

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Cirkulující biomarkery u kolorektálního karcinomu a jejich využití v diagnostice a stanovení prognózy

Circulating biomarkers in colorectal cancer and their application in diagnosis and prognosis

Mgr. Klára Červená

2023

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Dana Holá, Ph.D.

Školící pracoviště: Oddělení molekulární biologie nádorů, Ústav experimentální medicíny AV ČR

Školitel: Ing. Veronika Vymetálková, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Souhrn	4
Abstract	5
1. Úvod	6
1.1 Kolorektální karcinom.....	6
1.2 Biomarkery	7
1.3 Tekutá biopsie	7
1.3.1 MikroRNA.....	Chyba! Záložka není definována.
1.3.2 Dlouhé nekódující RNA	8
1.3.3 Volná cirkulující DNA	8
2. Hypotézy a cíle práce	9
3. Materiál a metodika	9
3.1 Studovaná populace.....	9
3.2 Metody.....	10
3.2.1 Izolace nukleových kyselin	10
3.2.2 Sekvenování nové generace (NGS).....	10
3.2.3 Real-time qPCR.....	10
3.2.4 Komparativní genomová hybridizace.....	10
3.2.5 Funkční studie	11
3.2.6 Statistické zpracování	11
4. Výsledky.....	11
4.1 Publikace č. 1 - Analýza expresních hladin miRNA v plazmě u pacientů s RC v průběhu terapie	11
4.2 Publikace č. 2 - Analýza expresních hladin miR-122-5p a miR-142-5p u pacientů s mKRRK	12
4.3 Publikace č. 3 – Identifikace <i>MALATI</i> amplifikace u prekancerózních lézí KRRK.....	12
4.4 Publikace č. 4 - Analýza cirkulující lncRNA <i>MALATI</i> jako diagnostického markeru pro KRA	12
4.5 Publikace č. 5 - Mutační profil volné DNA v plazmě spojený s odpovědí na léčbu KRRK.....	13
5. Diskuse	13
6. Závěry.....	18
7. Použitá literatura.....	19
8. Publikační aktivita.....	24

Souhrn

I přes veškerý pokrok na poli klinické i molekulární onkologie, čísla související s incidencí a mortalitou kolorektálního karcinomu (KRK) zůstávají stále na nepříliš přijatelné úrovni. V posledních letech se do popředí dostává tekutá biopsie, cirkulující biomarkery, která oproti klasické biopsii, přináší spoustu výhod, poskytuje včasné informace o heterogenitě nádoru a možnost opakovaného odběru materiálu.

Cílem této disertační práce bylo identifikovat nové kandidátní cirkulující biomarkery z řad mikroRNA, dlouhých nekódujících RNA a volné DNA, které by mohly sloužit k časnější diagnostice, lepší prognóze či k predikci léčebné odpovědi KRK pacientů a tím k dalšímu posunu personalizované medicíny.

Hlavními výsledky této práce jsou: 1) Cirkulující mikroRNA v plazmě (miR-122-5p a miR-142-5p) mohou od sebe rozlišit pacienty s rektálním karcinomem a jedince bez nádorového onemocnění, zároveň by mohly být prediktivními ukazateli odpovědi pacientů (jak s primárním, tak i metastatickým KRK) na léčbu. 2) Genová amplifikace dlouhé nekódující RNA *MALAT1* by mohla být důležitým krokem přechodu zdravé tkáně v adenomovou. *MALAT1* v plazmě je nadměrně exprimovaný u pacientů s KRK a kolorektálními adenomy oproti jedincům bez nádorového onemocnění a pro KRK pacienty má potenciál prediktivního biomarkeru. 3) Volná DNA prokázala potenciál odlišit od sebe dobré a špatné respondenty vůči chemoterapii a dále detekovat mutace, které nebyly prokázány v tkáňové nádorové DNA.

Tato disertační práce navrhla několik cirkulujících diagnostických, prognostických i prediktivních biomarkerů pro KRK. Pro potvrzení našich výsledků a následného zavedení těchto ukazatelů do klinické praxe jsou však nezbytné další nezávislé studie na větších populacích a s nimi spojené mechanistické studie, které by detailněji popsali biologický mechanismus.

Abstract

Despite all the advances in the field of clinical and molecular oncology, the numbers related to the incidence and mortality of colorectal cancer (CRC) remain at unacceptable levels. In recent years, liquid biopsy consisting of circulating biomarkers has come to the forefront of research, offering many advantages over conventional biopsy, such as providing timely information on tumor heterogeneity and the ease of repeated sampling.

This dissertation thesis aimed to identify novel candidate circulating biomarkers from microRNAs, long non-coding RNAs, and cell-free DNA that could be used for earlier diagnosis, better prognosis, or prediction of therapy response of CRC patients and thus further advance personalized medicine.

The main results of this work are: 1) Circulating microRNAs in plasma (miR-122-5p and miR-142-5p) can distinguish patients with rectal cancer and cancer-free individuals and could predict therapy response in patients (both in primary and metastatic CRC patients). 2) Gene amplification of the long non-coding RNA *MALATI* can represent an important step in the transition of healthy mucosa to adenoma tissue. Plasma *MALATI* is overexpressed in patients with colorectal adenomas and CRC patients compared to cancer-free individuals and has the potential as a predictive biomarker for CRC patients. 3) Cell-free DNA has the potential to distinguish good and poor responders to chemotherapy and to detect mutations not detected in tumor tissue DNA.

This dissertation proposed several diagnostic, prognostic, and predictive circulating biomarkers for CRC patients. However, to confirm our results and subsequently introduce these biomarkers into clinical practice, further independent studies on larger populations and related mechanistic studies that would describe the biological mechanism in more detail are necessary.

1. Úvod

1.1 Kolorektální karcinom

Nádorová onemocnění jsou celosvětově druhou nejčastější (po kardiovaskulárních onemocněních) příčinou úmrtí [1]. Podle serveru Globocan (<https://gco.iarc.fr>), byl pro rok 2020 KRK celosvětově třetím nejčastějším nádorovým onemocněním a druhou nejčastější příčinou úmrtí spojenou s nádorovými onemocněními.

KRK je heterogenní onemocnění, jehož vznik představuje mnohastupňový proces, který se vyznačuje postupnou kumulací histologických, morfologických, genetických, ale i epigenetických změn, které vedou k přechodu z normální střevní mukózy ke vzniku prekancerózní léze, adenomu a následně až ke vzniku karcinomu [2]. Rizikové faktory KRK můžeme rozdělit na dvě skupiny – ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi ty neovlivnitelné patří například věk, dědičnost či také rasa [3, 4]. Vznik sporadické formy KRK (cca 2/3 případů), kterou můžeme definovat jako nádor, který nevzniká na základě rodinné anamnézy či zárodečné mutace, ale mutace somatické, je často doprovázen některým z ovlivnitelných rizikových faktorů [5-7]. Tyto faktory souvisí především s životním stylem [8-11].

Mezi nejčastěji používané screeningové metody v oblasti diagnostiky KRK patří testy na okultní krvácení do stolice a endoskopická vyšetření [12]. Testování krve ve stolici je na rozdíl od jiných screeningových metod neinvazivní, lehce a levně proveditelné vyšetření. V případě pozitivního výsledku je potřeba tento test ověřit pomocí endoskopického vyšetření. Může se totiž také jednat o falešně pozitivní výsledek, protože se krev může dostat do stolice také z důvodu jiného zánětlivého onemocnění či například z některých potravin [13]. Endoskopická vyšetření jsou oproti testům na okultní krvácení do stolice charakterizována vysokou přesností a citlivostí, neboť je díky nim možné nahlédnout přímo na celý vnitřek tlustého střeva. Toto vyšetření je na rozdíl od předešlých testů invazivní a nese s sebou některé nevýhody (jako například vyšší cena, riziko krvácení a perforace střeva či různé dietní opatření [14]). Zvolený způsob léčby pacientů s KRK závisí kromě stádia onemocnění v čase diagnózy a také na lokalizaci tumorového ložiska. Jak již bylo zmíněno, KRK je heterogenní onemocnění a jsou zde zásadní rozdíly (embryologické, anatomické ale i funkční) mezi nádory tlustého střeva a konečníku (RC), které mají vliv i na výběr léčby [15, 16]. Standardem léčby KRK je chirurgické zákrok, jehož cílem je kompletní odstranění tumorového ložiska a následně pak adjuvantní chemoterapie jejímž cílem je úplné odstranění zbylých nádorových buněk a tím další snížení šance na recidivu nádoru [17, 18]. V některých případech je potřeba před chirurgickým zákrokem z důvodu zmenšení velikosti nádoru aplikovat tzv. neoadjuvantní (předoperační) léčbu [19].

Přes veškeré pokroky v nádorové terapii, přežívání KRK nedosahuje příliš vysoké úspěšnosti, a dokonce u mKRK je pětileté přežívání pouze okolo 11-14 % [1, 20, 21]. Z tohoto důvodu stále pokračuje úsilí o nalezení nových indikátorů, které by umožnily, kromě časnější diagnózy, také předpovídat odpověď pacienta na vybranou léčbu a tím nastavit efektivnější individualizovanou léčbu. A právě hledání nových nádorových biomarkerů je hlavním pilířem personalizované nebo precizní medicíny.

1.2 Biomarkery

Biomarker je jakýkoliv objektivně měřitelný a hodnotitelný znak, který se měří jako indikátor normálních biologických procesů, patogenních procesů či reakce na expozici či intervenci (FDA-NIH Biomarker Working Group, 2016, <https://ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK338449>). Nádorové biomarkery jsou pak substance, které jsou přítomné v organismu v důsledku vzniku a vývoje maligního procesu [22]. Ideální nádorový biomarker by měl být takový biomarker, který s dostatečnou senzitivitou a specifitou odliší nádorový a nenádorový proces [23]. Nádorovými biomarkery mohou být proteiny, nukleové kyseliny, protilátky či různé biochemické modifikace.

Nádorové biomarkery jsou rozlišovány na diagnostické, prognostické a prediktivní. Diagnostický biomarker je takový biomarker, který stanovuje či potvrzuje přítomnost nádorového onemocnění [24]. Prognostický biomarker určuje zvýšenou nebo sníženou pravděpodobnost, že se u pacienta s určitým nádorovým onemocněním objeví nějaká specifická klinická událost – například progresse onemocnění, rozvoj metastáz, vznik relapsu či úmrtí. Prediktivní biomarker je takový biomarker, který předpovídá, zda konkrétní léčba bude u pacienta účinná. Takový biomarker pak může pomoci lékařům při výběru nejúčinnější léčby [25, 26].

U KRK bylo zavedeno do klinické praxe jen několik biomarkerů a jejich stanovování již probíhá na denní bázi. Stanovení přítomnosti mutace genu *KRAS* se stalo jedním z neužitečnějších prediktivních markerů pro předpověď rezistence na biologickou léčbu pomocí monoklonální protilátky cetuximabu [27, 28]. Dalším z nejrozšířenějších nádorových markerů je karcinoembryonální antigen (CEA), který je nejvíce používaným nádorovým biomarkerem, jak u KRK, tak i u jiných typů malignit. Byla prokázána jeho korelace se stádiem onemocnění, stupněm diferenciacie či například lokalizací nádoru [29, 30].

I přes nesporný pokrok v diagnostice a léčbě nádorových onemocnění není účinnost terapie příliš uspokojivá. Z tohoto důvodu se stále usiluje o nalezení nových biomarkerů, které by umožnily personalizovat léčbu či časněji odhalit nádorové onemocnění. Kromě pozitivního dopadu na incidenci a mortalitu nádorových onemocnění je potřeba také nalézt takové biomarkery, které by měly pozitivní efekt na ekonomické dopady. Mezi poměrně nové metody patří i tekutá biopsie, která kromě ekonomické nenáročnosti přináší i spoustu dalších výhod.

1.3 Tekutá biopsie

Tradiční (tkáňová) biopsie je nezbytný úkon pro pacienty s nádorovými onemocněními – poskytuje nám zásadní informace pro stanovení diagnózy, prognózy i výběr vhodné terapie. Tento typ biopsie je založen na odebrání nádoru či jeho části během invazivního operačního výkonu, případně během kolonoskopického vyšetření. Tyto invazivní techniky začínají být pomalu nahrazovány neinvazivními metodami, které můžeme souhrnně nazvat pojmem “tekutá biopsie” (anglicky liquid biopsy). Kromě minimální invazivity a finanční nenáročnosti je hlavní výhodou této biopsie možnost opakovaného odebrání vzorku a tudíž možnost monitorování onemocnění v reálném čase [31]. To může být pak využito například pro monitorování odpovědi pacienta na léčbu, kdy se jeho molekulární profil neustále mění a díky tekuté biopsii můžeme objevit dříve například chemorezistenci či probíhající relaps. Základ tekuté biopsie tvoří izolace nukleových kyselin či

nádorových cirkulujících buněk z různých tělních tekutin, která je následována dalšími genomickými či proteomickými analýzami.

1.3.1 MikroRNA

MikroRNA (miRNA) jsou malé nekódující RNA, které jsou dlouhé cca 22 nukleotidů. MiRNA ovlivňují post-transkripčně genovou expresi RNA pomocí procesu RNA interference [32]. MiRNA interaguje s cílovou mRNA pomocí komplementární sekvencí na 3'UTR, které se nazývají miRNA response element (MRE) [33]. Stupeň komplementarity MRE pak určuje, zda dojde k úplné degradaci cílové mRNA, která je spojená s úplnou komplementaritou či k inhibici translace (neúplná komplementarita). V případě úplné komplementarity, dochází k aktivaci endonukleázové aktivity Ago proteinu a k nastříhání cílové mRNA [34]. Degradace či translační inhibice cílové mRNA vede ke znemožnění exprese proteinu. Takový protein může v buňce právě sloužit jako tzv. tumorsupresor či onkoprotein a tím mohou být miRNA zapojeny do procesu karcinogeneze [34]. Později se ukázalo, že miRNA můžou být detekovány v nejrůznějších tělních tekutinách jako je plazma, sérum, cerebrospinální tekutina, sliny, mateřské mléko, moč, slzy, stolice či kolostrum. Počet detekovatelných miRNA se pohybuje cca od 200 do 450 ve 300 µl tělní tekutiny, přičemž nejvíce jich můžeme nalézt ve slinách či spermatu, nejméně pak v pleurální a cerebrospinální tekutině [35]. Potenciál cirkulujících miRNA zvyšuje ještě fakt, že jsou v tělních tekutinách velmi stabilní – odolávají degradaci při pokojové teplotě i při extrémních podmínkách jako je například vysoké či nízké pH a opakované cykly rozmrazování/zamrazování [36-39].

1.3.2 Dlouhé nekódující RNA

Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) byly dlouho považovány za tzv. „junk“ nukleové kyseliny, jejich hlubší výzkum byl upozaděn, protože většina studií se zabývala především miRNA [40]. LncRNA patří také do skupiny nekódujících RNA, ale na rozdíl od miRNA se jedná o mnohem delší úseky RNA (cca 200 nukleotidů) [41]. LncRNA mají pouze krátký otevřený čtecí rámeček, nebo jim tento úplně chybí, což zabraňuje jejich překladu do proteinu. Výsledná lncRNA je většinou prepisována RNA polymerázou II a obsahuje na svém 5'konci 7-methylguanidinovou čepičku a na 3'konci je polyadenylována. LncRNA po svém prepisu zůstává v jádře a její hlavní funkcí je regulace genové exprese, a to jak na transkripční, tak i post-transkripční úrovni [42, 43]. Podle Human Genome (Release 41) existuje okolo 19000 lncRNA (<https://genecodegenes.org>). LncRNA mohou interagovat s DNA, RNA, ale i s proteiny, a to na mnoha úrovních. Nejčastěji bývají lncRNA podle funkce rozděleny na i) signály, ii) návody, iii) vůdce a iv) lešení [43, 44].

1.3.3 Volná cirkulující DNA

Volná cirkulující DNA (cfDNA – cell-free DNA) je bezbuněčná DNA, která se vyskytuje mimo buňky v cirkulaci ve formě fragmentů a může být detekována v různých tělních tekutinách jako například sérum, plazma, moč či sliny [45-50]. První asociace cfDNA s nádorovým onemocněním byla pak popsána v roce 1970 [51]. V této studii Leon a Shapiro měřili množství cfDNA v séru pacientů s různými nádorovými

onemocněními a v séru zdravých jedinců. Pacienti s nádorovými onemocněními byli oproti zdravým kontrolám charakterizováni vyššími hladiny cfDNA. Tato studie byl počáteční krok k dalšímu, hlubšímu výzkumu cfDNA, který vedl k poznání, že v cfDNA můžeme detekovat i mutace genů, mikrosatelitovou nestabilitu či DNA metylace [52-54].

2. Hypotézy a cíle práce

Hlavním cílem této disertační práce bylo identifikovat nové potenciální cirkulující biomarkery, které by umožnily časnější diagnózu KRK či predikovaly prognózu či odpověď pacienta s KRK na vybranou léčbu, čímž by napomohly personalizované medicíně. Byly stanoveny tyto hypotézy:

- a) Cirkulující mikroRNA v plazmě mohou sloužit jako diagnostické a prediktivní biomarkery pro předpověď odpovědi KRK pacientů na vybranou léčbu.
- b) Cirkulující dlouhé nekódující RNA mohou být diagnostickým biomarkerem pro časně zachycení prekancerózních lézí KRK.
- c) Cirkulující volná DNA v plazmě může sloužit jako prediktivní marker pro predikci odpovědi pacientů KRK na vybranou léčbu.

3. Materiál a metodika

3.1 Studovaná populace

Publikace č. 1: První část studie (tzv. „discovery“ část) zahrnovala 20 pacientů s RC. Validační část se poté skládala ze 107 RC pacientů a 51 dobrovolníků bez nádorového onemocnění (CFI – cancer-free individuals). U všech těchto pacientů jsme měli dostupné krevní vzorky odebrané ve dvou intervalech – 1. odběr – v čase diagnózy onemocnění (před operací), 2. odběr – cca rok od diagnózy (čas ukončení terapie). Získané informace ze sledování (follow-up) nám poté umožnily pacienty stratifikovat na dobré respondenty a špatné respondenty. Vybrané miRNA byly testovány také *in vitro* na nádorových rektálních buněčných liniích – HRA16 a SW1463, které byly získány z Evropské sbírky ověřených buněčných kultur (ECACC, Velká Británie).

Publikace č. 2: Tato studie představuje rozšíření předchozí studie o 18 pacientů s metastatickým KRK. Krevní vzorky všech pacientů byly odebrány ve třech intervalech – 1. odběr v čase operace metastáz, 2. odběr přibližně 1 měsíc po operaci a 3. odběr několik měsíců od operace (medián 8 měsíců). Taktéž jsme měli dostupné krevní vzorky od 51 CFI. Kromě klinických dat, jsme měli k dispozici také data pro sérové nádorové markery (CEA a CA-19-9) a snímky z počítačové tomografie (CT). Pacienti byli rozděleni do dobré prognostické skupiny či špatné prognostické skupiny.

Publikace č. 3: Studie zahrnovala 16 pacientů s kolorektálními adenomy (KRA), kteří podstoupili kolonoskopické vyšetření.

Publikace č. 4: Verifikační analýza předchozí studie byla nejprve provedena na tkáních pacientů s kolorektálními adenomy, jež byly součástí průvodní studie (n=16). V další fázi jsme provedli analýzu *MALAT1* v plazmě KRK pacientů (n=101), KRA pacientů (n=97) a CFI (n=48).

Publikace č. 5: Do této studie bylo zahrnuto celkem 10 pacientů s nádory tlustého střeva. U všech těchto pacientů jsme měli dostupné krevní vzorky odebrané ve dvou intervalech – 1. odběr – v čase diagnózy onemocnění (před operací) a 2. odběr – cca 6 měsíců od ukončení terapie. Kromě krevních vzorků byly u těchto pacientů dostupné také tumorové tkáně. Díky dostupnosti klinických dat byli pacienti rozděleni na dobré a špatné respondenty.

3.2 Metody

3.2.1 Izolace nukleových kyselin

RNA (včetně miRNA) z plazmy byla vyizolována pomocí Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Kit (Norgen Biotek, Kanada). DNA z plazmy byla izolována pomocí kitu Qiamp circulating nucleic acid kit (Qiagen, Německo). Nádorová tkáň i přilehlá nádorová tkáň byly nejprve nadrceny pomocí Magna Lyser Green beads (Roche, Švýcarsko) pomocí homogenizátoru MagnaLyser Instrument (Roche, Švýcarsko). Z takto nadrcených tkání byly dále izolovány nukleové kyseliny pomocí kitu AllPrep DNA/RNA Mini kit (Qiagen, Německo).

3.2.2 Sekvenování nové generace (NGS)

Sekvenační knihovny pro miRNA byly připraveny pomocí kitu NEB Next Multiplex Small RNA Library Prep (New England BioLabs, USA). Takto připravené knihovny byly pak sekvenovány pomocí Illumina HiSeq2000. Knihovny pro celoxomové sekvenování cfDNA a tumorové DNA byly připraveny pomocí SureSelect XT HS Library preparation kit (Agilent, USA) dle protokolu výrobce a sekvenovány na HiSeq4000 (Illumina, USA).

3.2.3 Real-time qPCR

Extrahovaná RNA/miRNA byla pomocí reverzní transkripce přepsána do komplementární DNA pomocí Taqman MicroRNA Reverse Transcription kit (ThermoFisher Scientific, USA) u miRNA či High-capacity cDNA reverse transcription kit (ThermoFisher Scientific, USA) pro RNA. Vzhledem k nízkým koncentracím nukleových kyselin v plazmě, byla ještě provedena pre-amplifikace přepsané cDNA pomocí IQ SuperMix (Bio-Rad, USA). Samotná Real-time qPCR (RT-qPCR) reakce byla analyzována na 7500 Sequence Detection System (ThermoFisher Scientific, USA).

3.2.4 Komparativní genomová hybridizace

Arraye použité pro komparativní genomovou hybridizaci (CGH) byly navrženy tak, aby pokrývaly genomové části, ve kterých se vyskytují nejčastější geny asociované s nádorovými onemocněními (SurePrint G3 Cancer CGH+ single nucleotide polymorphism Microarray Kit, 4_180 K (Agilent, USA). Pro značení fluorochromy Cy3 a Cy5 byl použit kit Sure Tag Complete DNA Labeling enzyme kit (Agilent, USA). Samotná hybridizace byla provedena pomocí Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization kit (Agilent, USA).

Pro následné skenování čipů byl použit SureScanMicroarray Scanner instrument (Agilent, USA) a data byla zpracována pomocí softwaru Agilent CytoGenomics (Agilent, USA).

3.2.5 Funkční studie

Kultivace buněčných linií probíhala za standardních podmínek (37 °C a 5 % CO₂) ve specifických médiích. Pro HRA16 se jednalo o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma Aldrich, USA), pro SW1463 to bylo Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Sigma Aldrich, USA). Pro studium vybraných miRNA jsme transfekovali hladiny miRNA v buněčných liniích pomocí tzv. mimics (Sigma Aldrich, USA) a lipofectaminu RNAiMAX (Invitrogen, USA). Buněčné linie byly dále vystaveny 5μM 5-FU. U buněčných linií jsme stanovovali buněčnou proliferaci pomocí WST-1, schopnost tvorby kolonií a buněčný cyklus.

3.2.6 Statistické zpracování

Statistické analýzy qPCR a *in vitro* výsledků byly provedeny v softwaru R (v. 4.2.2) a GraphPad Prism (GraphPad, USA). Statistická signifikance byla stanovena na $p \geq 0.05$.

4. Výsledky

4.1 Publikace č. 1 - Analýza expr. hladin miRNA v plazmě u pacientů s RC v průběhu terapie

Cílem této studie bylo zhodnotit expresní hladiny miRNA před a po terapii u pacientů s RC a tím identifikace specifických miRNA reflektující průběh a odpověď pacientů na léčbu. Pomocí sekvenování opakovaných odběrů plazmy RC pacientů, jsme identifikovali miR-122-5p, která byla 2,9-krát zvýšená u druhého odběru v porovnání s prvním odběrem ($p < 0.001$). Asociace s odpovědí pacientů na léčbu byla pozorována u miR-142-5p. Špatní respondenti byli charakterizováni signifikantně nižší hladinou u druhého odběru v porovnání s prvním odběrem ($p < 0.001$, -10,3-násobnou). Ve validační části expresní hladiny obou miRNA u RC pacientů a CFI byly signifikantně odlišné – RC pacienti byli charakterizováni signifikantně sníženými hladinami obou miRNA oproti CFI (pro obě miRNA $p < 0.001$). Při porovnání prvního a druhého odběru u RC pacientů byl nalezen signifikantní rozdíl – pro obě miRNA se jednalo o signifikantní zvýšení hladin u druhého odběru (miR-122-5p: $p=0.0003$, 3,2-násobná změna; miR-142-5p: $p=0.0002$, 2,4-násobná změna). Pacienti, kteří odpovídali na léčbu, byli charakterizováni nárůstem expresních hladin obou miRNA v plazmě u druhého odběru a tyto hladiny již nebyly nadále signifikantně odlišné od hladin CFI. Naopak u špatných respondentů zůstaly hladiny na obdobných hodnotách jako u prvního odběru a byly stále signifikantně sníženy oproti CFI (miR-122-5p: plazma: 4,9-násobná změna, $p=0.05$; miR-142-5p: plazma: 4,5-násobná změna, $p=0.008$). U plazmatických EVs byl tento trend pozorovaný také pro miR-122-5p (4,9-násobná změna, $p=0.007$). *In vitro* studie potvrdily, že zvýšené hladiny obou miRNA souvisejí se sníženým buněčným růstem a přežíváním nádorových buněk a podpořily teorii tumor-supresorového potenciálu těchto miRNA.

4.2 Publikace č. 2 - Analýza expresních hladin miR-122-5p a miR-142-5p u pacientů s mKRK

Potenciál přežlých miRNA byl dále testován na pacientech s mKRK. V porovnání s CFI měli mKRK pacienti signifikantně sníženou hladinu miR-142-5p v čase T2. U pacientů s metastatickým RC jsme identifikovali signifikantní rozdíl v expresní hladině miR-142-5p v čase T1 mezi dobrými a špatnými respondenty ($p=0.0094$, 7,3-násobná změna). V plazmatických EVs byl pozorovaný stejný trend pro miR-142-5p (3,8-násobná změna, $p=0.05$). Pro dva pacienty ze špatné prognostické skupiny (ID01 a ID03) a jednoho pacienta z dobré prognostické skupiny (ID26) byla provedena ještě individuální analýza zahrnující také hodnoty onkomarkerů a CT snímky. Pacient ID01 byl charakterizován snížením hladin obou miRNA v plazmě i v EVs po 8 měsících od operace a 12 měsíců před viditelným relapsem. Naopak CEA a CA-19-9 byly v této periodě zvýšené a nerefletovaly náznaky relapse. U pacienta s ID03 došlo během adjuvantní chemoterapie k nárůstu expresních hladin obou miRNA (jak v plazmě, tak v EVs). Ke konci nasazené terapie ale expresní hladiny miRNA začaly prudce klesat až se dostaly na úroveň před léčbou. Po 5 měsících od ukončení terapie došlo k rozvinutí relapsu. Oproti tomu sérové markery zůstaly neměnné v průběhu terapie a neidentifikovaly výskyt relapsu. V průběhu terapie pacienta ID26 byly hladiny miRNA velmi nestabilní, nicméně na konci terapie došlo k ustálení a následně pomalému stoupání.

4.3 Publikace č. 3 – Identifikace *MALATI* amplifikace u prekancerózních lézí KRK

CGH byla úspěšně provedena u 16 párových (adenomová a přilehlá tkáň) vzorků. Všechny párové vzorky byly charakterizovány různým stupněm chromozomové nestability. Po finální analýze získaných výsledků byly stanoveny čtyři skupiny pacientů na základě opakujících se genomových změn. První skupina pacientů byla charakterizována ziskem genetického materiálu (gain) na chromozomu 11, konkrétně v oblasti 11q13.1 kódující lncRNA *MALAT-1* v adenomové tkáni. Ve druhé skupině pacientů jsme identifikovali vysoký počet mikrodeleci (například v oblastech 7q, 9p, 16p, 17q či 20q) v adenomové tkáni v porovnání s přilehlou tkání. Třetí skupina pacientů měla ve svém karyotypu obrovské ztráty i zisky v adenomové tkáni a poslední skupinou pak byla skupina pacientů, kteří nevykazovali žádné rozdíly mezi párovými tkáňovými vzorky a nebyl zde nalezen ani jediný spojovník mezi těmito pacienty. Naše studie naznačila, že právě amplifikace v genu pro lncRNA *MALATI* by mohla být důležitým krokem podílejícím se na přeměně zdravé tkáně v adenomovou.

4.4 Publikace č. 4 - Analýza cirkulující lncRNA *MALATI* jako diagnostického markeru pro KRA

Cílem této studie bylo dokázat spojitost mezi DNA aberacemi a genovou expresí *MALATI*. Dále jsme v rámci této studie stanovovali expresní hladiny *MALATI* v plazmě u pacientů s KRK, KRA a CFI pomocí RT-qPCR. Celkem 14 pacientů z pilotní studie bylo rozděleno dle přítomnosti amplifikace *MALATI*. Mezi těmito skupinami nebyl však nalezen žádný signifikantní rozdíl v expresní hladině *MALATI*. Expresní hladina *MALATI* byla v plazmě zvýšena jak u KRA pacientů, tak i KRK pacientů v porovnání s CFI (pro obě skupiny $p < 0.001$). Nejvyšší expresní hladina byla pozorována u skupiny tubulovilózních/vilózních polypů, které mají

nejvyšší riziko vzniku KRK. *MALAT1* expresní hladina byla signifikantně vyšší u špatných respondentů v porovnání s dobrými respondenty u KRK ($p=0.036$).

4.5 Publikace č. 5 - Mutační profil volné DNA v plazmě spojený s odpovědí na léčbu KRK

Celoexomové sekvenování (WES) bylo použito pro analýzu vzorků krevní plazmy 10 pacientů s rakovinou tlustého střeva. Cílem naší studie bylo detekovat genomické změny asociované s odpovědí na léčbu. Paralelně bylo provedeno také sekvenování nádorové tkáně od stejného vzorku pacientů s úmyslem porovnat mezi sebou změny v plazmě a v tkáni. Pomocí WES na tumorové DNA bylo detekováno celkem 71705 SNV a indels. Mezi nejčastěji mutované geny, dle očekávání, patřily *TP53* a *APC*. Vyšší počet mutací se vyskytoval u pacientů s vyšším stádiem onemocnění. U špatných respondentů (kromě jednoho) jsme identifikovali výskyt mutací v genech *GPR50* (c.1594A>G ac.1505_1516delCCACTGGCCACA), *TPSD1* c.274G>A (p.Ala92Thr), *CPAMD8* c.1022G>A (p.Arg341Gln) a *OBP2A* c.367_370del a naopak žádný dobrý respondent nebyl nosičem žádné z těchto variant. U několika pacientů, u kterých jsme identifikovali mutace v tumorové tkáni, se tyto mutace nevyskytovaly v cfDNA (například *TP53*, *APC* či *KRAS*). Na druhou stranu v cfDNA byla detekována mutace v genu *DCC*, která nebyla v tumorové DNA.

5. Diskuse

Přestože současný onkologický výzkum zaznamenala velký posun v oblasti diagnostiky a terapie, čísla incidence a úmrtnosti KRK nejsou uspokojivá a stále se usiluje o nalezení nových biomarkerů, které by umožnily detekovat nádor v časných stádiích, pomohli zlepšit prognózu pacienta či předpovědět odpověď pacienta na vybranou léčbu a tím pomohly v posunu personalizované medicíny. V poslední letech se pak do popředí dostala především tekutá biopsie, která, kromě jiných výhod, umožňuje opakované odběry vzorku a lepší reflexi heterogenity nádoru než tradiční biopsie. Slibnými a nejvíce studovanými kandidáty na tyto biomarkery jsou cirkulující nekódující RNA (miRNA a lncRNA) a cirkulující volná DNA.

Studium cirkulujících miRNA v plazmě bylo náplní našich dvou studií. V naší první studii byly pomocí NGS identifikovány dvě kandidátní miRNA (miR-122-5p a miR-142-5p) s největšími rozdíly mezi opakovanými odběry RC pacientů, které byly následně validovány na větším počtu RC pacientů a CFI pomocí RT-qPCR [55]. Analýzy ukázaly na signifikantní rozdíly mezi RC pacienty a CFI, a asociaci expresních hladin těchto miRNA s odpovědí pacientů na léčbu – pacienti kteří odpovídali na léčbu byly charakterizováni zvýšením expresních hladin obou miRNA po roce od diagnózy oproti hodnotě těchto miRNA v čase diagnózy. V druhé naší studii byl potenciál těchto miRNA testován ještě u mKRK, kde jsme pozorovali obdobný trend jako v předešlé publikaci.

MiR-122-5p byla dosud nejčastěji studovaná v souvislosti s hepatocelulárním karcinomem, protože bylo dokázáno, že se jedná o tkáňově specifickou miRNA pro játra a hraje důležitou roli v jaterní homeostáze tím, že reguluje velké množství cílových mRNA zapojených do nejrůznějších jaterních funkcí [56-60]. Játra jsou nejčastější lokalizací metastazování KRK a z tohoto důvodu je miR-122-5p hojně studována také u KRK [61, 62]. Žádná z dosud publikovaných studií zabývající se touto miRNA ale nebyla zaměřena na RC a níže

diskutované studie se zabývaly KRK jako souhrnnou diagnózu (C18-C20). Studie zabývající se expresními hladinami miR-122-5p v KRK jsou rozporuplné. Některé popisují zvýšené hladiny miR-122-5p v nádorových tkáních a asociaci nadměrné exprese s výskytem jaterních metastáz [63, 64]. Naopak jiné studie jsou v souladu s našimi výsledky a autoři v nádorové tkáni KRK pozorovali snížené expresní hladiny oproti přilehlé mukóze [65, 66]. Cílem našich studií bylo především zjistit, zda miR-122-5p a miR-142-5p mají vliv na účinnost terapie, a proto jsem se v diskuzi věnovala především studiím zabývajícím se efektem miR-122-5p na terapii. Ve studii O'Brien et al., studovali efekt terapie na expresní hladinu miR-122-5p v plazmě a to nejen u KRK pacientů, ale také u KRA pacientů. Autoři porovnávali dva odběry – 1. odběr byl odebrán před terapií (ať již před chirurgickým zákrokem či endoskopií nebo jakoukoliv jinou terapií), druhý pak po terapii [67]. V obou případech došlo k nárůstu expresní hladiny miR-122-5p po zvolené terapii. Zvýšená exprese miR-122-5p je spojena také se zvratem rezistence na oxaliplatinu [68]. Autoři popsali, že tento efekt je způsoben přímou interakcí miR-122-5p s antiapoptotickým proteinem XIAP, který ve vysokých koncentracích navozuje rezistenci na toto terapeutikum. V případě umělého navýšení hladiny miR-122-5p, dochází k umlčení XIAP a k nárůstu cytotoxicity nádorových buněk na oxaliplatinu. Tato interakce byla potvrzena i v *in vivo* studiích [68]. Stejně pojítka bylo popsáno i pro 5-FU. Ve studii He a kol., autoři popsali trvale sníženou hladinu miR-122-5p v nádorových buněčných liniích a necitlivost těchto buněk k 5-FU [69]. Naopak ale po umělém navýšení hladiny miR-122-5p buňky opět začaly na 5-FU reagovat. Potenciálním cílem této miRNA by pak mohl být *PKM2*, kódující pyruvátkinázu účastnící se glykolýzy. Zvýšená expresní hladina miR-122-5p potlačovala expresi *PKM2*, tím došlo k inhibici glykolýzy a zastavení růstu nádoru a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. Spousta nádorových buněk vykazuje zvýšenou glykolýzu a sníženou oxidativní fosforylaci. A právě přechod mezi těmito metabolismy (na glykolýzu) je často spojen s rezistencí na 5-FU [70]. Ve studii Sendi a kol., připravili autoři lipidovou nanopartikuli, do které byla zabalena miR-122-5p a studovali její využití jako terapeutikum *in vivo*, které by mohlo zabránit vzniku jaterních metastáz [71]. Po injekci této partikule do myši došlo ke snížení expresních hladin potenciálních cílových targetů této miRNA (*ADAM17* a *ALDOA*) a klíčových genů asociovaných s epiteliálně-mezenchymální tranzicí. Myši, do kterých byla vpravena nanopartikule s miR-122-5p měly signifikantně nižší metastatické pozadí a přežívání delší než 100 dní, zatímco myši léčené kontrolní nanopartikulí (bez miR-122-5p) nepřežily. Kromě již zmíněných potenciálních cílů byla ještě popsána interakce miR-122-5p s buněčným transportérem CAT1 či BCL-W a Ccnf1 regulující apoptózu a buněčný cyklus [65, 72]. Ve studii Yin a kol. popsali ještě spletitější interakci zahrnující cirkulární RNA (řadící se nejčastěji do skupiny lncRNA) označenou jako circ_007142 [66]. Tato cirkulární RNA funguje tak, že vychytává miR-122-5p (“sponging”) pomocí komplementární sekvence a tím nedochází k umlčení translace jejích cílových mRNA [73]. Autoři popsali negativní vazebný vztah mezi circ_007142 a miR-122-5p a zároveň popsali CDC25A jako potenciální target miR-122-5p. Jejich výsledky prokázaly, že právě circ_007142 zrychluje progresi KRK onemocnění tím, že cílí na miR-122-5p a tím pozitivně reguluje CDC25A – fosfatázu podílející se na regulaci buněčného cyklu [66].

Studie zabývající se miR-142-5p nejsou rovněž příliš konzistentní. Ve studii Islama a kol. studovali roli miR-142-5p v nádorových tkáních KRK a buněčných liniích nádorové střevní tkáně [74]. Jak v tkáních, tak i v buněčných liniích popsali autoři signifikantně zvýšené expresní hladiny v porovnání s nenádorovými

tkáněmi a asociaci vyšších hladin s lokalizací nádoru ve střevě. Tyto výsledky nejsou konzistentní s našimi výsledky, ale je tady spousta rozdílných charakteristik, které mohou mít za následek tuto neshodu. První rozdílem je diagnóza. Kohorta pacientů zahrnovala jak pacienty s nádory, tlustého střeva, tak RC pacienty a ve studii chybí informace o přesném počtu pacientů s jednotlivými diagnózami. Bylo dokázáno, že KRK je heterogenní onemocnění, a jsou zde zásadní rozdíly mezi nádory tlustého střeva a konečníku a obě tyto diagnózy by bylo vhodnější studovat samostatně [15]. To, že mohou být rozdíly v expresních profilech různých lokalizací nádoru v rámci KRK diagnózy prokázala i studie sama, neboť popsala, že nádory vyskytující se v distální části střeva (kam patří i rektum) měly signifikantně snížené hladiny miR-142-5p oproti těm v proximální části střeva. Stejnou závislost prokázala i naše další studie, kdy jsme signifikantní změny pro miR-142-5p mezi jednotlivými odběry mKRK pacientů pozorovali také až po stratifikaci na nádory konečníku a tlustého střeva. Další zásadní rozdíl je také v typu biologického materiálu, neboť Islam a kol., analyzovali miR-142-5p v tkáních, zatímco my se zaměřili na cirkulující miRNA v plazmě. *In vitro* studie byly provedeny na odlišných buněčných liniích vycházejících z nádoru tlustého střeva (SW480 a HCT116) a naopak, naše studie byla zaměřena na rektální nádorové linie (SW1463, HRA16). Zvýšené hladiny těchto miRNA byly popsány i v dalších studiích [75-77]. Naopak ve studii Kong a kol., a dalších, autoři identifikovali sníženou expresní hladinu miR-142-5p v nádorové tkáni oproti zdravé tkáni a spousta studií tento tumorsupresorový potenciál spolu s asociací s terapií popsala také [77-80]. Jednou z těchto studií je studie od kolektivu Shi a kol., která popsala snížené hladiny této miRNA v nádorové tkáni oproti přilehlé tkáni a dále také popsala, že hladiny miR-142-5p se zvyšovaly poté, co pacienti obdrželi chemoterapii [78]. Neoadjuvantní chemoterapie měla za následek také nárůst expresních hladin miR-142-5p u RC pacientů [77]. Nejnovější studie z tohoto roku se zabývala korelací expresních profilů miRNA a jejich asociací s odpovědí na léčbu na bázi irinotekanu v séru u pacientů s mKRK. Autoři popsali 10 downregulovaných miRNA u špatných respondentů, mezi které patřila také miR-142-5p a miR-122-5p. Výsledky této studie podporují naše výsledky neboť obě tyto miRNA jsme objevili jako downregulované u pacientů se špatnou odpovědí na léčbu a to jak u mKRK, tak i u primárních nádorů. Autoři také popsali pomocí luciferázové eseje potenciální cíl této miRNA – *EPAS1* [80]. Produkt genu *EPAS1* je jednou z podjednotek HIF α , který je transkripční regulátor adaptivní odpovědi na hypoxii a právě hypoxie je jedním z hlavních faktorů, které vedou k nádorové angiogenezi a jeho zvýšená exprese byla již u KRK popsána [81-83]. U genu *SDHB* kódujícího sukcinát dehydrogenázu B, která je účastní Krebsova cyklu, buněčné proliferace, ale i apoptózy, byla také popsána spojitost s miR-142-5p, která ji negativně reguluje. Deficience *SDHB* je pak spojena s přechodem buněk z oxidativní fosforylace na aerobní glykolýzu, která má za následek zvýšenou kyselost mikroprostředí nádoru, která souvisí s horším rozpoznáváním nádorových buněk imunitním systémem [84, 85]. Dalšími potenciálními cílovými mRNA by mohly být *TIAMI*, zapojený do Wnt dráhy, či tumorsupresorový gen *KLF6* ovlivňující buněčný cyklus [74, 79, 86, 87]. Souhrnně lze říci, že většina studií popsala, že miR-122-5p i miR-142-5p mají tumorsupresorový účinek a jejich zvýšené hladiny jsou spojeny s vyšší senzitivitou na různá chemoterapeutika a tím příznivou odpovědí na léčbu. Tyto poznatky jsou v souladu s naším výzkumem, kde jsme prokázali také tumorsupresorový potenciál miR-122-5p a miR-142-5p a popsali, že zvýšené hladiny těchto miRNA jsou spjaty s pozitivní odezvou na léčbu a to jak u pacientů s primárním, tak i metastatickým KRK.

Dlouhé nekódující RNA byly dlouho ve stínu miRNA a jejich výzkum byl upozaděn, nejspíše z důvodu toho, že se dlouho myslelo, že nemají žádnou funkci a byly považované za tzv. “junk” nukleové kyseliny [40, 88]. Jak již bylo zmíněno, jedním z hlavních kroků vedoucích ke snížení úmrtnosti KRK je časná diagnóza, ideálně detekce onemocnění ještě ve fázi prekancerózních lézí – adenomů, které mohou být lehce odstranitelné kolonoskopií [89]. Toto vyšetření sebou nese ale několik limitací, kvůli kterým se mu pacienti snaží vyhýbat. Z tohoto důvodu jsme se v naší studii chtěli identifikovat kandidátní biomarkery, které by odhalily výskyt adenomu, potažmo KRK. Takovým kandidátem by dle našich výsledků mohla být lncRNA *MALATI*, jejíž amplifikace byla identifikovaná v adenomové tkáni a jejichž expresní hladiny v plazmě byly schopné rozlišit pacienty s KRK a KRA od CFI [90].

MALATI byl většinou zkoumán ve spojitosti s karcinomem plic, kde zvýšená hladina *MALATI* korelovala s progresí onemocnění a vznikem metastáz a celkově horší prognózou onemocnění [91, 92]. Naše studie je jednou z prvních prací zabývajících se lncRNA *MALATI* ve spojitosti s KRA. Studie vedená skupinou Radwan et al., je jediná studie, dle našeho vědomí, analyzující i KRA pacienty [93]. Tato studie popsala zvýšené expresní hladiny *MALATI* u KRK i KRA pacientů v porovnání s kontrolními osobami. Navíc ještě identifikovala přítomnost jednonukleotidového polymorfizmu (SNP) rs3200401 v genu pro *MALATI* jako rizikový faktor pro vznik KRK, který byl prokázán jako rizikový i další vědeckou skupinou [94]. Studií zabývajících se *MALATI* u KRK je mnohem více a často popisují jeho asociaci s účinností terapie [95-97]. Vyšší expresní hladina *MALATI* byla nalezena v nádorové tkáni oproti nenádorové tkáni a je asociována se stádiem onemocnění, výskytem metastáz, postižením uzlin i kratším přežíváním [95, 98-100]. Tyto výsledky jsou v souladu s našimi, neboť již několik studií již prokázalo spojitost genové amplifikace s nadměrnou expresí [101, 102]. Tím, že jsme *MALATI* objevili amplifikovaný v adenomové tkáni, čekali bychom, že i jeho expresní hladina bude právě v adenomové, popřípadě nádorové tkáni, zvýšená. V naší studii jsme také popsali asociaci *MALATI* s odpovědí na terapii u KRK pacientů – u pacientů, kteří hůře reagovali na léčbu a měli horší prognózu byly popsány signifikantně zvýšené expresní hladiny *MALATI* v plazmě. Studie Li a kol., analyzovala expresní hladiny *MALATI* v opakovaných odběrech séra mKRK pacientů [95]. Tito pacienti byli rozděleni do dvou skupiny podle to, zda odpovídali nebo neodpovídali na léčbu založené na oxaliplatině. Pacienti, kteří neodpovídali na tento typ terapie měli v odběru v čase diagnózy rovněž vyšší hladiny *MALATI*. Stejná korelace byla popsána i několika dalšími studii [103, 104]. Podle studií by *MALATI* mohl regulovat rezistenci na oxaliplatinu skrz interakci s miR-218 a následně s *EZH2*, nebo přes signální dráhu miR-324-3p a *ADAM17* či přímou interakci přes miR-200s [95, 103, 104]. To, že *MALATI* by mohl mít efekt i na odpověď pacientů na léčbu 5-FU potvrdilo i několik dalších studií, zabývajících se funkční analýzou *MALATI* [105, 106]. Tuto asociaci podporuje fakt, že *MALATI* interaguje s několika miRNA (miR-197-3p, miR-203a-3p a miR-375-3p), které cílí na tymidylát syntázu – enzym, který je nezbytný pro replikaci a opravu DNA a je jedním z cílů 5-FU terapie [107-109].

Volná DNA je první z cirkulujících nukleových kyselin, která byla zkoumána v souvislosti s jejím potenciálem jako nádorového biomarkeru [51]. Autoři v této studii popsali významné rozdíly v koncentraci cfDNA v séru pacientů s různými nádorovými onemocněními a zdravými jedinci. Od této doby výzkum cfDNA pokročil, a kromě měření koncentrace cfDNA bylo zjištěno, že cfDNA může být analyzována v

souvislosti s metylačním profilem, mikrosatelitovou nestabilitou či může nést nejružnější mutace genů včetně těch s onkogenní či tumorsupresorovou funkcí a některé analýzy cfDNA již byly zavedeny v klinické praxi [54, 110-112].

Cílem naší studie bylo identifikovat nové SNV v plazmatické cfDNA, které by souvisely s odpovědí pacientů na léčbu a dále porovnat výsledky s nalezenými mutacemi v tkáni. V naší studii jsme sekvenovali 10 pacientů s nádory tlustého střeva pomocí metody WES. V tumorové DNA se nám podařilo popsat dosud nepopsané varianty spojené s odpovědí pacientů na terapii (*GPR50* (c.1594A>G and c.1505_1516delCCACTGGCCACA), *TPSD1* c.274G>A (p.Ala92Thr), *CPAMD8* c.1022G>A (p.Arg341Gln) a *OBP2A* c.367_370del). Přestože některé specifické mutace identifikované z tumorové tkáně nebyly nalezeny v cfDNA, povedlo se nám však identifikovat mutaci v genu *DCC*, která nebyla detekována v tumoru. Přestože již bylo dosaženo významného pokroku v cíleném sekvenování pomocí předem připravených genových panelů, celoexomové sekvenování by mohlo přinést mnohem komplexnější analýzu. Tento přístup by mohl identifikovat i nové dosud nepopsané varianty, které tak mohou vést například k objevení mechanismu, jakým si nádorové buňky získaly rezistenci či dalších znaků ovlivňující účinnost léčby. Kromě již zmíněných SNV bylo prokázáno, že pomocí WES mohou být identifikované také různé fúzní geny, přestavby genů či různá variabilita v počtu kopií specifických úseků genomu [113-115].

Metaanalýza provedená skupinou Bos a kol., ukázala, že citlivost v detekci SNV mezi cfDNA tumorovou tkání je cca okolo 50 % - tzn. 50% SNV přítomných v nádorové tkáni je detekované také v cfDNA [116]. Autoři diskutovali, co je důvodem poměrně nízké citlivosti. Jedním z těchto parametrů by mohl být biologický materiál – ideálnější pro analýzu je cfDNA z plazmy, protože sérová cfDNA disponuje velkým cfDNA pozadím, protože v séru dochází k lýzy lymfocytů, ze kterých se uvolňuje DNA. Dalším důvodem může být také nízká frakce ctDNA v cfDNA. Citlivost WES se zvyšuje při analýze vzorků s frakcí ctDNA vyšší než 25 %. Dosud byly publikované jen dvě studie zabývající se WES u KRK [117, 118]. Ve studii Toledo a kol., analyzovali pomocí WES DNA z plazmy a tumoru od jednoho pacienta s mKRK, který měl jaterní i plicní metastáze, ale nebyla u něj přítomna žádná mutace v “hot-spot” genech *KRAS/NRAS/PIK3CA/BRAF*. WES analýza prokázala, že v cfDNA se také nevyskytovala mutace ve výše zmíněných genech. V cfDNA detekovali 73 % mutací, které byly detekovány i v tumoru, a navíc v plazmě bylo objeveno 14 mutací, které nebyly identifikovány v nádoru. Jedna z těchto mutací byla mutace v genu *KDR* (c.2518C>T) vedoucí ke změně v receptoru VEGFR [118]. Tato mutace byla následně potvrzena i pomocí PCR a testována *in vitro* a *in vivo* [119]. Autoři popsali, že právě tato mutace způsobovala silnou rezistenci k antiangiogenním terapeutikům. Druhá studie pak analyzovala pomocí WES SNV v plazmě, moči a tumorové tkáni. Studie zahrnovala 4 pacienty s mKRK. Shoda mezi těmito biologickými materiály se pohybovala mezi 28-57 %. Při porovnání plazmy a moči jako zdroje cfDNA, byl počet SNV i frakce tumorové ctDNA v cfDNA srovnatelný [117]. Několik dalších studií se zabývalo WES analýzou u různých nádorových onemocněních a % shody mezi cfDNA a DNA z tumorové tkáně se většinou pohybovalo od 50 % až po 99 % [120-124]. Několik studií však popsalo identifikaci mutací v cfDNA, které naopak nebyly identifikované v tumorové DNA, a to včetně naší studie [52, 116, 123]. SNV detekované pouze v cfDNA odrážejí fakt, že jsou nádory tvořeny heterogenní populací buněk, a ne vždy je mutační profil identický v celé nádorové tkáni. V naší studii se nám také povedlo

popsat mutaci v genu *DCC* v cfDNA, která naopak nebyla nalezena v tumorové tkáni. Jednalo se o pacienta se čtvrtým stádiem onemocnění, což znamená, že mutace nemusela pocházet z primárního nádoru, ale mohlo se jednat o mutaci pocházející z metastatického útvaru. *DCC* gen kóduje protein DCC, který je transmembránovým receptorovým proteinem podílejícím se na navádění růstu axonů a byl popsán jako potenciální tumor supresorový gen [125-127]. V tumorové DNA jsme identifikovali i dosud nepopsané varianty s nejistým významem. (*GPR50* (c.1594A>G a c.1505_1516delCCACTGGCCACA), *TPSD1* c.274G>A (p.Ala92Thr), *CPAMD8* c.1022G>A (p.Arg341Gln) a *OBP2A* c.367_370del), jejichž výskyt se lišil mezi špatnými a dobrými respondenty. Ve studii Saha a kol., popsali protein GPR50 jako upregulovaný u pacientů s hepatocelulárním karcinomem a autoři naznačili, že by se mohl podílet na zpomalení progresu nádorového onemocnění přímou interakcí s proteinem ADAM17 podílejícím se na regulaci Notch signalizace [128]. Přítomnost mutace tohoto genu u KRK pacientů potvrdila i studie Hendricks a kol. [129]. TPSD je proteáza jejíž funkce zatím nebyla příliš dobře prozkoumána, ale mutace v tomto genu již jednou byla popsána u pacientů s pankreatickým karcinomem [130]. Co se týče genů *CPAMD8* a *OBP2A*, tak ty zatím nebyly popsány v žádné studii v souvislosti s nádorovými onemocněními.

Přesto, že naše studie i spousta dalších poukazují na slibný přístup tekuté biopsie na poli onkologie, stále jsou potřeba další obsáhlé výzkumy. WES, ale i další analýzy, které jsme aplikovali v našich pracích jsou stále ve fázi vývoje a vylepšování technických i biologických parametrů, které by mohly zvýšit senzitivitu a specifitu těchto analýz. Zdokonalení těchto metod by mohlo vést k identifikaci nových nádorových biomarkerů, které by pomohly s personalizací medicíny.

6. Závěry

Nádorové biomarkery, které by pomohly s časnou diagnostikou KRK či KRA, předpovídaly odpověď pacienta na vybranou léčbu a pomohly tím precizní medicíně, jsou stále důležitým tématem vědecké komunity. V poslední dekádě se do popředí dostala především tekutá biopsie, která může poskytnout rozšířenější informace o molekulárním stavu nádoru a přináší spoustu dalších výhod. Cílem našich studií bylo dokázat, že miRNA, lncRNA a cfDNA mohou být slibnými biomarkery tekuté biopsie.

V plazmě RC pacientů byly identifikovány dvě miRNA (miR-122-5p a miR-142-5p), které byly schopné nejenom rozlišit RC pacienty od zdravých kontrol, ale zároveň i predikovat odpověď pacientů na léčbu, a to jak u pacientů s primárním RC, tak i metastatickým. Tumor-supresorový potenciál těchto miRNA jsme potvrdili i v *in vitro* studiích. Potenciál lncRNA jako nových nádorových biomarkerů jsme prokázali pro lncRNA *MALAT1*. V naší studii jsme identifikovali amplifikaci *MALAT1* vyskytující se v adenomové tkáni, ale chybějící v přilehlé mukóze. Expresní hladina *MALAT1* v plazmě pak dokázala stratifikovat KRA a KRK pacienty od CFI a také prokázala potenciál prediktivního biomarkeru u KRK pacientů. Pomocí WES jsme porovnávali plazmatickou cfDNA a DNA pocházející z nádorové tkáně. V tumorové DNA se nám podařilo popsát dosud nepopsané varianty spojené s odpovědí pacientů na terapii (*GPR50* (c.1594A>G and c.1505_1516delCCACTGGCCACA), *TPSD1* c.274G>A (p.Ala92Thr), *CPAMD8* c.1022G>A (p.Arg341Gln) a *OBP2A* c.367_370del). Přestože některé specifické mutace identifikované z tumorové tkáně nebyly nalezeny v cfDNA, povedlo se nám však identifikovat mutaci v genu *DCC*, která nebyla detekována v tumoru.

Tato disertační práce navrhla, případně ověřila, několik potenciálních kandidátních biomarkerů tekuté biopsie, které by mohly pomoci s časnější diagnostikou, zlepšit prognózu onemocnění a predikovat reakci pacientů KRK na zvolenou léčbu. I přes veškeré poznatky je potřeba dalších nezávislých studií, včetně těch klinických, které by mohly tyto výsledky ověřit na nezávislé početnější kohortě pacientů a případně popsat jejich přesný biologický mechanismus a tím zajistit jejich další posun k zavedení do klinické praxe.

7. Použitá literatura

1. Siegel, R.L., et al., *Cancer statistics, 2023*. CA Cancer J Clin, 2023. **73**(1): p. 17-48.
2. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
3. Rawla, P., T. Sunkara, and A. Barsouk, *Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors*. Prz Gastroenterol, 2019. **14**(2): p. 89-103.
4. Lansdorp-Vogelaar, I., et al., *Contribution of screening and survival differences to racial disparities in colorectal cancer rates*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. **21**(5): p. 728-36.
5. Carethers, J.M. and B.H. Jung, *Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer*. Gastroenterology, 2015. **149**(5): p. 1177-1190 e3.
6. Yamagishi, H., et al., *Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers*. Chin J Cancer, 2016. **35**: p. 4.
7. Sin, S.H., et al., *A Case of Sporadic Multiple Colonic Polyps in a Young Woman*. Curr Oncol, 2023. **30**(2): p. 1293-1299.
8. Lewandowska, A., et al., *Title: Risk Factors for the Diagnosis of Colorectal Cancer*. Cancer Control, 2022. **29**: p. 10732748211056692.
9. Bagnardi, V., et al., *Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis*. Br J Cancer, 2015. **112**(3): p. 580-93.
10. Wang, L., et al., *Risk Factors and Incidence of Colorectal Cancer According to Major Molecular Subtypes*. JNCI Cancer Spectr, 2021. **5**(1).
11. Murphy, N., et al., *Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility*. Mol Aspects Med, 2019. **69**: p. 2-9.
12. Ebell, M.H., T.N. Thai, and K.J. Royalty, *Cancer screening recommendations: an international comparison of high income countries*. Public Health Rev, 2018. **39**: p. 7.
13. Roslani, A.C., T. Abdullah, and K. Arumugam, *Screening for colorectal neoplasias with fecal occult blood tests: false-positive impact of non-dietary restriction*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(1): p. 237-41.
14. Gordon, P.H., *Screening for colorectal carcinoma*. Curr Oncol, 2010. **17**(2): p. 34-9.
15. Paschke, S., et al., *Are Colon and Rectal Cancer Two Different Tumor Entities? A Proposal to Abandon the Term Colorectal Cancer*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).
16. Tamas, K., et al., *Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site*. Cancer Treat Rev, 2015. **41**(8): p. 671-9.
17. Des Guetz, G., et al., *Does delaying adjuvant chemotherapy after curative surgery for colorectal cancer impair survival? A meta-analysis*. Eur J Cancer, 2010. **46**(6): p. 1049-55.
18. Gao, P., et al., *Impact of timing of adjuvant chemotherapy on survival in stage III colon cancer: a population-based study*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 234.
19. Wagner, T.D., M.G. Fakih, and G.Y. Yang, *Management of stage II/III rectal cancer*. J Gastrointest Oncol, 2010. **1**(2): p. 112-9.
20. Wang, J., et al., *Metastatic patterns and survival outcomes in patients with stage IV colon cancer: A population-based analysis*. Cancer Med, 2020. **9**(1): p. 361-373.
21. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
22. Duffy, M.J., *Tumor markers in clinical practice: a review focusing on common solid cancers*. Med Princ Pract, 2013. **22**(1): p. 4-11.
23. Srivastava, S. and R. Gopal-Srivastava, *Biomarkers in cancer screening: a public health perspective*. J Nutr, 2002. **132**(8 Suppl): p. 2471S-2475S.

24. Califf, R.M., *Biomarker definitions and their applications*. Exp Biol Med (Maywood), 2018. **243**(3): p. 213-221.
25. Davis, J.W., *Biomarker classification, validation, and what to look for in 2017 and beyond*. BJU Int, 2017. **119**(5): p. 812-814.
26. Sechidis, K., et al., *Distinguishing prognostic and predictive biomarkers: an information theoretic approach*. Bioinformatics, 2018. **34**(19): p. 3365-3376.
27. Brand, T.M. and D.L. Wheeler, *KRAS mutant colorectal tumors: past and present*. Small GTPases, 2012. **3**(1): p. 34-9.
28. Xie, Y.H., Y.X. Chen, and J.Y. Fang, *Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer*. Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 22.
29. Livingstone, A.S., et al., *Carcinoembryonic antigen in the diagnosis and management of colorectal carcinoma. Current status*. Arch Surg, 1974. **109**(2): p. 259-64.
30. Topdagi, O. and A. Timuroglu, *Evaluation of the Relationship between Carcinoembryonic Antigen and TNM Stage in Colorectal Cancer*. Eurasian J Med, 2018. **50**(2): p. 96-98.
31. Hirahata, T., et al., *Liquid Biopsy: A Distinctive Approach to the Diagnosis and Prognosis of Cancer*. Cancer Inform, 2022. **21**: p. 11769351221076062.
32. Zhuo, Y., et al., *miRNAs: biogenesis, origin and evolution, functions on virus-host interaction*. Cell Physiol Biochem, 2013. **32**(3): p. 499-510.
33. Didiano, D. and O. Hobert, *Molecular architecture of a miRNA-regulated 3' UTR*. RNA, 2008. **14**(7): p. 1297-317.
34. Peng, Y. and C.M. Croce, *The role of MicroRNAs in human cancer*. Signal Transduct Target Ther, 2016. **1**: p. 15004.
35. Weber, J.A., et al., *The microRNA spectrum in 12 body fluids*. Clin Chem, 2010. **56**(11): p. 1733-41.
36. Turchinovich, A., et al., *Characterization of extracellular circulating microRNA*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(16): p. 7223-33.
37. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
38. Kupec, T., et al., *Stability of circulating microRNAs in serum*. PLoS One, 2022. **17**(8): p. e0268958.
39. Glinge, C., et al., *Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs - Pre-Analytic Methodological Considerations*. PLoS One, 2017. **12**(2): p. e0167969.
40. Policarpo, R., et al., *From Junk to Function: LncRNAs in CNS Health and Disease*. Front Mol Neurosci, 2021. **14**: p. 714768.
41. Ma, L., V.B. Bajic, and Z. Zhang, *On the classification of long non-coding RNAs*. RNA Biol, 2013. **10**(6): p. 925-33.
42. Sun, Q., Q. Hao, and K.V. Prasanth, *Nuclear Long Noncoding RNAs: Key Regulators of Gene Expression*. Trends Genet, 2018. **34**(2): p. 142-157.
43. Gao, N., et al., *Long Non-Coding RNAs: The Regulatory Mechanisms, Research Strategies, and Future Directions in Cancers*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 598817.
44. Statello, L., et al., *Author Correction: Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. **22**(2): p. 159.
45. Biderman Waberski, M., et al., *Urine cell-free DNA is a biomarker for nephroblastomatosis or Wilms tumor in PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS)*. Genet Med, 2018. **20**(9): p. 1077-1081.
46. Sidransky, D., et al., *Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples*. Science, 1991. **252**(5006): p. 706-9.
47. Mithani, S.K., et al., *Mitochondrial resequencing arrays detect tumor-specific mutations in salivary rinses of patients with head and neck cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(24): p. 7335-40.
48. Bera, A., et al., *Circulating Cell-free DNA in Serum as a Marker for the Early Detection of Tumor Recurrence in Breast Cancer Patients*. Cancer Diagn Progn, 2022. **2**(3): p. 285-292.
49. Vymetalkova, V., et al., *Circulating Cell-Free DNA and Colorectal Cancer: A Systematic Review*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(11).
50. Cervena, K., P. Vodicka, and V. Vymetalkova, *Diagnostic and prognostic impact of cell-free DNA in human cancers: Systematic review*. Mutat Res Rev Mutat Res, 2019. **781**: p. 100-129.
51. Leon, S.A., et al., *Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy*. Cancer Res, 1977. **37**(3): p. 646-50.
52. Cervena, K., et al., *Mutational landscape of plasma cell-free DNA identifies molecular features associated with therapeutic response in patients with colon cancer. A pilot study*. Mutagenesis, 2021. **36**(5): p. 358-368.

53. Han, X., et al., *MSIsensor-ct: microsatellite instability detection using cfDNA sequencing data*. *Brief Bioinform*, 2021. **22**(5).
54. Liu, J., et al., *Genome-wide cell-free DNA methylation analyses improve accuracy of non-invasive diagnostic imaging for early-stage breast cancer*. *Mol Cancer*, 2021. **20**(1): p. 36.
55. Cervena, K., et al., *Analysis of MicroRNA Expression Changes During the Course of Therapy In Rectal Cancer Patients*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 702258.
56. Jopling, C., *Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function*. *RNA Biol*, 2012. **9**(2): p. 137-42.
57. Fu, X. and G.A. Calin, *miR-122 and hepatocellular carcinoma: from molecular biology to therapeutics*. *EBioMedicine*, 2018. **37**: p. 17-18.
58. Ha, S.Y., et al., *Prognostic significance of miR-122 expression after curative resection in patients with hepatocellular carcinoma*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 14738.
59. Wei, X., et al., *Over-expression of MiR-122 promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma via targeting TLR4*. *Ann Hepatol*, 2019. **18**(6): p. 869-878.
60. Thakral, S. and K. Ghoshal, *miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir*. *Curr Gene Ther*, 2015. **15**(2): p. 142-50.
61. Kow, A.W.C., *Hepatic metastasis from colorectal cancer*. *J Gastrointest Oncol*, 2019. **10**(6): p. 1274-1298.
62. Carter, J.V., et al., *A Highly Predictive Model for Diagnosis of Colorectal Neoplasms Using Plasma MicroRNA: Improving Specificity and Sensitivity*. *Ann Surg*, 2016. **264**(4): p. 575-84.
63. Maierthaler, M., et al., *Plasma miR-122 and miR-200 family are prognostic markers in colorectal cancer*. *Int J Cancer*, 2017. **140**(1): p. 176-187.
64. Sun, L., et al., *Serum exosomal miR-122 as a potential diagnostic and prognostic biomarker of colorectal cancer with liver metastasis*. *J Cancer*, 2020. **11**(3): p. 630-637.
65. Li, H., et al., *MiR-122 Promotes the Development of Colon Cancer by Targeting ALDOA In Vitro*. *Technol Cancer Res Treat*, 2019. **18**: p. 1533033819871300.
66. Yin, W., et al., *Circular RNA circ_0007142 Facilitates Colorectal Cancer Progression by Modulating CDC25A Expression via miR-122-5p*. *Onco Targets Ther*, 2020. **13**: p. 3689-3701.
67. O'Brien, S.J., et al., *Circulating plasma microRNAs in colorectal neoplasia: A pilot study in assessing response to therapy*. *Transl Oncol*, 2021. **14**(1): p. 100962.
68. Hua, Y., et al., *miR-122 Targets X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein to Sensitize Oxaliplatin-Resistant Colorectal Cancer Cells to Oxaliplatin-Mediated Cytotoxicity*. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **51**(5): p. 2148-2159.
69. He, J., et al., *Overexpression of microRNA-122 re-sensitizes 5-FU-resistant colon cancer cells to 5-FU through the inhibition of PKM2 in vitro and in vivo*. *Cell Biochem Biophys*, 2014. **70**(2): p. 1343-50.
70. Zhou, Y., et al., *Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells*. *Cancer Res*, 2012. **72**(1): p. 304-14.
71. Sendi, H., et al., *Nanoparticle Delivery of miR-122 Inhibits Colorectal Cancer Liver Metastasis*. *Cancer Res*, 2022. **82**(1): p. 105-113.
72. Iino, I., et al., *Effect of miR-122 and its target gene cationic amino acid transporter 1 on colorectal liver metastasis*. *Cancer Sci*, 2013. **104**(5): p. 624-30.
73. Panda, A.C., *Circular RNAs Act as miRNA Sponges*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. **1087**: p. 67-79.
74. Islam, F., et al., *MiR-142-5p act as an oncogenic microRNA in colorectal cancer: Clinicopathological and functional insights*. *Exp Mol Pathol*, 2018. **104**(1): p. 98-107.
75. Vychytilova-Faltejskova, P., et al., *Serum-based microRNA signatures in early diagnosis and prognosis prediction of colon cancer*. *Carcinogenesis*, 2016. **37**(10): p. 941-950.
76. Yin, Y., et al., *Systematic analysis of key miRNAs and related signaling pathways in colorectal tumorigenesis*. *Gene*, 2016. **578**(2): p. 177-84.
77. Kunigenas, L., et al., *3D Cell Culture-Based Global miRNA Expression Analysis Reveals miR-142-5p as a Theranostic Biomarker of Rectal Cancer Following Neoadjuvant Long-Course Treatment*. *Biomolecules*, 2020. **10**(4).
78. Shi, D., et al., *Transcatheter arterial infusion chemotherapy increases expression level of miR-142-5p in stage III colorectal cancer*. *Indian J Cancer*, 2015. **52 Suppl 2**: p. e47-55.
79. Kong, W., et al., *Diagnostic Value of miR-142-5p and Tiam-1 in Colon Cancer Patients*. *Clin Lab*, 2019. **65**(12).

80. Pliakou, E., et al., *Circulating miRNA Expression Profiles and Machine Learning Models in Association with Response to Irinotecan-Based Treatment in Metastatic Colorectal Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2022. **24**(1).
81. Pan, R., et al., *Endothelial PAS domain protein 1 gene hypomethylation is associated with colorectal cancer in Han Chinese*. *Exp Ther Med*, 2018. **16**(6): p. 4983-4990.
82. Mohammed, N., et al., *EPAS1 mRNA in plasma from colorectal cancer patients is associated with poor outcome in advanced stages*. *Oncol Lett*, 2011. **2**(4): p. 719-724.
83. Yoshimura, H., et al., *Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(24): p. 8554-60.
84. Liu, S., et al., *miR-142-5p promotes development of colorectal cancer through targeting SDHB and facilitating generation of aerobic glycolysis*. *Biomed Pharmacother*, 2017. **92**: p. 1119-1127.
85. Gu, Z., et al., *NEK2 Promotes Aerobic Glycolysis in Multiple Myeloma Through Regulating Splicing of Pyruvate Kinase*. *J Hematol Oncol*, 2017. **10**(1): p. 17.
86. Diamantopoulou, Z., et al., *TIAM1 Antagonizes TAZ/YAP Both in the Destruction Complex in the Cytoplasm and in the Nucleus to Inhibit Invasion of Intestinal Epithelial Cells*. *Cancer Cell*, 2017. **31**(5): p. 621-634 e6.
87. Andreoli, V., R.C. Gehrau, and J.L. Bocco, *Biology of Kruppel-like factor 6 transcriptional regulator in cell life and death*. *IUBMB Life*, 2010. **62**(12): p. 896-905.
88. Ling, H., et al., *Junk DNA and the long non-coding RNA twist in cancer genetics*. *Oncogene*, 2015. **34**(39): p. 5003-11.
89. Atkin, W., et al., *Adenoma surveillance and colorectal cancer incidence: a retrospective, multicentre, cohort study*. *Lancet Oncol*, 2017. **18**(6): p. 823-834.
90. Siskova, A., et al., *Discovery of Long Non-Coding RNA MALAT1 Amplification in Precancerous Colorectal Lesions*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **23**(14): p. 7656.
91. Ji, P., et al., *MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer*. *Oncogene*, 2003. **22**(39): p. 8031-41.
92. Schmidt, L.H., et al., *The long noncoding MALAT-1 RNA indicates a poor prognosis in non-small cell lung cancer and induces migration and tumor growth*. *J Thorac Oncol*, 2011. **6**(12): p. 1984-92.
93. Radwan, A.F., et al., *Association of MALAT1 and PVT1 Variants, Expression Profiles and Target miRNA-101 and miRNA-186 with Colorectal Cancer: Correlation with Epithelial-Mesenchymal Transition*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(11).
94. Wang, W., et al., *The contribution of MALAT1 gene rs3200401 and MEG3 gene rs7158663 to the risk of lung, colorectal, gastric and liver cancer*. *Pathol Res Pract*, 2022. **240**: p. 154212.
95. Li, P., et al., *MALAT1 Is Associated with Poor Response to Oxaliplatin-Based Chemotherapy in Colorectal Cancer Patients and Promotes Chemoresistance through EZH2*. *Mol Cancer Ther*, 2017. **16**(4): p. 739-751.
96. Shen, W., et al., *Upregulation of Long Noncoding RNA MALAT1 in Colorectal Cancer Promotes Radioresistance and Aggressive Malignance*. *Int J Gen Med*, 2022. **15**: p. 8365-8380.
97. Matuszyk, J., *MALAT1-miRNAs network regulate thymidylate synthase and affect 5FU-based chemotherapy*. *Mol Med*, 2022. **28**(1): p. 89.
98. Sun, Z., et al., *YAP1-induced MALAT1 promotes epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis by sponging miR-126-5p in colorectal cancer*. *Oncogene*, 2019. **38**(14): p. 2627-2644.
99. Qiu, G., et al., *Dysregulation of MALAT1 and miR-619-5p as a prognostic indicator in advanced colorectal carcinoma*. *Oncol Lett*, 2016. **12**(6): p. 5036-5042.
100. Zheng, H.T., et al., *High expression of lncRNA MALAT1 suggests a biomarker of poor prognosis in colorectal cancer*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**(6): p. 3174-81.
101. Hyman, E., et al., *Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer*. *Cancer Res*, 2002. **62**(21): p. 6240-5.
102. Vogt, N., et al., *Relationships linking amplification level to gene over-expression in gliomas*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e14249.
103. Wei, Z., et al., *Zuo Jin Wan Reverses the Resistance of Colorectal Cancer to Oxaliplatin by Regulating the MALAT1/miR-200s/JNK Signaling Pathway*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022. **2022**: p. 3032407.
104. Fan, C., et al., *Long non-coding RNA MALAT1 regulates oxaliplatin-resistance via miR-324-3p/ADAM17 axis in colorectal cancer cells*. *Cancer Cell Int*, 2020. **20**: p. 473.

105. Tang, D., et al., *Inhibition of MALAT1 reduces tumor growth and metastasis and promotes drug sensitivity in colorectal cancer*. Cell Signal, 2019. **57**: p. 21-28.
106. Ak Aksoy, S., et al., *Early-stage colon cancer with high MALAT1 expression is associated with the 5-Fluorouracil resistance and future metastasis*. Mol Biol Rep, 2022. **49**(12): p. 11243-11253.
107. Yang, T., et al., *LncRNA MALAT1 Depressed Chemo-Sensitivity of NSCLC Cells through Directly Functioning on miR-197-3p/p120 Catenin Axis*. Mol Cells, 2019. **42**(3): p. 270-283.
108. Yu, L., et al., *Long noncoding RNA MALAT1 participates in the pathological angiogenesis of diabetic retinopathy in an oxygen-induced retinopathy mouse model by sponging miR-203a-3p*. Can J Physiol Pharmacol, 2020. **98**(4): p. 219-227.
109. Zhao, L., et al., *lncRNA MALAT1 modulates cancer stem cell properties of liver cancer cells by regulating YAP1 expression via miR-375 sponging*. Mol Med Rep, 2020. **22**(2): p. 1449-1457.
110. Vidula, N., et al., *Detection of microsatellite instability high (MSI-H) status by targeted plasma-based genotyping in metastatic breast cancer*. NPJ Breast Cancer, 2022. **8**(1): p. 117.
111. Liebs, S., et al., *Detection of mutations in circulating cell-free DNA in relation to disease stage in colorectal cancer*. Cancer Med, 2019. **8**(8): p. 3761-3769.
112. Vitale, S.R., et al., *TP53 Mutations in Serum Circulating Cell-Free Tumor DNA As Longitudinal Biomarker for High-Grade Serous Ovarian Cancer*. Biomolecules, 2020. **10**(3).
113. Yang, L., et al., *Analyzing Somatic Genome Rearrangements in Human Cancers by Using Whole-Exome Sequencing*. Am J Hum Genet, 2016. **98**(5): p. 843-856.
114. Zhao, L., et al., *Comparative study of whole exome sequencing-based copy number variation detection tools*. BMC Bioinformatics, 2020. **21**(1): p. 97.
115. Deng, W., et al., *Fusion Gene Detection Using Whole-Exome Sequencing Data in Cancer Patients*. Front Genet, 2022. **13**: p. 820493.
116. Bos, M.K., et al., *Whole exome sequencing of cell-free DNA - A systematic review and Bayesian individual patient data meta-analysis*. Cancer Treat Rev, 2020. **83**: p. 101951.
117. Crisafulli, G., et al., *Whole exome sequencing analysis of urine trans-renal tumour DNA in metastatic colorectal cancer patients*. ESMO Open, 2019. **4**(6).
118. Toledo, R.A., et al., *Whole-exome sequencing of matched germline and plasma cell-free DNA portrays the somatic mutation landscape of refractory metastatic colorectal cancer and identifies mutated KDR/VEGFR2 as new cause of therapy resistance*. Annals of Oncology, 2017. **28**.
119. Toledo, R.A., et al., *Exome Sequencing of Plasma DNA Portrays the Mutation Landscape of Colorectal Cancer and Discovers Mutated VEGFR2 Receptors as Modulators of Antiangiogenic Therapies*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(15): p. 3550-3559.
120. Koepfel, F., et al., *Whole exome sequencing for determination of tumor mutation load in liquid biopsy from advanced cancer patients*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0188174.
121. Kunadirek, P., et al., *Cell-Free DNA Analysis by Whole-Exome Sequencing for Hepatocellular Carcinoma: A Pilot Study in Thailand*. Cancers (Basel), 2021. **13**(9).
122. Chicard, M., et al., *Whole-Exome Sequencing of Cell-Free DNA Reveals Temporo-spatial Heterogeneity and Identifies Treatment-Resistant Clones in Neuroblastoma*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(4): p. 939-949.
123. Manier, S., et al., *Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1691.
124. Adalsteinsson, V.A., et al., *Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1324.
125. Fearon, E.R., et al., *Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers*. Science, 1990. **247**(4938): p. 49-56.
126. Duman-Scheel, M., *Netrin and DCC: axon guidance regulators at the intersection of nervous system development and cancer*. Curr Drug Targets, 2009. **10**(7): p. 602-10.
127. Mehlen, P. and E.R. Fearon, *Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis*. J Clin Oncol, 2004. **22**(16): p. 3420-8.
128. Saha, S.K., et al., *GPR50 Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression via the Notch Signaling Pathway through Direct Interaction with ADAM17*. Mol Ther Oncolytics, 2020. **17**: p. 332-349.
129. Hendricks, A., et al., *Rapid response of stage IV colorectal cancer with APC/TP53/KRAS mutations to FOLFIRI and Bevacizumab combination chemotherapy: a case report of use of liquid biopsy*. BMC Med Genet, 2020. **21**(1): p. 3.
130. Fraile, J.M., et al., *Identification of novel tumor suppressor proteases by degradome profiling of colorectal carcinomas*. Oncotarget, 2013. **4**(11): p. 1919-32.

8. Publikační aktivita

Publikační aktivita související s disertační prací

Původní studie

Cervena, K., Novosadova, V., Pardini, B., Naccarati, A., Opattova, A., Horak, J., Vodenkova, S., Buchler, T., Skrobanek, P., Levy, M., Vodicka, P. and Vymetalkova, V., 2021. Analysis of MicroRNA Expression Changes During the Course of Therapy In Rectal Cancer Patients. *Front Oncol* 11, 702258. (IF 2021 - 6.244)

Cervena, K., Pardini, B., Urbanova, M., Vodenkova, S., Eva, P., Veskrnova, V., Levy, M., Buchler, T., Mokrejs, M., Naccarati, A., Vodicka, P. and Vymetalkova, V., 2021. Mutational landscape of plasma cell-free DNA identifies molecular features associated with therapeutic response in patients with colon cancer. A pilot study. *Mutagenesis* 36, 358-368. (IF 2021 – 2.954)

Siskova, A., Kral, J., Drabova, J., **Cervena, K.**, Tomasova, K., Jungwirth, J., Hucl, T., Kohout, P., Summerova, S., Vodickova, L., Vodicka, P. and Vymetalkova, V., 2022. Discovery of Long Non-Coding RNA MALAT1 Amplification in Precancerous Colorectal Lesions. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 7656. (IF 2022 – 6.208)

Cervena K., Kubecek O., Novosadova V., Ryska P., Petera J., Vymetalkova V. 2023. Can Plasma miR-122-5p and miR-142-5p Predict Relapse in Metastatic Colorectal Cancer Patients? *Journal of Disease Markers*, 8(1): 1053. (IF 2023 – 1.9).

Cervena K., Siskova A., Jungwirth J., Volarić M., Kral J., Kohout P., Levy M., Vymetalkova V. 2023. MALAT1 in liquid biopsy: the diagnostic promise for colorectal adenomas? *Journal of Personalized Medicine*. In revision process. (IF 2023 – 3.508).

Přehledové články

Vymetalkova, V., **Cervena, K.**, Bartu, L., and Vodicka, P., 2018. Circulating Cell-Free DNA and Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*, 19(11). (IF 2018 – 4.32).

Cervena, K., Vodicka, P. and Vymetalkova, V., 2019. Diagnostic and prognostic impact of cell-free DNA in human cancers: Systematic review. *Mutat Res Rev Mutat Res* 781, 100-129. (IF 2019 – 6.081).

Cervena, K., Vodenkova, S. and Vymetalkova, V., 2022. MALAT1 in colorectal cancer: Its implication as a diagnostic, prognostic, and predictive biomarker. *Gene* 843, 146791. (IF 2022 – 3.913).

Filip, S., Vymetalkova, V., Petera, J., Vodickova, L., Kubecek, O., John, S., Cecka, F., Krupova, M., Manethova, M., **Cervena, K.** and Vodicka, P., 2020. Distant Metastasis in Colorectal Cancer Patients-Do We Have New Predicting Clinicopathological and Molecular Biomarkers? A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci* 21. (IF 2020 - 4.561).

Siskova, A., **Cervena, K.**, Kral, J., Hucl, T., Vodicka, P. and Vymetalkova, V., 2020. Colorectal Adenomas-Genetics and Searching for New Molecular Screening Biomarkers. *Int J Mol Sci* 21. (IF 2020 - 4.561).

Vodenkova, S., Buchler, T., **Cervena, K.**, Veskrnova, V., Vodicka, P. and Vymetalkova, V., 2020. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther* 206, 107447. (IF 2020 – 11.45).

Publikační aktivita nesouvisející s disertační prací

Cervena, K., Siskova, A., Buchler, T., Vodicka, P. and Vymetalkova, V., 2020. Methylation Based Therapies for Colorectal Cancer. *Cells*, 9(6). (IF 2020 – 4.33).

Corradi, C., Gentiluomo, M., Gajdan, L., Cavestro, G. M., Kreivenaite, E., Di Franco, G., Sperti, C., Giaccherini, M., Petrone, M. C., Tavano, F., Gioffreda, D., Morelli, L., Soucek, P., Andriulli, A., Izbicki, J. R., Napoli, N., Malecka-Panas, E., Hegyi, P., Neoptolemos, J. P., Landi, S., Vashist, Y., Pasquali, C., Lu, Y., **Cervena, K.**, Theodoropoulos, G. E., Moz, S., Capurso, G., Strobel, O., Carrara, S., Hackert, T., Hlavac, V., Archibugi, L., Oliverius, M., Vanella, G., Vodicka, P., Arcidiacono, P. G., Pezzilli, R., Milanetto, A. C., Lawlor, R. T., Ivanauskas, A., Szentesi, A., Kupcinskas, J., Testoni, S. G. G., Lovecek, M., Nentwich, M., Gazouli, M., Luchini, C., Zupparado, R. A., Darvasi, E., Brenner, H., Gheorghe, C., Jamroziak, K., Canzian, F., and Campa, D., 2021. Genome-wide scan of long noncoding RNA single nucleotide polymorphisms and pancreatic cancer susceptibility. *Int J Cancer*, 148(11), 2779-2788. (IF 2021 – 7.316).