intenzivní spolupráce s řadou klinických pracovišť Fakultní nemocnice Plzeň. Na základě této spolupráce vznikly publikace zabývající se zodpovězením otázek vedoucí ke zpřesnění prognózy onemocnění, správnému zařazení pacienta do TNM klasifikace, předpovězení efektu léčby nebo časnému zachytu recidivy. Součástí disertace je také publikace zabývající se studiem různých stádií nádorové transformace u sarkomů prováděné na buněčných liniích, jejichž celogenomová transkriptomická analýza by mohla poskytnout informace o biologických mechanismech vzniku a progresu sarkomů a pomoci tak nalézt nové prognostické markery a potenciální terapeutické cíle. Tato práce souvisí s částí výzkumu na Ústavu biologie LF UK v Plzni, věnující se experimentální biologii. V další části textu jsou pro jednotlivá onkologická onemocnění uvedeny výsledky nalezených prognostických a prediktivních biomarkerů a okomentované práce publikované převážně v časopisech s impakt faktorem.

7.1 Plicní nádory

Plicní nádory patří mezi nejčastější onkologická onemocnění s vysokou mírou mortality také v České republice. V roce 2018 bylo v ČR diagnostikováno 6 459 nových případů, což činí 79,3 mužů a 49,2 žen na 100 000 obyvatel. Dlouhodobý trend mortality na toto onemocnění je velice podobný trendu incidence. V roce 2018 zemřelo v souvislosti s plicním nádorem 5 275 osob, tedy 65,1 mužů a 34,7 žen na 100 000 obyvatel, což představuje nejčastější příčinu úmrtí v rámci onkologických onemocnění [Krejčí et al., 2018]. Jeden z důvodů vysoké úmrtnosti je diagnostika v až pokročilém stádiu onemocnění. Karcinom plic je velice heterogenní skupina nádorů, které můžeme rozdělit na několik různých typů. Z histopatologického hlediska můžeme plicní karcinomy rozdělit na dva základní typy – malobuněčný plicní karcinom (Small-cell lung cancer, SCLC) a nemalobuněčný plicní karcinom (Non-small cell lung cancer, NSCLC). Zhruba 85 % tvoří nemalobuněčné plicní karcinomy, které se dělí na několik dalších podtypů a to adenokarcinom, velkobuněčný plicní karcinom a skvamózní plicní karcinom [Rodriguez-Canales et al., 2016].

Radikální chirurgická léčba, která poskytuje pacientovi jednoznačně nejlepší vyhlídky na dlouhodobé přežití je nejefektivnější pro pacienty v I. a II. stádiu. Avšak jak bylo řečeno, karcinom plic bývá často diagnostikován v pokročilém stádiu onemocnění, kdy již není možné chirurgické odstranění nádoru. Pacientům těchto stádií je podáván některý z léčebných režimů chemoterapie, případně chemoterapie v kombinaci s cílenou léčbou. Chemoterapie zatím zůstává základním pilířem onkologické léčby těchto pacientů, proto představuje predikce chemoterapie, případně zvýšení její účinnosti, možnosti zkvalitnění onkologické léčby. Pacientům s omezenou možností resekce nádoru je podávána paliativní léčba. Paliativní léčba užívána k léčbě pokročilých stadií NSCLC, je podávána pacientům ve stádiu IIIB, kdy bývá často kombinována s radioterapií a pacientům ve stádiu IV. Význam paliativní chemoterapie je jednak v prodloužení přežití pacientů, ale také ve zmírnění příznaků onemocnění a zlepšení kvality života [Skácel et al., 2002]. Je známo, že pacienti stejného stádia, kterým je podávána stejná léčba mohou mít rozdílnou léčebnou odpověď. Proto je snaha o nalezení vhodných markerů u plicních karcinomů, jejichž odhalení by vedlo k lepší predikci léčebné odpovědi a přispělo by tak ke správné volbě léčby.

Kromě nalezení vhodných biomarkerů, které by měly pomoci usnadnit výběr vhodné terapie onkologických pacientů, zůstává klíčové správné zařazení pacienta do TNM klasifikace. TNM klasifikace stanovuje přesné klinické stádium onemocnění, a proto správné zařazení pacienta do TNM klasifikace hraje důležitou roli pro zvolení vhodné léčby, sledování léčebného efektu a kontrolování vývoje onemocnění [Carter et al., 2018]. Jedním z parametrů TNM klasifikace je určení rozsahu nádorového onemocnění, a to zjištěním přítomnosti nádorových buněk v uzlinách. Uvedené detekuje novým způsobem metoda OSNA (Sysmex, Kobe, Japonsko).

Metoda OSNA není dosud v České republice rutinně využívána. V posledních letech ale byla v některých státech (např. Itálie, Francie nebo Španělsko) zavedena jako alternativní metoda pro detekci nádorových metastáz u karcinomů prsu, žaludku a kolorektálního karcinomu. Dále je zkoumán její přínos zavedení pro další malignity, jako je karcinom štítné žlázy, endometria nebo hlavy a krku. Dosud bylo publikováno několik článků o možnosti zavedení OSNA metody u nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC), nicméně žádná z publikací k problematice nepřistupovala komplexně, tzn. analýzou velkého počtu uzlin u velkého počtu pacientů s klinicky uplatnitelným systémem poolování uzlin z jednotlivých regionů plic (7.1.1), [Pérez et al., 2019].

Cílem publikace „Predictive relevance of miR-34a, miR-224 and miR-342 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the lung undergoing palliative chemotherapy“ bylo předpovědět účinek paliativní chemoterapie pomocí vybraných molekul miRNA u pacientů se skvamózním plicním karcinomem. Byly vybrány takové miRNA, které jsou zapojené do procesů vedoucích k rezistenci chemoterapie a podílí se tak na patogenezi NSCLC (Tabulka 1). Zaměřili jsme se na hodnocení vztahu mezi hladinami expresí vybraných molekul miRNA k celkové době přežití pacientů.

Tabulka 1 - Vybrané miRNA a jejich zapojení v patogenezi a léčbě NSCLC

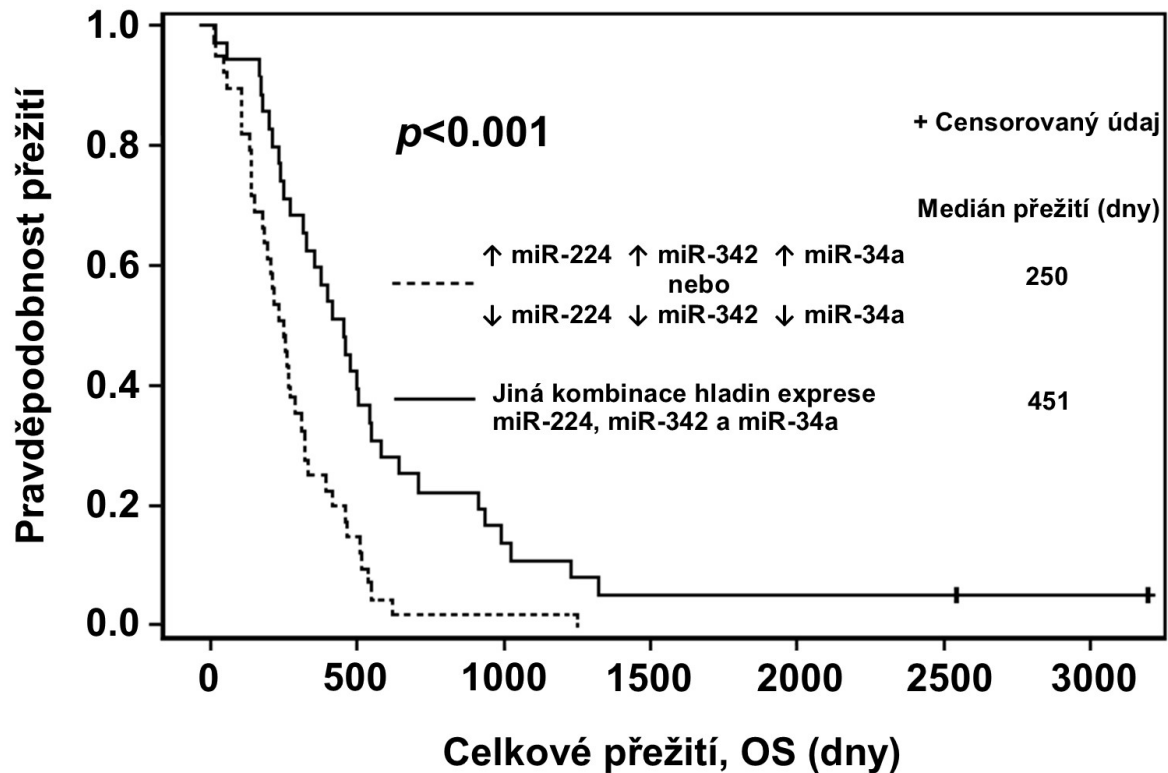
miRNA	Vztah k NSCLC
miR15b	Reguluje rezistenci k cisplatině a metastázám cílením PEBP4 v buňkách plicního adenokarcinomu
miR21	Reguluje invazivitu a chemosenzitivitu buněk NSCLC prostřednictvím SMAD
miR27a	Vyšší expresní hladiny u rezistentních pacientů k EGFR-TKI s pokročilým NSCLC
miR34a	Zvyšuje citlivost buněk plicního nádoru k cisplatině prostřednictvím p53/miR34a/MYCN dráhy
miR99a-3p	Podporuje proliferaci, migraci a invazi buněčných linií NSCLC
miR106a	Poskytuje rezistenci na cisplatinu A549 buňkám v NSCLC
miR107	Reguluje cisplatinovou chemosenzitivitu A549 buněčných linií cílením cyklin dependentní kinázy 8
miR143	Reguluje buněčnou apoptózu v plicním karcinomu cílením PKC ϵ
miR150	Downregulace indukuje inhibici buněčné proliferace a apoptózy v NSCLC cílením BAK1
miR192	Reguluje chemorezistenci plicního adenokarcinomu na kombinovanou léčbu gemcitabinem a cisplatinou cílením Bcl-2
miR193a-3p	Potlačuje metastázy NSCLC downregulací signální dráhy ERBB4/PIK3R3/mTOR/S6K2
miR211	Podporuje proliferaci NSCLC cílením SRCIN1
miR218	Reguluje cisplatinovou chemosenzitivitu v NSCLC cílením RUNX2
miR221	Zvýšeně exprimovaná v agresivním NSCLC, reguluje TRAIL rezistenci prostřednictvím PTEN a TIMP3
miR224	Zapojená do patogeneze plicního nádoru prostřednictvím cílení kaspázy-3 a kaspázy-7
miR342-3p	Potlačuje proliferaci a invazi NSCLC cílením RAPB2
miR375	Prediktivní pro odpověď na léčbu NSCLC cisplatinou-vinorelbinem A

Predikce efektu léčby byla zkoumána analýzou patologem verifikovaných vzorků FFPE tkáně NSCLC u 81 pacientů (74 mužů a 7 žen) v pozdním stádiu (3B nebo 4) skvamózního plicního karcinomu, kteří podstoupili paliativní chemoterapii na bázi platinových derivátů v kombinaci s gemcitabinem nebo paklitaxelem. Jedná se o udržovací léčbu, která je podávána pacientům v pozdní fázi onemocnění, kdy není možné jejich úplné vyléčení, ale cílem je zmírnění obtíží. Z FFPE vzorků bioptické tkáně byla izolována celková RNA. Expze 17 vybraných miRNA byla měřena pomocí reverzní transkripce a kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RT real-time PCR).

Po statistickém vyhodnocení byl nalezen signifikantní vztah mezi hladinami expze tří miRNA (miRNA-34a, -224 a -342) a celkovou dobou přežití. Pomocí klastrové analýzy byly nalezeny kombinace těchto miRNA a celkovou dobou přežití. Použitím bioinformatických programů bylo identifikováno 6 genů regulovaných všemi třemi miRNA, všechny tyto geny byly zapojené v procesech regulace buněčného cyklu nebo oprav DNA, tedy procesů deregulovaných během karcinogeneze.

Nízké hladiny miR-342 a vysoké hladiny miR-34a a miR-224 spojené s kratší dobou přežití (OS) u pacientů na základě stavu kouření a způsobu léčby. Nízká hladina miR-342 byla spojena s kratší dobou přežití u kuřáků. Vysoká hladina miR-34a byla spojena s kratší dobou přežití u pacientů, kteří podstoupili chemoterapii v kombinaci s gemcitabinem. Vysoká hladina miR-224 souvisela s kratší dobou přežití u pacientů, kteří podstoupili chemoterapii v kombinaci s radioterapií. Pomocí klastrové analýzy byly nalezeny kombinace těchto tří miRNA ve vztahu k celkové době přežití. Pacienti s vysokou hladinou expze miR-224, miR-342 a miR-34a nebo nízkou hladinou miR-224, miR-342 a miR-34a měli statisticky významně kratší přežití ve srovnání s pacienty s jinou kombinací expze molekul miR-224, miR-342 a miR-34a, což podporuje platnost tzv. ceRNA hypotézy, (Obrázek 3).

miR-224, miR-342 a miR-34a



Obrázek 3 - Srovnání celkové doby přežití u dvou skupin pacientů na základě hladin exprese miR-224, miR-342, miR-34a. Pacienti s vysokými nebo nízkými hladinami všech tří miRNA měli významně kratší dobu přežití ve srovnání s pacienty s jinou kombinací hladin exprese molekul miR-224, miR-342 a miR-34a (upraveno podle Kulda et al., 2017).

V této studii se nám podařilo nalézt miRNA ve vztahu k predikci účinnosti chemoterapie. Zjistili jsme, že efekt dané miRNA nezávisí jen na její samotné hladině, ale je též ovlivněn hladinou jiné/jiných miRNA vytvářející společnou regulační síť. Zároveň náš výsledek poukazuje na problematičnost stanovení miRNA jako jednotlivých markerů. Přesnější odpovědi na klinickou otázku by mohlo být dosaženo kombinací více vzájemně souvisejících molekul miRNA než pouze pomocí jednotlivých miRNA.

7.1.1 OSNA pro detekci nádorových buněk v uzlinách plicních nádorů

Pro optimální onkologickou léčbu zůstává klíčové správné zařazení pacienta do TNM klasifikace. V publikaci „Může vyšetření lymfatických uzlin metodou One-Step Nuclei Acid Amplification zpřesnit staging plicních nádorů?“ jsme se zaměřili na porovnání citlivosti průkazu mikrometastáz v lymfatických uzlinách primárních plicních karcinomů a plicních metastáz kolorektálních karcinomů použitím metod OSNA, H&E a IHC CK19. Hlavním cílem bylo zjistit, zda detekce mikrometastáz v lymfatických uzlinách prostřednictvím metody OSNA a IHC CK 19 ve srovnání s histopatologickým vyšetřením H&E, povede ke zpřesnění TNM klasifikace u primárních a sekundárních plicních nádorů.

Do naší studie bylo zařazeno celkem 100 pacientů (63 mužů a 37 žen), kterým byl diagnostikován primární nebo sekundární plicní karcinom. Všichni pacienti byli operováni na Chirurgické klinice FN v Plzni, z nichž 80 pacientů bylo operováno pro primární plicní karcinom a 20 pacientů bylo operováno pro plicní metastázy kolorektálního karcinomu. Celkem bylo v naší studii vyšetřeno 1429 lymfatických uzlin, které byly odebrány během chirurgického zákroku a následně rozděleny. Větší uzliny byly podélně rozděleny na 4 části, kdy první a třetí část uzliny byla použita na vyšetření metodami H&E a IHC CK19 a druhá a čtvrtá část byla detekována metodou OSNA. Menší uzliny byly podélně rozpuřeny, kdy jedna polovina byla vyšetřena H&E a IHC CK19 metodami a druhá polovina OSNA metodou.

Vlastní stanovení přítomnosti mRNA CK19 pomocí metody OSNA bylo prováděno v přístroji RD100i (Sysmex, Kobe, Japonsko). Výsledky byly zobrazovány na základě dosažené hodnoty exprese odečtené dle kalibrační křivky provedené pomocí standardů před vlastním stanovením vyšetřovaného vzorku. Pokud byl počet kopií CK 19 v ředěném vzorku menší než 250 kopií/ μ l, výsledek byl negativní (-). Pokud byl výsledek ≥ 250 kopií/ μ l jednalo se o mikrometastázu (+). V případě hodnoty exprese ≥ 5000 kopií/ μ l byl vzorek vyhodnocen jako obsahující makrometastázu (++) (Tabulka 2).

Tabulka 2 – Hodnocení metody OSNA podle počtu kopií mRNA CK 19/ μ l

Typ metastatického postižení	Počet kopií mRNA CK 19/ μ l v ředěném vzorku	Hodnocení výsledku
Makrometastáza	≥ 5000	++
Mikrometastáza	250 - 5000	+
Bez nádorových buněk	< 250	-

U 78 pacientů se výsledky všech tří vyšetřovaných metod shodovaly, u 59 pacientů byl prokázán negativní výsledek, pozitivní shoda byla u 19 pacientů. Výsledky mezi jednotlivými metodami se lišily u 22 pacientů. U 16 pacientů byla detekována pozitivita metodou OSNA, zatímco zbylými metodami byla prokázána negativita. Naopak u tří pacientů byla detekována negativní OSNA metoda, zatímco vyšetření metodami H&E a IHC CK19 prokázalo pozitivitu. Jeden pacient měl negativní výsledek pomocí metody H&E, zatímco zbylé dvě metody vyšly pozitivně, jeden pacient měl negativní vyšetření pomocí IHC CK19, zatímco metodami OSNA a H&E vyšel pozitivní. Naopak jeden pacient měl pozitivní vyšetření metodou IHC CK19, zatímco zbylé dvě metody prokázaly negativitu.

S časovým odstupem jsme u 100 pacientů (včetně předchozí skupiny) hodnotili vztah přítomnosti mikrometastáz v lymfatických uzlinách stanovených výše uvedenými metodami k přežití nemocných. Jinými slovy, cílem bylo určit na základě vztahu k přežití přesnost stanovení positivity uzlin jednotlivými metodami. Celkem bylo analyzováno 1426 uzlin. Výsledky této studie byly publikovány v práci: „Prognostic Significance of Lymph Node Examination by the OSNA Method in Lung Cancer Patients - Comparison with the Standard Histopathological Procedure“.

Vzhledem k tomu, že jsme v naší studii, stejně jako jiné zahraniční týmy, které se touto problematikou zabývali [Güller et al., 2012; Cserni, 2012], zaznamenali větší počet pozitivních vzorků odhalených metodou OSNA ve srovnání s metodami H&E nebo IHC CK19, vyvstává zde otázka, zda pozitivita uzlin koresponduje i s nepříznivějším vývojem onemocnění nebo zda je

detekce „jednotlivých nádorových buněk“ klinicky nevýznamná, případně zda je tedy správně stanovená hodnota cut-off pro detekci mikrometastáz v lymfatických uzlinách.

Z našeho pohledu se zdá být nejdůležitějším kritériem pro hodnocení přesnosti detekce nádorových buněk (exprese CK19) pro N-staging vztah výsledku s dalším klinickým vývojem onemocnění. Klinický význam vyšší senzitivity metody OSNA ve srovnání s H&E metodou jsme hodnotili na základě vztahu výsledků k intervalu bez nemoci (DFI) a celkovému přežití (OS). U 80% pacientů, u kterých byly shodně detekovány metastázy v lymfatických uzlinách jak metodou H&E, tak metodou OSNA, jsme pozorovali, že pozitivita lymfatických uzlin je spojena s horší prognózou jak u pacientů s primárním plicním karcinomem, tak plicními metastázami kolorektálního karcinomu. U 20% pacientů, u kterých byla neshoda výsledkům mezi metodami H&E a OSNA, jsme zaznamenali, že další vývoj onemocnění byl ve vztahu k průběhu onemocnění u výsledků získaných metodou H&E.

Proto jsme vybrali pacienty, kteří byli pozitivně detekováni pro metastatické postižení lymfatických uzlin jak metodou OSNA, tak pomocí H&E a porovnali jsme počty kopií mRNA CK19. Pozitivní výsledky i metodou H&E měly statisticky významně větší počet kopií mRNA CK19 než pozitivní výsledky detekované pouze metodou OSNA. Žádný z výsledků shodně pozitivní s metodou H&E neměl počet kopií mRNA CK19 nižší než 620 kopií mRNA CK19/ μ l. V případě výsledků, které byly metodou OSNA vyšetřeny pozitivně a metodou H&E negativně, mělo 53 % vzorků nižší počet kopií mRNA CK19 než 620. Navýšení cut-off hodnoty na 615 kopií mRNA CK19/ μ l, které jsme navrhli, by zvýšilo teoretickou shodu mezi metodami OSNA a H&E, stejně tak by toto navýšení vedlo k větší shodě při celkovém hodnocení positivity lymfatických uzlin NSCLC pacientů.

7.2 Karcinom endometria

Karcinom endometria se řadí mezi nejčastější gynekologickou malignitu a jedná se o šesté nejčastější nádorové onemocnění u žen s přibližnou incidencí 320 000 nově diagnostikovaných případů ročně a mortalitou okolo 90 000 žen [Maheswari et al., 2019]. Tradičně se karcinom endometria dělí na dva typy – typ I a typ II. Typ I jsou karcinomy závislé na estrogenu vznikající dlouhodobou stimulací děložní sliznice zvýšenou hladinou estrogenů a jsou spojené s hyperplázií endometria. Zatímco typ II jsou karcinomy, které nevznikají vlivem estrogenů a jsou spojené s atrofickým endometriem. Oproti typu I mají horší prognózu [Murali et al., 2014]. Významnou roli při vzniku karcinomu endometria jak prvního, tak druhého typu bezpochyby hrají rizikové faktory, mezi které patří především vyšší věk, obezita, vysoký krevní tlak, diabetes mellitus, zvýšená hladina estrogenů a vyšší příjem živočišných tuků.

Z důvodu časných symptomů onemocnění je většina případů diagnostikována v raném stádiu a pětileté přežití u pacientek ve stádiu I se pohybuje okolo 90% [Creasman, 2009]. Metastatické postižení lymfatických uzlin představuje nejvýznamnější prognostický faktor u časného karcinomu endometria. Prevalence výskytu metastáz v regionálních lymfatických uzlinách u I. stádia karcinomu endometria je dle většiny autorů cca 10 - 11 % [Morrow et al., 1991]. U stádia II jsou metastázy lymfatických uzlin udávány ve 36,5% [Schink et al., 1987].

Pánevní a paraaortální lymfadenektomie je doporučována jako standardní postup pro staging lymfatického systému. Tento chirurgický zákrok je obecně spojován s vyšším rizikem peroperačních a pooperačních komplikací [Kitchener et al., 2009]. Ve snaze vyhnout se lymfadenektomii byl vypracován koncept sentinelové lymfatické uzliny (SLN), který je stejně jako u jiných malignit na vzestupu z důvodu snižování radikality chirurgického zákroku a jeho potenciálních komplikací.

Metoda mapování sentinelových lymfatických uzlin slouží k identifikaci metastáz v lymfatických uzlinách. Sentinelová uzlina je lymfatická uzlina, která má s primárním nádorem přímé spojení ve formě lymfatické cévy a je tedy primárním místem, kam nádor lymfogenně metastazuje [Bodurtha Smith et al., 2016]. Podrobné vyšetření SLN umožňuje zvýšit spolehlivost zařazení onkologického pacienta v TNM systému, což je základní informace z hlediska prognózy a léčebné strategie. V klinické praxi se již několik desítek let používá pro

staging karcinomu endometria klasifikace určovaná Mezinárodní federací pro gynekologii a porodnictví - FIGO klasifikace. Jednou z odlišností oproti běžnému dělení do stádií pomocí TNM klasifikace je absence stádia 0. Nicméně jednotlivé organizace při tvorbě klasifikací úzce spolupracují a oba systémy spolu korespondují. V průběhu let prodělala FIGO klasifikace několik modifikací. Aktuálně je v platnosti verze FIGO z roku 2018, u které došlo ke včlenění konceptu sentinelové uzliny jako samostatné varianty nebo doplňku systematické pánevní a paraaortální lymfadenektomie (Tabulka 3), [Amin et al., 2017].

Tabulka 3 – TNM a FIGO staging karcinomu endometria

TNM	FIGO	Popis
T - tumor		
TX		Primární tumor nelze posoudit
T0	nehodnotí	Bez známek primárního tumoru
Tis	nehodnotí	Karcinom in situ
T1	I	Tumor je omezen na tělo děložní
T1a	IA	Postiženo pouze endometrium, stromální invaze do 5 mm
T1b	IB	Léze se stromální invází $\geq 5,0$ mm
T2	II	Nádor se šíří mimo dělohu, bez šíření ke stěně pánevní nebo dolní třetiny pochvy
T3	III	Nádor postihuje serózu, adnex, vaginu a/nebo parametria
T3a	IIIA	Nádor postihuje dolní třetinu pochvy bez šíření ke stěně pánevní
T3b	IIIB	Nádor postihuje vaginu a/nebo parametria
T4	IVA	Nádor postihuje močový měchýř nebo rektum
N - regionální mízní uzliny		
NX		Regionální mízní uzliny nelze posoudit

N0	nehodnotí	Regionální mízní uzliny bez metastáz
N0(i+)	nehodnotí	Zastiženy izolované nádorové buňky, léze do 0,2 mm
N1	IIIC1	Metastázy v pánevních mízních uzlinách
N2	IIIC2	Metastázy v paraaortálních mízních uzlinách
M - vzdálené metastázy		
M0	nehodnotí	Bez vzdálených metastáz
M1	IVB	Vzdálené metastázy (včetně šíření do inguinálních lymfatických uzlin, kostí, plic, jater)

Nalezení sentinelové uzliny umožňuje její detailní vyšetření – ultrastaging. Peroperační hodnocení sentinelové uzliny založené na barvení hematoxylinem-eosinem (H&E) nebo imunohistochemická detekce cytokeratinu 19 (IHC CK19) umožňuje detekci nádorových buněk do úrovně mikrometastáz, ale jejich nevýhodou je časová náročnost a falešná negativita, některé studie uvádějí falešnou negativitu až u 20% případů [Croner et al., 2014].

V publikaci „One-step nucleic acid amplification vs ultrastaging in the detection of sentinel lymph node metastasis in endometrial cancer patients“ jsme se zaměřili na zpřesnění detekce mikrometastáz a makrometastáz v sentinelových lymfatických uzlinách použitím molekulárně genetické metody OSNA (One Step Nuclei Acid amplification). Bylo provedeno porovnání výsledků získaných metodou OSNA s rutinně používanými imunohistochemickými metodami při hodnocení metastatického postižení sentinelových lymfatických uzlin. Práce zjišťovala využitelnost metody OSNA pro klinickou praxi a ukázala změny zařazení pacientek do FIGO klasifikace, a tudíž dopady na následnou péči. S časovým odstupem bude vyhodnoceno, jak jsou změny z hlediska zařazení do FIGO klasifikace ve vztahu k průběhu onemocnění.

Do studie, která probíhala od roku 2016 do roku 2018, vstoupilo celkem 58 pacientek, kterým bylo vyšetřeno celkem 135 uzlin. Výsledky získané metodou OSNA byly porovnávány s rutinně používanými metodami - analýzou histologických preparátů připravených metodou haematoxylin-eosin (H&E) a imunohistochemickou detekcí cytokeratinu 19 (IHC CK19). Jako negativních všemi třemi metodami (OSNA, H&E, IHC CK19) bylo detekováno celkem 106 uzlin, zbylých 29 uzlin bylo vyhodnoceno alespoň jednou z těchto metod jako pozitivní. Metodou H&E

i metodou IHC CK19 bylo pozitivně označeno celkem 11 uzlin, metodou OSNA bylo pozitivně vyhodnoceno dalších 18 uzlin, které byly ultrastagingem označeny jako negativní. Pouze v jednom případě došlo k detekci mikrometastázy pomocí metod H&E a IHC CK19, zatímco metodou OSNA byla uzlina označena jako negativní.

V naší studii byla zkoumána zatím doposud největší skupina pacientek s karcinomem endometria použitím OSNA metody. Všechny sentinelové uzliny byly současně vyšetřované jak standartními metodami, tak metodou OSNA, čímž bylo možné tyto metody porovnat. Ve srovnání se standartním histopatologickým ultrastagingem, prokázala OSNA častější metastatické postižení sentinelových lymfatických uzlin, což vedlo k up-stagingu až o 20 %. Diagnostika sentinelových uzlin pomocí metody OSNA zařadila 12 pacientek do III. stádia FIGO klasifikace, zatímco vyšetření ultrastagingem vedlo k jejich zařazení do I. a II. FIGO stádia. Díky tomuto upstagingu pomocí metody OSNA by došlo k výrazně častější indikaci adjuvantní léčby. Přesnější indikace adjuvantní léčby by mohla pomoci především pacientkám řazených do málo rizikových skupin a snížit tak riziko recidivy onemocnění.

Detekce sentinelové uzliny u karcinomu endometria není dosud standardně používána v klinické praxi. Podle výsledků naší studie vykazuje metoda OSNA senzitivitu 90,9 %, specificitu 85,5 % a konkordanci 85,9 % v porovnání s ultrastagingem. Porovnání vztahu positivity uzlin stanovené metodou OSNA a H&E a vývoje onemocnění pacientek, proběhne po uplynutí 3 let od provedení této studie.

Využití metody OSNA v kombinaci s technikami detekce a vyšetření sentinelových uzlin u pacientek s karcinomem endometria by tak mohlo být v budoucnu příslibem vysoce sensitivní detekce metastatického postižení uzlin a tím adekvátní indikace adjuvantní léčby.

7.3 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (CRC) se celosvětově řadí mezi třetí nejčastější typ rakoviny a je hlavní příčinou úmrtí na nádorové onemocnění [De Rosa et al., 2015]. V roce 2018 bylo celosvětově diagnostikováno zhruba 1,8 milionu nových případů, přičemž největší výskyt CRC je evidován ve vyspělých západních zemích [Salibasic et al., 2018].

Histologicky lze kolorektální karcinom rozdělit na několik subtypů. Více než 90 % všech kolorektálních karcinomů představuje adenokarcinom, který vzniká z epitelálních buněk kolorektální sliznice. Mezi další histologické subtypy patří mucinózní karcinom, karcinom z prstenčitých buněk, a další vzácné varianty jako je adenoskvamózní karcinom, medulární karcinom, malobuněčný karcinom a další nediferencované karcinomy [Li et al., 2019].

Kolorektální karcinom patří mezi onkologická onemocnění s nejdětalněji zmapovaným procesem karcinogeneze a postupné kumulace mutací. Na počátku těchto znalostí stál Vogelsteinův model vícestupňové karcinogeneze kolorektálního karcinomu publikovaný v roce 1990 [Fearon a Vogelstein, 1990]. V patogenezi kolorektálního karcinomu hrají klíčovou roli mutace DNA, genomová nestabilita, chromozomální aberace a hypermetylace promotorů, které se uplatňují během procesu karcinogeneze. V současnosti jsou na základě typu genetické nestability popisovány z hlediska patogeneze na genomové úrovni tři základní typy kolorektálních karcinomů. Kolorektální karcinomy vyznačující se mikrosatelitovou instabilitou (MSI), chromozomovou instabilitou (CIN) a metylací CpG ostrůvků (CIMP). Mikrosatelitová instabilita je spojena se změnami v krátkých mikrosatelitových repetičích, způsobené mutacemi „mismatch“ reparačních genů, především genu MLH1. Hypermetylace CpG ostrůvků vede k umlčení specifických tumorsupresorových genů a „DNA reparačních genů, včetně MLH1, MSH2 a MSH6 genů. Nádory vyznačující se chromozomální nestabilitou jsou způsobené ztrátami nebo zisky nadbytečných chromozomů a strukturními přestavbami, které přispívají k transformaci buněk [Simons et al., 2013]. CIN nestabilita se vyskytuje u přibližně 65 - 70% kolorektálních karcinomů a je spojena s horší prognózou.

Mezi hlavní rizikové faktory vzniku CRC patří kouření, nadměrná konzumace alkoholu, fyzická neaktivita a nadváha [De Rosa et al., 2015]. Stádium, ve kterém je onemocnění diagnostikováno, patří mezi nejdůležitější faktor určující přežití pacientů. Při včasné

diagnostice onemocnění, se uvádí až 90% pětileté přežití pacientů, ve srovnání se 14% přežitím pacientů, kterým je onemocnění diagnostikováno v pokročilejším stádiu [Nikolaou et al., 2018]. Obecně lze říci, že kolorektální karcinom nepředstavuje náhlou lézi v kolorektální sliznici, ale vyvíjí se pomalu a postupně přes několik stádií. Vzhledem k pomalé a progresivní povaze kolorektálního karcinomu se ukázalo, že většině případů lze preventivně předejít nebo je lze léčit díky včasné detekci onemocnění a chirurgickému odstranění prekarcinogenních polypů nebo nádorů v rané fázi [Gao et al., 2018]. Zároveň důležitou součástí péče o pacienty, kteří podstoupili chirurgické odstranění nádoru, je monitoring pro případnou včasnou detekci recidivy onemocnění [Nikolaou et al., 2018], vzhledem k tomu, že recidiva bývá zaznamenána až u 20% pacientů operovaných pro kolorektální karcinom v průběhu následujících pěti let [Wille-Jørgensen et al., 2018].

Snaha dosáhnout pokroku v léčbě pacientů s kolorektálním karcinomem je též spojena s nalezením vhodných biomarkerů pro časný záchyt onemocnění s prognostickým účinkem, pro detekci recidivy a v posledních dvaceti letech zejména pro predikci léčby. Jako standardně používaný prognostický marker u kolorektálního karcinomu slouží karcinoembryonální antigen (CEA) objevený již v roce 1965 Philem Goldem a Samuelem O. Freedmanem. Jedná se o glykoprotein, který je za fyziologických podmínek produkován ve vyvíjejícím se embryu. V dospělosti je omezeně syntetizován epiteliálními buňkami střevní sliznice, žaludku a bronchů. [Fakih, 2006]. Za patologických podmínek jeho hladiny v krevní plazmě slouží zejména pro sledování vývoje onemocnění a časný záchyt recidivy [Campos-da-Paz et al., 2018]. Ačkoliv je specifita CEA pro detekci kolorektálního karcinomu 96 %, senzitivita je pouze 23 % a tedy jeho schopnost záchytu onemocnění značně omezena, je jeho možnost využití pro předpovězení prognózy stále kontroverzní [Yu et al., 2017]. Z tohoto důvodu je snaha o zvýšení senzitivity detekce onemocnění pomocí dalších nádorových markerů, jako je rakovinný antigen 19-9 (CA 19-9), ale také použitím nových biomarkerů, které odrážejí další charakteristiky nádorových buněk. Svým způsobem samostatnou skupinou jsou prediktivní markery. S pokroky v biologické léčbě, cílené léčbě a imunoterapii je podání vhodné léčby čím dál častěji svázáno s výsledkem vyšetření prediktivních biomarkerů, které v kombinaci se standardně používanými klinickými postupy mohou přispět k volbě efektivní léčby. „Mismatch“ reparační geny jsou zodpovědné za opravy chybného párování nukleotidových bází a malých inzercí a delecí, ke kterým dochází během replikace DNA. Ztráta exprese MMR

genů vede k poruchám DNA reparačních mechanismů, což způsobuje mikrosatelitovou nestabilitu, kterou se kolorektální karcinomy často vyznačují. Z molekulárně-biologických markerů se při individualizaci léčby v současné době používá právě stanovení mikrosatelitové nestability při indikaci podání adjuvantní chemoterapie nebo stanovení mutací KRAS/NRAS a BRAF onkogenů při indikaci léčby monoklonálními protilátkami proti receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) v případě metastatického kolorektálního karcinomu [Simons et al., 2013].

Pokrok v detailním poznání procesu karcinogeneze v poslední dekádě umožňuje individualizovat a tím zefektivnit léčbu, stejně tak také rozhodnout o vhodnosti podání adjuvantní léčby. Současná paradigmaty pro výběr pacientů pro adjuvantní léčbu založené na klinicko-patologických vlastnostech se ukazují být nedostatečná. Nelze s jistotou identifikovat pacienty, u kterých by převládaly benefity podání adjuvantní chemoterapie nad jejími nežádoucími efekty. Proto je zde stále snaha co nejlépe identifikovat pacienty, pro které by podání adjuvantní léčby bylo jednoznačně přínosné. Současným trendem je proto používání multigenových panelů, které pomocí stanovení exprese vybraných genů pomáhají identifikovat pacienty s vysokým rizikem rekurence, kteří by byli vhodnými kandidáty pro podání adjuvantní léčby. [Kelley et al., 2011]. Jsou to například expresní panely ColoPrint, Oncotype DX nebo Colorectal Cancer DSA. Na zavedení do rutinní klinické praxe zatím tyto testy čekají [Mármol et al., 2017].

Ve studii, která probíhala ve spolupráci s Komplexním onkologickým centrem FN Plzeň jsme se zaměřili na možnosti využití nových biomarkerů pro zpřesnění prognózy onemocnění a včasnou detekci recidivy onemocnění, pokud by se používaly v kombinaci s rutinními nádorovými markery.

Zaměřili jsme se na možnost stanovení molekul miRNA, které vykazují vysokou stabilitu a snadnou měřitelnost v biologických vzorcích. Navzdory slibným výsledkům publikovaných ve studiích zabývajících se využitím cirkulujících miRNA jako biomarkerů u pacientů s kolorektálním karcinomem, není dosud žádná miRNA využívána jako biomarker v rutinní klinické praxi [Nikolaou et al., 2018]. Použití již rutinně používaných markerů, jako je CEA nebo CA19-9, v kombinaci s miRNA by mohl být způsob, jak lépe předpovědět vývoj onemocnění.

Cílem naší studie bylo identifikovat miRNA se signifikantním rozdílem v předoperačních a pooperačních hladinách plazmy a zhodnotit tak jejich vztah k prognóze onemocnění. Zároveň jsme se zaměřili schopnost těchto biomarkerů přispívat k včasné detekci recidivy onemocnění.

Na základě dostupné literatury bylo vybráno celkem 22 molekul miRNA, které se potenciálně uplatňují v karcinogenezi kolorektálního karcinomu a mohly by se tak stát vhodnými CRC biomarkery (Tabulka 4). Očekávali jsme, že hladiny těchto cirkulujících miRNA budou odpovídat aktuálnímu stavu patogeneze, proto jsme se zaměřili na porovnávání jejich předoperačních a pooperačních hladin v plazmě. Výsledky studie byly publikovány v práci: „Plasma microRNA Levels Combined with CEA and CA19-9 in the Follow-Up of Colorectal Cancer Patients“.

Tabulka 4 – Vybrané miRNA zapojené v karcinogenezi kolorektálního karcinomu a jejich sekvence

miRNA	5´ -3´ sekvence
miR17-3p	acugcagugaaggcacuuguag
miR18a-5p	uaaggugcaucuagugcagauag
miR20a-5p	uaaagugcuuauagucagguag
miR21p-5p	uagcuuaucaagacugauguuga
miR23a-3p	aucacauugccagggauuucc
miR27a-3p	uucacaguggcuaaguuccgc
miR29a-3p	uagcaccaucugaaaucgguaa
miR92a-3p	uauugcacuuguccggccugu
miR93p-5p	caaagugcuguucgugcagguag
miR96-5p	uuuggcacuagcacauuuuugcu
miR106a-5p	aaaagugcuuacagucagguag
miR141-3p	uaacacugucugguaaagaugg
miR142-5p	cauaaaguagaaagcacuacu
miR143-3p	ugagaugaagcacuguagcuc
miR155-5p	uuaaugcuauucgugauagggguu
miR183-5p	uauggcacugguagaauucacu

miR199a-3p	acaguagucugcacauugguua
miR200b-3p	uaauacugccugguaaugauga
miR-200c-3p	uaauacugccggguaaugaugga
miR-210-3p	cugugcgugugacagcggcuga
miR-223-3p	ugucaguuugucaaaauacccca
miR-592	ugucaauaugcgaugauguuug

Do studie bylo zahrnuto 85 pacientů (56 mužů a 29 žen), kterým byl shodně diagnostikován adenokarcinom. Studovaná skupina se skládala ze dvou skupin pacientů, první skupinu tvořili pacienti, kteří podstoupili radikální operaci pro odstranění kolorektálního karcinomu (57 pacientů), druhou kategorii představovali pacienti, kteří podstoupili paliativní intervenci, při které došlo k částečné resekci nebo kompletní resekci primárního nádoru bez resekce jaterních metastáz (27 pacientů).

Expres jednotlivých miRNA byla stanovována pomocí soupravy TaqMan Advanced miRNA Assays od firmy Thermo Fisher, která umožňuje pomocí univerzálního primeru pro reverzní transkripci méně pracné stanovení většího počtu miRNA.

Nejdříve jsme hodnotili změny exprese miRNA v předoperačních a pooperačních vzorcích plazmy. Zaznamenali jsme signifikantní pokles hladin miRNA-21, miRNA-20a, miRNA-210, miRNA-23 a miRNA-155 u pacientů, kteří podstoupili kompletní chirurgickou resekci nádoru. Pooperační pokles jsme zaznamenali i u markerů CEA a CA19-9.

Vztah k prognóze (celkovému přežití pacientů) jsme byli schopni hodnotit pouze u skupiny pacientů, kteří podstoupili paliativní operaci, kdy jsme zaznamenali statisticky signifikantní vztah mezi celkovou dobou přežití a třemi miRNA. Pacienti s vysokými předoperačními hladinami miR-21, miR-20a a miR-23a měli kratší dobu přežití. Vzhledem k absenci událostí u pacientů, kteří podstoupili kurativní operaci, jsme nehodnotili vztah těchto miRNA k celkovému přežití.

Nejlepšího rozlišení mezi pacienty s příznivou a nepříznivou prognózou jsme dosáhli kombinací všech tří markerů (CEA, CA19-9 a miRNA). Pacienti, u kterých jsme zaznamenali předoperačně vysokou hladinu některého markeru (CEA, CA19-9, miR-20a, miR-21 nebo miR-23a), měli

signifikantně kratší dobu přežití než ti, kteří měli hladiny všech těchto markerů pod hodnotou cut-off.

Naše výsledky poukazují na to, že přesnějšího odhadu dalšího vývoje onemocnění lze dosáhnout kombinací standardně používaných biomarkerů a miRNA. Použití kombinace různých biomarkerů odráží současný pohled na karcinogenezi jako na vícestupňový proces, který je velice individuální a vyznačuje se aberantními expresními hladinami různých genů. Stejně jako existují pacienti s nízkými hladinami CEA v krevní plazmě, existují pacienti s nízkými hladinami onkogenních miRNA, u kterých nemůžeme očekávat pooperační pokles. Pooperační pokles je základní kritérium, které musí splňovat marker, jehož hladina v plazmě má odrážet průběh nemoci a mohl by tak být potenciálně použit k včasné detekci recidivy onemocnění.

Jako markery pro včasnou detekci recidivy onemocnění jsme vybrali takové molekuly miRNA, které byly už dříve identifikované ve spojení s nádorovou patogenezi. U některých miRNA jsme zaznamenali signifikantně významný vztah k celkovému přežití, což naznačuje jejich potenciál stát se vhodnými prognostickými markery pro kolorektální karcinom. Nicméně ve srovnání s CEA a CA19-9 vykazovali miRNA sice vyšší senzitivitu, ale nižší specifitu pro včasnou detekci recidivy během follow-up období. Předpokládáme, že se tyto miRNA účastní i dalších buněčných procesů, které nesouvisí s karcinogenezi a mohly by tak být deregulované kvůli jiným patologickým stavům, z čehož vyplývá, že zvýšené pooperační hladiny miRNA nemusejí nutně souviset s recidivou onemocnění. Z tohoto důvodu bude nutné zaměřit se na miRNA, které jsou výlučně zapojené do patogeneze nádoru, což nebude úplně jednoduché vzhledem k provázanosti jednotlivých miRNA vytvářející složité sítě.

7.4 Jaterní metastázy kolorektálního karcinomu

Nejčastější místo vzniku metastáz kolorektálního karcinomu jsou játra. Studie ukazují, že až u 30% pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem dojde k metastazování do jater [Engstrand et al., 2018]. Chirurgická resekce jaterních metastáz představuje jedinou potenciálně kurativní léčbu pro dlouhodobé přežití těchto pacientů [Akgül et al., 2014]. Vzhledem k tomu, že až u 40 - 75% pacientů po operaci jater dojde do pěti let k recidivě, je snaha nalézt efektivní biomarkery předpovídající její vznik a detekující tuto recidivu.

V tomto případě se ukazuje jako efektivní použití metody tekuté biopsie, která je snadno opakovatelná vzhledem k provádění analýzy z periferní krve pacientů a v určitých případech dokáže, jak jsme ukázali, kompenzovat nedostupnost nádorové tkáně. Schopnost detekovat recidivu nebo progresi onemocnění tímto metodickým přístupem sebou nese nutnost znát změny v genotypu nádoru. Analýza mutované DNA uvolněná nádorovou tkání do krevní cirkulace umožňuje nejen stanovení nízkých hladin ctDNA, ale také nastavení vhodných cut-off hladin pro další kategorizaci onkologických pacientů a správné hodnocení vztahu mezi genotypem nádorové tkáně a zároveň charakterem a rozsahem onkologického onemocnění. Ukazuje se ale, že různé biomarkery, u kterých byl nalezen signifikantní vztah ke klinicko-patologickým charakteristikám nádoru, necharakterizují stejné vlastnosti nádoru. Domníváme se, že kombinace více biomarkerů podílejících se na různých procesech molekulární biologie nádorů by mohla být vhodná především ke stanovení prognózy onemocnění.

V případě detekce ctDNA je z klinického hlediska nejproveditelnější detekovat nejčastější mutace přítomné v tkáni daného onkologického onemocnění. Mezi nejčastější mutace, které jsou přítomny u 35 - 45% všech případů CRC, patří mutace protoonkogenů KRAS, NRAS, HRAS patřící do RAS rodiny [Yamashita et al., 2018]. Nejčastěji jsou u kolorektálního karcinomu detekovány mutace KRAS onkogenu, a to až u 30 - 50% všech případů. Aktivační mutace KRAS onkogenu se objevují stále častěji i u metastazujícího kolorektálního karcinomu, kde je tato mutace spojována s agresivnější formou onemocnění a rychlejším nástupem recidivy. U pacientů po resekci jaterních metastáz, je mutace KRAS spojována se zvýšeným rizikem recidivy, horším celkovým přežitím (OS) a zvýšenou recidivou mimo játra, zejména do plic, peritonea nebo i do méně obvyklých metastatických lokalit, jako je mozek a kosti [Knijn et al.,

2011]. Zároveň mutace KRAS onkogenu představuje prediktivní faktor k rezistenci pro léčbu protilátkami zaměřenými proti epidermálnímu růstovému faktoru (EGFR) u metastazujícího kolorektálního karcinomu tím, že způsobuje konstitutivní aktivaci MAPK signální dráhy [Yamashita et al., 2018].

Hlavním předpokladem pro detekci ctDNA je dostatečná citlivost použité analytické metody a dostatečné množství analyzovaného materiálu. Citlivou kvantitativní metodu detekce ctDNA představuje ddPCR. Některé studie uvádějí, že u kolorektálního karcinomu je možné u metastatického onemocnění zachytit ctDNA až u 98% pacientů [Ståhlberg et al., 2017].

Ve studii „The Level of Preoperative Plasma KRAS Mutations and CEA Predict Survival of Patients Undergoing Surgery for Colorectal Cancer Liver Metastases“ jsme se zaměřili na určení prognostického významu stanovení mutačního statusu KRAS genu ctDNA pomocí ddPCR. Dále jsme zjišťovali, zda kvantifikace KRAS mutovaných alel ctDNA, tedy hladiny frakční abundance, jsou nezávislým prognostickým faktorem pro pacienty podstupující jaterní metastazektomii. Hodnotili jsme synergický vztah mezi hladinami KRAS mutované ctDNA a hladinami CEA, při stanovení dalšího vývoje onemocnění. Dále jsme u párových vzorků vyhodnocovali shodu výsledků stanovení ctDNA metodou ddPCR v plazmě a tkáňových (FFPE) vzorcích u pacientů s primárním kolorektálním karcinomem a následnými jaterními metastázami. Získané jsme použili pro zodpovězení otázky možnosti náhrady vzorků tkáňové biopsie za plazmatické u těch pacientů, u kterých nebudou dostupné.

Tkáňové vzorky primárního kolorektálního karcinomu byly dostupné u 63 pacientů, z nichž 33 bylo detekováno jako KRAS pozitivních. Medián frakční abundance (FA, podíl mutované alely v celkové DNA) těchto KRAS pozitivních vzorků byl 15,66 %. Tkáňové vzorky s jaterními metastázami byly k dispozici u 69 pacientů, z nichž bylo 33 detekováno jako KRAS pozitivních. Medián frakční abundance těchto KRAS pozitivních pacientů byl 27,3 %. Celková procentuální shoda mutačního statusu mezi vzorky primárního kolorektálního karcinomu a jaterními metastázami byla 93,4 %. KRAS frakční abundance pozitivně korelovala mezi primárními a metastatickými vzorky.

U celkem 29 pacientů byly k dispozici jak tkáňové vzorky, tak vzorky plazmy. Celková shoda KRAS mutačního statusu mezi tkáňovými a plazmatickými vzorky byla 75,9 %.

Při určení vztahu mezi hladinami KRAS mutované ctDNA a hladinami určených mutací ve tkáni jaterních metastáz, jsme zaznamenali, že hladina KRAS frakční abundance pozitivně korelovala s předoperačními vzorky plazmy a tkáňovými vzorky jaterních metastáz. Po odstranění jaterních metastáz nebyla KRAS mutace ctDNA detekována. Důvodem může být relativně krátký poločas rozpadu fragmentů DNA v plazmě pohybující se od 15 minut po několik hodin. Zároveň se také nabízí možnost detekce minimálního reziduálního onemocnění a neinvazivního monitorování v případě, že byla během operace kompletně odstraněna nádorová hmota. Můžeme také konstatovat, že v případech, kdy nejsou k dispozici bioptické vzorky z nádoru, se zdá být molekulární testování cirkulující DNA v plazmě vhodnou alternativou k detekci mutací.

Vztah mezi hladinami KRAS mutované DNA k délce přežití bez nemoci (DFS) a celkovému přežití (OS) jsme posuzovali jak u tkáňových, tak plazmatických vzorků. Vzhledem k tomu, že byla KRAS mutace detekována jak v plazmě, tak ve tkáni pacientů s jaterními metastázami, očekávali jsme podobný prognostický význam u obou typů vzorků. Zaznamenali jsme však prognostický význam pouze pro stanovení KRAS mutované ctDNA v plazmě. Tyto výsledky naznačují, že v určitých případech může být vhodnější stanovovat přítomnost KRAS mutace metodou tzv. tekuté biopsie a mohou tak poskytnout další informace o průběhu a prognóze onemocnění, což může být užitečné při rozhodování o použití vhodné léčby. A opět lze na základě těchto výsledků konstatovat, že hladiny KRAS mutace stanovené v plazmě neodráží stejné biologické vlastnosti onkologického onemocnění jako hladiny KRAS mutované DNA stanovené v nádorové tkáni.

Některé studie popisují, že stanovení ctDNA by mohlo být vhodnějším prognostickým biomarkerem než hladiny CEA v plazmě [Reinert et al., 2006; Carpinetti et al., 2015]. My jsme však nejlepší prediktivní hodnotu, pro přežití pacientů po jaterní metastazektomii, zaznamenali stanovením předoperačních hladin KRAS mutované ctDNA v kombinaci s hladinami CEA. Pacienti s vysokými předoperačními hladinami KRAS frakční abundance v plazmě a vysokými hladinami CEA měli nejkratší přežití ve srovnání s pacienty s těmito nízkými hladinami. Stejně tak jsme pozorovali trend k delšímu bezpříznakovému období (DFS) u pacientů s nízkými hladinami KRAS frakční abundance v kombinaci s nízkými hladinami CEA.

7.5 Světlobuněčný renální karcinom

Renální karcinom patří mezi časté karcinomy močové soustavy, představující 2 až 3 % všech solidních nádorů dospělé populace [Zhang et al., 2020]. V roce 2018 bylo celosvětově diagnostikováno zhruba 400 000 nových případů a evidováno 175 000 úmrtí. Téměř 90 % všech renálních karcinomů představuje renální buněčný karcinom (RCC), [Carril-Ajuria et al., 2020], který se dělí na další histologické podtypy, z nichž nejčastější je světlobuněčný, papilární a chromofobní renální karcinom. Nejběžnější a nejvíce agresivní podtyp představuje světlobuněčný renální karcinom (ccRCC), [Zhang et al., 2020]. Přežití pacientů s tímto onemocněním závisí především na stádiu, ve kterém je onemocnění diagnostikováno, přibližně třetina případů ccRCC bývá diagnostikována v pozdním stádiu, s lokálně pokročilým nebo metastazujícím karcinomem, což představuje pro pacienty špatnou prognózu s pětiletým přežitím zhruba 12 % [Padala et al., 2020]. Z medicínského hlediska je světlobuněčný renální karcinom vysoce vaskularizující karcinom, jehož buňky mohou podporovat růst a progresi nádoru prostřednictvím proangiogenních faktorů. K metastatickému rozsevu dochází nejčastěji hematogenní cestou, a to do plic, kostí a CNS.

Onemocnění je spojeno s chromozomálními abnormalitami. Inaktivující somatické mutace nebo delece alely tumor supresorového genu von Hippel-Lindau (VHL) lokalizovaného na krátkém raménku chromozomu 3, je detekována až u 45% světlobuněčných renálních karcinomů [Padala et al., 2020]. VHL gen je zodpovědný za syntézu proteinu VHL (pVHL), jehož jednou z funkcí je kooperace s transkripčním faktorem HIF (hypoxií indukovaný faktor). Za normálních podmínek je HIF degradován interakcí s VHL, nedochází tak k expresi genů indukovaných hypoxií. Při nedostatku kyslíku je funkce VHL inhibována a zvyšuje se hladina HIF a dochází tak k expresi jím regulovaných genů. Inaktivace VHL tumor supresorového genu v buňkách vede k nadměrné akumulaci HIF, čímž dochází k nekontrolovatelné expresi genů kódující angiogenní faktory. Zvýšení aktivity proteinu HIF vede mimo jiné ke zvýšení exprese vaskulárního endotelového růstového faktoru VEGF, který stimuluje růst nových cév. Proto důležitou roli v cílené terapii hrají především tyrozinkinázové inhibitory s účinností hlavně proti signální dráze VEGF [Zhang et al., 2020; Carril-Ajuria et al., 2020]. Druhý nejčastěji mutovaný gen u ccRCC je PBR1 gen. Tento protein kódující gen se podílí na regulaci remodelace chromatinu a methylaci histonů. Kromě genetiky, je výskyt ccRCC také spojen s

životním stylem, stravovacími návyky a environmentálními faktory. Mezi hlavní rizikové faktory patří hypertenze, kouření a obezita [Wang et al., 2019].

Pro pacienty s metastatickým ccRCC je pro správné zvolení léčby zásadní jejich stratifikace podle kritérií Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre (MSKCC). Podle této klasifikace se pacienti rozdělují podle přítomnosti počtu rizikových faktorů do tří prognostických skupin, a to na pacienty s dobrou (žádný rizikový faktor), střední (1 nebo 2 rizikové faktory) a špatnou prognózou (3 a více rizikových faktorů). Riziková skóre se získávají z 5 klinických a laboratorních parametrů, posuzuje se Karnofského index, který udává celkový stav pacienta, hladina celkové koncentrace laktátdehydrogenázy v séru (LDH), koncentrace vápníku v séru, hladina hemoglobinu a čas od diagnózy do začátku léčby [Motzer et al., 2002]. V poslední době je snaha o zpřesnění stanovení prognózy pacientů zavedením molekulárních biomarkerů. Voss et al. z Memorial Sloan-Kettering Centre (MSKCC) navrhl zavést jako genomové biomarkery ccRCC mutační statusy tří genů (BAP1, PBRM1 a TP53), [Voss et al., 2018]. Jak už bylo řečeno v předchozích kapitolách, přesná stratifikace pacientů pomáhá přizpůsobit léčebné postupy tak, aby odpovídaly individuálnímu profilu pacienta. Uvedené je též součástí přístupu preventivní, prediktivní a personalizované medicíny (PPPM), [Golubnitschaja et al., 2016]. U nejčastěji se vyskytujících solidních nádorů, jako je kolorektální karcinom nebo karcinom prsu, již existují klinicky používané multigenové expresní panely pro stanovení prognózy a predikce léčby [Lin et al., 2017]. V případě ccRCC, v současné době neexistuje žádný takový multigenový expresní panel pro predikci odpovědi pacientů na léčbu používaný v klinické praxi, ale už se objevují slibné výsledky identifikace konkrétních genů, které by mohly být, takového panelu, součástí [Pan et al., 2019].

V publikaci „BAI1 as a prognostic marker of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC)” jsme se zaměřili na hledání prognostických biomarkerů u pacientů s ccRCC s potenciálem zpřesnit stratifikaci pacientů pro následné rozhodnutí o léčbě. Stanovili jsme prognostický potenciál hladin expresí mRNA vybraných genů zapojených do procesu angiogeneze u pacientů s metastatickým ccRCC. Od každého pacienta byl dispozici FFPE vzorek s tkání primárního a metastazujícího nádoru. Pomocí metody RT real-time PCR byly měřeny hladiny mRNA u vybraných genů, u kterých se předpokládalo, že se uplatňují v procesu angiogeneze. Hodnotili jsme vztah hladin expresí mRNA 97 genů u primárního a metastazujícího nádoru k délce intervalu bez progresu (PFI). Hodnocení PFI bylo založeno na délce podávání léčby, které

pokračovalo, pokud pacient na léčbu reagoval. Na základě této analýzy jsme identifikovali 4 geny (BAI1, PDGFB, FGF4 a EPHB2), jejichž hladiny exprese mRNA byly ve vztahu s PFI. U všech těchto 4 genů jsme zaznamenali vyšší hladiny exprese, které byly spojeny s kratším PFI. Pro detailnější analýzu, byly pro tyto 4 geny vytvořeny Kaplan-Meierovy křivky přežití. Zaznamenali jsme statisticky významný rozdíl v čase do progresu onemocnění u pacientů s nízkou a vysokou hladinou exprese genu BAI1 v metastazující nádorové tkáni ccRCC. Pacienti s nízkou hladinou exprese BAI1 měli lepší prognózu. Vztah exprese genu BAI1 v nádorové tkáni ccRCC k prognóze onemocnění jsme ověřili u skupiny 606 pacientů s ccRCC, jejichž data byly k dispozici ve veřejně přístupné TCGA KIRC databázi. Stejně jako u naší skupiny pacientů, tak i u pacientů z TCGA KIRC databáze, kteří měli vyšší hladiny exprese BAI1, jsme zaznamenali signifikantně kratší dobu přežití (OS) a kratší interval bez progresu (PFI).

Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) je gen exprimovaný zejména v mozku, ale jeho exprese byla zaznamenána i v jiných orgánech jako jsou ledviny nebo plíce. Podílí se především na regulaci růstu cév. Bylo zjištěno, že vysoké hladiny genu BAI1 v mozku jsou snižené v mozkových nádorech, což naznačuje jeho tumorsupresorovou funkci. Stejná funkce genu BAI1 byla zaznamenána i u buněk plicního nádoru [Liu et al., 2020], což poukazuje na fakt, že vysoké hladiny genu BAI1 by měly být spojené s lepší prognózou onemocnění u pacientů trpících nádorovým onemocněním. V naší studii, u pacientů se světlobuněčným renálním karcinomem, jsme zaznamenali, že pacienti s vysokými hladinami BAI1 měli signifikantně kratší dobu přežití (OS) a kratší interval bez progresu (PFI). Stejný výsledek jsme zaznamenali i u 606 pacientů se světlobuněčným renálním karcinomem, jejichž data jsme získali z TCGA KIRC databáze. Tyto výsledky naznačují složitější zapojení genu BAI1 do procesu karcinogeneze. Je ovšem potřeba zmínit, že většina pacientů s ccRCC podstupuje antiangiogenní léčbu a samozřejmě zde vyvstává otázka ovlivnění výsledku efektem antiangiogenní léčby. My si myslíme, že samotná léčba by nedokázala zvrátit hladiny tohoto genu a výsledky z obou databází se odvíjejí od vlastní role v procesu karcinogeneze ccRCC.

Vzhledem k tomu, že u některých typů nádorů je předpokládána tumorsupresorová funkce genu BAI1 a naše výsledky u pacientů s ccRCC (jak vlastní soubor, tak hodnoty z TCGA KIRC databáze) jsou v rozporu s touto předpokládanou funkcí, zaměřili jsme se na vztah hladin exprese BAI1 k prognóze onemocnění u jiných typů nádorů. U pacientů s glioblastomem jsme nezaznamenali žádný vztah mezi hladinami exprese BAI1 k prognóze onemocnění (data byla použita z TCGA

GBM databáze). U pacientů trpících adenokarcinomem plic, kteří měli nižší hladiny exprese BAI1, jsme zaznamenali signifikantně kratší dobu OS a PFI (data byla použita z TCGA LUAD databáze). Z toho důvodu se také přikláníme k vysvětlení, že výsledky ukazují jiný mechanismus funkce u těchto nádorů než u námi zkoumaného ccRCC.

7.5.1 Atlas rakovinového genomu (The Cancer Genome Atlas, TCGA)

TCGA je komplexní program v oblasti genomiky nádorových onemocnění, který je společně podporován a řízen Národním institutem pro výzkum rakoviny (NCI) a Národním výzkumným ústavem pro lidský genom (NHGRI) Spojených států amerických. TCGA začal v roce 2006 jako pilotní projekt zaměřený na tři typy onkologických onemocnění, a to na nádory vaječníků, plic a glioblastomy. V současné době TCGA databáze čítá data od více než 11 000 pacientů reprezentující 33 různých typů nádorů. Tento soubor slouží jako cenný zdroj dat popisující molekulární změny, ke kterým dochází během nádorového onemocnění a podporuje tak biomedicínský výzkum [Hutter et al., 2018].

7.6 Sarkomy

Sarkomy tvoří velice heterogenní skupinu nádorů mezenchymálního původu. Patří mezi vzácné nádory čítající přibližně 1 % všech lidských malignit, kterými ročně onemocní přibližně 200 000 lidí po celém světě [Taylor et al., 2011].

Sarkomy mohou být rozděleny podle různých kritérií. Z histopatologického hlediska můžeme sarkomy rozdělit do dvou obsáhlých skupin podle typu tkáně, kde se primárně manifestují. První skupinu tvoří kostní sarkomy, zahrnující osteosarkomy, chondrosarkomy a většinu případů Ewingova sarkomu. Druhou skupinu tvoří sarkomy měkkých tkání, zahrnující liposarkomy, fibrosarkomy, nediferencované pleomorfní sarkomy, leiomyosarkomy, rabdomyosarkomy a řadu dalších vzácných, převážně pediatrických, sarkomů [Skubitz a D'Adamo, 2007].

Na genomické úrovni můžeme sarkomy rozdělit opět na dvě velké skupiny. První skupina zahrnuje především pediatrické sarkomy, které se vyznačují převážně normálními karyotypy a definovanými strukturními chromozomálními abnormalitami. Typické pro tuto skupinu sarkomů je vznik fúzních genů, ke kterým dochází v důsledku reciprokových translokací. Druhou skupinu představují sarkomy dospělých pacientů, zahrnující angiosarkomy, chondrosarkomy, většinu liposarkomů, fibrosarkomy, leiomyosarkomy a nediferencované pleomorfní sarkomy, které se obvykle vyznačují velice komplexními karyotypy s rozsáhlou genomickou nestabilitou a četnými numerickými a strukturními aberacemi. Vztah mezi věkem nástupu onemocnění a karyotypickou komplexitou ovšem není úplně striktní, např. osteosarkom, jenž patří mezi karyotypicky velmi komplexní nádory, se často vyskytuje v dětském věku. Naopak např. dermatofibrosarkoma protuberans, jenž je typickým translokačním závislým nádorem, se vyskytuje převážně ve středním věku [Oda et al., 2017].

Sarkomy jsou charakterizovány velice variabilním biologickým chováním, od téměř benigních až po vysoce agresivní invazivní a metastatické nádory. Zatímco lokalizované nádory lze často úspěšně chirurgicky léčit pouze samotnou chirurgickou resekci nebo v kombinaci s radioterapií, prognóza metastatických sarkomů v pokročilém stádiu bývá špatná, s mediánem celkového přežití 8 až 12 měsíců [Quesada et al., 2012]. I když problematika vzniku sarkomů v posledních letech zaznamenala velký pokrok, především v souvislosti

s identifikací velkého počtu fúzních genů, které vznikají v důsledku reciprokových translokací, a zkoumáním mezenchymálních kmenových buněk, ze kterých se pravděpodobně vyvíjí většina sarkomů, relativně malého pokroku bylo dosaženo v pochopení mechanismů, které jsou zodpovědné za progresi sarkomů [Pennacchioli et al., 2012; Mertens, et al., 2016]. Vzhledem k tomu, že rychlou progresi sarkomů můžeme zaznamenat napříč různými histologickými podtypy, domnívám se, že by za tím mohly stát obecnější biologické mechanismy.

Nejčastější příčinou úmrtí související se sarkomy je metastatická diseminace. Metastatická kaskáda zahrnuje několik přísně regulovaných událostí. Na samotném počátku celého metastatického procesu musí být buňka schopna opustit místo primárního nádoru a následně putovat krevním nebo lymfatickým oběhem na sekundární místo, kde znovu zahájí proliferaci. Nádorová motilita a invazivita tedy představují klíčové momenty celé metastatické kaskády uplatňující se jak na jejím začátku, tak v procesu kolonizace sekundární tkáně [Peychl et al., 2003].

Určení prognózy onemocnění hraje klíčovou roli ve stanovení terapeutického přístupu v péči o pacienty se sarkomem. Současné prognostické hodnocení založené na FNCLCC klasifikaci bylo nedávno rozšířeno o stanovení genové exprese pomocí CINSARC expresního genového profilu. CINCARS identifikuje geny, které se primárně podílejí na mitotické regulaci a chromozomové integritě, jejichž deregulace může vést ke zvýšené genomové nestabilitě. Některé z identifikovaných genů mohou mít také vztah k progresi nádoru, to znamená, že mohou ovlivňovat nádorovou motilitu nebo invazivitu. Původně byl CINSARC vypracován ke stanovení prognózy onemocnění u sarkomů, následně se ukázalo, že expresní hladiny CINSARC dokáží předpovědět progresi i u jiných nádorů s různým biologickým chováním, jako jsou karcinomy, lymfomy a leukémie [Goncalves et al., 2021].

K pochopení mechanismu progresu sarkomů může přispět i analýza experimentálních modelových systémů. Například *in vitro* model progresivní série krysích fibrosarkomových linií pomohl odhalit důležitý základ mechanismu motility, invazivity a metastatické kompetence z hlediska cytoskeletální dynamiky [Rösel et al., 2008].

Byly také odvozeny modely progresivních buněčných linií lidských sarkomů spočívající v postupné *in vitro* transdukci virových a buněčných onkogenů do dospělých lidských fibroblastů nebo primárních mezenchymálních kmenových buněk [Ramanathan et al., 2005;

Funes et al., 2007]. Ty byly zvláště nápomocné při objasnění metabolických principů progresu sarkomů. Zatímco sarkomové buňky odvozené od lidských fibroblastů v *in vitro* podmínkách procházely během terminální transformace metabolickým přepnutím ve směru glykolytické dráhy, jejich protějšky odvozené z primárních mezenchymálních kmenových buněk zcela spoléhaly na mitochondriální oxidační fosforylaci, glykolýza sloužila pouze jako dočasné řešení v reakci na hypoxii.

Progresivní H2-K/v-jun série myších fibrosarkomů odvozená na Ústavu biologie LF UK v Plzni umožňuje studium různých stádií nádorové transformace u sarkomů [Hatina et al., 2003]. Jejich celogenomová transkriptomická analýza by mohla pomoci identifikovat geny zodpovědné za proliferaci, motilitu a invazivitu a poskytnout tak informace o biologických mechanismech vzniku a progresu sarkomů, které by pomohly nalézt nové prognostické markery a potenciální terapeutické cíle.

Tato progresivní série se skládá ze 4 buněčných linií, JUN-1, JUN-2, JUN-2fos-3 a JUN-3. Buněčné linie JUN-1, JUN-2 a JUN-3 představují lineární progresi od nejméně transformovaného fenotypu JUN-2 s nízkou úrovní proliferace, motility a invazivity po vysoce transformovaný fenotyp buněk JUN-3 s vysokou úrovní proliferace, motility a invazivity. U dceřiné linie JUN-2fos3 odvozené z JUN-2 sarkomové linie došlo k malé deregulaci buněčného růstu a proliferace, ale k výrazné manifestaci buněčné motility a invazivity.

V původní práci „Complex Interplay of Genes Underlies Invasiveness in Fibrosarcoma Progression Model“ jsme se podrobněji zaměřili na transkriptom invazivních sarkomových linií. Ukázalo se přitom, že vykazuje pozoruhodnou komplexitu a provázanost, kdy jednotlivé specificky exprimované geny a jimi kódované proteiny vytváří síť funkčních interakcí, které se vzájemně zčásti kompenzují, zčásti zesilují. Jedním z významných autokrinních motilitních faktorů, který jsme identifikovali, je Semaforin 3A. Byl rovněž nezávisle popsán jakožto široce aktivní inhibitor angiogeneze. Tato aktivita, která je sama o sobě těžko kompatibilní s nádorovou progresí, je kompenzována specifickou expresí několika dobře charakterizovaných aktivátorů angiogeneze, jako je Angiopoetin-2 nebo Vaskulární endoteliální růstový faktor – D, přičemž oba z nich zároveň vykazují rovněž motilitu stimulující aktivitu na buňky mezenchymálního původu, dobře charakterizovanou a popsanou v různých modelových systémech. Je zajímavé, že v transkriptomickém profilu aktivovaných genů nenalzáme žádný

gen kódující některou z proteáz spojených s nádorovou invazivitou, což ukazuje, že invazivita v tomto experimentální systému je primárně závislá na motilitě sarkomových buněk, nikoli na jejich schopnosti degradovat extracelulární matrix; dvě z metaloproteináz matrix, MMP-3 a MMP-13, jsou dokonce mezi geny, jež jsou reprimovány v invazivním transkriptomu. Další z reprimovaných genů, Xist, kóduje dlouhou regulační RNA, která hraje klíčovou roli v inaktivaci X-chromozómu u savců. Její snížená exprese by mohla usnadnit aktivaci některých X-vázaných genů, mezi jinými např. genu kódujícímu právě VEGF-D. Pro řadu proteinů, jejichž exprese je aktivována v rámci invazivního transkriptomu, jsou v současnosti dostupné farmakologické inhibitory; vedle farmakologického blokování autokrinně motilitního signálního systému CCL-8 – CCR5, jehož účinnost jsme v práci přímo otestovali, se jedná např. o inhibitory Angiopoetinu-2 či Semaforinu 3A, což by mohlo v delším časovém horizontu rozšířit farmakologickou léčbu sarkomů. Testování možnosti farmakologická blokace Semaforinu 3A je v současnosti předmětem mezinárodního projektu (Co-targeting semaphorin and VEGF receptors in experimental cancer treatment - Charles University 4EU+ Minigrants 2021 ve spolupráci s Univerzitou v Heidelbergu a Univerzitou ve Varšavě), na jehož řešení se rovněž podílím.

7.6.1 Mezenchymální kmenové buňky a sarkomové kmenové buňky

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) si získaly velký zájem v oblasti klinické medicíny, především v regenerativní medicíně díky svým schopnostem reparovat poškozené mezenchymální tkáň a modulovat imunitní systém. Jsou charakterizovány schopností sebeobnovy a vysokým diferenciačním potenciálem. Diferencují se v široké spektrum buněčných typů včetně osteoblastů, chondroblastů, myoblastů, fibroblastů a adipocytů. Přesto existují jisté obavy týkající se jejich role v lidském těle. Na jednu stranu hrají významnou roli v regeneraci a obnově tkání, na druhou stranu se ukázalo, že mezenchymální kmenové buňky a jejich transformace v sarkomové kmenové buňky hrají důležitou roli v procesu karcinogeneze [Lye et al., 2016].

Nádorové kmenové buňky (CSC) jsou buňky vznikající transformací normálních kmenových buněk, které mají schopnost sebeobnovy a současně diferenciaci v jakýkoliv typ nádorové buňky v daném nádoru. Ukázalo se, že CSC hrají významnou roli v rezistenci k protinádorové

léčbě, jako je chemoterapie nebo radioterapie, a navíc se vyznačují zvýšeným metastatickým potenciálem. Epigenetické změny a postupná akumulace mutací, které ústí v genotypové a fenotypové rozdíly mezi nádorovými a nenádorovými kmenovými buňkami představují klíčové procesy vedoucí ke schopnosti těchto transformovaných buněk aktivovat nádorový růst a odolávat terapii.

Vzhledem k tomu, že jsou nádorové kmenové buňky pravděpodobně zodpovědné za progresi nádoru, metastazování a vznik chemorezistence, představuje jejich identifikace v současnosti důležitou oblast výzkumu. Existují experimentální studie, které dokazují přítomnost sarkomových kmenových buněk, podobně jako je tomu u karcinomů nebo leukémií.

V naší knižní kapitole „Sarcoma Stem Cell Heterogeneity“ jsme se zabývali všemi aspekty problematiky mezenchymálních a sarkomových kmenových buněk jakožto klíčové buněčné populace odpovědné za nepřetržitý růst a progresi sarkomů. U mezenchymálních kmenových buněk je potenciál tříliniové in vitro diferenciaci považován za jakési definiční kritérium. Po vhodné stimulaci jsou schopné se diferencovat na osteoblasty, chondrocyty nebo adipocyty. Skutečný diferenciační potenciál MSC se ale liší. Minimálně v in vitro podmínkách jsou schopné vstoupit do neurogenní diferenciační dráhy. Samozřejmě se také diferencují ve fibroblasty, nejhojněji se vyskytující buňky pojivových tkání [Kubo et al., 2016].

MSC lze snadno získat z různých tkání, typickými zdroji jsou kostní dřev a bílá tuková tkáň. Buňky odvozené z těchto tkání ale nejsou identické a liší se svým diferenciačním potenciálem a epigenetickou regulací genů. Tyto biologické rozdíly vedou k různému názvosloví, pro MSC odvozené z kostní dřevě (BM-MS) bylo nedávno navrženo, aby byly nazývány kosterní kmenové buňky, zatímco MSC z bílé tukové tkáně jsou tradičně nazývány stromální buňky odvozené z adipózní tkáně (ASCs). Speciálním typem kmenových buněk kosterní svaloviny jsou satelitní buňky, které se mohou diferencovat v buňky kosterního svalstva. Existuje také samostatná populace dospělých kmenových buněk, kmenové buňky neurální lišty, které se mohou diferencovat ve specializované neurony, gliové buňky a melanocyty, ale také v celé spektrum mezenchymálních buněk. Jak různé populace mezenchymálních kmenových buněk, tak kmenové buňky neurální lišty, byly navrženy jako buňky, jejichž genetickou a epigenetickou transformací je odstartován proces sarkomogeneze.

Při identifikaci sarkomových kmenových buněk se používají stejné metody, jako se používají u různých karcinomů, lymfomů a leukémií. Jednou z možností je identifikace prostřednictvím specifických molekul, které buňky exprimují na svém povrchu. Mezi tyto metody patří průtoková cytometrie, především detekce specifických povrchových markerů, jako jsou CD44, CD90 a CD133 [Fujiwara et al., 2013]. Další možností je identifikace chemorezistentních nádorových a normálních kmenových buněk pomocí tzv. metody vedlejší populace (SP, side population) nebo Aldefluor testu. Mnoho studií dokazuje, že buňky tzv. vedlejší populace izolované z různých solidních nádorů vykazují vlastnosti kmenových buněk a jsou zodpovědné za rezistenci k chemoterapii a recidivu onemocnění. Metoda tzv. vedlejší populace sortuje buňky s vysokou expresí transmembránových proteinů z ABC rodiny, zejména ABCB1 a ABCG2, jejichž zvýšené exprese jsou považované za možnou příčinu rezistence nádorových kmenových buněk k chemoterapeutikům [Dean, 2009]. Aldefluor test identifikuje buňky exprimující vysoké hladiny enzymu aldehyddehydrogenázy (ALDH), zejména ALDH1A1 a ALDH1A3. Vyšší exprese ALDH jsou specifické pro nádorové kmenové buňky, a proto jsou využívány jako jeden z markerů CSC. Rovněž zvýšená aktivita ALDH je spojena s rezistencí buněk k chemoterapii [Škoda et al., 2012].

Několik experimentálních modelů ukázalo, že vývoj a progres sarkomů jsou spojeny s vyšší frakcí kmenových buněk, exprimovaných jako pozitivní na Aldefluor test i analýzu vedlejší populace. [Krause et al., 2014]. Signální dráhy zodpovědné za kmenovost sarkomových kmenových buněk jsou překvapivě rozdílné od většiny karcinomů. Např. signální dráha Wnt/ β -katenin, nepostradatelná pro nádorové kmenové buňky řady karcinomů (tlusté střevo, vaječníky, játra aj.) v kontextu sarkomogeneze vystupuje vyhraněně supresivně, ve smyslu podpory diferenciaci a senescence. Pro sarkomy, včetně sarkomových kmenových buněk je tedy typická specifická inhibice této signální dráhy, např. formou zvýšené exprese inhibitorů rodiny Dickkopf. U karyotypicky velmi nestabilních sarkomů, jako je osteosarkom nebo dediferencovaný liposarkom, vyvstává otázka, nakolik ovlivňuje neustálá proměna karyotypu fenotyp sarkomových kmenových buněk. V naší knižní kapitole jsme formulovali smělou hypotézu, že vedle obvyklých mechanismů diferenciaci nebo dediferenciaci může být kmenovost také ovlivněna aktuálním genotypem, to znamená, že aktuální kombinace mutací může propůjčit dediferencovaným buňkám kmenový charakter, který je ovšem pouze dočasný a ztrácí se vedle diferenciaci i v průběhu další komplexní proměny karyotypu. Sarkomové

kmenové buňky tak získávají spíše charakter funkčního fenotypu, spíše než diskrétní a relativně stabilní buněčné populace. Nakolik obecné je toto pojetí a nakolik může být aplikováno rovněž na ostatní typy karyotypicky komplexních nádorů zůstává především předmětem dalších výzkumů.

V naší knižní kapitole „Sarcoma Stem Cell Heterogeneity“ jsme se zabývali všemi aspekty problematiky mezenchymálních a sarkomových kmenových buněk jakožto klíčové buněčné populace odpovědné za nepřetržitý růst a progresi sarkomů. U mezenchymálních kmenových buněk je potenciál tříliniové in vitro diferenciaci považován za jakési definiční kritérium. Po vhodné stimulaci jsou schopné se diferencovat na osteoblasty, chondrocyty nebo adipocyty. Skutečný diferenciací potenciál MSC se ale liší. Minimálně v in vitro podmínkách jsou schopné vstoupit do neurogení diferenciací dráhy. Samozřejmě se také diferencují ve fibroblasty, nejhojněji se vyskytující buňky pojivových tkání [Kubo et al., 2016].

MSC lze snadno získat z různých tkání, typickými zdroji jsou kostní dřev a bílá tuková tkáň. Buňky odvozené z těchto tkání ale nejsou identické a liší se svým diferenciací potenciálem a epigenetickou regulací genů. Tyto biologické rozdíly vedou k různému názvosloví, pro MSC odvozené z kostní dřevě (BM-MS) bylo nedávno navrženo, aby byly nazývány kosterní kmenové buňky, zatímco MSC z bílé tukové tkáně jsou tradičně nazývány stromální buňky odvozené z adipózní tkáně (ASCs). Speciálním typem kmenových buněk kosterní svaloviny jsou satelitní buňky, které se mohou diferencovat v buňky kosterního svalstva. Existuje také samostatná populace dospělých kmenových buněk, kmenové buňky neurální lišty, které se mohou diferencovat ve specializované neurony, gliové buňky a melanocyty, ale také v celé spektrum mezenchymálních buněk. Jak různé populace mezenchymálních kmenových buněk, tak kmenové buňky neurální lišty, byly navrženy jako buňky, jejichž genetickou a epigenetickou transformací je odstartován proces sarkomogeneze.

Při identifikaci sarkomových kmenových buněk se používají stejné metody, jako se používají u různých karcinomů, lymfomů a leukémií. Jednou z možností je identifikace prostřednictvím specifických molekul, které buňky exprimují na svém povrchu. Mezi tyto metody patří průtoková cytometrie, především detekce specifických povrchových markerů, jako jsou CD44, CD90 a CD133 [Fujiwara et al., 2013]. Další možností je identifikace chemorezistentních nádorových a normálních kmenových buněk pomocí tzv. metody vedlejší populace (SP, side

population) nebo Aldefluor testu. Mnoho studií dokazuje, že buňky tzv. vedlejší populace izolované z různých solidních nádorů vykazují vlastnosti kmenových buněk a jsou zodpovědné za rezistenci k chemoterapii a recidivu onemocnění. Metoda tzv. vedlejší populace sortuje buňky s vysokou expresí transmembránových proteinů z ABC rodiny, zejména ABCB1 a ABCG2, jejichž zvýšené exprese jsou považované za možnou příčinu rezistence nádorových kmenových buněk k chemoterapeutikům [Dean, 2009]. Aldefluor test identifikuje buňky exprimující vysoké hladiny enzymu aldehyddehydrogenázy (ALDH), zejména ALDH1A1 a ALDH1A3. Vyšší exprese ALDH jsou specifické pro nádorové kmenové buňky, a proto jsou využívány jako jeden z markerů CSC. Rovněž zvýšená aktivita ALDH je spojena s rezistencí buněk k chemoterapii [Škoda et al., 2012].

Několik experimentálních modelů ukázalo, že vývoj a progres sarkomů jsou spojeny s vyšší frakcí kmenových buněk, exprimovaných jako pozitivní na Aldefluor test i analýzu vedlejší populace. [Krause et al., 2014]. Signální dráhy zodpovědné za kmenovost sarkomových kmenových buněk jsou překvapivě rozdílné od většiny karcinomů. Např. signální dráha Wnt/ β -katenin, nepostradatelná pro nádorové kmenové buňky řady karcinomů (tlusté střevo, vaječníky, játra aj.) v kontextu sarkomogeneze vystupuje vyhraněně supresivně, ve smyslu podpory diferenciaci a senescence. Pro sarkomy, včetně sarkomových kmenových buněk je tedy typická specifická inhibice této signální dráhy, např. formou zvýšené exprese inhibitorů rodiny Dickkopf. U karyotypicky velmi nestabilních sarkomů, jako je osteosarkom nebo dediferencovaný liposarkom, vyvstává otázka, nakolik ovlivňuje neustálá proměna karyotypu fenotyp sarkomových kmenových buněk. V naší knižní kapitole jsme formulovali smělou hypotézu, že vedle obvyklých mechanismů diferenciaci nebo dediferenciaci může být kmenovost také ovlivněna aktuálním genotypem, to znamená, že aktuální kombinace mutací může propůjčit dediferencovaným buňkám kmenový charakter, který je ovšem pouze dočasný a ztrácí, se vedle diferenciaci i v průběhu další komplexní proměny karyotypu. Sarkomové kmenové buňky tak získávají spíše charakter funkčního fenotypu, spíše než diskrétní a relativně stabilní buněčné populace. Nakolik obecné je toto pojetí a nakolik může být aplikováno rovněž na ostatní typy karyotypicky komplexních nádorů zůstává především předmětem dalších výzkumů.

8 Závěrečné shrnutí

Molekulárně biologický přístup ke studiu nádorů zažívá v současnosti obrovský rozvoj. Nové poznatky v patogenezi nádorových onemocnění pomáhají pochopit její složitost a komplexnost. V posledních letech je snaha především o personalizovanou medicínu, kdy je léčba individualizovaná každému pacientovi a pro každý nádor na základě molekulární charakteristiky nádorové tkáně. Jedním z cílů současné molekulární biologie je nalézání nových biomarkerů, které by vedly ke zpřesnění diagnostiky onemocnění nebo by měly prediktivní či prognostickou výpovědní hodnotu. Touto problematikou se zabýváme i na Ústavu biologie LF UK v Plzni, kde se nám v rámci výzkumu zaměřeného na solidní nádory podařilo nalézt několik potenciálně nadějných biomarkerů. Získané výsledky jsme prezentovali v řadě odborných publikací a jsou komentované v této disertační práci.

V posledních dekádách se část výzkumu upíná k detekci nekódujících RNA, především pak molekul miRNA, které se zdají být vhodnými kandidátními biomarkery. Pro předpovězení účinnosti chemoterapie pacientů se skvamózním plicním karcinomem se nám podařilo identifikovat 3 miRNA (miR-34a, miR-224 a miR-34), které jsou ve vztahu k přežití, tedy i do značné míry k účinnosti chemoterapie. Je zajímavé, že nejlepších výsledků jsme dosáhli kombinací různých hladin všech tří miRNA, což naznačuje, že efekt dané miRNA nezávisí jen na její hladině, ale je také ovlivněn dalšími hladinami jiných miRNA, které vytvářejí společnou regulační síť. Tento výsledek můžeme interpretovat jako v souladu s ceRNA hypotézou.

Zjistili jsme, že předoperační plazmatické hladiny miR-20a, miR-21 a miR-23a mají u pacientů s kolorektálním karcinomem prognostický význam. Nejpresnější předpovězení příznivé a nepříznivé prognózy bylo dosaženo kombinací miR-21, miR-20a, miR-23a, CEA a CA19-9, tzn. jak molekul miRNA, tak klasických nádorových markerů. Po chirurgickém odstranění nádoru došlo k poklesu plazmatických hladin miR-20a, miR-23a, miR-210 a miR-223a. Použití těchto miRNA pro včasnou detekci recidivy je však limitováno jejich nízkou specificitou ve srovnání s CEA a CA19-9. CEA a CA19-9 měly v naší studii vysokou specificitu, ale nízkou senzitivitu.

Nejen z našich výsledků vyplývá, že miRNA představují potenciálně velice slibné biomolekuly zapojené do patofyziologie nádorových onemocnění, jejichž hladiny odrážejí aktivitu onemocnění. Ovšem je potřeba zmínit, že stanovení hladin miRNA je stále technicky a časově

náročné. Pro zavedení stanovení hladin miRNA do klinické praxe bude potřeba standardizovat a zrychlit tyto metody. Potom budou mít miRNA velký předpoklad stát se cennými biomarkery v péči o onkologické pacienty.

Metoda OSNA je vysoce citlivá molekulární metoda, která, jak jsme ukázali, detekuje nádorové buňky v lymfatických uzlinách senzitivněji ve srovnání s rutinně používanými metodami (H&E, IHC CK 19). Metoda OSNA byla původně vyvinuta pro detekci metastáz v lymfatických uzlinách karcinomu prsu, kde je již používána v klinické praxi. Výhodou této metody je její rychlost a možnost vyšetření celé uzliny, prostřednictvím kompletní homogenizace. Vzhledem k tomu, že se vyznačuje i vysokou sensitivitou a specificitou, je testována i pro vyšetřování u dalších onkologických onemocnění. Navrhli jsme způsob použití metody OSNA, včetně způsobu zpracování uzlin (specifickým poolováním uzlin) u pacientů léčených pro plicní karcinomy. Ukázalo se však, že vyšší citlivost této metody u plicních karcinomů oproti rutinním metodám není v souladu s klinickým průběhem onemocnění. Proto jsme navrhli zvýšení hladiny cut-off CK19, které by zvýšilo shodu mezi metodami OSNA a H&E. V současné době firma Sysmex (Kobe, Japonsko) dodává novější přístroj RD210i, kde je již citlivost detekce upravena ve směru jejího snížení.

Stanovili jsme prognostický význam mutované DNA genu KRAS v plazmě (ctDNA), stanovené metodou ddPCR, u pacientů s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu. U párových vzorků jsme detekovali metodou ddPCR 75% shodu výsledků mezi tkáňovými (FFPE) vzorky a stanovením v plazmě. Tyto výsledky ukazují, že v určitých případech může být vhodnější stanovovat přítomnost KRAS mutace metodou tekuté biopsie a mohou tak poskytnout další informace o průběhu a prognóze onemocnění, což může být užitečné při rozhodování o použití vhodné léčby. Zároveň může být pro detekci mutace genu KRAS metodou ddPCR použita plazma tam, kde není dostupná tkáň (se znalostí limitů tohoto použití).

Identifikovali jsme gen BAI 1 jako prognostický marker světlobuněčného renálního karcinomu a mohl by tak být zařazen do panelu genů pro zpřesnění prognózy, na základě, které jsou pacienti s metastazujícím ccRCC stratifikováni pro léčbu. Zaznamenali jsme, že pacienti s vysokými hladinami BAI1 měli signifikantně kratší dobu přežití a kratší interval bez progresu.

U invazivních sarkomových linií jsme provedli celogenomovou transkriptomickou analýzu. Identifikovali jsme významný autokrinní motilitní faktor Semaforin 3A, jehož exprese je

aktivována v rámci invazivního transkriptomu. V současné době spolupracujeme na mezinárodním projektu, jehož součástí je testování farmakologického blokování Semaforinu 3A. Zavedení nových farmakologických inhibitorů by mohlo pomoci v léčbě sarkomů.

V naší knižní kapitole jsme komplexně shrnuli aspekty mezenchymálních a sarkomových kmenových buněk jakožto buněk zodpovědných za nepřetržitý růst a progresi sarkomů. Teorie nádorových kmenových buněk je respektována u řady solidních nádorů, včetně sarkomů. Zdokonalené metody průtokové cytometrie umožňují identifikovat buňky zodpovědné za iniciaci nádorového růstu a progresi onemocnění, metastazování, ale i rezistenci vůči chemoterapeutikům - nádorové kmenové buňky. Jednou z možností jejich identifikace je detekce molekul, které tyto buňky exprimují, především CD44, CD90 a CD133. I když nebyly tyto markery zatím zavedeny do rutinní diagnostiky, řada studií ukazuje, že exprese těchto molekul by mohly sloužit jako vhodné biomarkery pro záchyt metastáz a recidivy onemocnění.

Nové nádorové biomarkery představují možnost, jak zlepšit diagnostiku a léčbu onkologických onemocnění. Znalosti v tomto oboru dosáhly v posledních letech velkého pokroku, proto se jejich zavedení do rutinní klinické praxe zdá být dalším logickým krokem, který by vedl ke zdokonalení léčby a prodloužení délky života onkologických pacientů.

9 Nejvýznamnější výsledky

1. U pacientů s NSCLC jsme identifikovali 3 tkáňové miRNA (miR-34a, miR-224 a miR-34) s prognostickým významem. Nejlepších výsledků jsme dosáhli různými kombinacemi hladin všech tří miRNA. Tento výsledek podporuje tzv. ceRNA hypotézu.
2. U pacientů s kolorektálním karcinomem jsme našli 3 cirkulující miRNA (miR-20a, miR-21 a miR-23a), jejichž předoperační hladiny mají prognostický význam. Nejpresnějšího předpovězení příznivé a nepříznivé prognózy jsme dosáhli kombinací těchto 3 miRNA a rutinně používaných markerů CEA a CA19-9.
3. Metodou OSNA jsme detekovali vyšší záchyt metastatického postižení lymfatických uzlin u plicního karcinomu a karcinomu endometria ve srovnání s patologickým ultrastagingem. Pro plicní karcinomy jsme navrhli novou hladinu cut-off CK19, pomocí které výsledky positivity lymfatických uzlin přesněji korespondují s průběhem onemocnění. Navrhli jsme způsob použití metody OSNA při absenci konceptu sentinelové uzliny (u pacientů s NSCLC).
4. U pacientů s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu jsme metodou ddPCR prokázali prognostický význam ctDNA. Zjistili jsme, že v případě absence tkáňového vzorku nádoru pro vyšetření přítomnosti mutací KRAS genu, je možno tento vzorek do určité míry nahradit analýzou ctDNA.

10 Použitá literatura

Akgül Ö, Çetinkaya E, Ersöz Ş, Tez M. *Role of surgery in colorectal cancer liver metastases*. World J Gastroenterol. 2014; 20(20): 6113-22.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson AD, Raff M, Roberts K, Walter P. *Essential cell biology (4th ed.)*. Garland Publishing. 2013.

Alimirzaie S, Bagherzadeh M, Akbari MR. *Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review*. Clin Genet. 2019; 95(6): 643-660.

Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, Meyer L, Gress DM, Byrd DR, Winchester DP. *The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging*. CA Cancer J Clin. 2017; 67(2): 93-99.

Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. *The impact of microRNAs on protein output*. Nature. 2008; 455(7209): 64-71.

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Lubner B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih IM, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA Jr. *Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies*. Sci Transl Med. 2014; 6(224): 224ra24.

Bhaskaran M, Mohan M. *MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease*. Vet Pathol. 2014; 51(4): 759-74.

Bodurtha Smith AJ, Fader AN, Tanner EJ. *Sentinel lymph node assessment in endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis*. Am J Obstet Gynecol. 2017; 216(5): 459-476.e10.

Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. RNA. 2004; 10(2): 185-91.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin. 2018; 68(6): 394-424.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(24): 15524-9.

Campos-da-Paz M, Dórea JG, Galdino AS, Lacava ZGM, de Fatima Menezes Almeida Santos M. *Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Hepatic Metastasis in Colorectal Cancer: Update on Biomarker for Clinical and Biotechnological Approaches*. Recent Pat Biotechnol. 2018; 12(4): 269-279.

Carpinetti P, Donnard E, Bettoni F, Asprino P, Koyama F, Rozanski A, Sabbaga J, Habr-Gama A, Parmigiani RB, Galante PA, Perez RO, Camargo AA. *The use of personalized biomarkers and liquid biopsies to monitor treatment response and disease recurrence in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation*. Oncotarget. 2015; 6(35): 38360-71.

Carril-Ajuria L, Santos M, Roldán-Romero JM, Rodriguez-Antona C, de Velasco G. *Prognostic and Predictive Value of PBRM1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. Cancers. 2020; 12(1): 16.

Carter BW, Lichtenberger JP 3rd, Benveniste MK, de Groot PM, Wu CC, Erasmus JJ, Truong MT. *Revisions to the TNM Staging of Lung Cancer: Rationale, Significance, and Clinical Application*. Radiographics. 2018; 38(2): 374-391

Carthew RW, Sontheimer EJ. *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. Cell. 2009; 136(4): 642-55.

Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, Patnode H, Mishima Y, Cheloufi S, Ma E, Mane S, Hannon GJ, Lawson ND, Wolfe SA, Giraldez AJ. *A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity*. Science. 2010; 328(5986): 1694-8.

Creasman W. *Revised FIGO staging for carcinoma of the endometrium*. Int J Gynaecol Obstet. 2009; 105(2): 109-109

Croner RS, Geppert CI, Bader FG, Nitsche U, Späth C, Rosenberg R, Zettl A, Matias-Guiu X, Tarragona J, Güller U, Stürzl M, Zuber M. *Molecular staging of lymph node-negative colon carcinomas by one-step nucleic acid amplification (OSNA) results in upstaging of a quarter of patients in a prospective, European, multicentre study*. Br J Cancer. 2014; 110(10): 2544-50.

Cserni G. *Intraoperative analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer by one-step nucleic acid amplification*. J Clin Pathol. 2012; 65(3): 193-9.

Cui S, Cheng Z, Qin W, Jiang L. *Exosomes as a liquid biopsy for lung cancer*. Lung Cancer. 2018; 116: 46-54.

Čížková A. *Genové čipy — perspektivní nástroj biologie i moderní medicíny*. Živa. 2005; 3: 97-104.

De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, Delrio P. *Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review)*. *Oncol Rep*. 2015; 34(3): 1087-96.

Dean M. *ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2009; 14(1): 3-9.

DeVita VT Jr. *The 'War on Cancer' and its impact*. *Nat Clin Pract Oncol*. 2004; 1(2): 55.

Engstrand J, Nilsson H, Strömberg C, Jonas E, Freedman J. *Colorectal cancer liver metastases - a population-based study on incidence, management and survival*. *BMC Cancer*. 2018; 18(1): 78.

Escalante Pérez M, Hermida Romero MT, Otero Alén B, Álvarez Martínez M, Fernández Prado R, de la Torre Bravos M, Concha López Á. *Detection of lymph node metastasis in lung cancer patients using a one-step nucleic acid amplification assay: a single-centre prospective study*. *J Transl Med*. 2019; 17(1): 233.

Fakih MG, Padmanabhan A. *CEA monitoring in colorectal cancer. What you should know*. *Oncology (Williston Park)*. 2006; 20(6): 579-87.

Fearon ER, Vogelstein B. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. *Cell*. 1990; 61(5): 759-67.

Fialová E, Zdeňková K, Jablonská E, Demnerová K, Ovesná K. *Digitální PCR: princip a aplikace*. *Chem. Listy*. 2019; 113(9): 545-552.

Fidler MM, Soerjomataram I, Bray F. *A global view on cancer incidence and national levels of the human development index*. *Int J Cancer*. 2016; 139(11): 2436-46.

Frischmeyer PA, Dietz HC. *Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease*. *Hum Mol Genet*. 1999; 8(10): 1893-900.

Fujiwara, T., Kawai, A., Yoshida, A., Ozaki, T., & Ochiya, T. *Cancer stem cells of sarcoma. Role of cancer stem cells in cancer biology and therapy*. CRC Press, Boca Raton, FL. 2013; 23-78.

Funes JM, Quintero M, Henderson S, Martinez D, Qureshi U, Westwood C, Clements MO, Bourboulia D, Pedley RB, Moncada S, Boshoff C. *Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(15): 6223-8.

Gao Y, Wang J, Zhou Y, Sheng S, Qian SY, Huo X. *Evaluation of Serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and Ferritin as Diagnostic Markers and Factors of Clinical Parameters for Colorectal Cancer*. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 2732.

García-Foncillas J, Tabernero J, Élez E, Aranda E, Benavides M, Camps C, Jantus-Lewintre E, López R, Muínelo-Romay L, Montagut C, Antón A, López G, Díaz-Rubio E, Rojo F, Vivancos A.

Prospective multicenter real-world RAS mutation comparison between OncoBEAM-based liquid biopsy and tissue analysis in metastatic colorectal cancer. Br J Cancer. 2018; 119(12): 1464-1470.

Golubnitschaja O, Baban B, Boniolo G, Wang W, Bubnov R, Kapalla M, Krapfenbauer K, Mozaffari MS, Costigliola V. *Medicine in the early twenty-first century: paradigm and anticipation - EPMA position paper 2016.* EPMA J. 2016; 7(1): 23.

Goncalves A, Finetti P, Birnbaum D, Bertucci F. *The CINSARC signature predicts the clinical outcome in patients with Luminal B breast cancer.* NPJ Breast Cancer. 2021; 7(1): 48.

Gregory RI, Shiekhattar R. *MicroRNA biogenesis and cancer.* Cancer Res. 2005; 65(9): 3509-12.

Güller U, Zettl A, Worni M, Langer I, Cabalzar-Wondberg D, Viehl CT, Demartines N, Zuber M. *Molecular investigation of lymph nodes in colon cancer patients using one-step nucleic acid amplification (OSNA): a new road to better staging?* Cancer. 2012; 118(24): 6039-45.

Hatina J, Fernandes MI, Hoffmann MJ, Zeimet AG. *Cancer stem cells – basic biological properties and experimental approaches.* Encyclopedia of Life Sciences. Chichester, John Wiley & Sons. 2013.

Hatina J, Hájková L, Peychl J, Rudolf E, Fínek J, Cervinka M, Reischig J. *Establishment and characterization of clonal cell lines derived from a fibrosarcoma of the H2-K/V-JUN transgenic mouse. A model of H2-K/V-JUN mediated tumorigenesis.* Tumour Biol. 2003; 24(4): 176-84.

Hatina J. *Imunologie nádoru - současný stav a poznatky z 1. mezinárodní konference základní a klinické imunogenomiky. Část I – interakce nádoru a imunitního systému.* Klin Onkol. 2005; 18(4): 119-125.

Henry NL, Hayes DF. *Cancer biomarkers.* Mol Oncol. 2012; 6(2): 140-6.

Hillman RT, Green RE, Brenner SE. *An unappreciated role for RNA surveillance.* Genome Biol. 2004; 5(2): R8.

Huang T, Alvarez A, Hu B, Cheng SY. *Noncoding RNAs in cancer and cancer stem cells.* Chin J Cancer. 2013; 32(11): 582-93.

Hutter C, Zenklusen JC. *The Cancer Genome Atlas: Creating Lasting Value beyond Its Data.* Cell. 2018;173(2):283-285.

Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF. *The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway.* Annu Rev Biochem. 2007; 76: 51-74.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing.* Nature. 2005; 436(7051): 740-4.

Inamura K, Ishikawa Y. *MicroRNA In Lung Cancer: Novel Biomarkers and Potential Tools for Treatment*. J Clin Med. 2016; 5(3): 36.

Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. *DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells*. Cancer Res. 2001; 61(4): 1659-65.

Jiang J, Bi Y, Liu XP, Yu D, Yan X, Yao J, Liu T, Li S. *To construct a ceRNA regulatory network as prognostic biomarkers for bladder cancer*. J Cell Mol Med. 2020; 24(9): 5375-5386.

Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD. *Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays*. Science. 2003; 302(5653): 2141-4.

Kelley RK, Venook AP. *Prognostic and predictive markers in stage II colon cancer: is there a role for gene expression profiling?* Clin Colorectal Cancer. 2011; 10(2): 73-80.

Khatter H, Vorländer MK, Müller CW. *RNA polymerase I and III: similar yet unique*. Curr Opin Struct Biol. 2017; 47: 88-94.

Kiss I et al. *Modrá kniha České onkologické společnosti* [online]. 2021, [cit. 2021-10-05]. Dostupné z: 20.pdf (linkos.cz).

Kitchener H, Swart AM, Qian Q, Amos C, Parmar MK. *Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study*. Lancet. 2009; 373(9658): 125-36.

Knijjn N, Mekenkamp LJ, Klomp M, Vink-Börger ME, Tol J, Teerenstra S, Meijer JW, Tebar M, Riemersma S, van Krieken JH, Punt CJ, Nagtegaal ID. *KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients*. Br J Cancer. 2011; 104(6): 1020-6.

Krause U, Ryan DM, Clough BH, Gregory CA. *An unexpected role for a Wnt-inhibitor: Dickkopf-1 triggers a novel cancer survival mechanism through modulation of aldehyde-dehydrogenase-1 activity*. Cell Death Dis. 2014; 5(2): e1093.

Krejčí D, Pehalová L, Talábová A, Pokorová K, Katinová I, Mužík J, Dušek L. *Novotvary 2018. Současné epidemiologické trendy novotvarů v České republice* [online]. 2018, [cit. 2021-25-05]. Dostupné z: uzis.cz.

Kubo N, Araki K, Kuwano H, Shirabe K. *Cancer-associated fibroblasts in hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol. 2016; 22(30): 6841-50.

Kulda V, Svaton M, Mukensnabl P, Hrda K, Dvorak P, Houdek Z, Houfkova K, Vrzakova R, Babuska V, Pesek M, Pesta M. *Predictive relevance of miR-34a, miR-224 and miR-342 in*

patients with advanced squamous cell carcinoma of the lung undergoing palliative chemotherapy. *Oncol Lett.* 2018; 15(1): 592-599.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization.* *EMBO J.* 2002; 21(17): 4663-70.

Lee YS, Dutta A. *MicroRNAs in cancer.* *Annu Rev Pathol.* 2009; 4: 199-227.

Li C, Zheng H, Jia H, Huang D, Gu W, Cai S, Zhu J. *Prognosis of three histological subtypes of colorectal adenocarcinoma: A retrospective analysis of 8005 Chinese patients.* *Cancer Med.* 2019; 8(7): 3411-3419.

Lin HH, Wei NC, Chou TY, Lin CC, Lan YT, Chang SC, Wang HS, Yang SH, Chen WS, Lin TC, Lin JK, Jiang JK. *Building personalized treatment plans for early-stage colorectal cancer patients.* *Oncotarget.* 2017; 8(8): 13805-13817.

Liu CG, Calin GA, Volinia S, Croce CM. *MicroRNA expression profiling using microarrays.* *Nat Protoc.* 2008; 3(4): 563-78.

Liu L, Chai L, Ran J, Yang Y, Zhang L. *BAI1 acts as a tumor suppressor in lung cancer A549 cells by inducing metabolic reprogramming via the SCD1/HMGCR module.* *Carcinogenesis.* 2020; 41(12): 1724-1734.

Lu TX, Rothenberg ME. *MicroRNA.* *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 141(4): 1202-1207.

Lund M, Kjems J. *Defining a 5' splice site by functional selection in the presence and absence of U1 snRNA 5' end.* *RNA.* 2002; 8(2): 166-79.

Lye KL, Nordin N, Vidyadaran S, Thilakavathy K. *Mesenchymal stem cells: From stem cells to sarcomas.* *Cell Biol Int.* 2016; 40(6): 610-8.

Lye KL, Nordin N, Vidyadaran S, Thilakavathy K. *Mesenchymal stem cells: From stem cells to sarcomas.* *Cell Biol Int.* 2016; 40(6): 610-8.

Maheshwari A, Gupta S, Prat J. *A proposal for updating the staging of endometrial cancer.* *Int J Gynaecol Obstet.* 2019; 145(2): 245-252.

Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. *Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer.* *Int J Mol Sci.* 2017; 18(1): 197.

Mertens F, Antonescu CR, Mitelman F. *Gene fusions in soft tissue tumors: Recurrent and overlapping pathogenetic themes.* *Genes Chromosomes Cancer.* 2016; 55(4): 291-310.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL,

Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105(30): 10513-8.

Montagnana M, Benati M, Danese E, Giudici S, Perfranceschi M, Ruzzenenete O, Salvagno GL, Bassi A, Gelati M, Paviati E, Guidi GC, Franchi M, Lippi G. *Aberrant MicroRNA Expression in Patients With Endometrial Cancer*. Int J Gynecol Cancer. 2017; 27(3): 459-466.

Morrow CP, Bundy BN, Kurman RJ, Creasman WT, Heller P, Homesley HD, Graham JE. *Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study*. Gynecol Oncol. 1991; 40(1): 55-65.

Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. *Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma*. J Clin Oncol. 2002; 20(1): 289-96.

Murali R, Soslow RA, Weigelt B. *Classification of endometrial carcinoma: more than two types*. Lancet Oncol. 2014; 15(7): e268-78.

Nikolaou S, Qiu S, Fiorentino F, Rasheed S, Tekkis P, Kontovounisios C. *Systematic review of blood diagnostic markers in colorectal cancer*. Tech Coloproctol. 2018; 22(7): 481-498.

Nilsen TW. *The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell?* Bioessays. 2003; 25(12): 1147-9.

Oda Y, Yamamoto H, Kohashi K, Yamada Y, Iura K, Ishii T, Maekawa A, Bekki H. *Soft tissue sarcomas: From a morphological to a molecular biological approach*. Pathol Int. 2017; 67(9): 435-446.

Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. *The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila*. Cell. 2007; 130(1): 89-100.

Padala SA, Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Mohammed A, Vakiti A, Rawla P, Barsouk A. *Epidemiology of Renal Cell Carcinoma*. World J Oncol. 2020; 11(3): 79-87.

Padgett RA, Konarska MM, Grabowski PJ, Hardy SF, Sharp PA. *Lariat RNA's as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors*. Science. 1984; 225(4665): 898-903.

Pan Q, Wang L, Zhang H, Liang C, Li B. *Identification of a 5-Gene Signature Predicting Progression and Prognosis of Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. Med Sci Monit. 2019; 25: 4401-4413.

Pennacchioli E, Tosti G, Barberis M, De Pas TM, Verrecchia F, Menicanti C, Testori A, Mazzarol G. *Sarcoma spreads primarily through the vascular system: are there biomarkers associated with vascular spread?* Clin Exp Metastasis. 2012; 29(7): 757-73.

- Peychl J, Hatina J, Reischig J, Červinka M. *Relationship between motility and invasiveness of transformed cells – a model of H2-K/V-JUN fibrosarcoma - derived cell lines*. *Klin Onkol*. 2003; 16(5): 223-226.
- Pös O, Biró O, Szemes T, Nagy B. *Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications*. *Eur J Hum Genet*. 2018; 26(7): 937-945.
- Poulet G, Massias J, Taly V. *Liquid Biopsy: General Concepts*. *Acta Cytol*. 2019; 63(6): 449-455.
- Quesada J, Amato R. *The molecular biology of soft-tissue sarcomas and current trends in therapy*. *Sarcoma*. 2012; 2012: 849456.
- Ramanathan A, Wang C, Schreiber SL. *Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(17): 5992-7.
- Reinert T, Schøler LV, Thomsen R, Tobiasen H, Vang S, Nordentoft I, Lamy P, Kannerup AS, Mortensen FV, Stribolt K, Hamilton-Dutoit S, Nielsen HJ, Laurberg S, Pallisgaard N, Pedersen JS, Ørntoft TF, Andersen CL. *Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery*. *Gut*. 2016; 65(4): 625-34.
- Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W. *Tissue-dependent paired expression of miRNAs*. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35(17): 5944-53.
- Rodriguez-Canales J, Parra-Cuentas E, Wistuba II. *Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer*. *Cancer Treat Res*. 2016; 170: 25-46.
- Rösel D, Brábek J, Tolde O, Mierke CT, Zitterbart DP, Raupach C, Bicanová K, Kollmannsberger P, Panková D, Vesely P, Folk P, Fabry B. *Up-regulation of Rho/ROCK signaling in sarcoma cells drives invasion and increased generation of protrusive forces*. *Mol Cancer Res*. 2008; 6(9): 1410-20.
- Sánchez-Herrero E, Provencio M, Atocha R. *Clinical utility of liquid biopsy for the diagnosis and monitoring of EML4-ALK NSCLC patients*. *Adv Lab Med*. 2020; 1(1): 20190019.
- Salibasic M, Pusina S, Bicakcic E, Pasic A, Gavric I, Kulovic E, Rovcanin A, Beslija S. *Colorectal Cancer Surgical Treatment, our Experience*. *Med Arch*. 2019; 73(6): 412-414
- Shenouda SK, Alahari SK. *MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?* *Cancer Metastasis Rev*. 2009; 28(3-4): 369-78.
- Sheth N, Roca X, Hastings ML, Roeder T, Krainer AR, Sachidanandam R. *Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics*. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(14): 3955-67.
- Schink JC, Lurain JR, Wallemark CB, Chmiel JS. *Tumor size in endometrial cancer: a prognostic factor for lymph node metastasis*. *Obstet Gynecol*. 1987; 70(2): 216-9.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell. 2003; 115(2): 199-208.

Simons CC, Hughes LA, Smits KM, Khalid-de Bakker CA, de Bruine AP, Carvalho B, Meijer GA, Schouten LJ, van den Brandt PA, Weijenberg MP, van Engeland M. *A novel classification of colorectal tumors based on microsatellite instability, the CpG island methylator phenotype and chromosomal instability: implications for prognosis*. Ann Oncol. 2013; 24(8): 2048-56.

Skácel Z, Zatloukal P, Aschermanová A, et al. *Terapie nemalobuněčného bronchogenního karcinomu*. s. 127-142. In: Pešek M, ed. Bronchogenní karcinom. Praha: Galén. 2002; 235.

Skubitz KM, D'Adamo DR. *Sarcoma*. Mayo Clin Proc. 2007; 82(11): 1409-32.

Slabý O. *Technologie sekvenování nové generace: celogenomové, celoexonové a cílené – hotspot – sekvenování* [online]. 2019 [cit. 2021-10-06]. Dostupné z: download (prolekare.cz).

Ståhlberg A, Krzyzanowski PM, Egyud M, Filges S, Stein L, Godfrey TE. *Simple multiplexed PCR-based barcoding of DNA for ultrasensitive mutation detection by next-generation sequencing*. Nat Protoc. 2017; 12(4): 664-682.

Stahlhut Espinosa CE, Slack FJ. *The role of microRNAs in cancer*. Yale J Biol Med. 2006; 79(3-4): 131-40.

Škoda J, Neradil J, Veselská R. *Funkční testy pro detekci nádorových kmenových buněk*. Klin Onkol. 2014; 27(Suppl 1): 42-7.

Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. *Non-coding RNAs: regulators of disease*. J Pathol. 2010; 220(2): 126-39.

Taylor BS, Barretina J, Maki RG, Antonescu CR, Singer S, Ladanyi M. *Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets*. Nat Rev Cancer. 2011; 11(8): 541-57.

Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. *Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2016; 25(1): 16-27.

Valasek MA, Repa JJ. *The power of real-time PCR*. Adv Physiol Educ. 2005; 29(3): 151-9.

Valpione S, Gremel G, Mundra P, Middlehurst P, Galvani E, Girotti MR, Lee RJ, Garner G, Dhomen N, Lorigan PC, Marais R. *Plasma total cell-free DNA (cfDNA) is a surrogate biomarker for tumour burden and a prognostic biomarker for survival in metastatic melanoma patients*. Eur J Cancer. 2018; 88: 1-9.

Voss MH, Reising A, Cheng Y, Patel P, Marker M, Kuo F, Chan TA, Choueiri TK, Hsieh JJ, Hakimi AA, Motzer RJ. *Genomically annotated risk model for advanced renal-cell carcinoma: a retrospective cohort study*. Lancet Oncol. 2018; 19(12): 1688-1698.

- Wang Q, Jia Y, Wang Y, Jiang Z, Zhou X, Zhang Z, Nie C, Li J, Yang N, Qu L. *Evolution of cis- and trans-regulatory divergence in the chicken genome between two contrasting breeds analyzed using three tissue types at one-day-old*. BMC Genomics. 2019; 20(1): 933.
- Wang Q, Tu H, Zhu M, Liang D, Ye Y, Chang DW, Long Y, Wu X. *Circulating obesity-driven biomarkers are associated with risk of clear cell renal cell carcinoma: a two-stage, case-control study*. Carcinogenesis. 2019; 40(10): 1191-1197.
- Wille-Jørgensen P, Syk I, Smedh K, Laurberg S, Nielsen DT, Petersen SH, Renehan AG, Horváth-Puhó E, Páhlman L, Sørensen HT; COLOFOL Study Group. *Effect of More vs Less Frequent Follow-up Testing on Overall and Colorectal Cancer-Specific Mortality in Patients With Stage II or III Colorectal Cancer: The COLOFOL Randomized Clinical Trial*. JAMA. 2018; 319(20): 2095-2103.
- Wu W, Sun M, Zou GM, Chen J. *MicroRNA and cancer: Current status and prospective*. Int J Cancer. 2007; 120(5): 953-60.
- Xie Y, Ren Y. *Mechanisms of nuclear mRNA export: A structural perspective*. Traffic. 2019; 20(11): 829-840.
- Yang JS, Lai EC. *Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants*. Mol Cell. 2011; 43(6): 892-903.
- Yu Z, Chen Z, Wu J, Li Z, Wu Y. *Prognostic value of pretreatment serum carbohydrate antigen 19-9 level in patients with colorectal cancer: A meta-analysis*. PLoS One. 2017; 12(11): e0188139.
- Zadražil S. *Ribonukleové kyseliny. Věčně „druhé“ mezi nukleovými kyselinami*. Živa. 2007; 3: 98-100.
- Zhang N, Chen W, Gan Z, Abudurexiti A, Hu X, Sang W. *Identification of biomarkers of clear cell renal cell carcinoma by bioinformatics analysis*. Medicine (Baltimore). 2020; 99(21): e20470.

11 Seznam příloh

Příloha 1

Kulda V, Svaton M, Mukensnabl P, Hrda K, Dvorak P, Houdek Z, **Houfkova K**, Vrzakova R, Babuska V, Pesek M, Pesta M. *Predictive relevance of miR-34a, miR-224 and miR-342 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the lung undergoing palliative chemotherapy.* Oncol Lett. 2018; 15(1): 592-599.

Příloha 2

Vodička J, Vejvodová Š, Pešta M, Mukenšnabl P, Špidlen V, Kulda V, **Houfková K**, Topolčan O. *Can the One-Step Nucleic Acid Amplification method of lymph nodes examination make the staging of pulmonary tumours more precise?* Rozhl Chir. 2018; 97(8): 373-378.

Příloha 3

Vodicka J, Pesta M, Kulda V, **Houfkova K**, Vankova B, Sebek J, Skala M, Fichtl J, Prochazkova K, Topolcan O. *Prognostic Significance of Lymph Node Examination by the OSNA Method in Lung Cancer Patients-Comparison with the Standard Histopathological Procedure.* Cells. 2020; 9(12): 2611.

Příloha 4

Kostūn J, Pešta M, Sláma J, Slunéčko R, Vlasák P, Bouda J, Novotný Z, Topolčan O, Kučera R, Kulda V, **Houfková K**, Berezovskiy D, Bartáková A, Presl J. *One-step nucleic acid amplification vs ultrastaging in the detection of sentinel lymph node metastasis in endometrial cancer patients.* J Surg Oncol. 2019; 119(3): 361-369.

Příloha 5

Pesta M, Kucera R, Topolcan O, Karlikova M, **Houfkova K**, Polivka J, Macanova T, Machova I, Slouka D, Kulda V. *Plasma microRNA Levels Combined with CEA and CA19-9 in the Follow-Up of Colorectal Cancer Patients.* Cancers (Basel). 2019; 11(6): 864.

Příloha 6

Polivka J, Windrichova J, Pesta M, **Houfkova K**, Rezackova H, Macanova T, Vycital O, Kucera R, Slouka D, Topolcan O. *The Level of Preoperative Plasma KRAS Mutations and CEA Predict Survival of Patients Undergoing Surgery for Colorectal Cancer Liver Metastases*. *Cancers* (Basel). 2020; 12(9): 2434.

Příloha 7

Pesta M, Travnicek I, Kulda V, Windrichova J, Rezackova H, Houfkova K, Macanova T, Bendova B, Nestorova A, Hes O, Hora M, Topolcan O, Polivka J. *BAI1 as a prognostic marker of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC)*. Článek byl přijatý pod číslem 13385-P v časopise *Anticancer Research*.

Příloha 8

Houfková K, Hatina J. *Novel Aspects of Genetics, Molecular Biology and Clinical Oncology of Sarcomas*. *Klin Onkol*. 2020; 33(1): 66-78.

Příloha 9

Kripnerová M, Parmar HS, Šána J, Kopková A, Radová L, Sopper S, Biernacki K, Jedlička J, Kohoutová M, Kuncová J, Pechl J, Rudolf E, Červinka M, Houdek Z, Dvořák P, **Houfková K**, Pešta M, Tůma Z, Dolejšová M, Tichánek F, Babuška V, Leba M, Slabý O, Hatina J. *Complex Interplay of Genes Underlies Invasiveness in Fibrosarcoma Progression Model*. *J Clin Med*. 2021; 10(11): 2297.

Příloha 10

Hatina J, Kripnerova M, **Houfkova K**, Pesta M, Kuncova J, Sana J, Slaby O, Rodríguez R. *Sarcoma Stem Cell Heterogeneity*. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1123: 95-118.