

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:

Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:

Molekulární biologie a biochemie organismů



Dominika Karasová

**Volná cirkulující DNA a její potenciál v onkologii**

Circulating cell-free DNA and its potential in oncology

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Školitel: Mgr. Hana Žižková, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení:

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

V Praze, 8. 5. 2016

Podpis

## Poděkování

Mé poděkování patří vedoucí bakalářské práce Mgr. Haně Žižkové, Ph.D. za odborné vedení, zájem, trpělivost, ochotu a čas, které mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

## **Abstrakt**

Volná cirkulující DNA („cell-free DNA“, cfDNA) je typ extracelulární DNA vyskytující se v krvi, která se v klinické praxi využívá v rámci prenatální diagnostiky. Velká pozornost je cfDNA věnována v souvislosti s nádorovými onemocněními, kde se ukazuje její velký potenciál pro využití v onkologii, ve které se nejčastěji využívá volná cirkulující tumorová DNA. Vhodnou alternativou klasické biopsie, která je bezpečnější, méně bolestivá pro pacienta a zachycuje heterogenitu nádoru je tzv. tekutá biopsie, kterou lze volnou cirkulující DNA získat z krve. Ve většině studií se ukazuje, že cfDNA poskytuje stejné informace jako tkáňová DNA, ať už se jedná o genetické či epigenetické změny detekované v nádorových buňkách a v některých případech umožnila citlivější nebo časnější detekci relapsu onemocnění v porovnání s rutinně používanými vyšetřeními. Vysoká specifita i citlivost tohoto neinvazivního přístupu tak mohou být pro pacienty velkým přínosem. Nicméně, pro potvrzení jejího diagnostického a prognostického významu je však třeba rozšířit soubory pacientů s jednotlivými diagnózami a nejen pro porovnání dat i standardizovat metody izolace a detekce cfDNA.

Cílem této práce je získat všeobecný přehled o volné cirkulující DNA a jejím potenciálním využití v onkologii.

**Klíčová slova:** volná cirkulující DNA, volná cirkulující tumorová DNA, tekutá biopsie

## **Abstract**

The circulating free DNA („Cell-free DNA“,cfDNA) is a type of extracellular DNA present in blood, with clinical use in prenatal diagnosis. The cfDNA is given great emphasis in connection with tumor diseases, where there is a great potential for its use in oncology, where free circulating tumor DNA is the most commonly used type. A suitable alternative to classical biopsy, which is safer and less painful for the patient and reflects the heterogeneity of the tumor is called Liquid biopsy, which can be used to obtain free circulating DNA from the blood. Most studies show that cfDNA provides the same information as tissue DNA, regarding both genetic and epigenetic changes detected in tumor cells and in some cases it enabled more sensitive or earlier detection of relapse in comparison with routinely used examinations. The high specificity and sensitivity of this non-invasive approach can be a great benefit to patients. However, to confirm its diagnostic and prognostic significance, it is necessary to expand the group of patients with individual diagnoses and, not only for the purpose of data comparison, standardize methods for the isolation and detection of cfDNA,

The aim of this thesis is to gain a general overview of free circulating DNA and its potential use in oncology.

Keywords: circulating free DNA, circulating tumor DNA, liquid biopsy

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Historie volné cirkulující DNA.....	2
3	Zdroje cfDNA.....	3
3.1	Apoptóza.....	3
3.2	Nekróza.....	4
3.3	Aktivní uvolňování živými buňkami.....	5
4	Obecné aspekty.....	6
4.1	CfDNA v prenatální diagnostice.....	7
4.2	Eliminace cfDNA z krevního oběhu.....	8
5	Onkologie.....	8
5.1	Úvod do onkologie.....	9
5.2	Tekutá biopsie.....	9
5.3	Molekulární aspekty.....	11
5.3.1	Karcinom prsu.....	11
5.3.2	Kolorektální karcinom.....	12
5.3.3	Karcinom plic.....	13
5.4	Volná cirkulující DNA v hematologii.....	15
5.4.1	Volná cirkulující RNA v hematologii.....	16
6	Genometastáze.....	18
7	Izolace cfDNA.....	20
8	Závěr.....	22
9	Seznam použité literatury.....	24

## Seznam zkratek

CEA	Carcinoembryonic antigen	Karcinoembryonální antigen
CfDNA	Circulating cell-free DNA	Volná cirkulující DNA
CML	Chronicmyeloidleukemia	Chronická myeloidní leukemie
CtDNA	Circulating tumor DNA	Volná cirkulující tumorová DNA
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
HL-60	Humanpromyelocytisleukemiacells	Buňky lidské leukemické linie
HL	Hodgkin'slymphoma	Hodgkinův lymfom
LOH	Loss of heterozygosity	Ztráta heterozygosity
MDS	Myelodysplastic syndrome	Myelodysplastický syndrom
MDR	Minimalresidualdisease	Minimální reziduální nemoc
MI	Microsatelliteinstability	Mikrosatelitní nestabilita
MiRNA	MicroRNA	MikroRNA
mRNA	Messenger RNA	Mediátorová RNA
NIPT	Non-invasiveprenataltesting	Neinvazivní prenatální testování
PCR	Polymerasechainreaction	Polymerázová řetězová reakce
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
TKI	Tyrosine kinase inhibitor	Tyrosinkinázový inhibitor

# 1 Úvod

Volná cirkulující DNA („cell-free DNA“, cfDNA) je typ extracelulární DNA nacházející se v krevním oběhu. Přesný mechanismus jejího vzniku není zatím zcela objasněn, ale předpokládá se několik cest, kterými se do oběhu dostává - aktivním uvolňováním živými buňkami, apoptózou či nekrotizací. Detekované množství cfDNA se může lišit u zdravých a nemocných jedinců a také v závislosti na typu a případně i stádiu onemocnění. CfDNA je využívána v prenatalní diagnostice k vyšetření fetálních aneuploidií a genotypizací, avšak stále více prací se věnuje studiu jejího možného využití jako neinvazivní metody v diagnostice a prognóze nádorových onemocnění. Zde by se využívala volná cirkulující tumorová DNA („circulating tumor DNA“, ctDNA), která pochází přímo z nádorových buněk a nese stejné změny jako primární nádor. Zatímco používaná tkáňová biopsie představuje invazivní metodu vyšetření pacienta, analýza cfDNA získána z periferní krve, tzv. tekutá biopsie, představuje alternativu klasické biopsie, která je bezpečnější a méně bolestivá pro pacienta, méně náročná a zachycuje heterogenitu nádoru, kterou nemusí klasická biopsie vždy odhalit. I přes četné překážky, které musejí být překonány, je detekce rakoviny v klinické praxi díky volné cirkulující DNA relativně slibná.

Cílem této práce je získat všeobecný přehled o volné cirkulující DNA a jejím původu, jejím množství detekovaném u zdravých a nemocných jedinců a jejím možném využití zejména v diagnostice vybraných druhů nádorových onemocnění. Nejvíce prostoru je tedy věnováno genetickým a epigenetickým změnám zjištěným na úrovni ctDNA u pacientů s kolorektálním karcinomem, nádorem prsu a plic a hematologickými onemocněními a jejich významu v diagnostice a prognóze pacienta.



## 2 Historie volné cirkulující DNA

Roku 1948 Mandel a Mentais poprvé popsali přítomnost volné cirkulující DNA („cell-free DNA“, cfDNA) v lidské krvi (K. Jung *et al.*, 2010). Následujících několik let nebyla tomuto tématu věnována větší pozornost. Vše se ale změnilo téměř o 20 let později, kdy díky chemické analýze DNA byla u některých pacientů se systémovým lupem erythematosus nalezena cfDNA v krevním séru (Tan *et al.*, 1966). Díky tomuto objevu se cfDNA stala předmětem dalšího zkoumání. Steinman se ve své studii zaměřil na přítomnost cfDNA v plazmě a v séru zdravých lidí. S použitím 4 různých metod pro detekci DNA (s citlivostí až 0,05 µg/ml) detekoval cirkulující DNA v séru, ale nikoliv v plazmě a předpokládal tak, že výskyt DNA v plazmě zdravých dospělých jedinců je patologický jev (Steinman *et al.*, 1975). Tento závěr byl však později vyvrácen s použitím nových citlivějších metod (Suzuki *et al.*, 2008). V roce 1977 se Leon se svými kolegy ve studii zaměřil na přítomnost cfDNA u onkologicky nemocných pacientů. Jejich experimentální data ukázala, že vyšší koncentrace cfDNA se nachází v séru pacientů s rakovinou v porovnání s normálními kontrolami a signifikantně vyšší hladiny pak zjistili u pacientů s metastazujícím onemocněním. Ukázali, že změny hladiny cfDNA mohou vypovídat o zdravotním stavu pacienta, jako např. pokles koncentrace cfDNA po radioterapii. Trvale vysoké hladiny souvisely se špatnou prognózou (Leon *et al.*, 1977). O více jak 10 let později Strounet *al.* (1989) zjistil, že cfDNA u pacientů s onkologickým onemocněním pocházela přímo z nádorových buněk.

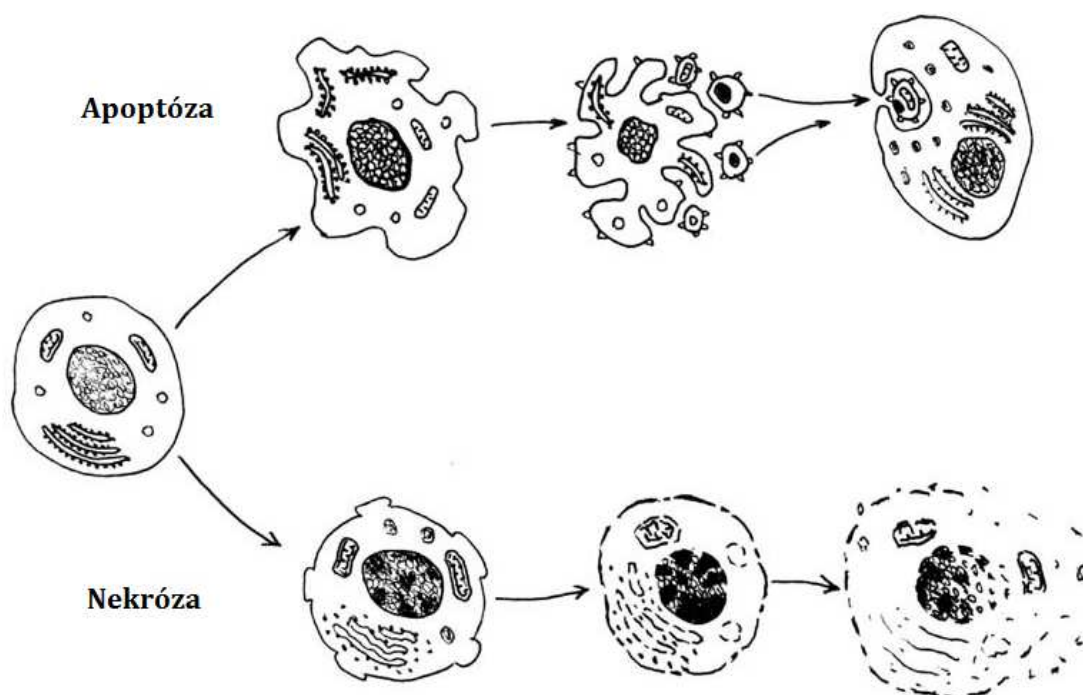
V současné době je již publikována řada prací, které se zabývají studiem volné cirkulující DNA a pozornost se zaměřuje zejména na její využití v prenatální diagnostice, diagnostice nádorových onemocnění a jejím prognostickém významu.

## 3 Zdroje cfDNA

Původ cfDNA není dosud zcela objasněn. Dle publikovaných dat jsou zvažovány 3 možné zdroje, ze kterých cfDNA může pocházet. Prvním z nich je apoptóza (Suzuki *et al.*, 2008), druhým nekróza (Li *et al.*, 2003) a třetím je aktivní uvolňování živými buňkami do krevního oběhu (Stroun *et al.*, 2001).

### 3.1 Apoptóza

Apoptóza je regulovaný mechanismus zajišťující eliminaci poškozených či nepotřebných buněk, kdy dochází ke smrštění buňky, fragmentaci jaderné DNA a rozpadu na apoptická tělíska, která jsou následně makrofágy fagocytózou degradována. Fragmenty DNA vznikající při apoptóze jsou přibližně 180 bp dlouhé (Suzuki *et al.*, 2008), což potvrzuje výsledky dřívějších studií (např. Giacona *et al.*, 1998).

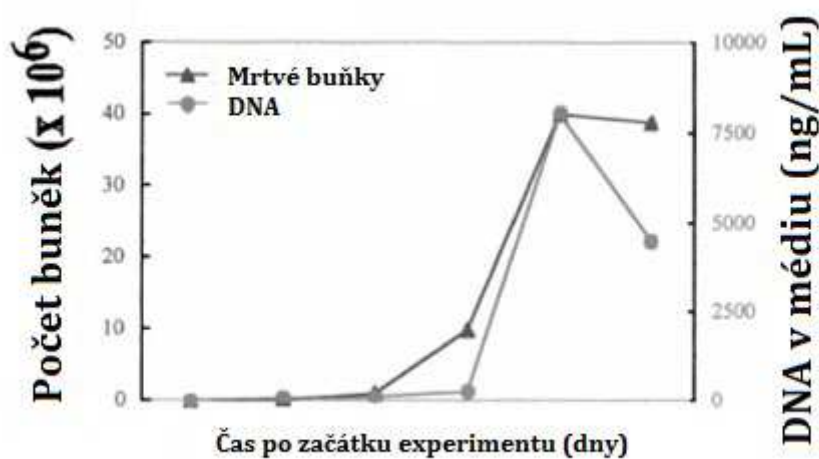


**Obr 1.** Rozdíl mezi apoptózou a nekrózou. Ačkoliv oba mechanismy končí smrtí buňky, apoptóza je regulovaný proces zajišťující eliminaci poškozených či nepotřebných buněk, kdy dochází k rozpadu buňky na apoptická tělíska, zatímco u nekrózy se jedná o patologický proces vyvolaný různými vlivy končící prasknutím buňky a vylitím buněčného obsahu (upraveno dle Meer *et al.*, 2010).

## 3.2 Nekróza

Dalším možným zdrojem cfDNA v oběhu je nekróza. Jedná se o patologický proces vyvolaný mechanickými, chemickými či biologickými vlivy. Na rozdíl od apoptózy dochází k prasknutí cytoplazmatické membrány, narušení rovnováhy vnitřního prostředí buňky a následného vylití buněčného obsahu (Obr. 1).

K nekróze jako ke zdroji cfDNA přispívá také studie, při které během kultivace K-BR3 nádorových buněk prsu došlo k indukci nekrózy, což vedlo k prudkému nárůstu bezbuněčné DNA v médiu (Obr. 2). Po dosažení maxima, množství nekrotických buněk začalo mírně klesat a s nimi i množství bezbuněčné DNA (Li *et al.*, 2003).



**Obr. 2** Důkaz nekrózy jako jednoho ze zdrojů cfDNA na nádorové buněčné linii SK-BR3. U nádorových buněk byla vyvolaná nekróza a s přibývajícím nekrotickými buňkami docházelo i k nárůstu jejich bezbuněčné DNA. (upraveno dle Li *et al.*, 2003).

Jako jeden z indikátorů nekrózy označila Diehlova studie hypoxii. Autoři si také všimli jisté korelace mezi agresivitou nádoru, zvyšující se nekrózou a zvyšující se absolutní koncentrací cfDNA v krevním oběhu. Díky zvyšující se nekróze rostla i smrt nádorových buněk a to mělo za následek celkový nárůst cfDNA nádorové i nenádorové v plazmě pacientů s pokročilými nádory (Diehl *et al.*, 2005).

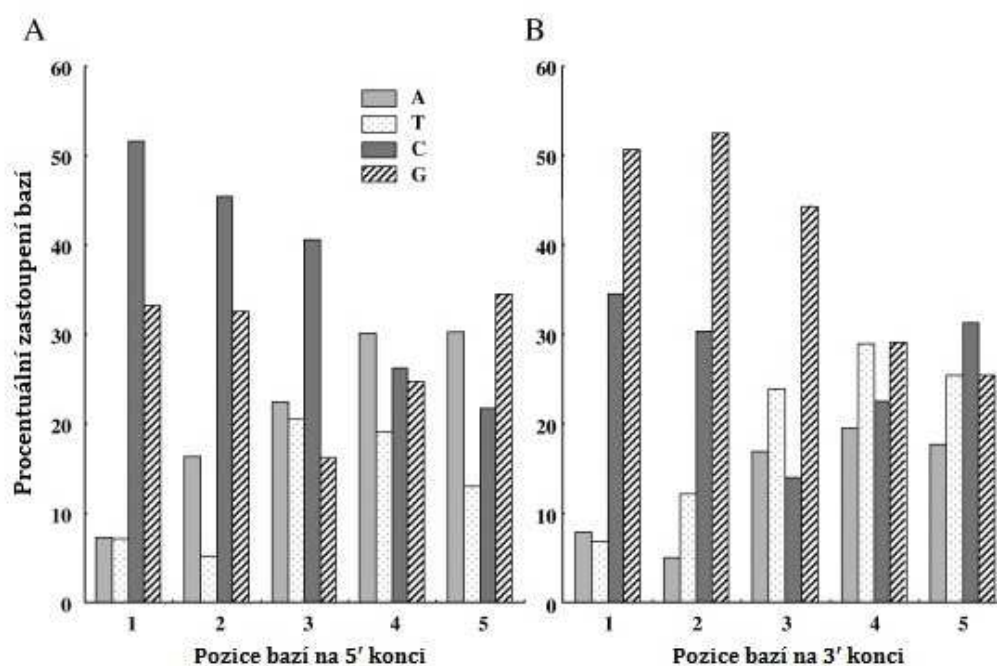
### **3.3 Aktivní uvolňování živými buňkami**

Posledním možným zdrojem cfDNA je její aktivní uvolňování živými buňkami, čemuž přispívá několik studií, které byly provedeny na buněčných liniích, např. na HL - 60 (Stroun *et al.*, 2001a), ale i u zdravých jedinců a onkologicky nemocných pacientů (Stroun *et al.*, 2001b). Jejich výsledkem bylo, že buňky přednostně uvolňují nově nasyntetizovanou DNA v nukleoproteinovém komplexu. Tento způsob uvolňování cfDNA nebyl limitován pouze na rakovinné buňky, jelikož nebyl pozorován významnější rozdíl mezi onkologickými pacienty a zdravými jedinci (Stroun *et al.*, 2001b).

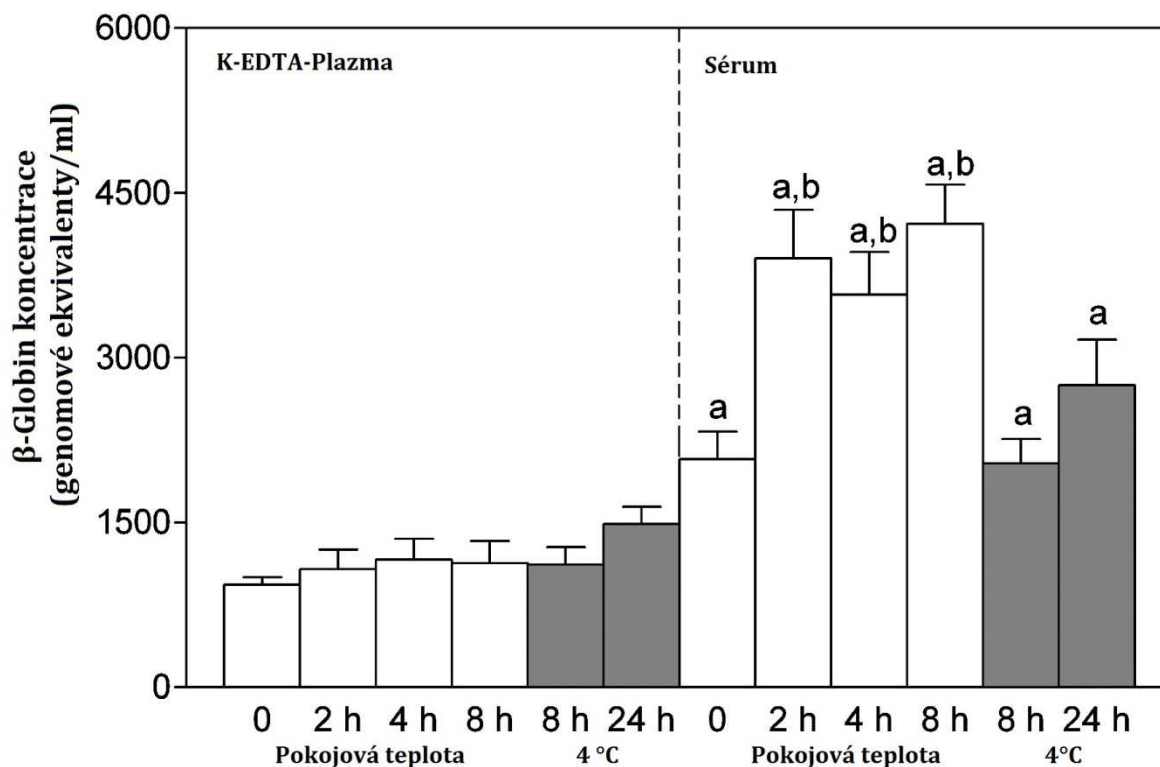
## 4 Obecné aspekty

Volná cirkulující DNA je typ bezbuněčné DNA, která se nalézá v krevním oběhu ve formě fragmentů (Holdenrieder *et al.*, 2005). Největší rozdíl koncentrací cfDNA nalézáme při srovnání zdravých a nemocných osob bez ohledu na pohlaví nebo rasu, kde významnější rozdíl popsán nebyl (Wu *et al.*, 2002). U zdravých jedinců ji můžeme nalézt především na povrchu krevních buněk (Skvortsova *et al.*, 2006). Sekvenační analýzou plazmové cfDNA zdravých jedinců bylo zjištěno, že se jedná o dvouřetězcovou molekulu s výrazným zastoupením CG párů. 5' konec molekuly byl bohatý na cytosin, zatímco 3' na guanin (Obr. 3). Toto zastoupení může být důležité pro stabilitu cfDNA v plazmě (Suzuki *et al.*, 2008).

Při srovnání koncentrace cfDNA v plazmě a séru bylo zjištěno, že nejsou shodné (Holdenrieder *et al.*, 2005). Ačkoli byla v plazmě cfDNA v nižší koncentraci, je stabilnější a proto je i lepším zdrojem pro analýzy (Obr. 4.). V séru byla koncentrace cfDNA výrazně vyšší, ale její stabilita v různých časových intervalech velice kolísala (Jung *et al.*, 2003).



**Obr. 3** Procentuální zastoupení jednotlivých bází na 5' konci plazmové cfDNA (A) a 3' konci (B) u zdravých kontrol. CfDNA byla na 5' konci bohatá na cytosin, zatímco na 3' konci na guanin (A = adenin, T = thymin, C = cytosin, G = guanin) (upraveno dle Suzuki *et al.*, 2008).



**Obr. 4** Koncentrace cfDNA v plazmě a séru v různých časových intervalech od odběru periferní krve uchovávané při pokojové teplotě a při 4 °C. V plazmě byla zjištěna koncentrace nižší, ale výrazně stabilnější oproti séru. Koncentrace byla měřena pomocí amplifikace genu pro  $\beta$ -globin metodou real-time PCR.(upraveno dle Jung *et al.*, 2003).

## 4.1 CfDNA v prenatální diagnostice

U těhotných žen lze v plazmě detekovat i tzv. fetální cirkulující DNApocházející z plodu. CfDNase používá v prenatální diagnostice k vyšetření fetálních aneuploidí a genotypizaci. RhDgenotypizace pomocí cfDNA spolehlivě předpovídá RhD fenotyp plodu z mateřské plazmy (Hromadníková *et al.*, 2007) již 28 týden těhotenství (Finning *et al.*, 1977). U vysoce rizikového těhotenství lze využít cfDNA k vyšetření aneuploidí plodu. Pomocí současných genetických metod jsou laboratoře schopny identifikovat téměř všechny případy nejčastějších trizomií (Downova, Patauova a Edwardsova syndromu) již v desátém týdnu těhotenství s nízkou mírou falešně pozitivních výsledků, což může výrazně snížit počet ostatních invazivních diagnostických postupů (až o 95 %), u kterých může dojít ke ztrátě plodu (Palomaki *et al.*, 2012). Laboratoře zabývající se prenatální

diagnostikou, používají pro toto vyšetření zkratku NIPT (non-invasive prenatal testing) neboli neinvazivní prenatální testování.

## 4.2 Eliminace cfDNA z krevního oběhu

Ke konci těhotenství se v oběhu vyskytují vysoké koncentrace fetálních jaderných buněk a bezbuněčné cfDNA. Odstranění fetální cfDNA můžeme rozdělit do dvou fází. První fáze je rychlá s průměrným poločasem rozpadu přibližně 1 hodinu, zatímco druhá – pomalejší fáze má průměrný poločas rozpadu 13 hodin. Definitivní vymizení fetální cfDNA v maternálním krevním oběhu bylo stanoveno na 1-2 dny. Došlo ke spekulacím, že první fáze eliminace může mít za úkol rychlé odstranění fetální cfDNA z plazmy matky a druhá může probíhat díky destrukci fetálních jaderných buněk pomocí imunitního systému, což způsobuje další uvolňování cfDNA (Yu *et al.*, 2013). Na mechanismu odstranění fetální DNA z plazmy se nepodílejí pouze nukleázy, enzymy štěpící nukleové kyseliny, ale i další orgány či orgánové soustavy (Lo *et al.*, 1999). Takovým orgánem jsou například ledviny (Majer *et al.*, 2007), což potvrzuje i studie zaměřující se na eliminaci fetální DNA u pacientů s preklampsí, která je spojena se zvýšením fetální cfDNA v krvi s poločasem rozpadu až 4x pomalejším v porovnání se zdravými matkami (Lau *et al.*, 2002).

Odstraněním ctDNA z krve se zabývala studie pacientů s karcinomem nosohltanu. Protože virus EBV je přítomen v nádorové tkáni téměř všech pacientů s tímto onemocněním, byla práce To *et al.* (2003) založena na sledování eliminace EBV-DNA z oběhu, která by měla odrážet kinetiku odstranění ctDNA u pacientů. Střední poločas rozpadu EBV-DNA byl stanoven na 139 minut, což ukazuje, že odstranění cirkulujících DNA je velice rychlý proces, jež by měl být dále hlouběji prozkoumán.

Diehlet *al.* dospěl k podobnému výsledku. Pacientům s kolorektálním karcinomem, kteří podstoupili úplnou resekci čili odstranění nádorové tkáně, byla ihned po zákroku a dále v různých časových intervalech odebrána periferní krev a sledován poločas rozpadu plazmové ctDNA. Tento poločas rozpadu byl stanoven na 113 minut (Diehlet *al.*, 2008).

# 5 Onkologie

## 5.1 Úvod do onkologie

U pacientů s karcinomy můžeme v krevním oběhu nalézt dva různé zdroje nádorově specifické DNA, které mohou být neinvazivně hodnoceny. Prvním je volná cirkulující tumorová DNA („circulating tumor DNA“, ctDNA) a druhým cirkulující nádorové buňky („circulating tumor cells“, CTCs). Jejich testováním byla v mnoha případech ve stejném vzorku ctDNA detekována, zatímco CTCs nikoliv.

Z většiny studií, vyplývá, že koncentrace cfDNA je u pacientů s pokročilými onkologickými onemocněními podstatně vyšší, než u zdravých kontrol (Wu *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2007; Bettegowda *et al.*, 2014). Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u rakoviny prostaty a prsu (Wu *et al.*, 2002). Dále byla prokázána negativní korelace mezi vysokou hodnotou cfDNA a délkou přežití pacientů (Perkins *et al.*, 2012). U pacientů s karcinomem prostaty, tlustého střeva a vaječníků byla pozorována vysoká koncentrace cfDNA i při nízkých koncentracích nádorových markerů, které jsou běžně používány v klinické praxi (Wu *et al.*, 2002).

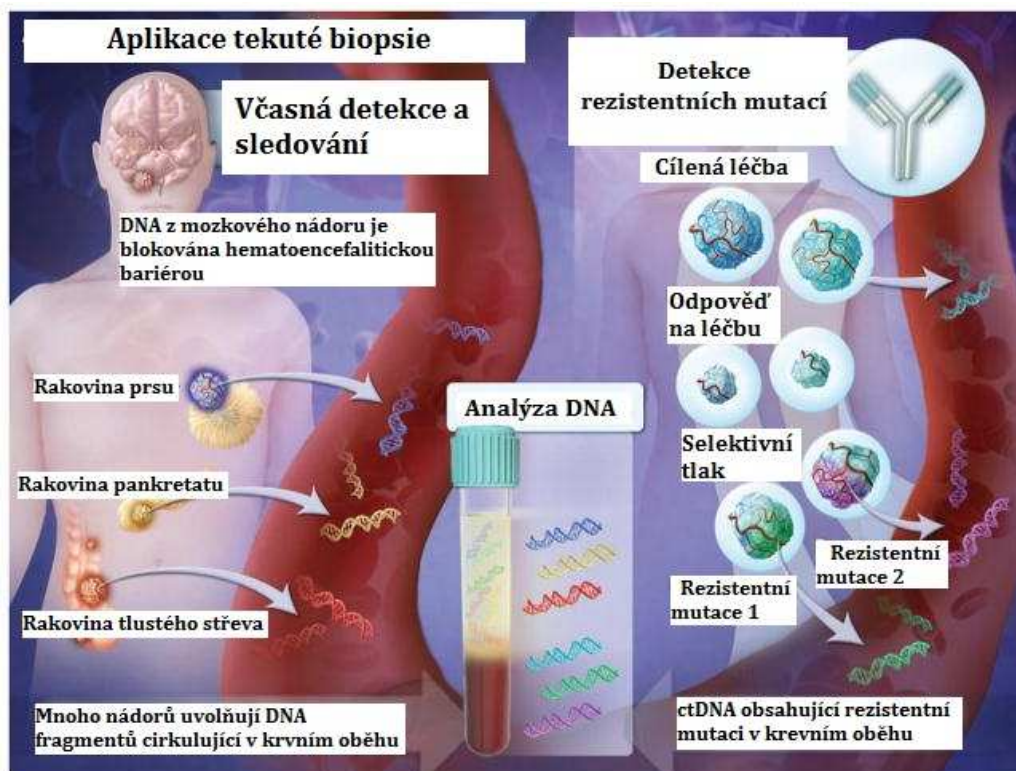
Neustále se rozvíjející molekulární diagnostika v kombinaci se standardními testy je dobrým základem pro sestavení nejvhodnější léčby (Mirnezami *et al.*, 2012). Testování cfDNA s sebou přináší řadu výhod, jako je například cena, rychlost, relativní jednoduchost vůči ostatním metodám a je přijatelnější pro pacienta. V posledních letech se zvyšuje úsilí používat cfDNA jako standardní biomarker (Perkins *et al.*, 2012). I přes četné překážky, které musejí být překonány, je detekce rakoviny v klinické praxi díky analýze volné cirkulující DNA relativně slibná (Bettegowda *et al.*, 2014).

## 5.2 Tekutá biopsie

Biopsií označujeme odběr tkáně z živého organismu, která se dále zkoumá histologickým vyšetřením pod mikroskopem, aby mohlo být stanoveno, zda se jedná o maligní či benigní tkáň a případně typ a stádium nádoru. Biopsie může být provedena různými způsoby v závislosti na odebírané tkáni. Odběr vzorků může být proveden stěrem pomocí kartáčku, klíšťkami, dutou jehlou nebo při chirurgickém zákroku. Délka samotného odběru a případná hospitalizace je individuální v závislosti na uložení



ložiska. Klasickou biopsii však nelze vždy provést a v těchto případech se jako vhodná alternativa jeví tzv. tekutá biopsie („liquidbiopsy“). Tekutá biopsie představuje neinvazivní vyšetření nádorových složek vyskytujících se v krevním oběhu (Obr. 5). Oproti biopsii klasické má tekutá biopsie určité výhody – je méně bolestivá a představuje pro pacienta menší riziko, je rychlá a díky své citlivosti a specifitě může být použita pro identifikaci molekulárních změn, které jsou zodpovědné za onemocnění pacientů. Ani tekutou biopsii však nelze použít vždy, protože např. ctDNA z mozkového nádoru byla jen zřídka zjistitelná díky hematoencefalitické bariéře, která blokuje průchod cfDNA do krve (Bettegowda *et al.*, 2014).



**Obr. 5** Aplikace tekuté biopsie, kdy je z periferní krve detekována ctDNA, která nese stejné změny na molekulární úrovni jako primární i metastazující nádor, ze kterých je odvozená. Tekutá biopsie se dá aplikovat i při detekci rezistentních mutací, avšak není vhodná pro detekci ctDNA z mozkového nádoru. Důvodem je hematoencefalitická bariéra blokující průchod bezbuněčné DNA do krve (Upraveno dle Bettegowda *et al.*, 2014).

Dalším úskalím klasické biopsie je, že nemusí zachytit heterogenitu nádoru (Dawson *et al.*, 2013). Každý nádor se může skládat z více buněčných subpopulací, které se mohou v genetických změnách lišit. Díky analýze ctDNA z krve mohou být zjistitelné genetické změny jak u primárního, tak u metastazujícího karcinomu. Při biopsii je množství nádorové DNA většinou omezeno, a proto je důležité klást důraz na správnou manipulaci se vzorkem. Špatná manipulace může mít vliv na integritu DNA, která pak nemusí být vhodná pro další analýzu.) Autoři se domnívají, že ctDNA získaná z periferní krve pacientů s rakovinou má velký potenciál nahradit klasickou biopsii a být vhodným biomarkerem pro diagnostiku mutací (Kuo *et al.*, 2014).

## 5.3 Molekulární aspekty

I když se kvantifikace cfDNA zdá být dobrým markerem k rozlišení zdravých a onkologicky nemocných pacientů (Sozzi *et al.*, 2001), tak pouze stanovení jejího množství nemůže být rozhodující. Důvodem je, že dochází k překrývání výsledků těchto skupin. Navíc vysokou hodnotu cfDNA nevykazuje pouze onkologické onemocnění, ale také například trauma (Lo *et al.*, 2000), mrtvice (Rainer *et al.*, 2003), či infarkt (Chang *et al.*, 2003). Aplikace molekulárně-biologických technik nám umožňuje identifikovat genetické změny v nádorech, jako jsou chromozomové abnormality, alelické ztráty, mikrosatelitní nestabilita („microsatellite instability“, MI), které byly objeveny v genetické informaci nádorových buněk (Chen *et al.*, 1999). V tomto má veliký potenciál diagnostika ctDNA nesoucí stejné genetické změny jako primární nádor (Gautschi *et al.*, 2007).

Dále uváděné studie se věnovaly možnému použití ctDNA v nádorové diagnostice a zpravidla porovnávaly detekované genomové změny u určitého typu rakoviny, buď jen na úrovni cirkulující tumorové DNA z krve nebo ctDNA v porovnání s tumorovou DNA z tkáně, která byla vyjádřena jako specifita pro daný znak.

### 5.3.1 Karcinom prsu

Mutace, methylace, mikrosatelitní nestabilita a ztráta heterozygoty („loss of heterozygosity“, LOH) jsou nejčastější změny na úrovni DNA spojené s karcinomem prsu.

Např. methylace promotorových oblastí genů *RARβ2*, *GSTP1*, *Rassf1A* u ctDNA vykazovala specifitu více jak 85 % a genu *APC* 75 %. Vyšší úroveň methylace byla diagnostikována u starších žen a žen, které procházejí menopauzou (Hoque *et al.*, 2006). Další studie se zabývala methylací promotoru genů *TMS1*, *BRCA1*, *ERα* a *PRBa* zjistila, že u 64 % pacientů byl aspoň jeden z genů methylován a shoda diagnostiky ctDNA a nádorové DNA byla 88 %. Prsní tkáň u zdravých žen i jejich cfDNA nevykazovala žádnou změnu v těchto genech (Mirza *et al.*, 2007).

Další prognostický význam jak u nádorové DNA, tak i plazmové ctDNA se ukázal u mutace genu *p53*, jejíž výskyt signifikantně koreloval s přítomností metastáze, stádiem onemocnění a velikostí nádoru. Pacientky s touto mutací měly kratší celkové přežití v porovnání s pacientkami, u kterých mutace detekována nebyla. Zajímavé bylo i testování přítomnosti mutace týden po odstranění nádorové tkáně u žen pozitivních na mutaci genu *p53*. Mutace v genu byla detekována pouze u 1 ze 30 pacientek, které byla později diagnostikována metastáze v játrech. Analýza plazmové ctDNA se jeví jako vhodný prognostický marker onemocnění i marker využitelný pro sledování stavu pacienta nesoucí mutaci v genu *p53* v průběhu onemocnění (Shao *et al.*, 2001).

Další častou mutací u karcinomu prsu je mutace genu *PIK3CA*, která je nejčastěji detekována v exonu 9 a 20. Tato mutace detekována v ctDNA se 100% shodovala s analýzou DNA nádorové tkáně u pacientů s metastazujícím onemocněním (Higgins *et al.*, 2012), avšak dosud nebyla spojena se stádiem rakoviny, přítomnosti metastáze v uzlinách či stavu estrogenových receptorů (Campbell *et al.*, 2004).

Další změnou pozorovanou u karcinomu prsu na úrovni DNA je ztráta heterozygoty a mikrosatelitní nestabilita. Detekce těchto změn byla z ctDNA dobře proveditelná, nebyla však pozorována žádná shoda mezi LOH či MI a progresí onemocnění či výskytem metastáz. Frekvence genetických změn byly navíc příliš nízké pro klinické využití (Shaw *et al.*, 2000).

### 5.3.2 Kolorektální karcinom

Za nejčastější změny na úrovni DNA u pacientů s kolorektálním karcinomem („colorectalcarcinoma“, CRC) jsou považovány mutace a metylace.

Somatické mutace se často vyskytují v genech *APC*, *K-ras*, *p53* (Wang *et al.*, 2004) a *PIK3CA* či *BRAF* (Rainer *et al.*, 2003; A. Li *et al.*, 2015). Nejčastější mutací je mutace nalézána v *K-ras* genu. Před zahájením cílené biologické léčby u pacientů s CRC je proto nutné vyšetřit tento gen, jelikož jeho mutace způsobuje rezistenci proti anti-EGFR monoklonálním protilátkám (Kuo *et al.*, 2014). *K-ras* mutace jsou spojovány se špatnou prognózou (Spindler *et al.*, 2012) a kratší dobou přežití nemocných (Li *et al.*, 2015). Mutace v *APC* genu a *K-ras* genu mají za následek časný rozvoj CRC, zatímco mutace v *p53* genu je spojena s relativně pozdní tumorogenezí CRC (Wang *et al.*, 2004). U několika pacientů byla detekována mutace v periferní krvi, zatímco v buňkách primárního nádoru nikoli (Heitzer *et al.*, 2013; Lise *et al.*, 2015). Většina mutací nalezených v primárním nádoru byla detekována i v periferní krvi (Wang *et al.*, 2004), kdy nejlepší shodu vidíme u mutace v *K-ras* genu bylo dosaženo vysoké specifity 85 % (Spindler *et al.*, 2015) a 78 % (Spindler *et al.*, 2012). Díky tomu je analýza této mutace z krevní plazmy použitelnou alternativou k běžnému vyšetření. U pacientů s CRC, kteří podstoupili operaci a hladiny ctDNA měli zjistitelné i po zákroku, došlo do roka k relapsu onemocnění. Vše naznačuje tomu, že ctDNA se zdá být mnohem citlivější a spolehlivější než standardně používaný biomarker CEA (karcinoembryonální antigen) (Diehlet *et al.*, 2010).

Další častou změnou na molekulární úrovni u pacientů s CRC jsou methylace promotorových oblastí genů *TMEFF2*, *NGFR* či *SEPT9* (Lofton-day *et al.*, 2008). Methylace promotoru *SEPT9* vykazuje významnou korelaci s přítomností CRC u pacientů (Grutzmann *et al.*, 2008) a mnohem vyšší úroveň methylace než ostatní geny. Proto se methylace *SEPT9* promotoru ctDNA stává vhodným kandidátem markeru pro včasnou detekci kolorektálního karcinomu (DeVos *et al.*, 2009).

### 5.3.3 Karcinom plic

Nejčastěji pozorované změny na molekulární úrovni u pacientů s karcinomem plic jsou mutace (Dowler *et al.*, 2013), methylace (Ponomaryova *et al.*, 2013) a mikrosatelitní nestabilita (Gonzalez *et al.*, 2000).

U pacientů s mutací v *K-ras* genu dochází k rozporupným výsledkům, co se týče souladu špatné prognózy a této mutace. Studie Gautschi *et al.* (2007) se účastnilo 180 pacientů, jejichž závěrem bylo, že doba přežití pacientů s mutací v *K-ras* genu byla výrazně kratší ve srovnání s pacienty bez mutace. Tento závěr však nepotvrdila studie

provedena o tři roky později, které se účastnilo 308 pacientů. Na rozdíl od dřívějších studií jejich data nenaznačovala špatnou prognózu pro pacienty s *K-ras* mutací. Tento rozpor přisuzovali omezenému počtu případů, které byly analyzovány (Camps *et al.*, 2011). Roku 2013 vychází další velká studie, které se účastnilo 246 pacientů, jejímž závěrem byla špatná prognóza u této mutace (Dowler *et al.*, 2013). Studie se však shodují na tom, že mutace v *K-ras* genu lze spolehlivě detekovat analýzou ctDNA. Charakteristiky pacientů jako je věk, pohlaví, stupeň rakoviny či kouření neprokázaly spojitost s výskytem mutace v *K-ras* genu (Camps *et al.*, 2011). Další často pozorovanou mutací u karcinomu plic je mutace v genu *EGFR*, nejčastěji v exonech 19, 20, 21, 25 či 26, která se častěji vyskytuje u žen a nekuřáků. Další charakteristiky, jako je věk či stupeň onemocnění, nesouvisely s výskytem této mutace (Bai *et al.*, 2009). U pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic a mutací v *EGFR* genu byl detekován pokles ctDNA při pozitivní odpovědi na léčbu tyrosinkinázovými inhibitory (tyrosine-kinase inhibitor, TKI) (Yung *et al.*, 2009) a konkrétně u inhibitoru Gefitinibu, byla pozorována delší doba přežití u pacientů s mutací detekované v ctDNA v porovnání s těmi bez mutace (Bai *et al.*, 2009). Pro vysokou citlivost a specifitu je plazmová detekce mutované sekvence *EGFR* vhodná pro sledování progresu onemocnění a včasné odhalení rezistence na léčbu TKI (Yung *et al.*, 2009).

Další z mnoha studií se zaměřila na sledování hladiny methylace genů *MGMT*, *p16INK4a*, *RassF1A*, *DAPK*, *RAR-b*. U 50,9 % pacientů s rakovinou plic byl identifikován aspoň jeden methylovaný gen z této pětičky, zatímco pouze 11,3 % bylo pozitivních na proteinové nádorové markery. Z těchto výsledků vyplývá, že včasná diagnostika methylovaných genů by mohla dříve odhalit začínající rakovinu plic (Fujiwara *et al.*, 2005).

Vysokou úroveň methylace promotorové oblasti i genu *RARβ2* u pacientů s karcinomem plic v porovnání se zdravými lidmi pozorovali i Ponomaryova *et al.* (2013). Domnívali se, že pro vyšší citlivost je ale vhodnější použít kombinaci alespoň dvou genů pro odlišení zdravých od nemocných s nízkou mírou falešně pozitivních i negativních výsledků. Jako druhým vhodným genem, který vykazuje u této nemoci vysokou úroveň methylace, označili *RassF1A*.

Dalším genem, u kterého je nalézána vysoká úroveň methylace promotoru, je tumorsupresorový gen *SEPT9*. V studii Krawczyk *et al.* (2014) detekovali metylaci genu

*SEPT9* v ctDNA u pacientů v druhém, třetím a čtvrtém stadiu rakoviny plic, zatímco u prvního stádia tato methylace detekována nebyla. Možnost detekce se může tedy odvíjet od agresivity nádoru. Posouzení methylace tohoto genu analýzou ctDNA může být užitečné při detekci specifického subtypu a může odrážet stádium onemocnění a agresivitu nádoru.

## 5.4 Volná cirkulující DNA v hematologii

I když většina studií se věnuje volné cirkulující DNA a solidním nádorům, jsou publikovány i práce zaměřující se na využití cfDNA v hematologii. Nádorové onemocnění lymfatického systému lze souhrnně označit jako lymfom. V závislosti na poddruhu lymfomu se hladiny cfDNA liší. U difúzního B-velkobuněčného lymfomu, Non-Hodgkinova lymfomu, lymfomu z plášťových buněk a Hodgkinova lymfomu (Hodgkinlymphoma, HL) byla koncentrace cfDNA zvýšená, zatímco u Folikulárního lymfomu byla srovnatelná se zdravými kontrolami. U pacientů s anaplastickýmvelkobuněčným

T-lymfomem („anaplasticlarge cell lymphoma“, ALCL) byla koncentrace také zvýšená a byla spojena s věkem a stupněm ALCL. Vysoké hodnotycfDNA u pacientů s Hodgkinovým lymfomem se shodovaly se špatnou prognózou. A zde má cfDNAnejvětší potenciál diagnostického markeru. U většiny lymfomů ale citlivost a specifita nepřekročila 75 %, takže je spíše nepravděpodobné, že by cfDNA byla vhodná pro diagnostiku (Martini *et al.*, 2009).

Podobné výsledky podala i studie lymfomu u pediatrických pacientů. U dětí s Hodgkinovým lymfomem hladina cfDNA korelovala s věkem a u ALCL se stupněm onemocnění. Vyšší hladiny byly pozorovány také u pacientů s Burkittovým lymfomem. Dle dosažených jejich výsledků může koncentrace plazmové DNA sloužit jako prognostický marker u dětských pacientů s Hodgkinovým lymfomem (Mussolin *et al.*, 2013).

Studie Gao *et al.* (2010) se zaměřila na volnou cirkulující DNA u pacientů s akutní myeloidní a akutní lymfatickou leukémií. Zabýval se nejen stanovením a pozorováním koncentrací cfDNA, ale také sledováním její integrity a právě změny v integritě plazmové DNA označil jako možný biomarker pro sledování minimální reziduální nemoci

(minimalresidualdisease,MRD), která zaujímá důležitou roli při posouzení odpovědi na léčbu a včasné odhalení recidivy u akutní leukémie.

U pacientů s akutní myeloidní leukémií je často detekována mutace v genu pro nukleofosmin, která je využitelná pro sledování MRD. Nárůst exprese mutovaného genu signalizuje progresi onemocnění. Mutovaný gen byl v plazmové DNA detekován u 37 pacientů, zatímco v periferní krvi u 35 pacientů a hladina jeho exprese souvisela s počtem blastů v kostí dřeni. Analýza cfDNA může sloužit jako doplňkové vyšetření k rutinně prováděným (Quanet *et al.*, 2015).

U dětí s akutní lymfoblastovou leukémií ukázala kvantifikace plazmové DNA zvýšenou hladinu při zjištění onemocnění a následný pokles po zahájení léčby. I přes nízkou koncentraci plazmové DNA ji bylo možné využít pro sledování MRD. Neznamená však větší přínos pro standardně využívané vyšetření periferní krve či kostní dřene (Schwarz *et al.*, 2009).

Vyšetření chimerizmu je nedílnou součástí monitorování pacientů s hematologickými malignitami, kteří podstoupili alogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk. V ideálním případě je po transplantaci u pacienta detekována pouze krvetvorba/genotyp dárce (= 100% dárcovský chimerizmus) a detekce smíšeného chimerizmu, tj. přítomnosti původní krvetvorby pacienta, může znamenat možný relaps onemocnění. Analýzou informativních lokusů získaných porovnáním genotypů vybraných SRT (short tandem repeats, krátké tandemové repetice) lokusů pacienta a jeho dárce v polymorfonukleárech, lymfocytech a cfDNA zjistili, že u části pacientů byla detekována pouze buněčná DNA dárce, zatímco cfDNA ukázala smíšený chimerizmus. U poloviny z těchto pacientů došlo k relapsu onemocnění. Posttransplantační monitorování pacientů pomocí analýzy cfDNA může přispět k časnější detekci začínajícího relapsu (Aljurf *et al.*, 2016)

#### **5.4.1 Volná cirkulující RNA v hematologii**

Studie týkající se hematologických malignit se nezaměřují pouze na cfDNA, ale i na volnou cirkulující RNA – mediátorová RNA („messenger RNA“, mRNA) či mikroRNA („microRNA“, miRNA).

MiRNA jsou nekódující řetězce RNA podílející se na regulaci genové exprese. Exprese specifických miRNA byla u pacientů s akutní myeloidní leukémií různá v porovnání se zdravými jedinci a mohla by být využívána jako prediktivní marker odpovědi na léčbu a jako terapeutický cíl (Ciccone and Calin, 2015).

Jiná studie se zaměřila na identifikaci plazmových miRNA využitelných pro klasifikaci a stratifikaci rizika pacientů s myelodysplastickým syndromem (myelodysplastic syndrome, MDS), identifikovala a ověřila řadu plazmových miRNA. Zjistili, že exprese stejných vzorů miRNA odlišovaly nejen zdravé lidi od nemocných, ale i pacienty s dobrou a špatnou prognózou. Výsledky naznačují, že hladiny exprese miR144 a miR451 byly trvale nízké u lidí bez onemocnění a spojené s lepší prognózou u pacientů s MDS a izolovanou delecí (20q). Oproti tomu pacienti s MDS a izolovanou delecí (7q/7) a vysokou hladinou exprese miR144 a miR451 byli spojováni s prognózou špatnou. MiRNA se zdá být vhodným markerem pro diagnostiku a sledování pacientů s MDS (Zuo *et al.*, 2015).

Maet *al.*, (2006) se zabýval studiem detekce mutace v kinázové doméně BCR-ABL genu ve volné mRNA u pacientů rezistentních na léčbu imatinibem. Detekce těchto mutací je většinou prováděna ze vzorků periferní krve. Porovnáním výsledků zjištěných v periferní krvi, kostní dřeni a volné RNA, se ukázala vhodnost plazmové RNA pro toto vyšetření i proto, že její analýzou byly detekovány mutace v periferní krvi či kostní dřeni nezjistitelné. Použití mRNA pro detekci BCR-ABL mutace je vhodnou alternativou k těmto dosud běžně používaným zdrojům.

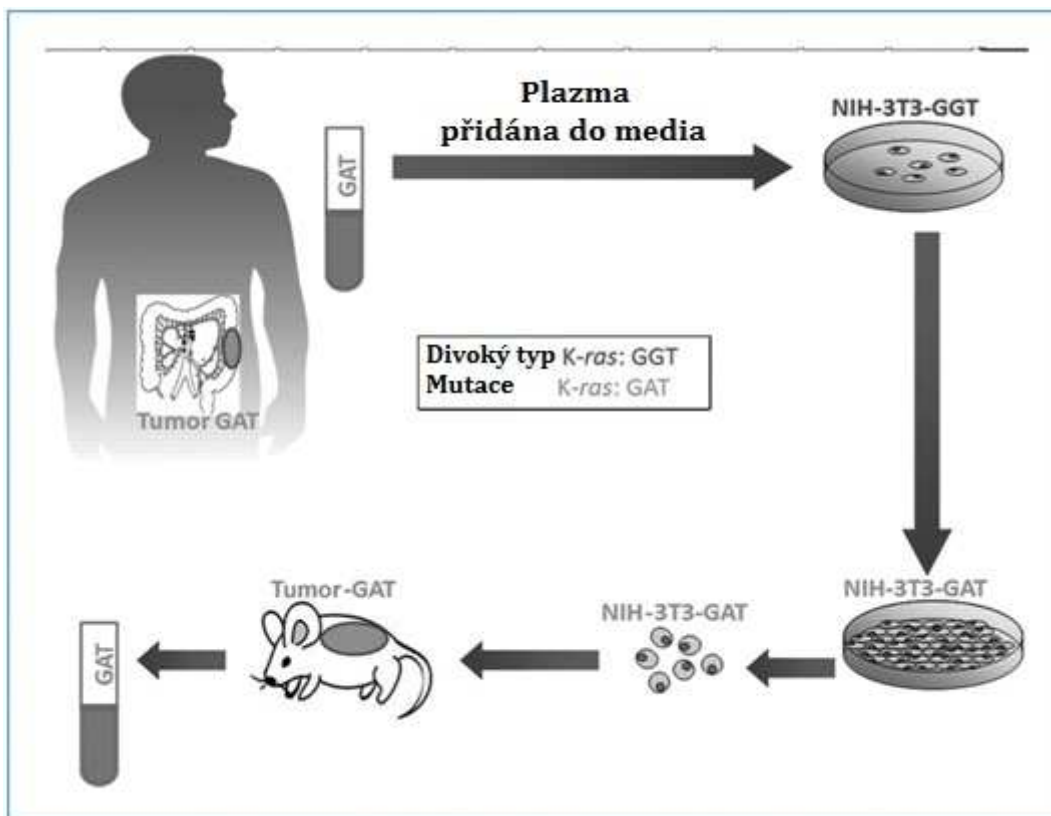


## 6 Genometastáze

Teorie genometastáze přišla se zajímavou myšlenkou, zda ctDNA má onkogenní schopnost a může se účastnit metastází. Garcia-Olmo *et al.* (2010) provedl experiment, kdy pacientům s kolorektálním karcinomem a mutací v *K-ras* genu byla odebrána plazma a následně přidána k NIH-3T3 buňkám. Brzy na to byla v buněčné linii detekována tato lidská *K-ras* mutace. Takto infikované buňky byly injekčně vpraveny do myši, u kterých se následně objevily tumory plic a jater s *K-ras* sekvencí (Obr. 6). Závěrem bylo, že plazma pacientů s rakovinou může vyvolat změny u buněk na molekulární úrovni díky genovému přenosu a následně vyvolat onkogenní transformaci.

Výsledky potvrzuje i jejich následující studie, která měla stejný průběh i stejné výsledky, ale byla obohacena o monitorování pacientů po odstranění nádoru. Dva roky po odstranění primárního ložiska nádorové tkáně se stejným pacientům, kteří se po klinické stránce zdáli být v pořádku, odebrala plazma a provedl se stejný experiment. Zajímavým výsledkem bylo, že i po dvou letech byla u poloviny skupiny detekována mutace v *K-ras* genu, která byla schopna transformovat buněčnou linii a následně vytvořit nádory u myši, což ukazuje na skutečnost, že plazma je schopna udržovat onkogenní schopnost ctDNA i po odstranění primárního nádoru (García-Olmo *et al.*, 2012).

Závěrem teorie genometastázy bylo, že rakovinné buňky uvolňují do oběhu ctDNA, která se může podílet na transformaci, tumorogenezi a také na indukci progresu rakoviny díky horizontálnímu přenosu. Naopak v případě, kdy se z plazmy odstranila veškerá DNA, tak k buněčné transformaci a vzniku nádoru nedošlo (Trejo-Becerril *et al.*, 2012).



**Obr. 6** Schéma znázorňující přidání lidské plazmy s *K-ras* mutací k buněčné linii NIH-3T3, u níž plazma indukovala stejnou mutací. Tyto buňky pak byly schopny následně indukovat tumorogenezi u myši, která vykazovala stejnou lidskou mutaci v *K-ras* genu (upraveno dle García-Olmo *etal.*, 2010).

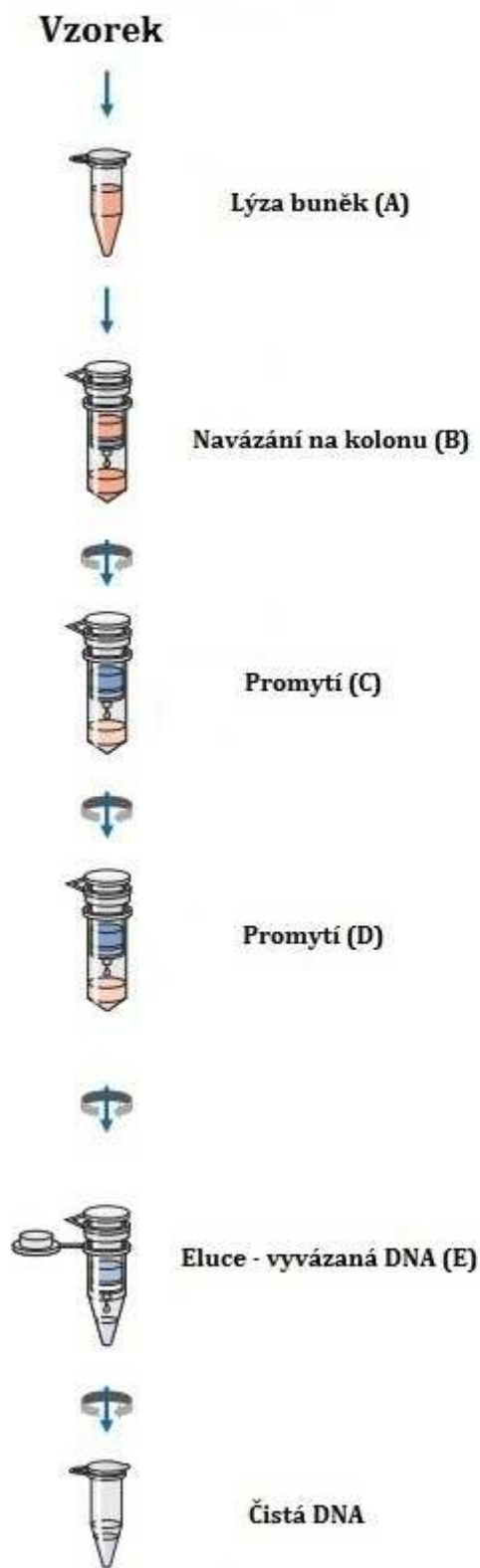
## 7 Izolace cfDNA

V dnešní době je izolace DNA nejčastěji založená na kolonkových metodách. Na trhu se nachází několik komerčně dostupných kitů, jejichž principem je extrakce na pevné fázi, kdy roztok prochází přes kolonku pomocí centrifugace, čímž izolovaná DNA zůstává v kolonce. Dle dosavadních studií vyplývá, že nejčastěji používanýmikomerčními kity jsou QIAamp DNA Mini a QIAampBloodMini Kits od firmy QIAGEN, které poskytují jednoduché a rychlé metody k purifikaci DNA, vhodné pro použití v metodách založených na PCR či Southernblottingu. DNA může být extrahována ze široké škály zdrojů, jako je krev, plazma, sérum, kostní dřeň, stolice, lymfocyty, kultivované buňky a forenzní vzorky. Krev může být čerstvá či zmražená a ošetřená protisrážlivými činidly, např. citrátem, heparinem nebo EDTA.

Principem této metody je navázání DNA na silikagelovou membránu během krátkého odstředění. Přidanýlyzát zajišťuje, že bílkoviny a jiné nečistoty, které mohou inhibovat další enzymatické reakce a PCR, se na membránu nenavážou. Navázaná DNA na membráně se promyje ve 2 centrifugačních krocích s přidáním pufrů, kvůli úplnému odstranění možných kontaminujících látek. Purifikovaná DNA se eluuje z kolony v koncentrované formě v pufru nebo vodě (dle manuálu kituQIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, 2015, 4. Vydání; Obr. 7)

I když k purifikaci DNA touto metodou jsou vhodné různé zdroje, nejčastěji byla používána plazma, která se získávala obdobnými způsoby.

Periferní krev byla odebrána do zkumavek s EDTA, kdy v horizontu několika hodin (1-6h) byla zpracována. Plazma byla získána centrifugací v rozmezí 1500-3000g po dobu 10-20 minut. Po dalším stočení byla směs rozdělena do zkumavek a skladována při -70 až -80 stupních Celsia. Samotná izolace cfDNA byla provedena z plazmy použitím nejčastěji QIAamp DNA Blood Mini Kitu(Camps *et al.*, 2011; Thierry *et al.*, 2010; Gautschi *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010; Hosny *et al.*, 2009)



Obr. 7Příklad izolace DNA pomocí kolony:

Do mikrocentrifugačních zkumavek se přidá QIAGEN proteáza (nebo proteináza K), ke které se přidá plazma a AL pufr (A). Po 10 minutách inkubace se ke směsi přidá 96-100% etanol a následuje centrifugace (B). Obsah zkumavky se přenesse na kolony QIAamp Mini se sběrnou tubou z kitu. Po centrifugaci následujepromytí AW1 pufr (C), stočení a přenesení na čistou sběrnou zkumavku. Tento proces se opakuje s přidáním AW2 pufru (D). Nakonec se ke kolonám přidá AE pufr či destilovaná voda, následuje inkubace při pokojové teplotě a eluce DNA centrifugací (E). (upraveno dle manuálu kituQIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, 2015, 4. vydání)

## 8 Závěr

Ačkoliv volná cirkulující DNA byla poprvé popsána v krevním oběhu už v roce 1948, další pozornosti se jí dostalo až téměř o 30 let později a postupem času společně s novými poznatky se její studium stalo intenzivnější. cfDNA je typ extracelulární DNA, která se vyskytuje v krvi ve formě fragmentů a její množství se v séru a plazmě liší.

Ačkoli je v plazmě cfDNA v nižší koncentraci, je stabilnější a proto je lepším zdrojem pro analýzy. Původ i odstranění cfDNA z oběhu není zatím zcela objasněn, avšak jsou navrženy 3 možné zdroje původu. U zdravých buněk to je apoptóza, u rakovinných nekróza a u obou bylo pozorováno aktivní uvolňování živými buňkami cfDNA do krevního oběhu. U eliminace se předpokládá, že se na ní podílejí i různé orgány, jako například ledviny. Poločas rozpadu cfDNA byl stanoven na několik desítek minut.

Významná část práce byla věnována volné cirkulující DNA v onkologii se zaměřením na volnou cirkulující tumorovou DNA. Nejvyšší rozdíl koncentrací cfDNA nalzáme u zdravých kontrol porovnání onkologicky nemocnými pacienty. I když se kvantifikace cfDNA zdá být dobrým markerem k rozlišení zdravých a nemocných jedinců, tak pouze stanovení jejího množství není rozhodující. Největším přínosem volné cirkulující DNA je její neinvazivní způsob vyšetření odběrem periferní krve pacientů, tzv. tekutá biopsie. Tekutou biopsií lze vyšetřit změny na úrovni tumorové DNA, protože ctDNA nese stejné genetické či epigenetické změny jako primární a metastazující nádor a navíc umožní zachytit heterogenitu nádoru, kterou nemusí klasická biopsie vždy odhalit. Mezi tyto změny patří nejčastěji mutace, methylace promotorových oblastí genů, ztráta heterozygoty či mikrosatelitní nestabilita. U kolorektálního karcinomu je přítomnost mutace v *K-ras* genu spojována s horší prognózou a u pacientů, u kterých byla ctDNA s mutací zjistitelná po operaci, došlo do roka k relapsu onemocnění. U karcinomu plic v spojení s mutací v *K-ras* genu došlo k rozporupným výsledkům, co se týká prognózy onemocnění.

U karcinomu prsu přítomnost mutace v genu p53 silně korelovala s výskytem metastáz, stádiem onemocnění a velikostí nádoru.

Obecně lze říci, že pokud byla detekována plazmová DNA s konkrétní změnou i po odstranění nádorové tkáně, docházelo u pacientů k relapsu onemocnění různých typů

rakoviny. Díky vysoké citlivosti a specifitě vyšetření ctDNase většina studií shodla na tom, že ctDNA má velký potenciál jako biomarker rakoviny.

I u hematologických malignit se studie věnují cfDNA i přesto, že některá vyšetření jsou běžně prováděna z periferní krve a tedy neinvazivním způsobem. Avšak u některých diagnóz je pro vyšetření odebírána kostní dřeň a tak i zde může vyšetření cfDNA sloužit jako alternativní a vysoce specifický přístup.

Úsilí vyvinout neinvazivní metody pro detekci a sledování nádorových onemocnění zůstává i nadále předmětem dalších studií, ale z dosud publikovaných dat je zřejmé, že zde bude mít cfDNA důležitou úlohu. K tomu mohou přispět i neustále se rozvíjející technologie a citlivější metody pro detekci specifické cfDNA.

## 9 Seznam použité literatury

- Aljurf, M., Abalkhail, H., Alseraihy, A., Mohamed, S. Y., Ayas, M., Alsharif, F., Albitar, M. (2016). Chimerism Analysis of Cell-Free DNA in Patients Treated with Hematopoietic Stem Cell Transplantation May Predict Early Relapse in Patients with Hematologic Malignancies. *Biotechnology Research International*, 2016.
- Bai, H., Mao, L., Wang, S., Zhao, J., Yang, L., An, T., Wu, M. (2009). Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Plasma DNA Samples Predict Tumor Response in Chinese Patients With Stages IIIB to IV Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(16), 2653–2659.
- Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Diaz, L., (2014). Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Science Translational Medicine*, 6(224), 1–25.
- Campbell, I. G., Russell, S. E., Choong, D. Y. H., Montgomery, K. G., Ciavarella, M. L., Hooi, C. S. F., Phillips, W. A. (2004). Mutation of the PIK3CA Gene in Ovarian and Breast Cancer. *American Association for Cancer Research*, 64, 7678–7681.
- Camps, C., Jantus-lewintre, E., Cabrera, A., Blasco, A., Sanmartín, E., Gallach, S., Sirera, R. (2011). The identification of KRAS mutations at codon 12 in plasma DNA is not a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*, 72(3), 365–369.
- Ciccone, M., Calin, G. A. (2015). MicroRNAs in Myeloid Hematological Malignancies. *Current Genomics*, 16, 336-348.
- Dawson, S.-J., Tsui, D. W. Y., Muraza, M., Biggs, H., Rueda, O. M., Chin, S.-F. C., Rosenfeld, N. (2013). Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 1199–1209.
- DeVos, T., Tetzner, R., Model, F., Weiss, G., Schuster, M., Distler, J., Lofton-day, C. (2009). Circulating Methylated SEPT9 DNA in Plasma Is a Biomarker for Colorectal Cancer, *Clinical Chemistry*, 55(7), 1337–1346.

- Diehl, F., Li, M., Dressman, D., He, Y., Shen, D., Szabo, S., Vogelstein, B. (2005). Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16368–73.
- Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M. A., Romans, K., Li, M., Thornton, K., Jr, L. A. D. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine*, 14(9), 985–990.
- Dowler, N. A., Spindler, K. G., Pallisgaard, N., Andersen, R. F., Jakobsen, A. (2013). The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 79(3), 312–317.
- Finning, K., Martin, P., Summers, J., Massey, E., Poole, G., Daniels, G. (1977). Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *British Medical Journal*.
- Fujiwara, K., Fujimoto, N., Tabata, M., Nishii, K., Matsuo, K., Hotta, K., Tanimoto, M. (2005). Identification of Epigenetic Aberrant Promoter Methylation in Serum DNA Is Useful for Early Detection of Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 11, 1219–1225.
- Gao, Y., He, Y., Yang, Z., Zuo, Y., Bai, Y., Chen, H., Zhang, L. (2010). Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 48(11), 1651–1656.
- García-Olmo, D. C., Domínguez, C., García-Arranz, M., Anker, P., Stroun, M., García-Verdugo, J. M., García-Olmo, D. (2010). Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Research*, 70(2), 560–567.
- García-Olmo, D., García-Olmo, D., Domínguez-Berzosa, C., Guadalajara, H., Vega, L., García-Arranz, M. (2012). Oncogenic transformation induced by cell-free nucleic acids circulating in plasma (genometastasis) remains after the surgical resection of the primary tumor: a pilot study. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(1), S61–8.



- Gautschi, O., Huegli, B., Ziegler, A., Gugger, M., Heighway, J., Stahel, R. A., Betticher, D. C. (2007). Origin and prognostic value of circulating KRAS mutations in lung cancer patients. *Cancer Letters*, 254, 265–273.
- Giacona, M. B., Ruben, G. C., Iczkowski, K. a, Roos, T. B., Porter, D. M., Sorenson, G. D. (1998). Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*, 17(1), 89–97.
- Gonzalez, R., Silva, J. M., Sanchez, A., Dominguez, G., Garcia, J. M., Chen, X., Bonilla, F. (2000). Microsatellite alterations and TP53 mutations in plasma DNA of small-cell lung cancer patients: Follow-up study and prognostic significance. *Annals of Oncology*, 11, 1097–1104.
- Grutzmann, R., Molnar, B., Pilarsky, C., Habermann, J. K., Schlag, P. M., Hans, D., Lofton-day, C. (2008). Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay. *PLoS ONE*, 3(11), 3Z59.
- Heitzer, E., Auer, M., Hoffmann, E. M., Pichler, M., Gasch, C., Ulz, P., Speicher, M. R. (2013). Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *International Journal of Cancer*, 133(2), 346–356.
- Higgins, M. J., Jelovac, D., Barnathan, E., Blair, B., Slater, S., Powers, P., Park, B. H. (2012). Detection od Tumor PIK3CA in Metastatic Breast Cancer Using Peripheral Blood. *Clinical Cancer Research*, 18(12), 3462–3469.
- Hohaus, S., Giachelia, M., Massini, G., Mansueto, G., Vannata, B., Bozzoli, V., Leone, G. (2009). Cell-free circulating DNA in Hodgkin' s and non-Hodgkin' s lymphomas. *Annals of Oncology*, 20(8), 1408–1413.
- Holdenrieder, S., Stieber, P., Chan, L. Y. S., Geiger, S., Kremer, A., Nagel, D. (2005). Cell-Free DNA in Serum and Plasma: Comparison of ELISA and Quantitative PCR. *Clinical Chemistry*, 51(8), 1544–1546.
- Hoque, M. O., Feng, Q., Toure, P., Dem, A., Critchlow, C. W., Hawes, S. E., Kiviat, N. B. (2006). Detection of Aberrant Methylation of Four Genes in Plasma DNA for the Detection of Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24(26), 9–11.

- Hosny, G., Farahat, N., Hainaut, P. (2009). TP53 mutations in circulating free DNA from Egyptian patients with non-Hodgkin' s lymphoma. *Cancer Letters*, 275(2), 234–239.
- Hromadníková, I., Veselá, K., Schrollová, R., Doucha, J. (2007). Neinvazivní SRY, RHD a RHCE genotypizace plodu z periferní krve těhotných žen na 7300 real-time PCR systému. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 15(1), 9–13.
- Chang, C. P., Chia, R., Wu, T., Tsao, K., Sun, C., Wu, J. T. (2003). Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta*, 327, 95–101.
- Chen, X., Bonnefoi, H., Diebold-berger, S., Lyautey, J., Lederrey, C., Faltin-Traub, E., Anker, P. (1999). Advances in Brief Detecting Tumor-related Alterations in Plasma or Serum DNA of Patients Diagnosed with Breast Cancer 1. *Clinical Cancer Research*, 5, 2297–2303.
- \*<sup>1</sup> Jung, K., Fleischhacker, M., Rabien, A. (2010). Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker-A critical appraisal of the literature. *Clinica Chimica Acta*, 411(21-22), 1611–1624.
- Jung, M., Klotzek, S., Lewandowski, M., Fleischhacker, M., Jung, K. (2003). Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clinical Chemistry*, 49(6), 1028–1029.
- Krawczyk, P., Towrozek, T., Kucharczyk, T., Milanowski, J. (2014). Septin 9 promoter region methylation in free circulating DNA - potential role in noninvasive diagnosis of lung cancer: preliminary report. *Med Oncol*, 31, 917.
- Kuo, Y. Bin, Chen, J. S., Fand, C. W., Li, Y. S., Chan, E. C. (2014). Comparison of KRAS mutation analysis of primary tumors and matched circulating cell-free DNA in plasmas of patients with colorectal cancer. *Clinica Chimica Acta*, 433, 284–289.
- Lau, T., Leung, T. N., Chan, L. Y. S., Lau, T. K., Chan, K. C. A., Tam, W. H., Lo, Y. M. D. (2002). Fetal DNA Clearance from Maternal Plasma Is Impaired in Preeclampsia. *Clinical Chemistry*, 48(12), 2141–2146.

---

<sup>1</sup>review

- Leon, S., Shapiro, B., Sklaroff, B., M, D., Yaros M. J., (1977). Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Research*, 37, 646–650.
- Li, A., Wong, A., Si, J., Lim, J., Sinha, A., Gopinathan, A., Goh, B. (2015). Tumour pharmacodynamics and circulating cell free DNA in patients with refractory colorectal carcinoma treated with regorafenib. *Journal of Translational Medicine*, 13(57), 1–9.
- Li, C.-N., Hsu, H.-L., Wu, T.-L., Tsao, K.-C., Sun, C.-F., Wu, J. T. (2003). Cell-free DNA is released from tumor cells upon cell death: a study of tissue cultures of tumor cell lines. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 17, 103–107.
- Lo, D. Y. M., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M. Z., Hjelm, N. M. (1999). Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma. *The American Journal of Human Genetics*, 64, 218–224.
- Lo, Y. M. D., Rainer, T. H., Chan, L. Y. S., Hjelm, N. M., Cocks, R. A. (2000). Plasma DNA as a Prognostic Marker in Trauma Patients. *Clinical Chemistry*, 46(3), 319–323.
- Lofton-day, C., Model, F., Devos, T., Tetzner, R., Distler, J., Schuster, M., Sledziewski, A. (2008). DNA Methylation Biomarkers for Blood-Based Colorectal Cancer Screening. *Clinical Chemistry*, 54(2), 414–423.
- Ma, W., Kantarjian, H., Jilani, I., Gorre, M., Bhalla, K., Ottmann, O., Albitar, M. (2006). Heterogeneity in detecting Abl kinase mutations and better sensitivity using circulating plasma RNA. *Leukemie*, 20, 1989-1991.
- Majer, S., Bauer, M., Magnet, E., Strele, A., Giegerl, E., Eder, M., Pertl, B. (2007). Maternal urine for prenatal diagnosis - an analysis of cell-free fetal DNA in maternal urine and plasma in the third trimester. *Prenatal Diagnosis*, 27, 1219–1223.
- Meer, F. J. Van Der, Faber, D. J., Aalders, M., Poot, A. A., Vermes, I., & van Leeuwen, T. G. (2010). Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. *Lasers in Medical Science*, 259–267.
- Mirnezami, R., Nicholson, J., Darzi, A., Macdonnell, M. (2012). Preparing for Precision Medicine. *New England Journal of Medicine*, 366(6), 489–491.

- Mirza, S., Sharma, G., Prasad, C. P., Parshad, R., Srivastava, A., Dutta, S., Ralhan, R. (2007). Promoter hypermethylation of TMS1 , BRCA1 , ER  $\alpha$  and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sciences*, 81, 280–287.
- Mussolin, L., Burnelli, R., Pillon, M., Carraro, E., Farruggia, P., Todesco, A., Rosolen, A. (2013). Plasma Cell-Free DNA in Paediatric Lymphomas. *Journal of Cancer*, 4(4), 323–329.
- Palomaki, G. E., Deciu, C., Kloza, E. M., Lambert-Messerlian, G. M., Haddow, J. E., Neveux, L. M., Canick, J. A. (2012). DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genetics in Medicine*, 14(3), 296–305.
- Perkins, G., Yap, T. A., Pope, L., Cassidy, A. M., Dukes, J. P., Riisnaes, R., de Bono, J. S. (2012). Multi-Purpose Utility of Circulating Plasma DNA Testing in Patients with Advanced Cancers. *PLoS ONE*, 7(11), 47020.
- Ponomaryova, A. A., Yu, E., Cherdyntseva, N. V., Skvortsova, T. E., Yu, A., Zav, A. A., Laktionov, P. P. (2013). Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients. *Lung Cancer*, 81(3), 397–403.
- Quan, J., Gao, Y., Yang, Z., Chen, H., Xian, J., Zhang, S., & Zou, Q. (2015). Quantitative Detection of Circulating Nucleophosmin Mutations DNA in the Plasma of Patients with Acute Myeloid Leukemia. *International Journal of Medical Sciences*, 12(1), 17–22.
- QUIamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. (2015). 4. vydání.
- Rainer, T. H., Wong, L. K. S., Lam, W., Yuen, E., Lam, N. Y. L., Metreweli, C., Lo, Y. M. D. (2003). Prognostic Use of Circulating Plasma Nucleic Acid Concentrations in Patients with Acute Stroke. *Clinical Chemistry*, 49(4), 562–569.
- Shao, Z., Wu, J., Shen, Z., Nguyen, M. (2001). p53 Mutation in Plasma DNA and Its Prognostic Value in Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 7, 2222–2227.
- Shaw, J. A., Smith, B. M., Walsh, T., Johnson, S., Primrose, L., Slade, M. J., Coombes, R. C. (2000). Microsatellite Alterations in Plasma DNA of Primary Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 6, 1119–1124.

- Schwarz, A. K., Stanulla, M., Cario, G., Flohr, T., Sutton, R., Möricke, A., ... Stroun, M. (2009). Quantification of free total plasma DNA and minimal residual disease detection in the plasma of children with acute lymphoblastic leukemia. *Annals of Hematology*, *88*, 897–905.
- Schwarzenbach, H., Eichelser, C., Kropidlowski, J., Janni, W., Rack, B., Pantel, K. (2012). Loss of Heterozygosity at Tumor Suppressor Genes Detectable on Fractionated Circulating Cell-Free Tumor DNA as Indicator of Breast Cancer Progression. *Clinical Cancer Research*, *18*(20), 5719–5731.
- Skvortsova, T. E., Rykova, E. Y., Tamkovich, S. N., Bryzgunova, O. E., Starikov, a V, Kuznetsova, N. P., Laktionov, P. P. (2006). Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *British Journal of Cancer*, *94*(10), 1492–1495.
- Sozzi, G., Conte, D., Mariani, L., Vullo, S. Lo, Roz, L., Lombardo, C., Tavecchio, L. (2001). Analysis of Circulating Tumor DNA in Plasma at Diagnosis and during Follow-Up of Lung Cancer Patients. *Cancer Research*, *61*, 4675–4678.
- Spindler, K. G., Pallisgaard, N., Vogelius, I., Jakobsen, A. (2012). Quantitative Cell-Free DNA, KRAS, and BRAF Mutations in Plasma from Patients with Metastatic Colorectal Cancer during Treatment with Cetuximab and Irinotecan. *Clinical Cancer Research*, *18*(4), 1177–1186.
- Spindler, K. L. G., Pallisgaard, N., Andersen, R. F., Brandslund, I., Jakobsen, A. (2015). Circulating Free DNA as Biomarker and Source for Mutation Detection in Metastatic Colorectal Cancer. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–14.
- Steinman, D. (1975). Free DNA in serum and plasma from normal adults. *Journal of Clinical Investigation*, *56*(2), 512–515.
- Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Layutey, J., Lederrey, C., Beljanski, M. (1989). Neoplastic Characteristic of the DNA Found in the Plasma of Cancer Patients. *Oncology*, *46*. 318-322
- Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A., Anker, P. (2001a). About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clinica Chimica Acta*, *313*(1-2), 139–142.

- Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Mulcahy, H. E., Anker, P. (2001b). Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA: evidence for a preferential release from viable cells? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 945, 258–264.
- Suzuki, N., Kamataki, A., Yamaki, J., Homma, Y. (2008). Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clinica Chimica Acta*, 387(1-2), 55–58.
- Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I., Kunkel, H. G. (1966). Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation*, 45(11), 1732–40.
- Thierry, A. R., Mouliere, F., Gongora, C., Ollier, J., Robert, B., Ychou, M., Molina, F. (2010). Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Research*, 38(18), 6159–6175.
- To, E. W. H., Chan, K. C. A., Leung, S., Leung, S., Chan, L. Y. S., To, K., Lo, Y. M. D. (2003). Rapid Clearance of Plasma Epstein-Barr Virus DNA After Surgical Treatment of Nasopharyngeal Carcinoma Rapid Clearance of Plasma Epstein-Barr Virus DNA After Surgical Treatment of Nasopharyngeal Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 9, 3254–3259.
- Trejo-Becerril, C., Pérez-Cárdenas, E., Taja-Chayeb, L., Anker, P., Herrera-Goepfert, R., Medina-Valázquez, L. A., Dueñas-González, A. (2012). Cancer Progression Mediated by Horizontal Gene Transfer in an In Vivo Model. *PLoS ONE*, 7(12), 1–12.
- Wang, J., Hsieh, J., Chang, M., Huang, T., Chen, F., Cheng, T., Lin, S. (2004). Molecular Detection of APC , K- ras , and p53 Mutations in the Serum of Colorectal Cancer Patients as Circulating Biomarkers. *World Journal of Surgery*, 28, 721–726.
- Wu, T. L., Zhang, D., Chia, J. H., Tsao, K. C., Sun, C. F., Wu, J. T. (2002). Cell-free DNA: Measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clinica Chimica Acta*, 321(1-2), 77–87.
- Yu, S. C. Y., Lee, S. W. Y., Jiang, P., Leung, T. Y., Chan, K. C. A., Chiu, R. W. K., Lo, Y. M. D. (2013). High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clinical Chemistry*, 59(8), 1228–1237.

- Yung, T. K. F., Chan, K. C. A., Mok, T. S. K., Tong, J., To, K., Lo, Y. M. D. (2009). Single-Molecule Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Plasma by Microfluidics Digital PCR in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Imaging, Diagnosis, Prognosis*, 15(6), 2076–2085.
- Zhong, X. Y., Ladewig, A., Schmid, S., Wight, E., Hahn, S., Holzgreve, W. (2007). Elevated level of cell-free plasma DNA is associated with breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 276(4), 327–331.
- Zuo, Z., Maiti, S., Hu, S., Loghavi, S., Calin, G. A., Garcia-manero, G., Bueso-ramos, C.E. (2015). Plasma circulating-microRNA profiles are useful for assessing prognosis in patients with cytogenetically normal myelodysplastic syndromes. *Modern Pathology*, 28(3), 373-382.