

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Mgr. Klára Červená

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

Disertační práce

Školitelka: Ing. Veronika Vymetálková, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne 30.3.2023

Mgr. Klára Červená

Identifikační záznam

ČERVENÁ, Klára. 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]. Praha, 2023. 83 stran, 5 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav experimentální medicíny AV ČR. Školitelka Vymetálková, Veronika.

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce Ing. Veronice Vymetákové, Ph.D. za trpělivost a podnětné připomínky k této disertační práci a k celému doktorskému studiu. Dále bych chtěla poděkovat Oddělení molekulární biologie nádorů vedené panem doktorem Vodičkou za vřelou a podporující atmosféru během svého studia. Mé poděkování patří také kolegům a lékařům ze spolupracujících institucí bez nichž by disertační práce nemohla vzniknout. Největší vděk pak patří mé rodině bez jejichž podpory by dokončení doktorského studia nebylo možné.

Obsah

Souhrn	7
Abstract	8
Seznam zkratek	9
1. Úvod	11
2. Kolorektální karcinom	12
2.1 Epidemiologie.....	12
2.2 Vznik kolorektálního karcinomu	14
2.3 Rizikové faktory a klasifikace KRK.....	15
2.4 Screening a léčba KRK.....	16
2.4.1 Screening.....	16
2.4.2 Léčba.....	17
3. Biomarkery	19
4. Tekutá biopsie	21
4.1 MikroRNA.....	23
4.1.1 Biogeneze a funkce mikroRNA	23
4.1.2 Cirkulující miRNA.....	24
4.2 Dlouhé nekódující RNA	25
4.3 Volná cirkulující DNA	27
5. Cíle a hypotézy práce	29
6. Materiál a metody	30
6.1 Studovaná populace	30
6.2 Metody.....	32
6.2.1 Izolace nukleových kyselin.....	32
6.2.2 Sekvenování nové generace (NGS)	32
6.2.3 Real-time qPCR	33
6.2.4 Komparativní genomová hybridizace	33

6.2.5 Funkční studie	33
6.2.6 Statistické zpracování	34
7. Výsledky	35
7.1 Přehled publikací	35
7.2 Souhrn publikovaných výsledků	36
7.2.1 Publikace č. 1 - Analýza expresních hladin miRNA v plazmě u pacientů s RC v průběhu terapie.....	36
7.2.2 Publikace č. 2 - Analýza expresních hladin miR-122-5p a miR-142-5p u pacientů s mKRK v predikci relapsu.....	38
7.2.3 Publikace č. 3 – Identifikace <i>MALATI</i> amplifikace u prekancerózních lézí KRK..	39
7.2.4 Publikace č. 4 - Analýza cirkulující lncRNA <i>MALATI</i> jako diagnostického markeru pro kolorektální adenomy	40
7.2.5 Publikace č. 5 - Mutační profil volné DNA v plazmě spojený s odpovědí na léčbu KRK	41
8. Diskuse.....	43
9. Závěr.....	51
10. Reference.....	52
11. Publikační aktivita	81

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 *MALAT1* can represent an important step in the transition of healthy mucosa to adenoma tissue. Plasma *MALAT1* 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.

Seznam zkratk

Ago – Argonaut

cDNA – komplementární DNA

CEA – karcinoembryonální antigen

ceRNA – kompetující endogenní RNA

cfDNA – cell-free DNA

CFI – cancer-free individuals

CGH – komparativní genomová hybridizace

CIMP – hypermetylační fenotyp

CIN – chromozomová nestabilita

ČR – Česká republika

CT – počítačová tomografie

ctDNA – cirkulující tumorová DNA

DGCR8 – DiGeorge Syndrome critical region 8

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

EGF – epidermální růstový faktor

EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor

EVs – extracelulární vezikuly

FIT – fekální imunohistochemický test

gFOBT – gajakový test na okultní krvácení

IKEM – Institut klinické a experimentální medicíny

KRA – kolorektální adenom

KRK – kolorektální karcinom

lncRNA – dlouhé nekódující RNA

miRNA – mikroRNA

mKRK – metastatický kolorektální karcinom

MRE – miRNA response element

MSI – mikrosatelitová nestabilita

NGS – next-generation sequencing

RC – rektální karcinom

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

RT-qPCR – real-time quantitative polymerase chain reaction

SNV – single nucleotide variant

WES – whole-exome sekvenování

1. Úvod

Kolorektální karcinom (KRK) je jedním z nejčastěji se vyskytujících nádorů a jednou z nejčastějších příčin úmrtí (Siegel et al., 2023). Celkové přežívání u KRK se liší mezi jednotlivými stádii onemocnění. Pro stádium I je šance pětiletého přežití nejvyšší – až 90 %, bohužel ale pro čtvrté stádium, charakterizované výskytem vzdálených metastáz, klesá až na 11-14 % (Sung et al., 2021; Wang, Li, et al., 2020) Z tohoto důvodu je potřeba identifikovat KRK v co nejčasnějších stádii, případně i ve fázi jejich prekancerózní léze – adenomu. Úmrtnost KRK ovlivňuje, kromě stádia onemocnění, také správně zvolená terapie. Nádorové biomarkery, které by pomohly s časnou identifikací KRK či by odrážely odpověď pacienta na vybranou léčbu a tím pomohly s personalizací medicíny, jsou stále v popředí zájmu mnoha vědeckých skupin (Gbenedio et al., 2019; Chidimatsu et al., 2023; Keenan & Frizelle, 2022).

Dosud provedené klinické výzkumy poukázaly na to, že tekutá biopsie může poskytnout rozšířenější informace o molekulárním stavu nádoru než klasická biopsie (Corcoran, 2020). Tekutou biopsii můžeme definovat jako sběr a analýzu biomarkerů derivovaných od nádoru, ale vyskytujících se v krvi či jiných tělních tekutinách. Mezi velmi slibné kandidáty na cirkulující nádorové biomarkery patří především volná DNA či nekódující RNA. Kromě toho přináší tekutá biopsie oproti biopsii tradiční několik výhod, jako je možnost opakovaného odběru vzorku a s tím spojená možnost monitorování onemocnění v reálném čase, minimální invazivita a finanční nenáročnost (Bai & Zhao, 2018).

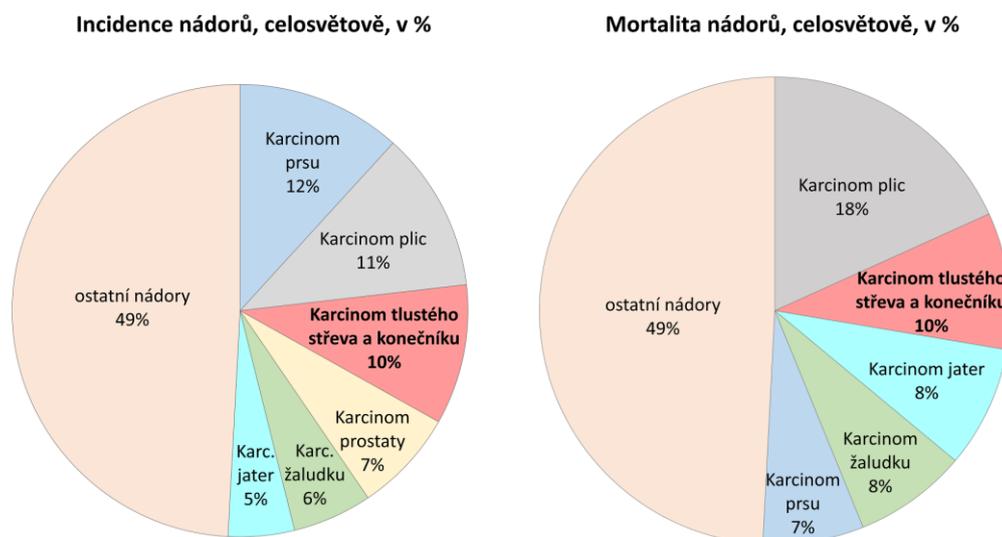
Cílem této dizertační práce byla analýza a následné zhodnocení potenciálu cirkulujících nukleových kyselin jako diagnostických, prognostických a prediktivních biomarkerů pro KRK. Dizertační práce se skládá z 5 původních prací a je doprovázena 5 přehledovými články shrnující shodnou tematiku. Práce byly publikovány v letech 2019-2023 (**kapitola 11 – Publikační aktivita**). Prezentované výsledky shrnuji jako komentovaný soubor pěti vlastních původních publikací.

2. Kolorektální karcinom

2.1 Epidemiologie

Nádorová onemocnění jsou celosvětově druhou nejčastější (po kardiovaskulárních onemocněních) příčinou úmrtí (Siegel et al., 2023).

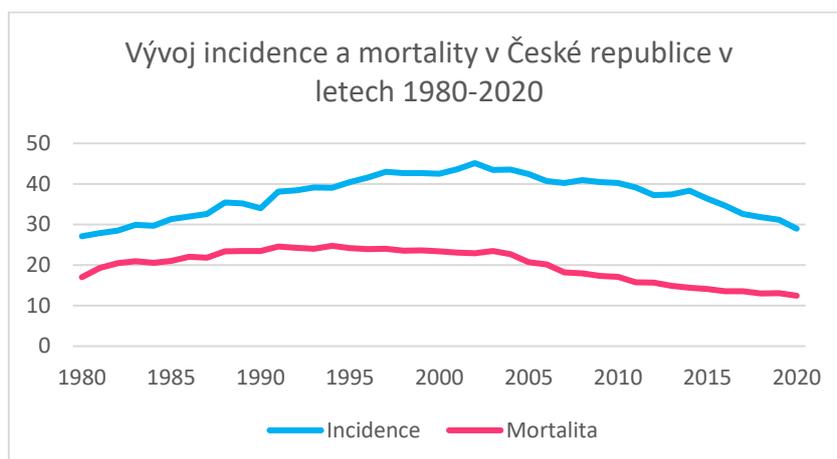
Podle serveru Globocan (<https://gco.iarc.fr>), byl pro rok 2020 KRK celosvětově třetím nejčastějším nádorovým onemocněním a druhou nejčastější příčinou úmrtí spojenou s nádorovými onemocněními (**Obrázek č. 1**). Stejné příčky v žebříčku incidence a mortality potvrdila i novější studie z roku 2023 zabývající se statistikou nádorových onemocnění ve Spojených státech amerických (Siegel et al., 2023). Celosvětově v roce 2020 přibylo téměř 2 miliony nových případů a bohužel téměř 1 milion pacientů s touto diagnózou zemřelo. Právě Evropa zaujímá po Asii druhou příčku jak v incidenci KRK, tak v mortalitě (Ferlay et al., 2021). V roce 2040 se předpokládá, že by počet případů mohl narůst až na 3 miliony. U mortality se předpokládá zvýšení z cca 1 milionů úmrtí na 1,5 milionů (Ferlay et al., 2021).



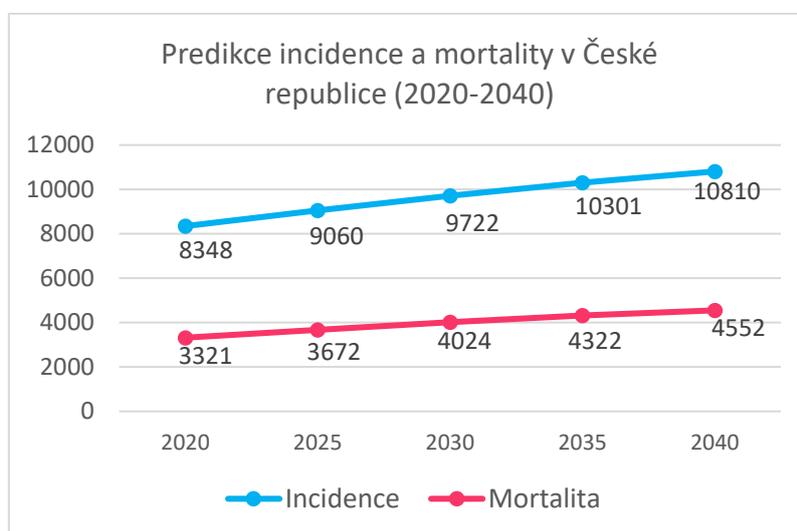
Obrázek č.1 – Incidence a mortalita nejčastějších typů nádorů, celosvětově, zdroj: Globocan 2020 (<https://gco.iarc.fr>), vlastní zpracování

Česká republika (ČR) se v minulosti řadila mezi země s nejčastější incidencí i mortalitou právě KRK. I když lokální statistiky ukazují na postupný pokles v incidenci i mortalitě KRK pacientů (**Obrázek č. 2**; <https://svod.cz>), i tak jsou čísla stále vysoká a předpokládá se opětovný nárůst. Podle Globocan (<https://gco.iarc.fr>), dojde v roce 2040 oproti roku 2020 k nárůstu počtu případů z 8350 na 10800 a nárůstu úmrtí z 3220 případů na 4550

případů (cca tedy o 30 %) (**Obrázek č. 3**). ČR zaznamenala největší výskyt případů KRK u pacientů ve věku cca 65-75 let, nicméně jak v ČR, tak i celosvětově, dochází k postupnému nárůstu případů, ale i úmrtí, u pacientů mladších 50 let (Siegel et al., 2023; <https://svod.cz>). Hlavním důvodem pak může být nedostatečný zájem o prevenci ve formě některé ze screeningových metod a zároveň jejich neproplácení zdravotní pojišťovnou před 50 rokem.



Obrázek č. 2 – Vývoj incidence a mortality v České republice v letech 1980-2020, zdroj: SVOD (<https://svod.cz>), vlastní zpracování



Obrázek č. 3 – Predikce incidence a mortality v České republice mezi lety 2020-2040, zdroj: Globocan (<https://gco.iarc.fr>), vlastní zpracování

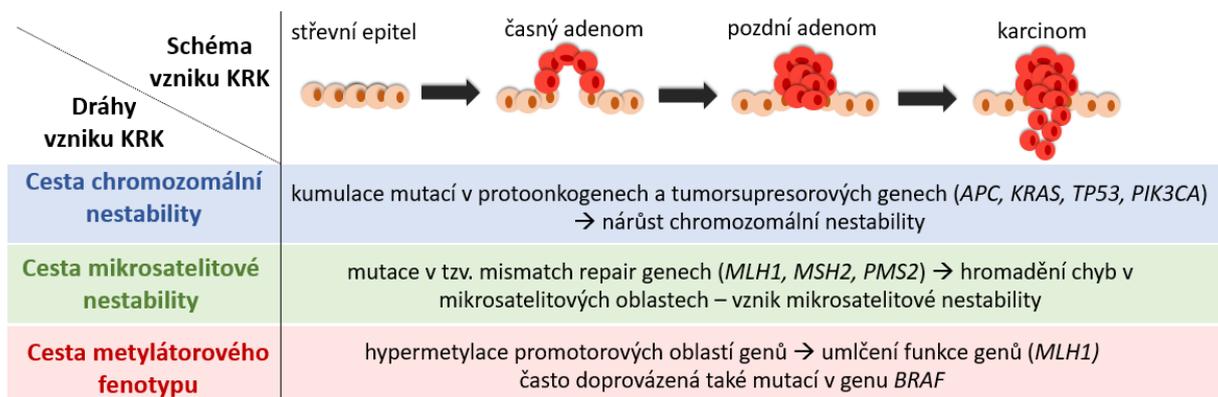
2.2 Vznik kolorektálního karcinomu

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 (Fearon & Vogelstein, 1990). Nejčastější dráhy vzniku KRK jsou znázorněny na **obrázku č. 4** a patří mezi ně: cesta chromozomální nestability (CIN), cesta mikrosatelitové nestability (MSI) a cesta metylátorového fenotypu (CIMP) (Carethers & Jung, 2015).

Nejvyšší procento (65-70 %) sporadických nádorů vzniká na základě změn v CIN. Tato cesta je charakterizována chromozomovými změnami zahrnující změny v počtu somatických kopií genů způsobených aneuploidii, delecemi, inzercemi, amplifikacemi nebo například ztrátou heterozygoty (Al-Sohaily et al., 2012; Pino & Chung, 2010). Tyto aberace vznikají vlivem defektu vzniklého během segregace chromozomů (například nesprávná segregace sesterských chromatid, abnormální počet centrozomů, dysfunkce telomer či defekty v mitotických kontrolních bodech). Při CIN dochází k mutacím v mnoha tumorsupresorových genech (jako například *APC* či *TP53*) a aktivujícím mutacím v onkogenech (například *KRAS* či *PIK3CA*). Iniciační mutace v genu *APC*, která je spojena s aktivací Wnt signální dráhy, se vyskytuje u cca 80 % těchto karcinomů a jejím výsledkem je formování prekancerózního adenomu (Nguyen et al., 2020; Segditsas & Tomlinson, 2006).

MSI cesta je cesta spjatá s mutacemi v tzv. mutátorových genech jejichž funkcí je oprava mutací v mikrosatelitech. Mikrosatelity jsou krátké repetitivně sekvence, které se vyskytují kdekoli v genomu a jsou charakterizovány vyšší frekvencí výskytu mutací (tzv. mismatches) vzniklých při replikaci (Li et al., 2020). Nejznámějším mutátorovým genem je gen *MLH1*, který bývá nejčastěji mutován u hereditárního nepolypózního KRK syndromu – Lynchův syndrom (Bonadona et al., 2011). Tato cesta je typická pro cca 15 % KRK případů (Sinicrope & Sargent, 2012).

Třetí cestou je pak cesta metylátorového fenotypu, někdy nazývaná také jako serátní cesta. Tato dráha je charakterizovaná metylacemi CpG ostrůvků v promotorových oblastech genů, čímž dochází k umlčení exprese těchto genů a ty tím ztrácí svoji funkci (Nazemalhosseini Mojarad et al., 2013). Jedním z nejčastěji hypermetylovaným genem u KRK je opět gen *MLH1* (Li et al., 2013).



Obrázek č. 4 – Přehled cest vedoucí ke vzniku kolorektálního karcinomu, vlastní zpracování

2.3 Rizikové faktory a klasifikace KRK

Rizikové faktory KRK můžeme rozdělit na dvě skupiny – ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi ty neovlivnitelné patří například věk, dědičnost či také rasa (Lansdorp-Vogelaar et al., 2012; Rawla et al., 2019). Ve studii Lewandowska a kol. navíc kromě vyššího rizika se zvyšujícím se věkem identifikovali také spojitost se vzděláním a místem bydliště (Lewandowska et al., 2022). Cca 5-10 % případů KRK představují hereditární nádory, které vznikají na podkladu hereditárního onemocnění, které je způsobeno mutací v predispozičních genech a jsou charakterizovány vysokým rizikem vzniku KRK. Příkladem takového onemocnění familiární adenomatózní polypóza způsobená mutací v genu *APC* či Lynchův syndrom (hereditární nepolypózní KRK, HNPCC) způsobený mutací v mutátorových genech (například gen *MLH1*) (Rawla et al., 2019). Chronická onemocnění trávicího traktu patří také do skupiny těchto neovlivnitelných faktorů. Příkladem může být ulcerózní kolitida, která zvyšuje riziko až 2,5krát (Jess et al., 2012). Tyto zánětlivá onemocnění střev často souvisí s výskytem KRK v mladém věku (Danial et al., 2022). Některé novější studie poukazují také na souvislost cystické fibrózy s vyšším rizikem vzniku KRK (Birch et al., 2022; Yamada et al., 2018).

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 (Carethers & Jung, 2015; Sin et al., 2023; Yamagishi et al., 2016). Tyto faktory souvisí především s životním stylem. Mezi tyto faktory patří nízká fyzická aktivita, strava bohatá na tuky, vyšší kalorický příjem, vyšší

příjem červeného masa, ale také kouření a vysoká konzumace alkoholu (Bagnardi et al., 2015; Lewandowska et al., 2022; Murphy et al., 2019; Wang et al., 2021). Kromě vysokého BMI, může obezita dospělých ale i adolescentů také zásadně ovlivnit výskyt KRK v dospělosti (Li et al., 2021; Suzuki et al., 2021).

2.4 Screening a léčba KRK

2.4.1 Screening

Screening můžeme definovat jako vyšetření, které může odhalit onemocnění v časnějších stádiích, kdy jsou pacienti ještě bez příznaků a hlavním cílem screeningu je tedy snížit úmrtnost daného onemocnění (Gordon, 2010). U lidí bez zvýšeného rizika (například bez rodinné predispozice) je pravidelný screening KRK doporučovaný od 50 let (Force et al., 2021; Wilkins & Shields, 2009). Mezi nejčastěji používané screeningové metody v oblasti diagnostiky KRK patří testy na okultní krvácení do stolice a endoskopická vyšetření (Ebell et al., 2018). V současné době se také testuje velké množství genetických neinvazivních markerů vyskytujících se v krvi a stolici, které by v budoucnu mohly mít své místo v základních screeningových metodách KRK (Bastaminejad et al., 2017; Tibble et al., 2001).

Testování krve ve stolici je na rozdíl od jiných screeningových metod neinvazivní, lehce a levně proveditelné vyšetření. Rozvoj KRK je spjat s výskytem slabšího krvácení, které může být detekovatelné ve stolici, a to ještě předtím, než se u pacienta objeví jiné příznaky (Bretthauer et al., 2022). Nejčastěji je udáváno, že by v rámci prevence měli toto vyšetření podstupovat lidé starších 50 let každý rok (Force et al., 2021). 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 jako je například červené maso (Roslani et al., 2012). Právě tyto falešně pozitivní výsledky se týkají především tzv. guajakového testu na okultní krvácení (gFOBT), který je založený na chemické reakci guajakové pryskyřice s hemoglobinem (Cooper et al., 2020). Právě pro jeho nízkou specifitu je gFOBT v poslední době nahrazován imunohistochemickými testy (FIT), které jsou založeny na stanovení množství lidského hemoglobinu pomocí specifických protilátek (Doubeni et al., 2016). Vyšší specifita i vyšší senzitivita těchto testů oproti gFOBT byla prokázána již několika studiemi (Guimaraes et al., 2019).

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. Hlavním cílem endoskopie je jak detekce potenciálních prekancerózních lézí, ale také přímo jejich okamžité bezbolestné odstranění. 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 (Gordon, 2010). Nejpoužívanější endoskopické vyšetření je kolonoskopie, při které dochází k vyšetření celého střeva a je provázena mnoha dietními ale i jinými opatřeními včetně podání sedativ (Bretthauer et al., 2022). Kombinace FIT testů a kolonoskopie podle studií představuje ideální kombinace snižující incidenci a úmrtnost na KRK (Ko et al., 2019; Lauby-Secretan et al., 2018).

2.4.2 Léčba

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 (Paschke et al., 2018; Tamas et al., 2015). Standardem léčby KRK je chirurgické zákrok, jehož cílem je kompletní odstranění tumorového ložiska.

V některých případech je potřeba před chirurgickým zákrokem z důvodu zmenšení velikosti nádoru aplikovat tzv. neoadjuvantní (předoperační) léčbu. Okolo 70 % RC je diagnostikováno jako tzv. lokální pokročilé karcinomy rekta, které odpovídají klinickému stádiu II-III, a právě u těchto typů nádorů bývá neoadjuvantní léčba využívána nejčastěji. U tohoto typu nádoru spočívá terapie nejčastěji v kombinaci chemoterapie a radioterapie a jejím cílem, kromě zmenšení velikosti nádoru, je také snížení rizika recidivy (Wagner et al., 2010). U karcinomů tlustého střeva bývá neoadjuvantní terapie nařízena méně častěji a nejčastěji se jedná o chemoterapii na bázi cytostatik – 5-fluorouracilu (5-FU) a oxaliplatiny (Karoui et al., 2020). Nevýhodou neoadjuvantní léčby naopak může být vyšší možnost intraoperačního krvácení během následujícího chirurgického zákroku (Braendengen et al., 2008; Li et al., 2016).

Po chirurgickém zákroku může být dále na základě histologického vyšetření nasazena adjuvantní terapie jejímž cílem je úplné odstranění zbylých nádorových buněk a tím další snížení šance na recidivu nádoru. Chemoterapie je většinou nasazena pacientů se stádiem II-III.

Většinou je doporučováno zahájit adjuvantní chemoterapii cca 8 týdnů po operaci, avšak neměly by být zahájena po více než 6 měsících od operace, protože v této době již zásadně dochází k poklesu efektivity terapie (Des Guetz et al., 2010; Gao et al., 2018). Nejčastěji používaných chemoterapeutikem je 5-FU, analog pyrimidinu, který je schopen inhibovat replikaci DNA, a který se nejčastěji využívá v kombinaci s metabolitem kyseliny listové – tzv. leukovorin (Francini et al., 1994; Taieb & Gallois, 2020; Vodenkova et al., 2020). V poslední době bylo prokázáno, že právě kombinace různých chemoterapeutik zlepšuje odpověď pacientů na chemoterapii a tím i přežívání pacientů – v kombinaci s 5-FU a leukovorinem se používá nejčastěji oxaliplatin (tzv. FOLFOX režim) (Andre et al., 2004; Qingwei et al., 2020).

V kombinaci s chemoterapií, především u mKRK, se ještě využívá tzv. cílená biologická léčba založená na monoklonálních protilátkách (Rodriguez et al., 2007; Xie et al., 2020). Hlavními prostředky cílené léčby jsou malé molekuly – monoklonální protilátky, které mohou proniknout do nádorových buněk, inaktivovat specifické enzymy a tím narušit proliferaci, diferenciaci a migraci nádorových buněk (Xie et al., 2020). Mezi první schválené biologické léky patří cetuximab a bevacizumab. Cetuximab je monoklonální protilátka, která cílí na receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) a to pak vede k inhibici růstového signálu pro nádorovou buňku (Baselga, 2001; Liu et al., 2023). Dalším biologickým lékem je bevacizumab, který cílí na receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor, jehož funkcí je podpora angiogeneze, která je důležitá pro růst nádoru (Ferrara & Kerbel, 2005; Stathopoulos et al., 2010). Nenovějším typem terapie je pak imunoterapie, při které dochází ke stimulaci imunitního systému, jsou pak protilátky blokující receptor PD-1 a jeho ligand PD-L1 (Jiang et al., 2019). PD-1 ve vazbě se svým ligandem aktivuje další signální dráhy, které brání proliferaci T-lymfocytů a znemožní jejich funkci (Liu et al., 2021).

Přes veškeré pokroky v nádorové terapii, přežívání KRK nedosahuje příliš vysoké úspěšnosti, a dokonce u mKRK je pětileté přežívání pouze okolo 11-14 % (Siegel et al., 2023; Sung et al., 2021; Wang et al., 2020). 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.

3. 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 (Duffy, 2013). Ideální nádorový biomarker by měl být takový biomarker, který s dostatečnou senzitivitou a specifitou odliší nádorový a nenádorový proces (Srivastava & Gopal-Srivastava, 2002). 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 (Califf, 2018). 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 (Davis, 2017; Sechidis et al., 2018).

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, která cílí na receptor pro epidermální růstový faktor (EGF) a je jednou z nejčastějších terapií u metastatického KRK (Brand & Wheeler, 2012; Xie et al., 2020). *KRAS* je protoonkogen patřící do skupiny *RAS* genů. Tato rodina kóduje malé proteiny, které jsou schopné vázat GTP a mají tím významnou roli v buněčné signalizaci a komunikaci (Brand & Wheeler, 2012; Jancik et al., 2010). V případě, že je *KRAS* nemutovaný, je signální dráha EGFR standardně regulována – po navázání ligandu dochází k dimerizaci receptoru, aktivaci receptorové tyrozinkinázy a následně k aktivaci *KRAS*, která pak aktivuje další signální kaskádu. Pacienti, kteří ale nesou mutaci v tomto genu, na tento typ cílené léčby neodpovídají. Důvodem je právě přítomnost mutace, která má za následek vznik trvale aktivního onkoproteinu, který je nezávislý na EGF (Lin et al., 2016; Van Cutsem et al., 2011).

Jedním z nejrozšířenějších nádorových markerů je karcinoembryonální antigen (CEA), který byl poprvé identifikován v roce 1965 (Gold & Freedman, 1965a, 1965b). Gold a Freedman pojmenovali tento antigen karcinoembryonální právě z toho důvodu, že byl identifikován pouze v embryonální a nádorové tkáni, ale nevyskytoval se pak v dospělých zdravých střevech (Goldstein & Mitchell, 2005). Později bylo prokázáno, že se CEA sice vyskytuje i ve zdravé tkáni, ale v několikanásobně menších koncentracích (Boucher et al., 1989). Právě detekce CEA v séru pacientů s KRK byla základním kamenem pro další výzkum tohoto antigenu jako biomarkeru (Thomson et al., 1969). Nyní je CEA nejvíce používaným nádorovým biomarkerem, jak u KRK, tak i u jiných typů malignit. Byla prokázána jeho korelace se stádiem onemocnění, stupněm diferenciací či například lokalizací nádoru (Livingstone et al., 1974; Topdagi & Timuroglu, 2018). Kromě diagnostického potenciálu u KRK, bylo popsáno užití CEA ve stanovení prognózy pacienta – pacienti, kteří měli vyšší předoperační hladinu CEA byly charakterizovány horší prognózou onemocnění než ti s nižšími koncentracemi (Huang et al., 2018; Nakagoe et al., 2001) a zároveň vysoké hladiny CEA byly asociovány s nižší úspěšností léčby (Holyoke et al., 1975; Yu et al., 2018). V kombinaci s CEA se dále stanovuje tumor asociovaný antigen CA-19-9, který byl poprvé popsán v roce 1979 (Koprowski et al., 1979). Zvýšené hladiny tohoto markeru jsou asociovány především s pankreatickým karcinomem či s gastrointestinálními nádory včetně KRK (Nakayama et al., 1997; Vukobrat-Bijedic et al., 2013). Bohužel tento marker nemá dostatečnou specifitu a jeho zvýšené hladiny nemusí souviset s maligním onemocněním, ale může se třeba také jednat o nemaligní onemocnění, jako jsou cirhóza jater, diabetes či endometrióza (Fiala et al., 2018; Kim et al., 2020).

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.

4. 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. Tato metoda je kromě několika rizik doprovázena i několika nevýhodami. Jedna z hlavních nevýhod může být nemožnost získání celého novotvaru, ale pouze (mnohdy nereprezentativního) kousku tkáně. Vzhledem k tomu, že jsou nádory velmi heterogenní, odebraný kousek nemusí odpovídat stejnému molekulárnímu profilu jako zbytek nádoru. Další obrovskou nevýhodou je pak problém opětovného získávání vzorku, která pak znemožňuje sledování odpovědi pacienta na léčbu či identifikaci přítomnosti recidivy nádoru. To může být problematické například pro metastáze, které se neustále prostorově i časově vyvíjejí v reakci na danou léčbu (Ilie & Hofman, 2016; Lone et al., 2022).

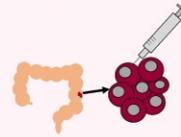
Tyto invazivní techniky začínají být pomalu nahrazovány neinvazivními metodami, které můžeme souhrnně nazvat pojmem “tekutá biopsie” (anglicky liquid biopsy). Tekutá biopsie je tedy alternativní metoda tkáňové biopsie, která oproti tkáňové biopsii disponuje několika výhodami. Kromě minimální invazivity a finanční nenáročnosti je hlavní výhodou této biopsie možnost opakovaného odebrání vzorku, a tudíž možnost monitorování onemocnění v reálném čase (Hirahata et al., 2022). 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. Porovnání tradiční a tekuté biopsie shrnuje **Obrázek č. 5**. Základ tekuté biopsie tvoří izolace nukleových kyselin či nádorových cirkulujících buněk z různých tělních tekutin, která je následována dalšími geonomickými či proteomickými analýzami (**Obrázek č. 6**). Nukleové kyseliny v krevním oběhu byly popsány v roce 1948, nicméně ve spojitosti s nádorovým výzkumem se do popředí dostaly až v roce 1970, kdy ve studii Leon et al., byla popsána asociace zvýšená koncentrace DNA v séru s výskytem metastáz a se špatnou odpovědí pacienta na léčbu (Leon et al., 1977; Mandel & Metais, 1948).

Tekutá biopsie



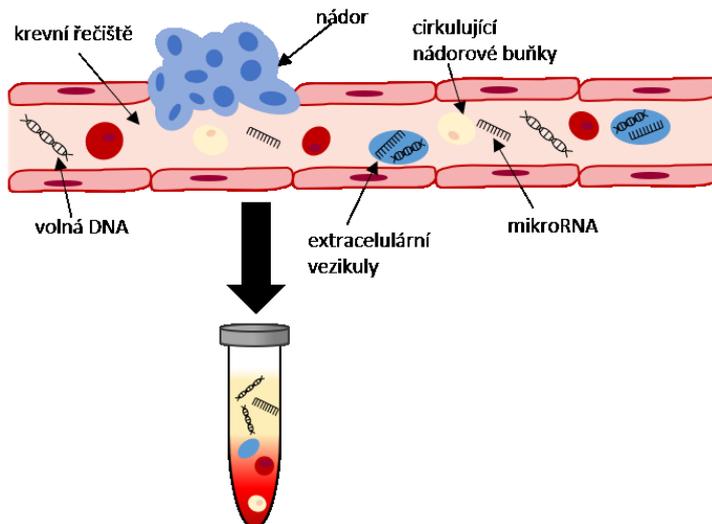
- + minimálně invazivní
- + finanční nenáročnost
- + opětovné získání vzorku
- + možnost monitorování onemocnění v reálném čase
- + odráží tumorovou heterogenitu
- chybí klinická validace
- neposkytuje informaci o histologii

Tradiční biopsie



- + klinicky validováno
- + poskytuje informace o histologii
- invazivní
- finančně náročná
- neodráží tumorovou heterogenitu
- nemožnost monitorování onemocnění v reálném čase

Obrázek č. 5 – Shrnutí výhod a nevýhod tekuté a tradiční biopsie, vlastní zpracování



Obrázek č. 6 – Schéma zobrazující princip tekuté biopsie, vlastní zpracování

4.1 MikroRNA

MikroRNA (miRNA) jsou malé nekódující RNA, které jsou dlouhé cca 22 nukleotidů. MiRNA ovlivňují post-transkripčně genovou expresi RNA pomocí procesu RNA interference (Zhuo et al., 2013). Počet miRNA neustále narůstá, v současné době dle databáze miRBase (verze 22.1) bylo identifikována již 38 589 prekurzorových miRNA.

První popsanou miRNA se stal v roce 1993 úsek RNA u *Caenorhabditis elegans*, později pojmenovaný *lin-4*. Ambros a kol. objevili, že tento úsek RNA nekóduje protein, ale zároveň objevili, že interaguje s jinou RNA – *lin-14*, kterou *lin-4* post-transkripčně tlumí skrz vzájemnou sekvenční komplementaritu v 3'UTR místech (Lee et al., 1993). Druhou popsanou miRNA byla pak *let-7* v roce 2000. Dokonce bylo zjištěno, že tato miRNA je vysoce mezidruhově konzervovaná a objevuje se u různých živočišných druhů, včetně člověka (Reinhart et al., 2000).

4.1.1 Biogeneze a funkce mikroRNA

Biogeneze miRNA je, oproti strukturním genům, složitější proces, který se liší také v rámci buněčných typů (Wang et al., 2019). Níže se budu zabývat biogenezí v rámci živočišné buňky.

Geny pro miRNA se nejčastěji vyskytují v intronových oblastech a prepis této DNA je zprostředkován prostřednictvím RNA polymerázy II za vzniku – pri-miRNA (Lee et al., 2004). Pri-miRNA je dále upravována pomocí komplexu několika proteinů – mikroprocesorového komplexu (Denli et al., 2004). Tento komplex se skládá z RNA vazebného proteinu DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) a ribonukleázy III, nazývané Drosha. DGCR8 je zodpovědný za rozpoznání pri-miRNA tím, že rozpozná její N6-metyloadenylovou sekvenci GGAC, zatímco Drosha rozstřihává pri-miRNA (Alarcon et al., 2015; Han et al., 2004). Výsledkem je vznik vlásenkové struktury o délce zhruba 70 nukleotidů s 3'přečnávajícím koncem s přesahem dvou nukleotidů, která se pak označuje jako pre-miRNA nebo prekurzová miRNA (O'Brien et al., 2018). Vzniklá pre-miRNA je dále aktivně transportována skrze jaderné póry z jádra do cytoplazmy pomocí komplexu exportinu 5/Ran-GTP komplexu (Yi et al., 2003) (Wu et al., 2018). V cytoplazmě je pre-miRNA rozpoznána enzymem Dicer – RNA III endonukleázou, která v komplexu s proteinem TRBP odstraní terminální vlásenku za vzniku maturované dvouřetězcové miRNA (Wilson et al., 2015; Zhang et al., 2004). Na tento duplex

se poté naváže protein Argonaut (Ago), který je schopen dvouvláknovou strukturu rozplést. Jedno vlákno, které se nazývá vedoucí, zůstává navázáno na Ago protein za vzniku tzv. RNA-induced silencing complex (RISC komplexu). Druhé vlákno, tzv. passenger vlákno, je poté v cytoplazmě degradováno a označuje se jako miR* (Gebert & MacRae, 2019; O'Brien et al., 2018). O tom, jaké z vláken bude vedoucí, rozhoduje stabilita párování. Vedoucí řetězec je ten, který je méně stabilní na 5'konci duplexu miRNA/miRNA* (Meijer et al., 2014). RISC komplex pak interaguje s cílovou mRNA pomocí komplementární sekvencí na 3'UTR, které se nazývají miRNA response element (MRE) (Didiano & Hobert, 2008). V poslední době také studie ukazují na to, že miRNA se mohou vázat také do oblastí 5'-UTR a kódujících či promotorových sekvencí (Orom et al., 2008; Zhang et al., 2014). 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 (Peng & Croce, 2016).

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 (Peng & Croce, 2016). MiRNA, která jsou kategorizovaná jako tumorsupresorová, je miRNA, která cílí na onkogeny a jejich koncentrace je v nádorové tkáni snížena. Naopak miRNA s onkogenním potenciálem potlačují expresi tumorsupresorových genů a v nádorových tkáních je najdeme ve vysokých koncentracích (Zhang et al., 2007). První propojení miRNA s nádorovými onemocněními bylo pak potvrzeno v roce 2002. Tato studie popsala tumor supresorovou funkci dvou miRNA (miR-15 a miR-16) u chronické lymfocytární leukémie. Právě delece či snížená expresní hladina byla pozorována u více než poloviny pacientů s tímto onemocněním (Calin et al., 2002).

4.1.2 Cirkulující miRNA

Jednou z vlastností, kterou by ideální nádorový biomarker měl disponovat by měla být možnost snadného získání a analýzy. Z tohoto důvodu se pár let po objevení miRNA přesunula pozornost od tkáňových miRNA k těm cirkulujícím. 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 μ l tělní tekutiny, přičemž nejvíce jich můžeme nalézt ve

slinách či spermatu, nejméně pak v pleurální a cerebrospinální tekutině (Weber et al., 2010). První studie popisující možnost cirkulujících miRNA jako nádorových markerů byla publikována v roce 2008. V této studii autoři porovnávali expresní hladiny miR-155, miR-210 a miR-21 mezi pacienty s difuzním B lymfomem a zdravými jedinci (Lawrie et al., 2008).

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 (Glinge et al., 2017; Kupec et al., 2022; Mitchell et al., 2008; Turchinovich et al., 2011). Mechanismus stojící za stabilitu cirkulujících miRNA není s jistotou popsán. Existuje několik hypotéz, které popisují, jak se miRNA chrání před účinkem RNáz a DNáz. MiRNA mohou být sdruženy s proteiny, být součástí lipidových a lipoproteinových komplexů či mohou být zabaleny do různých membránových vezikul (El-Hefnawy et al., 2004; Sisco, 2001).

MiRNA mohou být do cirkulace uvolňovány dvěma způsoby. První dráhou je uvolňování miRNA z poškozených, nekrotických či apoptotických buněk. Jedná se o pasivní dráhu, která nevyžaduje žádnou energii. Příkladem tohoto způsobu uvolňování může být chronický zánět, kdy dochází k nekróze buněk a obsah těchto buněk je uvolněn do cirkulace (Ji et al., 2009; Shah & Calin, 2013). Druhá dráha, aktivní, je realizována pomocí extracelulárních mikrovezikul, jako jsou například exosomy. MiRNA jsou nejprve intracelulárně zabaleny do sekrečních váčků a následně vylučovány ve formě vezikul do oběhu. Tyto váčky pak mají potenciál interagovat s cílovými buňkami a zajišťovat mezibuněčnou komunikaci (Salido-Guadarrama et al., 2014; Soares et al., 2021; Valadi et al., 2007).

4.2 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 (Policarpo et al., 2021). LncRNA patří také do skupiny nekódujících RNA, ale na rozdíl od miRNA se jedná o mnohem delší úseky RNA (cca 200 nukleotidů) (Ma et al., 2013). LncRNA mají pouze krátký otevřený čtecí rámeček, nebo jim tento úplně chybí, což zabraňuje jejich překlada do proteinu. Výsledná lncRNA je většinou přepisována RNA polymerázou II a obsahuje na svém 5' konci 7-methylguanidinovou čepičku a na 3' konci je polyadenylována. LncRNA po svém přepisu zůstává v jádře a její hlavní funkcí je regulace genové exprese, a to

jak na transkripční, tak i post-transkripční úrovni (Gao et al., 2020; Sun et al., 2018). Podle Human Gencode (Release 41) existuje okolo 19000 lncRNA (<https://encodegenes.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) návny, III) vůdce a IV) lešení (Gao et al., 2020; Statello et al., 2021). Signálními lncRNA jsou označovány takové lncRNA, které regulují (sami nebo v kombinaci s jinými proteiny) transkripci tzv. downstream cílových genů. Příkladem takové lncRNA může být *MIAT*. *MIAT* post-transkripčně váže protein SF1, který je důležitý sestřihový faktor a tím dochází k inhibici sestřihu (Wu et al., 2020). Dalším příkladem může být také interakce lncRNA s iniciačním faktorem či přímo s ribozomy což má za následek potlačení translace (Karakas & Ozpolat, 2021; Reisacher & Arbibe, 2019). LncRNA fungující jako návny se po transkripci přímo vážou na proteiny, které mají funkci například při skládání chromozomu nebo jako regulátory transkripce a tím narušují jeho funkci (Fan et al., 2015; Wang & Chang, 2011). Do této skupiny patří i poměrně nově objevená skupina lncRNA – tzv. competing endogenous RNA (ceRNA). Jsou to takové lncRNA, které obsahují sekvence komplementární k MRE sekvenci na miRNA. ceRNA poté funguje jako falešný cíl pro miRNA, která se díky tomu naváže na lncRNA a ne na cílovou mRNA a tím nedojde k jejímu umlčení (Cervena et al., 2022; Kartha & Subramanian, 2014). Vůdčí lncRNA fungují tak, že pomáhají specifickým proteinům dosáhnout cílového místa a vykonat jejich funkci (Zhu et al., 2022). Poslední skupinou jsou lncRNA, která mohou fungovat jako tzv. lešení. Takové lncRNA usnadňují interakci mnoha molekul a proteinů, tím, že je navádí, aby se shromáždily v cílové oblasti a spolupracovaly (Luo et al., 2021). Příkladem takové lncRNA je zároveň i nejznámější lncRNA *XIST*, která ovlivňuje genovou expresi a jedná se zároveň o jev tzv. kompenzace genové dóze. *XIST* je zodpovědná za inaktivaci X chromozomu v buňkách žen v časném embryonálním vývoji. *XIST* rekrutuje několik proteinů a slouží jako lešení pro ně a následně obklopují celý chromozom X, čímž způsobují jeho umlčení (Brockdorff, 2017).

Tím, že je hlavní úlohou lncRNA regulace genové exprese, dá se čekat, že deregulovaná lncRNA bude pozorována u mnoha lidských onemocněních včetně těch nádorových. Jako příklad mohu uvést zvýšenou hladinu lncRNA *HOTAIR* u pacientů s nádory prsu či asociaci H19 s různými typy nádorů jako pankreatický či kolorektální karcinom (Svoboda et al., 2014; Wang, Zhao, et al., 2020; Xu et al., 2017; Zhang et al., 2020). Uplatnění na pozici nádorových biomarkerů posiluje (obdobně jako u miRNA) fakt, že byly detekovány v různých tělních tekutinách (Gharib et al., 2021; Yuan et al., 2017).

4.3 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 (Bera et al., 2022; Biderman Waberski et al., 2018; Cervena et al., 2019; Mithani et al., 2007; Sidransky et al., 1991; Vymetalkova et al., 2018). CfDNA byla poprvé objevena v krvi zdravých jedinců v roce 1948 (Mandel & Metais, 1948). První asociace cfDNA s nádorovým onemocněním byla pak popsána v roce 1970 (Leon et al., 1977). 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 hladinami cfDNA. Navíc, autoři popsali také asociaci koncentrace cfDNA s výskytem metastáz, přežíváním i přítomností relapsu. 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 (Cervena et al., 2021a; Han et al., 2021; Liu et al., 2021).

Přesný mechanismus uvolňování cfDNA je stále nejasný, nicméně bylo prokázáno, že cfDNA může pocházet z různých zdrojů – například z apoptotických, nekrotických buněk či u těhotných žen se může jednat také o DNA plodu (Hu et al., 2021; Lo et al., 1997). Bylo prokázáno, že právě i DNA může být vylučována do cirkulace z nádorových buněk a taková cfDNA je poté nazývána jako cirkulující tumorová DNA (ctDNA). CfDNA je typicky fragmentovaná na úseky dlouhé 160-180 páru bází (Alcaide et al., 2020; Suzuki et al., 2008). Tato délka odpovídá nukleozómem chráněné DNA, která pochází z apoptotických buněk. CtDNA je co se týče délky velmi rozmanitá, protože prochází různými procesy jako je například nekróza, ale většinou bývá zastoupena kratšími fragmenty (Underhill et al., 2016; Yu et al., 2021).

Průměrná koncentrace cfDNA u KRK pacientů je cca 25-50krát vyšší než u zdravých jedinců (Boni et al., 2007; Flamini et al., 2006; Frattini et al., 2006; Spindler et al., 2015). Koncentrace cfDNA je u KRK asociována také s výskytem relapsu a přežíváním pacientů (Vymetalkova et al., 2018). Potenciál cfDNA u KRK byl prokázán také v detekci *KRAS* mutace, již zmiňovaného prediktivního biomarkeru pro úspěšnost cílené terapie. Shoda mezi tumorovou a plazmatickou DNA dosahuje až 90 % (Thierry et al., 2014; Wang et al., 2004). Jednou z častých změn, které vedou ke vzniku KRK jsou také metylace v promotorových oblastech genů. Jedním z kandidátních biomarkerů by mohla být analýza metylačního profilu *SEPT9* v cfDNA (deVos et al., 2009; Grutzmann et al., 2008; Lofton-Day et al., 2008). Gen *SEPT9*

kóduje protein Septin 9, který je zapojen do buněčných přestaveb a apoptózy. *SEPT9* byl popsán vysokou senzitivitou a specifitou pro záchyt časného stádia KRK včetně prekancerózních lézí. Přímo na stanovení této metylace byl již vyvinut specifický kit (Epi proColon – Epigenomics; <https://epigenomics.com>), která slouží k detekci metylace tohoto genu. Stanovení metylací tohoto genu se jeví jako vhodná nová metoda pro populační screening, která může zachytit KRK ve velmi časném stádiu (Lamb & Dhillon, 2017).

5. Cíle a hypotézy 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. Práce byla rozdělena do tří částí, ve kterých 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 časné zachycení prekancerózních lézí KRK.
- c) Cirkulující volná DNA v plazmě může sloužit jako prediktivní marker pro predikci odpovědi pacientů KRK na vybranou léčbu.

6. Materiál a metody

V následujícím textu je uveden souhrn a stručné představení souboru pacientů a použitých metod. Detailnější popis je uveden v jednotlivých publikovaných pracích, které jsou součástí předkládané disertační práce.

6.1 Studovaná populace

Veškeré studie předkládané disertační práce byly provedeny na lidských biologických vzorcích – analýzy byly prováděny převážně v plazmě, ale také na tkáňových vzorcích. Všechny studie byly schváleny příslušnými etickými komisemi. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas o účasti ve studii a souhlasili s poskytnutím vzorku a následnou genetickou analýzou v souladu s Helsinskou deklarací.

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). Pacienti byly odebírány v letech 2007-2018 (Oddělení chirurgie, Fakultní Thomayerova nemocnice) a sledování až do roku 2020. Získané informace ze sledování (follow-up) nám poté umožnily pacienty stratifikovat na dobré respondenty (ti, kteří měli prospěch z terapie – nevyvinul se u nich relaps) a špatné respondenty (ti pacienti, kteří neprofitovali z nasazené terapie – vyvinula se u nich toxicita, relaps či dokonce zemřeli). 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. Tito pacienti byli odebrány na oddělení Onkologie a radioterapie fakultní nemocnice Hradec Králové v letech 2019-2021 a 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 (ti u kterých se nevyvinul relaps po operaci metastáz) či špatné prognostické skupiny (ti u kterých se relaps vyvinul).

Publikace č. 3: Studie zahrnovala 16 pacientů s kolorektálními adenomy (KRA), kteří podstoupili kolonoskopické vyšetření. Sběr vzorků probíhal na dvou pracovištích – Oddělení gastroenterologie v Thomayerovo nemocnici a na oddělení Hepatogastroenterologie v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM). Tkáňové vzorky adenomů a přilehlé mukózy byly během kolonoskopie odebrány a vloženy do RNA stabilizačního roztoku. Vzorky byly poté zaslány na histopatologické vyšetření pro ověření nepřítomnosti známek malignity.

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 v plazmě KRK pacientů (n=101), KRA pacientů (n=97) a CFI (n=48). CRC pacienti byly odebrány v letech 2007-2018 na Oddělení chirurgie, Fakultní Thomayerova nemocnice. Krevní vzorky a tkáň pacientů s KRA byly získány na Oddělení Hepatogastroenterologie, IKEM.

Publikace č. 5: Do této studie bylo zahrnuto celkem 10 pacientů s nádory (pouze) tlustého střeva, kteří byli vybráni na základě přísných kritérií (nově diagnostikovaní pacienti, kteří neabsolvovali neoadjuvantní terapii a zároveň jim byla nasazena adjuvantní terapie na bázi 5-fluorouracilu). 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. Všichni pacienti obdrželi adjuvantní chemoterapii založenou na podávání cytostatik – fluoropyrimidinech. Kromě krevních vzorků byly u těchto pacientů dostupné také tumorové tkáň. Díky dostupnosti klinických dat byli pacienti rozděleni na dobré a špatné respondenty. Do skupiny dobrých respondentů byl zahrnut ten pacient, který nevyžadoval změnu chemoterapie, netrpěl žádným nepříznivým efektem chemoterapie a byl v remisi po skončení chemoterapie.

6.2 Metody

6.2.1 Izolace nukleových kyselin

RNA (včetně miRNA) z plazmy byla vyizolována pomocí Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Kit (Norgen Biotek, Kanada). Extrakce RNA z extracelulárních vesikulů (EVs) byla provedena také pomocí předešlého kitu, ale předcházela jí ještě precipitace mikrovesikulů z plazmy pomocí ExoQuick solution (System Biosciences, USA). DNA z plazmy byla izolována pomocí kitu Qiamp circulating nucleic acid kit (Qiagen, Německo) dle protokolu výrobce.

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).

Extrahovaná DNA a RNA byla kvantifikována pomocí Qubit 3.0 Fluorometer pomocí specifických Qubit assay kitů pro příslušnou nukleovou kyselinu (ThermoFisher Scientific, USA).

6.2.2 Sekvenování nové generace (NGS)

6.2.2.1 Sekvenování malých RNA

Sekvenační knihovny byly připraveny pomocí kitu NEB Next Multiplex Small RNA Library Prep (New England BioLabs, USA) dle protokolu výrobce. Takto připravené knihovny byly pak sekvenovány pomocí Illumina HiSeq2000. Sekvenační data byla dále zpracována podle přesně definovaných postupů miARmaSeq, které byly vypracovány tak, aby identifikovaly aberantní expresní profily (Andres-Leon et al., 2016).

6.2.2.2 Celoxomové sekvenování volné a tumorové DNA

Sekvenační knihovny pro nádorovou DNA z plazmy byly připraveny pomocí SureSelect XT HS Library preparation kit (Agilent, USA) dle protokolu výrobce. Knihovny tumorové DNA byly pak připraveny pomocí SureSelect XT HS Library Preparation a SSELXT2 Human All Exon V7 Kits (Agilent, USA). Připravené knihovny byly pak sekvenovány na HiSeq4000 (Illumina, USA). Jednalo se o pair-end sekvenování, které umožnilo produkovat čtení 2 x 100 bp.

6.2.3 Real-time qPCR

Extrahovaná RNA/miRNA byla pomocí reverzní transkripce přepsána do komplementární DNA (cDNA) pomocí Taqman MicroRNA Reverse Transcription kit (ThermoFisher Scientific, USA) u miRNA či High-capacity cDNA reverse transcription kit (ThermoFisher Scientific, USA) pro RNA. MiRNA byly přepsány s použitím specifických esejí – Taqman microRNA assays (ThermoFisher Scientific, USA). Referenční geny pro všechny analýzy byly vybrány na základě stability stanovené pomocí softwaru Normfinder (GenEx, MultiD – ThermoFisher Scientific, USA).

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). K samotné reakci byl použit Taqman Universal MasterMix II a Taqman microRNA/gene expression assays (ThermoFisher Scientific, USA). Výsledky získané z qPCR byly poté normalizovány pomocí programu GenEx (MultiD, ThermoFisher Scientific, USA).

6.2.4 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) a vstupní množství DNA pro toto značení se pohybovalo průměrně okolo 850 ng. 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).

6.2.5 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). Obě tato média byla obohacena o 10% fetální bovinní sérum (ThermoFisher Scientific, USA), 1 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin/streptomycin a 1mM pyruvátu sodného (v případě RPMI, Biosera, France). Pro studium vybraných miRNA jsme transfekovali (uměle navýšili) hladiny miRNA v buněčných liniích pomocí tzv. mimics (Sigma Aldrich, USA) a lipofectaminu RNAiMAX (Invitrogen, USA). Buněčné linie byly dále vystaveny 5 μ M 5-FU. U buněčných liniích jsme stanovovali buněčnou proliferaci pomocí WST-1 (Roche, USA), schopnost tvorby kolonií – colony forming assay (CFA) a buněčný cyklus.

6.2.6 Statistické zpracování

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

7. Výsledky

7.1 Přehled publikací

Publikace č. 1 – **Červená K.**, Novosadová V., Pardini B., Naccarati A., Opattová A., Horák J., Vodenková S., Büchler T., Škrobánek P., Levý M., Vodička P. a Vymetálková V., 2021. Analysis of MicroRNA Expression Changes During the Course of Therapy in Rectal Cancer Patients. *Front. Oncol.* 11:702258. Dostupné z: doi: 10.3389/fonc.2021.702258. (IF 2021 - 6.244)

Publikace č. 2 – **Červená K.**, Kubeček O, Novosadová V, Ryška P, Petera J, Vymetalková 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).

Publikace č. 3 – Šišková A., Král J., Drábová, J., **Červená, K.**, Tomášová K., Jungwirth J., Hucl T., Kohout P., Summerova S., Vodickova L., Vodicka P., Vymetalkova V., 2022. Discovery of Long Non-Coding RNA MALAT1 Amplification in Precancerous Colorectal Lesions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7656. Dostupné z: doi: 10.3390/ijms23147656. (IF 2022 – 6.028)

Publikace č. 4 – **Červená K.**, Šišková A., Jungwirth J., Volarić M., Král J., Kohout P., Levý M., Vymetálková V. 2023. MALAT1 in liquid biopsy: the diagnostic promise for colorectal adenomas? *Journal of Personalized Medicine*. Revizní řízení. (IF 2023 – 3.508).

Publikace č. 5 - **Červená K.**, Pardini B., Urbanová M., Vodenková S., Pazourková E., Veškrnová V., Levý M., Büchler T., Mokrejš M., Naccarati A., Vodička P., Vymetálková 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*. 6;36(5):358-368. Dostupné z: doi: 10.1093/mutage/geab024. (IF 2021 – 2.954)

7.2 Souhrn publikovaných výsledků

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

Cílem této studie bylo hodnocení expresních hladin miRNA před a po terapii u pacientů s RC a tím identifikace specifických miRNA reflektující průběh a odpověď pacientů na léčbu.

Prvním krokem této studie byla příprava knihoven a následné sekvenování pomocí NGS. Bioinformatická analýza dat měla za úkol identifikovat miRNA s aberantními rozdíly v plazmě mezi prvním odběrem (v čase diagnózy) a druhým odběrem (cca rok od diagnózy) u RC pacientů (n=20). Tito pacienti byli dále stratifikováni dle jejich odpovědi na léčbu na dobré a špatné respondenty. Nejvyšší rozdíl mezi jednotlivými odběry vykazovala miR-122-5p, která byla signifikantně 2,9krát 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). Obě tyto miRNA byly následně validovány na větším počtu RC pacientů.

V druhé části studie, validační části, byly tyto miRNA analyzovány jak v plazmě, tak v extracelulárních vezikulách izolovaných z plazmy pomocí RT-qPCR. Kromě 107 RC pacientů bylo do studie zahrnuto také 51 CFI za účelem zjištění případného diagnostického potenciálu vybraných miRNA. Expresní hladiny obou miRNA (miR-122-5p a miR-142-5p) u RC pacientů a CFI byly signifikantně odlišné – RC pacienti byli charakterizováni signifikantně sníženými hladinami obou miRNA oproti CFI, a to jak v plazmě, tak v plazmatických EVs (pro obě miRNA $p < 0.001$). Obecně, při porovnání prvního a druhého odběru u RC pacientů byl nalezen signifikantní rozdíl mezi prvním a druhým odběrem – 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). I ve validační části studie jsme RC pacienty stratifikovali dle odpovědi na léčbu a porovnávali jejich hladiny mezi jednotlivými odběry. 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).

Funkční úloha miR-122-5p a miR-142-5p byla dále ještě testována *in vitro* na rektálních nádorových buněčných liniích – SW1463 a HRA16. Tyto studie potvrdily, že zvýšené hladiny obou miRNA souvisejí se sníženým buněčným růstem a přežívání nádorových buněk a podpořily teorii tumor-supresorového potenciálu těchto miRNA.

Plný text originálního článku je v Příloze č. 1.

Autorský podíl na článku: izolace a qPCR analýza miRNA, *in vitro* analýzy, sepsání většiny textu článku

7.2.2 Publikace č. 2 - Analýza expresních hladin miR-122-5p a miR-142-5p u pacientů s mKRK v predikci relapsu

Potenciál předešlých miRNA byl dále testován na pacientech s mKRK. Cílem této studie byla analýza miR-122-5p a miR-142-5p v plazmě a v plazmatických EVs u mKRK pacientů a CFI pomocí RT-qPCR. U mKRK byly dostupné tři odběry. První odběr (T0) byl v čase operace metastáz, druhý odběr (T1) přibližně jeden měsíc po operaci a třetí odběr (T2) několik měsíců od operace (s mediánem 8 měsíců).

V porovnání s CFI měli mKRK pacienti signifikantně sníženou hladinu miR-142-5p v čase T2. Pro miR-122-5p jsme bohužel neidentifikovali žádné rozdíly mezi jednotlivými odběry mKRK pacientů a CFI. Pacienti byli dále stratifikováni podle lokalizace tumoru a výskytu relapsu. 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 a jednoho pacienta z dobré prognostické skupiny byla provedena ještě individuální analýza zahrnující také hodnoty onkomarkerů a CT snímky. Pacient ID01 (špatná prognostická skupina) 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 nereflektovaly 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. U dalšího pacienta (ID26) se nevyvinul relaps a byl tudíž zařazen do skupiny pacientů s dobrou prognózou. V průběhu terapie byly hladiny miRNA velmi nestabilní, nicméně na konci terapie došlo k ustálení a následně pomalému stoupání.

Plný text originálního článku je v Příloze č. 2.

Autorský podíl na článku: izolace a qPCR analýza miRNA, sepsání většiny textu článku

7.2.3 Publikace č. 3 – Identifikace *MALAT1* 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. Celkem se jednalo o 5 pacientů, ale tito pacienti nedisponovali konzistentní charakteristikou, co se týče pohlaví, diagnózy či stádia a typu adenomu. Ve druhé skupině pacientů jsme identifikovali vysoký počet mikrolecí (například v oblastech 7q, 9p, 16p, 17q či 20q) v adenomové tkáni v porovnání s přilehlou tkání (n=3). Pro tuto skupinu pacientů bylo shodné pohlaví (muži) i věk (rozmezí 63-68 let). Třetí skupina pacientů byla konzistentní věkově – jednalo se o pacienty ve věku 29, 43 a 43 let s adenomy nízkého stupně (low-grade). Tito pacienti měli ve svém karyotypu obrovské ztráty i zisky v adenomové tkáni a bylo jim doporučeno chodit na častější kolonoskopické kontroly. 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 *MALAT1* by mohla být důležitým krokem podílejícím se na přeměně zdravé tkáně v adenomovou.

Plný text originálního článku je v Příloze č. 3.

Autorský podíl na článku: podíl na CGH analýze, revize textu

7.2.4 Publikace č. 4 - Analýza cirkulující lncRNA *MALAT1* jako diagnostického markeru pro kolorektální adenomy

V naší přechozí studii (Siskova et al., 2022) jsme identifikovali *MALAT1* amplifikaci asociovanou s výskytem adenomu. Cílem této studie bylo dokázat spojitost mezi DNA aberacemi a genovou expresí *MALAT1*. Dále jsme v rámci této studie stanovovali expresní hladiny *MALAT1* v plazmě u pacientů s KRK, KRA a CFI pomocí RT-qPCR.

Celkem 14 pacientů z pilotní studie bylo rozděleno dle přítomnosti amplifikace *MALAT1*. Mezi těmito skupinami nebyl však nalezen žádný signifikantní rozdíl v expresní hladině *MALAT1*.

Dále byla expresní analýza provedena u plazmatických vzorků 97 KRA pacientů, 101 KRK pacientů a 48 CFI. Expresní hladina *MALAT1* byla zvýšena jak u KRA pacientů, tak i KRK pacientů v porovnání s CFI (pro obě skupiny $p < 0.001$). KRA pacienti byli dále rozděleni do skupin podle typů adenomu – hyperplastické adenomy, tubulární a tubulovilózní/vilózní adenomy. Nejvyšší expresní hladina byla pozorována u skupiny tubulovilózních/vilózních polypů, které mají nejvyšší riziko vzniku KRK. KRK pacienti byly poté ještě rozděleni dle odpovědi na léčbu. *MALAT1* expresní hladina byla signifikantně vyšší u špatných respondentů v porovnání s dobrými respondenty ($p=0.036$).

Plný text originálního článku je v Příloze č. 4.

Autorský podíl na článku: izolace a qPCR analýza, příprava dat, tabulek a obrázků, sepsání textu

7.2.5 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. Tyto vzorky byly odebrány v čase diagnózy před nasazením jakékoliv terapie, po chemoterapii založené na 5-FU a dále cca půl roku od ukončení léčby. 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. Pacienti byli opět dle stanovených charakteristik rozděleny na špatné a dobré respondenty.

Nejprve bylo provedeno WES na tumorové DNA pro identifikaci jednonukleotidových změn (SNV) a krátkých inzerčních/delečních mutací (indels). Detekováno bylo 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 genu *GPR50* (c.1594A>G ac.1505_1516delCCACTGGCCACA) a naopak žádný dobrý respondent nebyl nosičem žádné z těchto variant. *TPSD1* c.274G>A (p.Ala92Thr), *CPAMD8* c.1022G>A (p.Arg341Gln) a *BP2A* c.367_370del byly další varianty, které byly identifikovány u špatných respondentů, ale u těch dobrých se neobjevily. Tyto varianty byly charakterizovány dle Varsome jako ty s nejistým klinickým významem.

V předoperačních vzorcích plazmy byla u každého pacienta vždy minimálně jedna mutace, která byla detekována rovněž v tumorové tkáni. Shoda mezi plazmatickou cfDNA a tumorovou byla vyšší u pacientů s vyšším stádiem onemocnění. U několika pacientů, u kterých jsme identifikovali mutace v tumorové tkáni, se tyto mutace nevyskytovaly v cfDNA. Konkrétně se jednalo o mutace v genech *TP53* (u čtyř pacientů), *APC* (u čtyř pacientů), *KRAS* (u dvou pacientů) a *SMAD4* (u tří pacientů). Na druhou stranu u jednoho špatného respondenta jsme identifikovali mutaci *TP53* kromě tumorové DNA také v cfDNA v průběhu celého sledování a mutace v genu *DCC* byla detekována jen v cfDNA, nikoliv v tumorové DNA. Pacient ID221, který patřil do skupiny špatně odpovídajících pacientů, disponoval mutací v genu *APC* (c.3944C>A; p.Ser1315Ter) ve třetím odběru, ale tato mutace se nevyskytovala ani v jeho tumorové tkáni ani ve vzorcích plazmy v čase diagnózy. Tato nově vzniklá mutace v průběhu terapie by mohla být důvodem špatné odpovědi na léčbu.

Plný text originálního článku je v Příloze č. 5.

Autorský podíl na článku: izolace cfDNA, izolace tumorové DNA, práce s databázemi, podíl na psaní textu

8. 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 (Cervena et al., 2021b). 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 (Cervena et al., 2023a) 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 (Fu & Calin, 2018; Ha et al., 2019; Jopling, 2012; Thakral & Ghoshal, 2015; Wei et al., 2019). Játra jsou nejčastější lokalizací metastazování KRK a z tohoto důvodu je miR-122-5p hojně studována také u KRK (Carter et al., 2016; Kow, 2019). Žádná z dosud publikovaných studií zabývajících se touto miRNA ale nebyla zaměřena na RC a níže diskutované studie se zabývaly KRK jako souhrnnou diagnózu (C18-C20). Studie zabývajících 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 (Mairerthaler et al., 2017; Sun et al., 2020). Naopak jiné studie jsou v souladu s našimi výsledky a autoři v nádorové tkáni KRK pozorovali snížené expresní hladiny oproti přilehlé mukóze (Li et al., 2019; Yin et al., 2020). 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 zabývající 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 (O'Brien et al., 2021). 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 (Hua et al., 2018). 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 (Hua et al., 2018). 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 (He et al., 2014). 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 (Zhou et al., 2012). 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 (Sendi et al., 2022). 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 (Iino et al., 2013; Li et al., 2019). Ve studii Yin a kol. popsali ještě spletitější interakci zahrnující cirkulární RNA (řadící se nejčastěji do skupiny lncRNA) označenou jako circ_007142 (Yin et al., 2020). Tato cirkulární RNA funguje tak, že vychytává miR-122-5p (“sponging”) pomocí komplementární sekvence a tím nedochází k umlčení translace jejích cílových mRNA (Panda, 2018). 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 (Yin et al., 2020).

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 (Islam et al., 2018). 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 (Paschke et al., 2018). 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 (Cervena et al., 2023a). 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 (Kunigenas et al., 2020; Vychytilova-Faltejskova et al., 2016; Yin et al., 2016). 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 (Kong et al., 2019; Kunigenas et al., 2020; Pliakou et al., 2022; Shi et al., 2015). 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 (Shi et al., 2015). Neoadjuvantní chemoterapie měla za následek také nárůst expresních hladin miR-142-5p u RC pacientů (Kunigenas et al., 2020). 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 – *EPASI* (Pliakou et al., 2022). Produkt genu *EPASI* 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 (Mohammed et al., 2011; Pan et al., 2018; Yoshimura et al., 2004). 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 (Gu et al., 2017; Liu et al., 2017). Dalšími potenciálními cílovými mRNA by mohly být *TIAMI*, zapojený do Wnt dráhy, či tumorsupresorový gen *KLF6* ovlivňující buněčný cyklus (Andreoli et al., 2010; Diamantopoulou et al., 2017; Islam et al., 2018; Kong et al., 2019). 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 (Ling et al., 2015; Policarpo et al., 2021). 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 (Atkin et al., 2017). Toto vyšetření s 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 (Siskova et al., 2022; Cervena et al., 2023b).

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 (Ji et al., 2003; Schmidt et al., 2011). Naše studie je jednou z prvních prací zabývajících se lncRNA *MALATI* ve spojitosti s KRA. Studie vedená skupinou Radwan a kol., je jediná studie, dle našeho vědomí, analyzující i KRA pacienty (Radwan et al., 2021). 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 (Wang et al., 2022). Studií zabývajících se *MALATI* u KRK je mnohem více a často popisují jeho asociaci s účinností terapie (Li et al., 2017; Matuszyk, 2022; Shen et al., 2022). Vyšší expresní hladina *MALATI* byla nalezena v nádorové tkáni oproti nenádorové tkáni a je asociována se stádiem onemocnění, výskytem metastáz, postižení uzlin i kratším přežíváním (Li et al., 2017; Qiu et al., 2016; Sun et al., 2019; Zheng et al., 2014). Tyto výsledky jsou v souladu s našimi, neboť již několik studií prokázalo spojitost genové amplifikace s nadměrnou expresí (Hyman et al., 2002; Vogt et al., 2010). 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 (Li et al., 2017). 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 studiemi (Fan et al., 2020; Wei et al., 2022). 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 *ADAMI7* či přímou interakci přes miR-200s (Fan et al., 2020; Li et al., 2017; Wei et al., 2022). 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* (Ak Aksoy et al., 2022; Tang et al., 2019). 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 (Yang et al., 2019; Yu et al., 2020; Zhao et al., 2020).

Volná DNA je první z cirkulujících nukleových kyselin, která byla zkoumána v souvislosti s jejím potenciálem jako nádorového biomarkeru (Leon et al., 1977). 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 nejrozličnější mutace genů včetně těch s onkogenní či tumorsupresorovou funkcí a některé analýzy cfDNA již byly zavedeny v klinické praxi (Liebs et al., 2019; Liu et al., 2021; Vidula et al., 2022; Vitale et al., 2020).

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 (Deng et al., 2022; Yang et al., 2016; Zhao et al., 2020).

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 (Bos et al., 2020). 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 (Crisafulli et al., 2019; Toledo et al., 2017). 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 (Toledo et al., 2017). Tato mutace byla následně potvrzena i pomocí PCR a testována *in vitro* a *in vivo* (Toledo et al., 2018). 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 (Crisafulli et al., 2019). 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 % (Adalsteinsson et al., 2017; Chicard et al., 2018; Koepfel et al., 2017; Kunadirek et al., 2021; Manier et al., 2018). Několik studií však popsalo identifikaci mutací v cfDNA, které naopak nebyly identifikované v tumorové DNA, a to včetně naší studie (Bos et al., 2020; Cervena et al., 2021a; Manier et al., 2018). 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 (Duman-Scheel, 2009; Fearon et al., 1990; Mehlen & Fearon, 2004). 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 (Saha et al., 2020). Přítomnost mutace tohoto genu u KRK pacientů potvrdila i studie Hendricks a kol. (Hendricks et al., 2020). *TPSD* je proteáza jejíž funkce zatím nebyla příliš dobře prozkoumána, ale mutace v tomto genu již jednou byla popsána u pacientů s pankreatickým karcinomem (Fraile et al.,

2013). 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.

9. Závěr

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 *MALATI*. V naší studii jsme identifikovali amplifikaci *MALATI* vyskytující se v adenomové tkáni, ale chybějící v přilehlé mukóze. Expresní hladina *MALATI* 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 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.

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.

10. Reference

- Adalsteinsson, V. A., Ha, G., Freeman, S. S., Choudhury, A. D., Stover, D. G., Parsons, H. A., Gydush, G., Reed, S. C., Rotem, D., Rhoades, J., Loginov, D., Livitz, D., Rosebrock, D., Leshchiner, I., Kim, J., Stewart, C., Rosenberg, M., Francis, J. M., Zhang, C. Z., Cohen, O., Oh, C., Ding, H., Polak, P., Lloyd, M., Mahmud, S., Helvie, K., Merrill, M. S., Santiago, R. A., O'Connor, E. P., Jeong, S. H., Leeson, R., Barry, R. M., Kramkowski, J. F., Zhang, Z., Polacek, L., Lohr, J. G., Schleicher, M., Lipscomb, E., Saltzman, A., Oliver, N. M., Marini, L., Waks, A. G., Harshman, L. C., Tolaney, S. M., Van Allen, E. M., Winer, E. P., Lin, N. U., Nakabayashi, M., Taplin, M. E., Johannessen, C. M., Garraway, L. A., Golub, T. R., Boehm, J. S., Wagle, N., Getz, G., Love, J. C., & Meyerson, M. (2017). Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors. *Nat Commun*, *8*(1), 1324. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00965-y>
- Ak Aksoy, S., Tunca, B., Ercelik, M., Tezcan, G., Ozturk, E., Cecener, G., Ugras, N., Yilmazlar, T., & Yerci, O. (2022). Early-stage colon cancer with high MALAT1 expression is associated with the 5-Fluorouracil resistance and future metastasis. *Mol Biol Rep*, *49*(12), 11243-11253. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07680-y>
- Al-Sohaily, S., Biankin, A., Leong, R., Kohonen-Corish, M., & Warusavitarne, J. (2012). Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*, *27*(9), 1423-1431. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2012.07200.x>
- Alarcon, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., & Tavazoie, S. F. (2015). N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, *519*(7544), 482-485. <https://doi.org/10.1038/nature14281>
- Alcaide, M., Cheung, M., Hillman, J., Rassekh, S. R., Deyell, R. J., Batist, G., Karsan, A., Wyatt, A. W., Johnson, N., Scott, D. W., & Morin, R. D. (2020). Evaluating the quantity, quality and size distribution of cell-free DNA by multiplex droplet digital PCR. *Sci Rep*, *10*(1), 12564. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69432-x>
- Andre, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I., de Gramont, A., & Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer, I. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*, *350*(23), 2343-2351. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032709>

- Andreoli, V., Gehrau, R. C., & Bocco, J. L. (2010). Biology of Kruppel-like factor 6 transcriptional regulator in cell life and death. *IUBMB Life*, *62*(12), 896-905. <https://doi.org/10.1002/iub.396>
- Andres-Leon, E., Nunez-Torres, R., & Rojas, A. M. (2016). miARma-Seq: a comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis. *Sci Rep*, *6*, 25749. <https://doi.org/10.1038/srep25749>
- Atkin, W., Wooldrage, K., Brenner, A., Martin, J., Shah, U., Perera, S., Lucas, F., Brown, J. P., Kralj-Hans, I., Greliak, P., Pack, K., Wood, J., Thomson, A., Veitch, A., Duffy, S. W., & Cross, A. J. (2017). Adenoma surveillance and colorectal cancer incidence: a retrospective, multicentre, cohort study. *Lancet Oncol*, *18*(6), 823-834. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30187-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30187-0)
- Bagnardi, V., Rota, M., Botteri, E., Tramacere, I., Islami, F., Fedirko, V., Scotti, L., Jenab, M., Turati, F., Pasquali, E., Pelucchi, C., Galeone, C., Bellocco, R., Negri, E., Corrao, G., Boffetta, P., & La Vecchia, C. (2015). Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer*, *112*(3), 580-593. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.579>
- Bai, Y., & Zhao, H. (2018). Liquid biopsy in tumors: opportunities and challenges. *Ann Transl Med*, *6*(Suppl 1), S89. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.11.31>
- Baselga, J. (2001). The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer*, *37 Suppl 4*, S16-22. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(01\)00233-7](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(01)00233-7)
- Bastaminejad, S., Taherikalani, M., Ghanbari, R., Akbari, A., Shabab, N., & Saidijam, M. (2017). Investigation of MicroRNA-21 Expression Levels in Serum and Stool as a Potential Non-Invasive Biomarker for Diagnosis of Colorectal Cancer. *Iran Biomed J*, *21*(2), 106-113. <https://doi.org/10.18869/acadpub.ijb.21.2.106>
- Bera, A., Russ, E., Karaian, J., Landa, A., Radhakrishnan, S., Subramanian, M., Hueman, M., Pollard, H. B., Hu, H., Shriver, C. D., & Srivastava, M. (2022). Circulating Cell-free DNA in Serum as a Marker for the Early Detection of Tumor Recurrence in Breast Cancer Patients. *Cancer Diagn Progn*, *2*(3), 285-292. <https://doi.org/10.21873/cdp.10106>
- Biderman Waberski, M., Lindhurst, M., Keppler-Noreuil, K. M., Sapp, J. C., Baker, L., Gripp, K. W., Adams, D. M., & Biesecker, L. G. (2018). Urine cell-free DNA is a biomarker for nephroblastomatosis or Wilms tumor in PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Genet Med*, *20*(9), 1077-1081. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.228>

- Birch, R. J., Peckham, D., Wood, H. M., Quirke, P., Konstant-Hambling, R., Brownlee, K., Cosgriff, R., Consortium, G. E. R., Burr, N., & Downing, A. (2022). The risk of colorectal cancer in individuals with mutations of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene: An English population-based study. *J Cyst Fibros*. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2022.10.001>
- Bonadona, V., Bonaiti, B., Olschwang, S., Grandjouan, S., Huiart, L., Longy, M., Guimbaud, R., Buecher, B., Bignon, Y. J., Caron, O., Colas, C., Nogues, C., Lejeune-Dumoulin, S., Olivier-Faivre, L., Polycarpe-Osaer, F., Nguyen, T. D., Desseigne, F., Saurin, J. C., Berthet, P., Leroux, D., Duffour, J., Manouvrier, S., Frebourg, T., Sobol, H., Lasset, C., Bonaiti-Pellie, C., & French Cancer Genetics, N. (2011). Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA*, *305*(22), 2304-2310. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.743>
- Boni, L., Cassinotti, E., Canziani, M., Dionigi, G., Rovera, F., & Dionigi, R. (2007). Free circulating DNA as possible tumour marker in colorectal cancer. *Surg Oncol*, *16 Suppl 1*, S29-31. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2007.10.004>
- Bos, M. K., Angus, L., Nasserinejad, K., Jager, A., Jansen, M., Martens, J. W. M., & Sleijfer, S. (2020). Whole exome sequencing of cell-free DNA - A systematic review and Bayesian individual patient data meta-analysis. *Cancer Treat Rev*, *83*, 101951. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101951>
- Boucher, D., Cournoyer, D., Stanners, C. P., & Fuks, A. (1989). Studies on the control of gene expression of the carcinoembryonic antigen family in human tissue. *Cancer Res*, *49*(4), 847-852. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2912558>
- Braendengen, M., Tveit, K. M., Berglund, A., Birkemeyer, E., Frykholm, G., Pahlman, L., Wiig, J. N., Bystrom, P., Bujko, K., & Glimelius, B. (2008). Randomized phase III study comparing preoperative radiotherapy with chemoradiotherapy in nonresectable rectal cancer. *J Clin Oncol*, *26*(22), 3687-3694. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.3858>
- Brand, T. M., & Wheeler, D. L. (2012). KRAS mutant colorectal tumors: past and present. *Small GTPases*, *3*(1), 34-39. <https://doi.org/10.4161/sgtp.18751>
- Bretthauer, M., Loberg, M., Wieszczy, P., Kalager, M., Emilsson, L., Garborg, K., Rupinski, M., Dekker, E., Spaander, M., Bugajski, M., Holme, O., Zauber, A. G., Pilonis, N. D., Mroz, A., Kuipers, E. J., Shi, J., Hernan, M. A., Adami, H. O., Regula, J., Hoff, G., Kaminski, M. F., & Nord, I. C. C. S. G. (2022). Effect of Colonoscopy Screening on Risks of Colorectal Cancer and Related Death. *N Engl J Med*, *387*(17), 1547-1556. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2208375>

- Brockdorff, N. (2017). Polycomb complexes in X chromosome inactivation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 372(1733). <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0021>
- Califf, R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med (Maywood)*, 243(3), 213-221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(24), 15524-15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
- Carethers, J. M., & Jung, B. H. (2015). Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 149(5), 1177-1190 e1173. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.06.047>
- Carter, J. V., Roberts, H. L., Pan, J., Rice, J. D., Burton, J. F., Galbraith, N. J., Eichenberger, M. R., Jordan, J., Deveaux, P., Farmer, R., Williford, A., Kanaan, Z., Rai, S. N., & Galandiuk, S. (2016). A Highly Predictive Model for Diagnosis of Colorectal Neoplasms Using Plasma MicroRNA: Improving Specificity and Sensitivity. *Ann Surg*, 264(4), 575-584. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001873>
- Cervena K., Kubecek O., Novosadova V., Ryska P., Petera J., & Vymetalkova V. (2023a). Can Plasma miR-122-5p and miR-142-5p Predict Relapse in Metastatic Colorectal Cancer Patients? *Journal of Disease Markers*, 8(1): 1053.
- Cervena K., Siskova A., Jungwirth J., Volarić M., Kral J., Kohout P., Levy M., & Vymetalkova V. (2023b). MALAT1 in liquid biopsy: the diagnostic promise for colorectal adenomas? *Journal of Personalized Medicine*. In revision process
- Cervena, K., Novosadova, V., Pardini, B., Naccarati, A., Opattova, A., Horak, J., Vodenkova, S., Buchler, T., Skrobanek, P., Levy, M., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2021b). Analysis of MicroRNA Expression Changes During the Course of Therapy In Rectal Cancer Patients. *Front Oncol*, 11, 702258. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.702258>
- Cervena, K., Pardini, B., Urbanova, M., Vodenkova, S., Eva, P., Veskrnova, V., Levy, M., Buchler, T., Mokrejs, M., Naccarati, A., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2021a). Mutational landscape of plasma cell-free DNA identifies molecular features associated with therapeutic response in patients with colon cancer. A pilot study. *Mutagenesis*, 36(5), 358-368. <https://doi.org/10.1093/mutage/geab024>

- Cervena, K., Vodenkova, S., & Vymetalkova, V. (2022). MALAT1 in colorectal cancer: Its implication as a diagnostic, prognostic, and predictive biomarker. *Gene*, *843*, 146791. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146791>
- Cervena, K., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2019). Diagnostic and prognostic impact of cell-free DNA in human cancers: Systematic review. *Mutat Res Rev Mutat Res*, *781*, 100-129. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.05.002>
- Cooper, R. E., Hutchinson, E. K., & Izzi, J. M. (2020). Evaluation of the guaiac fecal occult blood test for detection of gastrointestinal bleeding in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*). *J Med Primatol*, *49*(1), 16-25. <https://doi.org/10.1111/jmp.12446>
- Corcoran, R. B. (2020). Liquid biopsy versus tumor biopsy for clinical-trial recruitment. *Nat Med*, *26*(12), 1815-1816. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01169-6>
- Crisafulli, G., Mussolin, B., Cassingena, A., Montone, M., Bartolini, A., Barault, L., Martinetti, A., Morano, F., Pietrantonio, F., Sartore-Bianchi, A., Siena, S., Di Nicolantonio, F., Marsoni, S., Bardelli, A., & Siravegna, G. (2019). Whole exome sequencing analysis of urine trans-renal tumour DNA in metastatic colorectal cancer patients. *ESMO Open*, *4*(6). <https://doi.org/10.1136/esmooopen-2019-000572>
- Danial, D., Youssef, E. D., Maryam, B. M., Mohammad, A., Moein, B. M., & Liliane, D. (2022). Risk Factors of Young-Onset Colorectal Cancer: Analysis of a Large Population-Based Registry. *Can J Gastroenterol Hepatol*, *2022*, 3582443. <https://doi.org/10.1155/2022/3582443>
- Davis, J. W. (2017). Biomarker classification, validation, and what to look for in 2017 and beyond. *BJU Int*, *119*(5), 812-814. <https://doi.org/10.1111/bju.13790>
- Deng, W., Murugan, S., Lindberg, J., Chellappa, V., Shen, X., Pawitan, Y., & Vu, T. N. (2022). Fusion Gene Detection Using Whole-Exome Sequencing Data in Cancer Patients. *Front Genet*, *13*, 820493. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.820493>
- Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, *432*(7014), 231-235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
- Des Guetz, G., Nicolas, P., Perret, G. Y., Morere, J. F., & Uzzan, B. (2010). Does delaying adjuvant chemotherapy after curative surgery for colorectal cancer impair survival? A meta-analysis. *Eur J Cancer*, *46*(6), 1049-1055. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.01.020>

- deVos, T., Tetzner, R., Model, F., Weiss, G., Schuster, M., Distler, J., Steiger, K. V., Grutzmann, R., Pilarsky, C., Habermann, J. K., Fleshner, P. R., Oubre, B. M., Day, R., Sledziewski, A. Z., & Lofton-Day, C. (2009). Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem*, *55*(7), 1337-1346. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.115808>
- Diamantopoulou, Z., White, G., Fadlullah, M. Z. H., Dreger, M., Pickering, K., Maltas, J., Ashton, G., MacLeod, R., Baillie, G. S., Kouskoff, V., Lacaud, G., Murray, G. I., Sansom, O. J., Hurlstone, A. F. L., & Malliri, A. (2017). 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*, *31*(5), 621-634 e626. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.03.007>
- Didiano, D., & Hobert, O. (2008). Molecular architecture of a miRNA-regulated 3' UTR. *RNA*, *14*(7), 1297-1317. <https://doi.org/10.1261/rna.1082708>
- Doubeni, C. A., Jensen, C. D., Fedewa, S. A., Quinn, V. P., Zauber, A. G., Schottinger, J. E., Corley, D. A., & Levin, T. R. (2016). Fecal Immunochemical Test (FIT) for Colon Cancer Screening: Variable Performance with Ambient Temperature. *J Am Board Fam Med*, *29*(6), 672-681. <https://doi.org/10.3122/jabfm.2016.06.160060>
- Duffy, M. J. (2013). Tumor markers in clinical practice: a review focusing on common solid cancers. *Med Princ Pract*, *22*(1), 4-11. <https://doi.org/10.1159/000338393>
- Duman-Scheel, M. (2009). Netrin and DCC: axon guidance regulators at the intersection of nervous system development and cancer. *Curr Drug Targets*, *10*(7), 602-610. <https://doi.org/10.2174/138945009788680428>
- Ebell, M. H., Thai, T. N., & Royalty, K. J. (2018). Cancer screening recommendations: an international comparison of high income countries. *Public Health Rev*, *39*, 7. <https://doi.org/10.1186/s40985-018-0080-0>
- El-Hefnawy, T., Raja, S., Kelly, L., Bigbee, W. L., Kirkwood, J. M., Luketich, J. D., & Godfrey, T. E. (2004). Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem*, *50*(3), 564-573. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.028506>
- Fan, C., Yuan, Q., Liu, G., Zhang, Y., Yan, M., Sun, Q., & Zhu, C. (2020). Long non-coding RNA MALAT1 regulates oxaliplatin-resistance via miR-324-3p/ADAM17 axis in colorectal cancer cells. *Cancer Cell Int*, *20*, 473. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01549-5>

- Fan, J., Xing, Y., Wen, X., Jia, R., Ni, H., He, J., Ding, X., Pan, H., Qian, G., Ge, S., Hoffman, A. R., Zhang, H., & Fan, X. (2015). Long non-coding RNA ROR decoys gene-specific histone methylation to promote tumorigenesis. *Genome Biol*, *16*(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0705-2>
- Fearon, E. R., Cho, K. R., Nigro, J. M., Kern, S. E., Simons, J. W., Ruppert, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Thomas, G., Kinzler, K. W., & et al. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, *247*(4938), 49-56. <https://doi.org/10.1126/science.2294591>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, *61*(5), 759-767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i)
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Pineros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Ferrara, N., & Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, *438*(7070), 967-974. <https://doi.org/10.1038/nature04483>
- Fiala, L., Bob, P., & Raboch, J. (2018). Oncological markers CA-125, CA 19-9 and endometriosis. *Medicine (Baltimore)*, *97*(51), e13759. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013759>
- Flamini, E., Mercatali, L., Nanni, O., Calistri, D., Nunziatini, R., Zoli, W., Rosetti, P., Gardini, N., Lattuneddu, A., Verdecchia, G. M., & Amadori, D. (2006). Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: an important combination for diagnosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, *12*(23), 6985-6988. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1931>
- Force, U. S. P. S. T., Davidson, K. W., Barry, M. J., Mangione, C. M., Cabana, M., Caughey, A. B., Davis, E. M., Donahue, K. E., Doubeni, C. A., Krist, A. H., Kubik, M., Li, L., Ogedegbe, G., Owens, D. K., Pbert, L., Silverstein, M., Stevermer, J., Tseng, C. W., & Wong, J. B. (2021). Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*, *325*(19), 1965-1977. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.6238>
- Fraile, J. M., Ordonez, G. R., Quiros, P. M., Astudillo, A., Galvan, J. A., Colomer, D., Lopez-Otin, C., Freije, J. M., & Puente, X. S. (2013). Identification of novel tumor suppressor proteases by degradome profiling of colorectal carcinomas. *Oncotarget*, *4*(11), 1919-1932. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1303>

- Francini, G., Petrioli, R., Lorenzini, L., Mancini, S., Armenio, S., Tanzini, G., Marsili, S., Aquino, A., Marzocca, G., Civitelli, S., & et al. (1994). Folinic acid and 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy in colon cancer. *Gastroenterology*, *106*(4), 899-906. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(94\)90748-x](https://doi.org/10.1016/0016-5085(94)90748-x)
- Frattini, M., Gallino, G., Signoroni, S., Balestra, D., Battaglia, L., Sozzi, G., Leo, E., Pilotti, S., & Pierotti, M. A. (2006). Quantitative analysis of plasma DNA in colorectal cancer patients: a novel prognostic tool. *Ann N Y Acad Sci*, *1075*, 185-190. <https://doi.org/10.1196/annals.1368.025>
- Fu, X., & Calin, G. A. (2018). miR-122 and hepatocellular carcinoma: from molecular biology to therapeutics. *EBioMedicine*, *37*, 17-18. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.10.032>
- Gao, N., Li, Y., Li, J., Gao, Z., Yang, Z., Li, Y., Liu, H., & Fan, T. (2020). Long Non-Coding RNAs: The Regulatory Mechanisms, Research Strategies, and Future Directions in Cancers. *Front Oncol*, *10*, 598817. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.598817>
- Gao, P., Huang, X. Z., Song, Y. X., Sun, J. X., Chen, X. W., Sun, Y., Jiang, Y. M., & Wang, Z. N. (2018). Impact of timing of adjuvant chemotherapy on survival in stage III colon cancer: a population-based study. *BMC Cancer*, *18*(1), 234. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4138-7>
- Gbenedio, O. M., Bonnans, C., Grun, D., Wang, C. Y., Hatch, A. J., Mahoney, M. R., Barras, D., Matli, M., Miao, Y., Garcia, K. C., Tejpar, S., Delorenzi, M., Venook, A. P., Nixon, A. B., Warren, R. S., Roose, J. P., & Depeille, P. (2019). RasGRP1 is a potential biomarker to stratify anti-EGFR therapy response in colorectal cancer. *JCI Insight*, *5*(15). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.127552>
- Gebert, L. F. R., & MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *20*(1), 21-37. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>
- Gharib, E., Nazemalhosseini-Mojarad, E., Baghdar, K., Nayeri, Z., Sadeghi, H., Rezasoltani, S., Jamshidi-Fard, A., Larki, P., Sadeghi, A., Hashemi, M., & Asadzadeh Aghdaei, H. (2021). Identification of a stool long non-coding RNAs panel as a potential biomarker for early detection of colorectal cancer. *J Clin Lab Anal*, *35*(2), e23601. <https://doi.org/10.1002/jcla.23601>
- Glinge, C., Clauss, S., Boddum, K., Jabbari, R., Jabbari, J., Risgaard, B., Tomsits, P., Hildebrand, B., Kaab, S., Wakili, R., Jespersen, T., & Tfelt-Hansen, J. (2017). Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs - Pre-Analytic Methodological Considerations. *PLoS One*, *12*(2), e0167969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167969>

- Gold, P., & Freedman, S. O. (1965a). Demonstration of Tumor-Specific Antigens in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absorption Techniques. *J Exp Med*, *121*(3), 439-462. <https://doi.org/10.1084/jem.121.3.439>
- Gold, P., & Freedman, S. O. (1965b). Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med*, *122*(3), 467-481. <https://doi.org/10.1084/jem.122.3.467>
- Goldstein, M. J., & Mitchell, E. P. (2005). Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest*, *23*(4), 338-351. <https://doi.org/10.1081/cnv-58878>
- Gordon, P. H. (2010). Screening for colorectal carcinoma. *Curr Oncol*, *17*(2), 34-39. <https://doi.org/10.3747/co.v17i2.602>
- Grutzmann, R., Molnar, B., Pilarsky, C., Habermann, J. K., Schlag, P. M., Saeger, H. D., Miehleke, S., Stolz, T., Model, F., Roblick, U. J., Bruch, H. P., Koch, R., Liebenberg, V., Devos, T., Song, X., Day, R. H., Sledziewski, A. Z., & Lofton-Day, C. (2008). Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS One*, *3*(11), e3759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003759>
- Gu, Z., Xia, J., Xu, H., Frech, I., Tricot, G., & Zhan, F. (2017). NEK2 Promotes Aerobic Glycolysis in Multiple Myeloma Through Regulating Splicing of Pyruvate Kinase. *J Hematol Oncol*, *10*(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0392-4>
- Guimaraes, D. P., Fregnani, J. H., Reis, R. M., Taveira, L. N., Scapulatempo-Neto, C., Matsushita, M., Silva, S. R. M., Oliveira, C. Z., Longatto-Filho, A., Eklund, C., Paloheimo, L., Mauad, E., Suovaniemi, O., & Syrjanen, K. (2019). Comparison of a New-generation Fecal Immunochemical Test (FIT) With Guaiac Fecal Occult Blood Test (gFOBT) in Detecting Colorectal Neoplasia Among Colonoscopy-referral Patients. *Anticancer Res*, *39*(1), 261-269. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13106>
- Ha, S. Y., Yu, J. I., Choi, C., Kang, S. Y., Joh, J. W., Paik, S. W., Kim, S., Kim, M., Park, H. C., & Park, C. K. (2019). Prognostic significance of miR-122 expression after curative resection in patients with hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*, *9*(1), 14738. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50594-2>
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, *18*(24), 3016-3027. <https://doi.org/10.1101/gad.1262504>
- Han, X., Zhang, S., Zhou, D. C., Wang, D., He, X., Yuan, D., Li, R., He, J., Duan, X., Wendl, M. C., Ding, L., & Niu, B. (2021). MSI-sensor-ct: microsatellite instability detection

- using cfDNA sequencing data. *Brief Bioinform*, 22(5).
<https://doi.org/10.1093/bib/bbaa402>
- He, J., Xie, G., Tong, J., Peng, Y., Huang, H., Li, J., Wang, N., & Liang, H. (2014). 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*, 70(2), 1343-1350. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0062-x>
- Hendricks, A., Rosenstiel, P., Hinz, S., Burmeister, G., Rocken, C., Boersch, K., Schafmayer, C., Becker, T., Franke, A., & Forster, M. (2020). 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*, 21(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0941-5>
- Hirahata, T., Ul Quraish, R., Quraish, A. U., Ul Quraish, S., Naz, M., & Razzaq, M. A. (2022). Liquid Biopsy: A Distinctive Approach to the Diagnosis and Prognosis of Cancer. *Cancer Inform*, 21, 11769351221076062. <https://doi.org/10.1177/11769351221076062>
- Holyoke, E. D., Chu, T. M., & Murphy, G. P. (1975). CEA as a monitor of gastrointestinal malignancy. *Cancer*, 35(3), 830-836. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197503\)35:3<830::aid-cnrcr2820350340>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197503)35:3<830::aid-cnrcr2820350340>3.0.co;2-h)
- Hu, Z., Chen, H., Long, Y., Li, P., & Gu, Y. (2021). The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion. *Crit Rev Oncol Hematol*, 157, 103166. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103166>
- Hua, Y., Zhu, Y., Zhang, J., Zhu, Z., Ning, Z., Chen, H., Liu, L., Chen, Z., & Meng, Z. (2018). miR-122 Targets X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein to Sensitize Oxaliplatin-Resistant Colorectal Cancer Cells to Oxaliplatin-Mediated Cytotoxicity. *Cell Physiol Biochem*, 51(5), 2148-2159. <https://doi.org/10.1159/000495832>
- Huang, E. Y., Chang, J. C., Chen, H. H., Hsu, C. Y., Hsu, H. C., & Wu, K. L. (2018). Carcinoembryonic antigen as a marker of radioresistance in colorectal cancer: a potential role of macrophages. *BMC Cancer*, 18(1), 321. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4254-4>
- Hyman, E., Kauraniemi, P., Hautaniemi, S., Wolf, M., Mousses, S., Rozenblum, E., Ringner, M., Sauter, G., Monni, O., Elkahloun, A., Kallioniemi, O. P., & Kallioniemi, A. (2002). Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res*, 62(21), 6240-6245. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414653>
- Chicard, M., Colmet-Daage, L., Clement, N., Danzon, A., Bohec, M., Bernard, V., Baulande, S., Bellini, A., Deveau, P., Pierron, G., Lapouble, E., Janoueix-Lerosey, I., Peuchmaur,

- M., Corradini, N., Defachelles, A. S., Valteau-Couanet, D., Michon, J., Combaret, V., Delattre, O., & Schleiermacher, G. (2018). Whole-Exome Sequencing of Cell-Free DNA Reveals Temporo-spatial Heterogeneity and Identifies Treatment-Resistant Clones in Neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 24(4), 939-949. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1586>
- Chidimatsu, H., Tsunedomi, R., Nakagami, Y., Xu, M., Nakajima, M., Nakashima-Nakasuga, C., Tomochika, S., Yoshida, S., Suzuki, N., Watanabe, Y., Matsui, H., Shindo, Y., Tokumitsu, Y., Iida, M., Takeda, S., Ioka, T., Ueno, T., Tanabe, T., Hoshii, Y., Hazama, S., & Nagano, H. (2023). Serum CCL7 Is a Novel Prognostic Biomarker of Metastatic Colorectal Cancer. *Anticancer Res*, 43(1), 105-114. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.16139>
- Iino, I., Kikuchi, H., Miyazaki, S., Hiramatsu, Y., Ohta, M., Kamiya, K., Kusama, Y., Baba, S., Setou, M., & Konno, H. (2013). Effect of miR-122 and its target gene cationic amino acid transporter 1 on colorectal liver metastasis. *Cancer Sci*, 104(5), 624-630. <https://doi.org/10.1111/cas.12122>
- Ilie, M., & Hofman, P. (2016). Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? *Transl Lung Cancer Res*, 5(4), 420-423. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.08.06>
- Islam, F., Gopalan, V., Vider, J., Lu, C. T., & Lam, A. K. (2018). MiR-142-5p act as an oncogenic microRNA in colorectal cancer: Clinicopathological and functional insights. *Exp Mol Pathol*, 104(1), 98-107. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.01.006>
- Jancik, S., Drabek, J., Radzioch, D., & Hajduch, M. (2010). Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 150960. <https://doi.org/10.1155/2010/150960>
- Jess, T., Rungoe, C., & Peyrin-Biroulet, L. (2012). Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 10(6), 639-645. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.01.010>
- Ji, P., Diederichs, S., Wang, W., Boing, S., Metzger, R., Schneider, P. M., Tidow, N., Brandt, B., Buerger, H., Bulk, E., Thomas, M., Berdel, W. E., Serve, H., & Muller-Tidow, C. (2003). MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 22(39), 8031-8041. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206928>
- Ji, X., Takahashi, R., Hiura, Y., Hirokawa, G., Fukushima, Y., & Iwai, N. (2009). Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem*, 55(11), 1944-1949. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.125310>

- Jiang, Y., Chen, M., Nie, H., & Yuan, Y. (2019). PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. *Hum Vaccin Immunother*, *15*(5), 1111-1122. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1571892>
- Jopling, C. (2012). Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biol*, *9*(2), 137-142. <https://doi.org/10.4161/rna.18827>
- Karakas, D., & Ozpolat, B. (2021). The Role of LncRNAs in Translation. *Noncoding RNA*, *7*(1). <https://doi.org/10.3390/ncrna7010016>
- Karoui, M., Rullier, A., Piessen, G., Legoux, J. L., Barbier, E., De Chaisemartin, C., Lecaille, C., Bouche, O., Ammarguella, H., Brunetti, F., Prudhomme, M., Regimbeau, J. M., Glehen, O., Lievre, A., Portier, G., Hartwig, J., Goujon, G., Romain, B., Lepage, C., Taieb, J., & for, P. i. c. (2020). Perioperative FOLFOX 4 Versus FOLFOX 4 Plus Cetuximab Versus Immediate Surgery for High-Risk Stage II and III Colon Cancers: A Phase II Multicenter Randomized Controlled Trial (PRODIGE 22). *Ann Surg*, *271*(4), 637-645. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000003454>
- Kartha, R. V., & Subramanian, S. (2014). Competing endogenous RNAs (ceRNAs): new entrants to the intricacies of gene regulation. *Front Genet*, *5*, 8. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00008>
- Keenan, J. I., & Frizelle, F. A. (2022). Biomarkers to Detect Early-Stage Colorectal Cancer. *Biomedicines*, *10*(2). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020255>
- Kim, S., Park, B. K., Seo, J. H., Choi, J., Choi, J. W., Lee, C. K., Chung, J. B., Park, Y., & Kim, D. W. (2020). Carbohydrate antigen 19-9 elevation without evidence of malignant or pancreatobiliary diseases. *Sci Rep*, *10*(1), 8820. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65720-8>
- Ko, C. W., Doria-Rose, V. P., Barrett, M. J., Kamineni, A., Enewold, L., & Weiss, N. S. (2019). Screening colonoscopy and flexible sigmoidoscopy for reduction of colorectal cancer incidence: A case-control study. *PLoS One*, *14*(12), e0226027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226027>
- Koepfel, F., Blanchard, S., Jovelet, C., Genin, B., Marcaillou, C., Martin, E., Rouleau, E., Solary, E., Soria, J. C., Andre, F., & Lacroix, L. (2017). Whole exome sequencing for determination of tumor mutation load in liquid biopsy from advanced cancer patients. *PLoS One*, *12*(11), e0188174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188174>
- Kong, W., Guang, Y., Yu, P., Zhu, A., Zhang, J., & Ying, R. (2019). Diagnostic Value of miR-142-5p and Tiam-1 in Colon Cancer Patients. *Clin Lab*, *65*(12). <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2019.190721>

- Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, M., Herlyn, D., & Fuhrer, P. (1979). Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet*, 5(6), 957-971. <https://doi.org/10.1007/BF01542654>
- Kow, A. W. C. (2019). Hepatic metastasis from colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*, 10(6), 1274-1298. <https://doi.org/10.21037/jgo.2019.08.06>
- Kunadirek, P., Chuaypen, N., Jenjaroenpun, P., Wongsurawat, T., Pinjaroen, N., Sirichindakul, P., Nookaew, I., & Tangkijvanich, P. (2021). Cell-Free DNA Analysis by Whole-Exome Sequencing for Hepatocellular Carcinoma: A Pilot Study in Thailand. *Cancers (Basel)*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/cancers13092229>
- Kunigenas, L., Stankevicius, V., Dulskas, A., Budginaite, E., Alzbutas, G., Stratilatovas, E., Cordes, N., & Suziedelis, K. (2020). 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*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/biom10040613>
- Kupec, T., Bleilevens, A., Iborra, S., Najjari, L., Wittenborn, J., Maurer, J., & Stickeler, E. (2022). Stability of circulating microRNAs in serum. *PLoS One*, 17(8), e0268958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268958>
- Lamb, Y. N., & Dhillon, S. (2017). Epi proColon((R)) 2.0 CE: A Blood-Based Screening Test for Colorectal Cancer. *Mol Diagn Ther*, 21(2), 225-232. <https://doi.org/10.1007/s40291-017-0259-y>
- Lansdorp-Vogelaar, I., Kuntz, K. M., Knudsen, A. B., van Ballegooijen, M., Zauber, A. G., & Jemal, A. (2012). Contribution of screening and survival differences to racial disparities in colorectal cancer rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21(5), 728-736. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0023>
- Lauby-Secretan, B., Vilahur, N., Bianchini, F., Guha, N., Straif, K., & International Agency for Research on Cancer Handbook Working, G. (2018). The IARC Perspective on Colorectal Cancer Screening. *N Engl J Med*, 378(18), 1734-1740. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr1714643>
- Lawrie, C. H., Gal, S., Dunlop, H. M., Pushkaran, B., Liggins, A. P., Pulford, K., Banham, A. H., Pezzella, F., Boulton, J., Wainscoat, J. S., Hatton, C. S., & Harris, A. L. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 141(5), 672-675. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x>

- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843-854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, *23*(20), 4051-4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M., & Yaros, M. J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*, *37*(3), 646-650. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/837366>
- Lewandowska, A., Rudzki, G., Lewandowski, T., Strykowska-Gora, A., & Rudzki, S. (2022). Title: Risk Factors for the Diagnosis of Colorectal Cancer. *Cancer Control*, *29*, 10732748211056692. <https://doi.org/10.1177/10732748211056692>
- Li, H., Boakye, D., Chen, X., Hoffmeister, M., & Brenner, H. (2021). Association of Body Mass Index With Risk of Early-Onset Colorectal Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol*, *116*(11), 2173-2183. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001393>
- Li, H., Zhang, X., Jin, Z., Yin, T., Duan, C., Sun, J., Xiong, R., & Li, Z. (2019). MiR-122 Promotes the Development of Colon Cancer by Targeting ALDOA In Vitro. *Technol Cancer Res Treat*, *18*, 1533033819871300. <https://doi.org/10.1177/1533033819871300>
- Li, K., Luo, H., Huang, L., Luo, H., & Zhu, X. (2020). Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int*, *20*, 16. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1091-8>
- Li, P., Zhang, X., Wang, H., Wang, L., Liu, T., Du, L., Yang, Y., & Wang, C. (2017). MALAT1 Is Associated with Poor Response to Oxaliplatin-Based Chemotherapy in Colorectal Cancer Patients and Promotes Chemoresistance through EZH2. *Mol Cancer Ther*, *16*(4), 739-751. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0591>
- Li, X., Yao, X., Wang, Y., Hu, F., Wang, F., Jiang, L., Liu, Y., Wang, D., Sun, G., & Zhao, Y. (2013). MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features. *PLoS One*, *8*(3), e59064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059064>
- Li, Y., Wang, J., Ma, X., Tan, L., Yan, Y., Xue, C., Hui, B., Liu, R., Ma, H., & Ren, J. (2016). A Review of Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer. *Int J Biol Sci*, *12*(8), 1022-1031. <https://doi.org/10.7150/ijbs.15438>

- Liebs, S., Keilholz, U., Kehler, I., Schweiger, C., Hayback, J., & Nonnenmacher, A. (2019). Detection of mutations in circulating cell-free DNA in relation to disease stage in colorectal cancer. *Cancer Med*, 8(8), 3761-3769. <https://doi.org/10.1002/cam4.2219>
- Lin, L. I., Chen, L. L., Wang, Y., Meng, X. Y., Liang, C., & Zhou, F. X. (2016). Efficacy of cetuximab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer according to RAS and BRAF mutation subgroups: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol*, 4(6), 1017-1024. <https://doi.org/10.3892/mco.2016.836>
- Ling, H., Vincent, K., Pichler, M., Fodde, R., Berindan-Neagoe, I., Slack, F. J., & Calin, G. A. (2015). Junk DNA and the long non-coding RNA twist in cancer genetics. *Oncogene*, 34(39), 5003-5011. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.456>
- Liu, J., Chen, Z., Li, Y., Zhao, W., Wu, J., & Zhang, Z. (2021). PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitors in Tumor Immunotherapy. *Front Pharmacol*, 12, 731798. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.731798>
- Liu, J., Zhao, H., Huang, Y., Xu, S., Zhou, Y., Zhang, W., Li, J., Ming, Y., Wang, X., Zhao, S., Li, K., Dong, X., Ma, Y., Qian, T., Chen, X., Xing, Z., Zhang, Y., Chen, H., Liu, Z., Pang, D., Zhou, M., Wu, Z., Wang, X., Wang, X., Wu, N., & Su, J. (2021). Genome-wide cell-free DNA methylation analyses improve accuracy of non-invasive diagnostic imaging for early-stage breast cancer. *Mol Cancer*, 20(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01330-w>
- Liu, S., Xiao, Z., Ai, F., Liu, F., Chen, X., Cao, K., Ren, W., Zhang, X., Shu, P., & Zhang, D. (2017). miR-142-5p promotes development of colorectal cancer through targeting SDHB and facilitating generation of aerobic glycolysis. *Biomed Pharmacother*, 92, 1119-1127. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.134>
- Liu, T., Jiang, S., Teng, X., Zhong, L., Liu, M., Jin, Y., & Dong, M. (2023). A comparison of panitumumab and cetuximab in the treatment of KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 45(1), 1-9. <https://doi.org/10.1080/08923973.2022.2112222>
- Livingstone, A. S., Hampson, L. G., Shuster, J., Gold, P., & Hinchey, E. J. (1974). Carcinoembryonic antigen in the diagnosis and management of colorectal carcinoma. Current status. *Arch Surg*, 109(2), 259-264. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1974.01360020119023>
- Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W., & Wainscoat, J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350(9076), 485-487. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02174-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02174-0)

- Lofton-Day, C., Model, F., Devos, T., Tetzner, R., Distler, J., Schuster, M., Song, X., Lesche, R., Liebenberg, V., Ebert, M., Molnar, B., Grutzmann, R., Pilarsky, C., & Sledziewski, A. (2008). DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem*, *54*(2), 414-423. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.095992>
- Lone, S. N., Nisar, S., Masoodi, T., Singh, M., Rizwan, A., Hashem, S., El-Rifai, W., Bedognetti, D., Batra, S. K., Haris, M., Bhat, A. A., & Macha, M. A. (2022). Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol Cancer*, *21*(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01543-7>
- Luo, J., Qu, L., Gao, F., Lin, J., Liu, J., & Lin, A. (2021). LncRNAs: Architectural Scaffolds or More Potential Roles in Phase Separation. *Front Genet*, *12*, 626234. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.626234>
- Ma, L., Bajic, V. B., & Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol*, *10*(6), 925-933. <https://doi.org/10.4161/rna.24604>
- Maiertaler, M., Benner, A., Hoffmeister, M., Surowy, H., Jansen, L., Knebel, P., Chang-Claude, J., Brenner, H., & Burwinkel, B. (2017). Plasma miR-122 and miR-200 family are prognostic markers in colorectal cancer. *Int J Cancer*, *140*(1), 176-187. <https://doi.org/10.1002/ijc.30433>
- Mandel, P., & Metais, P. (1948). [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *C R Seances Soc Biol Fil*, *142*(3-4), 241-243. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18875018> (Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme.)
- Manier, S., Park, J., Capelletti, M., Bustoros, M., Freeman, S. S., Ha, G., Rhoades, J., Liu, C. J., Huynh, D., Reed, S. C., Gydush, G., Salem, K. Z., Rotem, D., Freymond, C., Yosef, A., Perilla-Glen, A., Garderet, L., Van Allen, E. M., Kumar, S., Love, J. C., Getz, G., Adalsteinsson, V. A., & Ghobrial, I. M. (2018). Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma. *Nat Commun*, *9*(1), 1691. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04001-5>
- Matuszyk, J. (2022). MALAT1-miRNAs network regulate thymidylate synthase and affect 5FU-based chemotherapy. *Mol Med*, *28*(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s10020-022-00516-2>
- Mehlen, P., & Fearon, E. R. (2004). Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol*, *22*(16), 3420-3428. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.02.019>

- Meijer, H. A., Smith, E. M., & Bushell, M. (2014). Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans*, 42(4), 1135-1140. <https://doi.org/10.1042/BST20140142>
- Mithani, S. K., Smith, I. M., Zhou, S., Gray, A., Koch, W. M., Maitra, A., & Califano, J. A. (2007). Mitochondrial resequencing arrays detect tumor-specific mutations in salivary rinses of patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 13(24), 7335-7340. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0220>
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B., & Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(30), 10513-10518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>
- Mohammed, N., Rodriguez, M., Garcia, V., Garcia, J. M., Dominguez, G., Pena, C., Herrera, M., Gomez, I., Diaz, R., Soldevilla, B., Herrera, A., Silva, J., & Bonilla, F. (2011). EPAS1 mRNA in plasma from colorectal cancer patients is associated with poor outcome in advanced stages. *Oncol Lett*, 2(4), 719-724. <https://doi.org/10.3892/ol.2011.294>
- Murphy, N., Moreno, V., Hughes, D. J., Vodicka, L., Vodicka, P., Aglago, E. K., Gunter, M. J., & Jenab, M. (2019). Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Mol Aspects Med*, 69, 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.06.005>
- Nakagoe, T., Sawai, T., Ayabe, H., Nakazaki, T., Ishikaw, H., Hatano, K., Kajiwara, K., Miyashita, K., Matsuo, T., Nogawa, T., & Arisawa, K. (2001). Prognostic value of carcinoembryonic antigen (CEA) in tumor tissue of patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*, 21(4B), 3031-3036. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11712806>
- Nakayama, T., Watanabe, M., Teramoto, T., & Kitajima, M. (1997). Slope analysis of CA19-9 and CEA for predicting recurrence in colorectal cancer patients. *Anticancer Res*, 17(2B), 1379-1382. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9137502>
- Nazemalhosseini Mojarad, E., Kuppen, P. J., Aghdaei, H. A., & Zali, M. R. (2013). The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 6(3), 120-128. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24834258>
- Nguyen, L. H., Goel, A., & Chung, D. C. (2020). Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 158(2), 291-302. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.059>

- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *9*, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- O'Brien, S. J., Netz, U., Hallion, J., Bishop, C., Stephen, V., Burton, J., Paas, M., Feagins, K., Pan, J., Rai, S. N., & Galandiuk, S. (2021). Circulating plasma microRNAs in colorectal neoplasia: A pilot study in assessing response to therapy. *Transl Oncol*, *14*(1), 100962. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100962>
- Orom, U. A., Nielsen, F. C., & Lund, A. H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*, *30*(4), 460-471. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.001>
- Pan, R., Zhou, C., Dai, J., Ying, X., Yu, H., Zhong, J., Zhang, Y., Wu, B., Mao, Y., Wu, D., Ying, J., Zhang, W., & Duan, S. (2018). Endothelial PAS domain protein 1 gene hypomethylation is associated with colorectal cancer in Han Chinese. *Exp Ther Med*, *16*(6), 4983-4990. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6856>
- Panda, A. C. (2018). Circular RNAs Act as miRNA Sponges. *Adv Exp Med Biol*, *1087*, 67-79. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1426-1_6
- Paschke, S., Jafarov, S., Staib, L., Kreuser, E. D., Maulbecker-Armstrong, C., Roitman, M., Holm, T., Harris, C. C., Link, K. H., & Kornmann, M. (2018). Are Colon and Rectal Cancer Two Different Tumor Entities? A Proposal to Abandon the Term Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, *19*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092577>
- Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*, *1*, 15004. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
- Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, *138*(6), 2059-2072. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>
- Pliakou, E., Lampropoulou, D. I., Dovrolis, N., Chrysikos, D., Filippou, D., Papadimitriou, C., Vezakis, A., Aravantinos, G., & Gazouli, M. (2022). Circulating miRNA Expression Profiles and Machine Learning Models in Association with Response to Irinotecan-Based Treatment in Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, *24*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010046>
- Policarpo, R., Sierksma, A., De Strooper, B., & d'Ydewalle, C. (2021). From Junk to Function: LncRNAs in CNS Health and Disease. *Front Mol Neurosci*, *14*, 714768. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.714768>
- Qingwei, Z., Dongsheng, H., Duo, L., Youlei, W., Songxia, Y., Ziqi, Y., & Lanjuan, L. (2020). Fluorouracil Supplemented With Oxaliplatin or Irinotecan for Solid Tumors:

- Indications From Clinical Characteristics and Health Outcomes of Patients. *Front Oncol*, 10, 1542. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01542>
- Qiu, G., Zhang, X. B., Zhang, S. Q., Liu, P. L., Wu, W., Zhang, J. Y., & Dai, S. R. (2016). Dysregulation of MALAT1 and miR-619-5p as a prognostic indicator in advanced colorectal carcinoma. *Oncol Lett*, 12(6), 5036-5042. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5312>
- Radwan, A. F., Shaker, O. G., El-Boghdady, N. A., & Senousy, M. A. (2021). 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*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22116147>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*, 14(2), 89-103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., & Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), 901-906. <https://doi.org/10.1038/35002607>
- Reisacher, C., & Arbibe, L. (2019). Not lost in host translation: The new roles of long noncoding RNAs in infectious diseases. *Cell Microbiol*, 21(11), e13119. <https://doi.org/10.1111/cmi.13119>
- Rodriguez, J., Zarate, R., Bandres, E., Viudez, A., Chopitea, A., Garcia-Foncillas, J., & Gil-Bazo, I. (2007). Combining chemotherapy and targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 13(44), 5867-5876. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i44.5867>
- Roslani, A. C., Abdullah, T., & Arumugam, K. (2012). Screening for colorectal neoplasias with fecal occult blood tests: false-positive impact of non-dietary restriction. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(1), 237-241. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.1.237>
- Saha, S. K., Choi, H. Y., Yang, G. M., Biswas, P. K., Kim, K., Kang, G. H., Gil, M., & Cho, S. G. (2020). GPR50 Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression via the Notch Signaling Pathway through Direct Interaction with ADAM17. *Mol Ther Oncolytics*, 17, 332-349. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.04.002>
- Salido-Guadarrama, I., Romero-Cordoba, S., Peralta-Zaragoza, O., Hidalgo-Miranda, A., & Rodriguez-Dorantes, M. (2014). MicroRNAs transported by exosomes in body fluids

- as mediators of intercellular communication in cancer. *Onco Targets Ther*, 7, 1327-1338. <https://doi.org/10.2147/OTT.S61562>
- Segditsas, S., & Tomlinson, I. (2006). Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene*, 25(57), 7531-7537. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210059>
- Sechidis, K., Papangelou, K., Metcalfe, P. D., Svensson, D., Weatherall, J., & Brown, G. (2018). Distinguishing prognostic and predictive biomarkers: an information theoretic approach. *Bioinformatics*, 34(19), 3365-3376. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty357>
- Sendi, H., Yazdimamaghani, M., Hu, M., Sultanpuram, N., Wang, J., Moody, A. S., McCabe, E., Zhang, J., Graboski, A., Li, L., Rojas, J. D., Dayton, P. A., Huang, L., & Wang, A. Z. (2022). Nanoparticle Delivery of miR-122 Inhibits Colorectal Cancer Liver Metastasis. *Cancer Res*, 82(1), 105-113. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-2269>
- Shah, M. Y., & Calin, G. A. (2013). The mix of two worlds: non-coding RNAs and hormones. *Nucleic Acid Ther*, 23(1), 2-8. <https://doi.org/10.1089/nat.2012.0375>
- Shen, W., Yu, Q., Pu, Y., & Xing, C. (2022). Upregulation of Long Noncoding RNA MALAT1 in Colorectal Cancer Promotes Radioresistance and Aggressive Malignance. *Int J Gen Med*, 15, 8365-8380. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S393270>
- Shi, D., Zhai, B., Zheng, Y., Ren, R., Han, M., & Wang, X. (2015). Transcatheter arterial infusion chemotherapy increases expression level of miR-142-5p in stage III colorectal cancer. *Indian J Cancer*, 52 Suppl 2, e47-55. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.172513>
- Schmidt, L. H., Spieker, T., Koschmieder, S., Schaffers, S., Humberg, J., Jungen, D., Bulk, E., Hascher, A., Wittmer, D., Marra, A., Hillejan, L., Wiebe, K., Berdel, W. E., Wiewrodt, R., & Muller-Tidow, C. (2011). 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*, 6(12), 1984-1992. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182307eac>
- Sidransky, D., Von Eschenbach, A., Tsai, Y. C., Jones, P., Summerhayes, I., Marshall, F., Paul, M., Green, P., Hamilton, S. R., Frost, P., & et al. (1991). Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*, 252(5006), 706-709. <https://doi.org/10.1126/science.2024123>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*, 73(1), 17-48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>

- Sin, S. H., Yoon, J. H., Kim, S. W., Park, W. S., & Chae, H. S. (2023). A Case of Sporadic Multiple Colonic Polyps in a Young Woman. *Curr Oncol*, *30*(2), 1293-1299. <https://doi.org/10.3390/currenocol30020100>
- Sinicrope, F. A., & Sargent, D. J. (2012). Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*, *18*(6), 1506-1512. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1469>
- Sisco, K. L. (2001). Is RNA in serum bound to nucleoprotein complexes? *Clin Chem*, *47*(9), 1744-1745. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514429>
- Siskova, A., Kral, J., Drabova, J., Cervena, K., Tomasova, K., Jungwirth, J., Hucl, T., Kohout, P., Summerova, S., Vodickova, L., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2022). Discovery of Long Non-Coding RNA MALAT1 Amplification in Precancerous Colorectal Lesions. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(14), 7656. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/14/7656>
- Soares, E., Reis, J., Rodrigues, M., Ribeiro, C. F., & Pereira, F. C. (2021). Circulating Extracellular Vesicles: The Missing Link between Physical Exercise and Depression Management? *Int J Mol Sci*, *22*(2). <https://doi.org/10.3390/ijms22020542>
- Spindler, K. L., 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), e0108247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108247>
- Srivastava, S., & Gopal-Srivastava, R. (2002). Biomarkers in cancer screening: a public health perspective. *J Nutr*, *132*(8 Suppl), 2471S-2475S. <https://doi.org/10.1093/jn/132.8.2471S>
- Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., & Huarte, M. (2021). Author Correction: Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *22*(2), 159. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00330-4>
- Stathopoulos, G. P., Batziou, C., Trafalis, D., Koutantos, J., Batzios, S., Stathopoulos, J., Legakis, J., & Armakolas, A. (2010). Treatment of colorectal cancer with and without bevacizumab: a phase III study. *Oncology*, *78*(5-6), 376-381. <https://doi.org/10.1159/000320520>
- Sun, L., Liu, X., Pan, B., Hu, X., Zhu, Y., Su, Y., Guo, Z., Zhang, G., Xu, M., Xu, X., Sun, H., & Wang, S. (2020). Serum exosomal miR-122 as a potential diagnostic and prognostic biomarker of colorectal cancer with liver metastasis. *J Cancer*, *11*(3), 630-637. <https://doi.org/10.7150/jca.33022>

- Sun, Q., Hao, Q., & Prasanth, K. V. (2018). Nuclear Long Noncoding RNAs: Key Regulators of Gene Expression. *Trends Genet*, 34(2), 142-157. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.11.005>
- Sun, Z., Ou, C., Liu, J., Chen, C., Zhou, Q., Yang, S., Li, G., Wang, G., Song, J., Li, Z., Zhang, Z., Yuan, W., & Li, X. (2019). YAP1-induced MALAT1 promotes epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis by sponging miR-126-5p in colorectal cancer. *Oncogene*, 38(14), 2627-2644. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0628-y>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Suzuki, N., Kamataki, A., Yamaki, J., & Homma, Y. (2008). Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta*, 387(1-2), 55-58. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.09.001>
- Suzuki, S., Goto, A., Nakatochi, M., Narita, A., Yamaji, T., Sawada, N., Katagiri, R., Iwagami, M., Hanyuda, A., Hachiya, T., Sutoh, Y., Oze, I., Koyanagi, Y. N., Kasugai, Y., Taniyama, Y., Ito, H., Ikezaki, H., Nishida, Y., Tamura, T., Mikami, H., Takezaki, T., Suzuki, S., Ozaki, E., Kuriki, K., Takashima, N., Arisawa, K., Takeuchi, K., Tanno, K., Shimizu, A., Tamiya, G., Hozawa, A., Kinoshita, K., Wakai, K., Sasaki, M., Yamamoto, M., Matsuo, K., Tsugane, S., & Iwasaki, M. (2021). Body mass index and colorectal cancer risk: A Mendelian randomization study. *Cancer Sci*, 112(4), 1579-1588. <https://doi.org/10.1111/cas.14824>
- Svoboda, M., Slyskova, J., Schneiderova, M., Makovicky, P., Bielik, L., Levy, M., Lipska, L., Hemmelova, B., Kala, Z., Protivankova, M., Vycital, O., Liska, V., Schwarzova, L., Vodickova, L., & Vodicka, P. (2014). HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients. *Carcinogenesis*, 35(7), 1510-1515. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu055>
- Taieb, J., & Gallois, C. (2020). Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *Cancers (Basel)*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/cancers12092679>
- Tamas, K., Walenkamp, A. M., de Vries, E. G., van Vugt, M. A., Beets-Tan, R. G., van Etten, B., de Groot, D. J., & Hospers, G. A. (2015). Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site. *Cancer Treat Rev*, 41(8), 671-679. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.06.007>

- Tang, D., Yang, Z., Long, F., Luo, L., Yang, B., Zhu, R., Sang, X., & Cao, G. (2019). Inhibition of MALAT1 reduces tumor growth and metastasis and promotes drug sensitivity in colorectal cancer. *Cell Signal*, *57*, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.01.013>
- Thakral, S., & Ghoshal, K. (2015). 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*, *15*(2), 142-150. <https://doi.org/10.2174/1566523214666141224095610>
- Thierry, A. R., Mouliere, F., El Messaoudi, S., Mollevi, C., Lopez-Crapez, E., Rolet, F., Gillet, B., Gongora, C., Dechelotte, P., Robert, B., Del Rio, M., Lamy, P. J., Bibeau, F., Nouaille, M., Lorient, V., Jarrousse, A. S., Molina, F., Mathonnet, M., Pezet, D., & Ychou, M. (2014). Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med*, *20*(4), 430-435. <https://doi.org/10.1038/nm.3511>
- Thomson, D. M., Krupey, J., Freedman, S. O., & Gold, P. (1969). The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *64*(1), 161-167. <https://doi.org/10.1073/pnas.64.1.161>
- Tibble, J., Sigthorsson, G., Foster, R., Sherwood, R., Fagerhol, M., & Bjarnason, I. (2001). Faecal calprotectin and faecal occult blood tests in the diagnosis of colorectal carcinoma and adenoma. *Gut*, *49*(3), 402-408. <https://doi.org/10.1136/gut.49.3.402>
- Toledo, R. A., Garralda, E., Mitsi, M., Pons, T., Monsech, J., Vega, E., Otero, A., Albarran, M. I., Banos, N., Duran, Y., Bonilla, V., Sarno, F., Camacho-Artacho, M., Sanchez-Perez, T., Perea, S., Alvarez, R., De Martino, A., Lietha, D., Blanco-Aparicio, C., Cubillo, A., Dominguez, O., Martinez-Torrecuadrada, J. L., & Hidalgo, M. (2018). 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*, *24*(15), 3550-3559. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0103>
- Toledo, R. A., Garralda, E., Pons, T., Monsech, J., Vega, E., Alvarez, R., Cubillo, A., Blanco-Aparicio, C., Dominguez, O., Martinez, J. L., & Hidalgo, M. (2017). 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*, *28*. <Go to ISI>://WOS:000411324005011

- Topdagi, O., & Timuroglu, A. (2018). Evaluation of the Relationship between Carcinoembryonic Antigen and TNM Stage in Colorectal Cancer. *Eurasian J Med*, *50*(2), 96-98. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2018.17093>
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., & Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, *39*(16), 7223-7233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr254>
- Underhill, H. R., Kitzman, J. O., Hellwig, S., Welker, N. C., Daza, R., Baker, D. N., Gligorich, K. M., Rostomily, R. C., Bronner, M. P., & Shendure, J. (2016). Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet*, *12*(7), e1006162. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006162>
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J., & Lotvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, *9*(6), 654-659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Van Cutsem, E., Kohne, C. H., Lang, I., Folprecht, G., Nowacki, M. P., Cascinu, S., Shchepotin, I., Maurel, J., Cunningham, D., Tejpar, S., Schlichting, M., Zube, A., Celik, I., Rougier, P., & Ciardiello, F. (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*, *29*(15), 2011-2019. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.5091>
- Vidula, N., Lipman, A., Kato, S., Weipert, C., Hesler, K., Azzi, G., Elkhanany, A., Juric, D., Rodriguez, E., Faulkner, C., Makhoul, P., Price, K., O'Shaughnessy, J., & Bardia, A. (2022). Detection of microsatellite instability high (MSI-H) status by targeted plasma-based genotyping in metastatic breast cancer. *NPJ Breast Cancer*, *8*(1), 117. <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00490-2>
- Vitale, S. R., Groenendijk, F. H., van Marion, R., Beaufort, C. M., Helmijr, J. C., Dubbink, H. J., Dinjens, W. N. M., Ewing-Graham, P. C., Smolders, R., van Doorn, H. C., Boere, I. A., Berns, E., Helleman, J., & Jansen, M. (2020). TP53 Mutations in Serum Circulating Cell-Free Tumor DNA As Longitudinal Biomarker for High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Biomolecules*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/biom10030415>
- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2020). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther*, *206*, 107447. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107447>

- Vogt, N., Gibaud, A., Almeida, A., Ourliac-Garnier, I., Debatisse, M., & Malfoy, B. (2010). Relationships linking amplification level to gene over-expression in gliomas. *PLoS One*, 5(12), e14249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014249>
- Vukobrat-Bijedic, Z., Husic-Selimovic, A., Sofic, A., Bijedic, N., Bjelogrljic, I., Gogov, B., & Mehmedovic, A. (2013). Cancer Antigens (CEA and CA 19-9) as Markers of Advanced Stage of Colorectal Carcinoma. *Med Arch*, 67(6), 397-401. <https://doi.org/10.5455/medarh.2013.67.397-401>
- Vychytilova-Faltejskova, P., Radova, L., Sachlova, M., Kosarova, Z., Slaba, K., Fabian, P., Grolich, T., Prochazka, V., Kala, Z., Svoboda, M., Kiss, I., Vyzula, R., & Slaby, O. (2016). Serum-based microRNA signatures in early diagnosis and prognosis prediction of colon cancer. *Carcinogenesis*, 37(10), 941-950. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw078>
- Vymetalkova, V., Cervena, K., Bartu, L., & Vodicka, P. (2018). Circulating Cell-Free DNA and Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113356>
- Wagner, T. D., Fakhri, M. G., & Yang, G. Y. (2010). Management of stage II/III rectal cancer. *J Gastrointest Oncol*, 1(2), 112-119. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2010.002>
- Wang, J., Li, S., Liu, Y., Zhang, C., Li, H., & Lai, B. (2020). Metastatic patterns and survival outcomes in patients with stage IV colon cancer: A population-based analysis. *Cancer Med*, 9(1), 361-373. <https://doi.org/10.1002/cam4.2673>
- Wang, J., Mei, J., & Ren, G. (2019). Plant microRNAs: Biogenesis, Homeostasis, and Degradation. *Front Plant Sci*, 10, 360. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00360>
- Wang, J., Zhao, L., Shang, K., Liu, F., Che, J., Li, H., & Cao, B. (2020). Long non-coding RNA H19, a novel therapeutic target for pancreatic cancer. *Mol Med*, 26(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00156-4>
- Wang, J. Y., Hsieh, J. S., Chang, M. Y., Huang, T. J., Chen, F. M., Cheng, T. L., Alexandersen, K., Huang, Y. S., Tzou, W. S., & Lin, S. R. (2004). Molecular detection of APC, K-ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg*, 28(7), 721-726. <https://doi.org/10.1007/s00268-004-7366-8>
- Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 43(6), 904-914. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.018>
- Wang, L., He, X., Ugai, T., Haruki, K., Lo, C. H., Hang, D., Akimoto, N., Fujiyoshi, K., Wang, M., Fuchs, C. S., Meyerhardt, J. A., Zhang, X., Wu, K., Chan, A. T., Giovannucci, E. L., Ogino, S., & Song, M. (2021). Risk Factors and Incidence of Colorectal Cancer

- According to Major Molecular Subtypes. *JNCI Cancer Spectr*, 5(1).
<https://doi.org/10.1093/jncics/pkaa089>
- Wang, W., Xiong, W., Zheng, J., Jin, Y., Dong, L., Feng, X., Ban, Y., & Chen, B. (2022). The contribution of MALAT1 gene rs3200401 and MEG3 gene rs7158663 to the risk of lung, colorectal, gastric and liver cancer. *Pathol Res Pract*, 240, 154212. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154212>
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Galas, D. J., & Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 56(11), 1733-1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- Wei, X., Liu, H., Li, X., & Liu, X. (2019). Over-expression of MiR-122 promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma via targeting TLR4. *Ann Hepatol*, 18(6), 869-878. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2019.07.005>
- Wei, Z., Zhou, J., Yu, H., Pu, Y., Cheng, Y., Zhang, Y., Ji, Q., & Zhu, H. (2022). 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, 3032407. <https://doi.org/10.1155/2022/3032407>
- Wilkins, K., & Shields, M. (2009). Colorectal cancer testing in Canada--2008. *Health Rep*, 20(3), 21-30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19813436>
- Wilson, R. C., Tambe, A., Kidwell, M. A., Noland, C. L., Schneider, C. P., & Doudna, J. A. (2015). Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Mol Cell*, 57(3), 397-407. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.030>
- Wu, K., He, J., Pu, W., & Peng, Y. (2018). The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 16(2), 120-126. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2017.09.004>
- Wu, L., Liu, C., & Zhang, Z. (2020). Knockdown of lncRNA MIAT inhibits proliferation and cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells by increasing miR-184 expression. *Oncol Lett*, 19(1), 533-541. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.11084>
- Xie, Y. H., Chen, Y. X., & Fang, J. Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*, 5(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>
- Xu, S., Kong, D., Chen, Q., Ping, Y., & Pang, D. (2017). Oncogenic long noncoding RNA landscape in breast cancer. *Mol Cancer*, 16(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0696-6>

- Yamada, A., Komaki, Y., Komaki, F., Micic, D., Zullo, S., & Sakuraba, A. (2018). Risk of gastrointestinal cancers in patients with cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*, *19*(6), 758-767. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30188-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30188-8)
- Yamagishi, H., Kuroda, H., Imai, Y., & Hiraishi, H. (2016). Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin J Cancer*, *35*, 4. <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0066-y>
- Yang, L., Lee, M. S., Lu, H., Oh, D. Y., Kim, Y. J., Park, D., Park, G., Ren, X., Bristow, C. A., Haseley, P. S., Lee, S., Pantazi, A., Kucherlapati, R., Park, W. Y., Scott, K. L., Choi, Y. L., & Park, P. J. (2016). Analyzing Somatic Genome Rearrangements in Human Cancers by Using Whole-Exome Sequencing. *Am J Hum Genet*, *98*(5), 843-856. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.03.017>
- Yang, T., Li, H., Chen, T., Ren, H., Shi, P., & Chen, M. (2019). LncRNA MALAT1 Depressed Chemo-Sensitivity of NSCLC Cells through Directly Functioning on miR-197-3p/p120 Catenin Axis. *Mol Cells*, *42*(3), 270-283. <https://doi.org/10.14348/molcells.2019.2364>
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, *17*(24), 3011-3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>
- Yin, W., Xu, J., Li, C., Dai, X., Wu, T., & Wen, J. (2020). Circular RNA circ_0007142 Facilitates Colorectal Cancer Progression by Modulating CDC25A Expression via miR-122-5p. *Onco Targets Ther*, *13*, 3689-3701. <https://doi.org/10.2147/OTT.S238338>
- Yin, Y., Song, M., Gu, B., Qi, X., Hu, Y., Feng, Y., Liu, H., Zhou, L., Bian, Z., Zhang, J., Zuo, X., & Huang, Z. (2016). Systematic analysis of key miRNAs and related signaling pathways in colorectal tumorigenesis. *Gene*, *578*(2), 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.015>
- Yoshimura, H., Dhar, D. K., Kohno, H., Kubota, H., Fujii, T., Ueda, S., Kinugasa, S., Tachibana, M., & Nagasue, N. (2004). Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. *Clin Cancer Res*, *10*(24), 8554-8560. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0946-03>
- Yu, L., Fu, J., Yu, N., Wu, Y., & Han, N. (2020). 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*, *98*(4), 219-227. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2019-0489>

- Yu, M., Zhu, Y., Teng, L., Cui, J., & Su, Y. (2021). Can Circulating Cell-Free DNA or Circulating Tumor DNA Be a Promising Marker in Ovarian Cancer? *J Oncol*, 2021, 6627241. <https://doi.org/10.1155/2021/6627241>
- Yu, P., Zhou, M., Qu, J., Fu, L., Li, X., Cai, R., Jin, B., Teng, Y., Liu, J., Shi, J., & Zhang, J. (2018). The dynamic monitoring of CEA in response to chemotherapy and prognosis of mCRC patients. *BMC Cancer*, 18(1), 1076. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4987-0>
- Yuan, W., Sun, Y., Liu, L., Zhou, B., Wang, S., & Gu, D. (2017). Circulating LncRNAs Serve as Diagnostic Markers for Hepatocellular Carcinoma. *Cell Physiol Biochem*, 44(1), 125-132. <https://doi.org/10.1159/000484589>
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 302(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.028>
- Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., & Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 118(1), 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.017>
- Zhang, Y., Fan, M., Zhang, X., Huang, F., Wu, K., Zhang, J., Liu, J., Huang, Z., Luo, H., Tao, L., & Zhang, H. (2014). Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. *RNA*, 20(12), 1878-1889. <https://doi.org/10.1261/rna.045633.114>
- Zhang, Y., Huang, W., Yuan, Y., Li, J., Wu, J., Yu, J., He, Y., Wei, Z., & Zhang, C. (2020). Long non-coding RNA H19 promotes colorectal cancer metastasis via binding to hnRNPA2B1. *J Exp Clin Cancer Res*, 39(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01619-6>
- Zhao, L., Liu, H., Yuan, X., Gao, K., & Duan, J. (2020). Comparative study of whole exome sequencing-based copy number variation detection tools. *BMC Bioinformatics*, 21(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-3421-1>
- Zhao, L., Lou, G., Li, A., & Liu, Y. (2020). lncRNA MALAT1 modulates cancer stem cell properties of liver cancer cells by regulating YAP1 expression via miR-375 sponging. *Mol Med Rep*, 22(2), 1449-1457. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11196>
- Zheng, H. T., Shi, D. B., Wang, Y. W., Li, X. X., Xu, Y., Tripathi, P., Gu, W. L., Cai, G. X., & Cai, S. J. (2014). High expression of lncRNA MALAT1 suggests a biomarker of poor prognosis in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(6), 3174-3181. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031737>

Zhou, Y., Tozzi, F., Chen, J., Fan, F., Xia, L., Wang, J., Gao, G., Zhang, A., Xia, X., Brasher, H., Widger, W., Ellis, L. M., & Weihua, Z. (2012). Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells. *Cancer Res*, 72(1), 304-314.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1674>

Zhu, C., Wang, X., Wang, Y., & Wang, K. (2022). Functions and underlying mechanisms of lncRNA HOTAIR in cancer chemotherapy resistance. *Cell Death Discov*, 8(1), 383.
<https://doi.org/10.1038/s41420-022-01174-3>

Zhuo, Y., Gao, G., Shi, J. A., Zhou, X., & Wang, X. (2013). miRNAs: biogenesis, origin and evolution, functions on virus-host interaction. *Cell Physiol Biochem*, 32(3), 499-510.
<https://doi.org/10.1159/000354455>

Internetové zdroje:

<https://gco.iarc.fr>

<https://svod.cz>

FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/> Co-published by National Institutes of Health (US), Bethesda (MD).

<https://encodegenes.org>

11. 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., Skrobánek, 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*. Revizní řízení. (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., Zuppardo, 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).

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1

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)

Příloha č. 2

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).

Příloha č. 3

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)

Příloha č. 4

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*. Revizní řízení (IF 2023 – 3.508).

Příloha č. 5

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)