

UNIVERZITA KARLOVA

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



**VYUŽITÍ SOMATICKÝCH DNA MUTACÍ V DIAGNOSTICE, LÉČBĚ A SLEDOVÁNÍ
SPORADICKÝCH GASTROINTESTINÁLNÍCH NÁDORŮ**

HABILITAČNÍ PRÁCE

RNDr. Marek Minárik, Ph.D.

PRAHA

2017

„Mutation: it is the key to our evolution. It has enabled us to evolve from a single-celled organism into the dominant species on the planet. This process is slow, and normally taking thousands and thousands of years. But every few hundred millennia, evolution leaps forward“

Prof. Charles Francis Xavier

Využití somatických DNA mutací v diagnostice, léčbě a sledování sporadických gastrointestinálních nádorů

1	Úvod	3
1.1	Klasifikace DNA mutací	3
1.2	Mechanismy mutagenese	6
1.3	Somatické mutace jako faktory vzniku a progresu maligních tumorů	9
1.4	Karcinogeneze nádorů trávicího traktu	13
1.5	Molekulární modely vybraných nádorů trávicího traktu	15
2	Výsledky	19
2.1	Detekce mutací významných řídících genů u kolorektálních adenomů a karcinomů	19
2.2	Detailní profilování (molekulární fenotypizace) kolorektálních lézí vzhledem k jejich lokalizaci a stupni progresu	22
2.3	Vyšetřování vybraných somatických mutací z tekojehlových biopsií za účelem rozlišení chronické pankreatitidy a karcinomu pankreatu	23
2.4	Profilování panelu somatických mutací a genových amplifikací pro odhad přežití pacientů s pokročilým karcinomem žaludku	24
2.5	Představení citlivé metodiky pro vyšetřování somatických mutací z cirkulující nádorové DNA (metodika tekuté biopsie) u onkologických pacientů	25
2.6	Vyšetřování somatických mutací cirkulující nádorové DNA pro sledování pacientů léčených pro metastatický karcinom tlustého střeva a konečníku.	27
3	Diskuse	29
4	Závěr	30
5	Poděkování	31
6	Seznam obrázků	32
7	Seznam použitých zkratk	33
8	Literatura	34
9	Seznam publikací, které jsou předmětem habilitační práce	39
10	Přílohy	

1. Úvod

Slovo „mutace“ pochází z latinského výrazu pro změnu - „mūtātus“ či proces změny „mutare“. Pod tímto pojmem se většinou skrývá obecné označení výsledného stavu procesu změny, která má dopad na vnější vzhled či funkci daného objektu. Často tak slyšíme např. o mutování jako o změně hlasu v období dospívání, nebo hovoříme o různých jazykových mutacích jednoho daného textu. Patrně nejzásadnější význam však má tento výraz pro oblast genetiky, kde mutací označujeme změnu sekvence (či struktury) nukleové kyseliny DNA (případně i RNA nebo proteinu). Jako první tento pojem v souvislosti s dědičností a příčinou vzniku nových druhů použil na počátku dvacátého století holandský botanik Hugo Marie de Vries ve své publikaci „Mutační teorie“ (1). Ze sémantického hlediska je zde vhodné upozornit na nutnost rozlišení toho, zda hovoříme o exkluzivní změně vedoucí k zásadnímu dopadu na tvorbu či funkci proteinového produktu či o změně, která je v populaci častá a kde takový dopad není zcela zřejmý. V prvním případě tak skutečně hovoříme o mutaci, zatímco v případě druhém o polymorfismu (polymorfismus = vícetvarost, odvozeno od řeckého „(poly)morphée“).

1.1 Klasifikace DNA mutací

Mutace podle úrovně změny genetického kódu

Prvním hlediskem posuzování genetické mutace je úroveň nukleové molekuly, na které došlo k příslušné změně. Rozlišují se tak mutace (i) genové (bodové substituce bazí, jejich inserce nebo delece) a (ii) chromozomální (translokace, inserce/delece částí nebo celých chromozómů, případně změny v jejich počtu/aneuploidie). Zatímco u solidních nádorů gastrointestinálního traktu (GIT) se vyskytují všechny uvedené typy, co do průměrného počtu na každý nádor zcela jasně převažují genové mutace. Nejčastějším typem je bodová mutace, kdy je při replikaci v průběhu syntézy komplementárního řetězce DNA zařazena nesprávná báze (substituce). V menší míře se vyskytuje situace, kdy je zařazena báze navíc (inserce) nebo je tato báze zcela přeskočena, nezařazena (delece). V literatuře se v poslední době pro všechny tyto případy používá souhrnně termín jednonukleotidová variace (single-nucleotide variation, SNV) (2).

Mutace podle dopadu na funkci proteinového produktu

Genetický kód je při dělení buněk vždy kompletně zkopírován do nově

syntetizovaných molekul DNA (replikace). Při genové expresi jsou z těchto molekul vybrány úseky (exony), které jsou přepsány do komplementární molekuly mediátorové RNA (messenger RNA, mRNA). V posledním kroku je potom pořadí RNA bazí přeloženo do pořadí aminokyselin (translace) z jejichž řetězce je vytvořena molekula proteinu. Překlad nukleotidového kódu do aminokyselinového kódu je zajištěn tak, že 3 po sobě jdoucí báze (triplet neboli **kodon**) určují vždy jednu aminokyselinu. S výjimkou methioninu (kódující kodon je ATG) a tryptofanu (kódující kodon je TGG) může být každá z aminokyselin kódována vícero kodony. Například aminokyselina Arginin je do proteinového řetězce připojena v případě, že se v mRNA vyskytne kterýkoli z tripletů AGA, AGG, CGA, CGG, CGC nebo CGT.

Pokud k jednonukleotidové variaci dojde v nekódující části DNA sekvence (mimo exony)*, nijak se to při tvorbě proteinového produktu neprojeví. Pokud k mutaci dojde v kódující části (v exonu), může nastat jedna ze tří možností. V případě, že substitucí vzniklý nový triplet kóduje stejnou aminokyselinu, potom, stejně jako v případě mutací v nekódujících oblastech, se tato mutace neprojeví při přepisu DNA do RNA a proteinu a proto o ní hovoříme jako o „**tiché mutaci**“ (silent mutation).

Druhým případem je, když následkem substituce vzniklý nový kodon kóduje jinou aminokyselinu nežli kodon původní, mění se tedy „smysl“ kódu a taková mutace je označována jako „**missense mutace**“. Následky mohou být různě závažné, podle toho, jak zásadní význam má daná aminokyselina pro funkci proteinového produktu. Pokud záměna za novou aminokyselinu nezmění výrazně funkci nebo strukturu proteinu, může být vliv takové mutace relativně malý, mutace je tzv. neutrální.

Posledním případem je situace, kdy mutace způsobí vznik některého z tzv. stop kodonů TAA, TAG nebo TGA. Tyto kodony kódují ukončení syntézy proteinového řetězce a jejich náhlý vznik uprostřed sekvence způsobí produkci nekompletního a tedy pravděpodobně nefunkčního proteinového produktu. Tyto mutace jsou označovány termínem „**non-sense mutace**“. Analogicky k těmto mutacím lze pozorovat i mutace s opačným efektem, tedy mutace mění tři kodony na jiné a tím inaktivují jejich stop funkci a vedoucí k nadměrnému prodloužení produktu. Tyto „nonstop mutace“ jsou velmi málo časté a nedávné studie ukázaly, že vedou k prodloužení typicky o 150 – 190 bazí, což u většiny proteinů nemá dopad na jejich fungování (3).

*A mimo bezprostřední blízkosti exonů (± 5 bazí), kde jsou tzv. sestřihové sekvence

Mutace podle původu

Z klinického pohledu managementu nádorových onemocnění je vhodné posuzovat odděleně mutace, které provázely vývoj jedince již od fáze zárodečných buněk a ty, které vznikly až v průběhu života. V prvním případě se jedná o „**zárodečné mutace**“, které lze detekovat ve všech typech buněk včetně buněk epitelových tkání, krevních buněk (leukocytů), pohlavních buněk atd. Tato univerzální přítomnost má, mimo jiné, význam při jejich vyšetřování, pro které je zcela dostačující odběr periferní krve bez nutnosti cílených odběrů specifických buněčných typů. Současně to má zcela zásadní význam pro metodiku mutační detekce bez výrazných nároků na citlivost, neboť zastoupení dané mutace je ve vzorku buď u 100% přítomných buněk (homozygotní forma), nebo u 50% přítomných buněk (heterozygotní forma) nebo zde přítomna není vůbec (wild type – divoký typ, vzorek bez mutace).

Zárodečné mutace jsou zodpovědné za vznik nádorových syndromů. U trávicího traktu jsou to především hereditární difúzní karcinom žaludku (hereditary diffuse gastric cancer, HDGC), familiární adenomová polypóza (familial adenomatous polyposis, FAP) a Lynchův syndrom, neboli hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC). Vzhledem k fázi vzniku mohou být zárodečné mutace buď vrozené, tzn. mutace se vyskytuje u některého, případně u obou z rodičů, nebo de novo, tzn. k mutaci došlo ve fázi zárodečné buňky u žádného z rodičů se nevyskytuje.

Naprostá většina solidních nádorů vzniká sporadicky na základě mutací ke kterým došlo až v průběhu života. Nejsou tedy přítomny ve všech buňkách, ale pouze v tělních (somatických) buňkách postižených neoplastickým procesem. U solidních nádorů jsou tyto „**somatické mutace**“ detekovatelné na základě odběru příslušných buněk a k jejich odhalení je typicky prováděna tkáňová biopsie. Odebírané bioptické vzorky však často obsahují i příměsi nemutovaných krevních buněk a buněk okolních nenádorových tkáňových struktur. Proto je při vyšetřování somatických mutací zcela zásadním parametrem analytická citlivost vyšetření, neboli schopnost dané metody spolehlivě detekovat přítomnost mutantních alel v nadbytku alel nemutovaných. Současná doporučení mezinárodních společností pro vyšetřování somatických mutací v molekulární patologii uvádějí požadavky na analytickou citlivost na úrovni minimálně 5% mutantní frakce⁴.

Odběr tkáně s dostatečným zastoupením nádorových buněk, tzv. nádorová celularita (tumor cellularity), nutný pro vyšetřování somatických mutací, často nelze

provést v důsledku nedostupnosti nádoru či špatného stavu pacienta. V poslední době se jako případná alternativa tkáňové biopsie rozvíjí technologie umožňující záchyt somatických mutací ve fragmentech DNA uvolňovaných z nádoru do krevního oběhu (5). Metoda vyšetřování této cirkulující nádorové DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) se tak často označuje pojmem „**tekutá biopsie**“ (**liquid biopsy**) (6,7). Vzhledem k velmi nízkým hladinám ctDNA v cirkulaci (často se jedná o pouhé desítky krátkých DNA molekul) jsou však požadavky na analytickou citlivost metod pro tekutou biopsii ještě výraznější – v rozsahu od 0.1% do 0.001% mutované frakce podle typu nádoru a stádia onemocnění (8).

1.2 Mechanizmy mutagenese

K bodovým mutacím dochází téměř výhradně v důsledku chemické modifikace templátové báze, podle které se komplementární báze připojuje (9). Tato modifikace pak způsobí netypické párování s jinak nekomplementárním protějškem (např. namísto korektní báze G je k chemicky modifikované templátové bázi A přiřazena nesprávně báze C). K chemické modifikaci, která stojí na počátku vzniku bodové mutace, může dojít náhodně a v takovém případě se jedná o tzv. **spontánní** mutaci, nebo může být způsobena působením vnějších faktorů a o takto vzniklé mutaci hovoříme jako o **indukované**.

Netypické párování analogů DNA bází,

Nejčastější mechanismus vedoucí ke spontánním mutacím je založen na tzv. tautomerizaci, což je přirozený jev záměny jednoduché chemické vazby a k ní přiléhající vazby dvojně se současným přesunem atomu vodíku (protonu). Jedná se tedy o přechod keto-sloučeniny na její enol-formu (v případě dvojně vazby s kyslíkem) nebo přechod amino-sloučeniny na její imino-formu (v případě dvojně vazby s dusíkem). Výsledkem je alternativní struktura téže látky, která však může vykazovat lehce odlišné vlastnosti, například ve schopnosti vytváření vodíkových můstků - párování. V případě DNA (i RNA) existují tautomerické formy všech nukleotidových bází. Po konverzi na enol-formu tak spolu můžou netypicky párovat thymin s guaninem (T*-G nebo T-G*) a obdobně po konverzi na imino-formu můžou párovat cytosin s adeninem (C*-A nebo C-A*) (10). Vzhledem k nízké stabilitě však forma T* velmi brzy přechází zpět do stabilní ketoformy T, následkem čehož dojde v daném úseku ke vzniku nepárové struktury TxG tzv. **mismatch**. Za předpokladu správné funkce vnitřních mechanismů **DNA oprav** (DNA

repair), jsou nepárové mismatch struktury tímto systémem dobře rozpoznatelné a může snadno dojít k jejich opravě (11).

Deaminace

Deaminace neboli ztráta aminoskupiny, vedoucí k přeměně jedné báze na bázi jinou je dalším mechanismem stojícím za vznikem bodových substitucí. Jednou z nejčastějších je záměna cytosinu na thymin (C:G->T:A), ke které dochází v důsledku deaminace (C) cytosinu za vzniku uracilu (U). V této fázi mohou opravné mechanismy ještě modifikaci zachytit a opravit, neboť uracil se přirozeně v DNA nevyskytuje a navíc netvoří s původním guaninem komplementární pár, ale UxG mismatch. Avšak, při další replikaci má tato modifikace zcela zásadní dopad na genetický kód neboť zatímco v nemutovaném stavu má být v daném místě syntetizován řetězec s komplementární bázi k cytosinu (C) tzn. guanin (G), je v důsledku přeměny syntetizována komplementární báze k uracilu (U) kterou je adenin (A). V tu chvíli je mutace tzv. uzamčena, neboť již nelze odhalit, že tento adenin vznikl v daném místě mutací. Ještě snadnější je vznik mutace (C:G->T:A) u cytosinů, které jsou modifikovány navázáním metylové skupiny na 5. uhlíku. C₅-metylce cytosinů se často vyskytuje především v DNA savčích buněk a má zde zcela zásadní význam při regulaci transkripce DNA. V případě 5-methylcytosinu (mC) v důsledku deaminace vzniká 5-methyluracil, neboli nukleotidová báze thymin (T), což zužuje možnosti opravných systémů pouze na rozpoznání v důsledku přítomnosti TxG (mismatch). Protože C₅-metylce nastává téměř výhradně na cytosinu, po kterém bezprostředně v sekvenci následuje guanin (---CG---), jsou tyto tzv. CpG ostrůvky (CpG-islands) hlavní místa potenciálních mutací v genomu, tzv. **mutační „hotspoty“** (mutation hotspots) (12). Jejich výskyt je především v regulačních místech předcházejícím kódující sekvenci mimo kódující sekvence. Pokud jde o další mutace vzniklé v důsledku deaminace, analogickým mechanismem (avšak méně často) dochází například k přeměně Adeninu na Guanin (A->G), kdy deaminací dochází ke vzniku nesprávně párující báze hypoxanthinu (X), či opačné záměny Guaninu na Adenin (G->A) přes Xanthin.

Deaminace 5-methylcytosinu nebo cytosinu je nejčastějším důvodem vzniku spontánních mutací s relativně vysokou frekvencí $3 \text{ až } 6 \times 10^{-13} \text{ s}^{-1}$, což za fyziologických podmínek představuje průměrně 100 náhodných deaminací genomu každé buňky v těle během 24h (při teplotě 37 °C a pH 7.4) (13). Kromě toho však k významnému počtu deaminací dochází též vlivem vnějších faktorů, především působením nitrosačních

činidel. Jedním z nejlépe prozkoumaných mechanismů je deaminace oxidem dusným, NO, respektive jeho (auto)oxidovanou formou oxidem dusitým (N_2O_3) (14). Vystavení vysokým koncentracím reaktivních sloučenin dusíku (především NO a N_2O_3) se označuje jako nitrosativní stres a dochází k němu například v souvislosti s působením cytokinů provázejících chronické záněty (15).

Alkylace

Alkylace je připojení uhlíkového zbytku k nukleotidové bázi. Většinou se jedná o připojení methylové (CH_3) nebo ethylové (CH_3-CH_2) funkční skupiny ke kyslíku nebo dusíku nukleové báze. Jednou z nejvíce mutagenních modifikací je O_6 alkylace guaninu, která vede ke vzniku O_6 -methyl-guaninu, který na rozdíl od původního guaninu (G) párujícího s cytosinem (C) preferenčně páruje s thyminem (T), což vede k výsledné mutaci G:C → A:T. Zpětnou demetylaci O_6 -methyl-guaninu na guanin zajišťuje enzym O_6 -methyl-guanin-metyl transferáza (*MGMT*), který tak představuje jeden z nejvýznamnějších repair genů a jeho dysfunkce má zásadní význam pro vznik celé řady solidních nádorů (např. gliomů, kolorektálních karcinomů, karcinomů plic). Další významným typem alkylačního poškození DNA je N_7 alkylace guaninu, N_3 nebo N_1 alkylace adeninu a N_3 alkylace cytosinu. Na rozdíl od O -alkylace nemají produkty N -alkylace schopnost vytvářet nesprávné párování. Jejich účinek je v destabilizaci struktury nukleotidu, často vedoucí ke ztrátě nukleové báze. Tento jev nastává především u purinových bází (adenin, guanin) a proto bývá obecně označován jako depurinace. Negativní dopad depurinace spočívá v tom, že opravné systémy ve snaze toto místo opravit vkládají nespecificky nukleové báze, často preferenčně adenin, což má za následek vznik mutací.

K DNA alkylaci dochází téměř výlučně působením vnějších chemických karcinogenů – alkylačních činidel. Klasickými představiteli jsou nitrosaminy (např. *N*-methyl-*N*-nitrosoamin obsažený v tabáku), dimetylsulfát (který se nachází v produktech spalování uhlí a ropných produktů) a metansulfonát (16).

Oxidace

K indukci oxidace, neboli připojení atomu kyslíku k nukleotidové bázi, dochází působením tzv. reaktivních kyslíkatých látek (reactive oxygen species, ROS): O_2^- , H_2O_2 , a $\cdot OH$. Tyto reaktivní látky vznikají v důsledku tzv. oxidativního stresu, na jehož vzniku se podílí řada faktorů, mezi kterými jsou UV záření, infekce, záněty, kouření, alkohol, a

další (17). Nejvýznamnější oxidativní modifikací v důsledku působení ROS je vznik 8-oxoguaninu (respektive 8-oxo-2'-deoxyguanosinu), který, na rozdíl od původního guaninu, nekorektně páruje s adeninem a tím dává vzniknout G:C → T:A mutaci (18). Hlavním opravným mechanismem je enzymatické vyjmutí 8-oxoguaninu, které zajišťuje enzym 8-oxoguanine glycosylase (OGG1). V Tabulce 1 je přehledný souhrn všech chemických modifikací nukleotidových bází a souvisejících DNA mutací, která v jejich důsledku vznikají.

Tabulka I: Přehled chemických modifikací vedoucích k DNA mutacím(19, 20, 21, 22, 23)

Konverze	Chemická modifikace	Mutace
5-Methylcytosine → thymine	Deaminace	G:C → A:T
Cytosin → uracil	Deaminace	G:C → A:T
Guanin → xanthin	Deaminace	G:C → A:T
Adenine → hypoxanthin	Deaminace	A:T → G:C
Adenine → hypoxanthin → apurinace	Deaminace	A:T → T:A
Guanin → O6-ethylguanin:Thymin	Alkylace	G:C → T:A
Cytosin → N7alkyl Cytosin → apurinace	Alkylace	G:C → A:T
Guanin → apurinace	Alkylace	G:C → A:T
Guanin → 8-oxoguanin	Oxidace	G:C → A:T

1.3 Somatické mutace jako faktory vzniku a progresu maligních tumorů

Obrovská frekvence opakovaných připojení nukleotidů doprovázející replikaci DNA při každém dělení buněk má i přes dedikované systémy DNA oprav za následek výskyt spontánních mutací v každé nově vzniklé buňce (24). Frekvence těchto spontánních mutací je odhadována na zhruba 10^{-8} což pro diploidní genom znamená, že po každém dělení obsahuje dceřiná buňka zhruba $10^{-8} \times 3 \cdot 10^9$ (počet bází v genomu) $\times 2$ (diploidita) = 60 nových mutací náhodně kdekoli v celém genomu. Pokud uvažíme celkový poměr kódujících sekvencí na úrovni přibližně 1% genomu (25), potom je zjevné, že pravděpodobnost vzniku nádoru na základě spontánní mutace je prakticky vyloučena. K iniciaci maligní transformace u sporadických nádorů tak dochází výhradně v důsledku mutací indukovaných působením vnějších karcinogenních faktorů. Tento proces je logicky urychlen, pokud je současně postižen DNA repair systém, jak tomu

bývá např. u tumorů vykazujících tzv. **mikrosatelitovou nestabilitu** (microsatellite instability, **MSI**) (Kapitola 1.4). MSI nádory se vyznačují mnohonásobně vyšším množstvím mutací než ty, které tuto nestabilitu nemají a jsou označovány jako mikrosatelitově stabilní (microsatellite stable, MSS).

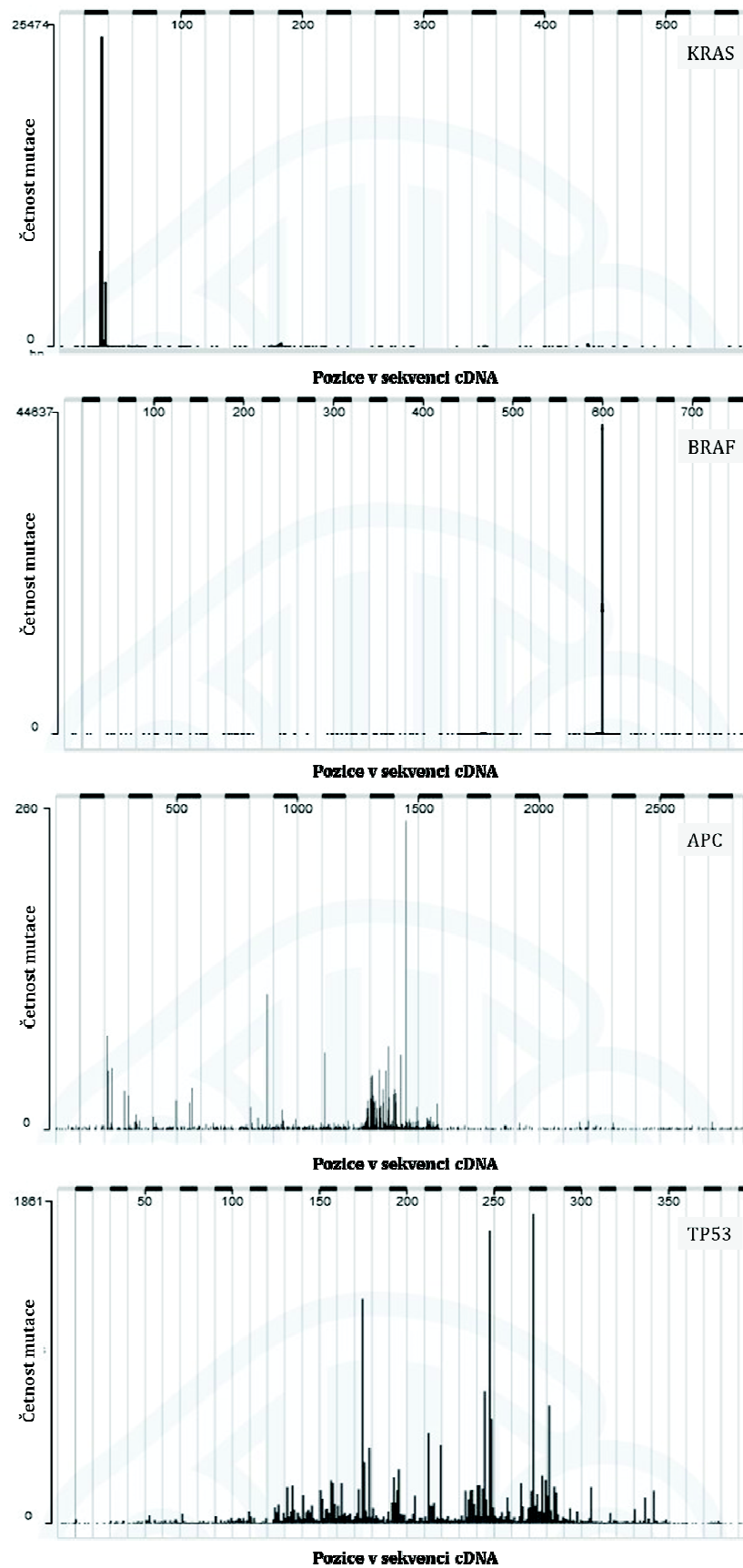
Nedávné studie srovnávající četnost somatických poruch u různých solidních nádorů prokázaly, že nádory trávicího traktu vykazují vysoké hodnoty tzv. **mutační zátěže (mutation burden)** vyjádřené jako průměrný počet mutací na tisíc bází nádorové DNA, případně průměrný počet mutací v nádoru(26). Tyto hodnoty jsou relativně nejvyšší u karcinomu jícnu a žaludku s průměrem 75ti, respektive 60ti mutacemi na nádor a nejnižší u slinivky břišní s průměrnými 40ti mutacemi. Jak bylo naznačeno, tyto počty se výrazně liší v závislosti na tom, zda se jedná o podtyp nádoru vykazující mikrosatelitovou nestabilitu či nikoli (MSI nebo MSS). Nejlépe je tento efekt pozorovatelný u nádorů tlustého střeva a konečníku, kde je MSI typ nalézán až ve 20% případů. Narozdíl od MSS nádorů, které obsahují průměrně 60 – 70 mutací, u MSI nádorů jdou v důsledku dysfunkce systému DNA oprav počty mutací do stovek (500 – 1000). Obdobně je tomu i u MSI nádorů jícnu či žaludku, jejichž zastoupení je však ve srovnání s kolorektálním karcinomem nižší (5 – 15%) (27, 28).

Obecně se vysoká mutační zátěž nádorů trávicího traktu přisuzuje vlivu přímého působení chemických karcinogenů z přijímané potravy v souvislosti s procesy permanentního obnovování buněčného epitelu provázenými nutností časté DNA replikace během buněčného dělení. U většiny výše uvedených orgánů trávicího traktu lze také somatické mutace nacházet již v pre-neoplastické fázi. Jedná se především o pokročilé kolorektální adenomy, jejichž mutační profily jsou blízké profilům kolorektálních adenokarcinomů. Pouze malá část adenomových polypů se však transformuje v maligní nádory (29). Z toho lze usoudit, že ne všechny mutace mají stejnou roli v procesu nádorové iniciace a progresu. Ve shodě s tím bylo v posledních letech potvrzeno, že lze rozlišit mutace, které mají jednoznačně za následek nekontrolované dělení a růst a naopak ty, které vznikají jako vedlejší efekt snížené schopnosti DNA oprav, avšak které nemají na další destabilizaci buněčné homeostázy vliv. Současně s tím se pro první skupinu vžil název „**řídící mutace**“ (driver mutations) a pro druhou „**passenger mutace**“ (český překlad „cestující“ není používán). Geny, které tyto mutace obsahují, bývají označovány jako „**řídící geny**“ a „**passenger geny**“ (30). Jedná se o geny, které se podílejí na regulaci buněčné proliferace u kterých mutace způsobí buď permanentní aktivaci (proto-**onkogen**) nebo naopak ztrátu funkce (**tumor**

supresor). Podle definice je jako (proto)onkogen je označován gen, u kterého se více než 20% všech mutací nachází pouze v několika specifických nukleotidových pozicích (hotspotech), a současně jsou to mutace typu missense (Kapitola 1.1 oddíl *Mutace podle dopadu na funkci proteinového produktu*). Jako tumor supresor je označován gen, u kterého >20% ze všech nalezených mutací způsobuje inaktivaci jeho funkce (31). Z uvedeného vyplývá, že rozložení mutací (mutační spektra) (proto)onkogenů a tumor supresorů se budou významně lišit.

Tento fakt je ilustrován na Obrázku 1, který znázorňuje mutační spektra (proto)onkogenů *KRAS* a *BRAF* a tumor supresorů *APC* a *TP53* na základě údajů z mezinárodní databáze mutací COSMIC (the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) (32). Zatímco v (proto)onkogenech jsou mutace koncentrovány v několika ojedinělých hotspotech, v tumor supresorech se mutace vyskytují napříč kódující sekvencí. V některých případech lze i u tumor supresorů nalézt oblasti se zvýšenou četností. Např. u genu *APC* se jedná o tzv. **mutační cluster region (MCR)** v exonu 15 mezi kodony 1286 a 1513 a u genu *TP53* o oblast exonů 5 – 8. Tyto hotspoty však představují spojitě sekvenční úseky, nikoli jednotlivé nukleotidové pozice, typické pro (proto)onkogeny. To je také důvodem vyšších metodických nároků, kdy zatímco u (proto)onkogenů je relativně snadná optimalizace pro konkrétní nukleotidové pozice, u tumor supresorů musí být metodika schopna detekovat mutace kdekoli v celé kódující sekvenci.

Ze zhruba 2000 genů, jejichž poruchy byly detekovány v solidních nádorech a které se vyskytují i v nádorech trávicího traktu, bylo na základě tohoto pravidla „20/20“ identifikováno 138 řídících genů, z toho 64 (proto)onkogenů a 74 tumor supresorových genů (33).



Obrázek 1: Mutační spektra (proto)onkogenů (*KRAS* a *BRAF*) a tumor supresorů (*APC* a *TP53*)

1.4 Karcinogeneze nádorů trávicího traktu

Maligní tumory GIT vykazují vysoce rozmanité molekulární profily, které odrážejí celé spektrum mechanismů podílejících se na jejich vzniku a progresi. Průběh karcinogeneze těchto nádorů bývá typicky vícestupňový vycházející z pre-maligního stavu a charakterizován řadou morfologických změn jako jsou hyperplázie, metaplázie, dysplázie a neoplázie (34). Tento proces je na molekulární úrovni doprovázen celou paletou genových i chromozomálních mutací (Kapitola 1.1 oddíl *Mutace podle úrovně změny genetického kódu*). Některé z faktorů provázejících tuto transformaci jsou pro více nádorů GIT společné. Jako příklad je možno uvést mutace vzniklé působením oxidativního a nitrosativního stresu (Kapitola 1.2. oddíly *Deaminace* a *Oxidace*) v důsledku působení žaludečních kyselin a žlučových solí uvolňovaných během zánětlivých procesů v jícnu a žaludku. Účinek reaktivních dusíkatých a kyslíkatých látek (**reactive nitrogen/oxygen species, RNS/ROS**) vede ke vzniku G:C → A:T mutací, které jsou častým důvodem inaktivace významných tumor supresorů (např. *TP53* nebo *APC*) (35). Tento mutační typ vzniká i v důsledku indukované alkylace, ke které dochází především působením nitrosaminů uvolňovaných za vysokých teplot při zpracování masa konzervovaného s použitím nitritových a nitrátových solí (Kapitola 1.2 oddíl *Alkylace*). G:C → A:T mutace genu *APC*, zapříčiňují poruchy Wnt-signální dráhy, vedou ke hromadění β-cateninu v cytoplazmě, což, mimo jiné, způsobuje poruchy systému kontaktní inhibice vedoucí k formaci polypózních makroskopických struktur typických pro tumory žaludku, tlustého střeva a konečníku (36, 37).

Stejně jako u ostatních solidních nádorů se na vzniku a rozvoji maligního onemocnění GIT nejvýznamnější mírou podílejí poruchy systému oprav náhodných chyb v DNA a s tím související patogenní inaktivace tumor supresorových genů. Jedná se zejména o tři prominentní dráhy - tzv. mikrosatelitovou nestabilitu (microsatellite instability, MSI), chromozomální nestabilitu (chromosomal instability, CIN) a o poruchy regulačních mechanismů na bázi DNA metylací (CpG island methylator phenotype, CIMP). Přestože konečným následkem těchto cest je především akumulace somatických poruch zahrnujících především bodové mutace, historicky se o CIN a MSI hovoří jako o mutátorových drahách, zatímco o CIMP jako o dráze methylátorové.

Mikrosatelitová nestabilita je typický projevem nefunkčnosti jednoho ze základních systémů zajišťujícího opravy poruch náhodně vzniklých při DNA replikaci (38). Tento opravný systém, nazývaný **mismatch repair system (MMR)**, je zajišťován několika tzv.

mutátorovými geny, mezi které patří především *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*. Dysfunkce některého z mutátorových genů má za následek kumulaci somatických poruch v dělicích se buňkách. Nejsnadněji je neschopnost oprav DNA poruch zjistitelná v oblastech DNA sekvencí s častým periodickým opakováním mikrosatelitů, které jsou při DNA replikaci ke vzniku náhodných chyb velmi náchylné. MSI se vyšetřuje sledováním uniformity délky několika takových úseků najednou a je přítomna, pokud jsou ve vyšetřované tkáni nalezeny úseky nestejně dlouhé (mají vzájemné odchylky v počtu opakování). MSI tedy není příčinou maligních procesů, ale jejich vedlejším produktem.

Chromozomální nestabilita, je charakterizována delecí úseků nebo celých částí chromozomů, při které dochází ke ztrátě funkce genů, které v daném úseku leží. Pokud není taková ztráta dostatečně kompenzována funkcí druhé alely daného genu (například v důsledku její deaktivující mutace), způsobí to vyřazení proteinů vyráběných na základě genů deletovaného úseku. V případě např., že dojde k mutaci jedné alely, zajišťuje funkci tumor supresoru pouze druhá, funkční alela – tzn. gen je v heterozygotním stavu. Nyní velmi často, v důsledku snahy buněčných systémů o opravu mutované alely mechanismem tzv. mitotické rekombinace (39), dochází ke ztrátě funkční nemutované alely (40). Tento jev se nazývá ztráta heterozygotity (loss of heterozygosity, LOH) (41) a uvedený příklad mutace následované LOH je klasickým tzv. Knudsonovým mechanismem inaktivace tumor supresorových genů v maligních buňkách (42). U většiny gastrointestinálních nádorů bývají takto vyřazeny tumor supresory *TP53* a *APC*, pro karcinom jícnu je navíc specifické vyřazení tumor supresoru *CDKN2A/p16*, u nádorů žaludku je to tumor supresor *ARID1A* a u pankreatických nádorů *SMAD4*.

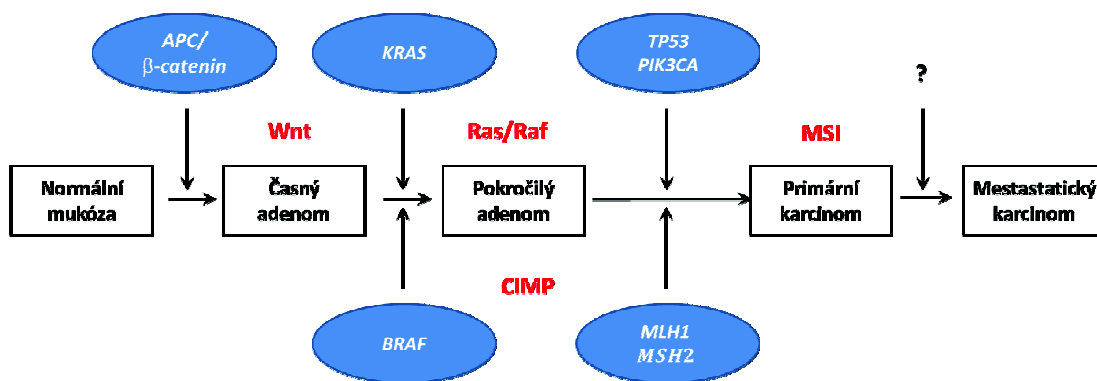
Poslední z drah vede k tzv. CIMP-methylátorovému fenotypu (CpG island methylator phenotype), který je charakterizován poruchami na bázi DNA metylace. Jeho projevem je potlačení tumor supresorových genů v důsledku nadměrné metylace jejich promotorů (43). Hypermethylace promotorových oblastí tak představuje epigenetickou (mimo-genetickou) alternativu k výše uvedeným mechanismům deaktivace tumor supresorů bodovou mutací / LOH. Geny, které mohou být „umlčeny“ v důsledku DNA metylace, jsou často součástí významných buněčných systémů. Mezi nejdůležitější patří metylace genů účastnících se systémů DNA oprav (např. *MLH1*, *MGMT*), kontroly buněčného cyklu (*P16*), buněčné adheze a migrace (*CDH1*, *TIMP3*), kontaktní inhibice (*APC*, β -catenin) a další.

1.5 Molekulární modely vzniku a progresu nádorů GIT

Poruchy receptorů růstových faktorů, chromozomální či mikrosatelitová nestabilita jsou pozorovány u celé řady nádorů zažívacího traktu. Naopak jiné dráhy, např. inaktivace tumor supresoru *CDH1* provázející vznik difúzního typu nádoru žaludku, nebo metylační inaktivace tzv. mismatch-repair genů v kombinaci s mutací (proto)onkogeny *BRAF* u pilovitých adenomů proximálního tračníku lze považovat za orgánově specifické.

Kolorektální karcinom (Vogelsteinův model)

V roce 1990, Fearon a Vogelstein prezentovali důkazy o několikastupňovém procesu formace kolorektálního karcinomu z benigní tkáně adenomových polypů provázeném přítomností somatických mutací několika specifických (proto)onkogenů a tumor supresorových genů. (44), 45). Tento převratný první model karcinogeneze u solidního nádoru je založen na sekvenční akumulaci, při které k některým mutacím dochází včasné a k jiným v pozdější fázi transformace (Obrázek 2). Geny, které jsou na počátku této dráhy, jsou tumor supresorový gen *APC* a (proto)onkogen *KRAS*. Tumor supresor *APC* kóduje protein s funkcí buněčné adheze a bývá mutován u téměř poloviny sporadických nádorů kolorekta.



Obrázek 2: Molekulární model sekvence kolorektální adenom – karcinom (Vogelsteinův model)

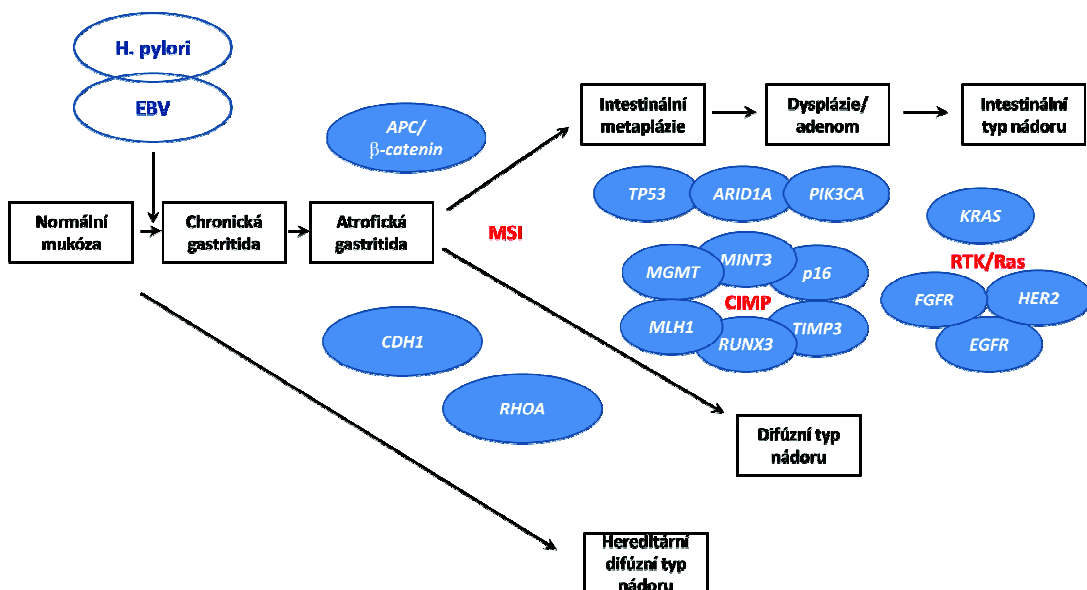
Mutace (proto)onkogeny *KRAS*, jehož produkt se účastní intracelulární signalizace, jsou detekovány u 40 - 60% sporadických kolorektálních karcinomů (46). Dalším typickým projevem v pozdní fázi vývoje jsou delece na chromozómu 18q v oblasti genu *DCC* (Deleted in Colorectal Carcinoma). Konečně posledním z genů mutujících dle

Vogelsteinova modelu je již zmíněný tumor supresor *TP53*, který kóduje transkripční faktor mající zásadní funkci při regulaci buněčného cyklu a jehož mutace jsou u kolorektálního karcinomu nalézány u 30 – 50% podle typu a pokročilosti nádoru.

Původně byl model založen na mutátorové cestě vykazující chromozomální nestabilitu v důsledku mutací tumor supresorových genů charakteristickou pro přerod tradičních tubulárních a tubulovilózních adenomových polypů v karcinomy. Následně byl aktualizován a rozšířen o alternativní, metylátorovou cestu, která se vyznačuje epigenetickou inaktivací systému DNA oprav a je typická především pro maligní konverzi nádorů pravého tračnicku z pilovitých adenomů (47). U obou typů karcinomu lze nalézt mikrosatelitovou nestabilitu, u lezí vznikajících na podkladu metylačního modelu se vyskytují mutace *BRAF*, které jsou exkluzivní k mutacím *KRAS* provázejících tradiční cestu adenom-karcinom. Přesné molekulární mechanismy stojící za metastatickým potenciálem onemocnění nejsou dosud známy.

Karcinomu žaludku (IMP model)

Molekulární model patogeneze karcinomu žaludku popisuje přerod žaludeční tkáně v různé nádorové podtypy s mezistupni chronické atrofické gastritidy a intestinální metaplázie (IMP) (48, 49), Obrázek 3.

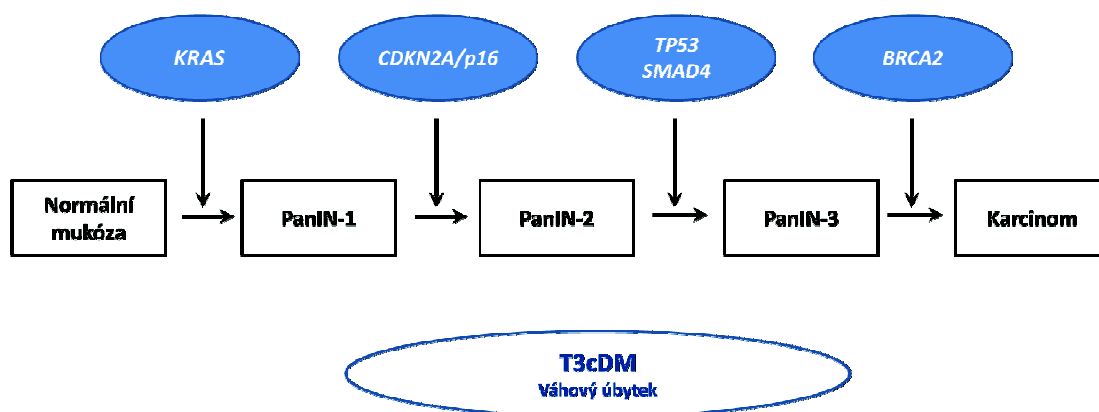


Obrázek 3: Molekulární model iniciace a progresu karcinomu žaludku (IMP model)

Specifickým spouštěcím či současně přítomným faktorem je zde infekce bakterií *Helicobacter pylori*, která se podílí na vzniku chronické gastritidy (50) a infekce virem Epstein-Barrové (EBV), který je zodpovědný za zvýšenou hladinu antiapoptotického proteinu Bcl-2 (51). Vzhledem k vysoké prevalenci obou patogenů ve zdravé populaci je však zřejmá role dalších faktorů pro vývoj tohoto onemocnění. Jedná se především o indukované mutace receptorových tyrozin-kináz (RTK) v kombinaci s mechanismy chromozomální a mikrosatelitní nestability provázející metaplázii intestinálního typu s obdobnými molekulárními pochody jako u výše popsaného kolorektálního karcinomu. Naopak pro vznik difúzního typu karcinomu žaludku jsou charakteristické poruchy systému buněčné adheze, invaze a metastazování. Jedná se především o mutace genu *CDH1*, které jsou zachyceny u cca 20% sporadických difúzních karcinomů žaludku, a nově objevené mutace genu *RHOA*, taktéž s frekvencí cca 20% (52).

Karcinomu pankreatu (PanIN model)

Molekulární model nejčastější formy, duktálního adenokarcinomu pankreatu, popisuje morfologické a molekulární transformace z prekursorového stádia tzv. pankreatické intraepiteliální neoplázie (PanIN) v invazivní karcinom (53,54), Obrázek 4. Stupně označované jako 1A, 1B, 2 a 3 jsou charakterizovány rostoucí cytologickou atypii provázenou ztrátou polarity, jaderným shlukováním a u které bývá patrna pseudostratifikace a hyperchromazie jader. Každá z PanIN etap se vyznačuje molekulárními procesy postihujícími specifické signální dráhy.



Obrázek 4: Molekulární patogeneze karcinomu pankreatu (PanIN model)

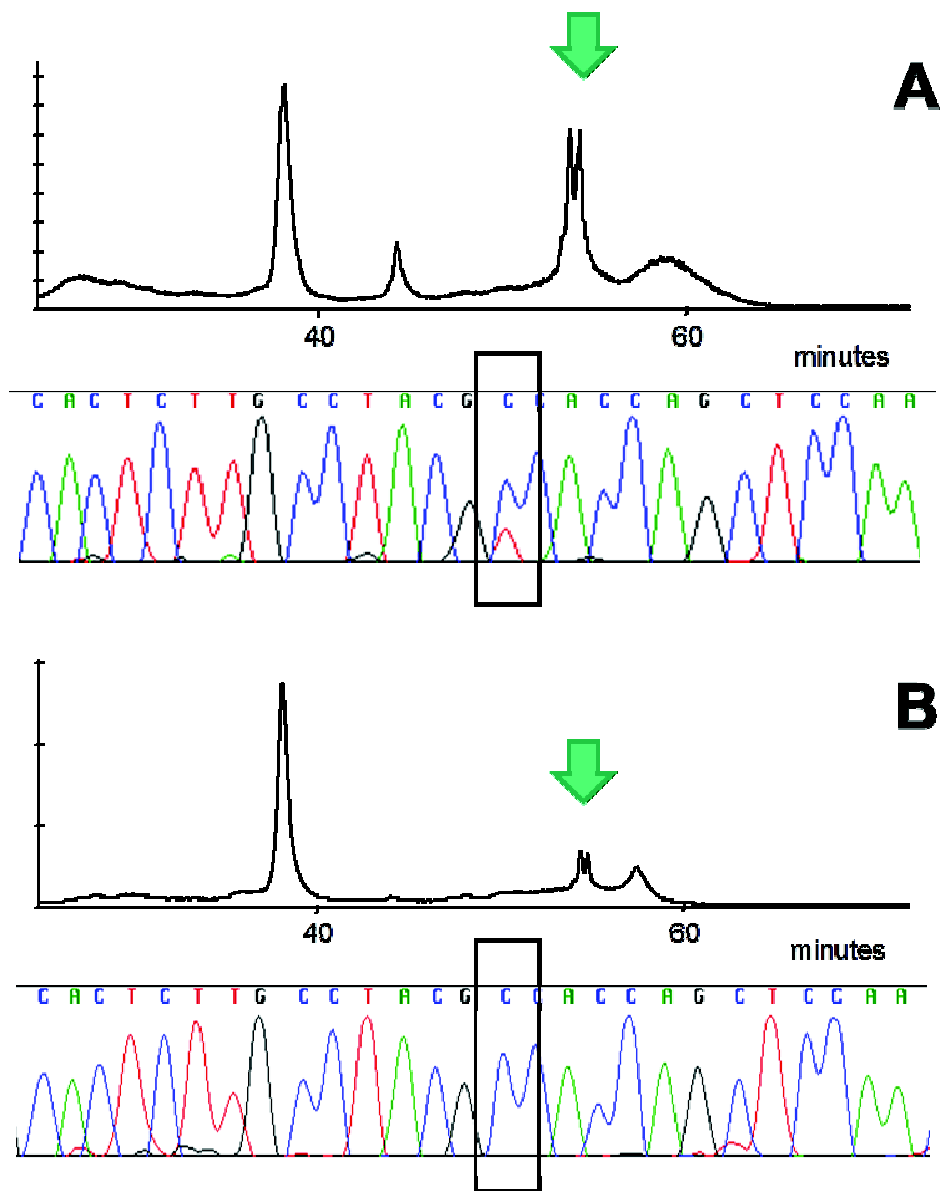
Nejvýznamnější signální dráhou je signalizace RAS/RAF/MAPK dráha, která je u karcinomu pankreatu aktivována v téměř 90% případů, především v důsledku přítomnosti onkogenní mutace genu *KRAS* (55). Aktivovaná forma *KRAS* působí kromě MAPK i na další signální dráhy, které mají význam v karcinogenezi napříč solidními nádory. Je to například dráha PI3K/AKT, která je zodpovědná za inhibici systému kontrolované buněčné smrti (apoptózy) (56). Průvodním jevem pankreatické karcinogeze bývá specifický podtyp diabetu mellitu – T3c, který je častý u chronické pankreatitidy (až 75%), projevuje se pozdním nástupem, inzulinovou rezistencí a váhovým úbytkem (57-59).

2. Výsledky

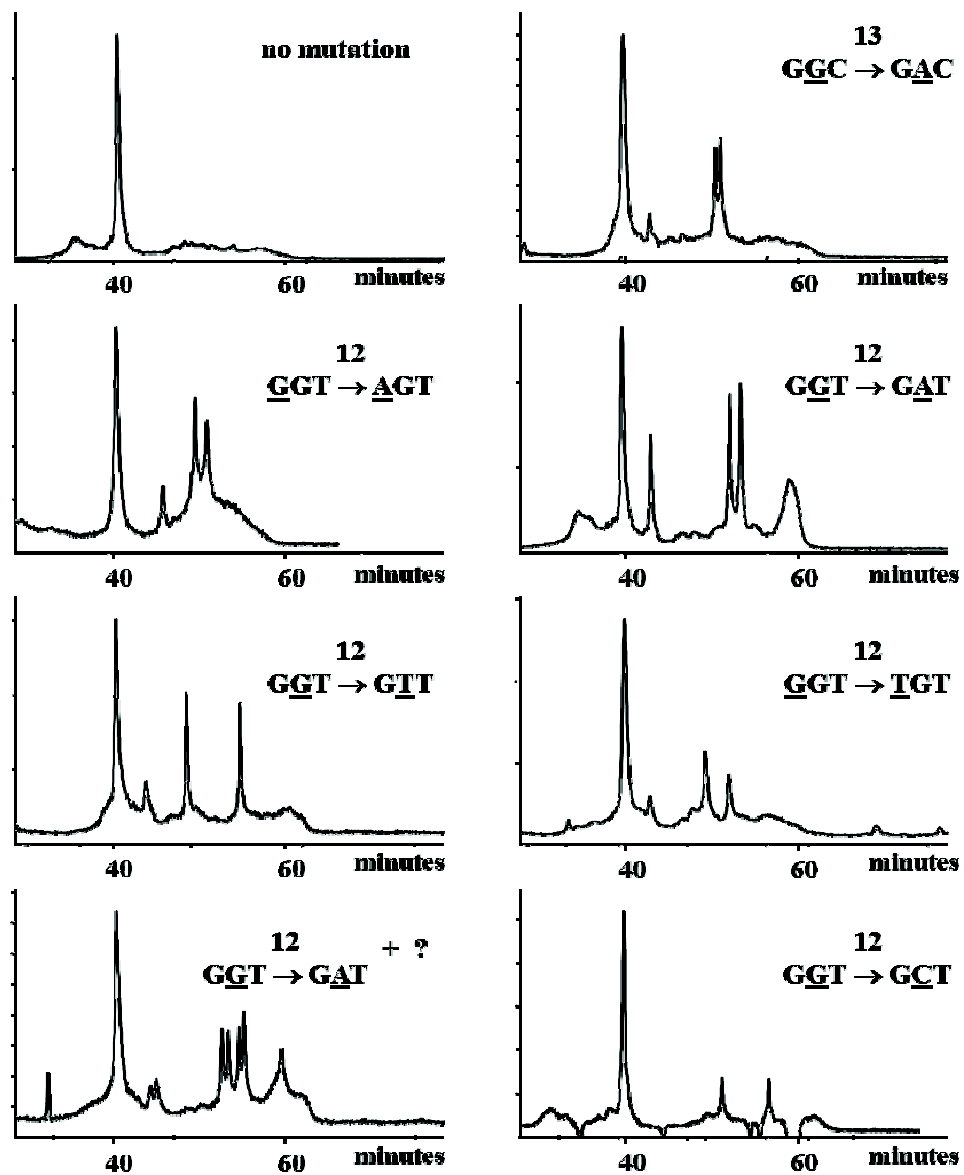
2.1 Profilování mutací významných řídicích genů u kolorektálních adenomů a karcinomů

Komentář k práci: Minarik M, Minarikova L, Hrabikova M, Minarikova P, Hrabal P, Zavoral M. Application of cycling gradient capillary electrophoresis to detection of APC, K-ras, and DCC point mutations in patients with sporadic colorectal tumors. Electrophoresis, 2004, 25, 1016-1021.

V této práci bylo poprvé představeno rutinní použití nové technologie pro vyšetřování somatických mutací ve tkáních kolorektálních tumorů získaných metodou endoskopické polypektomie (adenomy) nebo endoskopické biopsie (karcinomy). Jedná se o metodu PCR amplifikace cílových úseků DNA obsahujících místa s častým výskytem mutací (hotspoty) a jejich následnou analýzu pomocí kapilární elektroforézy za podmínek částečné denaturace. Tato metoda je dnes univerzálně označována termínem denaturační kapilární elektroforéza (denaturing capillary electrophoresis, DCE) a jsou při ní fragmenty obsahující mutaci elektroelektroforeticky odděleny od fragmentů, které mutaci neobsahují. V uvedeném článku byla metoda ověřena na 47 vzorcích tkání. U všech vzorků byly vyšetřovány mutační hotspoty třech významných genů popisovaných ve Vogelsteinově modelu kolorektální progresy (Kapitola 1.5 oddíl *Kolorektální karcinom - Vogelsteinův model*), tedy *APC*, *KRAS* a *TP53*. Navíc bylo provedeno testování přítomnosti dvou specifických mutací genu *DCC* (deleted in colorectal cancer) v oblastech exonu 28 a intronu 14, které byly v době studie hojně citovány v literatuře (60). Součástí studie bylo i provedení odhadu analytické citlivosti metody (Kapitola 1.1 oddíl *Mutace podle původu*). Bylo zjištěno, že metodu lze využít i v situaci, kdy klasické sekvenování (zlatý standard) již neposkytuje dostatečnou citlivost. Efekt je demonstrován na Obrázku 5, kde jsou srovnány výsledky vyšetření vzorků s vysokým zastoupením mutace (A) a s nízkým zastoupením mutace (B) metodami DCE a klasickým sekvenováním. Je zřejmé, že zatímco vyšší zastoupení mutace lze zachytit oběma metodami, u nízkého zastoupení mutace není tato mutace v sekvenačním záznamu zjistitelná, zatímco DCE zřetelně vykazuje příslušný pík pro mutantní fragment (označený šipkou). Dále bylo demonstrováno, že metoda je univerzálně použitelná pro různé typy mutací vyskytujících se na daném místě. Na Obrázku 6 je ukázán výsledek vyšetření různých typů mutantů (proto)onkogenu *KRAS*.



Obrázek 5: Detekce mutace metodou DCE (horní záznam) a metodou klasického sekvenování (dolní záznam) u vzorku vykazujícího vysoké zastoupení mutovaných DNA alel (A) a u vzorku s nízkým zastoupením (B)

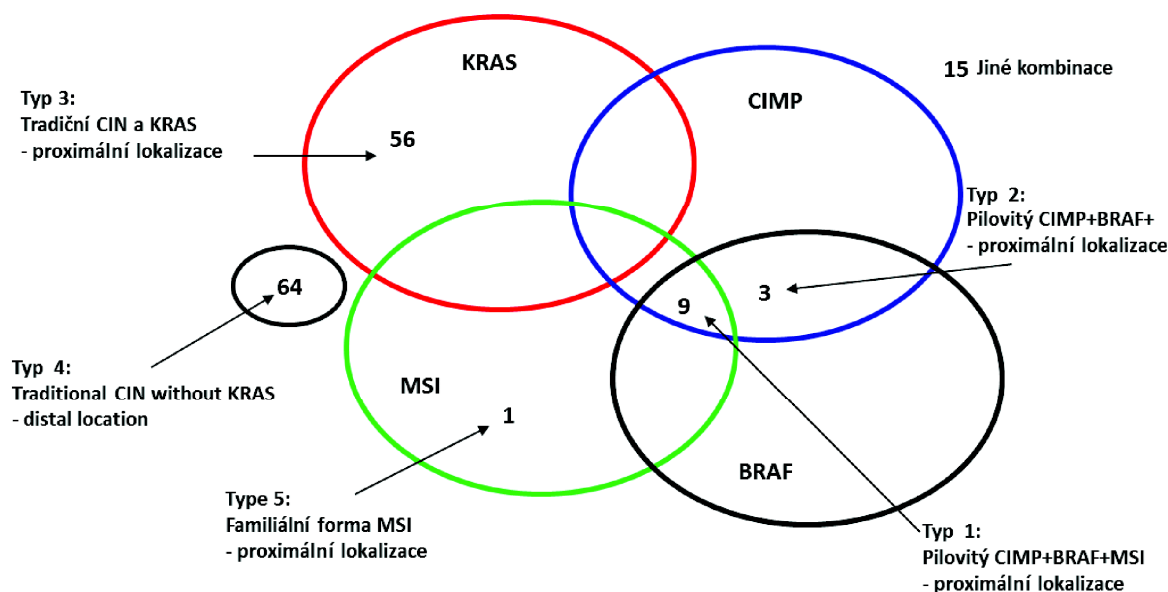


Obrázek 6: Detekce různých mutačních typů genu *KRAS* (exon 1, kodony 12 a 13) metodou DCE (denaturační kaplární elektroforézy)

2.2 Detailní profilování (molekulární fenotypizace) kolorektálních lézí vzhledem k jejich lokalizaci a stupni progresu

Komentář k práci: Minarikova P, Benesova L, Halkova T, Belsanova B, Suchanek S, Cyrany J, Tuckova I, Bures J, Zavoral M, Minarik M. Longitudinal molecular characterization of endoscopic specimens from colorectal lesions. World J Gastroenterol. 2016, 22, 4936-4945.

V této publikaci byla popsána komplexní molekulární charakterizace kolorektálních lézí. Obdobně jako u předchozí práce byly pro vyšetření využity vzorky tkání získávané při kolonoskopickém vyšetření (biopsie a polypektomie). Panel vyšetřovaných markerů byl významně rozšířen tak, aby pokrýval všechny v současné době známé cesty karcinogeneze. Vyšetřovány byly somatické mutace genů *APC*, *KRAS*, *BRAF* a *TP53*, dále bylo prováděno vyšetřování mikrosatelitové nestability (MSI) a metylačního fenotypu (CIMP). Takto bylo profilováno celkem 94 adenomů a 127 karcinomů. Na základě provedených vyšetření byly všechny léze stratifikovány do nově definovaných tzv. molekulární CRC typů (Typ 1 – 5) (61). U karcinomů má toto nové dělení dle recentní literatury význam při odhadu prognózy přežití pacientů (62). Obrázku 7 je vyobrazeno zastoupení jednotlivých molekulárních typů karcinomů získaných v této studii. U vyšetřovaných molekulárních markerů byl sledován jejich výskyt vzhledem k lokalizaci proximálního vs. distálního tračníku či rekta. Byl potvrzen významný výskyt rizikového Typu 3 v pravém tračníku. Tento typ, který vzniká na podkladě pilovitých adenomů, se vyznačuje CIMP-fenotypem a současnou přítomností mutace (proto)onkogenu *BRAF*.

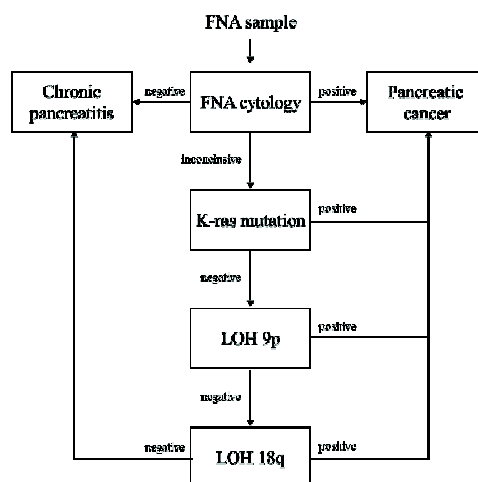


Obrázek 7: Zastoupení jednotlivých molekulárních typů CRC karcinomů vyšetřených ve studii.

2.3 Vyšetřování vybraných somatických mutací z tenkojehlových biopsí za účelem rozlišení chronické pankreatitidy a karcinomu pankreatu

Komentář k práci: B. Salek, C., Benesova, L., Zavoral, M., Nosek, V., Kasperova, L., Ryska, M., Strnad, R., Traboulsi, E., Minarik M. Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer, World J. Gastroenterol. 2007, 21, 3714-3420.

Tato práce pojednává o využití molekulárních markerů pro zpřesnění diagnostiky pankreatických lézí, především jako pomocných nástrojů rozlišení chronické pankreatitidy (ChP) a karcinomu pankreatu (KP). Vzorky ke genetickému vyšetřování byly získávány ve formě ultrazvukem-navigovaných tenkojehlových aspiračních biopsí (endoscopic ultrasound guided-fine needle aspiration, EUS-FNA), které byly ihned na endoskopickém sále zpracovávány ve formátu cytologických skel a následně hodnoceny cytologem. Ten také provedl vyznačení oblastí s nejvyšším zastoupením suspektních buněk za účelem jejich genetického vyšetření. Pro takto připravené preparáty bylo nejprve nutné vyvinout metodu účinné extrakce DNA. Následně byla v souladu s molekulárním modelem vývoje vedoucího přes mezistádia pankreatické intraepiteliální neoplázie (PanIN) k invazivnímu karcinomu vyšetření zaměřena na nejčastější mutace provázející tuto maligní transformaci. Jednalo se o bodové mutace genů *KRAS*, *TP53* a *CDKN2A/p16*. Navíc bylo provedeno testování ztráty heterozygosity (LOH) na lokusech tumor supresorových genů *CDKN2A/p16* (lokus 9p) a genu *DPC4* (lokus 18q). Vyšetřovaný soubor 101 pacientů čítal 81 následně vyhodnocených s karcinomem pankreatu a 20 s chronickou pankreatitidou. Četnosti jednotlivých poruch byly ve shodě s literaturou. Nejčastěji nalézanými poruchami byly alelické ztráty 9p (85% u KP, 36% u Chp) a bodové mutace (proto)onkogenu *KRAS* (70% u KP, 0% u Chp). Na základě získaných dat byl sestaven algoritmus využívající molekulární markery jako nadstavbu standardního cytologického vyšetření (Obrázek 8). Ukázalo se, že informace získaná z vyšetření molekulárních markerů má význam především u vzorků vyhodnocených cytologem jako inkonkluzivní (26%). Přidáním molekulárních markerů do diagnostického procesu v předkládané studii mělo za následek kompletní eliminaci těchto inkonkluzivních výsledků.



Obrázek 8: Algoritmus využití molekulárních markerů *KRAS*, 9p a 18q jako nadstavby cytologickému hodnocení EUS-FNA vzorků pankreatických lézí

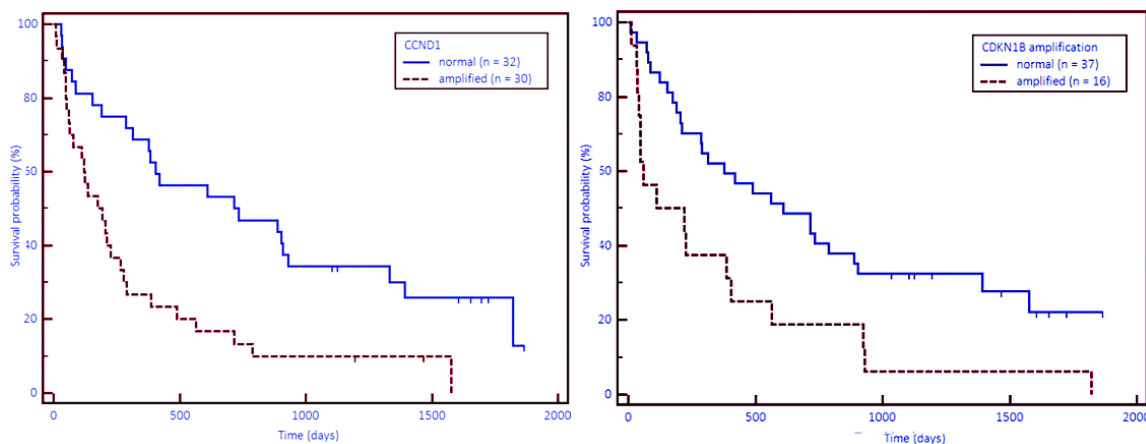
2.4 Profilování panelu somatických mutací a genových amplifikací u karcinomu žaludku

Komentář k práci: Minarikova P, Benesova L, Halkova T, Belsanova B, Tuckova I, Belina F, Dusek L, Zavoral M, Minarik M. Prognostic Importance of Cell Cycle Regulators Cyclin D1 (CCND1) and Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B (CDKN1B/p27) in Sporadic Gastric Cancers. Gastroenterol Res Pract. 2016,2016,9408190.

Cílem této práce bylo nalezení potenciálních prognostických markerů pro odhad přežití pacientů s pokročilým karcinomem žaludku. I v tomto případě byly vyšetřované tkáňové preparáty převážně pocházející z endoskopických biopsií, v menší míře potom z resekátů u pacientů podstupujících chirurgickou léčbu. Celkem bylo vyšetřeno 71 vzorků.

Vyšetřovaný panel vycházel z molekulárního modelu progresu karcinomu žaludku (Kapitola 1.5 oddíl *Karcinom žaludku – IMP model*), který zahrnuje příspěvky několika signálních drah. Vyšetřovány tak byly genové amplifikace celkem 71 genů účastnících se karcinogeneze solidních nádorů včetně genu *ERBB2/HER2*, jehož negativní prognostická role je již známa. Na základě multifaktoriální analýzy byla odhalena statistická významnost u dvou hlavních regulátorů buněčného cyklu – u cyklinu D1 (*CCND1*) a u genu p27 neboli cyklin-dependentního kinázového inhibitoru 1B

(*CDKN1B/p27*). V obou případech korelovala genová amplifikace s téměř 4-násobným zkrácením mediánu přežití pacientů. U amplifikovaného genu *CCND1* to bylo zkrácení ze 725 dní na 192 ($P = 0.0012$), u *CDKN1B* zkrácení ze 611 dní na 165 ($P = 0.0098$). Na Obrázku 9 jsou odpovídající Kaplan-Meierovy křivky přežití pro oba zmíněné markery.



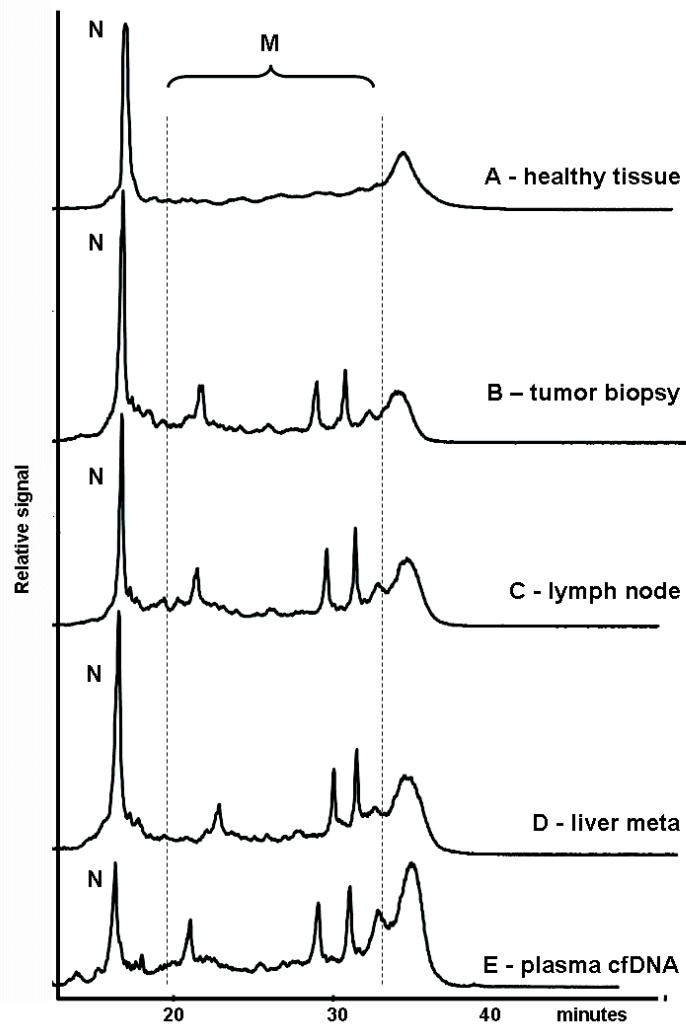
Obrázek 9: Kaplan-Meierovy křivky přežití pacientů podle přítomnosti genové amplifikace v nádoru

2.5 Představení citlivé metodiky pro vyšetřování somatických mutací z cirkulující nádorové DNA (metodika tekuté biopsie) u onkologických pacientů.

Komentář k práci: Benesova L, Belsanova B, Minarikova P, Suchanek S, Kopeckova M, Levy M, Lipska L, Visokai V, Zavoral M, Minarik M. Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. Anal Biochem 2013, 433:227-34.

Jedná se o přehledový článek s prezentací vlastních dat. Centrálním tématem je vyšetřování volné nádorové DNA (ctDNA) v periferním oběhu na základě citlivé detekce mutací, které se vyskytují pouze v nádoru a nevyskytují se v jiných tělních buňkách. Na rozdíl od předchozích přístupů, kdy byly sledovány hladiny celkové volné DNA (cell-free DNA) charakterizované krátkou délkou fragmentů je detekce zaměřena na nádorové mutace specifitější. V článku jsou popsány základní principy uvolňování ctDNA v důsledku apoptózy a nekrózy s následnou fragmentací uvolněné DNA na krátké úseky působením makrofágů. V práci jsou dále představeny současné technologie používané pro detekci ctDNA, jedná se především o metody založené na digitální PCR (droplet-digital PCR, ddPCR), technologie obohacení mutantů a hluboké sekvenování nové

generace (deep next-generation sequencing, NGS). Také je zde ilustrováno využití již dříve zmíněné metody DCE (denaturační kapilární elektroforézy) pro detekci somatických mutací ctDNA a současně srovnání ctDNA mutační analýzy s výsledkem vyšetření tkání primárního nádoru, lokální uzliny a vzdálené metastázy (viz Obrázek 10).

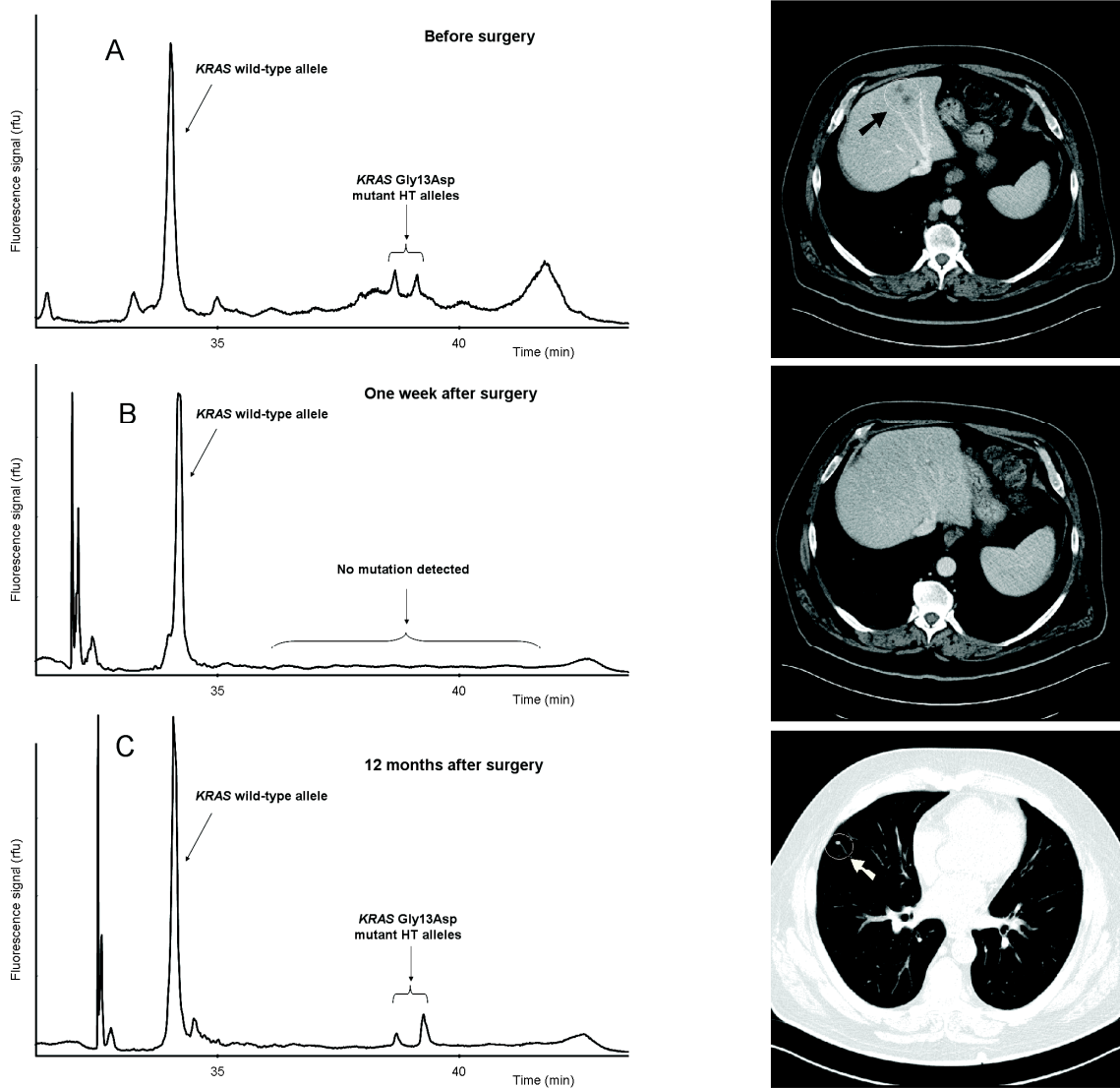


Obrázek 10: Výsledky vyšetřování přítomnosti DNA mutace (*KRAS* exon 2) metodou denaturační kapilární elektroforézy (DCE) v různých typech vzorků získaných od pacientů s generalizovaným kolorektálním karcinomem. Zdravá tkáň (A), biopsie z primárního nádoru (B), resekovaná lymfatická uzlina (C), jaterní metastáza (D) krevní plazma (E).

2.6 Vyšetřování somatických mutací cirkulující nádorové DNA v pooperačním sledování pacientů léčených pro metastatický karcinom tlustého střeva a konečníku.

Komentář k práci: Levy M, Benesova L, Lipska L, Belsanova B, Minarikova P, Veprekova G, Zavoral M, Minarik M. Utility of Cell-free Tumour DNA for Post-surgical Follow-up of Colorectal Cancer Patients. Anticancer Res. 2012, 32, 1621-1626.

Tato práce demonstruje klinické využití metodiky detekce a sledování hladin ctDNA na základě detekce nádorově-specifické somatické mutace ve tkáni nádoru a následně zachytu této mutace v periferním oběhu u 7mi pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem. Jednalo se převážně o pacienty, kteří podstupovali chirurgickou a onkologickou léčbu jaterních metastáz. Náběry nesrážlivé krve byly prováděny jedenkrát v období před- a následně opakovaně po- absolvování léčby. V případě chirurgického výkonu dynamika změn hladin ctDNA vždy korelovala se stupněm radikality tzn. ctDNA iniciálně zcela vymizela u případů dosažení R0 radikality, kdy se jednalo např. o *en bloc* resekci, jednodobou resekci primárního nádoru a jaterní metastázy nebo o totální resekci rekta. Naopak hladiny ctDNA zůstávaly detekovatelné (s případným přechodným snížením) v pooperační době u resekci R2. U pacientů následně léčených režimy biologické paliativní léčby byla v dynamice ctDNA pozorovatelná okamžitá odpověď na léčbu ve smyslu snížení při remisi nebo přetrvávání, případně zvýšení hladin při následné další progresi onemocnění. Patrně nejlépe byla klinická použitelnost tohoto přístupu využita u pacienta, u kterého byla v průběhu pooperačního sledování zachycena další progresse onemocnění. Případ je ilustrován na Obrázku 11, kde je zdokumentován stav pacienta před resekci jaterní metastázy s nálezem přítomnosti ctDNA (A), týden po úspěšné R0 resekci bez přítomnosti ctDNA (B) a s ročním odstupem od operace, kdy byla nově zachycena ctDNA a následné CT vyšetření odhalilo nové metastatické ložisko, tentokrát v pravém horním plicním laloku. (C). Jednalo se o totožnou mutaci (*KRAS Gly13Asp*), která byla detekována v nádorové tkáni i v původním jaterním metastatickém ložisku.



Obrázek 11: Detekce volné ctDNA v průběhu léčby a sledování u pacienta s metastatickým kolorektálním karcinomem. Vyšetření před jaterní resekcí (A), krátce po resekcí (B) a s ročním odstupem od operace (C)

3 Diskuse

Výše uvedené výsledky dávají ucelený přehled o možnostech klinického využití detekce somatických mutací u téměř všech gastrointestinálních nádorů. Přítomnost charakteristických nádorově-specifických mutací byla využita k molekulárnímu profilování (subtypování) kolorektálních adenomů a karcinomů, detekce poruch pro zlepšení diagnostiky karcinomu pankreatu, odhadu prognózy přežití u karcinomu žaludku a pro monitorování nemoci v pooperačním sledování pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem.

Velmi důležitým faktorem pro úspěšnost molekulárních vyšetření jsou procesy a metody v preklinické fázi. Především jde o způsoby odběru, fixace či stabilizace preparátů a následného skladování a transportu do laboratoře. Uvedené výsledky popisují vyšetřování celého spektra typů vzorků zahrnující čerstvě zmražené nativní tkáň z aspirátů, biopsií či resekátů, fixované parafínové bločky, cytologická skla a periferní nesrážlivou krev (pro izolaci krevní plazmy).

Zcela zásadní je potom volba laboratorních postupů a metodiky detekce mutací. Ve všech výše popsaných případech byla pro detekci somatických bodových mutací používána metoda založená na PCR amplifikaci sledovaných úseků s následnou analýzou pomocí denaturační kapilární elektroforézy. Jak bylo demonstrováno, tato metoda vykazuje vysokou analytickou citlivost na úrovni 1% mutantních DNA fragmentů. To umožňuje nejen spolehlivou detekci mutací v nádorové tkáni, ale i záchyt ctDNA v krvi vybraných pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem. Současně tato metoda umožňuje záchyt všech typů mutace v daném úseku, což může mít v budoucnu zásadní význam v případě různých klinických dopadů pro různé typy mutací tak, jak to bylo prokázáno např. u nemalobuněčného karcinomu plic (63).

Z hlediska přínosu pro klinickou praxi je významný výsledek vyšetřování somatických mutací v cytologických preparátech pro zpřesnění EUS-FNA diagnostiky pankreatických lézí. Vysoká citovanost této původní práce důležitost naznačeného postupu jenom potvrzuje. Značný potenciál má i zjištění prognostické významnosti genové amplifikace cyklinu D1 (*CCND1*) a cyklin-dependentního kinázového inhibitoru 1B (*CDKN1B*) u pokročilých forem karcinomu žaludku. Souvislost této aberace dosud nebyla v literatuře popsána a na jejím základě lze očekávat další výzkum zaměřený na tyto (a s nimi bezprostředně související) geny ať již jako potenciálních biomarkerů nebo potenciálních terapeutických cílů. V případě posledního tématu, vyšetřování ctDNA v periferním oběhu, byla základní metody akreditována a lze již v současnosti hovořit o

zavádění do klinické praxe jako pomocného minimálně invazivního nástroje sledování pacientů s metastatickým onemocněním.

4 Závěr

Vyšetřování somatických mutací se v průběhu posledních 10ti let stalo zcela neodmyslitelnou součástí diagnostiky a léčby gastrointestinálních nádorů. Detekce specifických poruch umožňuje zpřesnění iniciální diagnostiky a stává se významným komplementem standardních postupů morfologického vyšetřování. Na základě molekulárního rozboru lze již dnes lépe porozumět pozadí vzniku a vývoje nádoru a provést odhad jeho biologického chování. Identifikace řídicích mutací významně přispívá ke stanovení rizika a odhadu prognózy pacientů a predikce odpovědi v případě nasazení cílené biologické léčby. Získané informace tak pomáhají při racionálními rozhodování o dalším léčebném postupu.

Zcela nové možnosti se otevírají v oblasti minimálně-invazivního vyšetřování ctDNA v krevním oběhu pacientů a to jednak pro zjištění aktuálního stavu přítomnosti prediktivních mutací v nádoru i pro okamžité vyhodnocení terapeutického účinku v průběhu léčby. Nárůst hladin ctDNA též umožňuje časný záchyt rekurence nebo progresu onemocnění a stává se tak cenným pomocným nástrojem pro dlouhodobé sledování nemocných.

5 Poděkování

Především bych chtěl poděkovat svým rodičům, kteří mi na mé cestě vždy byli zcela zásadní oporou a kteří mi i v nesnadných chvílích dávali a stále dávají svou lásku, porozumění a bezmeznou podporu.

Za to, čeho jsem v posledních letech profesně dosáhl patří velký dík i mé sestře Lucii. Bez její pomoci, smyslu pro preciznost a vysokou profesionalitu by žádný z výsledků diskutovaných v této práci nemohl vzniknout.

Své ženě Petře bych chtěl poděkovat za to, že mne uvedla do lékařského světa, po večerech mi poskytovala rychlokurzy lékařských postupů. Na trase od fyzikální a analytické chemie k onkologii solidních nádorů mi vždy byla průvodcem i navigátorem, v případě nutnosti též semaforem či výstražným znamením.

Dále bych rád vyjádřil díky svým dvěma velkým medicínským vzorům. Tím prvním je Prof. Miloš Pešek, přednosta Kliniky pneumologie a ftizeologie Fakultní nemocnice Plzeň, jehož přátelství si velmi vážím a u něhož stále objevuji a obdivuji neúnavnou snahu zlepšovat tíživé osudy terminálně nemocných i jeho nezměrnou energii při hledání nových podnětů a témat pro náš společný klinický výzkum. Druhý dík patří přednostovi Interní kliniky Ústřední vojenské nemocnice v Praze Prof. Miroslavu Zavoralovi, za to, že mne během našich inspirativních rozhovorů (často i vzrušených diskusí), kromě jiného, naučil dívat se na svět medicíny mimo optiku akademické odbornosti či technologické výjimečnosti, ale především z pohledu klinické využitelnosti a smysluplnosti pro pacienty v rutinní praxi.

Mé díky patří i všem mým studentům, současným i bývalým, lékařům i přírodovědcům.

Na závěr bych chtěl poděkovat lidem, jejichž blízkost a přátelství tak často nedoceňuji - Báře, Honzovi, Pavlíně, Danovi, Standovi, Michalovi a Petře ...

... a těm dvěma nejúžasnějším na světě - mým skvělým dětem Natálce a Martinovi, kteří jsou mi v životě neustálou pozitivní inspirací.

6 Seznam obrázků

Obrázek 1:	
Mutační spektra (proto)onkogenů (KRAS a BRAF) a tumor supresorů (APC a TP53)	11
Obrázek 2:	
Molekulární model sekvence kolorektální adenom – karcinom (Vogelsteinův model)	15
Obrázek 3:	
Molekulární model iniciace a progresu karcinomu žaludku (IMP model)	16
Obrázek 4:	
Molekulární patogeneze karcinomu pankreatu (PanIN model)	17
Obrázek 5:	
Detekce mutace metodou DCE (horní záznam) a metodou klasického sekvenování (dolní záznam) u vzorku vykazujícího vysoké zastoupení mutovaných DNA alel (A) a u vzorku s nízkým zastoupením (B).	19
Obrázek 6:	
Detekce různých mutačních typů genu KRAS (exon 1, kodony 12 a 13) metodou DCE	20
Obrázek 7:	
Zastoupení jednotlivých molekulárních typů CRC karcinomů vyšetřených ve studii	21
Obrázek 8:	
Algoritmus využití molekulárních markerů KRAS, 9p a 18q jako nadstavby cytologickému hodnocení EUS-FNA vzorků pankreatických lézí	23
Obrázek 9: Kaplan-Meierovy křivky přežití pacientů podle přítomnosti genové amplifikace	24
Obrázek 10:	
Výsledky vyšetřování přítomnosti DNA mutace (KRAS exon 2) metodou denaturační kapilární elektroforézy (DCE) v různých typech vzorků získaných od pacientů s generalizovaným kolorektálním karcinomem.	25
Obrázek 11:	
Detekce volné ctDNA v průběhu léčby a sledování u pacienta s metastatickým kolorektálním karcinomem. Vyšetření před jaterní resekcí (A), krátce po resekci (B) s ročním odstupem od operace (C)	27

7 Seznam použitých zkratek

CIMP	CpG island methylator phenotype	<i>nepřekládá se</i>
ctDNA	circulating tumor DNA	cirkulující nádorová DNA
DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma	<i>název gen)</i>
DCE	Denaturing capillary electrophoresis	denaturační kapilární elektroforéza
ddPCR	droplet-digital PCR	digitální PCR v emulzních kapkách
deep NGS	deep next-generation sequencing	hluboké sekvenování nové generace
EUS-FNA	endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy	EUS-navigovaná tenkojehlová biopsie
FAP	familial adenomatous polyposis	familální adenomová polypóza
HDGC	hereditary diffuse gastric cancer	hereditární difúzní karcinom žaludku
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer	hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
Chp	Chronic pancreatitis	Chronická pankreatitida
IMP	intestinal metaplasia	intestinální metaplázie
LOH	loss of heterozygosity	ztráta heterozygosity
MCR	mutation cluster region	mutační cluster region
MGMT		O6-methyl-guanin-metyl transferáza
MMR	mismatch repair system	<i>nepřekládá se</i>
MSI	microsatellite instability	mikrosatelitová nestabilita
MSS	microsatellite stability	mikrosatelitová stabilita
OGG1		8-oxoguanine glycosyláza
PanIN	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia	Pankreatická intraepiteliální neoplázie
RNS	reactive nitrogen species	reaktivní dusíkaté látky
ROS	reactive oxygen species	reaktivní kyslíkaté látky
RTK	receptor tyrosin kinase	receptorová tyrozin-kináza
SNV	single-nucleotide variation	bodová mutace

8 Literatura

- 1 Allen GE.,Hugo de Vries and the reception of the “mutation theory” J. Hist. Biol. 1969, 2, 55–87.
- 2 Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaria P, Baltimore D, Darnell J. Molecular Cell Biology. 4th edition, 2000, New York, W. H. Freeman.
- 3 Hamby SE, Thomas NS, Cooper DN, Chuzhanova, A meta-analysis of single base-pair substitutions in translational termination codons ('nonstop' mutations) that cause human inherited disease. N.Hum Genomics, 2011, 5, 241-264.
- 4 Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology. J Mol Diagn. 2017, 19, 187-225.
- 5 Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E, Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis, Science 148 (1965) 374–376.
- 6 Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Sci Transl Med. 2014, 19, 6, 224ra24.
- 7 Zhu J, Strickler JH. Clinical applications of liquid biopsies in gastrointestinal oncology. J Gastrointest Oncol. 2016, 7, 675-686.
- 8 Lennon NJ, Adalsteinsson VA, Gabriel SB. Technological considerations for genome-guided diagnosis and management of cancer. Genome Med. 2016, 26, 112.
- 9 Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schulz RA, Ellenberger T DNA Repair and Mutagenesis, 2016, 2nd edition (ASM Press, Washington, DC).
- 10 Khuu, P., Ho, P. S. A rare nucleotide base tautomer in the structure of an asymmetric DNA junction. Biochemistry 2009, 48, 7824-7832.
- 11 Wood RD, Mitchell M, Sgouros JG, Lindahl T, Human DNA Repair Genes. Science 2001, 291, 1284-1289
- 12 Jones M, Wagner R, Radman M. Mismatch repair of deaminated 5-methyl-cytosine. J Mol Biol. 1987, 194, 155-159.
- 13 Poole A, Penny D, Sjoberg BM. 2001. Confounded cytosine! Tinkering and the evolution of DNA. Nat Rev Mol Cell Biol 2001, 2, 147-151
- 14 Caulfield JL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Nitric oxide-induced deamination of cytosine and guanine in deoxynucleosides and oligonucleotides. J Biol Chem. 1998, 273, 12689-12695.
- 15 Labet V, Grand A, Morell C, Cadet J, Eriksson LA. Mechanism of nitric oxide induced

-
- deamination of cytosine. *Phys Chem Chem Phys*. 2009, 11, 2379-2386.
- 16 Paula Jakszyn, Carlos Alberto González Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence, *World J Gastroenterol*. 2006, 12, 4296–4303.
 - 17 Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010, 49, 1603-1616.
 - 18 Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D'Errico M, Simonelli V, Dogliotti E. 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutat Res*. 2003, 531, 127-139.
 - 19 Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature*. 1978, 274, 775-780.
 - 20 Duncan BK, Miller JH. Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature*. 1980, 287, 560-561.
 - 21 Karran P, Lindahl T. Hypoxanthine in deoxyribonucleic acid: generation by heat-induced hydrolysis of adenine residues and release in free form by a deoxyribonucleic acid glycosylase from calf thymus. *Biochemistry*. 1980, 19, :6005-6011.
 - 22 Loeb LA, Preston BD. Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu Rev Genet*. 1986, 20, 201-230.
 - 23 Kamiya,H., Shimizu,M., Suzuki,M., Inoue,H. and Ohtsuka,E. Mutation induced by deoxyxanthosine in codon 12 of a synthetic c-Ha-ras gene. *Nucleosides Nucleotides*, 1992, 11, 247–260.
 - 24 Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 1998, 148, 1667-1686.
 - 25 Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, Shaffer T, Wong M, Bhattacharjee A, Eichler EE, Bamshad M, Nickerson DA, Shendure J. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes, *Nature*, 2009, 461, 272-276.
 - 26 Alexandrov LB., Signatures of mutational processes in human cancer, *Nature*, 2013, 500, 415–421
 - 27 Matsumoto Y, Nagasaka T, Kambara T, Hoshizima N, Murakami J, Sasamoto H, Hosokawa M, Naomoto Y, Isozaki H, Shimizu K, Tanaka N, Matsubara N. Microsatellite instability and clinicopathological features in esophageal squamous cell cancer. *Oncol Rep*. 2007, 5, 1123-1127.

-
- 28 Zhu L, Li Z, Wang Y, Zhang C, Liu Y, Qu X. Microsatellite instability and survival in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis *Mol Clin Oncol*. 2015, 3, 699–705.
 - 29 Bujanda L, Cosme A, Gil I, Arenas-Mirave JI. Malignant colorectal polyps *World J Gastroenterol*. 2010, 16, 3103–3111.
 - 30 Youn A. et al., Identifying cancer driver genes in tumor genome sequencing studies, *Bioinformatics*, 2011, 15, 27, 175–181.
 - 31 Tokheim CJ, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Karchin R Evaluating the evaluation of cancer driver genes *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016, 113, 14330–14335.
 - 32 Simon A. Forbes, David Beare, Harry Boutselakis et al. COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution *Nucleic Acids Res*. 2017, 4, 45.
 - 33 Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes, *Science*, 2013, 339, 1546-1558
 - 34 Mastrangelo D. *Molecular Models of Cancer Development in Orbital Tumors*, Springer 2016, 1-8.
 - 35 Suehiro Y, Wong CW, Chirieac LR, Kondo Y, Shen L, Webb CR, Chan YW, Chan AS, Chan TL, Wu TT, Rashid A, Hamanaka Y, Hinoda Y, Shannon RL, Wang X, Morris J, Issa JP, Yuen ST, Leung SY, Hamilton SR. Epigenetic-genetic interactions in the APC/WNT, RAS/RAF, and P53 pathways in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008, 14, 2560-2569.
 - 36 Munemitsu S, Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B. and Polakis, P. Regulation of intracellular β -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 3046–3050.
 - 37 Bryan D. White, Andy J. Chien, and David W. Dawson Dysregulation of Wnt/ β -catenin Signaling in Gastrointestinal Cancers *Gastroenterology*. 2012, 142, 219–232.
 - 38 Halling KC et al. Origin of Microsatellite Instability in Gastric Cancer *Am J Pathol*. 1999, 155, 205–211.
 - 39 LaFave MC, Sekelsky J. Mitotic Recombination: Why? When? How? Where? *PLoS Genet*. 2009, 5, e1000411.
 - 40 Daigaku Y, Endo K, Watanabe E, Ono T, Yamamoto K Loss of heterozygosity and DNA damage repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 2004, 556, 183–191.
 - 41 Tischfield JA Loss of heterozygosity or: how I learned to stop worrying and love

-
- mitotic recombination. *Am J Hum Genet.* 1997, 61, 995-999.
- 42 Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993, 90, 10914-10921.
- 43 Cheng YW, Pincas H, Bacolod MD, Schemmann G, Giardina SF, Huang J, Barral S, Idrees K, Khan SA, Zeng Z, Rosenberg S, Notterman DA, Ott J, Paty P, Barany F. CpG island methylator phenotype associates with low-degree chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2008, 14, 6005-6013.
- 44 Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell*, 1990, 61, 759-767.
- 45 Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer.* 1997, 5, 233 - 300.
- 46 Capella G, Cronauer-Mitra S, Pienado MA, Perucho M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect* 1991, 93, 125-131.
- 47 Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B, Whitehall V. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology* 2013, 62, 367-386.
- 48 Meining A, Morgner A, Miehle S, Bayerdörffer E, Stolte M. Atrophy-metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in the stomach: a reality or merely an hypothesis? *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2001, 15, 983-998.
- 49 Conteduca V, Sansonno D, Lauletta G, Russi S, Ingravallo G, Dammacco F. H. pylori infection and gastric cancer: state of the art (review). *Int J Oncol.* 2013, 42, 5-18.
- 50 Atherton JC The pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol.* 2006,1, 63-96.
- 51 Abe H, Kaneda A, Fukayama M. Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma: Use of Host Cell Machineries and Somatic Gene Mutations. *Pathobiology.* 2015, 82, 212-223.
- 52 Deng, N., Goh, L.K., Wang, H., Das, K., Tao, J., Tan, I.B. A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut.* 2015, 61, 673-684.
- 53 Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2000, 6, 2969-2972.
- 54 Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J et al. Pancreatic intraepithelial

-
- neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001, 25, 579-586
- 55 Furukawa T., Impacts of Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Pancreatic Cancer *Front Oncol.* 2015, 5, 23.
- 56 Collisson EA, Trejo CL, Silva JM, et al. A central role for RAF→MEK→ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2012, 2, 685–693.
- 57 Cui Y, Andersen DK. Pancreatogenic diabetes: special considerations for management. *Pancreatology* 2011, 11, 279-294.
- 58 Andersen DK, Andren-Sandberg Å, Duell EJ, Goggins M, Korc M, Petersen GM, Smith JP, Whitcomb DC. Pancreatitis-diabetes-pancreatic cancer: summary of an NIDDK-NCI workshop. *Pancreas.* 2013, 42, 1227-1237.
- 59 Liao WC, Tu YK, Wu MS, Lin JT, Wang HP, Chien KL. Blood glucose concentration and risk of pancreatic cancer: systematic review and dose-response meta-analysis. *BMJ.* 2015, 349, g7371.
- 60 Cho, K. R., Oliner, J. D., Simons, J. W., Hedrick, L., Fearon, E. R., Preisinger, A. C., Hedge, P., Silverman, G. A., Vogelstein, B., *Genomics* 1994, 19, 525–531.
- 61 Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007, 50, 113-130.
- 62 Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, Burnett-Hartman AN, Weisenberger DJ, Laird PW, Sinicrope FA, Rosty C, Buchanan DD, Potter JD, Newcomb PA. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology* 2015, 148, 77-87.e2
- 63 Fiala O, Pesek M, Finek J, Benesova L, Belsanova B, Minarik M. The dominant role of G12C over other KRAS mutation types in the negative prediction of efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer Genet.* 2013, 206, 26-31.

Minarik M, Minarikova L, Hrabikova M, Minarikova P, Hrabal P, Zavoral M.

Application of cycling gradient capillary electrophoresis to detection of APC, K-ras, and DCC point mutations in patients with sporadic colorectal tumors. *Electrophoresis*, 2004, 25, 1016-1021. IF 3,743, Citováno celkem 12x

Minarikova P, Benesova L, Halkova T, Belsanova B, Suchanek S, Cyrany J, Tuckova I, Bures J, Zavoral M, **Minarik M**.

Longitudinal molecular characterization of endoscopic specimens from colorectal lesions. *World J Gastroenterol.*, 2016, 22, 4936-4945. IF 2,787, Citováno celkem 1x

Salek, C., Benesova, L., Zavoral, M., Nosek, V., Kasperova, L., Ryska, M., Strnad, R., Traboulsi, E., **Minarik M**.

Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer, *World J. Gastroenterol.* 2007, 21, 3714-3420. IF 2,081, Citováno celkem 57x

Minarikova P, Benesova L, Halkova T, Belsanova B, Tuckova I, Belina F, Dusek L, Zavoral M, **Minarik M**.

Prognostic Importance of Cell Cycle Regulators Cyclin D1 (CCND1) and Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B (CDKN1B/p27) in Sporadic Gastric Cancers. *Gastroenterol Res Pract.* 2016,2016,9408190. IF 1,742

Levy M, Benesova L, Lipska L, Belsanova B, Minarikova P, Veprekova G, Zavoral M, **Minarik M**.

Utility of Cell-free Tumour DNA for Post-surgical Follow-up of Colorectal Cancer Patients. *Anticancer Res.* 2012, 32, 1621-1626. IF 1,656, Citováno celkem 7x

Benesova L, Belsanova B, Minarikova P, Suchanek S, Kopeckova M, Levy M, Lipska L, Visokai V, Zavoral M, **Minarik M**.

Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. *Anal Biochem* 2013, 433:227-34. IF 3,236, Citováno celkem 31

Příloha 1:

In extenso reprint publikace:

Minarik M, Minarikova L, Hrabikova M, Minarikova P, Hrabal P, Zavoral M. Application of cycling gradient capillary electrophoresis to detection of APC, K-ras, and DCC point mutations in patients with sporadic colorectal tumors. Electrophoresis, 2004, 25, 1016-1021.

Příloha 2:

In extenso reprint publikace:

Minarikova P, Benesova L, Halkova T, Belsanova B, Suchanek S, Cyrany J, Tuckova I, Bures J, Zavoral M, Minarik M. Longitudinal molecular characterization of endoscopic specimens from colorectal lesions. World J Gastroenterol. 2016, 22, 4936-4945.

Příloha 3:

In extenso reprint publikace:

Salek, C., Benesova, L., Zavoral, M., Nosek, V., Kasperova, L., Ryska, M., Strnad, R., Traboulsi, E., Minarik M. Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer, World J. Gastroenterol. 2007, 21, 3714-3420.

Příloha 4:

In extenso reprint publikace:

Minarikova P, Benesova L, Halkova T, Belsanova B, Tuckova I, Belina F, Dusek L, Zavoral M, Minarik M. Prognostic Importance of Cell Cycle Regulators Cyclin D1 (CCND1) and Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B (CDKN1B/p27) in Sporadic Gastric Cancers. Gastroenterol Res Pract. 2016, 2016: 9408190.

Příloha 5:

In extenso reprint publikace:

Benesova L, Belsanova B, Minarikova P, Suchanek S, Kopeckova M, Levy M, Lipska L, Visokai V, Zavoral M, Minarik M. Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. Anal Biochem 2013, 433, 227-234.

Příloha 6:

In extenso reprint publikace:

Levy M, Benesova L, Lipska L, Belsanova B, Minarikova P, Veprekova G, Zavoral M, Minarik M. Utility of Cell-free Tumour DNA for Post-surgical Follow-up of Colorectal Cancer Patients. Anticancer Res. 2012, 32, 1621-1626.