



Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

**Výzkum onkogenomických faktorů pro prognostiku a
prevenci karcinomů prsu, ovaria a kolorekta**

Mgr. Petr Holý

Praha, 2023

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

Obor: Preventivní medicína a epidemiologie

Předseda oborové rady: doc. MUDr. Jan Polák, Ph. D., MBA

Školící pracoviště: Státní zdravotní ústav, Oddělení toxikogenomiky

Autor: Mgr. Petr Holý

Školitel: doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.

Oponenti:

*S disertační prací je možno seznámit se na děkanátu 3. lékařské fakulty
Univerzity Karlovy*

Obsah

Souhrn	4
Summary.....	5
1. Úvod	6
1.1. Nádorová onemocnění.....	6
1.2. Oxysteroly a jejich role v nádorových onemocněních.....	11
1.3. Genomika a transkriptomika	13
2. Hypotézy a cíle práce	14
3. Materiál, metody a pacienti	15
3.1. Pacienti	15
3.2. Izolace a zpracování genetického materiálu	15
3.3. Sekvenování DNA a RNA.....	16
3.4. Terciární bioinformatická analýza a statistické vyhodnocení.	18
4. Výsledky a diskuze.....	20
4.1. Studie genů oxysterolové signalizace u karcinomu prsu....	20
4.2. Studie ovariálního karcinomu.....	24
4.3. Srovnání celoexomových mutačních profilů kolorektálních karcinomů a jejich synchronních jaterních metastáz	27
5. Závěr.....	30
6. Seznam publikací autora.....	32
6.1. Původní články podkládající disertační práci	32
6.2. Ostatní články související s tématem práce	33
7. Seznam použité literatury	35

Souhrn

Nádorová onemocnění dnes představují obrovskou socioekonomickou zátěž, přičemž jejich prevalence setrvale stoupá v měřítku lokálním i světovém. Díky moderním molekulárně-genetickým a příbuzným metodám bylo odhaleno mnoho biomarkerů pro lepší diagnostiku, prognostiku a účinnější léčbu se sníženým výskytem nežádoucích účinků, s benefitem pro všechny stupně prevence onkologických onemocnění.

Cíle této práce zahrnují genomickou charakterizaci pacientek s karcinomy prsu, ovaria (OVC) a kolorekta (CRC), včetně jejich nádorové tkáně, za účelem odhalení nových potenciálních biomarkerů pro zlepšení prognostiky nebo predikce odpovědi na léčbu.

U karcinomu prsu byly pomocí panelového DNA sekvenování odhaleny asociace somatických variant v *CYP46A1*, 9 funkčně souvisejících genech a dalších 20 genech individuálně asociovaných s expresí progesteronového receptoru, s kratším přežíváním pacientek. Multiomická studie, propojující varianty DNA s hladinami mRNA a miRNA, přinesla podrobnou interakční síť oxysterolové signalizace, v čele se zajímavou regulační osou *ESR1-CH25H-INSIG1-ABCA9* a 7 miRNA.

Srovnány byly celoexomové mutačních profily pacientek s OVC rezistentních a senzitivních na deriváty platiny. U senzitivních pacientek byla v nádorech nalezena signifikantně vyšší mutační zátěž v genu *TP53*, ale zároveň nižší v několika genech signalizační dráhy Hippo. Mutace v dráze oprav DNA homologní rekombinací umožnily predikci senzitivity pacientek na léčbu, zejména při kombinaci somatické a zárodečné informace.

Srovnání celoexomových mutačních profilů CRC a jejich synchronních jaterních metastáz odhalilo nové potenciální negativní prognostické faktory v metastázách v genech *ATM*, *DNAH11* a *MUC5AC*, a v mutačním podpisu SBS24, což podtrhuje smysl molekulární charakterizace metastáz navíc k obvykle analyzovaným primárním nádorům.

Summary

Cancer represents an enormous socioeconomic burden and its prevalence is steadily increasing, both domestically and globally. Thanks to modern molecular genetic and related methods, many biomarkers have been discovered for better diagnosis, prognosis and more effective treatment with reduced incidence of adverse effects, benefiting all levels of cancer prevention.

The objectives of this work include genomic characterization of patients with breast, ovarian (OVC) and colorectal (CRC) cancers, including their tumor tissue, to discover new potential biomarkers to improve prognosis or predict response to treatment.

In breast cancer, panel DNA sequencing revealed associations of somatic variants in CYP46A1, 9 functionally related genes, and 20 additional genes individually associated with progesterone receptor expression, with shorter patient survival. A multiomic study linking DNA variants to mRNA and miRNA levels yielded a detailed interaction network of oxysterol signaling, led by the notable *ESR1-CH25H-INSIG1-ABCA9* regulatory axis and 7 miRNAs.

Whole-exome mutational profiles of OVC patients resistant and sensitive to platinum derivatives were compared. Significantly higher mutational burden in the *TP53* gene was found in the tumors of sensitive patients, with also lower mutational burden in several genes of the Hippo signaling pathway. Mutations in the homologous recombination DNA repair pathway allowed prediction of patients' sensitivity to treatment, especially when somatic and germline information was combined.

Comparison of the genome-wide mutational profiles of CRCs and their synchronous liver metastases brought new potential negative prognostic factors in metastases in the *ATM*, *DNAH11* and *MUC5AC* genes, and in the SBS24 mutational signature, underscoring the importance of molecular characterization of metastases in addition to the commonly analyzed primary tumors.

1. Úvod

1.1. Nádorová onemocnění

1.1.1. Epidemiologie a prevence nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve většině zemí světa, včetně ČR, a to nejen u seniorní populace, ale i u populace mladší 70 let (Sung et al. 2021; Bray et al. 2021). Absolutní incidence a mortalita setrvale stoupají zejména v důsledku stárnutí populace a rostoucí prevalence environmentálních a socioekonomických rizikových faktorů v řadě zemí (Sung et al. 2021). Zdaleka nejčastějším nádorem u žen je karcinom prsu, jehož incidence je tak vysoká, že je zároveň nejčastějším karcinomem celkově. Prvním u mužů je pak karcinom plic (třetí u žen, druhý celkově). Celkově třetím nejčastějším je pak karcinom kolorekta (druhý u žen, třetí u mužů). Karcinomy plic a kolorekta zároveň představují první, resp. druhé místo v celkové mortalitě. Karcinomy prsu a prostaty mají navzdory své vysoké incidenci relativně nižší mortalitu vzhledem k příznivější prognóze. Naopak ovariální karcinomy mají kvůli své zpravidla nepříznivé prognóze, způsobené pozdním odhalením a častým vznikem rezistence na léčbu, mortalitu vysokou, ačkoli nepatří mezi nejčastější nádory u žen (Gandaglia et al. 2021; Arnold et al. 2022; Sung et al. 2021; Torre et al. 2018).

Důležitým nástrojem pro snížení incidence a mortality onemocnění, stejně jako kvality života pacientů, je prevence (Kisling a M Das 2023). Pojmeme primární prevence obecně rozumíme snižování rizikových faktorů vzniku onemocnění. V kontextu onkologie jde například o opatření snižující kouření a spotřebu alkoholu v populaci, vakcinaci pro hepatitidám a papilomavirům, nebo kontinuální monitoring životního prostředí a produktů z hlediska karcinogenity (Collatuzzo a Boffetta 2023).

Sekundární prevence se zabývá brzkým záchytem onemocnění v časném stádiu, a tedy s výrazně lepší prognózou, širšími možnostmi léčby, a s pacientem v lepším zdravotním stavu. Hlavním nástrojem jsou pravidelná vyšetření praktickým nebo specializovaným lékařem a screeningová vyšetření, a dále např. dispenzarizace jedinců se zvýšeným rizikem vzniku nádoru na základě rodinné anamnézy nebo genetického vyšetření (Loomans-Kropp a Umar 2019).

Cílem terciární prevence je snížit morbiditu a zvýšit kvalitu života pacientů během léčby nebo v remisi, a to mimo jiné rehabilitací a psychologickou pomocí (Jacobsen a Andrykowski 2015; Kisling a M Das 2023). Cílem je také zachytit případnou rekurenci onemocnění co nejdříve, čímž se výrazně zvyšuje šance na vyléčení. Zde jsou zásadní pravidelné kontroly u onkologa a jiných specialistů, a pokračování ve screeningových vyšetřeních i původně nepostižených orgánů (Vorlíček et al. 2009).

Kvartérní prevencí se rozumí předvídaní a předcházení dopadům léčby. Existuje především snaha o prevenci nedostatečné (tzv. „undertreatment“) nebo naopak příliš drastické (tzv. „overtreatment“), popř. jinak nevhodné léčby, nebo upuštění od zbytečného testování, představujícího zátěž pro pacienta i zdravotnický systém (Martins et al. 2018; Norman a Tesser 2019). V některých zdrojích je kvartérní prevence zahrnuta do definice prevence terciární (Blackburn 2010).

1.1.2. Karcinom prsu – klasifikace

Nádory prsu jsou ve většině případů benigní cisty nebo fibroadenomy, popř. karcinomy *in situ*, tj. prekancerózní nálezy (tzv. stádium 0), s potenciálem změny na invazivní malignanci. Karcinomy (invazivní i *in situ*) se dělí na duktální nebo lobulární, popř. tubulární, medulární nebo mucinózní. Nejčastějším typem zhoubného nádoru prsu je invazivní duktální karcinom (70-85 % případů). Pro určení stádia (I-IV) karcinomu prsu je tradičně využívána klasifikace založená na

klinickém hodnocení rozsahu primárního tumoru (T), postižení lymfatických uzlin (N) a přítomnosti vzdálených metastáz (M), zvaná TNM (**Tabulka 1**). Obdobou tohoto hodnocení pro patologii je pak systém pTNM. Agresivita nádoru je vyjadřována histopatologickým posouzením tzv. grade (1-3) (WHO 2019).

U karcinomů prsu se rutinně používá molekulární klasifikace, do velké míry určující léčebný postup (**Tabulka 1**).

Tabulka 1: Molekulární subtypy a doporučení pro systémovou léčbu karcinomu prsu

Subtyp	Definice subtypu	Typická léčba
Luminální A	ER poz. a/nebo PR poz., HER2 neg., Ki-67 < práh, grade < 3	hormonální, většinou pouze adjuvantní
Luminální B HER2 negativní	ER poz. a/nebo PR poz., HER2 neg., Ki-67 > práh, grade > 1	chemoterapie + hormonální
Luminální B HER2 pozitivní	ER poz. a/nebo PR poz., HER2 poz.	chemoterapie + anti-HER2
Neluminální HER2 pozitivní	ER neg. a PR neg., HER2 poz.	chemoterapie + anti-HER2
Triple negativní	ER neg. a PR neg., HER2 neg.	chemoterapie

Zdroj: (Kiss et al. 2023). ER – estrogenový receptor, PR – progesteronový receptor, HER2 – receptor tyrosin-protein kinázy erbB-2 (ERBB2).

1.1.3. Karcinom ovaria – klasifikace

Morfologicky můžeme nejběžnější nádory ovarií rozdělit na serózní (cca 70 % high grade, HGSC, 5 % low grade, LGSC), dále endometroidní (cca 10 %), světlobuněčný (ang. „clear cell“, cca 10 %)

a mucinózní (< 3 %), přičemž všechny tyto nádory jsou epiteliálního původu. Zbytek tvoří nádory původu germinálního. (McCluggage 2011; Torre et al. 2018). Všechny tyto typy mají odlišnou prognózu, přičemž HGSC ji má nejhorší, zatímco endometrioidní a mucinózní karcinom mají prognózu nejlepší. Tyto subtypy zároveň vykazují charakteristické molekulární abnormality, které mohou být důvodem pro cílenou léčbu (shrnutí v **Tabulce 2**, str. 11).

Tabulka 2: Přehled nejčastějších typů epitelových karcinomů ovarií a jejich vlastností

Typ	HGSC	LGSC	Endom.	Světlo-buněčný	Mucinózní	Nezávisle
Procento všech	70	<5	10	10	3	
Senzitivita k chemo	vysoká	střední	vysoká	nízká	nízká	
Prognóza	špatná	střední	dobrá	střední/špatná	dobrá	
Molekulární abnormality	<i>TP53</i> <i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i> CIN <i>NF1</i> <i>RB1</i> <i>CDK12</i>	<i>BRAF</i> <i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>HER2</i> <i>FGFR2</i> <i>PIK3CA</i>	<i>CTNNB1</i> MSI-H <i>PTEN</i> <i>ARID1A</i> <i>KRAS</i> <i>PIK3CA</i>	<i>ARID1A</i> <i>PIK3CA</i> <i>PTEN</i> mTOR <i>KRAS</i>	<i>KRAS</i> HER2	TMB-H MSI-H dMMR
Cílená terapie	PARP inhibitory	MEK inhibitory Fulvestrant Horm. terapie				Pembroli-zumab

CIN – chromozómalní nestabilita, MSI-H – vysoká mikrosatelitová nestabilita, TMB-H – vysoká mutační zátěž, dMMR – dysfunkce dráhy mismatch repair (MMR, jedna z drah oprav DNA). Převzato a upraveno (Dundr a Němejcová 2022; Harbin et al. 2022).

1.1.4. Karcinom kolorekta – klasifikace

Více než 90 % CRC jsou z histologického hlediska adenokarcinomy epiteliálního původu, tj. pocházející ze střevní mukózy. Další, většinou vzácné subtypy jsou CRC mucinózní, skvamózní, adenoskvamózní, z prstenčitých buněk aj. Míra dediferenciace se jako obvykle stanovuje ukazatelem grade 1-3 (Fleming et al. 2012).

Díky pokrokům v molekulární analýze CRC je dnes možné onemocnění charakterizovat skupinou molekulárních subtypů. Cílená léčba propojující a využívající tyto poznatky zatím nepronikla do klinické praxe. Ta se zaměřuje na driver geny *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* (mutace V600E), v kombinaci s chemoterapií a imunoterapií. Na obzoru je využití mutací v receptoru HER2, již známém markeru karcinomu prsu a ovarií, a dále velmi vzácné fúze NTRK (neurotrofická tyrosin receptor-kináza) genů (Martelli et al. 2022; Riedesser et al. 2022).

Molekulární charakteristiky můžeme dělit na genomické, epigenomické, transkriptomické a imunitní. Z hlediska genomiky můžeme kromě klasických mutací v driver genech RAS (*KRAS*, *NRAS*) a *BRAF* pozorovat nestabilitu mikrosatelitních úseků (MSI, oproti chromozomální nestabilitě, CIN), korelující s celkovým počtem mutací a snižujícím se množstvím variant v počtech kopií (CNV, angl. „copy number variants“). Ty zároveň korelují s úrovní metylace, specifickými transkriptomickými subtypy definovanými rozdílnou expresí různých signalizačních a metabolických drah (CMS, z angl. „consensus molecular subtype“), a s komplexními profily imunitní odpovědi v interakci s tumorovým mikroprostředím. Zároveň bylo pozorováno, že zastoupení těchto subtypů závisí na poloze nádoru, tj. jsou jasné rozdíly mezi nádory proximální a distální části střeva (Dienstmann et al. 2017). MSI vzniká z narušení systému oprav DNA, zvaného MMR (z angl. „mismatch repair“), založeného na genech *MLH1*, *MSH2*,

MSH6, *PMS2* a *EPCAM* (Vilar a Gruber 2010), a vyskytuje se zhruba u 15 % CRC, častěji ale u nižších stádií oproti vyšším (Martelli et al. 2022).

1.2. Oxysteroly a jejich role v nádorových onemocněních

Oxysteroly jsou skupinou oxidovaných derivátů cholesterolu nebo některých jeho prekurzorů (Schroepfer 2000). Endogenně v těle vznikají enzymatickou cestou nebo autooxidací, popř. jsou do organismu přijímány skrze stravu. Enzymatická cesta s sebou nese vyšší pravděpodobnost oxidace postranního řetězce molekuly, zatímco autooxidace, nejčastěji způsobená radikálovou reakcí s reaktivními formami kyslíku, častěji vede k oxidaci na kruhu (Iuliano, 2011; Murphy a Johnson, 2008). Některé oxysteroly ale mohou být produkovány oběma cestami.

Dobře je popsána jejich klíčová funkce oxysterolů v udržování buněčné homeostázy cholesterolu, kde fungují jako signalizační molekuly zodpovědné za omezování biosyntézy cholesterolu, snižování příjmu exogenního cholesterolu buňkou a stimulaci vyplavování cholesterolu ven z buňky (Howe et al. 2016). Významné jsou i pro strukturu buněčné membrány (Kulig et al. 2016b; 2016a), ve fyziologii imunitního systému a v zánětlivých procesech (Bah et al. 2017; de Freitas et al. 2022), a v diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk (Levy et al. 2017). Jsou součástí řady důležitých signalizačních drah, např. Hedgehog (Corcoran a Scott 2006; Dwyer et al. 2007; Gorojankina 2016), Wnt (de Wille et al. 2013), mTOR (Wang et al. 2017; 2013) nebo Notch (Kim et al. 2010). V posledních letech se množí důkazy, spojující oxysteroly s širokým spektrem patologických jevů a onemocnění, např. s neurodegenerativními procesy, stárnutím, makulární degenerací a tvorbou kataraktu (de Medina et al. 2022; Doria et al. 2016; Javitt a

Javitt 2009; Jeitner et al. 2011; Zarrouk et al. 2014), nebo aterosklerózou (Zmyslowski a Szerk 2017).

Velkou skupinou onemocnění, v jejímž kontextu jsou oxysteroly stále častěji studovány, jsou onemocnění nádorová (Kloudova et al. 2017). V poslední době přibývají důkazy toho, že oxysteroly mohou přímo ovlivňovat efektivitu onkologické léčby. Navíc existují i první indicie, že by oxysteroly mohly být využitelné jako nádorové biomarkery, popř. jako protinádorová léčiva (Kloudova-Spalenkova et al. 2021).

Zatímco v průběhu onkologického a oxysterolového výzkumu existuje řada studií, drtivá většina se zabývá především oxysteroly jako takovými a jejich vlivem na nádorové buňky *in vitro*, výrazně méně často pak *in vivo* v myších modelech. Studie na pacientech se orientují především na měření koncentrace oxysterolů v krvi, popř. v tkáních. Opomíjen je potenciál genetické variability genů zapojených do biologických účinků oxysterolů, popř. mechanismů, jimiž tato variabilita ovlivňuje nádorové buňky pacienta nebo léčbu. Moderní genomické metody teoreticky mohou poskytnout nové poznatky v této neprobádané oblasti. Somatické varianty (získané nádorem) byly dosud zřídka zkoumány v kontextu oxysterolových drah a navíc poměrně krátkou dobu. Pro podstatně déle studované varianty zárodečné již řada výsledků existuje (Holy et al. 2018), ačkoli jde zpravidla o vedlejší nálezy ze studií bez přímého zaměření na oxysterolovou problematiku.

Geny interagující s oxysteroly můžeme zhruba rozdělit do pěti skupin. Jedná se zaprvé o geny zodpovědné za homeostázu a biosyntézu sterolů, dále geny přímo metabolizující oxysteroly, skupinu proteinů vázajících oxysteroly (angl. „oxysterol-binding proteins, OSBPs), skupinu receptorů vázajících oxysteroly, a nakonec ABC transportéry (z angl. „ATP-binding cassette“), které oxysteroly přenáší nebo jsou jimi ovlivněny. Skupinu ABC transportérů je možno zahrnout rovněž do skupiny první (Holy et al. 2018).

1.3. Genomika a transkriptomika

Genomika je vědní obor hromadně analyzující velké množství genetických dat v jednotlivém vzorku nebo souboru vzorků najednou, na rozdíl od tradiční genetiky, která se zabývá analýzou jednotlivých genů. Vznikly ale tak zároveň nové požadavky na náročnou bioinformatickou analýzu a uložení velkého množství dat a zejména jejich interpretaci pro optimální využití v klinické praxi.

Ačkoli celogenomové sekvenování je každým rokem dostupnější, v klinické praxi i ve výzkumu se z důvodu nižší ceny a možnosti detailnější analýzy stále velmi často používá tzv. cílené sekvenování, tj. sekvenování pouze vybrané části genomu (popř. celého exomu), která je před sekvenací ve vzorku nabohacena.

V případě sekvenace transkriptomu, která je možná po předchozí reverzní transkripci RNA na komplementární DNA (cDNA), je cílené nabohacení specifického panelu genů (transkriptů) rovněž možné, ale v mnoha případech není nutné, z důvodu nižší sekvenační náročnosti oproti sekvenaci celého genomu. V nejběžnějším použití RNA sekvenování nabízí velmi výhodnou alternativu kvantitativní PCR nebo mikročipů ke stanovení exprese genů vzhledem k tomu, že je schopna zachytit celý transkriptom (včetně nekódujících RNA) najednou a není potřeba pro jednotlivé transkripty vytvářet specifické primery nebo sondy. Pomocí RNA sekvenování je rovněž možné odhalit např. i fúze genů a mnoho dalších typů mutací (Solomon et al. 2020; Zheng et al. 2014; Zhu et al. 2019).

Genomika a transkriptomika umožňují integraci s dalšími „omics“ vědami, např. proteomikou, metabolomikou, epigenomikou apod., čímž dovolují získat výrazně komplexnější přehled o vzájemně provázaných aspektech onemocnění, ačkoli analýza a interpretace takových dat, zejména při kombinaci třech a více typů, je zpravidla velmi obtížná.

2. Hypotézy a cíle práce

1) Vzhledem k prokázaným vlivům oxysterolů na různé aspekty karcinomu prsu je možné, že rovněž genetická variabilita v genech oxysterolových drah má vliv na onemocnění nebo jeho léčbu. Cílem bylo tedy porovnat profily zárodečných a somatických variant v těchto genech u souboru pacientek s karcinomem prsu, rozděleného podle klinických faktorů, včetně délky přežívání.

2) Protože genetická variabilita je pouze jedním aspektem možného působení oxysterolových genů, druhým cílem bylo doplnit data o expresi mRNA a regulačních miRNA a zjistit, zda kombinace těchto dat může vést k odhalení funkčních mechanismů, popř. k zpřesnění prediktivního nebo prognostického potenciálu variant.

3) V oblasti OVC dochází v poslední době k doplňování a zpřesňování molekulární charakterizace a klasifikace. Stále ale chybí mimo jiné genomické biomarkery umožňující predikci odpovědi na léčbu deriváty platiny. Cílem č. 3 bylo proto komplexní porovnání mutačních profilů pacientek citlivých a rezistentních na léčbu, které by mohlo poskytnout kandidátní geny nebo dráhy.

4) Pro predikci a prognostiku u CRC rovněž chybí spolehlivé genomické biomarkery. Výzkum v této oblasti je soustředěn zejména na primární nádory a často opomíjí metastázy, které jsou zásadní pro letalitu onemocnění. Cílem č. 4 bylo komplexní porovnání mutačních profilů v poměrně vzácných párových vzorcích primárních nádorů a metastáz, podrobná dokumentace rozdílů a poskytnutí základu pro další studie v této oblasti.

3. Materiál, metody a pacienti

Pozn.: Citace zdrojů pro tuto kapitolu jsou z důvodu ušetření místa uvedeny pouze v disertační práci.

3.1. Pacienti

Ve studiích řešených v rámci této disertační práce byly využity vzorky krve a tkání (nenádorová, primární nádorová, metastatická) pacientů s karcinomem prsu, ovarií nebo kolorekta. Vzorky byly získány v rámci spolupráce s Fakultní nemocnicí Královské Vinohrady, Fakultní nemocnicí v Motole, Fakultní nemocnicí v Plzni, Fakultní nemocnicí v Hradci Králové a Nemocnicí EUC Zlín. Pro validaci některých výsledků byla využita veřejně dostupná genomická data z projektů TCGA a z projektu GENIE verze 13.0.

3.2. Izolace a zpracování genetického materiálu

DNA a RNA ze vzorků byla získána standardní metodou fenol/chloroformové extrakce a precipitací etanolem, pomocí magnetické separace přístrojem Kingfisher mL (Thermo Fisher Scientific), nebo kity AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN) a DNEasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). DNA byla kvantifikována pomocí Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent Kit (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) a destičkového fluorescenčního spektrofotometru Infinite M200 (Tecan Group Ltd.) nebo Qubit dsDNA Assay na přístroji Qubit 4 (oboje Thermo Fisher Scientific). K izolaci DNA z parafinových bloků po fixaci formalínem (FFPE) byl použit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Thermo Fisher Scientific). DNA byla kvantifikována pomocí kitu FFPE QC Kit (Agilent). Přístroj Bioanalyzer 2100 a kit RNA 6000 Nano (oboje Agilent) byly použity ke stanovení kvality RNA.

Čistota DNA a RNA byla kontrolována poměrem absorbancí při 260 a 280 nm (také 260 a 230 nm) a v celém měřitelném absorpčním spektru přístrojem NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

3.3. Sekvenování DNA a RNA

3.3.1. Příprava knihoven a sekvenace

Příprava knihoven pro DNA sekvenování kity společnosti Agilent nebyla původně na pracovišti zavedena. Autor metodu zavedl a optimalizoval v rámci řešení úkolů této práce.

Knihovny pro DNA sekvenování byly připraveny pomocí kitů SureSelect XT Low Input nebo SureSelect XT HS2 (Agilent). Sekvenace směsi knihoven byla provedena na platformách NextSeq 500 a NovaSeq 6000 (Illumina, čtení 2x150 bází).

Knihovny pro RNA sekvenování byly připraveny z celkové RNA pomocí kitu QuantSeq 3'mRNA-Seq Library Prep FWD for Illumina (Lexogen). Sekvenace ekvimolární směsi knihoven byla provedena na platformě NextSeq 500 (čtení 1x75 bází).

Kontrola kvality během přípravy a po přípravě knihoven z DNA i RNA byla provedena pomocí přístroje Bioanalyzer 2100 s kitem DNA1000, potažmo High Sensitivity DNA (Agilent) a kvantifikace pomocí kvantitativní PCR (Viia7 – Thermo Fisher Scientific) dle KAPA Library Quantification Kit for Illumina Platforms (Roche) a fluorescenčně s využitím přístroje Qubit 4 a Qubit DNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

3.3.2. Bioinformatické zpracování sekvenačních dat

3.3.2.1. DNA a RNA sekvenování

Demultiplexování bylo provedeno nástrojem bcl2fastq (Illumina). Kontrola kvality dat byla provedena nástroji FastQC a MultiQC. Adaptérové sekvence a báze s nízkou kvalitou čtení byly

odstraněny pomocí programu AGenT Trimmer (Agilent) nebo Trimmomatic. Mapování na referenční sekvenci (GRCh37 nebo GRCh38) bylo provedeno pomocí nástroje Burrows-Wheeler Aligner. Deduplikace byla provedena softwarem AGenT LocatIt, nebo AGenT CReaK (Agilent) v závislosti na kitu použitém pro přípravu knihoven. Ke kontrole kvality souborů BAM byly použity nástroje Qualimap a Samtools. Pro detekci variant a řadu filtračních kroků byly použity nástroje balíku Genome Analysis Toolkit 4 (GATK, Broad Institute). Pro detekci somatických variant byl použit nástroj Mutect2 a pro zárodečné varianty pak HaplotypeCaller. Pro čtení a manipulaci se soubory VCF, obsahujícími nalezené varianty, byly použity nástroje vcfutils a bcftools. Pro anotaci variant byly použity nástroje Annovar, Funcotator, Variant Effect Predictor a SnpEff. Převod variant do formátu MAF byl proveden pomocí vcf2maf.

Detekce CNV byla provedena nástrojem CNVkit. Signifikantní nálezy byly hodnoceny na základě průměrné hloubky čtení a tzv. frekvencí B-alely (BAF) jednotlivých segmentů. BAF byla spočítána z VCF souborů pomocí nástrojů VarDict a ExomeDepth. U vzorků CRC a metastáz, kde nebyl k dispozici kontrolní nenádorový vzorek, byly požadované rozsahy BAF vypočítány z informací o čistotě vzorku nádorové tkáně, která byla pro každý vzorek stanovena podrobnou patologickou analýzou.

Kvalita nezpracovaných RNA sekvenačních dat byla kontrolována nástroji fastp a FastQC. Transkripty byly anotovány referenčním transkriptomem GENCODE v35 a kvantifikovány nástrojem kallisto. Pro analýzy (kromě analýzy diferenciální exprese) byla data normalizována aktuálně nejčastěji používaným způsobem, to jest na transkripty na milion (angl. „transcripts per million“, TPM), a transformována logaritmem dvou.

3.3.2.2. Měření exprese transkriptomu miRNA pomocí mikročipů

Pro měření exprese miRNA v rozsahu celého transkriptomu byl použit miRNA Microarray System s miRNA Complete Labeling and Hyb Kit a SurePrint G3 Unrestricted miRNA 8x60K v19.0 microarray slides (Agilent). Snímání bylo provedeno pomocí přístroje SureScan Microarray Scanner se softwarem Scan Control, extrakce dat pak proběhla přes software Feature Extraction (vše Agilent).

Pro počáteční kontrolu kvality, filtrování a anotaci byl použit software GeneSpring (Agilent). K potlačení tzv. „batch“ efektů, tj. systematickým chybám způsobeným původem vzorků a osobami provádějícími měření, byl použit nástroj ComBat.

3.4. Terciární bioinformatická analýza a statistické vyhodnocení

Tzv. terciární bioinformatická analýza pracuje s výstupy předchozích částí analýzy a propojuje je s ostatními typy dat za účelem interpretace výsledků.

3.4.1. Sledovaná klinická data

Klinická data sledovaná ve studiích zahrnovala všechny běžné klinické parametry. V závislosti na diagnóze pak byla sledována exprese molekulárních markerů (u karcinomu prsu ER, PR, HER2, Ki-67, molekulární subtyp), míra odpovědi na léčbu, lokalizace nádoru u CRC, případně způsob metastatického postižení (synchronní vs metachronní) tamtéž aj. U všech pacientů byla sledována délka celkového přežití a délka přežití od chirurgického odstranění nádoru do progresu onemocnění.

3.4.2. Analýza genomických a transkriptomických výstupů

Metody analýzy variant byly odlišné v jednotlivých studiích a detaily postupů jsou uvedeny v jednotlivých publikacích. Obecně byly vyhodnocovány jak jednotlivé varianty (především u zárodečných), tak frekvence alterací v jednotlivých genech, skupinách genů, nebo dráhách (především somatické varianty a CNV). Varianty byly mimo jiné klasifikovány na základě predikce závažnosti. Analýza somatických variant využívala především nástroje maftools. Pro detekci driver genů byly využity softwary MutSigCV, MutSig2CV a GenePattern. K vizualizaci CNV byl použit nástroj GenVisR.

Na základě somatických variant nalezených pomocí celoexomového sekvenování byly vyhodnocovány mutační podpisy, a to nástroji decompTumor2sig a sigminer. Ačkoli existuje řada druhů mutačních podpisů, v této práci byly vyhodnocovány pouze SBS podpisy (vycházející z jednonukleotidových substitucí), které jsou metodicky i interpretačně nejlépe prostudované. Diferenciální exprese mRNA byla vyhodnocena nástrojem EdgeR.

3.4.3. Statistické metody

Pro analýzu nalezených dat ve vztahu ke klinickým údajům byly použity zejména metody hodnocení přežívání, tj. grafy dle Kaplana a Meiera s log-rank nebo Breslowovým testem signifikance, a Coxův model poměru rizik, a to v programech survival pro R a SPSS (SPSS, Inc.). Pro srovnávání kategorických proměnných byl použit Pearsonův χ^2 test a kategorických nebo spojitých proměnných se spojitými pak neparametrický test dle Manna a Whitneyho. Pro analýzy diferenciální mutovanosti a společné přítomnosti (ang. „co-occurrence“) variant byl použit Fisherův exaktní test. Analýza korelace spojitých proměnných (např. exprese miRNA a mRNA) byla vzhledem k rozdělení dat významně odchyleného od normality (ověřeno testem dle

Shapira a Wilka provedena metodou Spearmanovy korelace na základě pořadí hodnot. Úprava p-hodnot v důsledku mnohočetného testování (korekce FDR, angl. „false discovery rate“) pak byla provedena metodou Benjaminiho a Hochberga. To, zda je p-hodnota upravena či nikoliv, je vždy v této práci, stejně jako v příložených publikacích, u příslušné hodnoty uvedeno. Pro tvorbu, hodnocení a vizualizaci integračních multiomických prediktivních modelů byl použit balík nástrojů mixOmics.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Studie genů oxysterolové signalizace u karcinomu prsu

4.1.1. Studie zárodečných a somatických variant ve vztahu ke klinickým parametrům

Celkem bylo u 101 pacientek nalezeno 96411 zárodečných variant, z nich 5042 unikátních. Po filtraci byl výsledný soubor 67288 variant použit pro hledání asociací s přežíváním pacientek a se všemi dostupnými kategorickými klinickými daty. Hlavním výsledkem byla řada 15 variant v 12 genech, asociovaných s kratším nebo delším přežitím bez progresu (DFS) nebo přežitím celkovým (OS). Bohužel žádná z těchto variant neprošla korekcí pro mnohočetné testování. Konkrétní nalezené varianty nepatří mezi často citované v kontextu nádorových onemocnění a vyskytují se z většiny v netranslatovaných oblastech (UTR, angl. „untranslated region“) a intronech, nebo jsou synonymní, takže jejich dopad na protein je přinejmenším nejasný. Validace by vyžadovala studie o velmi vysokém počtu pacientek, jelikož varianty nebyly v souboru hojně zastoupeny. Zároveň by taková studie vyžadovala buď spolehlivou komplementární metodu k našemu panelovému NGS, jako např. PCR genotyping nebo Sangerovo sekvenování, nebo použití obdobného přístupu jako v naší studii, přičemž obě možnosti by s sebou nesly nemalé náklady s malou šancí

na úspěch. Vzhledem v těmto důvodům bylo od následné validace těchto variant upuštěno.

U 99 úspěšně sekvenovaných nádorů bylo nalezeno 1177 somatických variant, z nich 1087 unikátních. Nápadná přítomnost dvou hypermutovaných vzorků v kohortě (n=99), dosahujících několikanásobně vyšších počtů mutací než medián, ukázala na nutnost provádění analýz jak s těmito vzorky, tak bez nich. Vyšší mutační zátěž korelovala s horším přežíváním pacientek, což by odpovídalo tomu, že pokročilejší nádory jsou zpravidla více mutované. Zajímavá byla skupina 20 genů námi označená jako „PR set“, jejichž mutace korelovaly s expresí progesteronového receptoru (PR) které byly výrazně mutovanější než zbytek panelu, a byl zde signifikantní rozdíl mezi PR pozitivními (méně mutací) a negativními (více mutací) pacientkami. Tento rozdíl se zároveň odrážel i v délce přežívání, která byla kratší pro pacientky s mutacemi v PR setu oproti nemutovaným, a to výrazněji než by odpovídalo celkovému trendu. V literatuře dosud tato skupina genů nebyla spojována se stavem PR nebo s přežíváním pacientek s karcinomem prsu.

Z asociací mutací jednotlivých genů byly nejzajímavější ty v *CYP46A1* s kratším OS a DFS. Tento gen kóduje enzym podílející se na syntéze mimo jiné 24-HC v neuronech, kde je téměř exkluzivně exprimován. Proto byl dosud spojován s nádory zejména v mozku (Han et al. 2020). V jedné studii produkce 24-HC *in vitro* potenciálně podporovala angiogenezi pankreatických neuroendokrinních nádorových buněk (Soncini et al. 2016). 27-HC je v buňkách nádorů prsu prokázaným stimulantem růstu skrze dva různé efekty na estrogenový receptor (ER) ER a Liver X receptor (LXR) (Nelson et al. 2013). Strukturně podobný 24-HC by tedy teoreticky mohl mít podobný účinek. Již je známo, že 24-HC dokáže rovněž aktivovat LXR (Lehmann et al. 1997; Okabe et al. 2013; Jakobsson et al. 2012; Shafaati

et al. 2011), a také, že se běžně nachází v relativně vysokých koncentracích v plazmě (van Reyk et al. 2006).

4.1.2. Integrační studie mRNA-miRNA profilů a somatických variant oxysterolových genů

V následující studii jsme se zaměřili na sledování exprese mutovaných a nemutovaných oxysterolových genů a propojili tuto informaci s expresí více než 2000 miRNA. V rámci studie byly provedeny i samostatné analýzy exprese mRNA a miRNA s klinickými daty. Pacientky s mutacemi v *CYP46A1* a funkčně příbuzných genech z předchozí studie, které měly signifikantně kratší délku přežití, byly zde zároveň těmi, které měly zároveň nejvíce diferenciatně mutovaných oxysterolových genů ze všech našich analýz. Konkrétně pro *EBP*, *PPARGC1B* a *DHCR7* bylo zvýšení exprese nejmarkantnější. V této studii jsme tedy lépe charakterizovali tuto špatně přežívající skupinu, ale můžeme jen spekulovat, jaké faktory stojí za její špatnou prognózou. Za vedlejší výsledek pak lze považovat nález asociace vysoké exprese miRNA miR-19b-3p s kratším DFS, která byla v jiných formách (OS a DSS) na hranici signifikance nalezena i ve validačních kohortách TCGA. Tato miRNA je součástí rodiny miR-19 a je exprimována v rámci dvou paralogních klastrů – miR-17-92 a miR-106b-25. Právě miR-17-92 je vysoce exprimován v mnoha typech nádorů (Zhao et al. 2022) a rodina miR-19 je onkogenním aktivátorem jeho exprese (Olive et al. 2009). V nádorech prsu pak byla exprese miR-19b-3p navržena jako prognostický biomarker (Li et al. 2018), jedná se ale o jedinou takovou studii, přičemž neposkytuje specifické informace pro jednotlivé subtypy onemocnění.

Hlavním přínosem multiomické studie ale bylo zmapování mRNA-miRNA interakcí oxysterolových genů pomocí korelačních sítí. Tento přístup nebyl do té doby v oblasti oxysterolů použit.

Nejnápadnějšími geny v této síti byly *CH25H* (většinou pozitivní korelace s miRNA) a *ESR1* (většinou negativní korelace). Tyto geny byly vysoce signifikantně ($p < 0,01$ po FDR korekci) propojeny skrz miR-100-5p, miR-125b-5p a miR-199b-5p a dále pak skrze miR-130a-3p, miR-143-3p, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-376a-3p a miR-376c-3p. Tyto miRNA zároveň odpovídají nejsilněji koexprimované skupině miRNA. Všechny tyto korelace byly zároveň nalezeny i ve validačních datech a řada z nich i v databázích. Důležitost ER α (gen *ESR1*) pro nádory prsu je nesporná (Brufsky a Dickler 2018) a s oxysteroly je spojován zejména skrze interakci s 27-HC (Umetani et al. 2007). *CH25H* kóduje enzym 25-hydroxylázu, zodpovědnou za produkci důležitého signalizačního oxysterolu, 25-HC, z cholesterolu (Cao et al. 2020). Jedním z receptorů vázajících 25-HC je i ER α , jehož aktivace tímto oxysterolem podporuje růst prsních a ovariálních nádorových buněk *in vitro* (Lappano et al. 2011). Naše výsledky naznačují, že funkční vazba 25-hydroxylázy na ER α by mohla být zprostředkována nejen 25-HC, ale i epigeneticky skrze miRNA. Dalším genem silně negativně korelovaným s *CH25H* skrze některé z těchto miRNA byl *INSIG1*, důležitý regulátor cholesterolové homeostázy. I u něj byla dříve prokázána modulace vazbou 25-HC (Ouyang et al. 2020). Posledním genem, který je třeba zmínit, je *ABCA9*, membránový transportér lipidů, jehož exprese byla negativně korelována s *ESR1* a *INSIG1* skrze miR-99a-5p a miR-125b-5p. MiR-99a-5p, miR-125b-5p a miR-100-5p jsou součástí dvou známých klastrů – miR-100/let-7a/miR-125b-1 a miR-99a/let-7c/miR-125b-2, jehož nízká exprese byla asociována s kratším OS u pacientek s lumenálním A subtypem nádoru (Søkilde et al. 2019). MiR-99a-5p, miR-100-5p, miR-125b-5p, miR-130a-3p a miR-376c-3p byly dříve navrženy jako biomarkery karcinomu prsu v krvi (Wang et al. 2023; Huo et al. 2016). Osa interakcí *CH25H-ESR1-INSIG1*, popř. i *ABCA9*, skrze všechny

zmíněné miRNA, se ukázala jako velmi zajímavý výsledek, zasluhující další výzkum.

Největší limitací obou studií byly zaprvé nízké počty pacientek v jednotlivých analýzách podskupin, což bylo ještě prohloubeno nedokonalým překryvem kohort ve druhé studii. Na druhou stranu korelační vztahy, které byly hlavním cílem studie, byly ve velkém procentu úspěšně validovány ve větších souborech pacientek a/nebo v databázích. Další limitace vychází ze samostatné podstaty analýzy. Na základě korelací nelze potvrdit nebo vyvrátit funkční vztah, ale pouze poskytnout hypotézy a vodítka pro další studie, tentokrát experimentální a specificky zaměřené na jednotlivé vztahy. Třetí limitací je pak charakteristika pacientek vybraných do studií, kdy se jednalo exkluzivně o české pacientky s ER pozitivním lumenálním karcinomem prsu v nízkém stádiu; šlo tedy o vysoce homogenní skupinu jak klinicky, tak etnicky. Výsledky proto nelze zobecňovat na jinou populaci (kromě těch validovaných na jiných souborech).

4.2. Studie ovariálního karcinomu

4.2.1. Studie celoexomových mutačních profilů a vybraných genů u pacientek s karcinomy ovarií s rozdílnou odpovědí na léčbu platinovými deriváty

Rezistentní pacientky měly významně vyšší počet mutací v genu *TP53* než pacientky senzitivní. Tento jev byl patrný i při srovnání celé dráhy p53. Pacientky s mutací měly riziko rezistence (OR) pro rezistenci téměř osmkrát vyšší než nemutované a rezistentní pacientky měly zároveň častěji varianty s vysokou závažností. P53 (gen *TP53*) je asi nejznámější tumor supresor, zodpovědný za detekci poškození DNA a zastavení buněčného cyklu v přechodu G1-S. Pokud nemůže být DNA opravena, p53 se podílí na spuštění apoptózy. Záradečné mutace v *TP53* vedou k syndromu Li-Fraumeniho a

somatické mutace stimulují karcinogenezi (Thomas et al. 2022). Mutovanost *TP53* v našem souboru odpovídala validační kohortě TCGA-OV i dostupné literatuře (Ahmed et al. 2010; Patch et al. 2015). Jisté důkazy existují i pro schopnost mutační zátěže v *TP53* predikovat chemorezistenci (Brachova et al. 2015). Inhibice dráhy P53 v epiteliálních ovariálních nádorech může vést k zvýšení účinnosti karboplatiny (Leijen et al. 2016) a tato dráha je v současnosti předmětem výzkumu nových cílených terapeutik (Zhang et al. 2022).

Dráha Hippo byla výrazně méně často mutovaná u rezistentních pacientek. V buňkách se podílí na proliferaci, apoptóze a obnově kmenových buněk. Její kinázová část má tumor supresivní účinky, zatímco její transkripční část stimuluje růst nádorů (Cunningham a Hansen 2022). Dalším diferenciálně mutovaným genem byl *PABPC3*, jehož varianty zároveň kosegregovaly s těmi v *PABPC1*. Oba geny jsou obecně důležité v regulaci translace vazbou na poly(A) konce transkriptů (Xiang a Bartel 2021). *PABPC3* patří mezi vysoce mutované geny v maligních ovariálních buňkách (Chen et al. 2021) a *PABPC1* je potenciálním biomarkerem malignity epiteliálního OVC (Feng et al. 2021) a je evidován v databázi COSMIC jako oncodriver druhého stupně (Sondka et al. 2018). Dle našich výsledků mutace v těchto genech mohou asociovat s horší odpovědí na léčbu.

Dále se potvrdila z literatury známá závislost prognózy na mutační zátěži (Chalmers et al. 2017), kdy pacientky s nadmediánovým počtem somatických variant nebo CNV měly signifikantně delší dobu OS, ačkoli epiteliální ovariální nádory obecně nepatří mezi nádory s častým výskytem vysokého TMB (Yang et al. 2018). Z našich dat proto můžeme usuzovat, že i v nádorech, které nesplňují typické parametry pro TMB (nejčastěji >20 nebo >10 mutací na Mb, definice mohou být různé), může mutační zátěž hrát prognostickou roli.

Pacientky se subtypem HGSC měly celkově výrazně vyšší mutační zátěž a vyšší počet mutací v *TP53*. Zároveň pacientky s mutací

v dráze *TP53* měly téměř 10krát vyšší šanci na subtyp HGSC než všechny ostatní subtypy dohromady. To je v souladu se současným povědomím o inaktivaci *p53* typické pro HGSC (Harbin et al. 2022).

Studie rovněž potvrdila prognostickou a prediktivní roli profilování genů HRR. Šestnáct genů HRR, které byly navrženy jako potenciální biomarkery vhodné do klinického testování (Norquist et al. 2018), byly i v naší studii prediktory odpovědi na léčbu platinovými deriváty a rovněž delšího OS. V tomto případě jsme do analýz zahrnuli jak somatické, tak zárodečné varianty, což není v obdobných studiích běžné (Norquist et al. 2018; de Witte et al. 2022). Zdaleka nejvíce zárodečných mutací se vyskytovalo v genech *BRCA1* a *BRCA2*, zatímco varianty v ostatních genech byly výrazně méně četné nebo neexistující, což naznačuje, že panely HRR genů možná vyžadují přehodnocení před uvedením do praxe.

Největší limitací studie je nízký počet pacientek v některých analýzách, obzvláště ve srovnávání malých podskupin. To vychází z přísného výběru pacientek a také velké finanční nákladnosti metody. Náklady navíc vzrostly z toho důvodu, že na rozdíl od většiny obdobných projektů jsme zvolili poměrně vysokou hloubku pokrytí, která nám ale poskytuje větší detailnost a robustnost výsledků, rozšiřuje možnosti v bioinformatické analýze, a odlišuje tento projekt od veřejně dostupných dat získaných z velkého počtu pacientů. Také jsme použili pouze vysoce kvalitní vzorky zamražené tkáně výhradně před zahájením léčby a před rekurencí, čímž studie také převyšuje běžný standard.

4.2.2. Studie vybraných genů pomocí panelového sekvenování

Pro další, dosud nedokončenou studii jsme zvolili panel 144 genů, které by na základě našich předchozích výsledků a dostupné literatury mohly mít relevanci pro odpověď pacientek s OVC na terapii

platinovými deriváty. Tyto geny jsme osekvenovali s vysokým pokrytím u 48 pacientek rozdělených dle odpovědi na platinové deriváty. Analýzy zárodečných variant a propojení s klinickými daty v době odevzdání disertační práce nebyly dokončeny a nejsou proto v této práci popsány.

Data somatických mutací pro celý soubor byla porovnána s výsledky z předchozí studie, přičemž šest pacientek bylo shodných, což umožnilo přímé srovnání detekovaných variant u těchto pacientek. První výsledky demonstrují vyšší citlivost panelového sekvenování oproti celoexomovému, která umožnila zachytit více závažných somatických variant, konkrétně varianty v *TP53* ovlivňující sestřih mRNA. Tyto varianty jsou potenciálně vysoce relevantní pro pacienta, ale při rozsáhlém sekvenování by pravděpodobně nebyly detekovány. Data pro HGSC pacientky byla porovnána se souborem konsorcia AACR GENIE (n=1209). Relativní počet sestřihových variant v *TP53* v naší studii byl vyšší i oproti tomuto souboru. To mohlo být způsobeno náhodně zvýšeným výskytem těchto variant v naší poměrně malé kohortě nebo rozdílným pokrytím intronových úseků. Celková četnost závažných nebo středně závažných variant *TP53* ale byla u panelů téměř identická, a mírně vyšší než u celoexomových profilů.

4.3. Srovnání celoexomových mutačních profilů kolorektálních karcinomů a jejich synchronních jaterních metastáz

Zde jsme se zaměřili na srovnání párových vzorků primárních kolorektálních nádorů a jejich synchronních jaterních metastáz (dále jen „metastázy“) na celoexomové úrovni, ve spojení s informací o odpovědi pacientů na léčbu a délkou přežívání.

Ačkoli nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v celkové mutační zátěži mezi primárními nádory a metastázami, byly pozorovány drobné rozdíly v počtech a v typech variant v jednotlivých genech nebo onkogenních dráhách, které ale nemohly nabýt statistické signifikance vzhledem k omezenému počtu pacientů ve studii (n=20). Další rozdíly byly nalezeny u primárních nádorů špatně odpovídajících pacientů, které obsahovaly významně vyšší počet mutací *TP53* s vysokou závažností než primární nádory dobře odpovídajících. To by mohlo znamenat, že tyto varianty jsou jednou z příčin rezistence a mohla by na ně být zaměřena cílená léčba (Zhang et al. 2022). Dále byla v primárních nádorech v naší skupině, stejně jako ve validačních datech získaných z projektů TCGA-COAD a TCGA-READ, potvrzena špatná prognóza (kratší DFS i OS) pacientů s mutovaným genem *KRAS*. Potvrdili jsme tak výsledek jiné studie na 13101 pacientech (Ugai et al. 2023). Mutovanost *KRAS* v primárních nádorech v naší kohortě (15 %) byla menší než v jiné studii (40 %) (Serebriiskii et al. 2019), což je pravděpodobně způsobeno tím, že pacienti s mutací v *KRAS* mají obecně agresivnější nádor, horší prognózu a nižší pravděpodobnost resekce jaterních metastáz (Modest et al. 2016), což bylo klíčové kritérium pro zahrnutí do naší studie. Vyšší podíl *KRAS*-mutovaných pacientů byl ale v metastázách (25 %), což by mohlo znamenat horší efektivitu anti-EGFR léčby a léčby tyrosin kinázovými inhibitory u těch pacientů, kteří nebyli mutováni v primárním nádoru, a ukazuje to na potenciální klinický přínos sekvenování metastáz. Jeden z pacientů měl mutaci *KRAS-G12C* v obou typech vzorků, a mohl by tak být kandidátem pro personalizovanou cílenou terapii (Schirripa et al. 2020). Největší rozdíl v mutovanosti mezi primárními nádory a metastázami byl v genu *TRIP11*, o kterém v kontextu onkologie není mnoho známo, ale *in silico* analýza protein-proteinových interakcí ukázala řadu vazeb na rodinu proteinů RAS, které jsou klíčové pro onkogenezi, prognózu i terapii CRC i jiných nádorů (Gimple a Wang 2019). *TRIP11* by mohl,

po důkladné validaci v dalších, především funkčních studiích, být novým kandidátním biomarkerem metastázování CRC.

U metastáz byly mutace v některých genech, např. *MUC5AC* a *DNAH11*, signifikantně asociovány s kratším přežíváním pacientů, a v případě genu *ATM* to platilo pro oba typy vzorků.

Pacienti se špatnou odpovědí na neoadjuvantní systémovou terapii měli celou řadu takových variant, např. v genech *KRAS* nebo *TP53*, v primárních nádorech. Jejich počet ale výrazně klesal u metastáz, což naznačuje, že zatímco indikace cílené léčby by mohla být smysluplná pro primární nádor, stejná léčba by pravděpodobně nebyla účinná u metastáz. Toto zjištění opět podtrhává smysl sekvenování metastáz pro klinickou praxi, ne jen samotných primárních nádorů.

Největší limitací byl nízký počet pacientů, vyplývající z obtížnosti získání kvalitně zdokumentovaných párových vzorků primárních nádorů a synchronních metastáz, což souvisí zároveň s nemožností validace v již dostupných datech vzhledem k tomu, že srovnatelná data jednoduše nejsou k dispozici. Za třetí, získat vysoce kvalitní čerstvě zmražené párové vzorky je prakticky neproveditelné, a jediná dostupná tkáň je uchována ve formě parafinových řezů (FFPE). To s sebou přináší komplikace jak při přípravě knihoven k sekvenování, tak v bioinformatické analýze a interpretaci. DNA ze vzorků z FFPE má oproti DNA z čerstvě zmražené tkáně vždy výrazně nižší kvalitu (Arreaza et al. 2016; McDonough et al. 2019; Williams et al. 1999; Mariani et al. 2018). V bioinformatickém zpracování je potřeba tento aspekt zohlednit a data přísně filtrovat (vysoká alelická frekvence, nízká frekvence v populačních databázích variant jako gnomAD (Karczewski et al. 2020), a mnoho dalších) za účelem snížení počtu falešně pozitivních nálezů. To s sebou ale samozřejmě přináší výrazné snížení věrohodnosti výsledků a také zvýšení šance na odfiltrování skutečných pozitivních výsledků. Jedním z mála

prostředků, jak zvýšit kvalitu dat získaných z FFPE vzorků, je proto použití velmi vysokého pokrytí, což jsme provedli v naší studii.

5. Závěr

Celkovým cílem této práce bylo přispět s použitím genomických metod, v čele s NGS, k poznatkům v oblastech vývoje biomarkerů pro predikci a prognostiku třech typů nádorů – karcinomu prsu, ovarií a kolorekta. Ačkoli u těchto typů nádorů v posledních dekádách došlo ke zlepšení efektivity a dostupnosti léčby, právě díky pokrokům v molekulární charakterizaci nádorů, stále zbývá dlouhá cesta k personalizované medicíně v plném smyslu slova, tj. terapii „šité na míru“ pacientovi.

Jedním z předmětů zájmu byla neprobádaná oblast vlivu genů interagujících s oxysteroly na lumenální karcinom prsu a jeho prognózu. Byla odhalena asociace somatických mutací v genu *CYP46A1*, zodpovědného za produkci 24-HC, a ve skupině genů s ním funkčně souvisejících, s horší prognózou pacientek. Obdobná asociace byla sledována pro mutace ve skupině dvaceti genů, které zároveň asociovaly s expresí progesteronového receptoru. V navazující multiomické studii byla data rozšířena o data exprese těchto genů a exprese miRNA na celotranskriptomové úrovni, přičemž byla vytvořena interakční síť mRNA-miRNA, poprvé mapující potenciálně funkční vazby v oxysterolové signalizaci v karcinomu prsu. Jako nejzajímavější se jeví interakce v ose *ESR1-CH25H-INSIG1-ABCA9*, propojené skrze 7 miRNA. Tyto výsledky poskytnou základ pro navazující funkční studie v této oblasti.

Pro karcinom ovarií navzdory pokrokům v molekulární klasifikaci stále chybí biomarkery rezistence na široce používané deriváty platiny, která se bohužel překrývá s rezistencí na cílenou léčbu, např. PARPi. Provedli jsme proto komplexní srovnání celoezomových

mutačních profilů mezi pacientkami senzitivními a rezistentními. Senzitivní pacientky měly signifikantně vyšší mutační zátěž v genu *TP53* a zároveň nižší v několika genech dráhy Hippo. Mutovanost v genech dráhy opravy DNA homologní rekombinací (HRR) umožnila predikovat senzitivitu na léčbu, přičemž predikce byla výrazně zpřesněna, pokud byly započítány i mutace zárodečné, což je jedním ze z nejdůležitějších poznatků studie. V navazující studii pak byly pozorovány zajímavé rozdíly v detekci závažných somatických variant v místech sestřihu *TP53* pomocí panelového sekvenování oproti sekvenování celoexomovému. Za zásadní zjištění lze považovat doporučení již od začátku sledovat mutovanost genů dráhy HRR nejen v nádorové tkáni, ale rovněž ve vzorcích krve pacientek. Podle našich dat kombinací zárodečné a somatické informace dochází k podstatnému zvýšení informativnosti molekulárních analýz s přímým důsledkem pro prognózu a udržovací léčbu pacientek.

Většina pozornosti se ve výzkumu karcinomu kolorekta upíná na primární nádory. Pro letalitu onemocnění jsou ale zásadní metastázy, jejichž genomická charakterizace je nedostatečná. Srovnali jsme proto celoexomové mutační profily poměrně vzácného souboru párů primárních CRC a jejich synchronních jaterních metastáz. Byla potvrzena známá asociace mutací v genu *KRAS* v primárních nádorech s kratší dobou do relapsu onemocnění. U metastáz byly negativními prognostickými faktory mutace v genech *ATM*, *DNAH11* a *MUC5AC* a vyšší výskyt mutačního podpisu SBS24. Výsledky ale bude třeba ověřit v budoucích rozsáhlejších studiích. Žádný zkoumaný faktor neasocioval s rezistencí pacientů na chemoterapii. Naše cílené analýzy na homogenním a klinicky jasně definovaném souboru ale jasně ukazují na význam molekulární informace nejen z primárního onemocnění, ale i pokud možno z rekurentních lézí. Opět se ukazuje, že individualizace molekulárního testování přináší významnou přidanou hodnotu a umožňuje tak i skutečně individualizovanou terapii, kdy by každé linii

onkologické léčby, podle našeho názoru, měla předcházet molekulární klasifikace onemocnění.

6. Seznam publikací autora

6.1. Původní články podkládající disertační práci

Článek 1

HOLÝ, Petr, Viktor HLAVÁČ, Pavel OSTAŠOV, Veronika BRYNYCHOVÁ, Renata KOŽEVNIKOVOVÁ, Markéta TRNKOVÁ, Kateřina KOPEČKOVÁ, Soňa MĚŠŤÁKOVÁ, Marcela MRHALOVÁ a Pavel SOUČEK, 2022. Germline and somatic genetic variability of oxysterol-related genes in breast cancer patients with early disease of the luminal subtype. *Biochimie*. 199, 158–169. ISSN 0300-9084.

Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2022.04.015 [IF₂₀₂₁ = 4,372 (Q2)]

Článek 2

HOLÝ, Petr, Veronika BRYNYCHOVÁ, Karolína ŠEBOROVÁ, Vojtěch HANIČINEC, Renata KOŽEVNIKOVOVÁ, Markéta TRNKOVÁ, David VRÁNA, Jiří GATĚK, Kateřina KOPEČKOVÁ, Marcela MRHALOVÁ a Pavel SOUČEK, 2023. Integrative analysis of mRNA-miRNA expression profiles and somatic variants in oxysterol signaling in early-stage luminal breast cancer. [v recenzním řízení]

Článek 3

HLAVÁČ, Viktor, **Petr HOLÝ**, Radka VÁCLAVÍKOVÁ, Lukáš ROB, Martin HRUDA, Marcela MRHALOVÁ, Petr ČERNAJ, Jiří BOUDA a Pavel SOUČEK, 2022. Whole-exome sequencing of epithelial ovarian carcinomas differing in resistance to platinum therapy. *Life Science Alliance* [online]. 5(12). ISSN 2575-1077.

Dostupné z: doi:10.26508/lisa.202201551. [IF₂₀₂₁ = 5,781 (Q1)]

Článek 4

HOLÝ, Petr, Viktor HLAVÁČ, Karolína ŠEBOROVÁ, Simona ŠŮSOVÁ, Lukáš ROB, Martin HRUDA, Jiří BOUDA, Alena BARTÁKOVÁ, Marcela MRHALOVÁ, Mohammad Moufaq Khatar Al Obeed ALLAH, Jiří ŠPAČEK, Iva SEDLÁKOVÁ, Pavel SOUČEK a Radka VÁCLAVÍKOVÁ, 2023. Germline and somatic variants in targeted DNA sequencing panel reveal new candidate genes involved in platinum resistance of ovarian carcinoma.

[článek v přípravě, výsledky jsou součástí disertační práce]

Článek 5

HLAVÁČ, Viktor, Lenka ČERVENKOVÁ, Simona ŠŮSOVÁ, **Petr HOLÝ**, Václav LIŠKA, Ondřej VYČÍTAL, Ondřej ŠOREJS, Ondřej FIALA, Ondřej DAUM a Pavel SOUČEK, 2023. Exome Sequencing of Paired Colorectal Carcinomas and Synchronous Liver Metastases for Prognosis and Therapy Prediction. *JCO Precision Oncology* [online]. (7), e2200557. Dostupné z: doi:10.1200/PO.22.00557.

[IF₂₀₂₁ = 5,479 (Q2)]

6.2. Ostatní články související s tématem práce

Článek 6

HOLY, P., A. KLOUDOVA a P. SOUCEK, 2018. Importance of genetic background of oxysterol signaling in cancer. *Biochimie*. 153, 109–138. ISSN 1638-6183. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2018.04.023 [IF₂₀₁₈ = 3,362 (Q2), IF₂₀₂₁ = 4,372 (Q2)]

Článek 7

KLOUDOVA-SPALENKOVA, Alzbeta, **Petr HOLY** a Pavel SOUCEK, 2021. Oxysterols in cancer management: From therapy to biomarkers. *British Journal of Pharmacology* [online]. 178(16), 3235–3247. ISSN 1476-5381. Dostupné z: doi:10.1111/bph.15273.

[IF₂₀₂₁ = 9,473 (D1)]

Článek 8

HLAVÁČ, Viktor, **Petr HOLÝ** a Pavel SOUČEK, 2020. Pharmacogenomics to Predict Tumor Therapy Response: A Focus on ATP-Binding Cassette Transporters and Cytochromes P450. *Journal of Personalized Medicine* [online]. 10(3), 108.

Dostupné z: doi:10.3390/jpm10030108. [IF₂₀₂₀ = 4,945 (Q1)]

Článek 9

SEBOROVA, Karolina, Alzbeta KLOUDOVA-SPALENKOVA, Kamila KOUCKA, **Petr HOLY**, Marie EHRLICHOVA, Changwei WANG, Iwao OJIMA, Iveta VOLESKA, Petr DANIEL, Kamila BALUSIKOVA, Michael JELINEK, Jan KOVAR, Lukas ROB, Martin HRUDA, Marcela MRHALOVA, Pavel SOUCEK a Radka VACLAVIKOVA, 2022. The Role of TRIP6, ABCC3 and CPS1 Expression in Resistance of Ovarian Cancer to Taxanes. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 23(1), 73.

Dostupné z: doi:10.3390/ijms23010073. [IF₂₀₂₁ = 6,208 (Q1)]

Článek 10

SEBOROVA, Karolina, Viktor HLAVAC, **Petr HOLY**, Sunniva S. BJØRKLUND, Thomas FLEISCHER, Lukas ROB, Martin HRUDA, Jiri BOUDA, Marcela MRHALOVA, Mohammad Moufaq Khatar Al Obeed ALLAH, Pavel VODICKA, Ondrej FIALA, Pavel SOUCEK, Vessela N. KRISTENSEN, Ludmila VODICKOVA a Radka

VACLAVIKOVA, 2022. Complex molecular profile of DNA repair genes in epithelial ovarian carcinoma patients with different sensitivity to platinum-based therapy. *Frontiers in Oncology* [online]. 12. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2022.1016958. [IF₂₀₂₁ = 5,738 (Q2)].

Článek 11

SEBOROVA, Karolina, Kamila KOUCKA, Alzbeta SPALENKOVA, **Petr HOLY**, Marie EHRlichova, Tomas SYCHRA, Lei CHEN, Hersh BENDALE, Iwao OJIMA, Cristian SANDOVAL-ACUÑA, Jaroslav TRUKSA, Pavel SOUCEK a Radka VACLAVIKOVA, 2022. Anticancer regimens containing third generation taxanes SB-T-121605 and SB-T-121606 are highly effective in resistant ovarian carcinoma model. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 13. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2022.971905.

[IF₂₀₂₁ = 5,988 (Q1)]

7. Seznam použité literatury

AHMED, Ahmed Ashour, Dariush ETEMADMOGHADAM, Jillian TEMPLE, Andy G LYNCH, Mohamed RIAD, Raghwa SHARMA, Colin STEWART, Sian FEREDAY, Carlos CALDAS, Anna DEFAZIO, David BOWTELL a James D BRENTON, 2010. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *The Journal of Pathology* [online]. **221**(1), 49–56 [vid. 2023-04-04]. ISSN 1096-9896. Dostupné z: doi:10.1002/path.2696

ARNOLD, Melina, Eileen MORGAN, Harriet RUMGAY, Allini MAFRA, Deependra SINGH, Mathieu LAVERSANNE, Jerome VIGNAT, Julie R. GRALOW, Fatima CARDOSO, Sabine SIESLING a Isabelle SOERJOMATARAM, 2022. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast : Official Journal of the European Society of Mastology* [online]. **66**, 15–23 [vid. 2022-10-03]. ISSN 0960-9776. Dostupné z: doi:10.1016/j.breast.2022.08.010

ARREAZA, Gladys, Ping QIU, Ling PANG, Andrew ALBRIGHT, Lewis Z. HONG, Matthew J. MARTON a Diane LEVITAN, 2016. Pre-Analytical Considerations for Successful Next-Generation Sequencing (NGS): Challenges and Opportunities for Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tumor Tissue (FFPE) Samples. *International*

Journal of Molecular Sciences [online]. **17**(9), 1579 [vid. 2023-04-05]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/jjms17091579

BAH, S. Y., P. DICKINSON, T. FORSTER, B. KAMPMANN a P. GHAZAL, 2017. Immune oxysterols: Role in mycobacterial infection and inflammation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [online]. **169**, 152–163. ISSN 0960-0760. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsbmb.2016.04.015

BRACHOVA, Pavla, Samuel R. MUETING, Matthew J. CARLSON, Michael J. GOODHEART, Anna M. BUTTON, Sarah L. MOTT, Donghai DAI, Kristina W. THIEL, Eric J. DEVOR a Kimberly K. LESLIE, 2015. TP53 oncomorphic mutations predict resistance to platinum- and taxane-based standard chemotherapy in patients diagnosed with advanced serous ovarian carcinoma. *International Journal of Oncology* [online]. **46**(2), 607–618 [vid. 2023-04-04]. ISSN 1019-6439. Dostupné z: doi:10.3892/ijo.2014.2747

BRAY, Freddie, Mathieu LAVERSANNE, Elisabete WEIDERPASS a Isabelle SOERJOMATARAM, 2021. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer* [online]. **127**(16), 3029–3030. ISSN 1097-0142. Dostupné z: doi:10.1002/cncr.33587

BRUFSKY, Adam M. a Maura N. DICKLER, 2018. Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: Exploiting Signaling Pathways Implicated in Endocrine Resistance. *The Oncologist* [online]. **23**(5), 528–539 [vid. 2023-02-21]. ISSN 1083-7159. Dostupné z: doi:10.1634/theoncologist.2017-0423

CAO, Qin, Zhongzhong LIU, Yan XIONG, Zibiao ZHONG a Qifa YE, 2020. Multiple Roles of 25-Hydroxycholesterol in Lipid Metabolism, Antivirus Process, Inflammatory Response, and Cell Survival. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. **2020**, 8893305 [vid. 2023-02-21]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2020/8893305

CORCORAN, Ryan B. a Matthew P. SCOTT, 2006. Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **103**(22), 8408–8413. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0602852103

CUNNINGHAM, Richard a Carsten Gram HANSEN, 2022. The Hippo pathway in cancer: YAP/TAZ and TEAD as therapeutic targets in cancer. *Clinical Science* [online]. **136**(3), 197–222 [vid. 2023-04-04]. ISSN 0143-5221. Dostupné z: doi:10.1042/CS20201474

DE FREITAS, Fábio Alessandro, Débora LEVY, Cadiele Oliana REICHERT, Edecio CUNHA-NETO, Jorge KALIL a Sérgio Paulo BYDŁOWSKI, 2022. Effects of Oxysterols on Immune Cells and Related Diseases. *Cells* [online]. **11**(8), 1251. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells11081251

- DE MEDINA, Philippe, Sandrine SILVENTE-POIROT a Marc POIROT, 2022. Oxysterols are potential physiological regulators of ageing. *Ageing Research Reviews* [online]. **77**, 101615. ISSN 1872-9649. Dostupné z: doi:10.1016/j.arr.2022.101615
- DE WILLE, J., C. FABRE a N. BAKALARA, 2013. Oxysterols in cancer cell proliferation and death. *Biochemical Pharmacology* [online]. **86**(1), 154–160. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2013.02.029
- DE WITTE, Chris J., Joachim KUTZERA, Arne VAN HOECK, Luan NGUYEN, Ingrid A. BOERE, Mathilde JALVING, Petronella B. OTTEVANGER, Christa VAN SCHAİK-VAN DE MHEEN, Marion STEVENSE, Wigard P. KLOOSTERMAN, Ronald P. ZWEEMER, Edwin CUPPEN a Petronella O. WITTEVEEN, 2022. Distinct Genomic Profiles Are Associated with Treatment Response and Survival in Ovarian Cancer. *Cancers* [online]. **14**(6), 1511 [vid. 2023-04-04]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers14061511
- DIENSTMANN, Rodrigo, Louis VERMEULEN, Justin GUINNEY, Scott KOPETZ, Sabine TEJPAR a Josep TABERNERO, 2017. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer* [online]. **17**(2), 79–92 [vid. 2022-11-02]. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc.2016.126
- DORIA, M., L. MAUGEST, T. MOREAU, G. LIZARD a A. VEJUX, 2016. Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* [online]. **101**, 393–400. ISSN 1873-4596. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.008
- DUNDR, Pavel a Kristýna NĚMEJCOVÁ, 2022. *Epitelové nádory ovaria, děložní tuby a peritonea* [online]. B.m.: Společnost českých patologů ČLS JEP [vid. 2022-10-26]. Dostupné z: <https://www.patologie.info/standardy/32>
- DWYER, Jennifer R., Navdar SEVER, Marc CARLSON, Stanley F. NELSON, Philip A. BEACHY a Farhad PARHAMI, 2007. Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **282**(12), 8959–8968. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M611741200
- FENG, Cong, Yan-Hua HAN, Na QI, Jia LI, Qing-Hua SHENG, Yu LIU a Li-Li YANG, 2021. Functional implications of PABPC1 in the development of ovarian cancer. *Open Medicine* [online]. **16**(1), 805–815 [vid. 2023-04-04]. ISSN 2391-5463. Dostupné z: doi:10.1515/med-2021-0278
- FLEMING, Matthew, Sreelakshmi RAVULA, Sergei F. TATISHCHEV a Hanlin L. WANG, 2012. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology* [online]. **3**(3), 153–173. ISSN 2219-679X. Dostupné z: doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030
- GANDAGLIA, Giorgio, Riccardo LENI, Freddie BRAY, Neil FLESHNER, Stephen J. FREDLAND, Adam KIBEL, Pär STATTIN, Hendrick VAN POPPEL a Carlo LA

VECCHIA, 2021. Epidemiology and Prevention of Prostate Cancer. *European Urology Oncology* [online]. **4**(6), 877–892. ISSN 2588-9311. Dostupné z: doi:10.1016/j.euo.2021.09.006

GIMPLE, Ryan C. a Xiuxing WANG, 2019. RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry. *Frontiers in Oncology* [online]. **9** [vid. 2023-04-05]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00965>

GOROJANKINA, Tatiana, 2016. Hedgehog signaling pathway: a novel model and molecular mechanisms of signal transduction. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* [online]. **73**(7), 1317–1332. ISSN 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-015-2127-4

HAN, Mingzhi, Shuai WANG, Ning YANG, Xu WANG, Wenbo ZHAO, Halala Sdik SAED, Thomas DAUBON, Bin HUANG, Anjing CHEN, Gang LI, Hrvoje MILETIC, Frits THORSEN, Rolf BJERKVIG, Xingang LI a Jian WANG, 2020. Therapeutic implications of altered cholesterol homeostasis mediated by loss of CYP46A1 in human glioblastoma. *EMBO molecular medicine* [online]. **12**(1), e10924. ISSN 1757-4684. Dostupné z: doi:10.15252/emmm.201910924

HARBIN, Laura M., Holly H. GALLION, Derek B. ALLISON a Jill M. KOLESAR, 2022. Next Generation Sequencing and Molecular Biomarkers in Ovarian Cancer-An Opportunity for Targeted Therapy. *Diagnostics (Basel, Switzerland)* [online]. **12**(4), 842. ISSN 2075-4418. Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics12040842

HOLY, P., A. KLOUDOVA a P. SOUCEK, 2018. Importance of genetic background of oxysterol signaling in cancer. *Biochimie* [online]. **153**, 109–138. ISSN 1638-6183. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2018.04.023

HOWE, V., L. J. SHARPE, S. J. ALEXOPOULOS, S. V. KUNZE, N. K. CHUA, D. LI a A. J. BROWN, 2016. Cholesterol homeostasis: How do cells sense sterol excess? *Chem Phys Lipids* [online]. **199**, 170–178. ISSN 1873-2941. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.02.011

HUO, Dezheng, Wendy M. CLAYTON, Toshio F. YOSHIMATSU, Jianjun CHEN a Olufunmilayo I. OLOPADE, 2016. Identification of a circulating microRNA signature to distinguish recurrence in breast cancer patients. *Oncotarget* [online]. **7**(34), 55231–55248 [vid. 2023-03-10]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.10485

CHALMERS, Zachary R., Caitlin F. CONNELLY, David FABRIZIO, Laurie GAY, Siraj M. ALI, Riley ENNIS, Alexa SCHROCK, Brittany CAMPBELL, Adam SHLIEN, Juliann CHMIELECKI, Franklin HUANG, Yuting HE, James SUN, Uri TABORI, Mark KENNEDY, Daniel S. LIEBER, Steven ROELS, Jared WHITE, Geoffrey A. OTTO, Jeffrey S. ROSS, Levi GARRAWAY, Vincent A. MILLER, Phillip J. STEPHENS a Garrett M. FRAMPTON, 2017. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Medicine* [online]. **9**(1), 34 [vid. 2023-04-04]. ISSN 1756-994X. Dostupné z: doi:10.1186/s13073-017-0424-2

- CHEN, Juan, Yan LI, Jianlei WU, Yakun LIU a Shan KANG, 2021. Whole-exome sequencing reveals potential germline and somatic mutations in 60 malignant ovarian germ cell tumors†. *Biology of Reproduction* [online]. **105**(1), 164–178 [vid. 2023-04-04]. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1093/biolre/ioab052
- IULIANO, Luigi, 2011. Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chemistry and Physics of Lipids* [online]. **164**(6), 457–468. ISSN 0009-3084. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphyslip.2011.06.006
- JAKOBSSON, Tomas, Eckardt TREUTER, Jan-Åke GUSTAFSSON a Knut R. STEFFENSEN, 2012. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. **33**(7), 394–404. ISSN 1873-3735. Dostupné z: doi:10.1016/j.tips.2012.03.013
- JAVITT, N. B. a J. C. JAVITT, 2009. The retinal oxysterol pathway: a unifying hypothesis for the cause of age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* [online]. **20**(3), 151–7. ISSN 1531-7021. Dostupné z: doi:10.1097/ICU.0b013e32832af468
- JEITNER, T. M., I. VOLOSHYNA a A. B. REISS, 2011. Oxysterol derivatives of cholesterol in neurodegenerative disorders. *Curr Med Chem* [online]. **18**(10), 1515–25. ISSN 1875-533X. Dostupné z: doi:10.2174/092986711795328445
- KARCZEWSKI, Konrad J., ..., Daniel G. MACARTHUR, 2020. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *bioRxiv* [online]. 531210 [vid. 2020-04-28]. Dostupné z: doi:10.1101/531210
- KIM, Woo-Kyun, Vicente MELITON, Sotirios TETRADIS, Gerry WEINMASTER, Theodore J. HAHN, Marc CARLSON, Stanley F. NELSON a Farhad PARHAMI, 2010. Osteogenic oxysterol, 20(S)-hydroxycholesterol, induces notch target gene expression in bone marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* [online]. **25**(4), 782–795. ISSN 1523-4681. Dostupné z: doi:10.1359/jbmr.091024
- KISS ET AL., 2023. *Modrá kniha České onkologické společnosti* [online]. 29. vyd. Brno: Masarykův onkologický ústav. ISBN 978-80-86793-55-9. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/modra-kniha/22.pdf>
- KLOUDOVA-SPALENKOVA, Alzbeta, Petr HOLY a Pavel SOUCEK, 2021. Oxysterols in cancer management: From therapy to biomarkers. *British Journal of Pharmacology* [online]. **178**(16), 3235–3247. ISSN 1476-5381. Dostupné z: doi:10.1111/bph.15273
- KULIG, W., L. CWIKLIK, P. JURKIEWICZ, T. ROG a I. VATTULAINEN, 2016a. Cholesterol oxidation products and their biological importance. *Chemistry and Physics of Lipids* [online]. **199**, 144–160. ISSN 0009-3084. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.03.001
- KULIG, W., A. OLZYNSKA, P. JURKIEWICZ, A. M. KANTOLA, M. MANNA, M. POURMOUSA, M. VAZDAR, L. CWIKLIK, T. ROG, G. KHELASHVILI, D.

HARRIES, V. V. TELKKI, M. HOF, I. VATTULAINEN a P. JUNGWIRTH, 2016b. Oxidation of Cholesterol Changes the Physical Properties of Lipid Membranes. *Biophysical Journal* [online]. **110**(3), 84A-84A. ISSN 0006-3495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2015.11.512

LAPPANO, R., A. G. RECCHIA, E. M. DE FRANCESCO, T. ANGELONE, M. C. CERRA, D. PICARD a M. MAGGIOLINI, 2011. The cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol activates estrogen receptor α -mediated signaling in cancer cells and in cardiomyocytes. *PLoS One* [online]. **6**(1), e16631. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0016631

LEHMANN, J. M., S. A. KLIEWER, L. B. MOORE, T. A. SMITH-OLIVER, B. B. OLIVER, J. L. SU, S. S. SUNDSETH, D. A. WINEGAR, D. E. BLANCHARD, T. A. SPENCER a T. M. WILLSON, 1997. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **272**(6), 3137–3140. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.6.3137

LEIJEN, Suzanne, Robin M.J.M. VAN GEEL, Gabe S. SONKE, Daphne DE JONG, Efraim H. ROSENBERG, Serena MARCHETTI, Dick PLUIM, Erik VAN WERKHOVEN, Shelonitda ROSE, Mark A. LEE, Tomoko FRESHWATER, Jos H. BEIJNEN a Jan H.M. SCHELLENS, 2016. Phase II Study of WEE1 Inhibitor AZD1775 Plus Carboplatin in Patients With TP53-Mutated Ovarian Cancer Refractory or Resistant to First-Line Therapy Within 3 Months. *Journal of Clinical Oncology* [online]. **34**(36), 4354–4361 [vid. 2023-04-04]. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2016.67.5942

LEVY, D., T. C. DE MELO, J. L. M. RUIZ a S. P. BYDŁOWSKI, 2017. Oxysterols and mesenchymal stem cell biology. *Chem Phys Lipids* [online]. **207**(Pt B), 223–230. ISSN 1873-2941. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphyslip.2017.06.009

LI, Chuansheng, Jingwei ZHANG, Zhongliang MA, Fan ZHANG a Wenlong YU, 2018. miR-19b serves as a prognostic biomarker of breast cancer and promotes tumor progression through PI3K/AKT signaling pathway. *Oncotargets and Therapy* [online]. **11**, 4087–4095 [vid. 2023-03-14]. Dostupné z: doi:10.2147/OTT.S171043

MARIANI, Sara, Luca BERTERO, Vittoria COPPOLA, Giorgio SARACCO, Alberto AREZZO, Paola FRANCIÀ DI CELLE, Jasna METOVIC, Caterina MARCHIÒ a Paola CASSONI, 2018. Awareness of mutational artefacts in suboptimal DNA samples: possible risk for therapeutic choices. *Expert Review of Molecular Diagnostics* [online]. **18**(5), 467–475. ISSN 1744-8352. Dostupné z: doi:10.1080/14737159.2018.1468254

MARTELLI, Valentino, Alessandro PASTORINO a Alberto F. SOBRERO, 2022. Prognostic and predictive molecular biomarkers in advanced colorectal cancer. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. **236**, 108239. ISSN 1879-016X. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2022.108239

MCCLUGGAGE, W. Glenn, 2011. Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology* [online].

43(5), 420–432 [vid. 2022-10-25]. ISSN 0031-3025. Dostupné z: doi:10.1097/PAT.0b013e328348a6e7

MCDONOUGH, Samantha J., Aditya BHAGWATE, Zhifu SUN, Chen WANG, Michael ZSCHUNKE, Joshua A. GORMAN, Karla J. KOPP a Julie M. CUNNINGHAM, 2019. Use of FFPE-derived DNA in next generation sequencing: DNA extraction methods. *PLOS ONE* [online]. **14**(4), e0211400 [vid. 2023-04-05]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0211400

MODEST, D. P., I. RICARD, V. HEINEMANN, S. HEGEWISCH-BECKER, W. SCHMIEGEL, R. PORSCHE, S. STINTZING, U. GRAEVEN, D. ARNOLD, L. F. VON WEIKERSTHAL, C. GIESSEN-JUNG, A. STAHLER, H. J. SCHMOLL, A. JUNG, T. KIRCHNER, A. TANNAPFEL a A. REINACHER-SCHICK, 2016. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* [online]. **27**(9), 1746–1753. ISSN 1569-8041. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdw261

MURPHY, R. C. a K. M. JOHNSON, 2008. Cholesterol, reactive oxygen species, and the formation of biologically active mediators. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **283**(23), 15521–15525. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.R700049200

NELSON, Erik R., Suzanne E. WARDELL, Jeff S. JASPER, Sunghee PARK, Sunil SUCHINDRAN, Matthew K. HOWE, Nicole J. CARVER, Ruchita V. PILLAI, Patrick M. SULLIVAN, Varun SONDHAI, Michihisa UMETANI, Joseph GERADTS a Donald P. MCDONNELL, 2013. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **342**(6162), 1094–1098. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1241908

NORQUIST, Barbara M., Mark F. BRADY, Maria I. HARRELL, Tom WALSH, Ming K. LEE, Suleyman GULSUNER, Sarah S. BERNARDS, Silvia CASADEI, Robert A. BURGER, Krishnansu S. TEWARI, Floor BACKES, Robert S. MANNEL, Gretchen GLASER, Cheryl BAILEY, Stephen RUBIN, John SOPER, Heather A. LANKES, Nilsa C. RAMIREZ, Mary Claire KING, Michael J. BIRRER a Elizabeth M. SWISHER, 2018. Mutations in Homologous Recombination Genes and Outcomes in Ovarian Carcinoma Patients in GOG 218: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. *Clinical Cancer Research* [online]. **24**(4), 777–783 [vid. 2023-04-04]. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1327

OKABE, Akishi, Yasuomi URANO, Sayoko ITOH, Naoto SUDA, Rina KOTANI, Yuki NISHIMURA, Yoshiro SAITO a Noriko NOGUCHI, 2013. Adaptive responses induced by 24S-hydroxycholesterol through liver X receptor pathway reduce 7-ketocholesterol-caused neuronal cell death. *Redox Biology* [online]. **2**, 28–35. ISSN 2213-2317. Dostupné z: doi:10.1016/j.redox.2013.11.007

- OLIVE, Virginie, Margaux J. BENNETT, James C. WALKER, Cong MA, Iris JIANG, Carlos CORDON-CARDO, Qi-Jing LI, Scott W. LOWE, Gregory J. HANNON a Lin HE, 2009. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes & Development* [online]. **23**(24), 2839–2849. ISSN 1549-5477. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1861409
- OUYANG, Shuhui, Zhongcheng MO, Sha SUN, Kai YIN a Yuncheng LV, 2020. Emerging role of Insig-1 in lipid metabolism and lipid disorders. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* [online]. **508**, 206–212. ISSN 1873-3492. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2020.05.042
- PATCH, Ann-Marie, ..., David D. L. BOWTELL, 2015. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature* [online]. **521**(7553), 489–494 [vid. 2023-04-04]. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature14410
- RIEDESSER, Julian E., Matthias P. EBERT a Johannes BETGE, 2022. Precision medicine for metastatic colorectal cancer in clinical practice. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* [online]. **14**, 17588359211072704. ISSN 1758-8340. Dostupné z: doi:10.1177/17588359211072703
- SEREBRIISKII, Ilya G., Caitlin CONNELLY, Garrett FRAMPTON, Justin NEWBERG, Matthew COOKE, Vince MILLER, Siraj ALI, Jeffrey S. ROSS, Elizabeth HANDORF, Sanjeevani ARORA, Christopher LIEU, Erica A. GOLEMIS a Joshua E. MEYER, 2019. Comprehensive characterization of RAS mutations in colon and rectal cancers in old and young patients. *Nature Communications* [online]. **10**(1), 3722. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-11530-0
- SHAFATI, M., M. OLIN, A. BÄVNER, H. PETERSSON, B. ROZELL, S. MEANEY, P. PARINI a I. BJÖRKHEM, 2011. Enhanced production of 24S-hydroxycholesterol is not sufficient to drive liver X receptor target genes in vivo. *Journal of Internal Medicine* [online]. **270**(4), 377–387. ISSN 1365-2796. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2796.2011.02389.x
- SCHIRRIPA, Marta, Floriana NAPPO, Chiara CREMOLINI, Lisa SALVATORE, Daniele ROSSINI, Maria BENSI, Gianluca BUSINELLO, Filippo PIETRANTONIO, Giovanni RANDON, Giovanni FUCÀ, Alessandra BOCCACCINO, Francesca BERGAMO, Sara LONARDI, Angelo Paolo DEI TOS, Matteo FASSAN a Fotios LOUPAKIS, 2020. KRAS G12C Metastatic Colorectal Cancer: Specific Features of a New Emerging Target Population. *Clinical Colorectal Cancer* [online]. **19**(3), 219–225. ISSN 1938-0674. Dostupné z: doi:10.1016/j.clcc.2020.04.009
- SCHROEPFER, G. J., 2000. Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological Reviews* [online]. **80**(1), 361–554. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.2000.80.1.361
- SØKILDE, Rolf, Helena PERSSON, Anna EHINGER, Anna Chiara PIRONA, Mårten FERNÖ, Cecilia HEGARDT, Christer LARSSON, Niklas LOMAN, Martin MALMBERG, Lisa RYDÉN, Lao SAAL, Åke BORG, Johan VALLON-CHRISTERSON a Carlos ROVIRA, 2019. Refinement of breast cancer molecular

classification by miRNA expression profiles. *BMC Genomics* [online]. **20**(1), 503 [vid. 2023-02-24]. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-019-5887-7

SOLOMON, James P., Irina LINKOV, Andrea ROSADO, Kerry MULLANEY, Ezra Y. ROSEN, Denise FROSINA, Achim A. JUNGBLUTH, Ahmet ZEHIR, Ryma BENAYED, Alexander DRILON, David M. HYMAN, Marc LADANYI, Anthony N. SIRECI a Jaclyn F. HECHTMAN, 2020. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* [online]. **33**(1), 38–46. ISSN 1530-0285. Dostupné z: doi:10.1038/s41379-019-0324-7

SONCINI, Matias, Gianfranca CORNA, Marta MORESCO, Nadia COLTELLA, Umberto RESTUCCIA, Daniela MAGGIONI, Laura RACCOSTA, Chin-Yo LIN, Francesca INVERNIZZI, Roberto CROCCHIOLO, Claudio DOGLIONI, Catia TRAVERSARI, Angela BACHI, Rosa BERNARDI, Claudio BORDIGNON, Jan-Åke GUSTAFSSON a Vincenzo RUSSO, 2016. 24-Hydroxycholesterol participates in pancreatic neuroendocrine tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **113**(41), E6219–E6227. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1613332113

SONDKA, Zbyslaw, Sally BAMFORD, Charlotte G. COLE, Sari A. WARD, Ian DUNHAM a Simon A. FORBES, 2018. The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nature Reviews Cancer* [online]. **18**(11), 696–705 [vid. 2020-04-29]. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/s41568-018-0060-1

SUNG, Hyuna, Jacques FERLAY, Rebecca L. SIEGEL, Mathieu LAVERSANNE, Isabelle SOERJOMATARAM, Ahmedin JEMAL a Freddie BRAY, 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians* [online]. **71**(3), 209–249. ISSN 1542-4863. Dostupné z: doi:10.3322/caac.21660

THOMAS, Annabella F., Gemma L. KELLY a Andreas STRASSER, 2022. Of the many cellular responses activated by TP53, which ones are critical for tumour suppression? *Cell Death & Differentiation* [online]. **29**(5), 961–971 [vid. 2023-04-04]. ISSN 1476-5403. Dostupné z: doi:10.1038/s41418-022-00996-z

TORRE, Lindsey A., Britton TRABERT, Carol E. DESANTIS, Kimberly D. MILLER, Goli SAMIMI, Carolyn D. RUNOWICZ, Mia M. GAUDET, Ahmedin JEMAL a Rebecca L. SIEGEL, 2018. Ovarian Cancer Statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians* [online]. **68**(4), 284–296 [vid. 2022-10-25]. ISSN 0007-9235. Dostupné z: doi:10.3322/caac.21456

UGAI, Tomotaka, ..., Shuji OGINO, 2023. Prognostic role of detailed colorectal location and tumor molecular features: analyses of 13,101 colorectal cancer patients including 2994 early-onset cases. *Journal of Gastroenterology* [online]. **58**(3), 229–245. ISSN 1435-5922. Dostupné z: doi:10.1007/s00535-023-01955-2

UMETANI, M., H. DOMOTO, A. K. GORMLEY, I. S. YUHANNA, C. L. CUMMINS, N. B. JAVITT, K. S. KORACH, P. W. SHAUL a D. J. MANGELSDORF, 2007. 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. *Nat Med* [online]. **13**(10), 1185–92. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/nm1641

VAN REYK, David M., Andrew J. BROWN, Lillemor Mattsson HULT'EN, Roger T. DEAN a Wendy JESSUP, 2006. Oxysterols in biological systems: sources, metabolism and pathophysiological relevance. *Redox Report: Communications in Free Radical Research* [online]. **11**(6), 255–262. ISSN 1743-2928. Dostupné z: doi:10.1179/135100006X155003

VILAR, Eduardo a Stephen B. GRUBER, 2010. Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence. *Nature Reviews. Clinical Oncology* [online]. **7**(3), 153–162. ISSN 1759-4782. Dostupné z: doi:10.1038/nrclinonc.2009.237

WANG, Chun-Wei, Chiung-Chiao HUANG, Pei-Hsin CHOU, Yu-Ping CHANG, Shouzuo WEI, Frederick Peter GUENGERICH, Yueh-Ching CHOU, Sheng-Fan WANG, Ping-Shan LAI, Pavel SOUČEK a Yune-Fang UENG, 2017. 7-ketocholesterol and 27-hydroxycholesterol decreased doxorubicin sensitivity in breast cancer cells: estrogenic activity and mTOR pathway. *Oncotarget* [online]. **8**(39), 66033–66050. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.19789

WANG, S. F., Y. C. CHOU, N. MAZUMDER, F. J. KAO, L. D. NAGY, F. P. GUENGERICH, C. HUANG, H. C. LEE, P. S. LAI a Y. F. UENG, 2013. 7-Ketocholesterol induces P-glycoprotein through PI3K/mTOR signaling in hepatoma cells. *Biochem Pharmacol* [online]. **86**(4), 548–60. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2013.06.006

WANG, Shuang, Lijuan LI, Mengmeng YANG, Xiaoyan WANG, Huan ZHANG, Nan WU, Kaichao JIA, Junchao WANG, Menghui LI, Lijuan WEI a Juntian LIU, 2023. Identification of Three Circulating MicroRNAs in Plasma as Clinical Biomarkers for Breast Cancer Detection. *Journal of Clinical Medicine* [online]. **12**(1), 322 [vid. 2023-03-10]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm12010322

WHO, 2019. *World Health Organization Classification of Tumours: Breast Tumours* [online]. 5th vyd. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer [vid. 2022-10-25]. ISBN 978-92-832-4500-1. Dostupné z: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Breast-Tumours-2019>

WILLIAMS, C., F. PONTÉN, C. MOBERG, P. SÖDERKVIST, M. UHLÉN, J. PONTÉN, G. SITBON a J. LUNDEBERG, 1999. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *The American Journal of Pathology* [online]. **155**(5), 1467–1471. ISSN 0002-9440. Dostupné z: doi:10.1016/S0002-9440(10)65461-2

- XIANG, Kehui a David P BARTEL, 2021. The molecular basis of coupling between poly(A)-tail length and translational efficiency. *eLife* [online]. **10**, e66493 [vid. 2023-04-04]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.66493
- YANG, S. Y. Cindy, Stephanie LHEUREUX, Katherine KARAKASIS, Julia V. BURNIER, Jeffery P. BRUCE, Derek L. CLOUTHIER, Arnavaz DANESH, Rene QUEVEDO, Mark DOWAR, Youstina HANNA, Tiantian LI, Lin LU, Wei XU, Blaise A. CLARKE, Pamela S. OHASHI, Patricia A. SHAW, Trevor J. PUGH a Amit M. OZA, 2018. Landscape of genomic alterations in high-grade serous ovarian cancer from exceptional long- and short-term survivors. *Genome Medicine* [online]. **10**(1), 81 [vid. 2023-04-04]. ISSN 1756-994X. Dostupné z: doi:10.1186/s13073-018-0590-x
- ZARROUK, A., A. VEJUX, J. MACKRILL, Y. O'CALLAGHAN, M. HAMMAMI, N. O'BRIEN a G. LIZARD, 2014. Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Research Reviews* [online]. **18**, 148–162. ISSN 1568-1637. Dostupné z: doi:10.1016/j.arr.2014.09.006
- ZHANG, Shengliang, Lindsey CARLSEN, Liz HERNANDEZ BORRERO, Attila A. SEYHAN, Xiaobing TIAN a Wafik S. EL-DEIRY, 2022. Advanced Strategies for Therapeutic Targeting of Wild-Type and Mutant p53 in Cancer. *Biomolecules* [online]. **12**(4), 548 [vid. 2023-04-04]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom12040548
- ZHAO, Wenyuan, Ananya GUPTA, Janusz KRAWCZYK a Sanjeev GUPTA, 2022. The miR-17-92 cluster: Yin and Yang in human cancers. *Cancer Treatment and Research Communications* [online]. **33**, 100647 [vid. 2023-03-14]. ISSN 2468-2942. Dostupné z: doi:10.1016/j.ctarc.2022.100647
- ZHENG, Zongli, Matthew LIEBERS, Boryana ZHELYAZKOVA, Yi CAO, Divya PANDITI, Kerry D. LYNCH, Juxiang CHEN, Hayley E. ROBINSON, Hyo Sup SHIM, Juliann CHMIELECKI, William PAO, Jeffrey A. ENGELMAN, A. John IAFRATE a Long Phi LE, 2014. Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nature Medicine* [online]. **20**(12), 1479–1484. ISSN 1546-170X. Dostupné z: doi:10.1038/nm.3729
- ZHU, Guo, Ryma BENAYED, Caleb HO, Kerry MULLANEY, Purvil SUKHADIA, Kelly RIOS, Ryan BERRY, Brian P. RUBIN, Khedoudja NAFA, Lu WANG, David S. KLIMSTRA, Marc LADANYI a Meera R. HAMEED, 2019. Diagnosis of known sarcoma fusions and novel fusion partners by targeted RNA sequencing with identification of a recurrent ACTB-FOSB fusion in pseudomyogenic hemangioendothelioma. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* [online]. **32**(5), 609–620. ISSN 1530-0285. Dostupné z: doi:10.1038/s41379-018-0175-7
- ZMYSŁOWSKI, A. a A. SZTERK, 2017. Current knowledge on the mechanism of atherosclerosis and pro-atherosclerotic properties of oxysterols. *Lipids in Health and Disease* [online]. **16**. ISSN 1476-511X. Dostupné z: doi:10.1186/s12944-017-0579-2