

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2024

Bc. Marek Kvapil

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Tekutá biopsie u kolorektálního karcinomu

Diplomová práce

Bc. Marek Kvapil

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Marek KVAPIL**
Osobní číslo: **R210601**
Studijní program: **N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Tekutá biopsie u kolorektálního karcinomu**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Provést rešerši na dané téma; popsat možnosti pokročilé diagnostiky tekuté biopsie (cirkulující nádorové buňky, cirkulující nádorová DNA aj.) a její využití v experimentální a klinické medicíně, zejména u karcinomu kolorekta.
2. Pomocí genomických metod (NGS, ddPCR aj.) analyzovat a charakterizovat cirkulující nádorovou DNA u buněčných nádorových linií kolorektálního karcinomu a u pacientů s kolorektálním karcinomem.
3. Získat teoretické a praktické znalosti pokročilých molekulárně-genomických metod, naučit se pracovat s patřičnými databázemi a softwarem.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Circulating tumor nucleic acids: biology, release mechanisms, and clinical relevance. Stejskal P, Goodarzi H, Srovnal J, Hajdúch M, van 't Veer LJ, Magbanua MJM. Mol Cancer. 2023 Jan 21;22(1):15. doi: 10.1186/s12943-022-01710-w. PMID: 36681803
2. Recent Advances in Methods for Circulating Tumor Cell Detection. Vidlarova M, Rehulkova A, Stejskal P, Prokopova A, Slavik H, Hajduch M, Srovnal J. Int J Mol Sci. 2023 Feb 15;24(4):3902. doi: 10.3390/ijms24043902. PMID: 36835311
3. Molekulární medicína. Slabý O. et al. Galén 2015

Vedoucí diplomové práce:

MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání diplomové práce: 9. listopadu 2021

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 17. dubna 2024

Bibliografické údaje:

Jméno a příjmení autora	Bc. Marek Kvapil
Název práce	Tekutá biopsie u kolorektálního karcinomu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

SOUHRN

Kolorektální karcinom (CRC) patří celosvětově mezi nejčastěji se vyskytující karcinomy. Tekutá biopsie je jedna z potencionálních nových diagnostických metod, jež využívá řady biomarkerů detekovatelných v tělních tekutinách. Mezi tyto biomarkery patří i cirkulující nádorová DNA (ctDNA). CtDNA představuje díky snadnému získávání a přítomnosti v tělních tekutinách dobře využitelný a obsáhlý zdroj informací o nádorovém onemocnění. Cílem této diplomové práce bylo analyzovat a charakterizovat ctDNA u nádorových buněčných linií CRC a u pacientů s CRC. Byly zkoumány dosud ne zcela popsané parametry ctDNA, jako jsou kinetika uvolňování v časových intervalech, délka fragmentů a zastoupení bodových mutací ve volné cirkulující DNA (cfDNA), typických pro CRC. Zjistili jsme, že v průběhu času dochází ke změnám v množství uvolňování cfDNA a ke zkracování jednotlivých fragmentů ctDNA. Zároveň byly pozorovány změny v zastoupení alel jednotlivých zkoumaných genů. Nepodařilo se nám však potvrdit předpokládaný vliv senescence na zkoumané parametry. U CRC pacientů byly detekovány mutace jak v genu *KRAS*, tak i v genu *PIK3CA*. Získané poznatky o chování ctDNA umožní přesnější interpretaci a časnější implementaci tekuté biopsie do diagnostiky nejenom nádorových onemocnění.

Klíčová slova	Kolorektální karcinom, tekutá biopsie, cirkulující nádorová DNA
Počet stran	84
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Marek Kvapil
Title	Liquid biopsy in colorectal cancer
Type of thesis	Master
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine
Supervisor	MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
The year of presentation	2024

SUMMARY

Colorectal carcinoma (CRC) is among the most commonly occurring cancers worldwide. Liquid biopsy is one of the potential new diagnostic methods that utilizes a range of biomarkers detectable in bodily fluids. Among these biomarkers is circulating tumor DNA (ctDNA). CtDNA, due to its easy accessibility and presence in bodily fluids, represents a valuable and comprehensive source of information about cancer. The aim of this thesis was to analyze and characterize ctDNA in CRC cell lines and patients with CRC. Previously undescribed parameters of ctDNA were examined, such as the kinetics of release at time intervals, fragment length, and the representation of point mutations in circulating free DNA (cfDNA) typical for CRC. We found that over time, there are changes in the amount of cfDNA release and shortening of individual ctDNA fragments. Additionally, changes in the allele representation of the examined genes were observed. However, we were unable to confirm the presumed influence of senescence on the parameters studied. Mutations were detected in both the *KRAS* and *PIK3CA* genes in CRC patients. The insights gained into ctDNA behavior will enable a more precise interpretation and earlier implementation of liquid biopsy in the diagnosis of not only cancer but also other diseases.

Key words	Colorectal cancer, Liquid biopsy, Circulating tumor DNA
Number of pages	84
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením MUDr. Josefa Srovnala, Ph.D., a s vyznačením všech použitých literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Bc. Marek Kvapil

Tímto bych chtěl poděkovat MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D., za odborné vedení, odborné rady, ochotu, trpělivost a čas během vypracovávání diplomové práce. Velice bych chtěl poděkovat Mgr. Pavlu Stejskalovi a kolektivu Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP za neocenitelnou pomoc během práce na experimentální části této práce. Poděkovat bych chtěl i své rodině a přátelům za podporu.

Diplomová práce vznikla za finanční podpory projektu Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) - Financováno Evropskou unií - Next Generation EU a IGA_LF UP_2024_007.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Kolorektální karcinom	3
3.1.1	Charakterizace CRC	4
3.1.1.1	Obecná charakteristika.....	4
3.1.1.2	Nestabilita genomu	6
3.1.1.3	Vývojové dráhy CRC	7
3.1.2	Proliferační signální dráhy u CRC.....	9
3.1.2.1	<i>EGFR</i> signální dráha.....	9
3.1.2.2	Wnt signální dráha	11
3.2	CtDNA	12
3.2.1	Biologie ctDNA	13
3.2.2	Mechanismy uvolnění ctDNA	16
3.2.2.1	Pasivní mechanismy	17
3.2.2.2	Aktivní mechanismy	20
3.2.2.3	Faktory ovlivňující uvolňování ctDNA	21
3.3	Tekutá biopsie	21
3.3.1	Biomarkery v tekuté biopsii	22
3.3.2	Zdroje biomarkerů v tekuté biopsii	23
4	MATERIÁLY A METODY	26
4.1	Biologický materiál.....	26
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	26
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	27
4.4	Použitý software	28
4.5	Použité experimentální a vyhodnocovací metody	28

4.5.1	Kultivace nádorových linií a sběr materiálu	28
4.5.2	Izolace a kvantifikace cfDNA	29
4.5.3	Extrakce a kvantifikace proteinů	31
4.5.4	Evaluaace velikosti fragmentů cfDNA	32
4.5.5	ddPCR.....	33
4.5.6	Navození a kontrola senescence	35
5	VÝSLEDKY	37
5.1	Vzorce uvolňování cfDNA	37
5.2	Velikostní složení fragmentů cfDNA	38
5.3	Detekce a zastoupení mutací typických pro kolorektální karcinom	40
5.4	Vliv senescence na kinetiku uvolňování cfDNA, velikost fragmentů a zastoupení mutací	43
5.5	Detekce mutací genů <i>KRAS</i> a <i>PIK3CA</i> u pacientů s CRC	48
6	DISKUZE	50
7	ZÁVĚR	54
8	LITERATURA.....	55

Seznam symbolů a zkratek

<i>APC</i>	Supresorový gen adenomatous polyposis coli
<i>BRAF</i>	Protoonkogen B-Raf
β -Gal	β -galaktosidáza
cfDNA	Volná cirkulující DNA
CIMP	Fenotyp methylovaných CpG ostrovů
CIN	Chromosomová instabilita
CMS1-4	Konsenzuální molekulární subtypy 1-4
CRC	Kolorektální karcinom
ctDNA	Cirkulující nádorová DNA
ctRNA	Cirkulující nádorová RNA
DDR	Dráhy odpovědi na poškození DNA (z angl. DNA damage-response)
DM	Double minutes
EGF	Epidermální růstový faktor
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
EV	Extracelulární vezikuly
FAP	Familiární adenomatózní polypóza
<i>HER2</i>	Humánní epidermální receptor 2
IBD	Nespecifické střevní nádory
<i>KRAS</i>	Protoonkogen K-RAS
MET	Receptor mezenchymálně-epiteliální tranzice
MMR	Geny oprav v párování bází DNA
MSI	Mikrosatelitová instabilita
MVB	Multivezikulární tělísko
PIP ₃	Fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PI3K	Fosfatidylinositol-3 kináza
Pro-IL-18	Prointerleukin-18
RNS	Reaktivní dusíkaté radikály
ROS	Reaktivní kyslíkové radikály

TGF- β	Transformující růstový faktor β
--------------	---------------------------------------

Seznam obrázků

Obr. 1	4
Obr. 2	8
Obr. 3	10
Obr. 4	15
Obr. 5	16
Obr. 6	17
Obr. 7	20
Obr. 8	30
Obr. 9	34
Obr. 10	35
Obr. 11.....	37
Obr. 12	38
Obr. 13	39
Obr. 14	40
Obr. 15	41
Obr. 16	42
Obr. 17	43
Obr. 18	43
Obr. 19	44
Obr. 20	45
Obr. 21	46
Obr. 22	47
Obr. 23	48
Obr. 24	48
Obr. 25	49

Seznam tabulek

Tab. 1	30
Tab. 2	31
Tab. 3	32
Tab. 4	33
Tab. 5	34
Tab. 6	36
Tab. 7	49

1 ÚVOD

Kolorektální karcinom (CRC) je jedním z nejčastěji se vyskytujících karcinomů po celém světě. Vyznačuje se vysokou mortalitou, která je důsledkem diagnózy onemocnění až v pokročilých stádiích (Sung *et al.*, 2021). Tekutá biopsie je v poslední době rychle se rozvíjející metoda, pomocí níž je možné sledovat a detekovat molekulární změny a heterogenitu nádoru prostřednictvím nukleových kyselin uvolněných buňkami nádoru do cirkulace. Molekuly cirkulující nádorové DNA (ctDNA, z angl. circulating tumor DNA) jsou pouhým zlomkem všech volných cirkulujících DNA molekul (cfDNA, z angl. cell-free DNA) přítomných v oběhovém systému (Thierry *et al.*, 2016).

CtDNA může sloužit jako spolehlivý biomarker u pacientů s CRC, a jeví se tak jako vhodný nástroj při diagnóze, terapii a prognóze onemocnění. Data publikovaná řadou experimentálních prací poukazují na souvislost mezi pozitivně detekovanou ctDNA s hodnotami celkového přežití pacientů a přežití bez recidivy nádorového onemocnění (Basnet *et al.*, 2016). Brzká diagnóza CRC je kritickým faktorem, vedoucí ke zvýšení šance na přežití pacienta. Využití ctDNA by mohlo přinést řadu zlepšení a zefektivnění ať už léčby samotné, nebo detekce CRC a řady dalších nádorových onemocnění.

2 CÍLE PRÁCE

Vypracovat literární rešerši na téma:

Kolorektální karcinom. Charakterizace, diagnóza, prognóza.

Možnosti pokročilé diagnostiky tekuté biopsie a její využití v experimentální a klinické medicíně, zejména u kolorektálního karcinomu.

Cirkulující nádorová DNA a nebuněčné komponenty.

Získat teoretické a praktické znalosti:

Pokročilých molekulárně-genomických metod.

Práce s příslušnými databázemi a softwarem.

Experimentální cíle:

Pomocí genomických metod (NGS, ddPCR aj.) analyzovat a charakterizovat cirkulující nádorovou DNA u buněčných nádorových linií kolorektálního karcinomu a u pacientů s kolorektálním karcinomem.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Kolorektální karcinom

CRC v dnešní době patří mezi nádorová onemocnění s největším výskytem po celém světě. V celosvětovém žebříčku četnosti výskytu rakoviny obsazuje třetí místo (v roce 2020 činil 10 % z celkového počtu nových případů), zatímco v celkové úmrtnosti se nachází na druhém místě, kdy v roce 2020 činil 9,4 % všech rakovinou podmíněných úmrtí, což je v přepočtu zhruba 935 000 úmrtí. Celkově lze říci, že incidence roste se zvyšující se vyspělostí země, což je patrně způsobeno změnou životního stylu a častějšímu vystavení se rizikovým faktorům (Sung *et al.*, 2021).

Ke vzniku CRC může dojít buď sporadicky (většina), nebo se může rozvinout na základě genetické predispozice. Mezi dědičné formy onemocnění patří Familiární adenomatózní polypóza (FAP) a Lynchův syndrom. Rozvoj FAP je zapříčiněn autozomálně dominantní mutací *APC* genu (z angl. adenomatous polyposis coli), zatímco Lynchův syndrom je autozomálně dominantní onemocnění, způsobené mutací genů MMR (z angl. mismatch repair) zodpovědných za opravu chyb v párování bází DNA (Dekker *et al.*, 2019). Původ většiny nádorových buněk CRC je předpokládán v kmenových buňkách či buňkách podobných kmenovým buňkám (Nassar a Blanpain, 2016). Tyto kmenové buňky jsou výsledkem akumulace genetických a epigenetických změn, které ovlivňují onkogeny, tumor supresory apod. (Nassar a Blanpain, 2016).

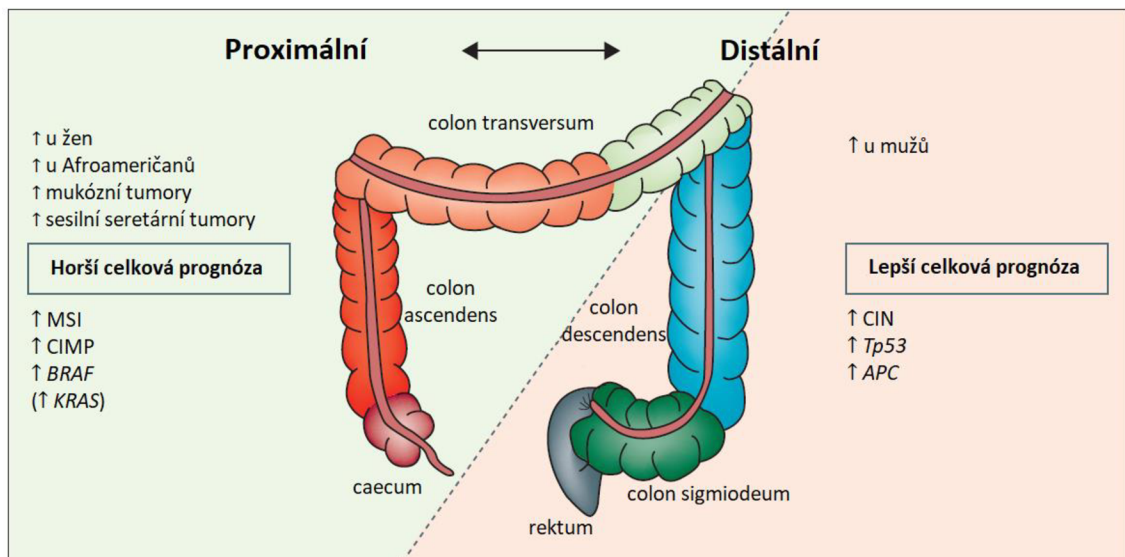
Rizikových faktorů je celá řada a každý z nich může přispět k rozvoji onemocnění jinou měrou. Jednoduše lze tyto faktory rozdělit na ovlivnitelné (zejména životní styl) a neovlivnitelné, kam spadají vnitřní faktory, dědičné faktory a věk. Nejdůležitějším rizikovým faktorem je věk, kdy po 50. roce dochází k prudkému zvýšení pravděpodobnosti rozvoje CRC. Existují i případy, a v poslední době jejich počet roste, výskytu CRC u osob mladších 50 let (Sung *et al.*, 2021). Mezi rizikové faktory, jež jdou ruku v ruce se životním stylem, spadají kouření, obezita, nadměrné požívání alkoholu a červeného masa či nedostatek pohybu. Všechny tyto faktory se podepisují jak na celkovém stavu mikrobiomu, tak i na metabolismu kmenových buněk střev (Sedlak *et al.*, 2023). Co se týče rizikových faktorů na úrovni genů, bavíme se zejména

o přítomnosti somatických mutací řady onkogenů či tumor supresorových genů (Fearon a Vogelstein, 1990).

3.1.1 Charakterizace CRC

3.1.1.1 Obecná charakteristika

Základním principem, jak lze rozdělit CRC, je dle lokalizace tohoto onemocnění v rámci organismu. V závislosti na lokalizaci se totiž liší klinické výsledky terapie, odpověď léčiva použitého pro léčbu a zejména i exprese genů z důvodu ontogenetických rozdílů. Z tohoto hlediska může být CRC buď proximálním sporadickým nádorem, nebo nádorem distálním (Obr. 1; Dekker *et al.*, 2019). Proximální sporadické nádory tlustého střeva mívají horší prognózu přežití ve srovnání s distálním CRC a také vyšší výskyt u žen a Afroameričanů (Hansen a Jess, 2012; Dienstmann *et al.*, 2017a; Augustus a Ellis, 2018).



Obr. 1: Schéma tlustého střeva a rozdíly mezi proximální a distální částí u kolorektálního karcinomu. *APC*, *Tp53* – tumor supresorové geny; *BRAF*, *KRAS* – protoonkogeny; CIMP – fenotyp methylovaných CpG ostrovů; CIN – chromosomová instabilita; MSI - Mikrosatelitová instabilita. Upraveno dle Dekker *et al.*, 2019.

Dále zde jsou rozdíly na molekulární úrovni. Z genomického pohledu je CRC poměrně heterogenní. Heterogenita nádoru je v tomto případě důsledkem akumulace mutací genů a chromosomových aberací, ke kterým dochází v počátcích a v průběhu onemocnění. Nestabilitu genomu u CRC lze rozdělit na dvě formy, a to na chromosomovou instabilitu (z angl. chromosomal instability, CIN) a na mikrosatelitovou instabilitu (MSI [Lengauer *et al.*, 1998]). Distální CRC bývá bohatý na CIN, zatímco proximální sporadické nádory tlustého střeva bývají bohaté na MSI, jež je důsledkem deficience MMR genů. Proximální CRC jsou bohaté i na hypermethyloci promotorů

tumor supresorových genů v rámci celého genomu, běžně označované jako fenotyp methylovaných CpG ostrovů (CIMP) (Dekker *et al.*, 2019). Mimo to má proximální CRC častěji mutovaný protoonkogen *B-Raf* a protoonkogen *K-RAS* (Kadowaki *et al.*, 2015). *BRAF* kóduje serin/threonin protein kinázu, která je downstream efektozem *KRAS*, zatímco *KRAS* kóduje GTP/GDP vazebný protein (Kadowaki *et al.*, 2015).

Většina buněk CRC má původ ve střevních kmenových buňkách, konkrétně v *LGR5* pozitivních buňkách (Barker *et al.*, 2009). Tyto buňky obsahují transmembránový receptor pro R-spondin, jenž zesiluje Wnt signalizaci neutralizací transmembránové E3 ligázy, která odstraňuje Wnt receptory (de Lau *et al.*, 2014). *LGR5* pozitivní buňky produkují přechodné dělicí se buňky (transit-amplifying cells) s omezeným množstvím dělení. Přestože mají *LGR5* pozitivní buňky největší potenciál se transformovat v CRC buňky, mohou i již diferenciované nebo přechodné dělicí se buňky přispívat k tvorbě CRC během specifických podmínek (zánět, obezita, změny v mikroprostředí tumoru [Barker *et al.*, 2009; Schwitalla *et al.*, 2013]). Původ nemusejí mít buňky CRC jen v kmenových buňkách střev. Buňky CRC mohou vznikat rovněž z nádorových kmenových buněk (Li *et al.*, 2021). Tento koncept vychází z neustálé sebeobnovy kmenových buněk, vedoucí ke vzniku a akumulaci mutací onkogenů (Zeki *et al.*, 2011).

Z důvodu poměrně vysoké heterogenity byl CRC rozdělen na základě genové exprese do čtyř konsensuálních molekulárních subtypů (CMS1-4, z angl. consensus molecular subtypes). Mezi jednotlivými subtypy jsou podstatné rozdíly v expresi genů. CMS1 (MSI Immune), pro nějž je charakteristická hypermutovaná nádorová DNA, MSI a mutace *BRAF*, je asociován s aktivací JAK-STAT signální dráhy. CMS1 má zároveň horší prognózu přežití. CMS2 (kanonický) je charakterizován silnou aktivací Wnt signalizace zejména v epiteliálních buňkách. CMS3 (metabolický) vykazuje epiteliální vlastnosti, silnou dysregulaci metabolismu a mutaci v genu *KRAS*. Posledním subtypem je CMS4 (mezenchymální), který charakterizuje aktivace drah spojených s epitel-mezenchymální tranzicí, silná aktivace receptoru transformujícího růstového faktoru β (TGF- β) a zvýšená exprese proteinů podílejících se na remodelování extracelulární matrix. CMS4 má nejhorší celkovou prognózu přežití v porovnání s ostatními subtypy. Subtypy CMS2–CMS4 zároveň vykazovaly daleko větší míru CIN (Guinney *et al.*, 2015, Dienstmann *et al.*, 2017b; Ionescu *et al.*, 2023).

3.1.1.2 Nestabilita genomu

Důležitou vlastností CRC je nestabilita genomu tvořená dvěma, případně třemi základními složkami, a to CIN, MSI a dysfunkcí telomer. CIN je charakterizována strukturálními a početními změnami chromosomů (např. změny v počtu kopií, delece, inserce, amplifikace). K těmto změnám a aberacím dochází zejména během segregace chromosomů, narušenou senescencí či dysfunkcí drah spojených s odpovědí na poškození DNA (DDR, z angl. DNA damage response; Nguyen *et al.*, 2020). Ke vzniku CIN může docházet v důsledku mutace tumor supresorového genu *Tp53* nebo důsledkem dysfunkce telomer zejména v brzkých stádiích CRC (Rudolph *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2020). Zhruba 80 % tumorů s CIN má mutací inaktivovaný *APC*, negativní regulátor Wnt/ β -kateninové signalizace, která je jednou z hlavních proproliferčních signálních drah u CRC. Díky inaktivaci *APC* dochází u většiny tumorů s CIN právě k signalizaci přes Wnt/ β -katenin signální dráhu (Nguyen *et al.*, 2020).

DNA mikrosatelity jsou opakující se tandemové sekvence obsahující jednonukleotidové, případně vícenukleotidové repetice, v nichž dochází k akumulaci mutací v důsledku nízké vazebnosti DNA polymerázy na opakující se sekvence genomu. Mutací *MMR* genů (např. *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*) nebo *EpCAM* genu kódujícího regulátor *MSH2* dochází k nestabilitě v mikrosatelitových oblastech vedoucí k MSI. Hlavním promotorem vzniku CRC je v tomto případě hypermutagenita (Nguyen *et al.*, 2020). Nejběžnějším mechanismem vzniku MSI je právě hypermethylace promotoru *MLH1* vedoucí k jeho epigenetickému umlčení (Cunningham *et al.*, 1998). Součástí mutací v MSI je i mutace genu *TGFBR2*, který kóduje protein zabraňující proliferaci střevních epiteliálních buněk. Tento gen je mutovaný v 90 % CRC spojených s MSI (Parsons *et al.*, 1995).

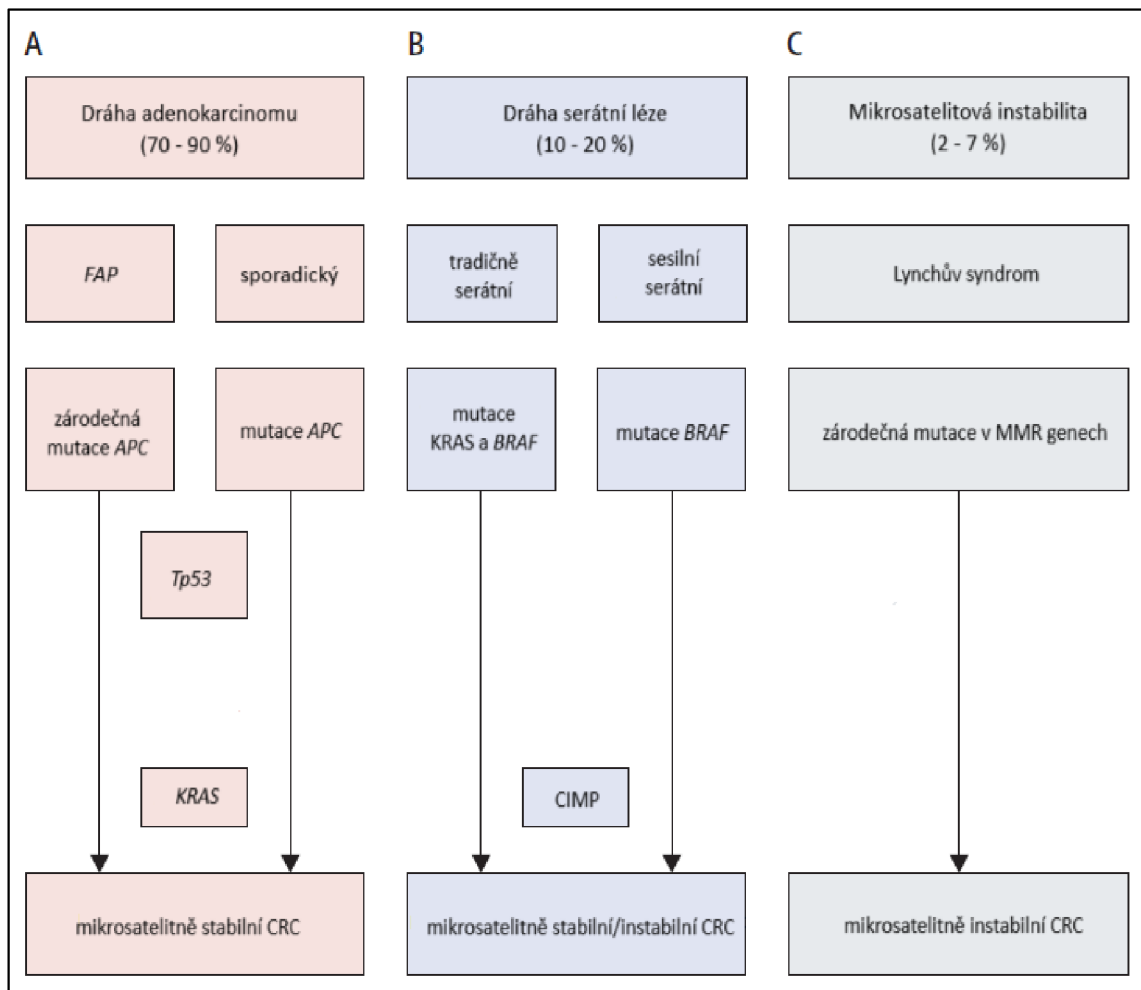
Poslední diskutovaný proces přispívající nejen k nestabilitě genomu je dysfunkce telomer. Mimo již zmíněný podíl na vzniku CIN přispívá dysfunkce telomer ke vzniku CRC na více úrovních. Podporuje vznik střevních zánětů, včetně nespecifických (IBD). K tomuto dochází fosforylací *YAP1* transkripčního faktoru prostřednictvím aktivace ATM/cABL, který up-reguluje prointerleukin-18 (pro-IL-18). Činností střevního mikrobiomu dochází k přeměně pro-IL-18 na IL-18, což ve finále vede k tvorbě střevních zánětů (Chakravarti *et al.*, 2020). Výsledkem je zvýšená hladina intracelulárních

reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), jež poškozují telomery. Toto může vést až k nestabilitě genomu a vzniku nádorů (Jurk *et al.*, 2014). Další možností, jak může dysfunkce telomer vést k tvorbě CRC, je prostřednictvím zvýšené tvorby ROS a reaktivních dusíkatých radikálů (RNS) v mitochondriích. Ke zvýšení tvorby ROS a RNS dochází dysfunkcí telomer aktivovaným p53, který potlačuje hlavní regulátory anti-oxidativní obrany PGC1- α a PGC1- β (Valko *et al.*, 2007). Takto vzniklé ROS/RNS oxidativně poškozují proteiny, DNA a lipidy. Oxidace lipidů může narušovat permeabilitu membrán, vedoucí k defektům v signalizaci a k zánětům (Cejas *et al.*, 2004). Oxidativní poškození proteinů může vést k nesprávné funkci, nebo až k vyřazení z provozu řady polymeráz a enzymů podílejících se na opravě DNA (Shringarpure a Davies, 2002). Akumulace poškozených proteinů může ve finále vést k řadě onemocnění, včetně CRC (Marnett, 2000). Oxidace nukleotidů v DNA je mutagenní proces probíhající v řadě nádorů, včetně CRC (Bjelland a Seeberg, 2003).

Celkově tedy můžeme říci, že nestabilita genomu, k níž dochází prostřednictvím CIN, MSI a dysfunkce telomer, přispívá k heterogenitě nádoru. Mimo to dysfunkce telomer dokáže řadou procesů napomáhat karcinogenezi a progresi CRC.

3.1.1.3 Vývojové dráhy CRC

CRC se může vyvíjet na základě tří drah (Obr. 2). První možností je klasická dráha cestou adenokarcinomu, kterou se vyvíjí 70 – 90 % všech CRC. Tyto CRC jsou bohaté na CIN. Dráha začíná vývojem aberantní krypty v benigní adenomatózní polyp, jenž se v průběhu času vyvine až ve sporadický CRC (Dekker *et al.*, 2019). Touto dráhou se vyvíjí i FAP. Na úrovni genomu byla dráha cestou adenokarcinomu znázorněna tzv. Vogelsteinovým modelem (Faeron a Vogelstein, 1990), který byl ovšem později upraven tak, aby sled událostí byl posloupný (Li *et al.*, 2021). Celá dráha je iniciována mutací v genu *APC*, jež jej inaktivuje (Faeron a Vogelstein, 1990). Poté je adenokarcinom „udržován“ mutací/deleci *TP53* (Janssen *et al.*, 2006). Aktivace *KRAS* je následně přítomna ve fázi metastáz (Boutin *et al.*, 2017).



Obr. 2: Vývojové dráhy kolorektálního karcinomu (CRC). Většina CRC se vyvíjí dráhou přes adenokarcinom (A). Postup touto dráhou je charakterizován akumulací mutací *APC*, *TP53* a *KRAS*, vedoucí k mikrosatelitně stabilním CRC. Dráhou přes adenokarcinom se ubírá i hereditární onemocnění familiární adenomatózní polypóza (FAP). Dráha serátní léze je často, ale ne vždy, zahájena mutacemi *BRAF* nebo *KRAS*, na které navazuje methylace tumor supresorů (fenotyp methylovaných CpG ostrovů [CIMP]) (B). Tato dráha může vést k mikrosatelitně stabilním/instabilním CRC. Dráha přes mikrosatelitovou instabilitu je způsobena mutací v *MMR* genech odpovědných za opravu v párování bází DNA a vede k mikrosatelitně instabilním CRC (C). Upraveno dle Dekker *et al.*, 2019.

Druhou možností je dráha cestou serátní léze (Obr. 2). Tato dráha představuje zhruba 10 – 20 % všech CRC a může probíhat dvěma způsoby, přičemž každý z nich má jiný výsledek. Prvním způsobem je tzv. tradičně serátní dráha, kdy hyperplastický polyp bohatý na pohárkové buňky přechází do tradičního vroubkovaného adenomu a následně do mikrosatelitně stabilního CRC (Snover, 2011). Druhým způsobem je sesilní serátní dráha, vedoucí přes mikrovezikulární hyperplastický polyp přecházející v sesilně serátní adenom až k mikrosatelitně instabilnímu/stabilnímu CRC (Rashtak *et al.*, 2017). Dráha

cestou serátní léze souvisí s mutacemi *KRAS* a *BRAF* a s epigenetickou nestabilitou, jež je charakterizována CIMP (Obr. 2).

Poslední možností je dráha MSI, která je důsledkem defektních oprav DNA zapříčiněných zárodečnými mutacemi v *MMR* genech (Obr. 2), jež jsou také asociovány s již zmíněným Lynchovým syndromem. Důsledkem MSI dráhy je mikrosatelitně instabilní CRC (Dekker *et al.*, 2019).

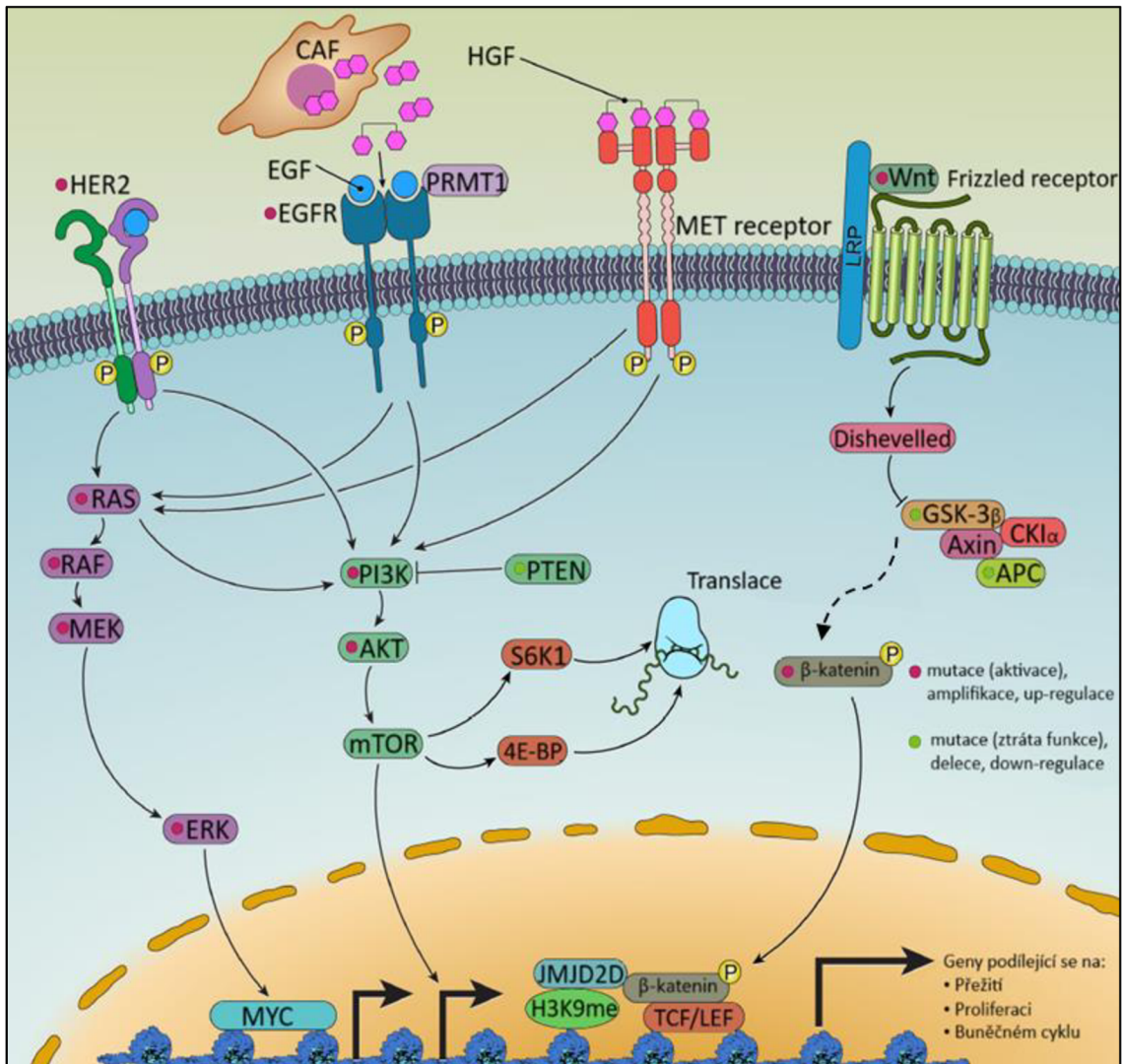
3.1.2 Proliferační signální dráhy u CRC

Aby mohlo dojít k proliferaci CRC buněk, je třeba, aby se aktivovaly transdukční signální dráhy prostřednictvím somatických mutací, čímž u těchto buněk dojde k nastartování pro-proliferačního stavu. U CRC známe dvě hlavní proliferační signální dráhy, a to dráhu receptoru epidermálního růstového faktoru (*EGFR*) a Wnt- β -katenin dráhu (Li *et al.*, 2021).

3.1.2.1 *EGFR* signální dráha

Aktivace *EGFR* spouští downstream signální kaskády RAS/RAF/MEK/ERK, anebo PI3K/AKT (Obr. 3). Přenos signálu je zahájen vazbou epidermálního růstového faktoru (EGF) na extracelulární doménu *EGFR*. Vazba EGF na oba monomery *EGFR* vede k tvorbě dimeru a transfosforylaci C-terminální domény receptoru. Následně dochází k aktivaci některé ze signálních kaskád. V případě RAS/RAF/MEK/ERK kaskády je katalyzována přeměna GDP, vázaného na RAS, na GTP. Následuje přenos signálu až k ERK. Aktivovaný ERK translokuje do jádra, kde může aktivovat řadu transkripčních faktorů, které indukují geny rané odpovědi (např. geny *Myc*; Wee a Wang, 2017). Produkty těchto genů indukují geny pozdní odpovědi, jejichž produkty ovlivňují řadu procesů spojených s proliferací, nebo buněčným cyklem (Li *et al.*, 2021). U PI3K dochází k přenosu signálu jinak. Nejprve dochází k aktivaci fosfatidylinositol-3 kinázy (PI3K). Ta fosforyluje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP₃; Wee a Wang, 2017). V tomto bodě bývá za běžných podmínek PIP₃ vyvazován produktem genu *PTEN*, který funguje jako antagonistu PI3K, ovšem v rakovinných buňkách bývá často inaktivován (Salmena *et al.*, 2008). PIP₃ funguje jako sekundární posel lokalizovaný na plazmatické membráně, na něž se váže serin/threoninová kináza AKT. Aktivovaná AKT inhibuje TSC2, což je inhibitor další serin/threonin kinázy mTOR. Aktivovaná mTOR může fosforylovat buď kinázu S6K, nebo protein vázající eukaryotický iniciační faktor 4E (Wee a Wang, 2017). Oba tyto efekторы mají silný dopad

na translaci a buněčný růst (Dibble a Cantley, 2015). Takto může být nastartována zvýšená produkce např. cyklinu D1, který v komplexu s cyklin dependentními kinázami 4/6 vede k buněčné proliferaci.



Obr. 3: Proliferační signální dráhy u kolorektálního karcinomu. 4E-BP – eukaryotický iniciační faktor 4E vazebný protein; AKT, mTOR – serin/threonin kinázy; APC/Axin/CK1α/GSK-3β – destrukční komplex; CAF – fibroblast asociovaný s rakovinou; EGF – epidermální růstový faktor; EGFR – receptor EGF; HER2 – humánní epidermální receptor 2; HGF – růstový faktor hepatocytů; H3K9me – methylace lysinu histonu H3; JMJD2D – demethyláza histonů; MET - receptor mezenchymálně-epiteliální tranzice; MYC, TCF/LEF – transkripční faktory; PI3K - fosfatidylinositol-3-kináza; PRMT1 – protein arginin N-methyltransferáza 1; PTEN - fosfatáza a homolog tenzinu; RAS/RAF/MEK/ERK – mitogenem aktivované protein kinázy; S6K1 - ribozomální protein S6 kináza. Upraveno dle Li *et al.*, 2021.

U většiny CRC je exprese *EGFR* zvýšená (cca 80 % všech CRC; Spano *et al.*, 2005) a u většiny komponent podílejících se na přenosu signálu dochází k mutacím (Barber *et al.*, 2004). Zejména mutace způsobující nepřetržitou aktivaci *RAS*, *RAF*, *MEK* nebo *ERK* mohou udržovat proliferaci a přežití nádorových buněk během

inhibice EGFR. Mutace v genech *KRAS*, *NRAS* nebo *HRAS* jsou přítomné v cca 50 % CRC (Vaughn *et al.*, 2011). K mutacím *BRAF* dochází asi v 10 % až 15 % CRC v brzkých stádiích a v 5 % CRC v pozdních stádiích (Vaugh *et al.*, 2011). V případě druhé signální kaskády často dochází k epigenetickému umlčení *PTEN*, k aktivačním mutacím PI3K, nebo k amplifikaci AKT (Cantley 2002; Zhang *et al.*, 2011; Yager *et al.*, 2018). Ke zvýšené aktivaci EGFR dochází metylací extracelulární domény prostřednictvím protein arginin N-methyltransferázy 1 (PRMT1), jež zvyšuje afinitu receptoru k EGF (Liao *et al.*, 2015). EGFR může být v případě inhibice zastoupen dalšími receptory, jako jsou receptor mezenchymálně-epiteliální tranzice (MET) nebo humánní epidermální receptor 2 (HER2; Obr. 3). Ligand MET může zcela nahradit funkci EGF v tvorbě adenomů (Joosten *et al.*, 2017).

3.1.2.2 Wnt signální dráha

Druhou možnou signální dráhou, zprostředkovávající proliferaci u CRC, je Wnt signální dráha. Jedná se o komplexní signální dráhu obecně rozdělenou na tři pod dráhy, a to kanonickou a dvě nekanonické. Kanonická, nejlépe prozkoumaná, vyžaduje vazbu Wnt ligandu na tzv. Frizzled receptor a na lipoproteinový koreceptor LRP5/6. Zásadní složkou kanonické dráhy je protein β -katenin. Cytoplazmatická koncentrace β -kateninu je kontrolována tzv. destrukčním komplexem, složeným z nádorového supresoru APC, skafoldového proteinu Axinu, GSK-3 β kinázy a CK1 α kinázy. Kinázy v komplexu fosforylují β -katenin, který je rozeznán a polyubikvitinován komplexem ligáz a ve finále degradován v proteázomu. Po vazbě ligandu na frizzled receptor dochází k fosforylaci tzv. dishevelled proteinu. Aktivovaný dishevelled protein inaktivuje destrukční komplex tím, že z něj vyváže Axin, a ve finále tak zamezuje degradaci β -kateninu přítomného v cytoplasmě. Ten následně může translokovat do jádra, kde se váže na transkripční faktory TCF/LEF (Duchartre *et al.*, 2016). Komplex transkripčních faktorů s β -kateninem aktivuje transkripci řady genů spojených s proliferací (např. gen *TERT*; Hoffmeyer *et al.*, 2012).

Mutace a genetické změny ovlivňují Wnt signalizaci na několika úrovních. Samotná Wnt signální dráha může být epigeneticky aktivována DNA hypermethylací (Tao *et al.*, 2019). Známé jsou mutace ovlivňující jednotlivé intracelulární složky transdukce signálu, jako jsou APC a β -katenin. Mutace vedoucí k inaktivaci *APC* jsou jednou z nejčastěji se vyskytujících mutací v CRC (80 %; Cancer Genom Atlas Network, 2012). Další možností je mutace v genu *CTNNB1* kódující β -katenin. Transaktivační

potenciál β -kateninu může být zvýšen např. fosforylací tyrozinovými kinázami (van Veelen *et al.*, 2011) nebo interakcí s demethylázou JMJD2D (Peng *et al.*, 2019).

3.2 CtDNA

Cirkulující nádorová DNA (ctDNA) jsou krátké molekuly DNA (o velikosti 150 až 200 bp), uvolňované buňkami nádoru do krevního řečiště. Analýza ctDNA může poskytnout důležité informace o genetických mutacích přítomných v tumoru a lze ji využít zejména jako biomarkery nádorových onemocnění, jež nám mohou pomoci s lepší diagnostikou, s rozhodováním o vhodnosti prováděné terapie či s monitorováním nemoci (Pessoa *et al.*, 2020). CtDNA je pouhou částí celkové volné cirkulující DNA (cfDNA). Molekuly cfDNA cirkulují v těle jak zdravých, tak nemocných lidí (Thierry *et al.*, 2016), přičemž zásadním rozdílem mezi zdravými lidmi a pacienty s rakovinou je celková hladina cfDNA v krvi, která je vyšší u onkologických pacientů (Angeles *et al.*, 2021). K tomuto dochází pravděpodobně díky zvýšené hladině buněčné smrti, přítomnosti nádorů nebo chronickým zánětům, což vede k nedostatečné účinnosti DNA čistících procesů (Kustanovich *et al.*, 2019).

Nádorové buňky nejsou jediným zdrojem ctDNA. Jedním ze zdrojů mohou být i cirkulující nádorové buňky (circulating tumor cells, CTC), jež mohou tyto molekuly uvolňovat (Schwarzenbach *et al.*, 2011). Pravděpodobným mechanismem uvolnění ctDNA je v nejvíce případech poškození samotné CTC (Chistiakov a Chekhonin, 2018). Důvod je jednoduchý. CTC uvolněná do krevního oběhu je vystavena řadě faktorů, jako jsou například kolize s krevními buňkami, hemodynamické síly či tvorba komplexů s ostatními buňkami (leukocyty/trombocyty). Na druhou stranu, vzhledem k tomu, že se ctDNA vyskytuje i u vzorků, kde nebyly detekovány CTC a ne naopak (Papadopoulos, 2020), a že výskyt CTC je spíše vzácnější (Gold *et al.*, 2015), můžeme CTC zařadit do klinicky nerelevantních zdrojů ctDNA (Stejskal *et al.*, 2023).

Nádorové buňky uvolňují krom ctDNA i cirkulující nádorovou RNA (ctRNA). CtRNA poskytuje jedinečné informace, které nelze získat z ctDNA. Na rozdíl od ctDNA, jež v zásadě nese genetické znaky tvorby nádorů, ctRNA může sloužit jako klíč k objasnění dynamických procesů probíhajících v nádorech na buněčné a mezibuněčné úrovni (Thierry *et al.*, 2016; Sadik *et al.*, 2018).

Díky tomu, že genetická informace nesená ctDNA je totožná s genetickou informací v buňkách nádoru a cirkuluje v periferní krvi, jedná se o vhodný a užitečný nástroj k diagnostice řady nádorových onemocnění, včetně CRC.

Mimo ctDNA a ctRNA je v krvi přítomná i tzv. cirkulující bakteriální DNA, uvolňovaná střevním mikrobiomem. Mikrobiom a jeho funkce v karcinogenezi jsou předmětem zájmu, zejména v kontextu CRC. Role mikrobiomu spočívá především v podněcování střevních zánětů (např. IBD) a v modulaci řady signálních drah (Maisonneuve *et al.*, 2018; Wong a Yu, 2019). Mikrobiom by mohl například stimulovat střevní kmenové buňky k jejich přeměně na buňky CRC (Reikvam *et al.*, 2011). Cirkulující bakteriální DNA tak představuje další možný biomarker zejména u pacientů s CRC (Xiao *et al.*, 2021).

3.2.1 Biologie ctDNA

CtDNA se může vyskytovat v krevní plasmě či v séru, a to v jednořetězcové i dvouřetězcové formě (Cheng *et al.*, 2016). Množství těchto molekul v krevním oběhu závisí na mnoha faktorech, a to zejména na typu nádoru (Zill *et al.*, 2018), na fázi onemocnění, ve které se pacient nachází (Neumann *et al.*, 2018), na vaskularizaci nádoru (Jahr *et al.*, 2001) či na odpovědi na léčbu (Diehl *et al.*, 2008). Dalšími faktory ovlivňujícími hladiny ctDNA jsou rychlost růstu nádoru (indolentní vs. rychle postupující) a samotná míra uvolňování ctDNA nádorem (Siravengna *et al.*, 2019). Velikost frakce ctDNA z celkového množství cfDNA v krevním oběhu je dynamická, s rozsahem od 0,003 až po 95 % (Thierry *et al.*, 2016). U pacientů v raných stádiích onemocnění může ctDNA tvořit 1 % veškeré cfDNA. V případě pokročilých stádií může tato hodnota dosáhnout až 40 % (Neumann *et al.*, 2018). Množství frakce ctDNA se u jednotlivých typů nádorů také různí. Obecně platí, že u některých nádorů s charakteristickými vlastnostmi (vysoká míra nekrózy) dochází k uvolňování většího množství ctDNA (Papadopoulos, 2020). Příkladem jsou zvýšené hladiny ctDNA u triple-negativního karcinomu prsu ve srovnání s jinými subtypy (Magbanua *et al.*, 2021). Tyto poznatky mohou pomoci lepšímu poznání nádorů, a to zejména jejich heterogenity a evoluce.

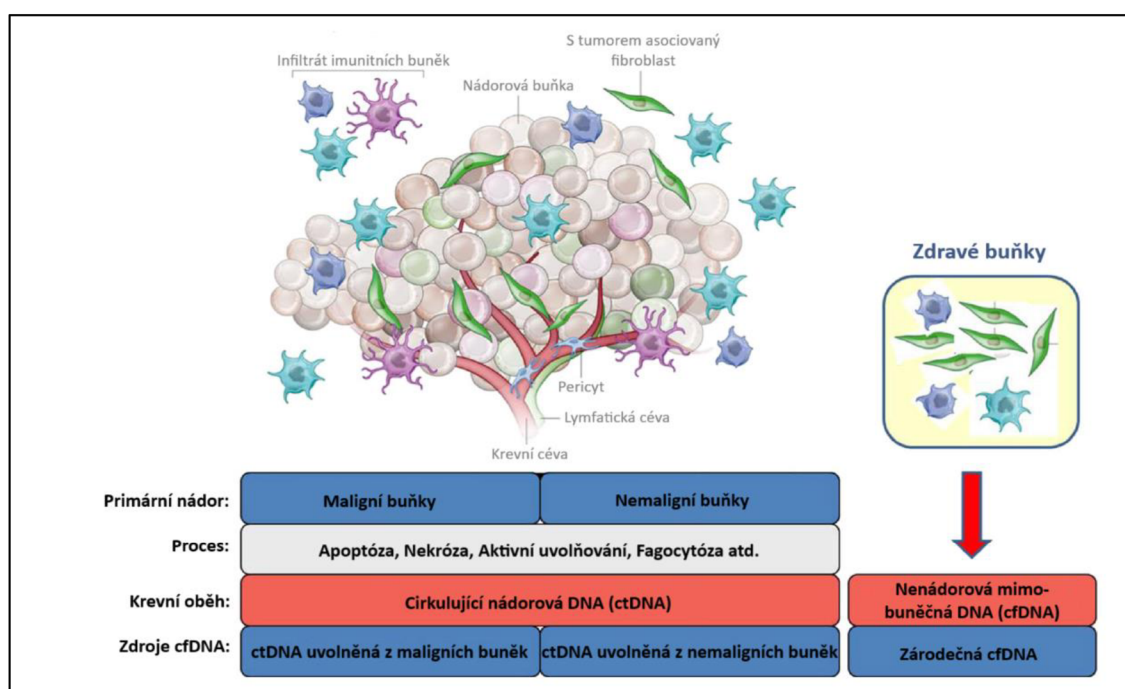
Důležitou roli v celkovém množství ctDNA hraje poločas rozpadu, resp. odstranění ctDNA. Poločas rozpadu je ovlivněn řadou faktorů, a to zejména přístupností ctDNA pro nukleázy. Molekuly ctDNA vázané na proteiny, nebo nacházející se uvnitř

extracelulárních vezikul, jsou hůře přístupné, a tudíž mají delší poločas rozpadu. Poločas rozpadu ctDNA je od řádově několika minut až po dvě hodiny. Příkladem může být poločas rozpadu ctDNA po chirurgickém odstranění nádoru v preklinickém modelu králíků s nádorem hlavy a krku. Poločas rozpadu ctDNA byl v tomto případě 23–52 minut (Muhanna *et al.*, 2017), zatímco série analýz ctDNA u pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC) prokázala poločas rozpadu 114 minut (Diehl *et al.*, 2008). Poločas rozpadu silně závisí na procesu ctDNA clearance. Ten je primárně zajištěn Kupfferovými buňkami jater, ledvinami a makrofágy sleziny a lymfatických uzlin. V souvislosti se zmíněnými orgány by lymfatická drenáž mohla být hlavním zprostředkovatelem ctDNA clearance v mikroprostředí nádoru. Mimo zmíněné orgány hrají důležitou roli v tomto procesu také imunitní buňky a DNA nukleázy přítomné v krevním oběhu (Leung *et al.*, 2016).

Jelikož je ctDNA jen pouhou součástí veškeré cfDNA přítomné v krevním oběhu, může se zdát, že odlišení ctDNA od zbytku cfDNA je obtížnější, než se jeví. Zásadním rozdílem jsou velikost a fragmentace. Jak Thierry *et al.* (2010) zjistili, ctDNA byla v plasmě pacientů s metastázujícím CRC více fragmentovaná, přičemž fragmenty dosahovaly kratších délek (<100 bp). Tento výsledek byl potvrzen i později, kdy se fragment mutantní alelely *BRAF*^{V600E} u pacientů s melanomem vyskytoval častěji v kratších délkách (132-145 bp) oproti běžné formě (wild-type) tohoto genu (165 bp; Underhill *et al.*, 2016). Rozdíl v délce tedy není jen záležitostí jednoho typu nádoru.

Na rozdílné velikosti fragmentů se může podílet i původ ctDNA. Například fragmenty ctDNA uvolněné během nekrózy mohou dosahovat délek až několik kbp (Jahr *et al.*, 2001). Jedná se ovšem o znak typický pro nekrózu, jelikož samotný proces nekrózy je rychlejší a méně organizovaný ve srovnání s apoptózou, a může tedy dojít v případě, kdy je přehlcena fagocytární kapacita, k uvolnění fragmentů větších délek (Galluzzi *et al.*, 2014). Přítomnost takto dlouhých fragmentů může pomoci s diagnostikou nádorů s vysokou mírou nekrózy. Zajímavostí ovšem je, že takto dlouhé fragmenty, původem z nekrózy, mohou být dále degradovány DNA nukleázami přítomnými v krevním oběhu na menší fragmenty (Stephan *et al.*, 2014), takže je možnost využití detekce takto dlouhých fragmentů předmětem diskuze. Oproti tomu během apoptózy vznikají fragmenty ctDNA o délce 167 bp, což odpovídá délce jedné nukleozomové jednotky.

V organismu pacientů léčených s rakovinou známe tři typy zdrojů cfDNA (Obr. 4). Prvním jsou zdravé buňky, uvolňující cfDNA běžnými mechanismy. Další dva zdroje, typické právě pro pacienty s nádory, jsou nádorové buňky a buňky mikroprostředí nádoru uvolňující ctDNA. Jelikož se nádor skládá jak z maligních buněk, tak i z buněk mikroprostředí (endotelové buňky, fibroblasty, stromální buňky, lymfocyty a další imunitní buňky), mohou být oba tyto typy považovány za zdroje ctDNA. Každý z těchto kompartmentů může být vystaven různým procesům, které generují uvolňování různých forem DNA do oběhového systému (Mouliere a Thierry, 2012).

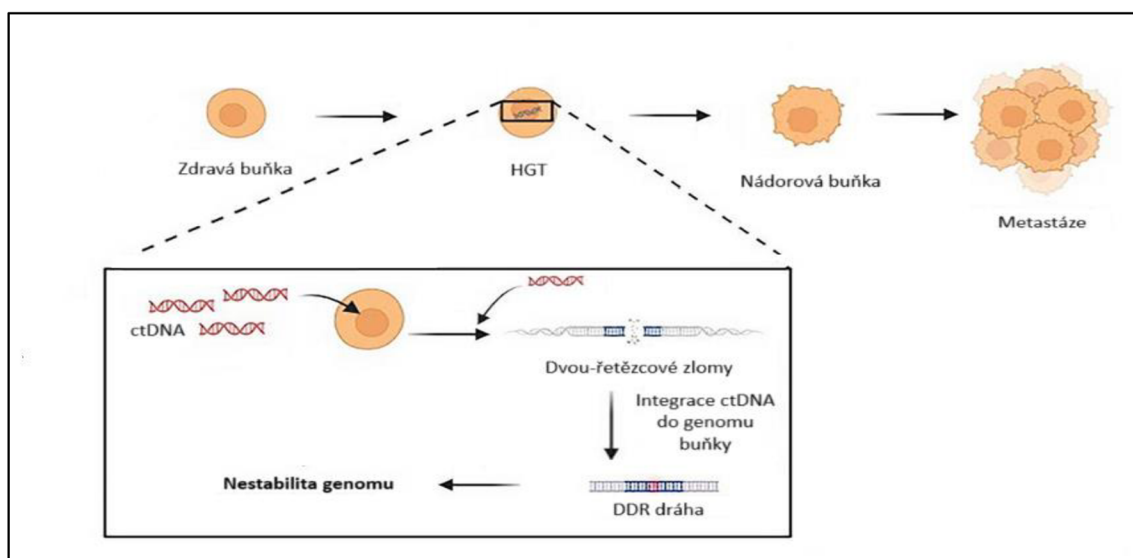


Obr. 4: Zdroje mimo-buněčné DNA a cirkulující nádorové DNA u pacientů s rakovinou. cfDNA – mimo-buněčná DNA, ctDNA – cirkulující nádorová DNA. Upraveno dle Thierry *et al.*, 2016.

I když se může zdát, že k uvolnění ctDNA do krevního oběhu dochází nahodile a bezdůvodně, existuje hypotéza, že by ctDNA mohla mít biologickou funkci. Tzv. hypotéza genometastáze předkládá schopnost ctDNA transformovat zdravé a náchylné buňky transfekcí dominantních onkogenů (z buněk primárního nádoru cirkulujících v krevním oběhu; García-Olmo *et al.*, 1999). Hypotéza byla podpořena několika na sobě nezávislými studiemi, kdy v jedné z nich dokázaly krevní sérum a supernatant lidských rakovinných buněk indukovat transformaci normálních buněk vedoucí k tvorbě tumoru *in vitro*, k čemuž nedocházelo, když byly sérum a supernatant ochuzeny o molekuly DNA (Trejo-Becerril *et al.*, 2012). Jiná studie potvrdila tuto hypotézu *in vitro* i *in vivo*, kdy došlo k transformaci immortalizovaných buněk po expozici krevního séra od pacienta

s rakovinou (Abdouh *et al.*, 2014). Tato hypotéza může být rozumným vysvětlením tvorby metastáz, ovšem je třeba brát v úvahu poměrný nedostatek *in vivo* studií zabývajících se danou tematikou.

Možná biologická funkce ctDNA není spřažena pouze s teorií genometastáze. Mitra *et al.* (2015) zjistili, že ctDNA má i další důležitou funkci. Dle jejich výsledků je cirkulující DNA schopna horizontálního transferu genů do zdravé buňky, kde se následně integruje do genomu této buňky (Obr. 5). Takovýto genom je charakteristický dvouřetězcovými zlomy. Toto následně aktivuje DDR dráhu, po jejíž aktivaci dochází k nestabilitě somatického genomu a následně přeměně zdravé buňky na nádorovou buňku.

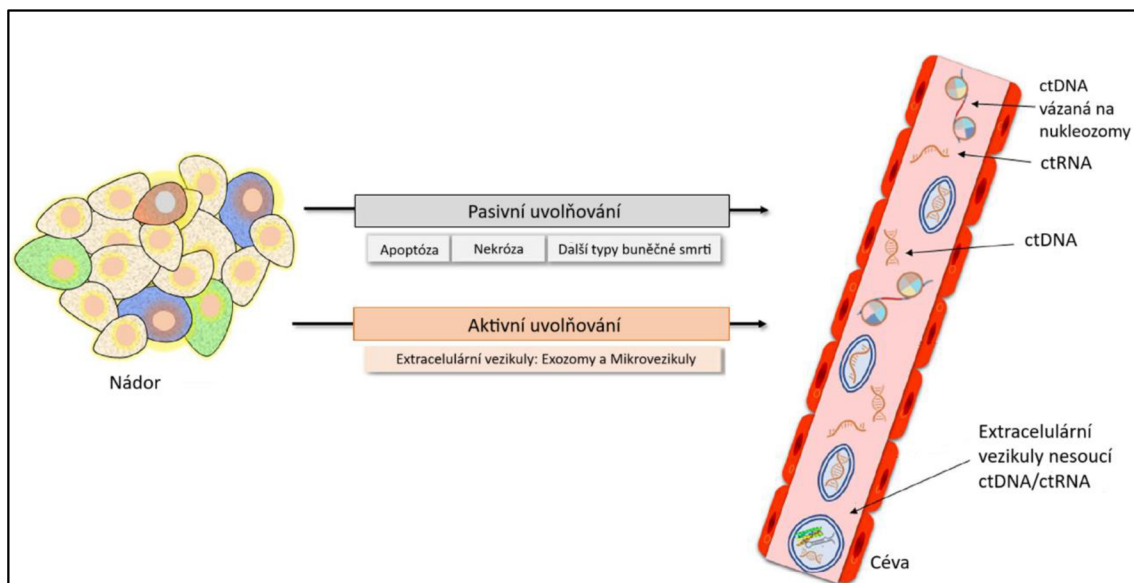


Obr. 5: Přeměna zdravé buňky na nádorovou buňku s následnou tvorbou metastáz po transfekci cirkulující nádorovou DNA. ctDNA – cirkulující nádorová DNA, DDR – DNA damage response, HGT – horizontální transfer genu. Upraveno dle Witz *et al.*, 2024.

3.2.2 Mechanismy uvolnění ctDNA

CtDNA se může do krevního oběhu dostat několika způsoby. Z hlediska lokalizace zdroje jde v podstatě o původ v buňkách nádoru, či v CTC, ovšem přínos CTC je v tomto případě přinejmenším diskutabilní (Stejskal *et al.*, 2023). Z buněk nádorů může být ctDNA uvolněna řadou mechanismů, lišících se v energetice buňky. Uvolňovací mechanismy můžeme takto rozdělit na pasivní a na ty vyžadující aktivní transport ctDNA z buňky (Obr. 6). Do pasivních mechanismů nespádají pouze jednotlivé typy buněčných smrtí (apoptóza, nekróza, onkolýza, ferroptóza a pyroptóza), ale i CIN může ve finále vést až k uvolnění ctDNA z buňky (Schütz *et al.*, 2015; Grabuschnig *et al.*, 2020). Díky závislosti aktivního uvolňování na energii může být uvolnění ctDNA regulováno. Mezi

aktivní mechanismy patří zejména sekrece prostřednictvím extracelulárních vezikul (EV).



Obr. 6: Mechanismy uvolňování cirkulující nádorové DNA (ctDNA) do krevního oběhu. CtDNA může být uvolněna pasivně důsledkem buněčné smrti, nebo aktivně jako součást extracelulárních vezikul. ctDNA – cirkulující nádorová DNA, ctRNA – cirkulující nádorová RNA. Upraveno dle Stejskal *et al.*, 2023.

3.2.2.1 Pasivní mechanismy

Pasivní mechanismy uvolnění ctDNA do krevního oběhu jsou ve většině případů důsledkem přirozených procesů probíhajících uvnitř mikroprostředí nádoru. K smrti nádorových buněk, následované uvolněním molekul ctDNA, může dojít řadou mechanismů. Všeobecně jsou jako hlavní zdroje vnímány apoptóza a nekróza, i když jejich přesný příspěvek není znám (Wan *et al.*, 2017; Grabuschnig *et al.*, 2020). Jsou důsledkem mnoha stresů spjatých s rapidní proliferací nádoru. Rapidní proliferací dochází k lokálnímu vyčerpání živin, k zánětům, oxidativnímu stresu, hypoxii, produkci tkáňově specifických transkripčních faktorů apod., kdy všechny tyto faktory působí stresově na buňky, což může vyústit až ke zmíněné buněčné smrti (Baghba *et al.*, 2020).

Apoptóza je formou programované buněčné smrti za účelem udržování homeostatické rovnováhy. Dochází k ní prostřednictvím enzymů kaspáz, jejichž zapojení vede ke smrštění buňky, ke kondenzaci chromatinu a k fragmentaci. Následně dochází k tvorbě tzv. apoptických tělísek, jež obalují obsah buňky, včetně nukleových kyselin. Apoptická tělíska jsou následně zpracována fagocyty (Battistelli a Falcieri, 2020). Pouze v případě, kdy dojde k přehlcení kapacity fagocytů, nebo jejich inhibici, dojde k uvolnění DNA z apoptických tělísek do krevního oběhu (Jahr *et al.*, 2001).

Díky znalosti některých mechanismů lze odlišit původ alespoň části frakce ctDNA, tak jak je to v případě apoptózy. V brzkých fázích apoptózy je DNA degradována na větší fragmenty (50–300 kbp), které jsou následně našťipány na nukleozomové jednotky o velikosti 167 bp. Tato délka je dána velikostí DNA omotané okolo jednoho nukleozomu (147 bp) a velikostí volné DNA (linker DNA, 20 bp). Délka těchto fragmentů je dána fragmentací specifickými nukleázami (DNáza aktivovaná kaspázou, DNáza I L-3 atd.), které jsou aktivovány apoptickým stimulem (Korn *et al.*, 2005; Mizuta *et al.*, 2013). Nukleázy následně našťipou DNA specificky v internukleozomových regionech, jež nejsou chráněny histony. Díky tomu část ctDNA cirkuluje v krevním oběhu ve formě nukleozomu (Obr. 5; Snyder *et al.*, 2016). K tvorbě menších fragmentů nedochází v tomto případě díky sterickému bránění, kdy nukleáza nedokáže nasednout na úsek DNA obmotávající se kolem nukleozomu (Hu *et al.*, 2021).

Nekróza, na rozdíl od apoptózy, více reflektuje nepříznivé prostředí nádoru. Typickými znaky nekrotizujících buněk jsou pórovitost membrán a disfunkce organel, což může vést k nahodilému uvolnění buněčného obsahu, včetně nukleových kyselin, které jsou tak vystaveny intra- a extracelulárním nukleázám, případně dalším degradativním látkám (např. volné radikály; Thierry *et al.*, 2016; Kustanovich *et al.*, 2019). Prostřednictvím nesystematického uvolnění a degradace DNA mohou vznikat větší fragmenty o velikosti několika tisíc párů bází (kbp), které jsou následně uvolněny do krevního oběhu (Thierry *et al.*, 2016). Komplexnost celého procesu je umocněna produkcí řady látek atrahující imunitní buňky (zejména makrofágy a fagocyty), jež eliminují uniklý obsah, čímž dochází k tvorbě zánětů v okolních tkáních (Gobeil *et al.*, 2001; Stejskal *et al.*, 2023).

Vedle již dvou zmíněných typů buněčné smrti existují i další buněčné smrti, které mohou přispívat ke zvýšení koncentrace ctDNA. Pyroptóza je typem regulované buněčné smrti, jež je závislá na tvorbě pórů v plazmatické membráně prostřednictvím proteinů z rodiny gasdermin, která je často důsledkem zánětlivé aktivace kaspázy (Galluzi *et al.*, 2018). Nekroptóza je buněčná smrt podobná apoptóze s tím rozdílem, že není závislá na kaspáze a že dochází k prasknutí membrány buňky a vyjití buněčného obsahu (Galluzi *et al.*, 2018). K aktivaci nekroptózy může docházet i během působení metabolických stresů (Liu a Jiao, 2020). Onkóza neboli ischemická buněčná smrt je závislá na expresi specifických proteinů. Buněčná smrt je indukována ischemickou degradací endonukleázami, a to jako odpověď na letální poškození buňky

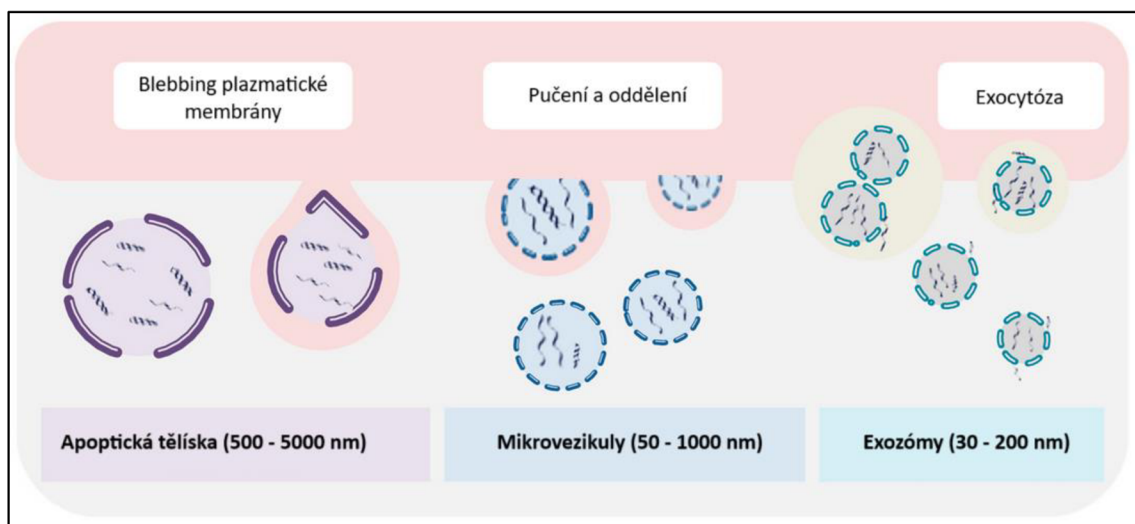
(Weerasinghe a Buja, 2012). Nádory, u kterých dochází často k onkóze, mají většinou narušený iontový gradient a zvýšenou expresi iontových kanálů (Peters *et al.*, 2017). Ferroptóza je zahájena oxidativním poškozením intracelulárního mikroprostředí jako důsledku akumulace lipidových peroxidů. Podléhá konstantní regulaci glutathion peroxidáze 4 a může být inhibována lipofilními antioxidanty a chelátory železa (Galluizi *et al.*, 2018). Krom oxidativního stresu může být ferroptóza zahájena vyplýváním živin (Riegman *et al.*, 2019). Přesná role těchto mechanismů buněčné smrti v uvolňování ctDNA je zatím neznámá a vyžaduje další studie.

Pasivním mechanismem, který nepatří mezi buněčné smrti, ale může způsobit uvolnění ctDNA, je CIN (Schutz *et al.*, 2015). Existuje řada způsobů, jimiž může dojít k uvolnění ctDNA do extracelulárního prostoru, a každý z těchto procesů je modulován řadou biologických faktorů (Bronkhorst *et al.*, 2018). Jedním z hypotetizovaných způsobů je uvolnění ctDNA ve formě mikrojadér obsahujících chybně segregovanou chromosomovou DNA během mitózy (Grabuschnig *et al.*, 2020). Chybně segregované chromosomy jsou obaleny vlastní jadernou membránou. V nádorových buňkách bohatých na CIN dochází k tvorbě většího množství mikrojadér oproti zdravým buňkám (Norppa a Falck, 2003).

Mimo to se fragmenty chromosomů, které se během mitózy nezačlení zpět do celistvých chromosomů, mohou spojit, a vytvořit tak extrachromosomální kruhové DNA fragmenty nazvané „double minutes“ (DM). DM vznikají spojením fragmentů jednoho, či více chromosomů. Fragmenty jsou spojovány v nepřírozeném pořadí a orientaci díky spojování nehomologních konců, a/nebo opravou zlomů vzniklých v důsledku mikrohomologie (Leibowitz *et al.*, 2015). DM se často vyskytují v mnoha typech rakovin (Xu *et al.*, 2019). Amplifikace DM může zvýšit množství kopií onkogenů daleko efektivněji ve srovnání s amplifikací chromosomů, a vzhledem k tomu podpořit a lépe udržovat heterogenitu nádoru (Turner *et al.*, 2017). DM mohou opustit jádro a následně buňku ve formě mikrojadér (Shimizu *et al.*, 2000), nebo mohou být mikrojadra cílem autofágie vedoucí k uvolnění ctDNA do mezibuněčného prostoru (Gekara, 2017).

3.2.2.2 Aktivní mechanismy

Aktivní mechanismy, na rozdíl od pasivních, vyžadují k uvolnění ctDNA energii, jsou regulované a homeostatické. K aktivní sekreci ctDNA do extracelulárního prostoru dochází prostřednictvím EV (Grabuschnig *et al.*, 2020; Stejskal *et al.*, 2023). EV obsahující ctDNA tak mohou potenciálně zefektivňovat invazivnost, progresi nebo rezistenci na terapii nádorů (Suraj *et al.*, 2017; Pös *et al.*, 2018; Grabuschnig *et al.*, 2020). Mimo to se EV podílejí na procesu metastázování (Bian *et al.*, 2019). EV jsou kulovité útvary tvořené jednou fosfo-lipidovou dvouvrstvou a uvolňované buňkou procesy exocytóza (exozómy) a pučením (mikroEV). Mimo již zmíněnou ctDNA mohou obsahovat další nukleové kyseliny, proteiny, receptory nebo lipidy v závislosti na důvodu a mechanismu jejich vzniku. V případě ctDNA jsou nejdůležitější dva typy EV, a to mikrovezikuly a exozómy (Obr. 7; Grabuschnig *et al.*, 2020).



Obr. 7: Typy extracelulárních vezikul jako možných zdrojů cirkulující nádorové DNA. Upraveno dle Grabuschnig *et al.*, 2020.

Exozómy vznikají endozomálně v multivezikulárních tělíscích (MVB) a jsou uvolněny do extracelulárního prostoru splynutím MVB a cytoplazmatické membrány. Jejich velikost je v rozpětí 30 až 200 nm. Nádorová DNA pocházející z exozómů může být transportována do jiných buněk, v nichž může ovlivňovat expresi genů (Cai *et al.*, 2016; Grabuschnig *et al.*, 2020; Sharma a Johanson, 2020). Mikrovezikuly jsou uvolňovány z buňky tvorbou pupene na vnější straně cytoplazmatické membrány, který je následně oddělen. Jsou větší ve srovnání s exozómy (50 až 1000 nm) a fungují zejména jako mediátoři mezi rakovinnými a stromálními buňkami (Bian *et al.*, 2019). Důležitým faktorem, podílejícím se na formování a uvolňování mikrovezikul, je protein

ADP-ribolyzační faktor 6, jehož exprese byla detekována v mikrovezikulách řady nádorových linií a asociována s invazivností nádoru (Muralidharan-Chari *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2019). Díky ochraně ctDNA před nukleázami vyskytujícími se v krevním oběhu by mohly EV znamenat důležitý zdroj těchto molekul, ovšem pro ověření těchto poznatků je třeba přijít s možnostmi standardizované izolace EV.

3.2.2.3 Faktory ovlivňující uvolňování ctDNA

Uvolňování molekul ctDNA není konstantní proces, ale proces dynamický. Může tak být ovlivněn řadou vnějších a vnitřních faktorů a procesů. Jedním z těchto faktorů je buněčná senescence. Buněčná senescence je fyziologický stav trvalého zastavení/přerušování buněčného cyklu, k němuž dochází v proliferujících buňkách po vnitřní a vnější stresové stimulaci (oxidativní stres, poškození DNA/telomer). Jedná se tak o obranný mechanismus buněk, který se snaží omezit zbytečné poškození (Calcinotto *et al.*, 2019). Rostami *et al.* (2020) zjistili, že senescence, jež je indukovaná ionizujícím zářením, může mít negativní vliv na uvolňování cfDNA. Zajímavé ovšem je, že stejná studie zjistila i opačný vliv. Při ošetření již senescentních buněk proteinovým inhibítorem Navitoclax došlo k indukci apoptózy u těchto buněk a k celkovému zvýšení koncentrace uvolněné cfDNA.

Radioterapie je tak dalším možným modulátorem kinetiky uvolňování ctDNA. Na jednu stranu indukuje nekrózu, která je jedním z mechanismů uvolnění ctDNA. Ihned po ozáření dochází k navýšení koncentrace cfDNA, jež s postupujícím časem klesá (Cheng *et al.*, 2009). Na druhou stranu, s odstupem času od provedení radioterapie, dochází až k 90 % snížení koncentrace ctDNA (Leon *et al.*, 1977). V současné době bohužel existuje jen velmi málo studií zabývajících se těmito problematikami.

3.3 Tekutá biopsie

Rozvoj nových diagnostických metod nejen v onkologii je nezastavitelný. Hojně využívané tradiční biopsie se vyvinuly z dříve přímočarých procedur ve velmi komplexní technologii, umožňující detekci genetických mutací a personalizovanou léčbu. Nevýhody v tomto případě ale stále přetrvávají – invazivnost spolu s pacientovým diskomfortem nebo výzvy spojené s heterogenitou nádorů (Alieva *et al.*, 2018). Tekutá biopsie nabízí alternativní přístup k získání tolik potřebného materiálu pro diagnózu nádorů bez nutnosti invazivních zákroků a přímého odběru nádorové tkáně. Označení „tekutá biopsie“ odkazuje na biomarkery nalezené v organismem produkováných tekutinách, poskytující

klinicky drahocenné informace o pacientovi a o probíhajícím onemocnění (Siravegna *et al.*, 2019).

3.3.1 Biomarkery v tekuté biopsii

Biomarkery využívané v tekuté biopsii se liší podle biologické tekutiny, z níž byly izolované, a také v závislosti na typu nádoru. Nejhojněji využívané jsou ctDNA, CTC a EV.

CtDNA coby biomarker poskytuje v diagnostice řadu důležitých informací. Neustále se měnící koncentrace ctDNA v krevním oběhu nám poskytuje cenné informace o nádoru, včetně informací o lokalizaci, velikosti, fázi, metastázování a vaskularizaci (Li *et al.*, 2022). CtDNA se kromě krve nachází i v dalších tělních tekutinách (viz. Zdroje biomarkerů v tekuté biopsii). CtDNA může poskytnout informace o genetické variabilitě nádoru (bodové mutace, inserce a delece nebo přeuspořádání chromozomů), o epigenetických změnách (např. methylace) nebo o ztrátě heterozygoty (Schwarzenbach *et al.*, 2011; Crowley *et al.*, 2013). Nevýhodou zůstává cfDNA uvolňovaná zdravými buňkami, která musí být odlišena, aby nedocházelo ke zkreslování výsledků. V dnešní době se využívá řada technik detekujících ctDNA (Wang *et al.*, 2024). Každá z těchto technik má své výhody a limitace, a tak záleží především na preferenci pracoviště využívajícího danou techniku. DdPCR (z angl. droplet digital PCR) je jednou z nejvíce užívaných metod analýzy výskytu genomických mutací. Její výhodou je vysoká specifita a senzitivita, ovšem za cenu detekce pouze známých mutací (Hindson *et al.*, 2013). BEAMing (z angl. Bead, Emulsion, Amplification and Magnetics), obdobně jako ddPCR dokáže detekovat pouze známé mutace. Výhodou této metody je vysoká senzitivita a poměrně nízké pořizovací náklady (Nakamura, 2016). V případě WGS (z angl. Whole Genome Sequencing) získáváme informace o celém genomu nádoru, včetně výskytu neznámých mutací a onkogenů, což může pomoci s vývojem nových léčebných nebo diagnostických procedur. Bohužel WGS má řadu nevýhod. Jedná se o stále relativně drahou a časově náročnou metodu s obtížnou kontrolou kvality (McGuire *et al.*, 2008). Kvantitativní analýzy ctDNA v jednom časovém bodě mohou umožnit stanovení fáze nádoru a prognózu, zatímco sekvenční analýzy napomáhají selekci cílených terapií (Arisi *et al.*, 2022).

Dalším využívaným biomarkerem jsou cirkulující nádorové buňky (CTC). I přes jejich nízký výskyt mohou být CTC využívány při diagnostice, léčbě, monitorování

nádoru a zejména ve výzkumu (Yu *et al.*, 2011). Buňky jsou ve srovnání s ctDNA a EV velmi složité entity, díky čemuž slouží jako bohatý zdroj informací o proteinech, DNA, RNA a dalších molekulách v nich přítomných. Z tohoto pohledu mohou být využívány v širokém spektru proteomických a transkriptomických studií nebo ve studiu signálních drah (Siravegna *et al.*, 2017). CTC mohou být kultivovány *in vitro* za účelem produkce CTC linií, určených k dalšímu výzkumu v oblasti onkologie (Liu *et al.*, 2021). Nízká přítomnost CTC v krevním oběhu představuje výzvu pro efektivní izolaci (Gold *et al.*, 2015). Proto se dá postup práce s CTC rozdělit na dvě části. První, separace a obohacení CTC, spočívá v oddělení co největšího množství CTC od ostatních buněk ve vzorku. K separaci jsou využívány specifické metody pro CTC (centrifugace s hustotním gradientem, filtrace přes membránu, vazba specifické protilátky na antigeny CTC (např. EpCAM, CKs apod.). Druhou částí jsou identifikační metody využívající k identifikaci především průtokovou cytometrii, imunofluorescenční barvení, FISH (z angl. Fluorescence *in situ* hybridization), RT-PCR nebo proteomické metody (Wang *et al.*, 2024).

EV, stejně jako ctDNA, jsou biomarkery vyskytující se v řadě tělních tekutin. Svoji podstatou, coby útvary nesoucí buněčný náklad (DNA, proteiny, lipidy, mRNA, miRNA atd.), nám umožňují získat data o aktuálním stavu onemocnění (Marar *et al.*, 2021). Značnou výhodou EV je široké spektrum zdrojů, odkud lze EV izolovat. Kromě krve se nacházejí i ve slinách, moči, mateřském mléce nebo spermatu (Wang *et al.*, 2024). Pro úspěšnou analýzu je nejdříve nutné překonat obtíže spojené se separací a purifikací EV (rozdílná velikost, funkce, zdroj). K izolaci EV se hojně využívá centrifugace s hustotním gradientem, ultrafiltrace nebo různé druhy chromatografií. V závislosti na povaze nákladu se využívají různé detekční metody, jako RT-PCR, sekvenování genomu a proteomické metody (Wang *et al.*, 2024).

3.3.2 Zdroje biomarkerů v tekuté biopsii

Hlavní výhodou tekuté biopsie je široká paleta tekutin, ze kterých lze izolovat biomarkery. Jako „nevýhodu“ lze brát v potaz to, že neexistuje jeden ideální zdroj pro všechny typy nádorů. Všeobecně nejrozšířeněji využívaná je krev. Krev je bohatá na široké spektrum biomarkerů ctDNA, CTC, EV a miRNA, což z ní dělá vhodný zdroj. Klinicky se krev využívá zejména u nádorů, u nichž nelze provést klasické tkáňové biopsie (např. nemalobuněčný karcinom plic; Horn *et al.*, 2019). Nevýhodou ovšem

zůstává velké množství nenádorové cfDNA, nebo naopak nízký výskyt CTC (Gold *et al.*, 2015).

Moč představuje neinvazivní zdroj nádorových biomarkerů. Z toho plyne možnost odebrání vzorků v pravidelných intervalech, díky čemuž lze sledovat změny v onemocnění v čase, zejména u urologických nádorů. Molekuly přítomné v moči (ctDNA, miRNA, proteiny, peptidy) napomáhají zkoumání dynamiky nádorů. CtDNA původem z moči obsahuje kratší fragmenty (<100bp), které prošly glomerulární filtrací, a také delší fragmenty přímo z nádorových buněk urologických nádorů. Výhody jsou zejména vyšší poměr ctDNA a cfDNA ve prospěch ctDNA oproti krevním vzorkům nebo vysoká senzitivita na urotheliální karcinomy. Data získaná z ctDNA mohou doplňovat data z krevní ctDNA. Nevýhodou je limitace množství ctDNA glomerulární filtrací (Tivey *et al.*, 2022; Bao *et al.*, 2024).

Sliny, podobně jako moč, jsou neinvazivní zdroj biomarkerů pro tekutou biopsii. Jejich využití se zvyšuje zejména pro detekci a monitorování nádorů trávicího traktu. Slinné biomarkery se ale neomezují jen na tyto nádory. Araújo *et al.* (2023) detekovali nekódující RNA asociované s orálními nádory. Nevýhodou slin je opět nízká výtěžnost ctDNA nebo využití vysoce specifikovaných analytických technik z důvodu krátké délky fragmentů ctDNA (40–60 bp; Tivey *et al.*, 2022).

Mozkomíšni mok je dalším cenným zdrojem biomarkerů u nádorů centrálního nervového systému. Vzhledem k těsné blízkosti k samotným nádorům a k menšímu počtu imunitních buněk obsahuje vysoké množství ctDNA (Siravegna *et al.*, 2017; Bao *et al.*, 2024). Výhodou je i vyšší poměr ctDNA ku cfDNA oproti krevní plazmě. Podstatnou nevýhodou však je invazivnost získávání mozkomíšního moku. Lumbální punkce představuje riziko, a může tak limitovat odběr vzorků (Tivey *et al.*, 2022).

Peritoneální tekutina je dobrým zdrojem biomarkerů u CRC, pankreatických nádorů nebo nádorů slepého střeva. Stejně jako mozkomíšni mok se peritoneální tekutina nachází v těsné blízkosti nádorů, což se promítá do vyšší koncentrace ctDNA. Stejně tak i poměr ctDNA ku cfDNA je vyšší. Výhodou je zejména možnost odběru před i po prodělání operace za účelem vyhodnocení rizika opakovaného výskytu nádoru. Jedná se opět o invazivně získaný zdroj biomarkerů (Tivey *et al.*, 2022).

Tekutá biopsie tak představuje důležitý mezník v diagnostice nádorových onemocnění, umožňující alternativní přístup v léčebných procesech zejména vzhledem

k možnosti neinvazivního pojetí. Díky širokému rozpětí využitelných biomarkerů dokáže poskytnout v kombinaci s analytickými metodami natolik potřebná data, důležitá v managementu nádorových onemocnění, včetně CRC.

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro experimenty byly použity dvě lidské nádorové buněčné linie kolorektálního karcinomu, a to HCT116 (ATCC[®], kat. č. CCL-247[™]) a HT-29 (ATCC[®], kat. č. HTB-38[™]). Buňky HCT116 byly kultivovány v McCoy's 5A médiu s L-Glutaminem, doplněným o 10% FBS a 1X směs Penicillin-Streptomycin (finální koncentrace 100U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu). Buňky HT-29 byly kultivovány v RPMI-1640 médiu s L-Gltaminem, doplněným o 10% FBS a 1X směs Penicillin-Streptomycin (finální koncentrace 100U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu).

Dále byly použity vzorky krevní plazmy čtyř pacientů s kolorektálním karcinomem. Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Ostrava a pacienti podepsali informovaný souhlas s účastí ve studii.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, kat. č. D2650)
- Absolutní ethanol $\geq 99,8\%$ (VWR Chemicals, kat. č. 437433T)
- Fetal bovine serum (FBS [Gibco[™], kat. č. 10270106])
- Inhibitor proteáz Halt[™] Protease Inhibitor Cocktail (ThermoFisher Scientific[™], kat. č. 78430)
- Isopropanol (MP Biomedicals, kat. č. 194006)
- McCoy's 5A médium s L-Glutaminem (Lonza, kat. č. BE12-688F)
- MiliQ voda
- M-PER[®] Mammalian Protein Extraction Reagent (ThermoFisher Scientific[™], kat. č. 78501)
- Penicillin-Streptomycin solution 100X (Biosera, kat. č. XC-A4122)
- RPMI-1640 médium s L-Glutaminem (Lonza, kat. č. 12-702F)
- TrypLE[™] Express Enzyme 1x, no phenol red (ThermoFisher Scientific[™], kat. č. 12604013)

Použité soupravy

- Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies Inc., kat. č. 5067-4626)

- ddPCRTM Mutation Detection Assays, Validated (FAM+HEX [Bio-Rad, kat. č. 10049550])
- QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, kat. č. 55114)
- QubitTM dsDNA HS Assay kit (InvitrogenTM, kat. č. Q32854)
- QubitTM Protein Assay Kit (InvitrogenTM, kat. č. Q33211)
- Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology[®], kat. č. 9860S)

Použité roztoky a jejich příprava

- 10x PBS: 80 g NaCl, 2,0 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄ rozpustit za stálého míchání v 800 ml dH₂O, upravit pomocí HCl na požadované pH, doplnit vodou do 1000 ml, sterilizovat autoklárováním

Použité próby pro ddPCR

- ddPCR Mutation Assay: *KRAS* p.G13D c.38G>A, Human (Bio-Rad)
- ddPCR Mutation Assay: *PIK3CA* p.H1047R, Human (Bio-Rad)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- 96jamková destička pro ddPCR (Bio-Rad)
- Automatický pipetor Pipetus[®] (HirschmannTM)
- Automatický generátor kapiček (Bio-Rad)
- Bioanalyzátor Agilent 2100 (Agilent Technologies Inc.)
- Centrifuga/vortex Combi-Spin FVL-2400N (Biosan)
- Čtečka kapiček QX 200TM (Bio-Rad)
- Fluorescenční mikroskop Axio Observer D1 (Zeiss)
- Fluorimetr Qubit 4 (Invitrogen)
- Inkubátor HERAcellTM 150i CO₂ (ThermoFisher ScientificTM)
- Inkubátor KS 4000i control (IKA[®])
- Kultivační nádoba 25 cm² (TPP[®])
- Kultivační nádoba 75 cm² (TPP[®])
- Kultivační nádoba 150 cm² (TPP[®])
- Laboratorní váha ED323S Extend Precision Balance (Sartorius)
- Laminární box Herasafe 2025 Biological Safety Cabinet (ThermoFisher ScientificTM)

- Laminární box MSC-Advantage™ Class II Biological Safety Cabinet (ThermoFisher Scientific™)
- Mikroskop Olympus IX51 Inverted Phase Contrast Fluorescence (Olympus)
- Mrazák -80 °C CryoCube (Eppendorf)
- pH metr HI 2211 (Hanna instruments)
- Pipety Eppendorf Research® plus (0,5 – 5000 µl, Eppendorf)
- Stolní centrifuga 5430 (Eppendorf)
- Stolní centrifuga 5810 R (Eppendorf)
- Termoblok ThermoStat C (Eppendorf)
- Termocyklér T100™ (Bio-Rad)
- Utěšňovač PCR destiček PX1™ (Bio-Rad)
- ViCell™ XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter)
- Vodní lázeň Julabo TW8 (Julabo®)
- Vakuová pumpa VP820 (VWR®)

4.4 Použitý software

- Expert 2100 (Agilent Technologies Inc.)
- Microsoft Excel (Microsoft)
- QuantaSoft™ (Bio-Rad)
- Zen Microscopy Software (Zeiss)

4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací metody

4.5.1 Kultivace nádorových linií a sběr materiálu

Obě buněčné linie byly udržovány v inkubátoru při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂ v 25cm² plastových kultivačních nádobách. Obě buněčné linie byly pasážovány v závislosti na konfluenci, v průměru 2x až 3x týdně. Ke stanovení konfluencie a sledování buněčného růstu byl použit světelný mikroskop Olympus IX51. Pasáž byla prováděna při konfluenci mezi 70 % a 80 %. V průběhu pasáže se nejdříve odlilo staré médium do odpadu. Následovalo promytí 1x PBS, slití PBS do odpadu a přidání enzymatické směsi TrypLE™ pro oddělení buněk ode dna kultivační lahve. Během působení enzymatické směsi byly lahve umístěny do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Po uvolnění všech buněk bylo přidáno kultivační médium pro zastavení působení enzymatické směsi. Pro novou násadu kultivační lahve byl použit odpovídající aliquot buněčné suspenze následně doplněný o požadovaný objem média. Počty buněk pro

požadovaný aliquot byly stanoveny pomocí přístroje Vi-Cell™. Lahve byly následně umístěny zpět do inkubátoru.

Sběr materiálu pro sledování kinetiky uvolňování cfDNA probíhal ve dvanáctihodinových intervalech. Před začátkem kultivace bylo na každou 25cm² lahev nasazeno 700 tis. buněk. Každý vzorek byl sbírán v duplikátu pro zvýšení přesnosti dat. Po dvanácti hodinách od nasazení se vyměnilo všem buňkám médium a první sběr média a sklizeň buněk byly provedeny po uplynutí dalších dvanácti hodin. Sbírání se médium pro izolaci cfDNA a buňky nádorové linie pro izolaci proteinů. Kultivační médium bylo slito hned na začátku do 15ml falkony. Médium bylo nejdříve stočeno ve stolní centrifuze při 3000 rcf a 4 °C po dobu 10 minut. Po stočení byl odpipetován supernatant do čisté 15ml falkony. Ponechal se mrtvý objem 1 ml s účelem minimalizace kontaminace vzorku genomickou DNA. Vzorek byl opět stočen při 12 000 rcf a 4°C po dobu 10 minut. Stočený vzorek byl rozpipetován po 2ml aliquotech a uskladněn v -80 °C. Opět byl ponechán mrtvý objem 1 ml.

Sběr buněk byl prováděn formou pasáže. Po zastavení enzymatické směsi TrypLE™ kultivačním médiem byl celý obsah přelit z kultivační nádoby do 15ml falkony a změřen počet buněk pomocí přístroje Vi-Cell™. Následovalo stočení vzorku při 1400 rpm po dobu 5 minut. Byl odpipetován supernatant a peleta byla rozsuspendována v 1x PBS a přepipetována do menších 2 ml mikrozkrumavek. Vzorky byly opět stočeny při stejných parametrech jako poprvé a supernatant odpipetován. Suchá peleta byla zamrazena do -80 °C.

Sběr materiálu pro sledování vlivu senescence na kinetiku uvolňování cfDNA probíhal stejně jako pro sledování kinetiky uvolňování cfDNA s rozdílem v délce intervalů. Intervaly byly v tomto případě dvacetičtyřhodinové. Delší časové intervaly byly zvoleny z důvodu zaručení jistoty ustálení senescence.

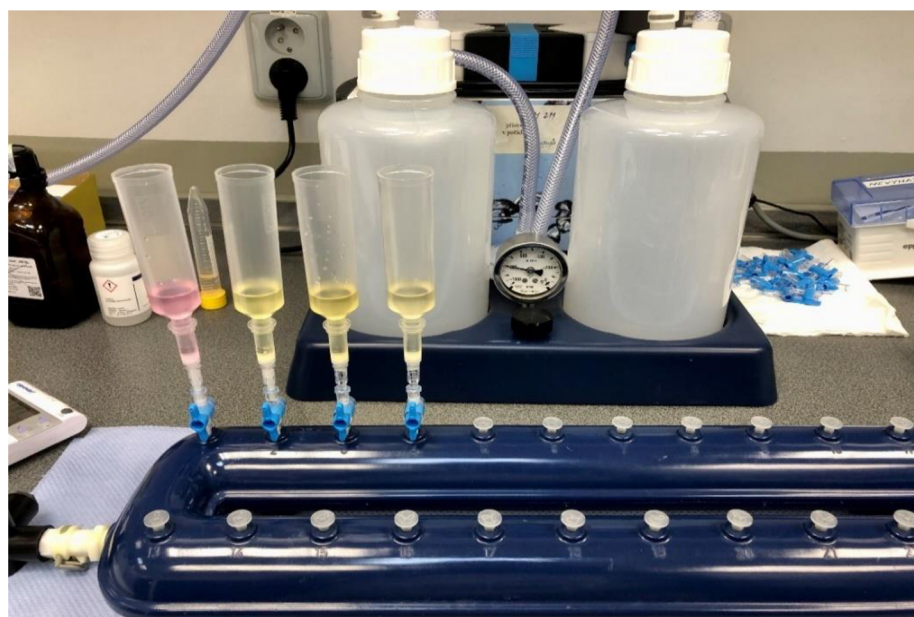
4.5.2 Izolace a kvantifikace cfDNA

Pro izolaci cfDNA z médií a plazmy pacientů (viz biologický materiál) byla použita souprava pro vakuovou izolaci cfDNA QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit. Celý postup byl proveden dle oficiálního protokolu výrobce. Vzorky byly nejdříve stočeny při 16 000 rcf a 4 °C 5 minut a ekvilibrovány na pokojovou teplotu. V mezičase byly připraveny pracovní roztoky (Tab. 1). Do 50 ml falkon bylo napipetováno 400 µl proteinázy K, 4 ml vzorku a 4 ml pufru ACL. Směs byla vortexována 30 sekund

a následně umístěna na 30 minut do 60 °C vodní lázně. Po uplynutí 30 minut bylo ke směsi přidáno 7,2 ml pufru ACB a směs byla opět vortexována 20 sekund a následně inkubována 5 minut na ledu. V mezičase byla připravena vakuová pumpa s nastavci z této izolační soupravy (Obr. 8).

Tab. 1: Příprava pracovních roztoků pro izolaci cfDNA soupravou QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit

Roztok	Objem zásobního roztoku (ml)	Přidávaná látka	Objem přidávané látky (ml)	Celkový objem pracovního roztoku (ml)
Pufr ACB	300	Isopropanol	200	500
Pufr ACW1	19	Absolutní ethanol	25	44
Pufr ACW2	13	Absolutní ethanol	30	43
Pufr ACL	Podle počtu vzorků	Pufr AVE s RNA nosičem	Podle počtu vzorků	Podle počtu vzorků



Obr. 8: Vakuová pumpa s nastavci pro izolaci volné cirkulující DNA pomocí QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit.

Po uplynutí 5 minut se směs lyzátu a ACB pufru nalila do 20ml nástavce QIAamp minikolonky a byla zapnuta vakuová pumpa. Po přefiltrování celé směsi byla pumpa vypnuta a 20ml nástavce byly odstraněny. Na minikolonku se následně aplikovalo 600 μ l pufru ACW1 a zapnula se vakuová pumpa. Po přefiltrování celého objemu pufru ACW1 byla pumpa vypnuta a celý proces se opakoval, nejdříve se 750 μ l pufru ACW2 a poté se 750 μ l absolutního ethanolu. Po přefiltrování celého objemu ethanolu se minikolonka

umístila do 2ml sběrné zkumavky. Bylo provedeno stočení při 20 000 rcf a 22 °C 3 minuty. Minikolonky se následně umístily do nových 2ml sběrných zkumavek a nechaly se inkubovat 10 minut při 56 °C v termobloku pro kompletní vyschnutí membrány filtru. Po uplynutí 10 minut byly minikolonky přemístěny do 1,5ml elučních mikrozkuavek. Na střed membrány filtru bylo přidáno 25 µl elučního pufru AVE a nechala se proběhnout inkubace 3 minuty. K eluci došlo stočením při 20 000 rcf a 22 °C po dobu 1 minuty. Pro zvýšení výtěžku byl eluát přepipetován zpět na membránu, a ještě jednou stočen při stejných parametrech.

Po úspěšné izolaci byla změřena koncentrace DNA v každém vzorku pomocí fluorimetru Qubit 4. Vzorky byly pro kvantifikaci připraveny dle oficiálního protokolu výrobce. Nejdříve byl připraven požadovaný objem Qubit[®] pracovního roztoku (pro jeden vzorek se pracovní roztok skládá z 1 µl Qubit[®] dsDNA HS činidla a 199 µl Qubit[®] dsDNA HS pufru). Nejdříve se připravily dva standardy. Do Qubit[®] assay mikrozkuavek byly připraveny tři standardy a vzorky (Tab. 2). Vzorky i standardy byly následně promíchány na vortexu 2–3 sekundy a inkubovány 2 minuty při pokojové teplotě. Následně byly změřeny na fluorimetru standardy a posléze koncentrace všech vzorků. Po zaznamenání všech koncentrací byly vzorky zamrazeny v -80°C.

Tab. 2: Příprava standardů a vzorků pro Qubit[®] dsDNA HS analýzu

	Objem standardu/vzorku (µl)	Objem Qubit[®] pracovního roztoku (µl)
Standard 1	10	190
Standard 2	10	190
Vzorek	2	198

4.5.3 Extrakce a kvantifikace proteinů

Extrakce proteinů byla provedena pomocí extrakčního činidla M-PER[®] Mammalian Protein Extraction Reagent. Vzorky buněk byly nejdříve vyjmuty z -80 °C mrazáku a inkubovány na pokojovou teplotu. Následně byla připravena směs extrakčního činidla a inhibitoru proteáz v poměru 100:1 (100 µl činidla na 1 µl inhibitoru). Po inkubaci vzorků na pokojovou teplotu byl k peletě přidán 1 ml směsi a celý obsah se propipetoval, dokud nebyla peleta rozsuspendována. Následně byly vzorky lehce promíchány (300 rpm) po dobu 10 minut. Po promíchání byly vzorky stočeny při 14 000 rcf a 22 °C 15 minut. Po stočení byl supernatant přepipetován do čisté mikrozkuavky.

Po provedení extrakce byla změřena koncentrace proteinů ve vzorku pomocí přístroje Qubit[®] 4. Vzorky byly pro kvantifikaci připraveny dle oficiálního protokolu výrobce. Nejdříve byl připraven požadovaný objem Qubit[®] pracovního roztoku (pro jeden vzorek se pracovní roztok skládá z 1 μ l činidla Qubit[®] protein reagent a 199 μ l Qubit[®] protein pufry). Do Qubit[®] assay mikrozku mávek byly připraveny tři standardy a vzorky (Tab. 3). Vzhledem k rozsahu měření koncentrací byly z důvodu zvýšení přesnosti měření vzorky ředěny 10x. Vzorky i standardy byly následně promíchány na vortexu 2–3 sekundy a inkubovány po dobu 15 minut. Po 15 minutách byly nejdříve změřeny standardy a následně koncentrace vzorků. Po zaznamenání všech koncentrací byly vzorky uskladněny do -80 °C.

Tab. 3: Příprava standardů a vzorků pro Qubit[®] protein analýzu

	Objem standartu/vzorku (μl)	Objem Qubit[®] pracovního roztoku (μl)
Standard 1	10	190
Standard 2	10	190
Standard 3	10	190
Vzorek	10	190

4.5.4 **Evaluace velikosti fragmentů cfDNA**

Evaluace velikosti fragmentů vyizolované DNA byla provedena pomocí bioanalyzáru pro kapilární elektroforézu Agilent 2100. K přípravě vzorků byla využita souprava Agilent High Sensitivity DNA Kit a postupovalo se přesně dle protokolu výrobce. Vzorky byly naředěny tak, aby koncentrace DNA ve vzorku byla mezi 100 pg/ μ l a 10 ng/ μ l. Všechny reagenty a vzorky byly ekvilibrovány na pokojovou teplotu. Nejdříve se připravila směs gelové matrice a barviva. Do vialky s gelovou matricí bylo přidáno 15 μ l High Sensitivity DNA barvy. Směs byla promíchána na vortexu a přenesena na kolonku s filtrem. Kolonka byla stočena při 2240 rcf a 22 °C 10 minut. Po stočení bylo 9 μ l gelu nanášeno do specificky označené jamky čipu. Čip byl vložen do nabíjecí stanice a stlačil se píst. Po stlačení pístu do polohy 1 ml se počkalo 60 sekund. Po uplynutí 60 sekund byl povolen píst a po navrácení pístu do původní polohy byl čip odebrán z nabíjecí stanice. Následně bylo napipetováno 9 μ l gelu do dalších tří označených jamek a do zbývajících jamek (pro vzorky a ladder) 5 μ l markeru. Jako další byl do označené jamky napipetován 1 μ l ladderu a jako poslední byly nanášeny vzorky po 1 μ l na zbývajících

jamky. Takto připravený čip byl vložen do adaptéru a promíchán na vortexu 1 minutu při 2400 rpm. Nakonec byl čip vložen do bioanalyzáru a proběhla analýza.

4.5.5 ddPCR

Analýza vzorků za účelem detekce mutací v genech *KRAS* (mutace G13D) a *PIK3CA* (mutace H1047R) byla provedena s využitím metody ddPCR a QuantaSoft™ softwaru. Při práci se postupovalo podle protokolu výrobce s jednou výjimkou. Z důvodu práce s cfDNA o krátkých délkách byl vynechán krok přidání restriktivního enzymu. Všechny vzorky a komponenty pro reakci se nejdříve nechaly inkubovat na pokojovou teplotu a poté byly promíchány na vortexu a krátce stočeny. Byla připravena reakční směs a vzorky byly naředěny na požadovanou koncentraci (Tab. 4). Do 96jamkové ddPCR destičky byla napipetována reakční směs a následně byly napipetovány vzorky, negativní kontroly a pozitivní kontroly.

Tab. 4: Příprava reakční směsi pro ddPCR

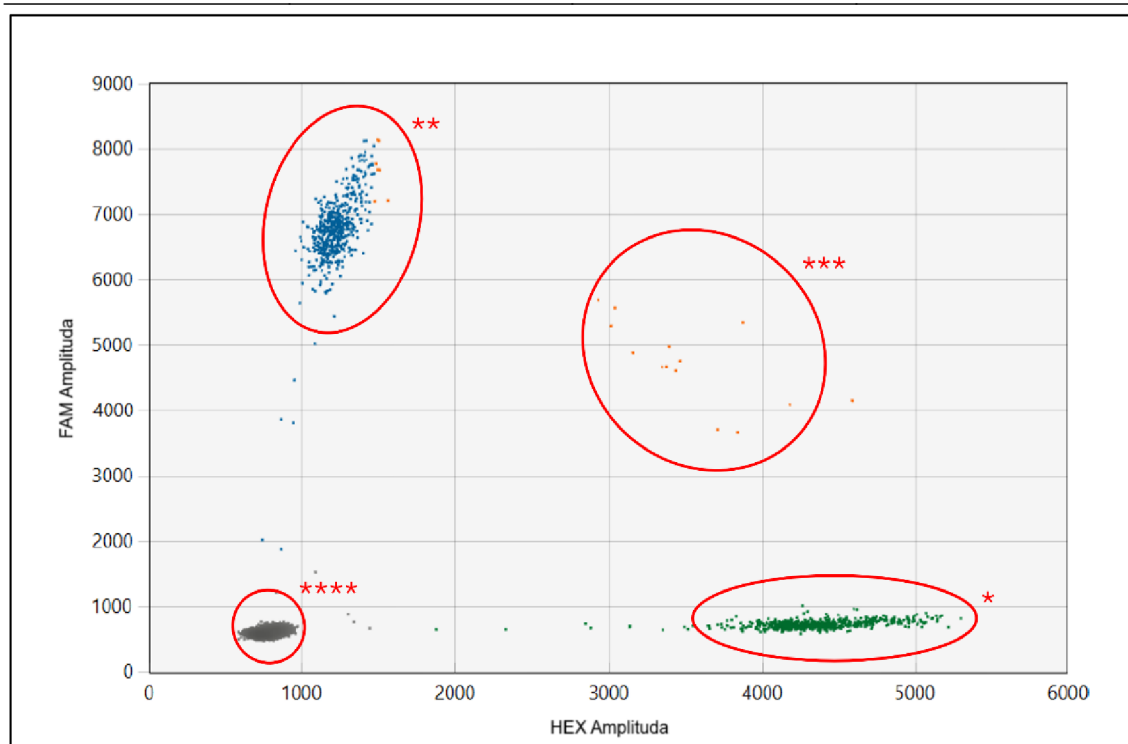
Reagencie	Objem na jednu reakci (μl)	Celková koncentrace
2x ddPCR Supermix for Probes (No dUTP)	11	1x
20x target (FAM) and wild-type (HEX) primery/próby	1,1 každá próba	1x (900 nM primery/250 nM každá próba)
DNA vzorek	variabilní	7 ng
voda	variabilní	–
Celkový objem	22	–

Po napipetování všech vzorků a kontrol byla ddPCR destička zapečetěna tepelnou fólií při 180 °C po dobu 5 sekund pomocí utěšňovače PX1™. Po zapečetění byla ddPCR destička umístěna do nástavce na vortexu a vzorky byly promíchány při 3500 rpm 15 sekund. Po promíchání byla destička stočena při 1000 rcf 1 minutu a byla provedena kontrola přítomnosti bublin na dně jamek. Pokud byly bubliny přítomny, destička se stočila ještě jednou. Následně se připravil automatický generátor kapiček. Nastavilo se rozložení destičky, vložily se kazety pro tvorbu kapiček, pipetovací špičky, odpadní koš a chladič bloček s prázdnou ddPCR destičkou pro nově vytvořené kapičky. DdPCR destička se vzorky byla vložena do připraveného přístroje a byla provedena tvorba kapiček.

Po uplynutí procesu tvorby kapiček byla vyjmuta a následně zapečetěna (180°C, 5 sekund) destička obsahující kapičky. Poté byla přemístěna do termocykléru T100™ a byla provedena PCR (Tab. 5). Jakmile skončila PCR, byla ddPCR destička přemístěna do čtečky kapiček QX200™ a provedl se získání dat a analýza pomocí QuantaSoft™ softwaru. Po dokončení analýzy byla data vizuálně a statisticky vyhodnocena. Jedním z výstupů ddPCR je 2D diagram, znázorňující zastoupení mutovaného a normálního (wild-type) genotypu (Obr. 9). Krom toho ddPCR poskytuje kvantitativní informace o koncentraci jednotlivých alel.

Tab. 5: Teplotní a časový profil PCR

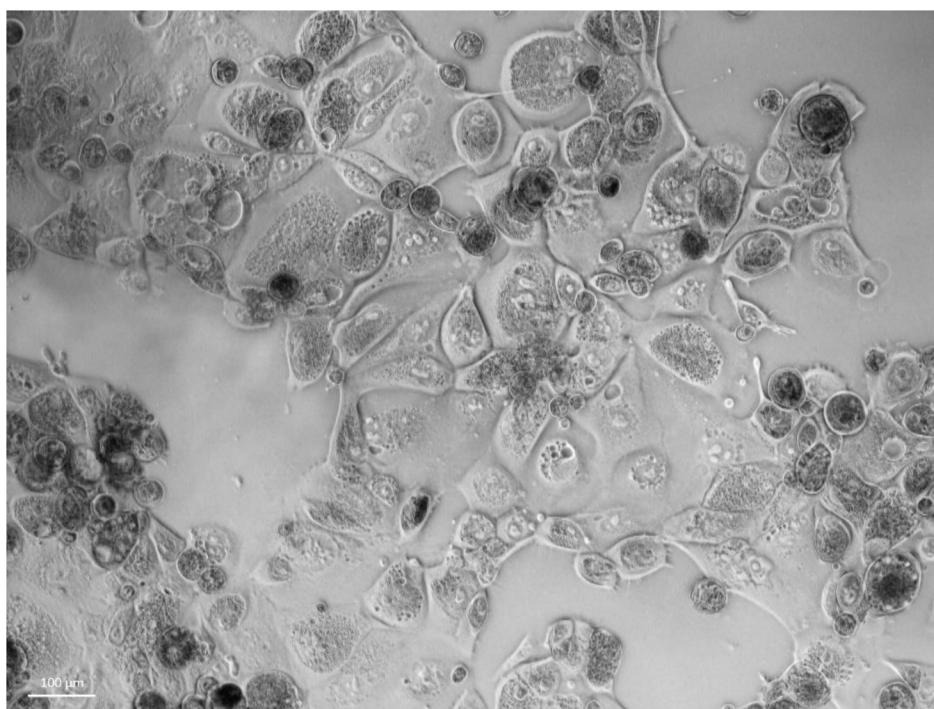
Fáze	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Inkubace	25	3 min	1
Aktivace enzymu	95	10 min	1
Denaturace	94	30 sec	40
Nasedání primerů a prób/extenze DNA	55	1 min	40
Deaktivace enzymu	98	10 min	1
Inkubace	4	nekonečno	1



Obr. 9: Grafické znázornění v podobě 2D diagramu znázorňující detekované populace kapiček, obsahujících mutované alely a wild-type alely genu *KRAS* ve volně cirkulující DNA u HCT116 buněčné linie. * – wild-typ alela; ** - mutantní alela; *** – populace kapiček pozitivní jak pro mutované alely, tak i wild-typ alely; **** – negativní populace; FAM – kanál pro detekci mutované alely; HEX – kanál pro detekci wild-typ alely.

4.5.6 Navození a kontrola senescence

Pro sledování vlivu senescence na kinetiku uvolňování cfDNA bylo třeba nejdříve převést buňky do senescentního stavu. Toho bylo docíleno prostřednictvím rentgenového záření o síle 20 Gy. Délka ozáření se lišila v závislosti na velikosti kultivační lahve. Po ozáření se buňky umístily zpět do inkubátoru a byly inkubovány po následující dva týdny v podmínkách 37 °C a 5 % CO₂. Během těchto dvou týdnů bylo buňkám měněno kultivační médium 3x týdně. Zároveň byly pomocí světelného mikroskopu Olympus IX51 kontrolovány postupné morfologické změny, typické pro senescentní buňky. Během výměny média bylo nejdříve slito staré médium do odpadu, následovalo promytí buněk 1x PBS. Po promytí bylo PBS slito do odpadu a přidáno čerstvé médium. Po dvou týdnech, kdy se z optického hlediska ustálila senescence (Obr. 10), se provedla kontrola, zda jsou buňky opravdu senescentní, a to barvením 35mm jamek kontrolních panelů pomocí β -galaktosidázy (β -Gal).



Obr. 10: Snímek senescentních buněk HCT116 z fluorescenčního mikroskopu. Zvětšení: 10x.

Barvení β -Gal bylo provedeno podle protokolu výrobce. Nejdříve se připravil zásobní roztok X-gal (20mg X-gal rozpuštěno v 1 ml DMSO) a β -Gal barvicí roztok (Tab. 4), kterému bylo následně upraveno pH na hodnotu 6,0. Odebralo se staré médium a buňky byly promyty 1x PBS. Po odlití PBS byl k buňkám přidán 1x fixační roztok

připravený ze 100x zásobního roztoku. Buňky byly inkubovány s fixačním roztokem po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí 15 minut byl odpipetován fixační roztok a buňky byly opět promyty 1x PBS. Následně bylo PBS odlito a k buňkám se přidal β -Gal barvicí roztok. Panel byl zapečetěn parafilmem a proběhla inkubace přes noc při 37 °C v suchém inkubátoru bez CO₂. Po ukončení inkubace byl β -Gal barvicí roztok odlit a do každé jamky byl přidán 70 % glycerol tak, aby byly všechny buňky ponořené.

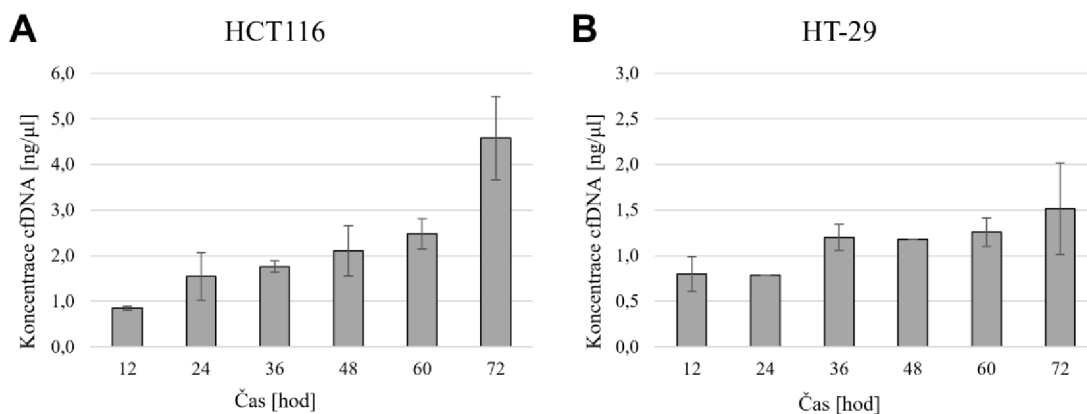
Tab. 6: Příprava β -Gal barvicího roztoku pro barvení senescentních buněk

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem pro jednu 35 mm jamku (μl)
Barvicí roztok	10x	1x	930
Roztok A	100x	100x	10
Roztok B	100x	100x	10
Zásobní roztok X-gal	–	20 mg/ml	50

5 VÝSLEDKY

5.1 Vzorce uvolňování cfDNA

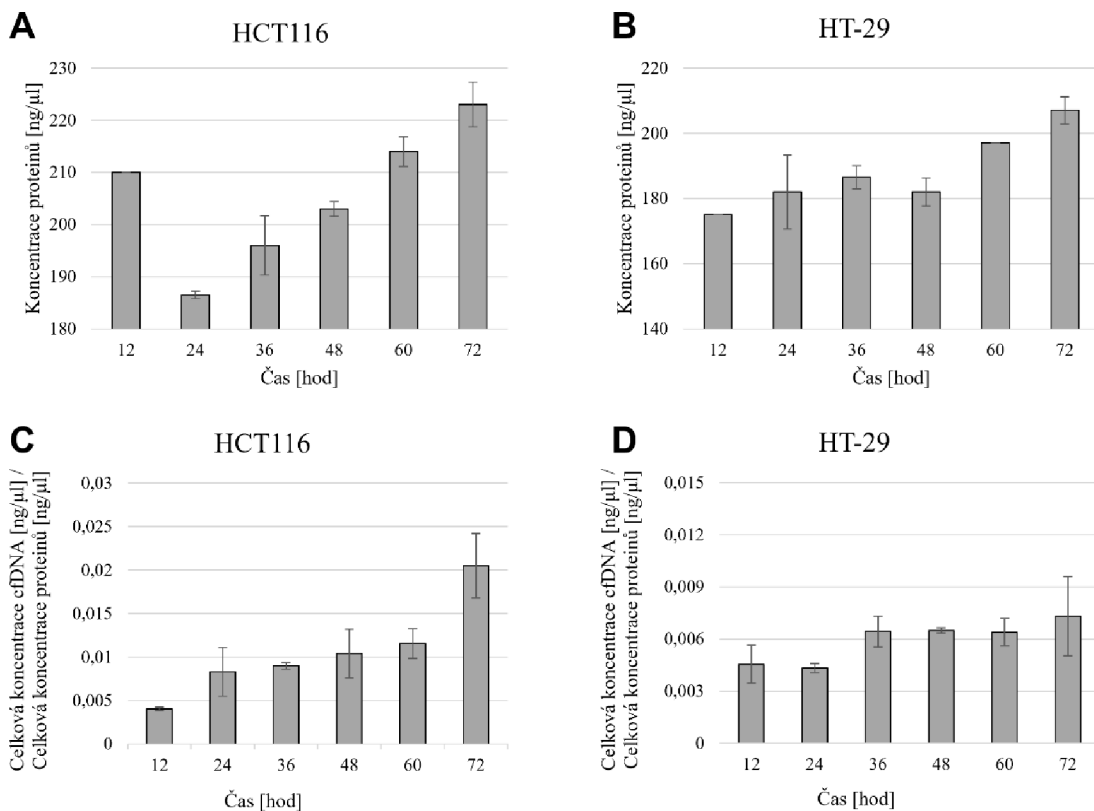
Kinetika uvolňování volné cirkulující DNA (cfDNA) do kultivačního média byla charakterizována v čase u HCT116 a HT-29 nádorových buněčných linií. V průběhu času docházelo k postupnému nárůstu celkového množství u obou buněčných linií (Obr. 11). Zásadním rozdílem byla ovšem dynamika růstu množství cfDNA. V případě linie HCT116 množství uvolněné cfDNA pozvolně narůstalo až do třetího dne, kdy po 72 hodinách došlo k exponenciálnímu nárůstu v koncentraci cfDNA, která se téměř zdvojnásobila z 2,475 ng/μl na 4,575 ng/μl (Obr. 11A). V případě linie HT-29 byl nárůst celkového množství uvolněné cfDNA velice pozvolný po celou dobu kultivace (Obr. 11B). Hodnota koncentrace cfDNA se během prvních 24 hodin téměř nijak nezměnila (0,796 ng/μl po 12 hodinách vs. 0,788 ng/μl po 24 hodinách) a tento trend přetrvával i během následujících 24 hodin, kdy po 36 hodinách došlo k nárůstu koncentrace cfDNA ve srovnání s odběrem po 24 hodinách, ovšem během následujícího odběru byla tato hodnota téměř identická. Po 72 hodinách došlo opět k mírnému nárůstu.



Obr. 11: Grafické znázornění uvolňování volné cirkulující DNA (cfDNA) u buněčných linií HCT116 (A) a HT-29 (B) v časových intervalech od 12 do 72 hodin od poslední výměny média. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám (\pm SD, $n = 2$).

Míra uvolňování cfDNA oběma buněčnými liniemi byla normalizována na celkový obsah buněčných proteinů (Obr. 12). Trend změn koncentrace proteinů v čase je podobný změnám koncentrace cfDNA v čase s jednou výjimkou. U linie HCT116 došlo po 24 hodinách k zásadnímu propadu koncentrace proteinů z 210 ng/μl na 187 ng/μl (Obr. 12A). Tento propad v koncentraci proteinů po 24 hodinách se ovšem neprojevil při vztahování míry uvolňování cfDNA v čase na koncentraci proteinů, kdy je trend obdobný

trendu uvolňování cfDNA (Obr. 12C). Koncentrace proteinů u linie HT-29 v čase postupně narůstá s menším poklesem koncentrace po 48 hodinách (Obr. 12B). Koncentrace cfDNA vztažená na koncentraci proteinů u linie HT-29 je na obrázku 12D. V čase je pozorovatelný trend, kdy během prvních 24 hodin se poměry nijak výrazně neliší a následuje drobný nárůst na hodnotu 0,0064, jež je téměř konstantní během následujících 36 hodin. Po 72 hodinách následuje opětovný nárůst.

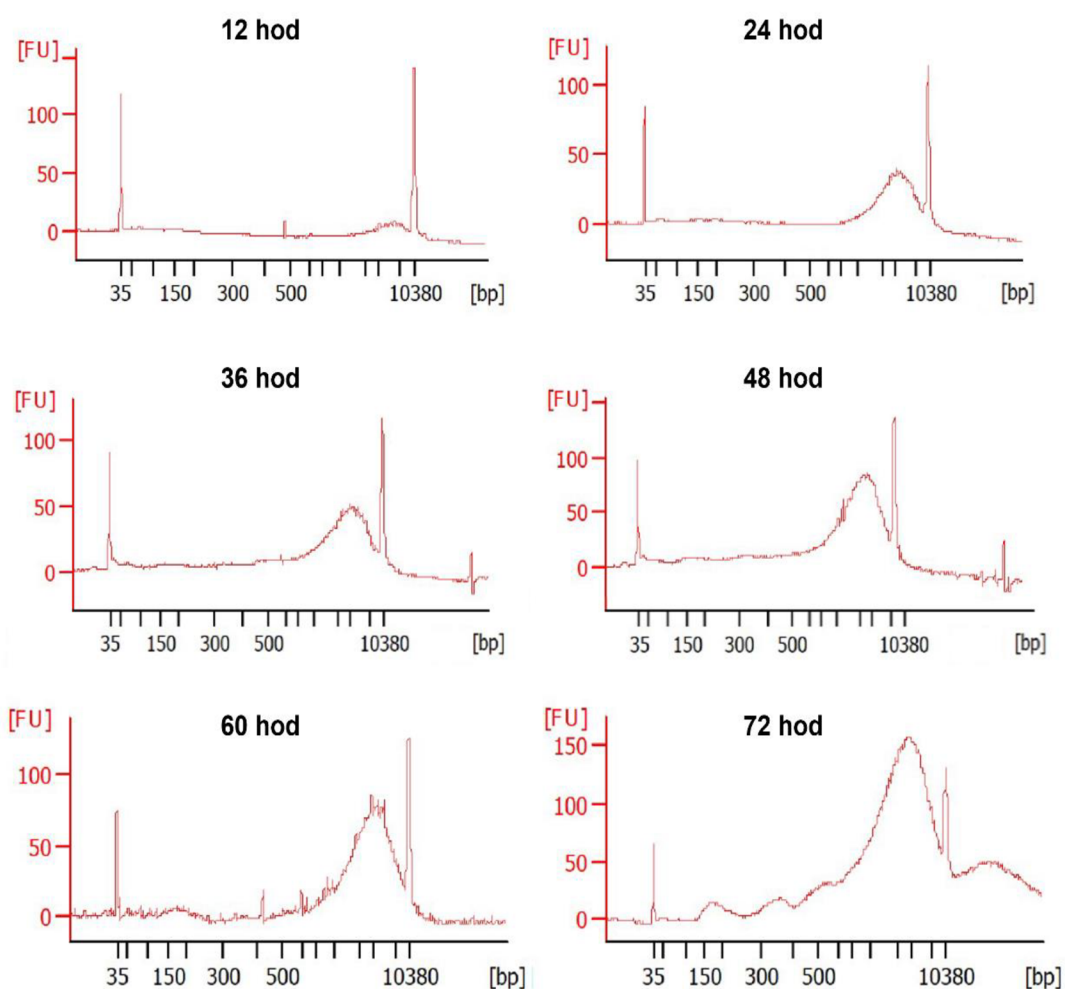


Obr. 12: Grafické znázornění změn koncentrace proteinů u buněčné linie HCT116 (A) a HT-29 (B) v časových intervalech od 12 do 72 hodin od poslední výměny média. Hodnoty změn v koncentraci volné cirkulující DNA byly poté vztaženy na koncentrace proteinů za účelem normalizace hodnot, a to jak u linie HCT116 (C), tak i HT-29 (D). Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchýlkám (\pm SD, $n = 2$).

5.2 Velikostní složení fragmentů cfDNA

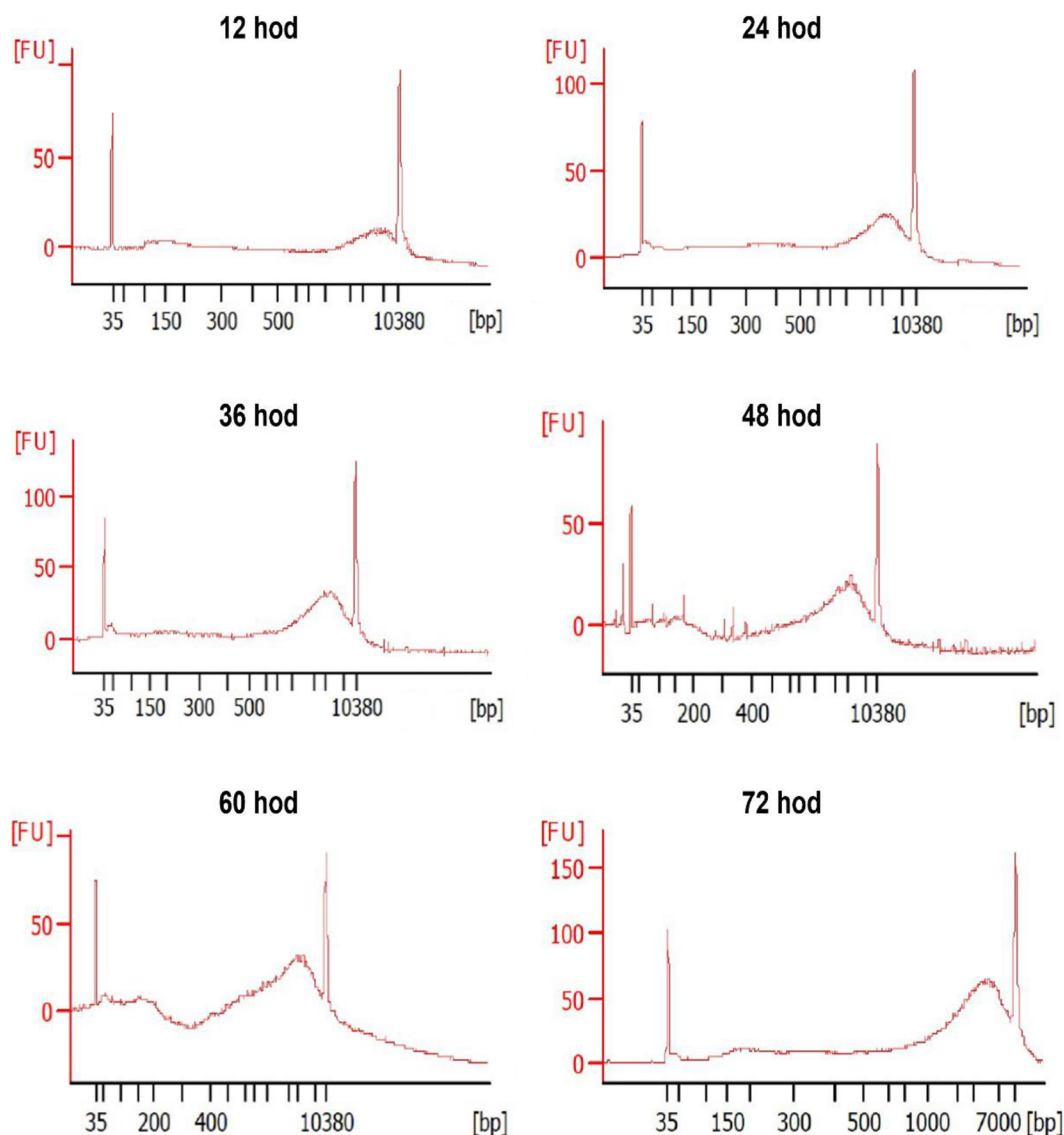
Analýzou velikosti fragmentů cfDNA byly zjištěny změny ve velikostech fragmentů přítomných ve vzorku u obou buněčných linií v čase. Postupně docházelo k poklesu zastoupení delších fragmentů (>2000 bp) a k nárůstu zastoupení fragmentů kratších délek (< 200 bp). U linie HCT116 zpočátku převažovaly fragmenty o velikosti 2500 – 5000 bp a v průběhu času začalo narůstat množství fragmentů kratších délek (Obr. 13). První náznak nárůstu píku v oblasti kratších fragmentů je viditelný po uplynutí 48 hodin od výměny média. Nejcitelněji došlo k nárůstu kratších fragmentů po uplynutí

72 hodin, kdy jsou dobře viditelné píky elektroferogramu v oblasti hodnot 166 a 183 bp, pak v oblasti 339 až 366 bp a v oblasti 449 až 559 bp.



Obr. 13: Kapilární elektroferogramy znázorňující velikosti fragmentů volné cirkulující DNA, izolované z buněk HCT116 v časových intervalech od 12 hodin do 72 hodin od poslední výměny média.

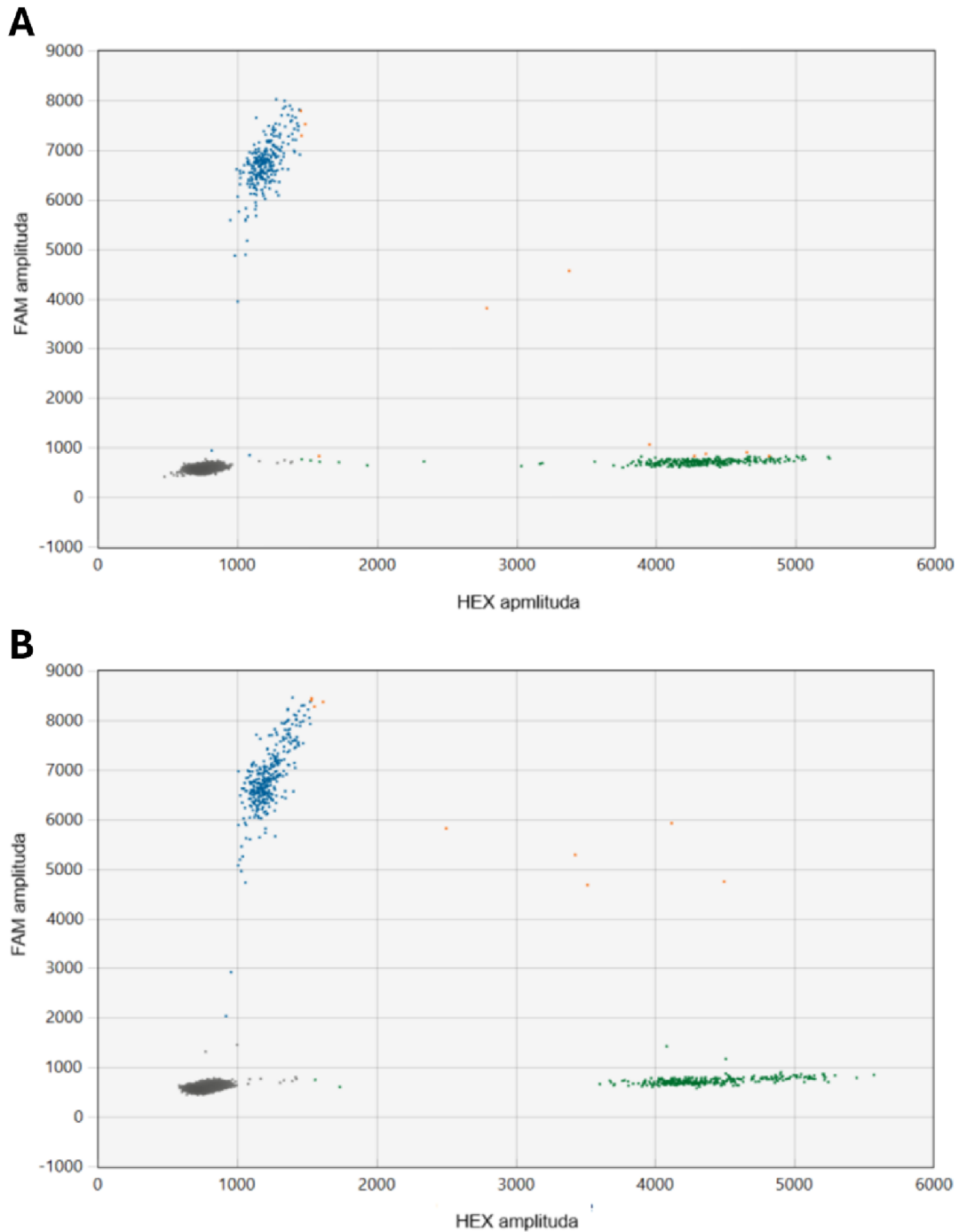
U linie HT-29 během prvních 24 hodin převažovaly fragmenty o velikosti 5000 - 8000 bp (Obr. 14). S postupujícím časem se poměr dlouhých a krátkých fragmentů začal přesouvat ve prospěch kratších fragmentů a po uplynutí 60 hodin od výměny média se nacházela většina fragmentů v oblasti do 2000 bp. Zejména jsou dobře viditelné píky v oblasti 48 až 56 bp a 134 až 176 bp (Obr. 14). Po uplynutí 72 hodin se píky nacházely ve zhruba obdobných místech bez značného posunu k nižším délkám fragmentů.



Obr. 14: Kapilární elektroforegramy znázorňující velikosti fragmentů volné cirkulující DNA, izolované z buněk HT-29 v časových intervalech od 12 hodin do 72 hodin od poslední výměny média.

5.3 Detekce a zastoupení mutací typických pro kolorektální karcinom

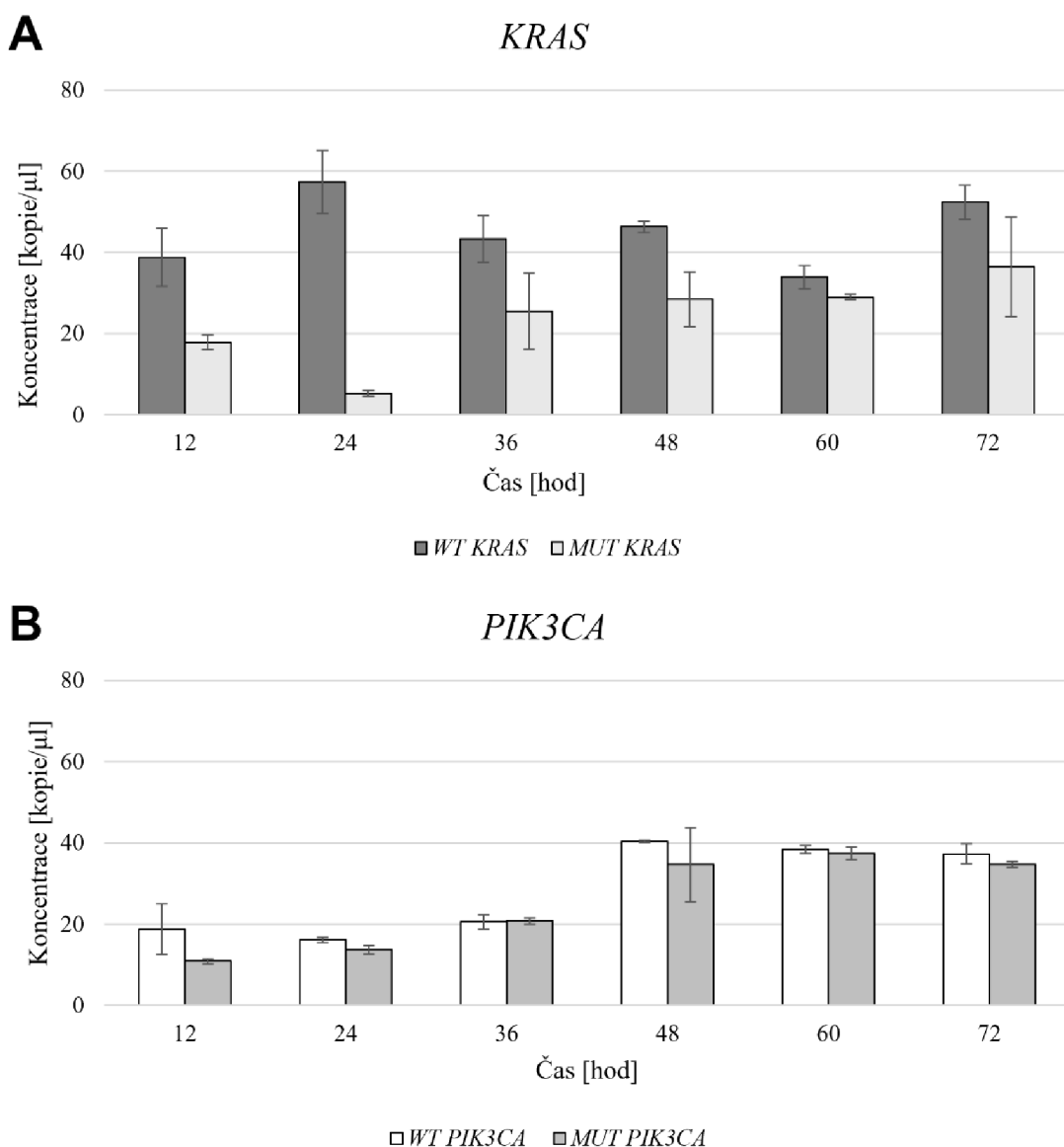
Pro detekci a kvantifikaci zastoupení dvou somatických mutací byla využita pouze buněčná linie HCT116. Ta byla upřednostněna z důvodu vyšších výtěžků cfDNA oproti HT-29 linii (Obr. 11). U linie byly detekovány obě alely genů *KRAS* (Obr. 15A) a *PIK3CA* (Obr. 15B). Kromě detekovaných nemutovaných a mutovaných alel se ve vzorcích vyskytovaly i populace molekul cfDNA s mutovanými alelami v obou genech i populace s wild-type alelami obou genů (Obr. 15).



Obr. 15: 2D diagram znázorňující populace kapiček obsahujících mutované alely a wild-typ alely genu *KRAS* (A) a *PIK3CA* (B) ve volné cirkulující DNA (cfDNA) u buněčné linie HCT116. Modré populace teček představují kapičky s molekulami cfDNA nesoucí mutovanou alelu, zelené wild-typ alelu a oranžové představují kapičky s molekulami cfDNA pozitivními jak pro mutovanou alelu, tak i wild-typ alelu. FAM – kanál pro detekci mutované alely; HEX – kanál pro detekci wild-typ alely.

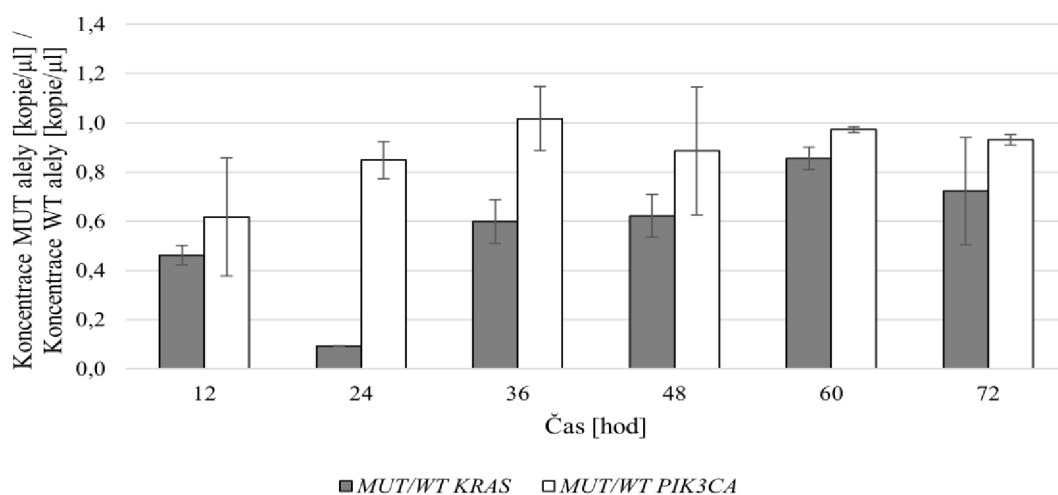
Při porovnání koncentrací mutovaných a nemutovaných alel byly zjištěny rozdíly v těchto hodnotách, a to zejména u genu *KRAS* (Obr. 16A). Koncentrace mutované alely

byla ve všech případech nižší než koncentrace nemutované alely. Zároveň je pozorovatelný výrazný pokles v koncentraci mutované alely po 24 hodinách, následovaný opětovným nárůstem. V případě nemutované alely dochází k přesnému opaku. Po 24 hodinách je koncentrace nemutované alely *KRAS* nejvyšší (57,4 kopií/μl) a postupně klesá až do posledního odběru po 72 hodinách, kdy byl detekován opětovný nárůst. U genu *PIK3CA* jsou trendy ve změnách koncentrace stejné u obou typů alel s nejvyššími hodnotami po 48 hodinách (40,35 kopií/μl) pro nemutovanou alelu, respektive po 60 hodinách pro mutovanou alelu (37,35 kopií/μl, Obr. 16B).



Obr. 16: Grafické znázornění změn koncentrace mutovaných a nemutovaných alel genů *KRAS* (A) a *PIK3CA* (B) u buněčné linie HCT116. Změny byly pozorovány v časových intervalech od 12 do 72 hodin od poslední výměny média. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchýlkám (\pm SD, n = 2).

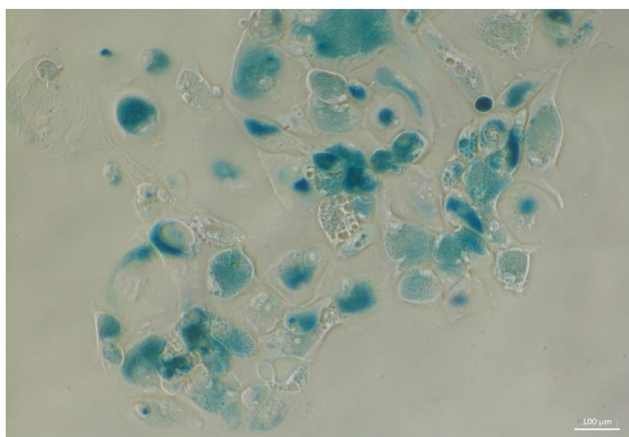
Pro lepší přehlednost byly poměry koncentrací mezi mutovanou a nemutovanou alelou u obou genů vyneseny na samostatný graf (Obr. 17). Lze si tak povšimnout menších rozdílů mezi mutovanou a nemutovanou u genu *PIK3CA*, kdy jsou poměry blíže hodnotě 1 ve srovnání s genem *KRAS*.



Obr. 17: Grafické znázornění poměrů koncentrací mutovaných a nemutovaných alel genů *KRAS* a *PIK3CA* u buněčné linie HCT116. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám (\pm SD, $n = 2$).

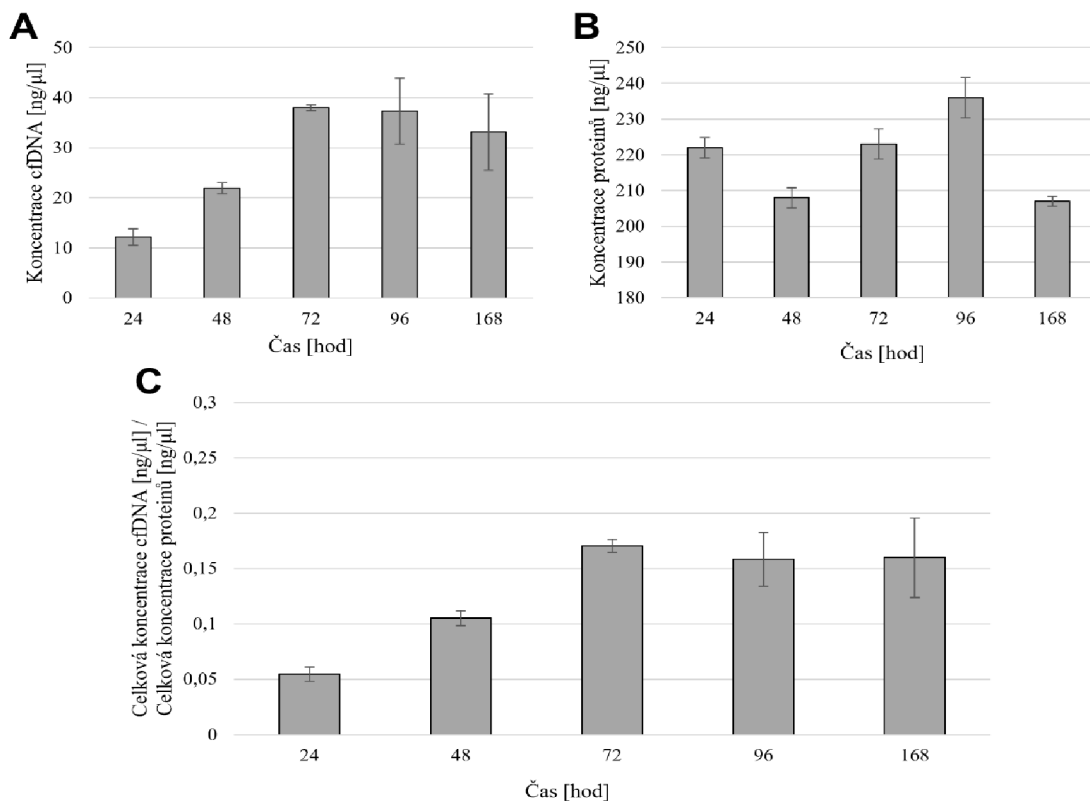
5.4 Vliv senescence na kinetiku uvolňování cfDNA, velikost fragmentů a zastoupení mutací

Po dvou týdnech od ozáření došlo u 99 % buněk HT-29 k úmrtí, zatímco u buněk HCT116 se po úmrtí většiny buněk (cca 80 %) ustálila senescence, a proto byla pro experimenty sledování vlivu senescence na kinetiku uvolňování cfDNA zvolena nádorová linie HCT116. U buněk byla potvrzena senescence prostřednictvím β -Gal barvení (Obr. 18). Pro zjištění vlivu senescence byla na těchto senescentních buňkách provedena stejná série experimentů jako v bodech 5.1 až 5.3 výše.



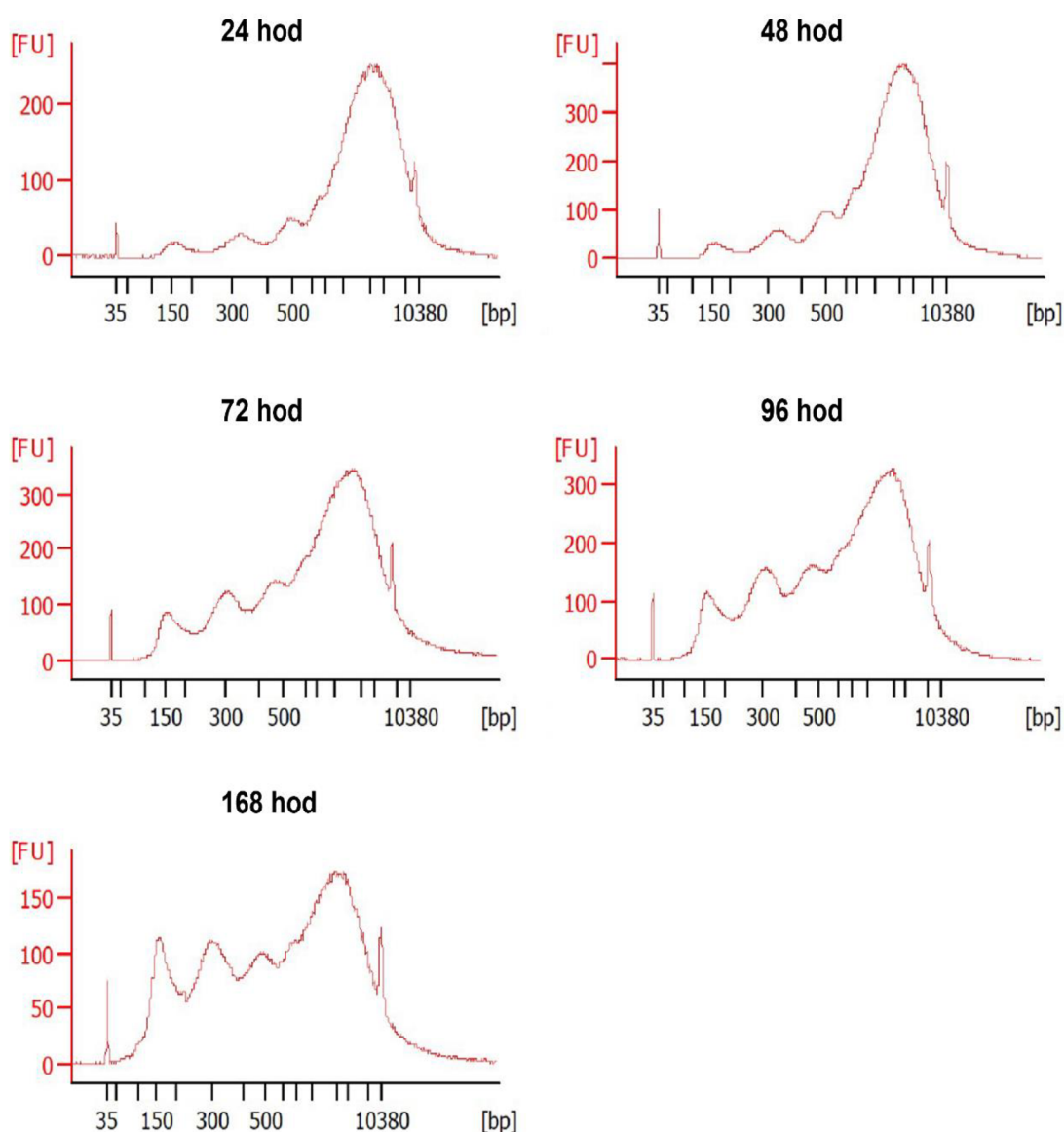
Obr. 18: Snímek senescentních buněk obarvených pomocí β -Gal barvení. Zvětšení: 10x.

Ve vzorcích senescentních buněk byly detekovány vyšší koncentrace cfDNA v porovnání s nesenescenčními buňkami (Obr. 19A). Koncentrace cfDNA stoupla během prvních 72 hodin až k hodnotám 38 ng/μl, což je o 33,5 ng/μl více než u nesenescenčních buněk za stejný časový úsek (Obr. 11). Během následujících 24 hodin došlo k ustálení koncentrace na obdobnou hodnotu. Po uplynutí dalších 72 hodin došlo k poklesu celkové koncentrace cfDNA z 37,5 ng/μl na 33 ng/μl. Rozdíl mezi senescentními a nesenescenčními buňkami v koncentraci buněčných proteinů nebyl statisticky významný (Obr. 19B). Jiný byl ovšem trend ve změnách koncentrace buněčných proteinů v porovnání s nesenescenčními buňkami. Koncentrace proteinů po 24 hodinách byla vyšší než ta po 48 hodinách. Následně docházelo k nárůstu koncentrace s maximem po uplynutí 96 hodin, kdy koncentrace dosáhla hodnoty 236 ng/μl. Při posledním odběru došlo k nejcitelnějšímu propadu koncentrace, a to o 29 ng/μl, což je nejnižší hodnota za celou dobu. Za účelem normalizace pak byly hodnoty koncentrace cfDNA vztaženy na celkovou koncentraci buněčných proteinů ve vzorku (Obr. 19C).



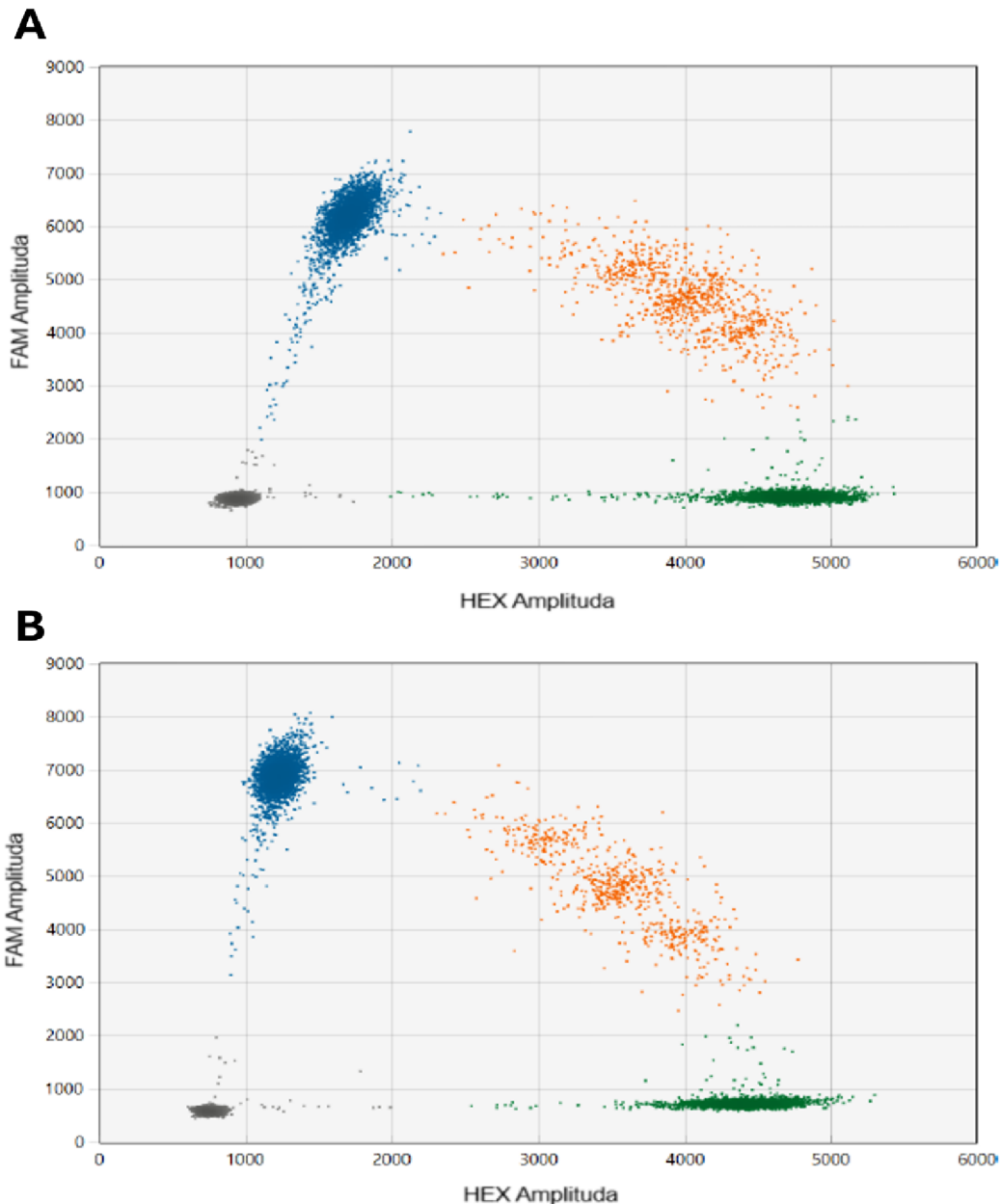
Obr. 19: Grafické znázornění změn koncentrací volné cirkulující DNA (cfDNA, A) a proteinů (B) u senescentních buněk nádorové linie HCT116 v časových intervalech od 24 do 168 hodin od poslední výměny média. Hodnoty změn v koncentraci volné cirkulující DNA byly poté vztaženy na koncentrace proteinů za účelem normalizace hodnot (C). Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám (\pm SD, $n = 2$).

Dále byla provedena analýza velikosti fragmentů cfDNA u senescentních buněk. V porovnání s nesenescenčními buňkami jsou hned od počátku dobře pozorovatelné píky pro kratší délky fragmentů (167 bp), následované píky násobků nukleozomů (tzv. žebříčkovitý vzor). Zpočátku převažuje množství delších fragmentů oproti kratším a v průběhu času dochází k nárůstu množství kratších fragmentů a k úbytku delších fragmentů (Obr. 20). Po uplynutí 168 hodin převažuje množství kratších fragmentů nad delšími, ovšem ve vzorcích byly stále přítomné i fragmenty větších délek (až 8 466 bp dlouhé).



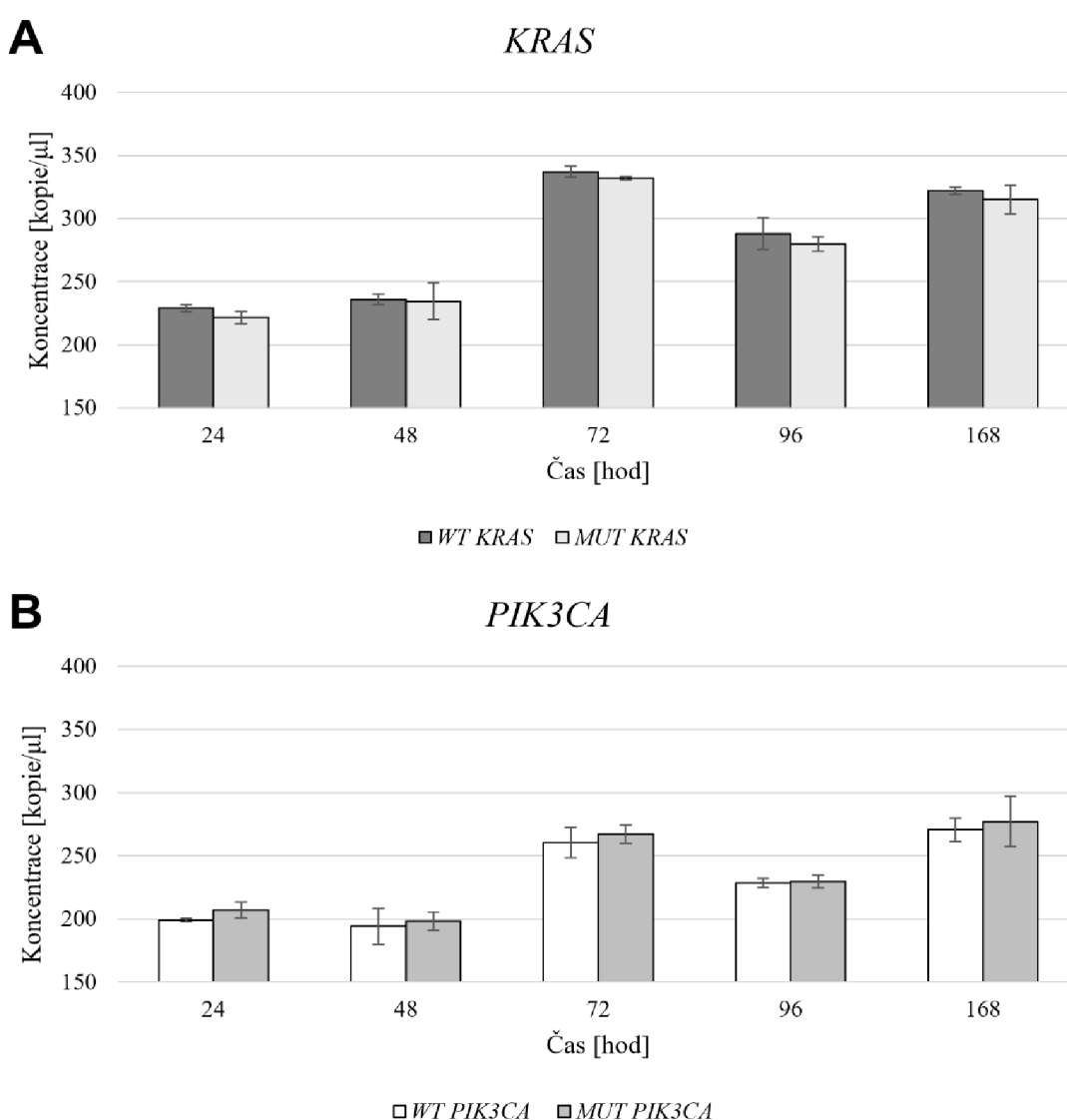
Obr. 20: Kapilární elektroforegramy znázorňující velikosti fragmentů volné cirkulující DNA, izolované ze senescentních buněk nádorové linie HCT116 v časových intervalech od 24 hodin až po 168 hodin od poslední výměny média.

U cfDNA ze senescentních buněk byly stejně jako u nesenescentních buněk detekovány jak mutovaná, tak i nemutovaná alela genů *KRAS* (Obr. 21A) a *PIK3CA* (Obr. 21B). Na rozdíl od nesenescentních buněk zde byla přítomná výrazně větší populace kapiček, obsahujících molekuly cfDNA s mutovanou alelou obou genů.



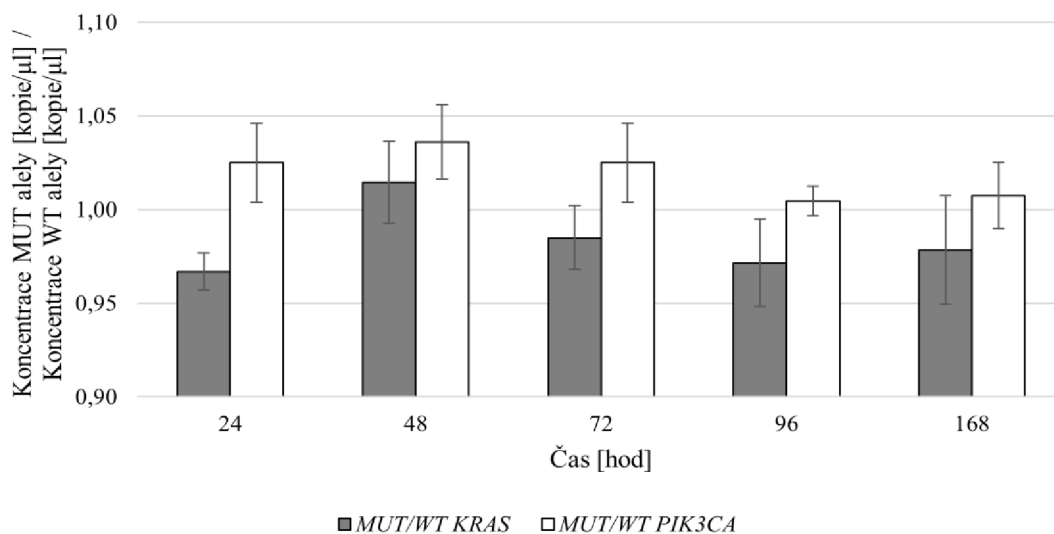
Obr. 21: 2D diagram znázorňující populace kapiček obsahujících mutované alely a wild-tyt alely genu *KRAS* (A) a *PIK3CA* (B) ve volné cirkulující DNA (cfDNA) u senescentních buněk nádorové linie HCT116. Modré populace teček představují kapičky s molekulami cfDNA nesoucí mutovanou alelu, zelené wild-tyt alelu a oranžové představují kapičky s molekulami cfDNA pozitivními jak pro mutovanou alelu, tak i wild-tyt alelu. FAM – kanál pro detekci mutované alely; HEX – kanál pro detekci wild-tyt alely.

Celkově vyšší množství cfDNA se projevilo i na koncentraci obou forem genů *KRAS* a *PIK3CA*. V porovnání s nesenescentními buňkami jsou koncentrace několikanásobně vyšší (Obr. 16 vs. Obr. 22). Koncentrace mutované i nemutované alely genu *KRAS* v průběhu prvních 48 hodin velice pozvolně narůstají, s velkým nárůstem po uplynutí 72 hodin (nárůst o 101 kopií/μl nemutované alely, respektive 97,5 kopií mutované alely). Během následujících 24 hodin dochází k poklesu koncentrací obou alel následovanému mírným vzrůstem po dalších 72 hodinách (Obr. 22A). V případě genu *PIK3CA* je trend ve změnách koncentrací obou typů alel obdobný s trendem u genu *KRAS* (Obr. 22B).



Obr. 22: Grafické znázornění změn koncentrace mutovaných a nemutovaných alel genů *KRAS* (A) a *PIK3CA* (B) u senescentních buněk nádorové linie HCT116. Změny byly pozorovány v časových intervalech od 24 do 168 hodin od poslední výměny média. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám (\pm SD, $n = 2$).

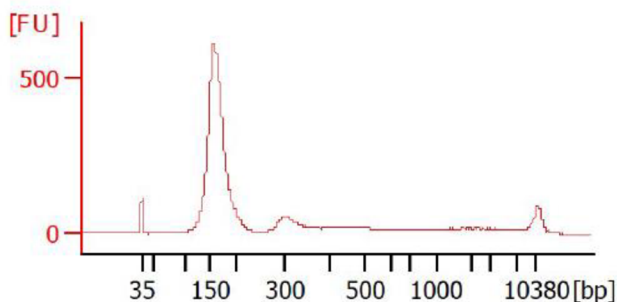
Pro lepší přehlednost byly opět poměry koncentrací mezi mutovanou a nemutovanou alelou u obou genů vyneseny na samostatný graf (Obr. 23). Zásadním pozorovaným rozdílem oproti nesenescentním buňkám byl rozdíl v poměru koncentrace mutované alely ke koncentraci nemutované u genu *KRAS* (Obr. 17 vs. Obr. 23). U senescentních buněk jsou poměry koncentrací mutované alely k nemutované v blízkosti hodnoty 1 (od 0,967 po 1,015). V případě genu *PIK3CA* jsou hodnoty poměrů blízké hodnotě 1 (od 1,008 po 1,036).



Obr. 23: Grafické znázornění poměrů koncentrací mutovaných a nemutovaných alel genů *KRAS* a *PIK3CA* u senescentních buněk nádorové linie HCT116. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám (\pm SD, n = 2).

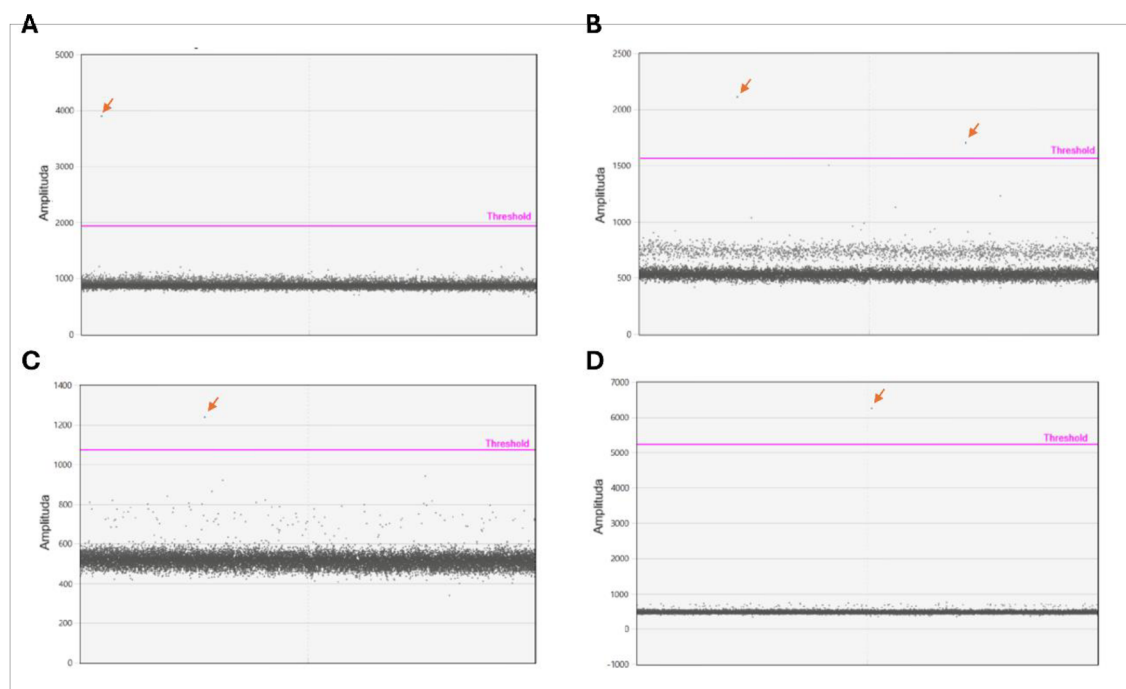
5.5 Detekce mutací genů *KRAS* a *PIK3CA* u pacientů s CRC

Po izolaci cfDNA z plazmy pacientů s CRC byla provedena analýza velikostního složení fragmentů cfDNA. Pro představu je vyobrazen elektroferogram pacienta MRD3320 SK1 (Obr. 24). Na elektroferogramu jsou dobře viditelné dva píky reprezentující fragmenty o velikosti 158 bp a 302 bp.



Obr. 24: Kapilární elektroferogram znázorňující velikost fragmentů volné cirkulující DNA izolované z krevní plazmy pacienta MRD3320 SK1.

Pouze u jednoho pacienta byla detekována mutace G13D genu *KRAS*, zatímco mutace H1047R genu *PIK3CA* byla detekována u tří ze čtyř pacientů (Obr. 25). Získaná data od všech pacientů pak byla doplněna do Tab. 7.



Obr. 25: Diagramy z ddPCR znázorňující detekované fragmenty volné cirkulující DNA (cfDNA) obsahující mutované alely genů *KRAS* a *PIK3CA* u pacientů s kolorektálním karcinomem. A – diagram pacienta MRD3320 SK1 s detekovanou mutací G13D genu *KRAS*; B – diagram pacienta MRD3320 SK1 s detekovanou mutací H1047R genu *PIK3CA*; C – diagram pacienta MRD3321 SK1 s detekovanou mutací H1047R genu *PIK3CA*; D – diagram pacienta MRD3297 SK5 s detekovanou mutací H1047R genu *PIK3CA*. Šipky označují detekovaný fragment cfDNA s mutovanou alelou.

Tab. 7: Souhrnná data od jednotlivých pacientů s kolorektálním karcinomem

Pacient	Množství plazmy (ml)	Koncentrace volné cirkulující DNA (ng/μl)	Pozitivní detekce mutace		Koncentrace (počet kopií/μl)	
			<i>KRAS</i> G13D	<i>PIK3CA</i> H1047R	<i>KRAS</i> G13D	<i>PIK3CA</i> H1047R
MRD3318 SK1	1	1,09	ne	ne		
MRD3320 SK1	2	9,46	ano	ano	1,44	2,34
MRD3321 SK1	1,5	2,68	ne	ano		1,28
MRD3297 SK5	1	1,68	ne	ano		1,35

6 DISKUZE

Kolorektální karcinom (CRC) je jedním z nejčastěji se vyskytujících karcinomů po celém světě, vyznačující se vysokou mortalitou, která je důsledkem diagnózy onemocnění až v pokročilých stádiích (Sung *et al.*, 2021). Tekutá biopsie se nabízí jako jedna z možných alternativ k běžné tkáňové biopsii, jejíž největší nevýhody, jako jsou invazivnost, pacientův diskomfort nebo heterogenita nádoru, stále přetrvávají (Alieva *et al.*, 2018). Tekutá biopsie využívá řady biomarkerů detekovatelných v tělních tekutinách. Mezi tyto biomarkery patří cirkulující nádorová DNA (ctDNA), cirkulující nádorové buňky (CTC) nebo extracelulární vezikuly. CtDNA představuje díky snadnému získávání a alternacím v koncentraci v tělních tekutinách dobře využitelný a obsáhlý zdroj informací o nádorovém onemocnění (Li *et al.*, 2022). Cílem této diplomové práce bylo analyzovat a charakterizovat ctDNA u buněčných linií CRC a pacientů s CRC.

Celková hladina volné cirkulující DNA (cfDNA) se odlišovala v závislosti na nádorové linii. U linie HCT116 byly detekovány značně vyšší hladiny cfDNA ve srovnání s linií HT-29. Hlavním důvodem je pravděpodobně odlišný čas potřebný ke zdvojnásobení počtu buněk (z angl. doubling time), který mají HCT116 téměř o 12 hodin kratší ve srovnání s HT-29 (Bazzocco *et al.*, 2015). Obě linie ale vykazovaly vzrůstající trend koncentrací cfDNA, jenž byl pozorován např. u buněk nádorové linie osteosarkomu 143B (Bronkhorst *et al.*, 2016). Vzrůstající trendy u obou zůstaly i po vztažení koncentrací cfDNA na koncentraci proteinů, a to i přes odchylku v koncentraci proteinů u linie HCT116, kde po 24 hodinách došlo k propadu.

V průběhu času docházelo ke změnám ve velikosti fragmentů cfDNA. S postupujícím časem se zvyšovalo množství menších fragmentů s dobře pozorovatelným žebříčkovitým vzorem násobků délky odpovídající DNA ovinuté kolem jednoho či více nukleozomů a linker DNA úbytkem dlouhých fragmentů. Tento posun v délkách fragmentů u cfDNA byl zaznamenán v řadě studií (Bronkhorst *et al.*, 2016; Aucamp *et al.*, 2017). Zpočátku jsou přítomny zejména dlouhé fragmenty cfDNA (>2000 bp), které jsou pravděpodobně uvolňovány do extracelulárního prostoru aktivními mechanismy (Morozkin *et al.*, 2009). S postupem času (od 48 hodin) se začala projevovat na elektroferogramu vyšší množství kratších fragmentů. Ve studii Bronkhorst *et al.* (2016) zjistili, že fragmenty cfDNA uvolňované buňkami ve formě apoptických tělísek mají na elektroferogramech píky v násobcích nukleozomů (profil označovaný jako tzv. ladder pattern), počínaje píkem v oblasti okolo 167 bp následovaným píkem v oblasti

okolo 340 bp atd. Tento trend je pozorovatelný u později odebraných vzorků, a lze tak soudit, že k apoptóze docházelo až v pozdějších časech. Mimo tyto krátké píky byly ve vzorcích přítomny také dlouhé fragmenty, které byly do média uvolněny pravděpodobně nekrozou v důsledku postupného vyčerpání živin, čímž došlo ke zvýšení stresu působícího na buňky.

Relativní zastoupení mutovaných alel a wild-type alel bylo odlišné u námi zkoumaných genů. U genu *KRAS* bylo detekováno podstatně nižší zastoupení mutované alely oproti wild-typu. Z dohledatelných dat ovšem vyplývá, že frekvence alelických variant je u tohoto genu u nádorové linie HCT116 50 % (Debeljak *et al.*, 2018), a tudíž by zastoupení mutované a nemutované alely mělo být obdobné. Toto by platilo u genomické DNA. V případě cfDNA si už tímto ovšem nemůžeme být tak jistí. Jednou z možností, jak vysvětlit propad mutované alely a současnou dominanci nemutované alely po uplynutí 24 hodin, je omezení aktivního transportu ctDNA do extracelulárního prostoru. Pokud by došlo k omezení uvolnění extracelulárních vezikul (EV) nesoucích právě mutovanou DNA, mohlo by dojít k propadu v koncentraci mutované alely přítomné v rámci cfDNA. K omezení uvolnění EV může dojít během stresových podmínek v důsledku autofágie, což je důležitý buněčný ochranný mechanismus (Biaxauli *et al.*, 2014). V našem případě by mohlo dojít ke stresu v průběhu pasáže buněk nebo výměny média a vliv stresu by se projevoval v průběhu prvních 36 hodin. Výsledek studie Bhatta *et al.* (2021), zaměřený na selektivní třídění mutantního proteinu p53 do EV u několika typů rakovin, by mohl podpořit tuto teorii, jelikož by se tak vysvětlil pokles mutované alely. Mimo to, velké EV obsahují velké molekuly DNA s mutacemi a aberacemi typickými pro nádorovou DNA (Vagner *et al.*, 2018). V porovnání s genem *KRAS*, koncentrace mutované a nemutované alely genu *PIK3CA*, který má u nádorové linie HCT116 stejnou hodnotu frekvence alelických variant jako gen *KRAS*, si jsou velice blízké svými hodnotami.

Vliv buněčné senescence na kinetiku uvolňování cfDNA není zatím znám. V našem případě byly vypořádány vyšší koncentrace cfDNA u senescentních buněk, což je v rozporu s výsledky od Rostami *et al.* (2020), kde senescence indukovaná ionizujícím zářením, stejně jako v našem případě, má negativní vliv na uvolňování cfDNA. Důvodem pro takto naměřené hodnoty by mohla být zvýšená nekróza u těchto buněk, jež by vedla ke kontaminaci izolované cfDNA genomickou DNA. Tento závěr podporuje jednak snížená koncentrace proteinů po uplynutí 168 hodin od poslední

výměny média, ale také v čase se zvyšující množství krátkých fragmentů a snižující se množství delších fragmentů. Na druhou stranu, v průběhu experimentu byly provedeny kroky k eliminaci kontaminace genomickou DNA (dvojitá centrifugace před zamražením biologického materiálu a další centrifugace po rozmražení vzorku). V důsledku zvýšené nekrózy by se totiž teoreticky mohlo do média uvolňovat větší množství DNA nukleáz, které by mohly velké fragmenty DNA začít štípat na menší fragmenty. Dalším možným důkazem kontaminace genomickou DNA je téměř identické zastoupení mutantní alely a wild-typ alely u genu *KRAS*, což je opak výsledku dosaženého u nesenescentních buněk. Vzhledem k tomu je potřeba věnovat výzkumu vlivu senescence na kinetiku uvolňování cfDNA větší úsilí.

U vzorků pacientů s CRC byl při evaluaci velikosti fragmentů cfDNA vyzorován jednak charakteristický profil násobků nukleozomů, což odkazuje na apoptózu, ale byla také detekována malá množství fragmentů o velikosti okolo 2000 bp, uvolněných do krevního řečiště pravděpodobně aktivními mechanismy. Fragmenty apoptického původu mohou být uvolňovány jak zdravými, tak i nádorovými buňkami, ovšem hladina apoptózy je u nádorových buněk pravděpodobně vyšší, zejména kvůli vyšší úrovni stresů nebo snížené vaskularizaci nádorů a okolních tkání (Jahr *et al.*, 2001). Vzhledem k množství fragmentů v tomto velikostním rozmezí a komplexnosti všech možných biologických procesů je ale nepravděpodobné, že by všechny fragmenty byly apoptického původu. Může se z části jednat i o původně delší fragmenty, uvolněné ať už aktivními, či jinými pasivními mechanismy (viz kapitola 3.2.2), které byly naštipány DNázami přítomnými v krevním oběhu (Stephan *et al.*, 2014). Přestože řada studií vyzorovala vyšší míru fragmentace a kratší délku fragmentů u ctDNA v porovnání s cfDNA od zdravých pacientů (Mouliere *et al.*, 2014; Underhill *et al.*, 2016; Hallermayr *et al.*, 2022), v našem případě nebyly fragmenty kratších délek (<150 bp) přítomny v patientských vzorcích. Pro potvrzení této skutečnosti by bylo ovšem třeba větší množství klinických vzorků. Hallermayr *et al.* (2022) prezentovali možnost využití nádorově-specifického vzorce fragmentace cfDNA k detekci ctDNA. Z klinického hlediska by se tak mohlo jednat o použitelný biomarker v tekuté biopsii pro diagnózu a sledování reakce na terapii u pacientů s CRC.

Při detekci vzácných mutací prostřednictvím ddPCR u klinických vzorků platí obecná shoda, že až při detekci dvou/tří a více kopií obsahujících mutovanou alelu

může být vzorek prohlášen za pozitivní (Chan *et al.*, 2020; Silveira *et al.*, 2021). V našem případě k tomu došlo pouze u jednoho pacienta, a to jen v případě mutace H1047R genu *PIK3CA*. Důvodem pro tak nízkou pozitivitu je pravděpodobně malé množství plazmy, které pouze v případě pozitivního pacienta dosahovalo množství 2 ml. U zbylých patientských vzorků bylo omezené množství krevní plazmy v rozpětí od 1 do 1,5 ml, což odpovídá získaným výsledkům. Z tohoto lze vyvodit nutnost stanovení minimálního objemu analyzované plazmy u pacientů na 2 ml.

7 ZÁVĚR

V předkládané diplomové práci jsme se zabývali analýzou a charakterizací cirkulující nádorové DNA (ctDNA) u nádorových buněčných linií kolorektálního karcinomu (CRC) a pacientů s CRC. U volné cirkulující DNA (cfDNA) izolované z buněčných linií byly zkoumány kinetika uvolňování v časových intervalech, délka fragmentů a zastoupení bodových mutací typických pro CRC. Dále pak byly tyto parametry sledovány u senescentních buněk nádorové linie HCT116. U pacientů s CRC byla provedena analýza koncentrace a velikosti fragmentů, následovaná detekcí bodových mutací *KRAS* a *PIK3CA* v cfDNA.

Zjistili jsme, že během kultivace nádorových buněčných linií HCT116 a HT29 dochází k nárůstu koncentrace cfDNA a rovněž roste poměrné zastoupení krátkých fragmentů, odkazující s největší pravděpodobností na probíhající apoptózu. Mutovaná alela *KRAS* se v cfDNA u buněčné linie HCT116 vyskytovala s podstatně nižší frekvencí než wild-typ alela tohoto genu, což potvrzuje teorii o selektivní sekreci. Vliv senescence na kinetiku uvolňování cfDNA nebyl potvrzen pravděpodobně v důsledku kontaminace genomickou DNA. U vzorků pacientů s CRC byly detekovány fragmenty cfDNA typické pro apoptózu, ale i fragmenty odvozené od aktivních mechanismů sekrece ctDNA. Při detekci mutací se potvrdila patogenní mutace v genu *PIK3CA* pouze u jednoho pacienta, zatímco mutace v genu *KRAS* nebyla v ctDNA pacientů detekována. Získané poznatky o chování ctDNA umožní přesnější interpretaci a časnější implementaci tekuté biopsie do diagnostiky nejen nádorových onemocnění.

8 LITERATURA

Abdouh M., Zhou S., Arena V., Arena M., Lazaris A., Onerheim R., Metrakos P., Arena G.O. (2014): Transfer of malignant trait to immortalized human cells following exposure to human cancer serum. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 33(1):86.

Alieva M., van Rheenen J., Broekman M. L. D. (2018): Potential impact of invasive surgical procedures on primary tumor growth and metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis* 35(4):319-331.

Angeles A. K., Janke F., Bauer S., Christopoulos P., Riediger A. L., Sultmann H. (2021): Liquid biopsies beyond mutation calling: genomic and epigenomic features of cell-free DNA in cancer. *Cancers* 13(22):5615.

Araújo A. L. D., Santos-Silva A. R., Kowalski L. P. (2023): Diagnostic Accuracy of Liquid Biopsy for Oral Potentially Malignant Disorders and Head and Neck Cancer: an Overview of Systematic Reviews. *Current Oncology Reports* 25(4):279-292.

Arisi M. F., Dotan E., Fernandez S. V. (2022): Circulating Tumor DNA in Precision Oncology and Its Applications in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 23(8):4441.

Aucamp J., Bronkhorst A. J., Peters D. L., Van Dyk H. C., Van der Westhuizen F. H., Pretorius P. J. (2017): Kinetic analysis, size profiling, and bioenergetic association of DNA released by selected cell lines in vitro. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74(14):2689-2707.

Augustus G. J., Ellis N. A. (2018): Colorectal cancer disparity in African Americans: risk factors and carcinogenic mechanisms. *The American journal of pathology* 188(2):291-303.

Baghba R., Roshangar L., Jahanban-Esfahlan R., Seidi K., Ebrahimi-Kalan A., Jaymand M., Kolahian S., Javaheri T., Zare P. (2020): Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling* 18(1):59.

Baixauli F., López-Otín C., Mittelbrunn M. (2014): Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. *Frontiers in Immunology* 5:403.

- Balgkouranidou I., Chimonidou M., Milaki G., Tsarouxa E. G., Kakolyris S., Welch D. R., Georgoulas V., Lianidou E. S. (2014): Breast cancer metastasis suppressor-1 promoter methylation in cell-free DNA provides prognostic information in non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 110(8):2054-62.
- Bao Y., Zhang D., Guo H., Ma W. (2024): Beyond blood: Advancing the frontiers of liquid biopsy in oncology and personalized medicine. *Cancer Science* 115(4):1060-1072.
- Barker N., Ridgway R. A., van Es J. H., van de Wetering M., Begthel H., van den Born M., Danenberg E., Clarke A. R., Sansom O. J., Clevers H. (2009): Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457(7229):608-11.
- Basnet S., Zhang Z. Y., Liao W. Q., Li S. H., Li P. S., Ge H. Y. (2016): The Prognostic Value of Circulating Cell-Free DNA in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Journal of Cancer* 7(9):1105-1113.
- Battistelli M., Falcieri E. (2020): Apoptotic bodies: particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. *Biology (Basel)* 9(1):21.
- Bazzocco S., Dopeso H., Carton-Garcia F., Macaya I., Andretta E., Chionh F., Rodrigues P., Garrido M., Alazzouzi H., Nieto R., Sanchez A., Schwartz S. Jr., Bilic J., Mariadason J. M., Arango D. (2015): Highly Expressed Genes in Rapidly Proliferating Tumor Cells as New Targets for Colorectal Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research* 21(16):3695-704.
- Bhatta B., Luz I., Krueger C., Teo F. X., Lane D. P., Sabapathy K., Cooks T. (2021): Cancer Cells Shuttle Extracellular Vesicles Containing Oncogenic Mutant p53 Proteins to the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)* 13(12):2985.
- Bian X., Xiao Y. T., Wu T., Yao M., Du L., Ren S., Wang J. (2019): Microvesicles and chemokines in tumor microenvironment: mediators of intercellular communications in tumor progression. *Molecular Cancer* 18(1):50.
- Bjelland S., Seeberg E. (2003): Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutation Research* 531(1-2):37-80.
- Bronkhorst A. J., Wentzel J. F., Aucamp J., van Dyk E., du Plessis L., Pretorius P. J. (2016): Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1863(1):157-65.

- Bronkhorst A. J., Wentzel J. F., Ungerer V., Peters D. L., Aucamp J., de Villiers E. P., Holdenrieder S., Pretorius P. J. (2018): Sequence analysis of cell-free DNA derived from cultured human bone osteosarcoma (143B) cells. *Tumour Biology* 40(9):1010428318801190.
- Cai J., Wu G., Jose P. A., Zeng C. (2016): Functional transferred DNA within extracellular vesicles. *Experimental Cell Research* 349(1):179-183.
- Calcinotto A., Kohli J., Zagato E., Pellegrini L., Demaria M., Alimonti A. (2019): Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiological Reviews* 99(2):1047-1078.
- Campitelli M., Jeannot E., Peter M., Lappartient E., Saada S., de la Rochefordière A., Fourchette V., Alran S., Petrow P., Cottu P., Pierga J. Y., Lantz O., Couturier J., Sastre-Garau X. (2012): Human papillomavirus mutational insertion: specific marker of circulating tumor DNA in cervical cancer patients. *PLoS One* 7(8):e43393.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487(7407):330-7.
- Cantley L. C. (2002): The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296(5573):1655-7.
- Cejas P., Casado E., Belda-Iniesta C., De Castro J., Espinosa E., Redondo A., Sereno M., García-Cabezas M. A., Vara J. A., Domínguez-Cáceres A., Perona R., González-Barón M. (2004): Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes & Control* 15(7):707-19.
- Crowley E., Di Nicolantonio F., Loupakis F., Bardelli A. (2013): Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews. Clinical Oncology* 10(8):472-84.
- Debeljak M., Noë M., Riel S. L., Haley L. M., Norris A. L., Anderson D. A., Adams E. M., Suenaga M., Beierl K. F., Lin M. T., Goggins M. G., Gocke C. D., Eshleman J. R. (2018): Validation Strategy for Ultrasensitive Mutation Detection. *Molecular Diagnosis & Therapy* 22(5):603-611.
- Dekker E., Tanis P. J., Vleugels J. L. A., Kasi P. M., Wallace M. B. (2019): Colorectal cancer. *Lancet* 394(10207):1467-1480.

de Lau W., Peng W. C., Gros P., Clevers H. (2014): The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes & Development* 28(4):305-16.

Dibble C. C., Cantley L. C. (2015): Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends in Cell Biology* 2015 Sep;25(9):545-55.

Diehl F., Schmidt K., Choti M. A., Romans K., Goodman S., Li M., Thornton K., Agrawal N., Sokoll L., Szabo S. A., Kinzler K. W., Vogelstein B., Diaz L. A. Jr. (2008): Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine* 14(9):985–990.

Dienstmann R., Mason M. J., Sinicrope F. A., Phipps A. I., Tejpar S., Nesbakken A., Danielsen S. A., Sveen A., Buchanan D. D., Clendenning M., Rosty C., Bot B., Alberts S. R., Milburn Jessup J., Lothe R. A., Delorenzi M., Newcomb P. A., Sargent D., Guinney J. (2017a): Prediction of overall survival in stage II and III colon cancer beyond TNM system: a retrospective, pooled biomarker study. *Annals of Oncology* 28(5):1023-1031.

Dienstmann R., Vermeulen L., Guinney J., Kopetz S., Tejpar S., Tabernero J. (2017b): Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nature Reviews. Cancer* 17(2):79-92.

Duchartre Y., Kim Y. M., Kahn M. (2016): The Wnt signaling pathway in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 99:141-9.

Fearon E. R., Vogelstein B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61(5):759-767.

Galluzi L., Kepp O., Krautwald S., Kroemer G., Linkermann A. (2014): Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 35:24-32.

Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S. A., Abrams J. M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E. S., Altucci L., Amelio I., Andrews D. W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A. V., Arama E., Baehrecke E. H., Barlev N. A., Bazan N. G., Bernassola F., Bertrand M. J. M., Bianchi K., Blagosklonny M. V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F. K., Chandel N. S., Cheng E. H., Chipuk J. E., Cidlowski J. A., Ciechanover A., Cohen G. M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J. R., Czabotar P. E., D'Angiolella V., Dawson T. M., Dawson V. L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin K. M., DeBerardinis R. J., Deshmukh M., Di Daniele N., Di Virgilio F., Dixit V. M., Dixon S. J., Duckett C. S., Dynlacht B. D., El-Deiry W. S., Elrod J. W., Fimia G. M., Fulda S., García-Sáez A. J., Garg A. D., Garrido C., Gavathiotis

E., Golstein P., Gottlieb E., Green D. R., Greene L. A., Gronemeyer H., Gross A., Hajnoczky G., Hardwick J. M., Harris I. S., Hengartner M. O., Hetz C., Ichijo H., Jäättelä M., Joseph B., Jost P. J., Juin P. P., Kaiser W. J., Karin M., Kaufmann T., Kepp O., Kimchi A., Kitsis R. N., Klionsky D. J., Knight R. A., Kumar S., Lee S. W., Lemasters J. J., Levine B., Linkermann A., Lipton S. A., Lockshin R. A., López-Otín C., Lowe S. W., Luedde T., Lugli E., MacFarlane M., Madeo F., Malewicz M., Malorni W., Manic G., Marine J. C., Martin S. J., Martinou J. C., Medema J. P., Mehlen P., Meier P., Melino S., Miao E. A., Molkentin J. D., Moll U. M., Muñoz-Pinedo C., Nagata S., Nuñez G., Oberst A., Oren M., Overholtzer M., Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger J. M., Pereira D. M., Pervaiz S., Peter M. E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J. H. M., Puthalakath H., Rabinovich G. A., Rehm M., Rizzuto R., Rodrigues C. M. P., Rubinsztein D. C., Rudel T., Ryan K. M., Sayan E., Scorrano L., Shao F., Shi Y., Silke J., Simon H. U., Sistigu A., Stockwell B. R., Strasser A., Szabadkai G., Tait S. W. G., Tang D., Tavernarakis N., Thorburn A., Tsujimoto Y., Turk B., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Vander Heiden M. G., Villunger A., Virgin H. W., Vousden K. H., Vucic D., Wagner E. F., Walczak H., Wallach D., Wang Y., Wells J. A., Wood W., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Zitvogel L., Melino G., Kroemer G. (2018): Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation* 25(3):486-541.

García-Olmo D., García-Olmo D. C., Ontañón J., Martínez E., Vallejo M. (1999): Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis The hypothesis of the genomestasis. *Histology and Histopathology* 14:1159-64.

Gekara N. O. (2017): DNA damage-induced immune response: micronuclei provide key platform. *Journal of Cell Biology* 216(10):2999-3001.

Gobeil S., Boucher C. C., Nadeau D., Poirier G. G. (2001): Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differentiation* 8(6):588-94.

Gold B., Cankovic M., Furtado L. V., Meier F., Gocke C. D. (2015) Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility? A report of the association for molecular pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics* 17(3):209-24.

Grabuschnig S., Bronkhorst A. J., Holdenrieder S., Rosales Rodriguez I., Schliep K. P., Schwendenwein D., Ungerer V., Sensen C. W. (2020): Putative Origins of Cell-Free DNA

in Humans: A Review of Active and Passive Nucleic Acid Release Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 21(21):8062.

Guinney J., Dienstmann R., Wang X., de Reyniès A., Schlicker A., Sonesson C., Marisa L., Roepman P., Nyamundanda G., Angelino P., Bot B. M., Morris J. S., Simon I. M., Gerster S., Fessler E., De Sousa E Melo F., Missiaglia E., Ramay H., Barras D., Homicsko K., Maru D., Manyam G. C., Broom B., Boige V., Perez-Villamil B., Laderas T., Salazar R., Gray J. W., Hanahan D., Tabernero J., Bernards R., Friend S. H., Laurent-Puig P., Medema J. P., Sadanandam A., Wessels L., Delorenzi M., Kopetz S., Vermeulen L., Tejpar S. (2015): The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine* 21(11):1350-1356.

Hallermayr A., Wohlfrom T., Steinke-Lange V., Benet-Pagès A., Scharf F., Heitzer E., Mansmann U., Haberl C., de Wit M., Vogelsang H., Rentsch M., Holinski-Feder E., Pickl J. M. A. (2022): Somatic copy number alteration and fragmentation analysis in circulating tumor DNA for cancer screening and treatment monitoring in colorectal cancer patients. *Journal of Hematology & Oncology* 15(1):125.

Hansen I. O., Jess P. (2012): Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer - a systematic review. *Danish medical journal* 59(6):A4444.

Hindson C. M., Chevillet J. R., Briggs H. A., Gallichotte E. N., Ruf I. K., Hindson B. J., Vessella R. L., Tewari M. (2013): Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature Methods* 10(10):1003-5.

Horn L., Whisenant J. G., Wakelee H., Reckamp K. L., Qiao H., Leal T. A., Du L., Hernandez J., Huang V., Blumenschein G. R., Waqar S. N., Patel S. P., Nieva J., Oxnard G. R., Sanborn R. E., Shaffer T., Garg K., Holzhausen A., Harrow K., Liang C., Lim L. P., Li M., Lovly C. M. (2019): Monitoring Therapeutic Response and Resistance: Analysis of Circulating Tumor DNA in Patients With ALK+ Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 14(11):1901-1911.

Hu Z., Chen H., Long Y., Li P., Gu Y. (2021): The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 157:103166.

Chakravarti D., Hu B., Mao X., Rashid A., Li J., Li J., Liao W. T., Whitley E. M., Dey P., Hou P., LaBella K. A., Chang A., Wang G., Spring D. J., Deng P., Zhao D., Liang X., Lan

- Z., Lin Y., Sarkar S., Terranova C., Deribe Y. L., Blutt S. E., Okhuysen P., Zhang J., Vilar E., Nielsen O. H., Dupont A., Younes M., Patel K. R., Shroyer N. F., Rai K., Estes M. K., Wang Y. A., Bertuch A. A., DePinho R. A. (2020): Telomere dysfunction activates YAP1 to drive tissue inflammation. *Nature Communications* 11(1):4766.
- Chan D. L. H., Toh G. L. X., Goh L. L. (2020): Clinical implementation of plasma EGFR T790M testing using droplet digital PCR in TKI-resistant NSCLC patients. *Experimental and Molecular Pathology* 116:104515.
- Cheng C., Omura-Minamisawa M., Kang Y., Hara T., Koike I., Inoue T. (2009): Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients during radiation therapy. *Cancer Science* 100(2):303-9.
- Cheng F., Su L., Qian C. (2016): Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget* 7(30):48832-48841.
- Chistiakov D. A., Chekhonin V. P. (2018): Circulating tumor cells and their advances to promote cancer metastasis and relapse, with focus on glioblastoma multiforme. *Experimental and Molecular Pathology* 105(2):166-174.
- Ionescu V. A., Gheorghe G., Bacalbasa N., Chiotoroiu A. L., Diaconu C. (2023): Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Medicina (Kaunas)* 59(9):1646.
- Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F. O., Hesch R. D., Knippers R. (2001): DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Research* 61(4):1659-65.
- Janssen K. , Alberici P., Fsihi H., Gaspar C., Breukel C., Franken P., Rosty C., Abal M., El Marjou F., Smits R., Louvard D., Fodde R., Robine S. (2006): *APC* and oncogenic *KRAS* are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology* 131(4):1096-1109.
- Joosten S. P. J., Zeilstra J., van Andel H., Mijns R. C., Zaunbrecher J., Duivenvoorden A. A. M., van de Wetering M., Clevers H., Spaargaren M., Pals S. T. (2017): MET Signaling Mediates Intestinal Crypt-Villus Development, Regeneration, and Adenoma Formation and Is Promoted by Stem Cell CD44 Isoforms. *Gastroenterology* 153(4):1040-1053.e4.
- Jurk D., Wilson C., Passos J. F., Oakley F., Correia-Melo C., Greaves L., Saretzki G., Fox C., Lawless C., Anderson R., Hewitt G., Pender S. L., Fullard N., Nelson G., Mann J.,

van de Sluis B., Mann D. A., von Zglinicki T. (2014): Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nature Communications* 2:4172.

Kadowaki S., Kakuta M., Takahashi S., Takahashi A., Arai Y., Nishimura Y., Yatsuoka T., Ooki A., Yamaguchi K., Matsuo K., Muro K., Akagi K. (2015): Prognostic value of *KRAS* and *BRAF* mutations in curatively resected colorectal cancer. *World journal of gastroenterology* 21(4):1275-1283.

Korn C., Scholz S. R., Gimadutdinow O., Lurz R., Pingoud A., Meiss G. (2005): Interaction of DNA fragmentation factor (DFF) with DNA reveals an unprecedented mechanism for nuclease inhibition and suggests that DFF can be activated in a DNA-bound state. *The Journal of Biological Chemistry* 280(7):6005-15.

Kustanovich A., Schwartz R., Peretz T., Grinshpun A. (2019): Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology & Therapy* 20(8):1057-1067.

Labani-Motlagh A., Naseri S., Wenthe J., Eriksson E., Loskog A. (2021): Systemic immunity upon local oncolytic virotherapy armed with immunostimulatory genes may be supported by tumor-derived exosomes. *Molecular Therapy Oncolytics* 20:508-518.

Leibowitz M. L., Zhang C. Z., Pellman D. (2015): Chromothripsis: A New Mechanism for Rapid Karyotype Evolution. *Annual Review of Genetics* 49:183-211.

Lengauer C., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1998): Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396(6712):643-649.

Leon S. A., Shapiro B., Sklaroff D. M., Yaros M. J. (1977): Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Research* 37(3):646-50.

Leung F., Kulasingam V., Diamandis E. P., Hoon D. S., Kinzler K., Pantel K., Alix-Panabières C. (2016): Circulating Tumor DNA as a Cancer Biomarker: Fact or Fiction? *Clinical Chemistry* 62(8):1054-60.

Li J., Ma X., Chakravarti D., Shalpour S., DePinho R. A. (2021): Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes & Development* 35(11-12):787-820.

Li W., Liu J. B., Hou L. K., Yu F., Zhang J., Wu W., Tang X. M., Sun F., Lu H. M., Deng J., Bai J., Li J., Wu C. Y., Lin Q. L., Lv Z. W., Wang G. R., Jiang G. X., Ma Y. S., Fu D. (2022): Liquid biopsy in lung cancer: significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring. *Molecular Cancer* 21(1):25.

- Liu J., Lian J., Chen Y., Zhao X., Du C., Xu Y., Hu H., Rao H., Hong X. (2021): Circulating Tumor Cells (CTCs): A Unique Model of Cancer Metastases and Non-invasive Biomarkers of Therapeutic Response. *Frontiers in Genetics* 12:734595.
- Liu Z. G., Jiao D. (2020): Necroptosis, tumor necrosis and tumorigenesis. *Cell Stress* 4(1):1-8.
- Magbanua M. J. M., Swigart L. B., Wu H. T., Hirst G. L., Yau C., Wolf D. M., Tin A., Salari R., Shchegrova S., Pawar H., Delson A. L., DeMichele A., Liu M. C., Chien A. J., Tripathy D., Asare S., Lin C. J., Billings P., Aleshin A., Sethi H., Louie M., Zimmermann B., Esserman L. J., van 't Veer L. J. (2021): Circulating tumor DNA in neoadjuvant-treated breast cancer reflects response and survival. *Annals of Oncology* 32(2):229-239.
- Maisonneuve C., Irrazabal T., Martin A., Girardin S. E., Philpott D. J. (2018): The Impact of the Gut Microbiome on Colorectal Cancer. *Annual Reviews in Cancer Biology* 2(1):229-49.
- Marar C., Starich B., Wirtz D. (2021): Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression. *Nature Immunology* 22(5):560-570.
- Marnett L. J. (2000): Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21(3):361-70.
- McGuire A. L., Caulfield T., Cho M. K. (2008): Research ethics and the challenge of whole-genome sequencing. *Nature Reviews. Genetics* 9(2):152-6.
- Mitra I., Khare N. K., Raghuram G. V., Chaubal R., Khambatti F., Gupta D., Gaikwad A., Prasannan P., Singh A., Iyer A., Singh A., Upadhyay P., Nair N. K., Mishra P. K., Dutt A. (2015): Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. *Journal of Biosciences* 40:91-111.
- Mizuta R., Araki S., Furukawa M., Furukawa Y., Ebara S., Shiokawa D., Hayashi K., Tanuma S., Kitamura D. (2013): DNase γ is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. *PLoS One* 8(12):e80223.
- Morozkin E. S., Sil'nikov V. N., Rykova E. Y., Vlassov V. V., Laktionov P. P. (2009): Extracellular DNA in culture of primary and transformed cells, infected and not infected with mycoplasma. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 147(1):63-5.

- Mouliere F., Thierry A. R. (2012): The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. *Expert Opinion on Biological Therapy* 12(S1):S209–S215.
- Mouliere F., El Messaoudi S., Pang D., Dritschilo A., Thierry A. R. (2014): Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Molecular Oncology* 8(5):927-41.
- Muhanna N., Di Grappa M. A., Chan H. H. L., Khan T., Jin C. S., Zheng Y., Irish J. C., Bratman S. V. (2017): Cell-free DNA kinetics in a pre-clinical model of head and neck cancer. *Scientific Reports* 7(1):16723.
- Muralidharan-Chari V., Clancy J., Plou C., Romao M., Chavrier P., Raposo G., D'Souza-Schorey C. (2009): ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Current Biology* 19(22):1875-85.
- Nakamura K. (2016): [Circulating Tumor DNA (ctDNA) Detection Using BEAMing and Its Clinical Significance.]. *Rinsho Byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology* 64(4):400-406.
- Nassar D., Blanpain C. (2016): Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annual review of pathology* 11:47-76.
- Neumann M. H. D., Bender S., Krahn T., Schlange T. (2018): ctDNA and CTCs in liquid biopsy – current status and where we need to progress. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 16:190–195.
- Nguyen L. H., Goel A., Chung D. C. (2020): Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology* 158(2):291-302.
- Norppa H., Falck G. C. (2003): What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18(3):221-33.
- Papadopoulos N. (2020): Pathophysiology of ctDNA release into the circulation and its characteristics: what is important for clinical applications. *Tumor Liquid Biopsies* 215:163–80.
- Parsons R., Myeroff L. L., Liu B., Willson J. K., Markowitz S. D., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1995): Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Research* 55(23):5548-50.

- Peng K., Kou L., Yu L., Bai C., Li M., Mo P., Li W., Yu C. (2019): Histone Demethylase JMJD2D Interacts With β -Catenin to Induce Transcription and Activate Colorectal Cancer Cell Proliferation and Tumor Growth in Mice. *Gastroenterology* 156(4):1112-1126.
- Pessoa L. S., Heringer M., Ferrer V. P. (2020): ctDNA as a cancer biomarker: A broad overview. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 155:103109.
- Peters A. A., Jamaludin S. Y. N., Yapa K. T. D. S., Chalmers S., Wiegman A. P., Lim H. F., Milevskiy M. J. G., Azimi I., Davis F. M., Northwood K. S., Pera E., Marcial D. L., Dray E., Waterhouse N. J., Cabot P. J., Gonda T. J., Kenny P. A., Brown M. A., Khanna K. K., Roberts-Thomson S. J., Monteith G. R. (2017): Oncosis and apoptosis induction by activation of an overexpressed ion channel in breast cancer cells. *Oncogene* 36(46):6490-6500.
- Pös O., Biró O., Szemes T., Nagy B. (2018): Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *European Journal of Human Genetics* 26(7):937-945.
- Qiu M., Wang J., Xu Y., Ding X., Li M., Jiang F., Xu L., Yin R. (2015): Circulating tumor DNA is effective for the detection of EGFR mutation in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 24(1):206-12.
- Rashtak S., Rego R., Sweetser S. R., Sinicrope F. A. (2017): Sessile serrated polyps and colon cancer prevention. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 10(5):270-278.
- Reikvam D. H., Erofeev A., Sandvik A., Grcic V., Jahnsen F. L., Gaustad P., McCoy K. D., Macpherson A. J., Meza-Zepeda L. A., Johansen F. E. (2011): Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One* 6(3):e17996.
- Riegman M., Bradbury M. S., Overholtzer M. (2019): Population Dynamics in Cell Death: Mechanisms of Propagation. *Trends in Cancer* 5(9):558-568.
- Rostami A., Lambie M., Yu C. W., Stambolic V., Waldron J. N., Bratman S. V. (2020): Senescence, Necrosis, and Apoptosis Govern Circulating Cell-free DNA Release Kinetics. *Cell Reports* 31(13):107830.
- Rudolph K. L., Millard M., Bosenberg M. W., DePinho R. A. (2001): Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nature Genetics* 28(2):155-9.

Sadik N., Cruz L., Gurtner A., Rodosthenous R. S., Dusoswa S. A., Ziegler O., Van Solinge T. S., Wei Z., Salvador-Garicano A. M., Gyorgy B., Broekman M., Balaj L. (2018): Extracellular RNAs: A New Awareness of Old Perspectives. *Methods in Molecular Biology* 1740:1-15.

Salmena L., Carracedo A., Pandolfi P. P. (2008): Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 133(3):403-14.

Sedlak J. C., Yilmaz Ö. H., Roper J. (2023): Metabolism and Colorectal Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 18:467-492.

Sharma A., Johnson A. (2020): Exosome DNA: Critical regulator of tumor immunity and a diagnostic biomarker. *Journal of Cellular Physiology* 235(3):1921-1932.

Shimizu N., Shimura T., Tanaka T. (2000): Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutation Research* 448(1):81–90.

Shringarpure R., Davies K. J. (2002): Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radical Biology & Medicine* 32(11):1084-9.

Schütz E., Akbari M. R., Beck J., Urnovitz H., Zhang W. W., Bornemann-Kolatzki K., Mitchell W. M., Nam R. K., Narod S. A. (2015): Chromosomal instability in cell-free DNA is a serum biomarker for prostate cancer. *Clinical Chemistry* 61(1):239-48.

Schwarzenbach H., Hoon D. S. B., Pantel K. (2011): Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews. Cancer* 11:426–37.

Schwitalla S., Fingerle A. A., Cammareri P., Nebelsiek T., Göktuna S. I., Ziegler P. K., Canli O., Heijmans J., Huels D. J., Moreaux G., Rupec R. A., Gerhard M., Schmid R., Barker N., Clevers H., Lang R., Neumann J., Kirchner T., Taketo M. M., van den Brink G. R., Sansom O. J., Arkan M. C., Greten F. R. (2013): Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 152(1-2):25-38.

Silveira C., Sousa A. C., Janeiro A., Malveiro S., Teixeira E., Brysch E., Pantarotto M., Felizardo M., Madureira R., Nogueira F., Guimarães C., Matos C., Canário D., Bruges-Armas J., Carmo-Fonseca M. (2021): Detection and quantification of *EGFR* T790M mutation in liquid biopsies by droplet digital PCR. *Translational Lung Cancer Research* 10(3):1200-1208.

- Siravegna G., Marsoni S., Siena S., Bardelli A. (2017): Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology* 14(9):531-548.
- Siravegna, G., Mussolin, B., Venesio, T., Marsoni, S., Seoane, J., Dive, C., Papadopoulos, N., Kopetz, S., Corcoran, R. B., Siu, L.L., Bardelli A. (2019): How liquid biopsies can change clinical practice in oncology. *Annals of Oncology* 30(10):1580-1590.
- Snover D. C. (2011): Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Human Pathology* 42(1):1-10.
- Snyder M. W., Kircher M., Hill A. J., Daza R. M., Shendure J. (2016): Cell-free DNA Comprises an *In Vivo* Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell* 164(1-2):57-68.
- Sorolla M. A., Sorolla A., Parisi E., Salud A., Porcel J. M. (2021): Diving into the Pleural Fluid: Liquid Biopsy for Metastatic Malignant Pleural Effusions. *Cancers (Basel)* 13(11):2798.
- Stejskal P., Goodarzi H., Srovnal J., Hajdúch M., van 't Veer L. J., Magbanua M. J. M. (2023): Circulating tumor nucleic acids: biology, release mechanisms, and clinical relevance. *Molecular cancer* 22(1):15.
- Stephan F., Marsman G., Bakker L. M., Bulder I., Stavenuiter F., Aarden L. A., Zeerleder S. (2014) Cooperation of Factor Vii-Activating Protease and Serum Dnase I in the Release of Nucleosomes From Necrotic Cells. *Arthritis & Rheumatology* 66(3):686–93.
- Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021): Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 71(3):209-249.
- Suraj S., Dhar C., Srivastava S. (2017): Circulating nucleic acids: An analysis of their occurrence in malignancies. *Biomedical Reports* 6(1):8-14.
- Thierry A. R., Mouliere F., Gongora C., Ollier J., Robert B., Ychou M., Del Rio M., Molina F. (2010): Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Ressearch* 38(18):6159-75.

- Thierry A. R., El Messaoudi S., Gahan P. B., Anker P., Stroun M. (2016): Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Review* 35(3):347–376.
- Tivey A., Church M., Rothwell D., Dive C., Cook N. (2022): Circulating tumour DNA - looking beyond the blood. *Nature Reviews. Clinical Oncology* 19(9):600-612.
- Trejo-Becerril C., Pérez-Cárdenas E., Taja-Chayeb L., Anker P., Herrera-Goepfert R., Medina-Velázquez L. A., Hidalgo-Miranda A., Pérez-Montiel D., Chávez-Blanco A., Cruz-Velázquez J., Díaz-Chávez J., Gaxiola M., Dueñas-González A. (2012): Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an *in vivo* model. *PLoS One*. 7:e52754.
- Turner K. M., Deshpande V., Beyter D., Koga T., Rusert J., Lee C., Li B., Arden K., Ren B., Nathanson D. A., Kornblum H. I., Taylor M. D., Kaushal S., Cavenee W. K., Wechsler-Reya R., Furnari F. B., Vandenberg S. R., Rao P. N., Wahl G. M., Bafna V., Mischel P. S. (2017): Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity. *Nature* 543(7643):122-125.
- Underhill H. R., Kitzman J. O., Hellwig S., Welker N. C., Daza R., Baker D. N., Gligorich K. M., Rostomily R. C., Bronner M. P., Shendure J. (2016): Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genetics* 12(7):e1006162.
- Vagner T., Spinelli C., Minciocchi V. R., Balaj L., Zandian M., Conley A., Zijlstra A., Freeman M. R., Demichelis F., De S., Posadas E. M., Tanaka H., Di Vizio D. (2018): Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. *Journal of Extracellular Vesicles* 7(1):1505403.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(1):44-84.
- van Veelen W., Le N. H., Helvensteijn W., Blonden L., Theeuwes M., Bakker E. R., Franken P. F., van Gurp L., Meijlink F., van der Valk M. A., Kuipers E. J., Fodde R., Smits R. (2011): β -catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut* 60(9):1204-12.

- Wan J. C. M., Massie C., Garcia-Corbacho J., Mouliere F., Brenton J. D., Caldas C., Pacey S., Baird R., Rosenfeld N. (2017): Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *National Reviews, Cancer* 17(4):223-238.
- Wang X., Wang L., Lin H., Zhu Y., Huang D., Lai M., Xi X., Huang J., Zhang W., Zhong T. (2024): Research progress of CTC, ctDNA, and EVs in cancer liquid biopsy. *Frontiers in Oncology* 14:1303335.
- Wee P., Wang Z. (2017): Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)* 9(5):52.
- Weerasinghe P., Buja L. M. (2012): Oncosis: an important non-apoptotic mode of cell death. *Experimental and Molecular Pathology* 93(3):302-8.
- Witz A., Dardare J., Betz M., Gilson P., Merlin J. L., Harlé A. (2024): Tumor-derived cell-free DNA and circulating tumor cells: partners or rivals in metastasis formation? *Clinical and Experimental Medicine* 24(1):2.
- Wong S. H., Yu J. (2019): Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 16(11):690-704.
- Xiao Q., Lu W., Kong X., Shao Y. W., Hu Y., Wang A., Bao H., Cao R., Liu K., Wang X., Wu X., Zheng S., Yuan Y., Ding K. (2021): Alterations of circulating bacterial DNA in colorectal cancer and adenoma: A proof-of-concept study. *Cancer Letters* 499:201-208.
- Xu K., Ding L., Chang T. C., Shao Y., Chiang J., Mulder H., Wang S., Shaw T. I., Wen J., Hover L., McLeod C., Wang Y. D., Easton J., Rusch M., Dalton J., Downing J. R., Ellison D. W., Zhang J., Baker S. J., Wu G. (2019): Structure and evolution of double minutes in diagnosis and relapse brain tumors. *Acta Neuropathologica* 137(1):123-137.
- Yaeger R., Chatila W. K., Lipsyc M. D., Hechtman J. F., Cercek A., Sanchez-Vega F., Jayakumaran G., Middha S., Zehir A., Donoghue M. T. A., You D., Viale A., Kemeny N., Segal N. H., Stadler Z. K., Varghese A. M., Kundra R., Gao J., Syed A., Hyman D. M., Vakiani E., Rosen N., Taylor B. S., Ladanyi M., Berger M. F., Solit D. B., Shia J., Saltz L., Schultz N. (2018): Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Cell* 33(1):125-136.e3.
- Yu M., Stott S., Toner M., Maheswaran S., Haber D. A. (2011): Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *The Journal of Cell Biology* 192(3):373-82.

Zeki S. S., Graham T. A., Wright N. A. (2011): Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 8(2):90-100.

Zhang J., Roberts T. M., Shivdasani R. A. (2011): Targeting PI3K signaling as a therapeutic approach for colorectal cancer. *Gastroenterology* 141(1):50-61.

Zill O. A., Banks K. C., Fairclough S. R., Mortimer S. A., Vowles J. V., Mokhtari R., Gandara D. R., Mack P. C., Odegaard J. I., Nagy R. J., Baca A. M., Eltoukhy H., Chudova D. I., Lanman R. B., Talasz A. (2018): The landscape of actionable genomic alterations in cell-free circulating tumor DNA from 21,807 advanced cancer patients. *Clinical Cancer Research* 24:3528–353.