

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní program: Biologie a patologie buňky



Histopatologie a molekulární biologie nádorů gastrointestinálního traktu

Histopathology and Molecular Biology of Gastrointestinal Tumours

Dizertační práce

Školitel: doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.

Plzeň, 2023

MVDr. Lenka Červenková

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Plzni, 19.12.2023

Lenka Červenková

Identifikační záznam:

ČERVENKOVÁ, Lenka. *Histopatologie a molekulární biologie nádorů gastrointestinálního traktu. [Histopathology and Molecular Biology of Gastrointestinal Tumours]*. Plzeň, 2023. Počet stran 94, 5 příloh. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni. Školitel Souček, Pavel

Souhrn

Incidence a mortalita nádorů gastrointestinálního traktu jsou na úrovni, která představuje závažný problém. Tyto nádory mají nespecifické klinické příznaky, a proto často dochází k pozdní diagnóze. V posledních letech byl zaznamenán výrazný pokrok v oblasti vyhledávání a sledování molekulárních ukazatelů nádorových změn v diagnostice, prognóze a léčbě těchto onemocnění. Klinická onkologie se však stále potýká s nedostatkem takovýchto biomarkerů. Cílem této práce bylo najít nové biomarkery pro nádory gastrointestinálního traktu, které by korelovaly zejména s prognostickými ukazateli a prediktory léčebné odpovědi či chemorezistence.

Dizertační práce je založena na 5 studiích věnujících se duktálnímu adenokarcinomu pankreatu, kolorektálnímu karcinomu a hepatocelulárnímu karcinomu s použitím imunohistochemických a molekulárních metod. Všechny studie byly provedeny na archivních parafinových blocích. K hlavním výsledkům patří imunohistochemicky prokázaná proteinová exprese transportérů MRP2, SLC22A3 a SUR1/ABCC8 a její významná souvislost s prognózou adenokarcinomu pankreatu. Bylo zjištěno, že pacienti bez exprese proteinu SLC22A3 v apikální membráně mají signifikantně kratší přežití bez nemoci i celkové přežití. U pacientů s pozitivní membránovou expresí MRP2 i SLC22A3 jsme našli delší přežití bez nemoci a u kombinace pozitivní exprese MRP2 a negativní exprese SLC22A3 pak kratší celkové přežití. Pacienti se střední či vysokou expresí SUR1/ABCC8 v cytoplazmě měli 3,5krát vyšší riziko progresu onemocnění ve srovnání s pacienty se slabou expresí. Další studie ukázala, že přítomnost T a B lymfocytů ve vnitřním invazivním okraji hepatocelulárního karcinomu po resekci souvisí s příznivou prognózou pacientů. U stejného onemocnění výskyt mutací v *CTNNB1*, polymorfismu *TERT* a hustota CD8+ lymfocytů významně souvisí s delší dobou do opakovaného výskytu onemocnění. V poslední předkládané práci ukazujeme význam sekvenování exomu pro charakterizaci molekulárního profilu metastazujícího kolorektálního karcinomu. V párových vzorcích primárního onemocnění a synchronních jaterních metastáz byla potvrzena vysoká četnost somatických variant v genech *APC*, *TP53* a *KRAS* a podobnost mutačních profilů ve vzorcích z obou typů nádorových ložisek.

V rámci této doktorské práce bylo navrženo několik nových přístupů využití archivních vzorků nádorových tkání gastrointestinálních karcinomů a identifikována řada nových biomarkerů pro stanovení prognózy pacientů. K potvrzení našich závěrů a zavedení těchto biomarkerů do klinické praxe jsou nezbytné další nezávislé studie na větších souborech pacientů.

Summary

The incidence and mortality of gastrointestinal cancers are at a level that represents a serious problem. These tumours have non-specific clinical symptoms, which often results in late diagnosis. In recent years, there have been significant advances in the identification and monitoring of molecular markers of tumour changes in the diagnosis, prognosis and treatment of these diseases. However, clinical oncology still faces a shortage of such biomarkers. The aim of this study was to find new biomarkers that correlate especially with prognostic indicators and predictors of treatment response or chemoresistance in gastrointestinal tract cancers.

This thesis is based on 5 studies addressing ductal adenocarcinoma of the pancreas, colorectal cancer and hepatocellular carcinoma using IHC and molecular methods. All studies were performed using archival formalin-fixed paraffin-embedded samples. The main results include immunohistochemical evidence of protein expression of MRP2, SLC22A3 and SUR1/*ABCC8* transporters and its significant association with the prognosis of pancreatic adenocarcinoma. Patients without SLC22A3 protein expression in the apical membrane were found to have significantly shorter disease-free and overall survival. We found longer disease-free survival in patients with positive membrane expression of both MRP2 and SLC22A3, and shorter overall survival in the combination of positive MRP2 and negative SLC22A3 expression. Patients with moderate or high expression of SUR1/*ABCC8* in the cytoplasm had a 3.5-fold higher risk of disease progression compared to patients with low expression. Another study showed that the presence of T and B lymphocytes in the inner invasive margin of hepatocellular carcinoma after resection was associated with a favourable prognosis for the patients. In the same disease, the presence of mutations in *CTNNB1*, *TERT* polymorphism and CD8⁺ lymphocyte density were significantly associated with longer time to recurrence. In the last submitted study, we show the importance of exome sequencing for characterizing the molecular profile of metastatic colorectal cancer. We confirmed the high frequency of somatic variants in *APC*, *TP53* and *KRAS* genes in paired samples of primary lesions and synchronous liver metastases and the similarity of mutational profiles in samples from both tumour types.

In the framework of this PhD thesis, several new approaches for the use of archival samples of gastrointestinal cancer tissues have been proposed and a number of new biomarkers have been identified to determine the prognosis of patients. Further independent studies in larger patient cohorts are needed to confirm our findings and to introduce these biomarkers into clinical practice.

Klíčová slova:

Duktální adenokarcinom pankreatu

Kolorektální karcinom

Hepatocelulární karcinom

Imunohistochemie

Sekvenování nové generace

Keywords:

Pancreatic ductal adenocarcinoma

Colorectal cancer

Hepatocellular carcinoma

Immunohistochemistry

Next generation sequencing

Poděkování

Chtěla bych upřímně poděkovat všem, kteří se podíleli na vzniku této dizertační práce. V první řadě děkuji svému školiteli doc. RNDr. Pavlu Součkovi, CSc. za neocenitelnou podporu, odborné rady a trpělivost, kterou mi věnoval. Jeho odborné vedení a přístupnost mi umožnily dosáhnout úspěchu v tomto náročném procesu.

Dále bych chtěla poděkovat kolegům z Oddělení toxikogenomiky Státního zdravotního ústavu v Praze a Laboratoře farmakogenomiky, Laboratoře nádorové léčby a regenerace tkáně, Laboratoře translační genomiky nádorových onemocnění Biomedicínského centra Lékařské fakulty v Plzni za vynikající spolupráci. Jejich připomínky a podněty byly pro mě velkým přínosem a jejich zájem o úspěch celého týmu vedly k dosažení společných cílů.

Tato práce by nemohla vzniknout bez spolehlivosti a ochoty pomoci pracovníků Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Plzni a Šiklova ústavu patologie fakultní nemocnice Plzeň. Chtěla bych vyjádřit hlubokou vděčnost za možnost využívat laboratoř Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Plzni a Laboratoř speciální diagnostiky Šiklova ústavu patologie fakultní nemocnice Plzeň během mé výzkumné práce. Jejich ochota poskytnout prostředí s nezbytnými zdroji a vybavením byla pro mě klíčová při dosahování cílů mého výzkumu.

Obsah

Souhrn.....	4
Summary.....	5
Obsah.....	8
Seznam použitých zkratek.....	10
Seznam genů.....	13
1 Teoretický úvod.....	14
1.1 Nádory gastrointestinálního traktu.....	14
1.1.1 Základní charakteristika nádorů, kancerogeneze.....	14
1.1.2 Morfologická stavba solidních nádorů.....	16
1.1.3 Imunologie nádorů.....	17
1.1.4 Klasifikace nádorů.....	18
1.1.5 Molekulární klasifikace nádorů.....	18
1.1.6 Mezinárodní systém klasifikace nádorů – WHO klasifikace nádorů.....	20
1.1.7 Diagnostika nádorů.....	21
1.1.8 Epidemiologie nádorů.....	23
1.1.9 Léčba nádorových onemocnění.....	25
1.1.10 Transportéry zprostředkovaná léková rezistence.....	26
1.2 Koloréktální karcinom.....	30
1.3 Hepatocelulární karcinom.....	34
1.4 Duktální adenokarcinom pankreatu.....	36
1.5 Molekulární metody v onkologii.....	39
1.5.1 Izolace DNA z formalínem fixované a parafínovou technikou zpracované tkáni.....	39
1.5.2 Polymerázová řetězová reakce.....	40
1.5.3 Sekvence nukleových kyselin.....	41
1.6 Imunohistochemické metody v onkologii.....	42
1.6.1 Postup IHC detekce.....	43
1.6.2 Vliv preanalytické fáze na kvalitu IHC vyšetření.....	45
1.6.3 Automatické inkubační metody.....	46
1.6.4 Využití IHC metod.....	46
1.6.5 Interpretace IHC.....	48
2 Cíle a hypotézy.....	50
3 Přehled publikací.....	51
4 Metody, výsledky a diskuze.....	54

4.1	Publikace č. 1: Proteinová exprese MRP2 a SLC22A3 souvisí s prognózou adenokarcinomu pankreatu	54
4.1.1	Metody.....	54
4.1.2	Výsledky – hlavní zjištění	54
4.1.3	Diskuze	56
4.2	Publikace č. 2: Proteinová exprese a lokalizace ABC transportérů u duktálního karcinomu pankreatu: prognostická role SUR1/ABCC8.....	59
4.2.1	Metody.....	59
4.2.2	Výsledky – hlavní zjištění	60
4.2.3	Diskuze	61
4.3	Publikace č. 3: T a B lymfocyty ve vnitřním invazivním okraji hepatocelulárního karcinomu po resekci souvisí s příznivou prognózou.....	64
4.3.1	Metody.....	64
4.3.2	Výsledky – hlavní zjištění	66
4.3.3	Diskuze	67
4.4	Publikace č. 4: <i>CTNNB1</i> mutace, <i>TERT</i> polymorfismus a hustota CD8+ buněk u resekovaného hepatocelulárního karcinomu souvisí s delší dobou do relapsu.....	70
4.4.1	Metody.....	70
4.4.2	Výsledky – hlavní zjištění	71
4.4.3	Diskuze	71
4.5	Publikace č. 5: Sekvenování exomu párových vzorků kolorektálního karcinomu a synchronních jaterních metastáz pro prognózu a předpověď terapie	73
4.5.1	Metody.....	73
4.5.2	Výsledky – hlavní zjištění	74
4.5.3	Diskuze	76
5	Závěr.....	77
6	Podpora:	78
7	Literatura:	79
8	Publikační činnost autorky	90
9	Přílohy – plná znění předložených prací	94

Seznam použitých zkratek

ABC	ATP vážící (transportér) (z angl. ATP binding cassette)
ABCD4	ATP binding cassette subfamily D member 4
AEC	aminoethylcarbazol
ALK	anaplastic lymphoma kinase protein
ATP	adenosintrifosfát (z angl. adenosine triphosphate)
BCRP	breast cancer resistance protein
BER	system vyštěpování bází (z angl. base excision repair)
BRAF	Serine/threonine-protein kinase B-raf
CA 19-9	tumorový antigen 19-9 (z angl. carbohydrate antigen 19-9)
cDNA	komplementární DNA (z angl. complementary deoxyribonucleic acid)
CDX2	caudal type homeobox 2
CFTR	modulátor transmembránového regulátoru vodivosti (z angl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
CIMP	metylace CpG ostrůvků (z angl. CpG island methylator phenotype)
CIN	chromozomální nestabilita (z angl. chromosomal instability)
CNV	variabilita počtu kopií (z angl. copy-number variation)
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
CRC	kolorektální karcinom (z angl. colorectal cancer)
CTLA4	Cytotoxický protein asociovaný s T-lymfocyty 4 (z angl. Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4)
DAB	diaminobenzidin
DCs	dendritické buňky (z angl. dendritic cells)
ddNTP	dideoxynukleotid trifosfát (z angl. dideoxynucleotide triphosphate)
DFS	přežití bez nemoci (z angl. disease free survival)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (z angl. epidermal growth factor receptor)
FFPE	formalínem fixované a parafínovou technikou zpracované (z angl. formalin-fixed paraffin-embedded)
FLAGS	FrequentLy mutAted Genes
GIST	gastrointestinální stromální tumor (z angl. gastrointestinal stromal tumor)
GIT	gastrointestinální trakt
HCC	hepatocelulární karcinom (z angl. hepatocellular carcinoma)
Hep Par 1	hepatocyte paraffin 1
HER2	humánní epidermální receptor 2
HRP	křenová peroxidáza (z angl. horseradish peroxidase)
HUGO	Human Genome Organisation
IHC	imunohistochemie (z angl. Immunohistochemistry)
Ki-67	proliferační marker protein Ki-67
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinová kináza (z angl. mitogen-activated protein kinase)
miRNA	mikroRNA (z angl. microRNA)

MLH1	MutL protein homolog 1
MMR	systém opravy nesprávného párování bází DNA (z angl. DNA mismatch repair)
mRNA	mediátorová RNA (z angl. messenger RNA)
MRP1	multidrug resistance-associated protein 1
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2
MSH2	MutS protein homolog 2
MSH6	MutS protein homolog 6
MSI	nestabilita mikrosatelitů (z angl. microsatellite instability)
MSI-H	vysoká nestabilita mikrosatelitů (z angl. high microsatellite instability)
MSI-L	nízká nestabilita mikrosatelitů (z angl. low microsatellite instability)
NCI	National Cancer Institute
NCI-MATCH	National Cancer Institute - Molecular Analysis for Therapy Choice
NER	systém vyštěpování nukleotidů (z angl. nucleotide excision repair)
NGS	sekvenování nové generace (z angl. next generation sequencing)
NHGRI	National Human Genome Research Institute
OS	doba do úmrtí (z angl. overall survival)
PARP	poly adenosine diphosphate ribose polymerase
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PD-1	membránový protein programované buněčné smrti (z angl. programmed cell death 1)
PDAC	duktální adenokarcinom pankreatu (z angl. pancreatic ductal adenocarcinoma)
PD-L1	ligand membránového proteinu programované buněčné smrti (z angl. programmed cell death ligand 1)
PMS2	PMS1 protein homolog 2
qPCR	kvantitativní PCR (z angl. quantitative polymerase chain reaction)
RFS	přežití bez relapsu (z angl. relapse-free survival)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
ROS1	receptor tyrosine kinase 1
RTK-RAS	receptor tyrosine kinase -Ras
SBS	substituce jedné báze (z angl. single base substitution)
SLC	solute carrier
SLC22A3	solute carrier family 22 member 3
SUR1	sulfonylurea receptor 1
TAP1	antigen peptide transporter 1
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCGA COAD-READ	The Cancer Genome Atlas Rectum Adenocarcinoma Collection
TCGA MC3	TCGA Multi-Center Mutation Calling in Multiple Cancers
TERT	telomerázová reverzní transkriptáza (z angl. telomerase reverse transcriptase)
TGFβ	transformující růstový faktor-β (z angl. transforming growth factor-β)
TILs	tumor infiltrující lymfocyty (z angl. tumor-infiltrating lymphocytes)
TMB	nádorová mutační zátěž (z angl. tumor mutation burden)

TNM	primární tumor, regionální lymfatické uzliny, vzdálené metastázy (z angl. primary tumor, regional lymph nodes, distant metastasis)
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TTR	doba do recidivy (z angl. time to recurrence)
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (z angl. vascular endothelial growth factor)
WES	celoexomové sekvenování (z angl. whole exome sequencing)
WGS	celogenomové sekvenování (z angl. whole genome sequencing)
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)
WNT	Wingless/Int-1

Seznam genu

<i>ABCB1</i>	ATP binding cassette subfamily B member 1
<i>ABCC1</i>	ATP binding cassette subfamily C member 1
<i>ABCC2</i>	ATP binding cassette subfamily C member 2
<i>ABCG2</i>	ATP binding cassette subfamily G member 2 (Junior blood group)
<i>APC</i>	APC regulator of WNT signaling pathway
<i>ATM</i>	ATM serine/threonine kinase
<i>BRAF</i>	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
<i>BRAF</i>	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
<i>BRCA1</i>	BRCA1 DNA repair associated
<i>BRCA2</i>	BRCA2 DNA repair associated
<i>CDKN2A</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
<i>CTNNB1</i>	catenin beta 1
<i>DNAH11</i>	dynein axonemal heavy chain 11
<i>FAM186A</i>	family with sequence similarity 186 member A
<i>FAT4</i>	FAT atypical cadherin 4
<i>KIT</i>	KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
<i>KRAS</i>	KRAS proto-oncogene, GTPase
<i>MLH1</i>	mutL homolog 1
<i>MSH2</i>	mutS homolog 2
<i>MSH6</i>	mutS homolog 6
<i>MUC3A</i>	mucin 3A, cell surface associated
<i>MUC5AC</i>	mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming
<i>NRAS</i>	NRAS proto-oncogene, GTPase
<i>PMS2</i>	PMS1 homolog 2, mismatch repair system component
<i>RB1</i>	RB transcriptional corepressor 1
<i>SLC22A3</i>	solute carrier family 22 member 3
<i>SMAD4</i>	SMAD family member 4
<i>TERT</i>	telomerase reverse transcriptase
<i>TP53</i>	tumor protein p53
<i>TRIP11</i>	thyroid hormone receptor interactor 11

1 Teoretický úvod

1.1 Nádory gastrointestinálního traktu

1.1.1 Základní charakteristika nádorů, kancerogeneze

Nádor je tkáň tvořená transformovanými buňkami, které jsou schopné nadměrného, nekoordinovaného a autonomního růstu. Vznik a rozvoj nádorového onemocnění je dlouhodobý, komplexní a mnohostupňový proces tvořený genetickými i epigenetickými změnami.

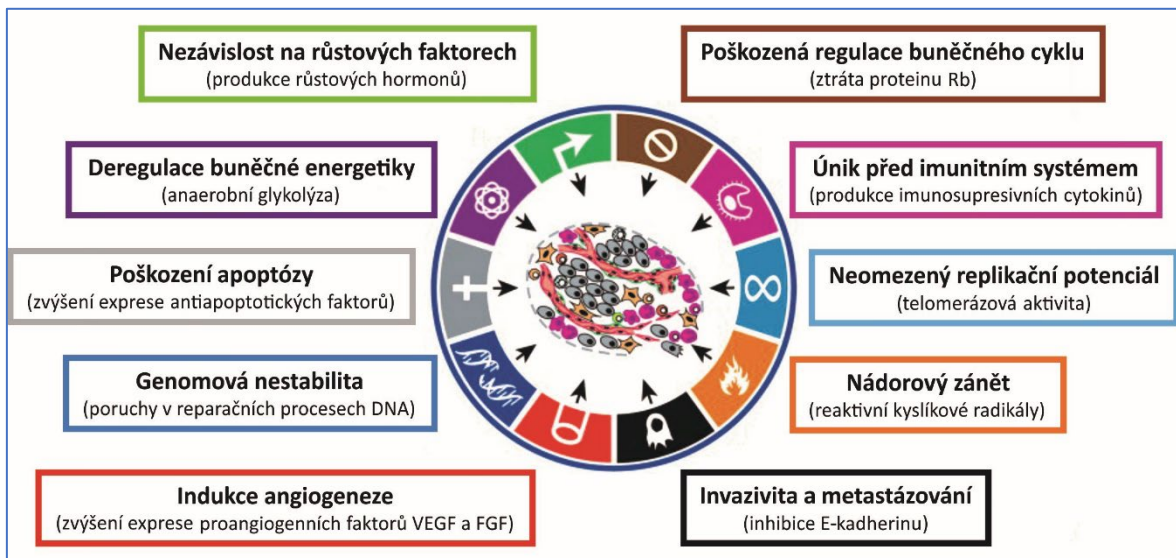
K maligní transformaci dochází prostřednictvím mutací v genech řídících buněčný cyklus. Tyto geny můžeme rozdělit do dvou skupin: **Protoonkogeny**, které se mutací změní na onkogeny a jsou zodpovědné za nadměrnou proliferaci buněk a **nádorové supresorové geny**, které jsou mutacemi inaktivovány a ztrácí svou antiproliferační funkci. Proces vzniku a růstu nádoru lze rozdělit do 3 fází:

- **Iniciace** – indukce mutací, během které dochází k jednoduchým záměnám bází a malým delecím v deoxyribonukleové kyselině (DNA), zejména v protoonkogenech.
- **Promoce** – fáze transformace, během které se mění fenotyp buňky a vzniká nádorový klon, dochází zejména ke změnám genové exprese v důsledku epigenetických změn.
- **Progrese** – akumulace dalších mutací, zejména velké změny genomu v důsledku chromozomálních aberací.

V roce 2000 Weinberg a Hanahan definovali šest a v roce 2011 doplnili o další čtyři získané **znaky definující nádor**¹, schematicky znázorněno na obrázku 1:

1. **Nezávislost na růstových faktorech:** Nádorová buňka získá schopnost autonomního a neregulovatelného růstu prostřednictvím mutací protoonkogenů pro růstové faktory, membránové receptory pro růstové faktory, cytoplasmatické proteiny signální transdukce, jaderné transkripční faktory a proteiny regulující buněčný cyklus.
2. **Poškozená regulace buněčného cyklu:** V nádorové buňce dochází k vyřazení exprese tumor supresorových genů *TP53*, *RB* genu, genů dráhy transformujícího

růstového faktoru- β (TGF β) a signální dráhy WNT (Wingless/Int-1)/ β -catenin s následnou ztrátou schopnosti reagovat na signály inhibující růst.



Obrázek 1: Získané znaky definující nádor, upravené dle Weinberga a Hanahana (Hanahan D, Weinberg RA, 2011)

- Poškození apoptózy:** Nádorová buňka je schopna vyhnout se jak vnější dráze prostřednictvím mutací v genech pro receptory smrti, tak vnitřní dráze zejména mutacemi ovlivňujícími funkci nádorového supresoru *TP53*.
- Neomezený replikační potenciál:** Nádorová buňka získá tuto schopnost prostřednictvím zvýšené exprese telomerázy.
- Indukce angiogeneze:** Nádorové buňky získávají tuto schopnost v průběhu vývoje nádoru v důsledku hypoxie prostřednictvím přepnutí (angiogenní switch) z klidového stavu angiogeneze.
- Invazivní růst a metastazování:** Nádorové buňky se změnami exprese a funkce proteinů zajišťujících vazby mezi buňkami i buňkami a extracelulární matrix podstupují metastatickou kaskádu.
- Deregulace buněčné energetiky:** Nádorové buňky mají schopnost přeprogramovat energetický metabolismus, využívají mechanismů aerobní glykolýzy, která je rychlá, pokrývá nároky na stavební materiál buňky a spoluvytváří proonkogenní prostředí.
- Únik před imunitním systémem:** Schopnost uniknout imunitnímu dozoru nádorové buňky mohou získat například ztrátou exprese nádorových antigenů nebo mohou exprimovat inhibiční molekuly indukující apoptózu T lymfocytů.

- 9. Genomová nestabilita – porucha opravy DNA:** K hlavním mechanismům, které mohou být inaktivovány, patří systém opravy nesprávného párování bází DNA (MMR), systém vyštěpování nukleotidů (NER) či bází (BER) a systém opravy zlomů řetězců (homologní rekombinace a nehomologní spojování konců).
- 10. Zánět podporující nádorový růst:** Chronický zánět způsobuje poškození tkáně s následnou regenerací, což zvyšuje proliferaci buněk a zvyšuje riziko kumulace mutací. Zánětlivé buňky uvolňují reaktivní formy kyslíku a aktivně ovlivňují nádorové mikroprostředí, což také vede k buněčné proliferaci.

1.1.2 Morfologická stavba solidních nádorů

Histologická stavba nádoru neodpovídá žádné dospělé ani embryonální tkáni. Uspořádání nádorové tkáně je atypické. Nádory jsou tvořeny vlastní nádorově transformovanou a proliferující složkou – **nádorovým parenchymem** a **stromatem**, které je tvořeno podpurnou mezenchymální tkání s cévami.

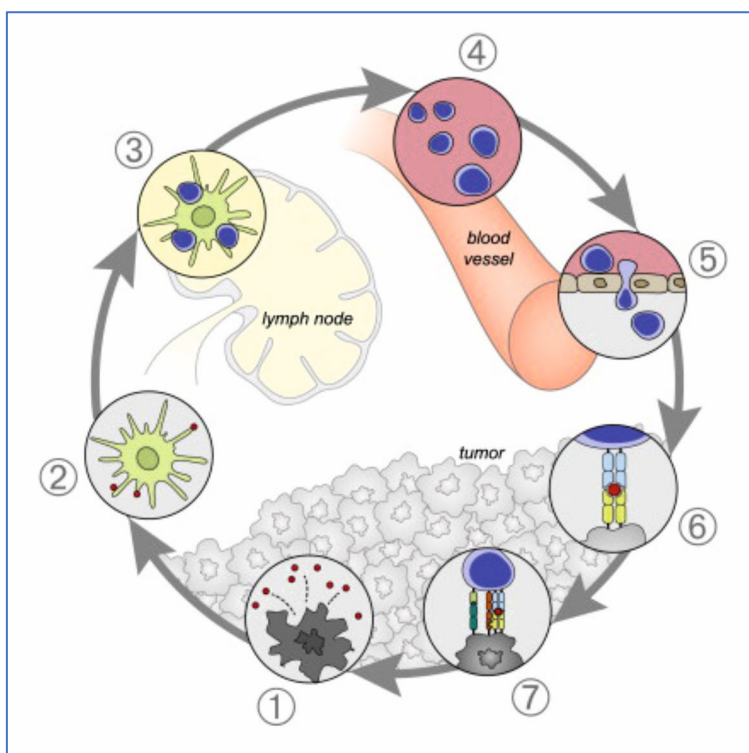
Nádorové buňky mají charakteristické morfologické znaky, jako jsou velké jádro s nepravidelným tvarem a velikostí, prominující jáderko a bazofilie cytoplasmy. Buňky mají různou velikost a tvar. Jsou přítomné atypické mitózy. Tyto změny reflektují nádorový metabolismus buněk².

Stroma nádoru neboli nádorové mikroprostředí je komplexní médium tvořené nemaligními buňkami, extracelulární matrix a zánětlivými mediátory. V nemaligní tkáni jsou parenchym a extracelulární matrix odděleny bazální membránou, v nádorové tkáni je bazální membrána obvykle nekompletní a rozlišení hranice mezi nádorovým parenchymem a stromatem je často špatně definovatelné. Nekompletní bazální membrána umožňuje úzkou interakci nádorového mikroprostředí s nádorovými buňkami. Tyto dynamické interakce umožňují růst tumoru, metastazování a chemorezistenci. Buňky stromatu jsou krevní a lymfatické endotelie, buňky imunitního systému, s nádorem asociované fibroblasty, mezenchymální zárodečné buňky a pericyty³. Imunitní buňky rozdělujeme na buňky **příspěvající k potlačení nádoru** (cytotoxické T lymfocyty, NK buňky, dendritické buňky (DCs), M1 makrofágy a N1 neutrofil), buňky **umožňující progresi nádoru** (regulační T lymfocyty, M2 makrofágy a myeloidní supresorové buňky) a B lymfocyty s kontroverzní úlohou^{4,5}. Množství stromatu je pro jednotlivé nádory obvykle typické, hepatocelulární karcinom (HCC) je tvořen nádorovým parenchymem s velmi malým množstvím stromatu,

na rozdíl od duktálního adenokarcinomu pankreatu (PDAC), kde je typické velmi bohaté stroma.

1.1.3 Imunologie nádorů

Schopnost imunitního systému rozpoznat a eliminovat nádorové buňky často selhává z důvodu přílišné podobnosti buňkám normálním. Interakce nádoru a imunitního systému je označována **teorií 3E**: „elimination“, kdy jsou nádorové buňky rozpoznány a zlikvidovány, „equilibrium“, kdy imunitní systém dokáže nádorový růst kontrolovat, ale ne zcela eliminovat a „escape“, imunitní dozor selhává a dochází k rozvoji nádorového onemocnění. Odolnost nádorů vůči imunitnímu systému je způsobena zejména variabilitou nádorových buněk a inhibicí T lymfocytů a dalších imunitních buněk. V protinádorové imunitě se uplatňují jak vrozené (NK buňky, neutrofilů, makrofágy a komplement), tak adaptivní mechanismy (antigen specifické T a B lymfocyty)^{5,6}.



Obrázek 2: Imunitní cyklus: 1) Uvolnění nádorových antigenů, 2) Prezentace antigenu DCs, 3) Aktivace T lymfocytů, 4) Přesun aktivovaných efektorových T lymfocytů, 5) Infiltrace nádoru, 6) Rozpoznání a navázání T lymfocytů na nádorové buňky, 7) Usmrčení nádorových buněk (Chen DS, 2013)

Rozpoznání a likvidaci nádorových buněk imunitním systémem označujeme jako **imunitní cyklus**. Nádorové antigeny jsou pohlceny DCs a v lymfatických uzlinách jsou tyto antigeny prezentovány prostřednictvím DCs T lymfocytům. Aktivace T lymfocytů je regulována prostřednictvím kontrolních bodů membránového proteinu programované buněčné smrti (PD-1) a cytotoxického proteinu asociovaného s T-lymfocyty 4 (CTLA4). Aktivované T lymfocyty jsou transportovány krevním oběhem zpět do nádoru, nádorové buňky jsou rozpoznány a likvidovány. Uvolněním nádorových antigenů imunitní cyklus pokračuje^{6,7}. Schématické znázornění imunitního cyklu je na obrázku 2.

1.1.4 Klasifikace nádorů

Pro správnou léčbu, sledování pacientů a studium vzniku nádorových onemocnění je nezbytná přesná klasifikace nádorů. Ke klasifikaci nádorů můžeme přistupovat různými způsoby. Standardně, historicky je klasifikace nádorů založena na primární anatomické lokalizaci a histologickém fenotypu. V současnosti však nemůže samotná histopatologie zodpovědět všechny otázky ohledně prognózy a odpovědi na léčbu, a proto bývá diagnóza v určitých případech doplněná molekulárním a imunitním profilem nádoru. Různé přístupy ke klasifikaci jsou uvedeny v tabulce 1.

1.1.5 Molekulární klasifikace nádorů

V současné době probíhá vývoj vysoce výkonných molekulárních metod pro klasifikaci nádorů a dochází ke stratifikaci pacientů podle prognostických a prediktivních biomarkerů, což umožňuje zpřesnit prognózu a optimalizovat léčbu pacientů. *KRAS*, *BRAF* a *NRAS* jsou důležité prognostické indikátory u kolorektálního karcinomu (CRC) a využívají se k predikci odpovědi na cílenou terapii proti receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR)⁸.

Tak jako informace o lidském genomu, které byly zkoumány v Projektu lidského genomu (The Human Genome Project – HUGO – HUMAN Genome Organisation), tak pro nádorové tkáně je k dispozici veřejně dostupná molekulární charakterizace (genomická, epigenomická, transkriptomická a proteomická data) 33 nejrozšířenějších nádorů v **The Cancer Genome Atlas**. Při ukončení studie v roce 2018 NCI (National Cancer Institute) a NHGRI (National Human Genome Research Institute) publikovali tato molekulární data v Pan Cancer Atlas⁹.

Tabulka 1: Kategorizace nádorů

Metoda kategorizace nádorů	Příklady kategorií
Biologické chování	benigní - nezhoubné
	maligní - zhoubné
Buňky, ze kterých nádor vznikl	mezenchymové
	epitelové
	neuroektodermové
	smíšené
Věk v době diagnózy	pediatrické
	dospělé
	menopauzální
Pořadí výskytu	primární
	sekundární
Genetické faktory	geny s vysokou penetrací
	familiární
	sporadické
Vliv prostředí	radiace
	komplikace po předchozí léčbě
	karcinogeny
Histopatologie	typ
	grade
Molekulární patologie	DNA profil
	RNA profil
	proteinový profil
Cíle molekulární léčby	somatické mutace
	signální dráhy (pathways)
Lymfocytární infiltrace	se zánětlivou infiltrací
	s infiltrací na periferii nádoru
	bez zánětlivé infiltrace

1.1.6 Mezinárodní systém klasifikace nádorů – WHO klasifikace nádorů

Světová zdravotnická organizace (WHO) pravidelně vydává klasifikace nádorů pro jednotlivé orgánové soustavy. Páté vydání WHO klasifikace Nádorů trávicího traktu z roku 2019 je členěno na oddíly dle anatomické lokalizace (jícen, žaludek, tenké a tlusté střevo atd.), rozděleno do kategorií (epitelové, mezenchymové, hemolymfoidní atd.) a do tříd (benigní léze a prekancerózy, maligní léze). Klasifikace je mezinárodním standardem jak pro péči o pacienty, tak pro výzkum nádorových onemocnění, obsahuje informace ke stanovení histopatologické diagnózy (typ nádoru) i v oblasti molekulární patologie.

Nejpočetnější skupinou nádorů gastrointestinálního traktu jsou nádory **epitelové**. Nejčastějšími maligními nádory **jícnu** jsou dlaždicobuněčný karcinom a adenokarcinom. V **žaludku** je převažujícím typem adenokarcinom. Nejčastějším nádorem **střeva** je kolorektální karcinom. V oblasti tenkého střeva jsou nádory málo časté, v anální oblasti převažují adenokarcinomy z různých oblastí/tkání a s lidským papilomavirem asociovaný dlaždicobuněčný karcinom. V appendixu se vyskytují jak adenokarcinomy, tak neuroendokrinní nádory. V **játrech** se vyskytují nejčastěji metastázy, primární nádory můžeme rozdělit na hepatocelulární a cholangiocelulární. Převažujícím nádorem **exokrinního pankreatu** je PDAC, v **endokrinním pankreatu** jsou to neuroendokrinní nádory¹⁰. Tato dizertační práce je založena na studiích PDAC, CRC a HCC tyto nádory jsou detailně popsány dále v textu.

Neuroendokrinní nádory jsou vzácné, pomalu rostoucí nádory z difúzního systému neuroendokrinních buněk. Většina (55 %) vzniká v gastrointestinálním traktu. Diagnostikovány jsou na základě obsahu chromograninu A, synaptofyzinu a neuron specifické enolázy¹¹.

Nejčastějším **sarkomem** v gastrointestinálním traktu je gastrointestinální stromální tumor (GIST)¹²⁻¹⁴, který se nejčastěji lokalizuje v žaludku a tenkém střevě¹⁴. Ostatní primární sarkomy jsou vzácné. Časté jsou benigní léze jako lipomy, leiomyomy a vaskulární léze¹⁵.

Hematologické nádory se v gastrointestinálním traktu vyskytují s různou frekvencí jako primární onemocnění nebo jako součást systémového onemocnění. 30 – 40 % všech extranodálních lymfomů se vyskytuje v gastrointestinálním traktu¹⁶. Nejčastěji je postižený žaludek (50 – 60 %), tenké střevo (30 %) a tlusté střevo (10 %)^{17,18}.

Orgán s nejčastěji diagnostikovanými **metastázami** v gastrointestinálním traktu jsou játra, další orgány, kde se mohou vyskytovat metastázy^{19,20} jsou uvedené v tabulce 2¹⁵.

Tabulka 2: Metastázy v gastrointestinálním traktu; zdroj WHO klasifikace nádorů

Lokalizace	Relativní frekvence výskytu	Nejčastější primární lokalizace
Jícen	do 3 %	mléčná žláza, plíce, kožní melanom
Žaludek	do 3 %	mléčná žláza, plíce, jícen, kožní melanom
Tenké střevo	70 %	kožní melanom, plíce, mléčná žláza, vaječník, varlata
Kolorektum	5-10 %	žaludek, mléčná žláza, krček děložní, plíce
Játra	70-97 %	kolorektum, mléčná žláza, žaludek, slinivka, melanom
Slinivka	4 %	ledviny, kožní melanom, kolorektum, mléčná žláza, sarkomy

1.1.7 Diagnostika nádorů

Nádorové onemocnění lze diagnostikovat prostřednictvím zobrazovacích metod, biochemických onkomarkerů a onkopatologicky **tkáňovou diagnostikou nádorů**. V patologii se běžně pro diagnostiku nádorů využívají metody cytologie, histologie, imunohistochemie, *in situ* hybridizace a molekulární patologie.

Tabulka 3: Obecný princip stanovení grade; zdroj WHO klasifikace nádorů

Grading	
grade 1	dobře diferencovaný maligní nádor
grade 2	středně diferencovaný maligní nádor
grade 3	nízce diferencovaný (nediferencovaný, anaplastický) nádor

Typing, grading a staging nádorů je základem stanovení diagnózy nádorového onemocnění: **Typ nádoru** určuje patolog na základě histopatologického a molekulárně biologického vyšetření. Jednotlivé typy nádorů jsou popsány ve WHO Classification of Tumours²¹. Pro každý konkrétní typ nádoru je vypracován „gradingový“ systém, podle kterého patolog určí stupeň malignity neboli „**grade**“. Tento systém je obvykle třístupňový

a je založen na charakteru růstu nádoru, stupni diferenciacie buněk, mitotickém/proliferačním indexu a dalších znacích. Obecný princip stanovení grade je uvedený v tabulce 3.

Nejčastěji používaným systémem k určení rozsahu nádorového onemocnění, čili „stage“, je systém založený na popisu rozsahu primárního nádoru (T), oblasti spádových mízních uzlin (N) a vzdáleného metastatického postižení (M) tzv. **TNM systém**, využívající klasifikační příručku TNM Classification of Malignant Tumours vydávaný Union for International Cancer Control²². Tento systém je vyvinut pro predikci klinického chování malignit, stanovení optimální terapie a usnadnění výměny přesných informací mezi lékaři. Klinické TNM stádium (cTNM) je stanoveno na základě klinických vyšetření (fyzikální, laboratorní, zobrazovací), patologické TNM stádium (pTNM) je stanoveno po chirurgickém zákroku a histologickém vyšetření tkáně nádoru. Klasifikace patologem po neoadjuvantní léčbě se označuje ypTNM. Obecný princip TNM klasifikace a „stagingu“ je uvedený v tabulkách 4 a 5.

Tabulka 4: Obecný princip TNM klasifikace; zdroj WHO klasifikace nádorů

TNM klasifikace		
T	tumor	velikost tumoru a lokální růst
N	node	rozsah metastáz v mízních uzlinách
M	metastasis	výskyt vzdálených metastáz

Tabulka 5: Principy stanovení stage; zdroj WHO klasifikace nádorů

Principy stanovení stage		
T	is	carcinoma in situ
	1 - 4	velikost, lokální invaze, vztah k okolním strukturám
N	X	nelze hodnotit
	0	bez metastáz
	1 - 3	počet, topografie
M	X	nelze hodnotit
	0	bez metastáz
	1	přítomnost metastáz

V současné době je u CRC do TNM systému začleněno **hodnocení imunitní odpovědi** přímo v nádoru jako TNM – I (TNM – Immune) = **imunoscóre**. V některých

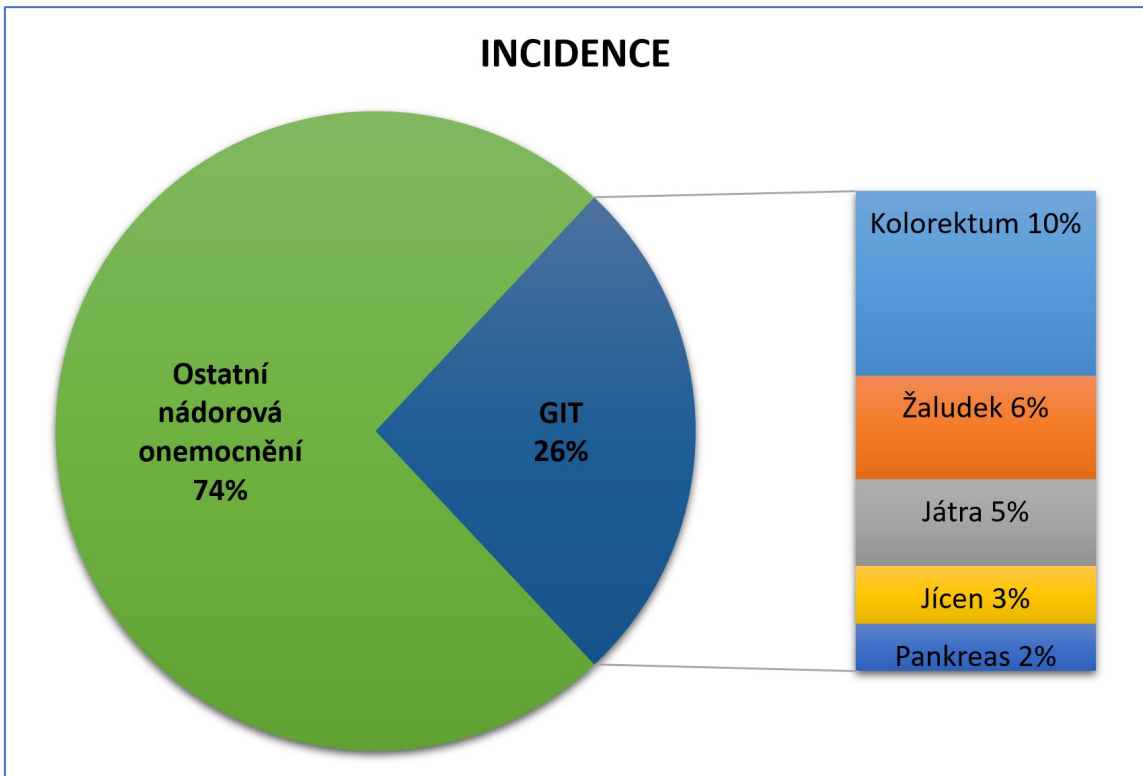
případech má imunoskóre větší prognostický význam než TNM klasifikace. Toto hodnocení je založeno na počtu, typu a lokalizaci imunitních buněk v nádoru. Oblasti zájmu jsou centrum a invazivní okraj nádoru, vyšetřovanými buňkami jsou CD3+ a CD8+ T lymfocyty. Očekává se, že hodnocení imunoskóre bude začleněno do klasifikace i u dalších typů nádorů^{23,24}.

Předpokládá se, že v budoucnosti budou do TNM systému začleněny i výsledky **genomického a proteomického profilování** nádorů²⁵. V České republice zástupci Všeobecné zdravotní pojišťovny ČR, České onkologické společnosti a Společnosti českých patologů vydali společné stanovisko k prediktivnímu testování solidních nádorů. Pro nádory gastrointestinálního traktu je doporučeno testování mutací *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* u kolorektálního karcinomu, vyšetření poruchy systému MMR proteinů imunohistochemicky u různých typů solidních nádorů na základě indikace onkologa a testování mutací *BRCA1* a *BRCA2* pomocí sekvenování nové generace (NGS) u PDAC v referenčních laboratořích (https://www.linkos.cz/files/pro_odborniky/ocozapisy/2020/2020-03-10-Spolecne-stanovisko_prediktivni-testovani-solidnich-nadoru_05032020.pdf).

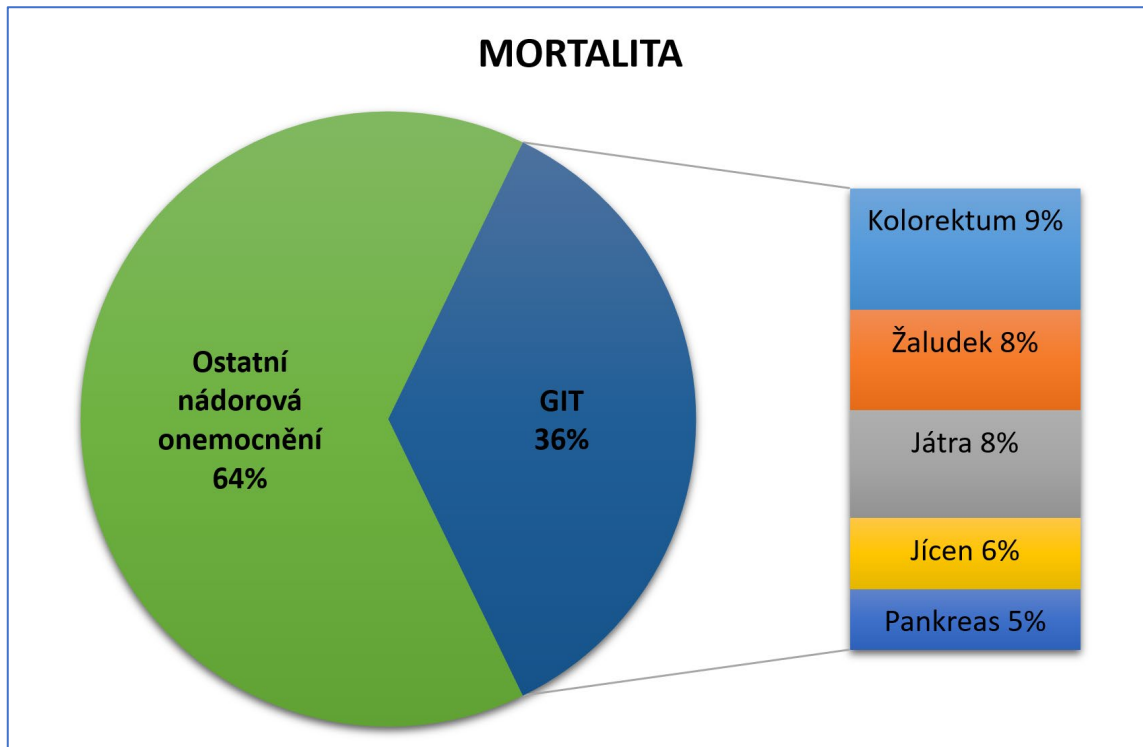
1.1.8 Epidemiologie nádorů

Nádory gastrointestinálního traktu (GIT) tvoří asi čtvrtinu všech nově diagnostikovaných nádorových onemocnění (5 026 243 případů v roce 2020) a více než třetinu úmrtí na nádorová onemocnění (3 544 225 úmrtí v roce 2020)²⁶ a představují celosvětový problém v souvislosti s lidským zdravím. Celosvětová incidence a mortalita gastrointestinálních nádorů je znázorněna na obrázku 3 a 4. Změny ve výskytu nádorů GIT souvisí se změnami v expozici rizikovým faktorům, které jsou pro tyto nádory společné. Jsou to zejména konzumace alkoholu, kouření tabáku, obezita a některá infekční onemocnění. Z důvodu pozdní diagnózy má většina nádorů GIT špatnou prognózu, kromě CRC v důsledku pokroku v diagnostice a léčbě²⁷.

Výskyt GIT nádorů lze ovlivnit primární a sekundární prevencí omezením spotřeby alkoholu a tabáku, úpravou životního stylu, imunizací proti hepatitidě B a skríníngem CRC²⁷.



Obrázek 3: Odhadovaný počet celosvětové incidence u nádorů gastrointestinálního traktu (GIT) v roce 2020, obě pohlaví, všechny věkové kategorie; zdroj GLOBOCAN 2020



Obrázek 4: Odhadovaný počet celosvětové mortality u nádorů gastrointestinálního traktu (GIT) v roce 2020, obě pohlaví, všechny věkové kategorie; zdroj GLOBOCAN 2020

1.1.9 Léčba nádorových onemocnění

Dle očekávaného výsledku můžeme protinádorovou léčbu rozdělit na **kurativní**, **potenciálně kurativní** s nejistým výsledkem a **paliativní** u pacientů s nevléčitelným nádorovým onemocněním. Základní možnosti protinádorové léčby jsou **chirurgická léčba**, **radioterapie** a **systémová léčba**.

Tyto metody jsou velmi často kombinovány, např. chirurgický výkon a systémová léčba chemoterapeutiky, případně radioterapie. Podle načasování kombinace léčby je podávána **adjuvantní onkologická léčba** (chemoterapie, radioterapie, cílená nebo hormonální léčba) navazující na radikální chirurgickou léčbu nebo radioterapii. Adjuvantní léčba doplňuje nebo zvyšuje účinnost léčby s cílem snížení rizika recidivy a eradikace mikrometastáz. **Neoadjuvantní onkologická léčba** předchází chirurgickému výkonu případně radioterapii²⁸ a jejím cílem je zmenšení nádoru a časná eradikace mikrometastáz použitím chemoterapie, radioterapie či cílené léčby.

Paliativní léčba pokročilých nádorových onemocnění se používá ke zvýšení kvality života a pokud možno i k jeho prodloužení u pacientů s nevléčitelným nádorovým onemocněním. Působí zmenšení, zastavení růstu a šíření nádoru. K paliativní léčbě můžeme využít paliativní chirurgický výkon, radioterapii nebo systémovou paliativní léčbu podle typu nádoru např. léčba inhibitory tyrozinkináz, monoklonálními protilátkami a imunoterapie²⁹.

Konvenční protinádorová chemoterapie je základní léčebnou metodou využívající cytostatik, jejichž mechanismus účinku inhibuje **syntézu nukleových kyselin** (antifolika, purinová a pyrimidinová analoga, inhibitory ribonukleotidreduktázy), poškozují **strukturu a funkci nukleových kyselin** (alkylační látky, interkalační látky, inhibitory topoizomeráz, látky s radiomimetickým účinkem), alterují **mikrotubulární mechanismus** (inhibice polymerizace a depolymerizace) a narušují **syntézu proteinů**. Možný je i kombinovaný účinek. Chemoterapie působí nespecificky a většinou postihuje i nemaligní buňky⁶.

Cílená léčba, na rozdíl od konvenční chemoterapie, která nerozlišuje nádorové a zdravé buňky, ovlivňuje specifické pochody v procesu karcinogeneze a metastazování. Cílené léky se vybírají **na základě prediktivních biomarkerů** a účinkují přímo **proti nádorovým buňkám** (inhibice proliferace, indukce apoptózy) nebo **proti faktorům mikroprostředí** (inhibice neovaskularizace, invazivity a metastazování či regulace protinádorové imunity). Jedná se o **monoklonální protilátky** proti specifickým extracelulárním strukturám (například protilátky proti receptorům růstových faktorů či proti

růstovým faktorům) a o **nízkomolekulární kinázové inhibitory** (například nízkomolekulární inhibitory EGFR a humánního epidermálního receptoru 2 (HER2/ERBB2), které blokují intracelulární kinázové domény a tím i celou signální dráhu^{6,30}.

Tumoragnostická léčba je cílená léčba založená na využití molekulárního profilu nádoru k identifikaci léčebných cílů. Tímto oborem se zabývá **precizní onkologie** za použití molekulárního testování, zejména NGS a cílem je zlepšit výsledky léčby pro větší počet pacientů. Je doporučeno účastnit se klinických studií a sdílet soubory molekulárních a klinických dat pacientů s nádorovými onemocněními³¹. V rámci precizní onkologie celosvětově probíhají klinické studie, např. NCI-MATCH Trial (National Cancer Institute - Molecular Analysis for Therapy Choice)³², která má za cíl léčbu založenou na specifických genetických změnách účinnou bez ohledu na typ nádorového onemocnění.

Hormonální terapie prostřednictvím hormonů (pohlavní hormony, glukokortikoidy) se u gastrointestinálních nádorů běžně nevyužívá.

Imunoterapie využívá imunitních mechanismů k terapii a prevenci nádorových onemocnění s cílem podpořit vlastní imunitu. Léčbu lze rozdělit na pasivní a aktivní imunoterapii, a dále na specifickou (proti konkrétnímu antigenu) či nespecifickou imunoterapii. Pro blokování růstových faktorů a indukci apoptózy se používají **monoklonální protilátky**, ty lze též konjugovat s cytostatikem nebo radioizotopem a specificky je dopravit do nádorové buňky. V současné době je nejvýznamnější možností imunoterapie terapie **inhibitory kontrolních bodů** využívající monoklonálních protilátek pro inhibici receptoru CTLA-4 a PD-1 a jeho ligandu (PD-L1). Dalšími možnostmi jsou využití cytokinů s cytostatickým efektem (interferon α) a pro aktivaci T-lymfocytů (interleukin 2); *in vitro* modifikace a kultivace patientských T-lymfocytů a navrácení zpět do organismu a protinádorové vakcíny^{6,33}.

Podpůrná léčba je využívána k omezení nežádoucích účinků léčby.

Účinnost onkologické léčby se hodnotí na základě **trvání efektu léčby** a **odpovědi nádoru** pomocí jasně definovaných pojmů⁶ uvedených v tabulce 6 a 7.

1.1.10 Transportéry zprostředkovaná léková rezistence

V současnosti často dochází v průběhu protinádorové léčby k selhání chemoterapie z důvodu rezistence k protinádorovým lékům. Léky, které jsou během primární léčby velmi

účinné, postupně ztrácí účinnost v důsledku lékové rezistence^{34,35}. Během progresse léčby se riziko lékové rezistence zvyšuje³⁶.

Tabulka 6: Nejčastější pojmy pro hodnocení doby přežití pacientů; zdroj Linkos.cz

Doba přežití		
OS (<i>overall survival</i>)	celkové přežití	doba do úmrtí (bez ohledu na příčinu)
DFS (<i>disease-free survival</i>)	přežití bez nemoci	doba, po kterou pacient je pacient živ a nemá známky choroby (je bez relapsu) po předchozí úspěšné léčbě primárního nádoru (operace, u některých nádorů radioterapie)
PFS (<i>progression-free survival</i>)	přežití bez progresse	doba, po kterou je pacient živ a nemá známky progresse nádoru, užívá se u pacientů s neoperovaným a/nebo metastatickým onemocněním
TTP (<i>time to progression</i>)	doba do progresse	hodnotí se podobně jako PFS, avšak bez započítání pacientů, kteří zemřou z jiných příčin bez progresse nádoru
TTF (<i>time to treatment failure</i>)	doba do selhání léčby	doba do (předčasného) ukončení léčby z jakéhokoli důvodu (toxicita, progresse nemoci, úmrtí)
EFS (<i>event-free survival</i>)	přežití bez příhody (události)	doba, po kterou je pacient živ a nenastala jiná definovaná příhoda
TTR (<i>time to recurrence</i>)	doba do recidivy	doba od resekce nádoru do recidivy/progresse onemocnění

Léková rezistence je schopnost nádorových buněk odolávat účinkům protinádorové chemoterapie. Přirozená (primární) rezistence je v nádoru přítomná již před léčbou, kdežto získaná (sekundární) rezistence vzniká v průběhu léčby. Zkřížená rezistence se vyskytuje u strukturálně podobných chemoterapeutik, naopak mnohočetná léková rezistence je zkřížená rezistence mezi chemoterapeutiky s rozdílnou strukturou a mechanismem účinku³⁷.

Léková rezistence obvykle vzniká **komplexním působením** a změnami ve více mechanismech současně³⁸.

Tabulka 7: Nejčastější pojmy pro hodnocení odpovědi nádoru; zdroj Linkos.cz

Odpověď nádoru		
CR (complete response)	úplná (kompletní) odpověď (remise)	úplné vymizení všech detekovatelných ložisek
PR (partial response)	částečná (parciální) odpověď	částečné přesně definované zmenšení součtu velikosti všech ložisek nádoru, ne však úplné vymizení
PD (progressive disease)	progrese (zhoršení) nemoci	přesně definované zvětšení součtu velikosti všech ložisek nádoru
NC/SD (no change / stable disease)	stabilizace nemoci	minimální změny velikosti nedosahující parametru PR nebo PD, onemocnění se tedy ani nezhoršuje ani nezlepšuje.

Účinek léčiva je závislý na jeho koncentraci v cílovém místě a závisí na schopnosti léčiva přestupovat přes biologické membrány, které jsou přirozenou bariérou. Přestup léčiva je podmíněn jeho chemickou podstatou a možnostmi přestupu jsou pasivní difúze, transport zprostředkovaný přenašeči, vezikulární transport a filtrace. **Transport zprostředkovaný přenašeči** je buď pasivní (**usnadněná difúze**) nebo **aktivní**, závislý na energii. Transportéry jsou influxní a efluxní³⁹.

Klíčovou roli ve **zvýšeném vylučování léku** z buňky hrají adenosintrifosfát (ATP) vážící (**ABC**) transportéry, a to zejména **P-glykoprotein** kódovaný *ABCB1* genem, **MRP1** (multidrug resistance-associated protein 1) kódovaný *ABCC1* genem a **BCRP** (breast cancer resistance protein) kódovaný *ABCG2* genem^{38,40}. Zvýšená exprese těchto tří proteinů vede ke zvýšenému vylučování léků z nádorových buněk a tím i ke snížení jejich intracelulární koncentrace a účinnosti⁴¹⁻⁴³. Přehled nejdůležitějších substrátů transportovaných prostřednictvím ABC transportérů⁴⁴ je uvedený v tabulce 8. V souvislosti s ABC transportéry má vliv i množství ATP v intracelulárním i extracelulárním prostředí nádoru. Nádorové buňky produkují velké množství ATP (Warburgův efekt) prostřednictvím aerobní glykolýzy⁴⁵ a tím je ovlivněna exprese ABC transportérů a podpora rezistence vůči protinádorovým lékům^{46,47}. ABC transportéry jsou všudypřítomné v membránách buněk

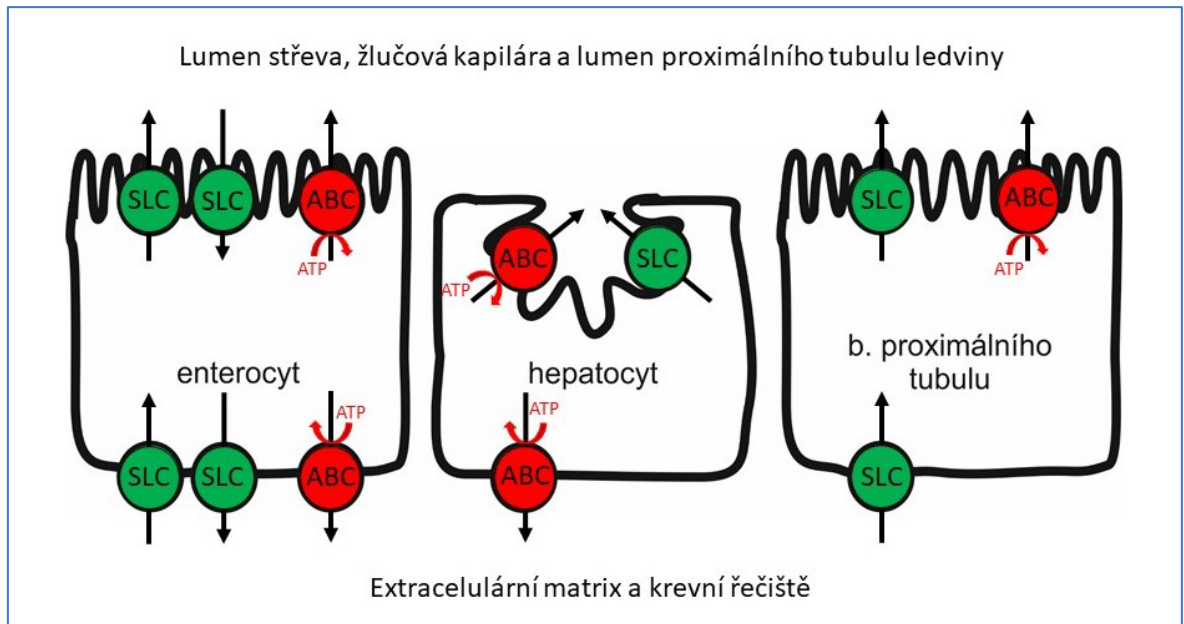
živých organismů. V eukaryotních buňkách aktivně, za spotřeby ATP, exportují různé substráty ven z buněk. ABC transportéry pro xenobiotika (P-glykoprotein, MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) a BCRP) jsou lokalizovány zejména v apikální membráně polarizovaných buněk⁴⁸. Dle struktury a funkce jsou ABC transportéry rozdělené do 7 podrodin A až G, které obsahují celkem 48 protein-kódujících genů⁴⁹.

Tabulka 8: Substráty pro ABC transportéry (Choi CH, 2005)

ABC transportér	Gen	Exogenní cytotoxické substráty
P-glykoprotein	ABCB1	Antracykliny, kolchicin, podofylotoxin, metotrexát, mitomycin C, taxany, vinca-alkaloidy
MRP1	ABCC1	Antracykliny, kolchicin, etoposid, těžké kovy, vinca-alkaloidy, paklitaxel
MRP2	ABCC2	Cisplatina, irinotekan, doxorubicin, etoposid, metotrexát, SN-38, vinca-alkaloidy
BCRP	ABCG2	Antracykliny, bisantren, kamptothecin, epirubicin, flavopiridol, mitoxantron, S-38, topotekan

Ve **sníženém vstřebávání léků buňkami** se uplatňují **SLC (solute carrier) transportéry**. Ke snížení vstřebávání dochází snížením vazby na transportér nebo snížením počtu transportérů. SLC transportéry tvoří skupinu více než 400 transmembránových transportérů rozdělených do 52 rodin dle funkce a struktury zajišťující fyziologické procesy od příjmu živin po absorpci léků a dalších cizorodých látek. Jsou popsány transportéry pouze pro endogenní substráty, transport převážně xenobiotik, či transportéry pro endogenní i cizorodé látky. Obvykle se jedná o multispecifické transportéry. Primárně transportují malé molekuly do buňky, ale mnoho SLC transportérů má importní i exportní funkci v závislosti na gradientu substrátu. SLC transportéry zprostředkovávají vstup léčiva do buňky a jsou lokalizovány jak v bazolaterální, tak v apikální membráně. Transportují prostřednictvím usnadněné difúze (uniport) a sekundárním aktivním transportem (antiport, symport)^{48,50,51}.

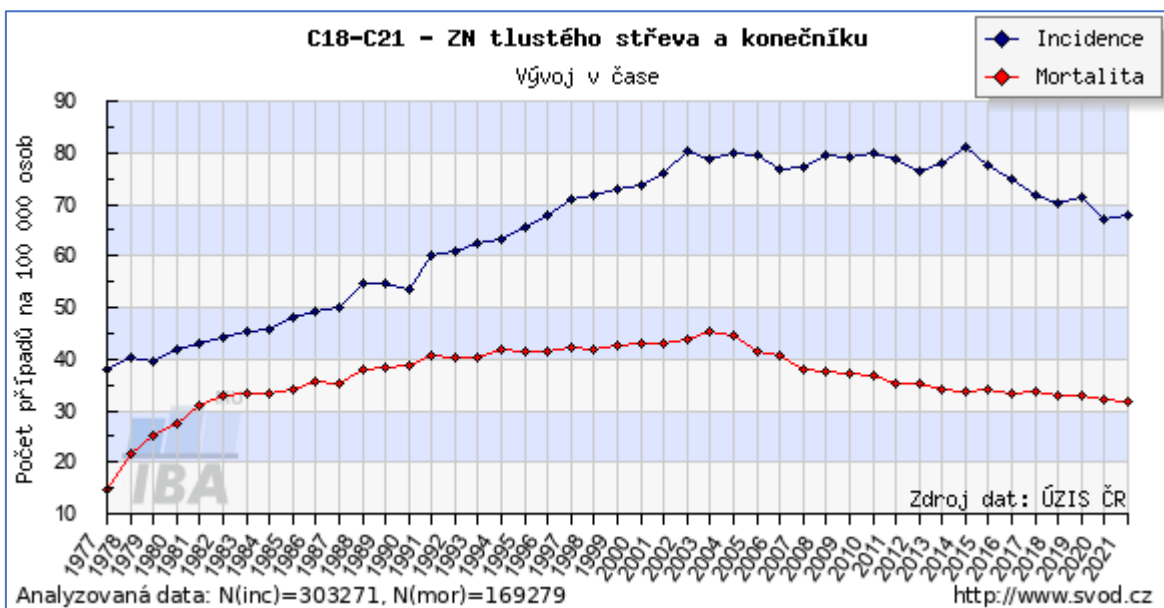
Obecná farmakokinetika léčiv ve vztahu k membránovým transportérům⁵² je znázorněná na obrázku 5.



Obrázek 5: Transport léčiv prostřednictvím SLC a ABC transportérů; zdroj <https://basicmedicalkey.com/drug-transporters/>

1.2 Kolorektální karcinom

Epidemiologie: Vývoj incidence a mortality v České republice ukazuje graf na obrázku 6. Ve srovnání incidence CRC s ostatními zeměmi světa je Česká republika na pátém místě. Incidence CRC je nejvyšší u věkových kategorií 65 až 80 let⁵³. Incidence je vyšší u mužů, jedná se u druhé nejčastější nádorové onemocnění, u mužů po nádorech prostaty a u žen po nádorech prsu⁵⁴.



Obrázek 6: Vývoj incidence a mortality CRC v České republice; zdroj SVOD.cz

Etiologie: Není známá přesná příčina onemocnění, ale je známo mnoho rizikových faktorů přispívajících ke vzniku onemocnění. Se vznikem nádoru je spojováno zejména složení potravy a životní styl⁵⁴. Strava s vysokým obsahem tuku může přispívat k nerovnováze střevního mikrobiomu a podporovat tak rozvoj CRC⁵⁵. Rizikovým faktorem je také přítomnost polypů střevní sliznice. Odhadem 6 až 10 % CRC označovaných jako dědičné syndromy je způsobeno specifickými mutacemi, obvykle u nemocných mladých dospělých osob. Tyto nádory bývají agresivnější a s horší prognózou⁵⁶. Ke zvýšení rizika rozvoje CRC dochází u Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy⁵⁷.

Symptomatologie: Z počátku bývá onemocnění bez příznaků. Později bývají neurčité příznaky, neurčité bolesti, únava, anemie z okultního krvácení u pravostranných nádorů; střídání zácpy a průjmů, ileus u levostranných nádorů. U nádorů v oblasti rekta dochází ke krvácení, nucení na stolicí a tenesmům⁵⁴.

Diagnostika: Klíčovým nástrojem k včasné diagnostice CRC je **skrínig**. Lze použít test okultního krvácení ve stolici nebo kolonoskopii. Kolonoskopie slouží k detekci a případnému odstranění preneoplastických polypů. V současné době se testují nové skrínigové metody například kolonografie s pomocí počítačové tomografie či magnetické rezonance, endoskopie kapslí a molekulární testy stolice a krve⁵⁸. Před chirurgickým výkonem je nutno doplnit vyšetření břicha počítačovou tomografií. Pro vyloučení metastáz se provádí sonografické vyšetření břicha a rentgenové vyšetření hrudníku.

Patologie: CRC je maligní epiteliální nádor vznikající v tlustém střevě s glandulární nebo mucinózní diferenciací. Většina CRC vzniká z prekursorových lézí (adenomy, polypy)⁵⁹. Dle lokalizace výskytu dělíme CRC na **pravostranné** (caecum, colon ascendes a colon transversum), **levostranné** (colon descendens, sigma, rectosigma) a **rektální**; základní charakteristika⁶⁰ je uvedena v tabulce 9. Většina CRC je levostranná a rektální⁶¹. Lokalizace nádoru částečně koreluje i s molekulárním profilem nádoru.

Makroskopický vzhled je variabilní, může se jednat o exofytické intraluminální masy, ulcerované endofytické nádory nebo nádory infiltrující cirkumferenciálně stěnu střeva s následnou stenózou. CRC metastazuje lymfogenní cestou do spádových mízních uzlin, hematogenní metastázy vznikají v játrech, následně v plicích a mozku¹⁰.

Histopatologicky se v 90 % jedná o adenokarcinomy, většina z nich je popsána jako blíže nespecifikovaný adenokarcinom, ale je popsáno několik histopatologických subtypů se specifickou klinickou a molekulární charakteristikou (např. mucinózní, serrated, mikropapilární atd.). V rámci stanovení histopatologické diagnózy se popisuje histologický subtyp, grade, hloubka invaze, lymfangioinvaze, angioinvaze, perineurální šíření, resekcí

okraje, velikost nádoru, lokalizace, případně počet vyšetřených a pozitivních (s metastázou) mízních uzlin, přítomnost odpovědi na léčbu, budding, imunitní odpověď a kvalita odebraného vzorku¹⁵. Mikroskopický vzhled CRC je na obrázku 7.

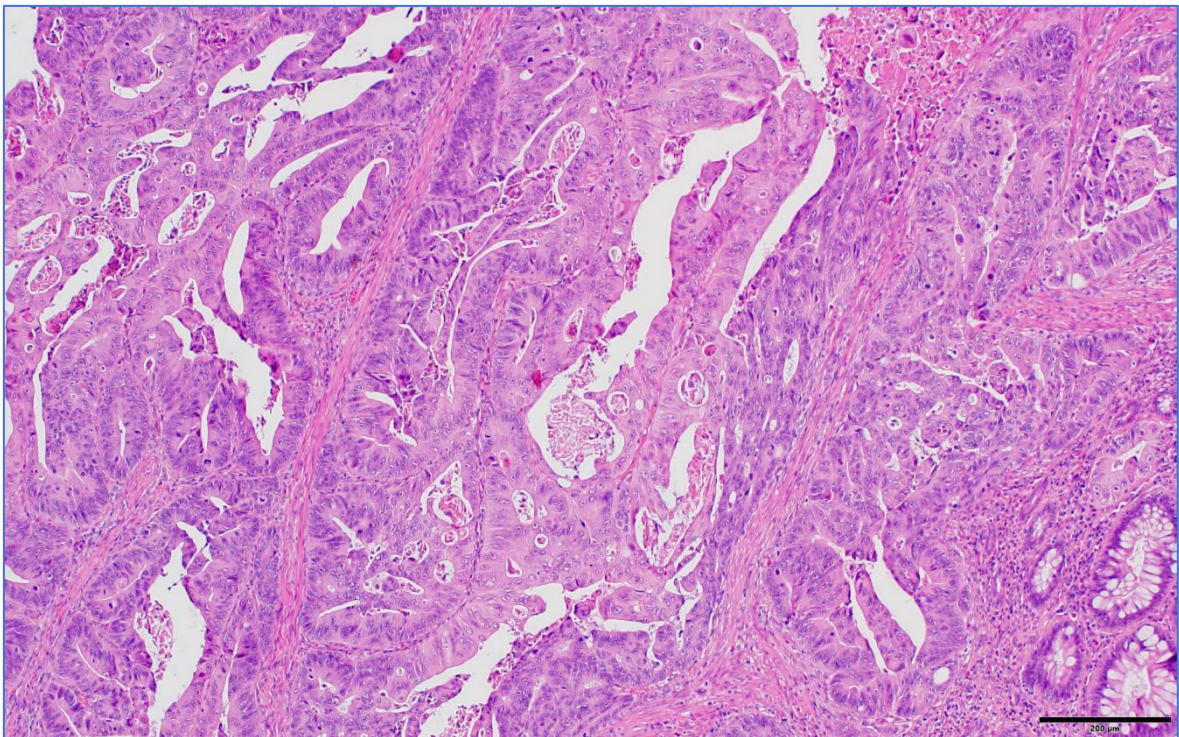
Tabulka 9: Charakteristika levostranných a pravostranných CRC (Baran B, 2018)

Rozdíly mezi levostranným a pravostranným CRC	
Pravostranný CRC	Levostranný CRC
Mucinózní adenokarcinom, sesilní serrated adenokarcinom	Tubulární, vilózní adenokarcinom
Vysoká frekvence nestability mikrosatelitů, deficit MMR	Chromozomální nestabilita
Vysoce imunogenní, vysoká infiltrace T-lymfocyty	Málo imunogenní
Metastazuje do peritoneální oblasti	Metastazuje do jater a plic
Výskyt ve vyšším věku	Výskyt v nižším věku
Převážně u žen	Převážně u mužů
Lepší prognóza u raných stádií (I a II)	Lepší prognóza u pokročilých stádií (III a IV)
Dobrá odpověď na imunoterapii	Dobrá odpověď na adjuvantní chemoterapii

Molekulární profil: Kolorektální karcinom je heterogenní onemocnění a každý jednotlivý nádor má specifické spektrum genetických a epigenetických změn souvisejících s chováním nádoru a terapeutickou odpovědí. Sekvenováním byl opakovaně identifikován velký počet genových mutací, změn chromozomů a signálních drah týkajících se progresu CRC⁶². K modifikaci funkce genů dochází v důsledku mutací, translokací, delecí, amplifikací či inzercí, tzv. copy number variation/gene amplification nebo epigenetickými změnami.

Třemi základní molekulární typy jsou CRC s chromozomální nestabilitou (CIN), CRC s nestabilitou mikrosatelitů (MSI) a CRC s metylací CpG ostrůvků (CIMP). **Chromozomální nestabilita** je charakterizována změnami v počtu a struktuře chromozomů s kumulací mutací v *APC*, *TP53*, *KRAS* a *BRAF* genech a změnami WNT signální dráhy a dráhy mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK). CIN se vyskytuje v 75 až 85 %

případů CRC. Generalizovaná **mikrosatelitová nestabilita** je důsledkem mutace MMR genů (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* nebo *PMS2*) nebo hypermetylace a umlčení promotoru *MLH1*, četnost MSI je 15 %. Zárodečné mutace MMR genů vede ke vzniku Lynchova syndromu. Nádory můžeme rozdělit na stabilní (MSS), s nízkou frekvencí nestability mikrosatelitů (MSI-L) a s vysokou frekvencí nestability mikrosatelitů (MSI-H). **Metylace CpG ostrůvků** vede k epigenetické inaktivaci nádorových supresorových genů, vyskytuje se v 17 % případů CRC. CIMP se vyskytuje u „serrated“ nádorů^{10,59,63}.



Obrázek 7: Kolorektální karcinom, barvení hematoxylin a eozin, zvětšení 10x, měřítko 200 μm ; vlastní zpracování

Velké množství onkogenů a tumor supresorových genů je změněno prostřednictvím CIN, MSI a CIMP v každém CRC. Pouze některé z nich jsou však řídicí geny (oncodrivers) v nádorové progresi. V karcinogenezi CRC jsou deregulovány jako hlavní signální dráhy APC/WNT, PI3K, TGF- β , MAPK a p53 signální dráhy⁶⁴.

Pro stanovení strategie léčby u pokročilých stádií se vyšetřuje stav MSI/MMR, aktivační mutace *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* a případně *HER2*⁶⁵.

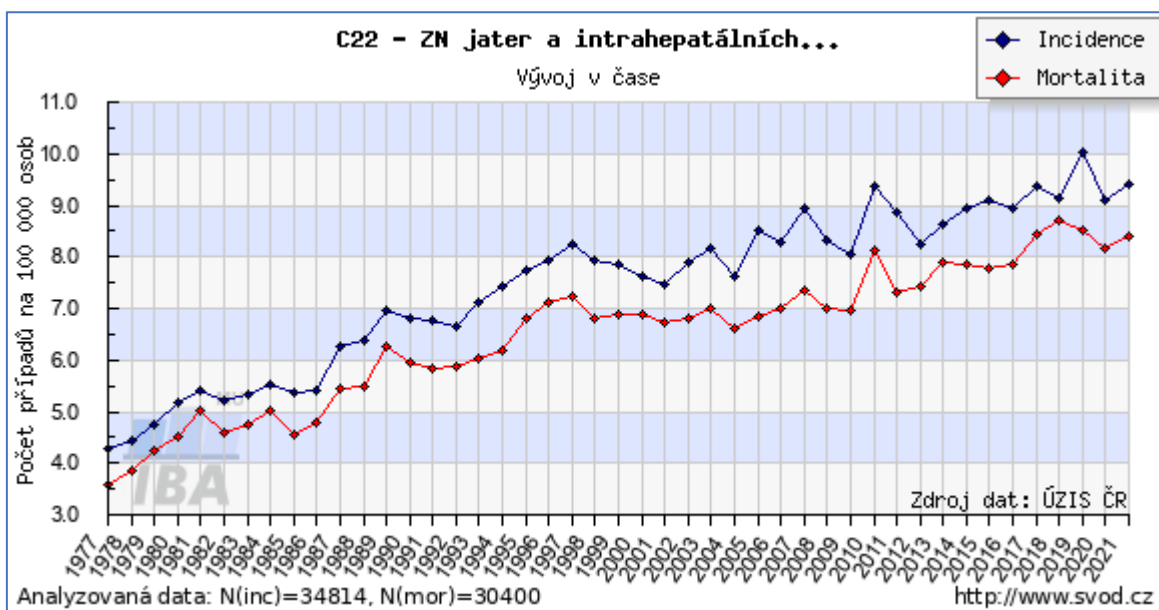
Terapie: Nádory tlustého střeva ve stádiu 0 (carcinoma in situ) a ve stádiu I jsou indikovány k chirurgické léčbě; onemocnění ve stádiu II je indikováno k chirurgické léčbě a v pokročilých případech bez deficiencie MMR k adjuvantní chemoterapii. Nádory tlustého

střeva ve stádiu III jsou indikovány k chirurgické léčbě a následné chemoterapii. Nádory rekta jsou indikovány k operační léčbě (např. transanální endoskopická mikrochirurgie, resekce rekta) a radioterapii prostřednictvím multidisciplinárního týmu na pracovišti, kde je rutinně komplexní léčba nádorů rekta prováděna, následně může být podána chemoterapie. V některých případech je vhodné indikovat neoadjuvantní chemoterapii⁶⁵.

Prognóza: Prognóza závisí na rozsahu nádorového onemocnění – stanovení stádia (stage). U stádia I je pětileté přežití asi 90 %, u stádia II asi 66 % a při generalizaci onemocnění jen 10 %⁵⁴.

1.3 Hepatocelulární karcinom

Epidemiologie: Vývoj incidence a mortality v České republice ukazuje graf na obrázku 8. Ve srovnání incidence HCC s ostatními zeměmi světa je Česká republika na 106 místě. Incidence HCC je nejvyšší u věkových kategorií 65 až 80 let⁵³.



Obrázek 8: Vývoj incidence a mortality HCC v České republice; zdroj SVOD.cz

Etiologie: Na vzniku nádoru se podílí chronické jaterní onemocnění v důsledku hepatitidy B⁶⁶ a C^{67,68}, alkoholické nebo metabolické steatitidy^{69,70}, vrozených onemocnění jater a v důsledku působení aflatoxinu B1⁷¹. V 80 % případů vzniká v cirhotických játrech. Tak jako u CRC strava s vysokým obsahem tuku může přispívat k nerovnováze střevního mikrobiomu s následným onemocněním jater (zánět, fibróza, cirhóza) a přispívat k rozvoji HCC⁷².

Symptomatologie: Příznaky onemocnění jsou nespecifické, u časných stádií dochází k náhodným nálezům nádorů. U pokročilého onemocnění dochází k únavě, bolestem břicha, ztrátě hmotnosti, ikteru a známkám portální hypertenze⁵⁴.

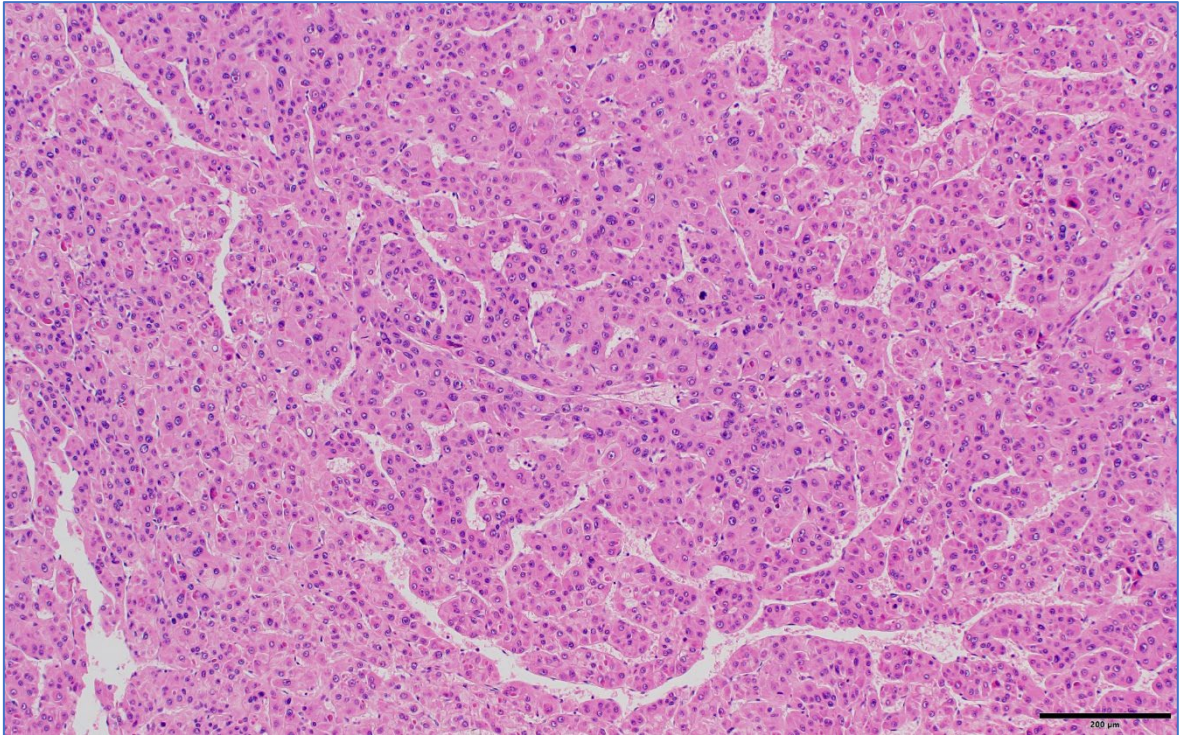
Diagnostika: Pacienti s cirhózou a hepatitidou B jsou sledováni, nejčastěji používanými kontrolními testy jsou stanovení hladiny sérového α -fetoproteinu a sonografie jater. Diagnózu HCC lze stanovit na základě zobrazovacích metod (počítačová tomografie, magnetická rezonance), pouze v případě nejasného nálezu je nutností odebrat jaterní biopsii k histologickému vyšetření. Součástí diagnostiky je i vyšetření funkčního stavu jater⁵⁸.

Patologie: HCC je primární epiteliální maligní nádor s hepatocelulární diferenciací který se může lokalizovat kdekoliv v játrech.

Makroskopicky se jedná o zelený, žlutý až světle hnědý nádor často s (pseudo)kapsulou. V játrech se HCC vyskytuje ve čtyřech formách: jako **jeden solidní nádor**, jeden **dominantní nádor s mnohočetnými malými satelitními nádory** v blízkém okolí, **mnohočetné drobné noduly** podobné cirhotickým nodulům a **mnohočetné nezávislé primární nádory**. Nádor se šíří lymfatickými cévami i vénami. Nejčastěji se HCC šíří intrahepatálně prostřednictvím vény portae. U pokročilých stádií se nádor šíří extrahepatálně do plic, mízních uzlin, kostí a nadledvin¹⁵.

Histopatologicky se HCC diagnostikuje na základě morfologické hepatocelulární diferenciacie, případně s doplněním specifického imunohistochemického (IHC) vyšetření. Jsou popsány čtyři morfologické vzory (trabekulární, solidní, pseudoglandulární a makrotrabekulární), avšak u 50 % resekovaných HCC je přítomen smíšený morfologický vzor¹⁵. Mikroskopický vzhled HCC je na obrázku 9.

Molekulární profil: V buňkách HCC se může vyskytovat 5 až 121 mutací v jednom nádoru⁷³. Mutace promotoru telomerázové reverzní transkriptázy (TERT) je nejčastější a velmi brzkou mutací⁷³⁻⁷⁵. Na základě rozsáhlých studií genové exprese u různých populací pacientů lze HCC rozdělit do dvou hlavních molekulárních podtříd, které korelují s histopatologií i klinickými rysy nádoru. **Agresivnější skupina** větších a méně diferencovaných nádorů s vyšším rizikem výskytu recidivy a horší prognózou je charakterizována inaktivací nádorového supresoru *TP53* a aktivací proonkogenních signálních drah. **Méně agresivní skupina** menších a diferencovanějších nádorů s lepší prognózou je charakterizovaná mutací *CTNBI* a nadměrnou expresí složek jaterní signální dráhy WNT^{76,77}.



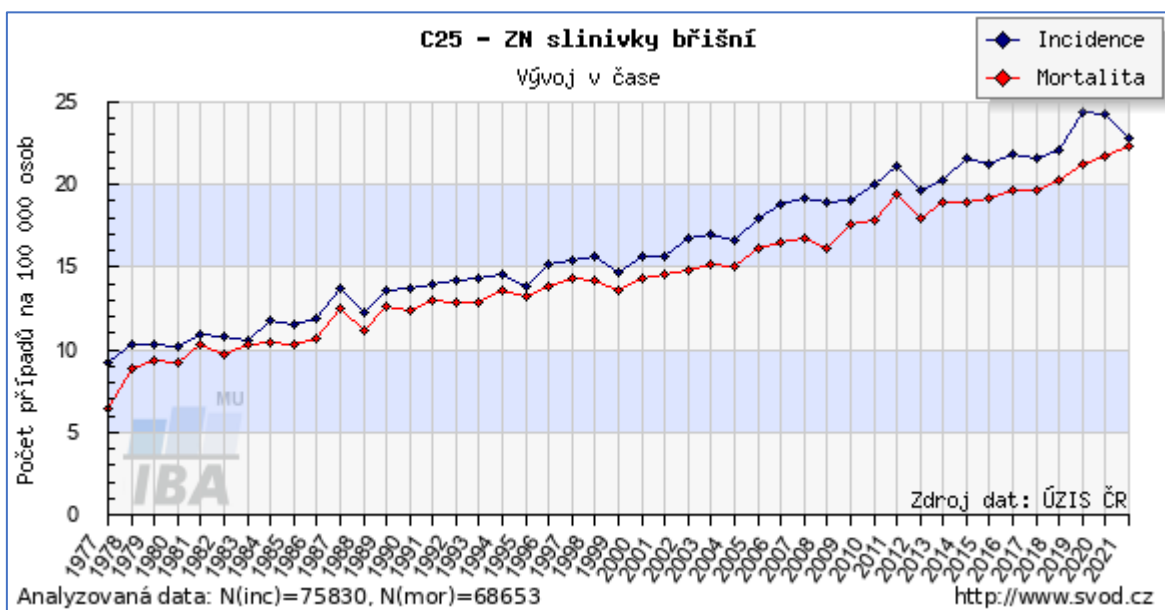
Obrázek 9: Hepatocelulární karcinom, barvení hematoxylin a eozin, zvětšení 10x, měřítko 200 μm ; vlastní zpracování

Terapie: Léčba HCC se indikuje na základě rozsahu a lokalizace nádoru, funkčního stavu jaterního parenchymu a celkového stavu pacienta. Potenciálně kurativní je pouze chirurgická léčba (resekce a transplantace jater), která se indikuje u časného a středního rozsahu onemocnění. Další možností léčby jsou transarteriální chemoembolizace a radiofrekvenční ablace nádorových ložisek. U pokročilých stavů je indikována systémová cílená léčba zejména anti PD-L1 či léčba proti vaskulárnímu endotelovému růstovému faktoru (VEGF) a léčba inhibitory proteinových kináz⁶⁵.

Prognóza: Prognóza závisí zejména na velikosti nádoru a jeho diferenciaci. Lepší prognóza je u resekabilních nádorů, bohužel většina nádorů je diagnostikována jako neresekabilní, což závisí i na stavu jaterního parenchymu. U pacientů po resekci se udává pětileté přežití asi 20 %⁵⁴.

1.4 Duktální adenokarcinom pankreatu

Epidemiologie: Vývoj incidence a mortality v České republice ukazuje graf na obrázku 10. Ve srovnání incidence PDAC s ostatními zeměmi světa je Česká republika na druhém místě. Incidence PDAC je nejvyšší u věkových kategorií 65 až 80 let⁵³. Onemocnění se častěji vyskytuje u mužů⁵⁴.



Obrázek 10: Vývoj incidence a mortality PDAC v České republice; zdroj SVOD.cz

Etiologie: Příčinami vzniku jsou kouření tabáku^{72,78,79}, nezdravý (západní) styl života⁸⁰⁻⁸⁴ a nadměrný příjem alkoholu⁸⁵. Cigaretový kouř má přímý karcinogenní vliv^{86,87}, v patogenezi má vliv i chronická pankreatitida⁸⁸. I když pankreas není v přímém kontaktu se střevním obsahem, může dieta s vysokým obsahem tuku a následné změny mikrobiomu ovlivnit vznik PDAC⁷². Až 10 % PDAC tvoří familiární formy s mutacemi v *BRC A2*, *CDKN2A* a *ATM* genech⁸⁹.

PDAC vzniká z **neinvazivních prekancerózních** lézí (pankreatická intraepitelová neoplazie, intraduktální papilární mucinózní neoplazie a mucinózní cystická neoplazie), tyto léze jsou časté a jejich výskyt se zvyšuje s věkem, ale většina těchto lézí neprogreduje do PDAC⁹⁰⁻⁹².

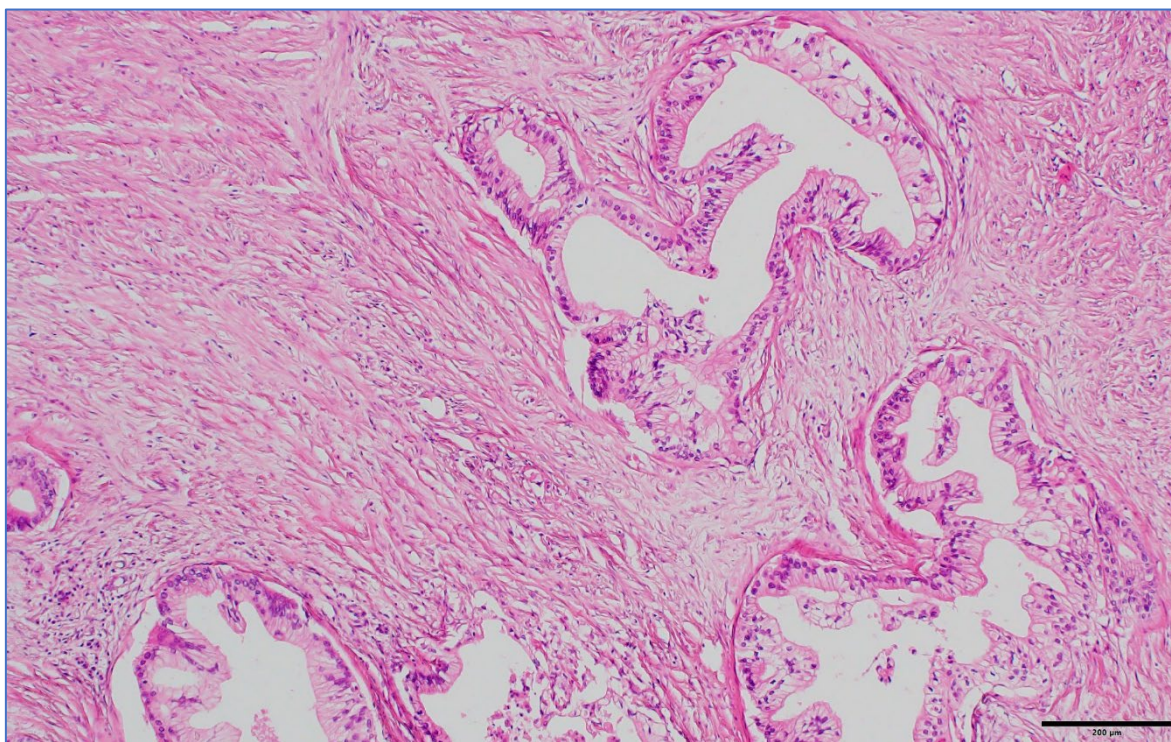
Symptomatologie: V počátečních stádiích jsou příznaky nespecifické, připomínající funkční dyspeptické syndromy. Klinické příznaky jako bolesti, nechutenství a hubnutí je spojeno s pokročilými, většinou metastatickými stádii. U nádorů lokalizovaných v hlavě pankreatu bývá častým příznakem obstrukční ikterus⁵⁴.

Diagnostika: Klinické příznaky PDAC jsou nespecifické a přítomné až v pokročilém stádiu onemocnění, proto bývá detekován pozdě. Běžně používaný sérový biomarker je tumorový antigen 19-9 (CA 19-9), ze zobrazovacích metod je vhodná počítačová tomografie. Pro potvrzení diagnózy lze využít endoskopickou biopsii⁹⁰. Skríníng onemocnění není proveditelný z důvodu nízké incidence PDAC, ale doporučuje se sledovat

vysoce rizikové pacienty (rodinná anamnéza PDAC, cystické léze pankreatu, mutace ve specifických genech)⁹³.

Patologie: PDAC je invazivní epiteliální nádor s glandulární (duktální) diferenciací, obvykle s produkcí mucinu. Dvě třetiny nádorů vznikají v hlavě pankreatu, zbytek v těle nebo ocase. Většinou se jedná solitární lézi, může však být i multifokální.

Makroskopicky se jedná o tvrdý, neostře ohraničený, žlutobílý nádor, občas s mikrocystickými či makrocystickými oblastmi. Často je přítomná infiltrace okolních tkání nádorem. U pokročilých stádií dochází ke karcinóze peritonea, lymfogenním metastázám do mízních uzlin a hematogenním metastázám do jater, méně často do plic, kostí a nadledvin^{10,15}.



Obrázek 11: Duktální adenokarcinom pankreatu, barvení hematoxylin a eozin, zvětšení 20x, měřítko 200 μ m; vlastní zpracování

Histopatologicky se obvykle jedná o dobře až středně diferencovaný nádor s tvorbou glandulárních a tubulům podobných struktur s výraznou desmoplastickou reakcí. Obvyklé cesty šíření jsou perineurální invaze, venózní invaze a kancerizace duktů¹⁵. Mikroskopický vzhled PDAC je na obrázku 11.

Molekulární profil: Nejčastějšími genetickými alteracemi v buňkách PDAC jsou onkogenní mutace *KRAS* a inaktivace nádorových supresorů *TP53*, *SMAD4* a *CDKN2A*. Ztráta exprese *SMAD4* je specifická pro PDAC a může být využita v IHC diagnostice^{15,90,94}.

Terapie: Radikální resekce tumoru v centru specializovaném na operativu nádorů pankreatu je jedinou potenciální kurativní metodou, avšak resekabilních onemocnění v době diagnózy je pouze 10 až 20 %. Po operaci následuje chemoterapie. U hraničně resekabilních pacientů je možné podat neoadjuvantní chemoterapii. U pokročilého stádia je doporučena paliativní chemoterapie. U metastatického onemocnění lze při detekci MSI-H zvážit léčbu inhibitory PD-1, při detekci mutací genů *BRCAl/2* použít chemoterapii na bázi platiny⁶⁵.

Prognóza: PDAC je fatální ve většině případů. Lepší prognóza je u resekabilních nádorů, kterých je však v době diagnózy méně než 20 %. Pětileté přežití i u kompletně resekovaných nádorů nepřesahuje 5 %. Většina pacientů umírá do jednoho roku⁵⁴.

1.5 Molekulární metody v onkologii

Pro diagnostiku, prognózu i cílenou léčbu lze využít molekulární metody. Z tkáně fixované zamražením, etanolem nebo pufovaným formalínem lze izolovat nukleové kyseliny a následně prokázat germinální nebo somatické mutace. Změny na úrovni genomu prokazujeme z DNA a aktivitu buněk odráží ribonukleová kyselina (RNA) a protein. K izolaci nukleových kyselin lze využít fenol-chloroformovou extrakci, komerční kity nebo automatické izolátory. Před izolací nukleových kyselin je nutné tkáň histologicky vyšetřit, po izolaci nukleových kyselin je prováděna kontrola integrity nukleových kyselin polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) amplifikace kontrolních genů a kontrola kvantity získané DNA nebo komplementární DNA (cDNA) (spektrofotometricky, fluorometricky).

V klinické onkologii lze molekulárních metod využít pro **diagnostiku hereditárních onkologických syndromů** (např. Lynchův syndrom); vyhledávání nosičů **mutací s predispozicí** k nádorovému onemocnění; pro stanovení **prognózy**; pro **personalizovaný výběr léků** (např. inhibitory EGFR, BRAF (Serine/threonine-protein kinase B-raf), ALK (anaplastic lymphoma kinase protein), ROS1 (receptor tyrosine kinase 1) a PARP (poly adenosine diphosphate ribose polymerase)), **tekutou biopsii** pro neinvazivní monitorování onemocnění a pro **diagnostiku nádorů neznámého původu**⁹⁵.

1.5.1 Izolace DNA z formalínem fixované a parafínovou technikou zpracované tkáně

S rozvojem NGS se archivní formalínem fixované a parafínovou technikou zpracované (FFPE) tkáně stávají největším dostupným zdrojem biologického materiálu s velkým

potenciálem jako zdroj molekulárních informací. Ačkoliv je fixace formalínem a následné zpracování parafínovou technikou zlatým standardem pro patologii, v molekulární biologii je zdrojem chemické modifikace a degradace nukleových kyselin⁹⁶⁻⁹⁸.

Formalín interaguje s proteiny a nukleovými kyselinami v tkáni, v důsledku toho vznikají příčné vazby (crosslinks) histon-DNA, DNA-protein, DNA-DNA, formaldehyd-DNA adukty; dochází k deaminaci cytosinu a 5-methyl cytosinu s následným vznikem „sekvenčních“ artefaktů⁹⁶. Četnost výskytu mutací, zejména záměn C>T, je díky tomu v FFPE tkáních vyšší než v odpovídajících zmražených vzorcích⁹⁹. Nepříznivý efekt formalínu během fixace je způsobený vysokou teplotou, nízkým pH, nízkou koncentrací solí a přítomností kyseliny mravenčí ve formalínu¹⁰⁰. Tento efekt lze příznivě ovlivnit používáním pufovaného formalínu a skladováním v chladu a tmě.

Během extrakce DNA dochází k fragmentaci DNA v důsledku silných kovalentních vazeb vzniklých během fixace. Vhodným přístupem je proto rozbití křížových vazeb ještě před extrakcí DNA⁹⁷, využívá se metod běžně používaných pro odhalení antigenních epitopů v imunohistochemii, například kombinace vysoké teploty a vysokého pH¹⁰¹ nebo metody využívající mikrovln⁹⁷.

1.5.2 Polymerázová řetězová reakce

V průběhu PCR dochází ke zmnožení/replikaci **primery definované části DNA** nebo cDNA *in vitro*. Během kvantitativní PCR (qPCR) je průběh reakce a množství nově vzniklé DNA monitorováno v reálném čase prostřednictvím flouorescenčních či interkalačních sond.

PCR je v rutinní diagnostice využívána k průkazu fúzních genů, určení klonality onemocnění (nádorové klony B a T lymfocytů), průkazu známých mutací, namnožení úseků DNA (cDNA) pro následné analýzy (sekvenování), průkazu hladiny exprese mediátorové RNA (mRNA) a mikroRNA (miRNA) a detekci minimální diseminované/reziduální nemoci¹⁰. Jedná se o vysoce citlivou metodu pro detekci nízkého počtu nádorových buněk, což využívají mnohé klinické studie k sledování změn genů (mutace, delece, translokace a amplifikace), přítomnosti onkogenních virů a exprese genů specifických pro tkáň, nádor či metastázy¹⁰².

1.5.3 Sekvenace nukleových kyselin

Prostřednictvím sekvenace je určováno pořadí jednotlivých nukleotidových bází v molekule nukleové kyseliny.

Sangerova metoda sekvenování

Sangerovo sekvenování je založeno na procesu replikace DNA jako u PCR, ale v reakční směsi jsou fluorochromem značené dideoxynukleotidy, které přerušují proces replikace. Vzniklá směs různě dlouhých molekul DNA ukončených označeným dideoxynukleotidem je elektroforeticky rozdělena podle velikosti. **Kombinací velikosti úseků DNA a detekce značených dideoxynukleotidů (ddNTP) lze odečíst pozice jednotlivých nukleotidů.** Lze sekvenovat pouze krátké úseky DNA, cca 1 000 párů bází. Analytická citlivost je pouze 15 až 25 %, lze tedy spolehlivě zachytit změny DNA, pokud je přítomná u 15 – 25 % kopií DNA¹⁰. Sangerovo sekvenování se využívá k **detekci jednotlivých mutací** (např. *BRAF*, *BRCA1* a 2, *c-KIT*, *EGFR* a *KRAS*) a **ověření specifiity PCR reakce**¹⁰.

Sekvenování nové generace

NGS je metoda **masivně paralelního sekvenování DNA**. NGS je založeno na stejném principu jako Sangerovo sekvenování, dochází k navázání fluorescenčně značených ddNTP a tím zastavení replikace, následuje přečtení signálu a odštěpení ddNTP, následuje pokračování replikace. Na rozdíl od Sangerova sekvenování se DNA klonuje v bezbuněčných systémech, pro přípravu sekvenačních knihoven není třeba bakterií; sekvenování probíhá masivně a paralelně a k detekci jednotlivých sekvencí dochází přímo, bez potřeby elektroforézy.

Masivní rozvoj NGS v letech 2004 až 2006 a dramatický nárůst sekvenačních dat změnil biomedicínský výzkum¹⁰³. Technologie NGS můžeme rozdělit na technologie pro krátké čtení (druhá generace) a technologie s dlouhým čtením (třetí generace). Pracovní postup **technologie s krátkým čtením** (250 až 800 bp) zahrnuje přípravu knihoven, sekvenování a analýzu dat. Nejrozšířenějšími technologiemi jsou Illumina a Ion Torrent. **Technologie s dlouhým čtením** (> 10 kb) překonává problémy krátkého čtení sekvenováním přímo z nativní DNA a lze ji využít i pro detekci repetitiv v celém genomu a detekci strukturálních variant. Nejčastějšími technologiemi jsou Pacific Biosciences a Oxford Nanopore Technology¹⁰⁴.

NGS má mnoho výhod (sekvenace všech mutací pro velký počet genů, rychlost, citlivost a relativně nízká cena), proto se uplatňuje v **diagnostice nových mutací, detekci známých mutací, detekci variant počtu kopií, detekci hereditárních syndromů** a pro **určení prognózy a terapeutických cílů**¹⁰⁵.

Ke studiu nádorových buněk můžeme použít několik různých přístupů, případně jejich kombinaci. Výhodou **sekvenování celého genomu** (WGS) je možnost identifikace strukturálních variant, včetně delecí, amplifikací, chromozomálních translokací a uniparietálních disomií. Omezením WGS jsou vysoké náklady a složitá analýza velkého množství získaných dat. Prostřednictvím selektivního **sekvenování exomu** (WES) můžeme identifikovat kódující geny, miRNA a nekódující RNA. Po hybridizaci se sondami dojde k „zachycení“ cca 200 000 exonů, které tvoří 1 až 2 % genomu. Výhodami je poměrně hluboké pokrytí a nižší náklady, na druhou stranu nelze zjistit mutace v nekódujících oblastech a většinu strukturálních variant¹⁰⁶. Na druhou stranu je 85 % známých genetických změn obsaženo v exomu¹⁰⁷, což činí tuto variantu velmi efektivní. Nutností je znát hranice jednotlivých kódujících oblastí DNA. **Transkriptomové sekvenování** slouží k identifikaci všech transkribovaných genů včetně kódujících a nekódujících RNA. Výhodou je získání informací o hladinách genové exprese, detekce postranskripčních změn (alternativní sestřih) a detekce fúzních transkriptů v důsledku chromozomálních změn. Nelze detekovat nekódující oblasti a mutace se ztrátou genu. Další možností je **detekce epigenetických modifikací** (metylace DNA, metylace a acetylace histonů)¹⁰⁶.

Sekvenováním získáváme velké množství dat, které je třeba bioinformaticky zpracovat a následně interpretovat. Pro analýzu získaných dat lze použít velké množství volně dostupných nástrojů a databází. Díky existenci 3 až 4 miliónů dědičných polymorfismů je většina nalezených sekvenčních variant ve vzorku nádoru právě těmito polymorfismy a získané mutace s řídicím efektem (driver mutations) je třeba odlišit srovnáním nádorového genomu se vzorkem krve nebo nemaligní tkáně obsahující zárodečný genom¹⁰⁶.

1.6 Imunohistochemické metody v onkologii

IHC je metoda založená na přirozené schopnosti protilátek vázat se na specifické antigeny *in vitro*. Nekovalentní vazba použité protilátky s antigenem v tkáni je zprostředkována hydrofobními vazbami, vodíkovými můstky, van der Walsovými silami a interakcí iontů.

Výhodou IHC vyšetření je jeho vysoká specifita a senzitivita s informací o přesné lokalizaci antigenu v tkáni. Další výhodou pro výzkum je možnost provádění vyšetření na archivních FFPE tkáních.

1.6.1 Postup IHC detekce

IHC vyšetření se skládá z několika po sobě jdoucích kroků¹⁰⁸:

- 1) **Odhalení antigenních epitopů**, které byly skryty během fixace a zahřátí v parafínu. Lze použít enzym nebo teplem zprostředkované demaskování. Tento krok je specifický jak pro každou primární protilátku, tak pro jednotlivé laboratoře z důvodů použití různých postupů fixace a zpracování do parafinových bloků. Běžně používané metody:
 1. Tepelně indukované odhalení epitopu s citrátovým pufrům pH 6
 2. Tepelně indukované odhalení epitopu s EDTA pufrům pH 9
 3. Krátké (4 min) natrávení proteázou (např. Proteináza K)
- 2) **Blokování endogenních enzymů**. Aby nedocházelo k falešně pozitivní reakci, je nutné v tkáni zablokovat endogenní enzymy, které mají shodný substrát s následně použitým detekčním systémem. V případě křenové peroxidázy, která je nejčastěji používaným enzymem, se nadbytkem substrátu blokuje endogenní peroxidáza. V případě použití avidin biotinové metody se blokuje endogenní avidin-biotinová aktivita.
- 3) **Blokování pozadí**. Z důvodu zabránění nespecifických vazeb protilátky na antigen ve vyšetřované tkáni se blokují nespecifická vazebná místa. Lze použít různé blokovací pufrы, které soutěží s protilátkou o nespecifická vazebná místa:
 1. Normální sérum zvířete, ze kterého pochází sekundární protilátka v koncentraci 1 až 5 %.
 2. Hovězí sérový albumin, želatina, odtučněné sušené mléko v koncentraci 1 až 5 %.
 3. Předem připravené komerční pufrы
- 4) **Inkubace s primární protilátkou**. Protilátky jsou glykoproteiny definované **afinitou** (síla vazby protilátky s jednou antigenní determinantou), **aviditou** (síla vazby několika vazebných determinant antigenu a protilátky), **specifitou** (selektivní vazba k antigenu bez zkřížených reakcí) a **sensitivitou** (relativní množství antigenu, které je schopné detekovat). Rozlišujeme polyklonální protilátky připravované

imunizací zvířat a monoklonální protilátky produkované tkáňovými kulturami. Jejich srovnání je uvedeno v tabulce 10.

Tabulka 10: Srovnání vlastností polyklonálních a monoklonálních protilátek

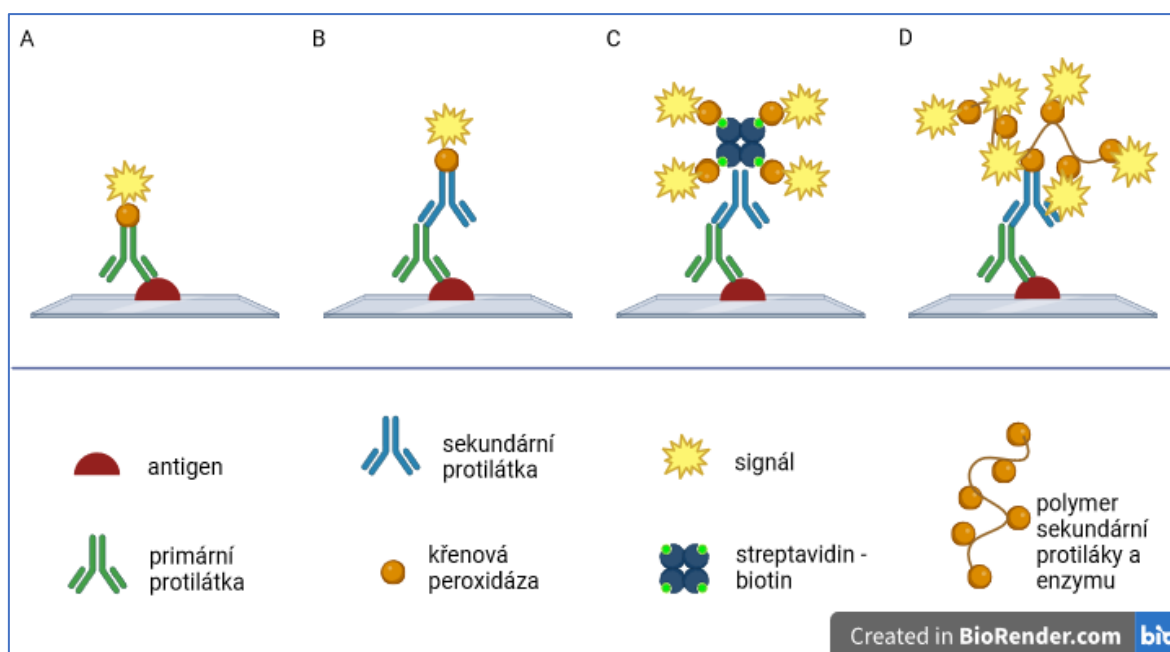
Vlastnost	Polyklonální protilátka	Monoklonální protilátka
Specifita	++	+++
Afinita	+++	++
Avidita	+++	++
Reprodukovatelnost	ne	ano
Množství připravené protilátky	omezené	neomezené
Počáteční náklady	nízké	vysoké
Počet epitopů rozeznávaných protilátkou	2 a více	1
Zkřížená reakce	ano	ne
Reprodukovatelnost výsledků	++	+++
Citlivost	+++	++

5) **Vizualizace imunoenzymatickou reakcí** se skládá z několika stupňů reakce dle použité metody. Nejčastěji používanými enzymy jsou **křenová peroxidáza (HRP)** s následně použitým chromogenem diaminobenzidinem (DAB) nebo aminoethylcarbazolem (AEC) a **alkalická fosfatáza** používaná s chromogeny Fast Red a Fast Blue.

1. **Přímá metoda:** Antigen je detekován enzymem značenou primární protilátkou s navázaným chromogenem.
2. Nejčastěji používaná **nepřímá dvoustupňová metoda:** Na antigen je navázána neoznačená primární protilátka, dalším krokem je navázání enzymem značené sekundární protilátky a následná detekce chromogenem.
3. **Avidin biotinová metoda** pro amplifikaci signálu: Na antigen je navázána neoznačená primární protilátka, následným krokem je navázání biotinylované sekundární protilátky a amplifikace enzymem označeným biotinem a následná detekce chromogenem.

4. **Dvoustupňová polymerová metoda** pro amplifikaci signálu: Na antigen je navázána neoznačená primární protilátka, následně je navázán polymer sekundární protilátky a enzymu, následuje detekce chromogenem. Často používaný univerzální imuno-peroxidázový polymer je N-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI). Tento způsob detekce je běžný v detekčních kitech pro zpracování v IHC automatech.

Schéma běžně používaných imunoenzymatických reakcí je na obrázku 12.



Obrázek 12: Schéma IHC reakce: A) přímá metoda; B) nepřímá dvoustupňová metoda; C) avidin biotinová metoda; D) dvoustupňová polymerová metoda; vlastní zpracování (BioRender)

6) Dobarvení jader **hematoxylinem**

1.6.2 Vliv preanalytické fáze na kvalitu IHC vyšetření

Preanalytická fáze má významný vliv na výslednou kvalitu IHC vyšetření:

Ischémie je redukována rychlým vložením vzorků do standardního fixativa. V důsledku prodlevy ve fixaci tkáň dochází k nevratným změnám způsobeným autolýzou¹⁰⁹ a tím k falešně negativním výsledkům.

Ideální fixace tkáň s rovnováhou mezi dobrou morfologií a dobrou antigenicitou¹⁰⁸. Standardním fixativem je 10% neutrální pufrovaný formalín. Pokud se používají jiná

fixativa, musí dojít k validaci IHC protokolů. Reakce formaldehydu s makromolekulami v tkáni jsou početné a komplexní. Dochází k interakci s proteiny, nukleovými kyselinami a nenasycenými lipidy, nereaguje se sacharidy¹⁰⁸. Nejvýznamnější změnou je tvorba příčných vazeb mezi proteiny nebo proteiny a nukleovými kyselinami s následnou změnou terciární struktury proteinů, sekundární struktura proteinů je zachována¹¹⁰. V případě nedostatečné fixace tkáně může procesem demaskování antigenů dojít k destrukci cílového proteinu a falešně negativním výsledkům. V případě prefixování tkáně může být standardní demaskování antigenů nedostatečné a důsledkem je falešně negativní výsledek

1.6.3 Automatické inkubační metody

Výhodou automatizace je standardizace metody a úspora práce. Nevýhodou je potřeba údržby a možnost poruchy automatu. Automatizace má také negativní vliv na znalosti laborantů a může být frustrující z důvodu nedostatečné kontroly nebo povědomí o procesech probíhajících během automatického procesu.

Jsou dostupné otevřené a uzavřené automatické systémy. Otevřené systémy jsou flexibilní, podobně jako manuální metody a jsou preferovány výzkumnými laboratořemi. Lze v nich upravit jednotlivé protokoly, časy a teploty inkubace a je možné použít jakékoliv reagensie. Uzavřené systémy jsou vysoce standardizované a jsou preferované v klinických diagnostických provozech. Do protokolů nelze zasahovat a lze použít pouze reagensie dodávané výrobcem přístroje¹⁰⁹. Přehled tří nejčastěji používaných IHC automatů je uvedený v tabulce 11, kde je uveden i plně automatizovaný BOND RXm (Leica Biosystems), určený pro výzkum, na kterém byly provedeny některé z analýz této práce.

1.6.4 Využití IHC metod









IHC vyšetření se používá v diagnostice nádorového typu (**tkáňově specifické markery**), stanovení prognózy onemocnění (**prognostické markery**) a indikaci k cílené terapii (**prediktivní markery**).

Pro diagnostické účely se u **HCC** využívají markery hepatocelulární diferenciace Hep Par 1 (hepatocyte paraffin 1) a Argináza 1 a markery maligních hepatocytů Glypican 3, Protein teplotního šoku 70 a Gluthamin syntetáza^{109,111}.

V diagnostice **CRC** jsou využívány cytokeratiny: cytokeratin 7 negativní a cytokeratin 20+ exprese je typický stav jak pro nenádorovou sliznici tlustého střeva, tak

pro buňky CRC; CDX2 (caudal type homeobox 2) je exprimován v enterocytech a v nádorových buňkách CRC (mimo těch, co vykazují MSI)¹¹².

Tabulka 11: Přehled IHC automatů; zpracováno a doplněno dle Handbook of Practical Immunohistochemistry (Lin F, 2022)

Výrobce				
	Benchmark ULTRA TM	BOND RXm	Bond-III TM	Autostainer Link 48
IHC barvicí automat				
Protokol				
Zahřívání sklíček	ano	ano	ano	ne
Odparafínování	ano	ano	ano	separátní modul
In situ hybridizace	ano	ano	ano	ano
Dvojité barvení	ano	ano	ano	ano
Dobarvení jader	ano	ano	ano	ano
Odvodnění a projasnění	ne	ne	ne	ne
Montování	ne	ne	ne	ne
Délka standardního protokolu	90 skel/8 hodin	30 skel/2,5 hodiny	30 skel/2,5 hodiny	48 skel/3 hodiny 24 skel/2 hodiny
Skla				
Kapacita	30	30	30	48
Sestava 1 cyklus	30 nezávislých barvicích jednotek	3 lišty po 10 sklech	3 lišty po 10 sklech	4 lišty po 12 sklech
Označení "bar-code"	ano	ano	ano	ano
Reagencie				
Robotický pohyb	rotační karusel	maticové pole	maticové pole	maticové pole
Kapacita kontejnery	35	36	36	42
Označení "bar-code"	ano	ano	ano	ano
Nastavitelný objem dávkování	ne	ne	ne	ano
Možnost použití reagií jiných dodavatelů	primární protilátky, enzymy	ano	primární protilátky	ano
Třídění odpadu	ano	ano	ano	ano
Jedinečné vlastnosti	manuální aplikace protilátek, nezávislé barvicí jednotky	technologie krycích skel CovertilleTM; bezkonkurenční flexibilita protokolu a výběr reagií, multiplexy, IF, TUNEL	technologie krycích skel CovertilleTM	flexibilní protokoly umožňují pracovat s novými reagenciemi a validovat jejich používání v laboratorní rutině

IHC ztráta exprese v proteinech **MMR** má diagnostický, prognostický i terapeutický význam: může indikovat potencionální Lynchův syndrom (barvení proteinů MLH1 (MutL protein homolog 1), PMS2 (PMS1 protein homolog 2), MSH2 (MutS protein homolog 2) a MSH6 (MutS protein homolog 6))¹¹³⁻¹¹⁵. CRC s MMR defekty mají obecně lepší prognózu; neodpovídají na léčbu 5-fluorouracilem, ale odpovídají na léčbu PD-1 inhibitory¹¹⁶. Nádorové buňky exprimující **PD-L1** mohou být cílem pro léčbu PD-L1 inhibitory u dlaždicobuněčného karcinomu jícnu, adenokarcinomu žaludku a CRC¹¹⁶. **HER2** abnormality u méně než 5 % CRC a 18 % adenokarcinomů jícnu a žaludku by mohly identifikovat případy vhodné k cílené léčbě^{117,118}.

Proliferační marker protein Ki-67 (**Ki67**) se využívá jako prognostický marker pro určení grade u neuroendokrinních nádorů¹¹⁹. Molekulární abnormality u PDAC jsou dobře charakterizovány, ale nebyly zatím úspěšně využity jako IHC markery¹¹⁶.

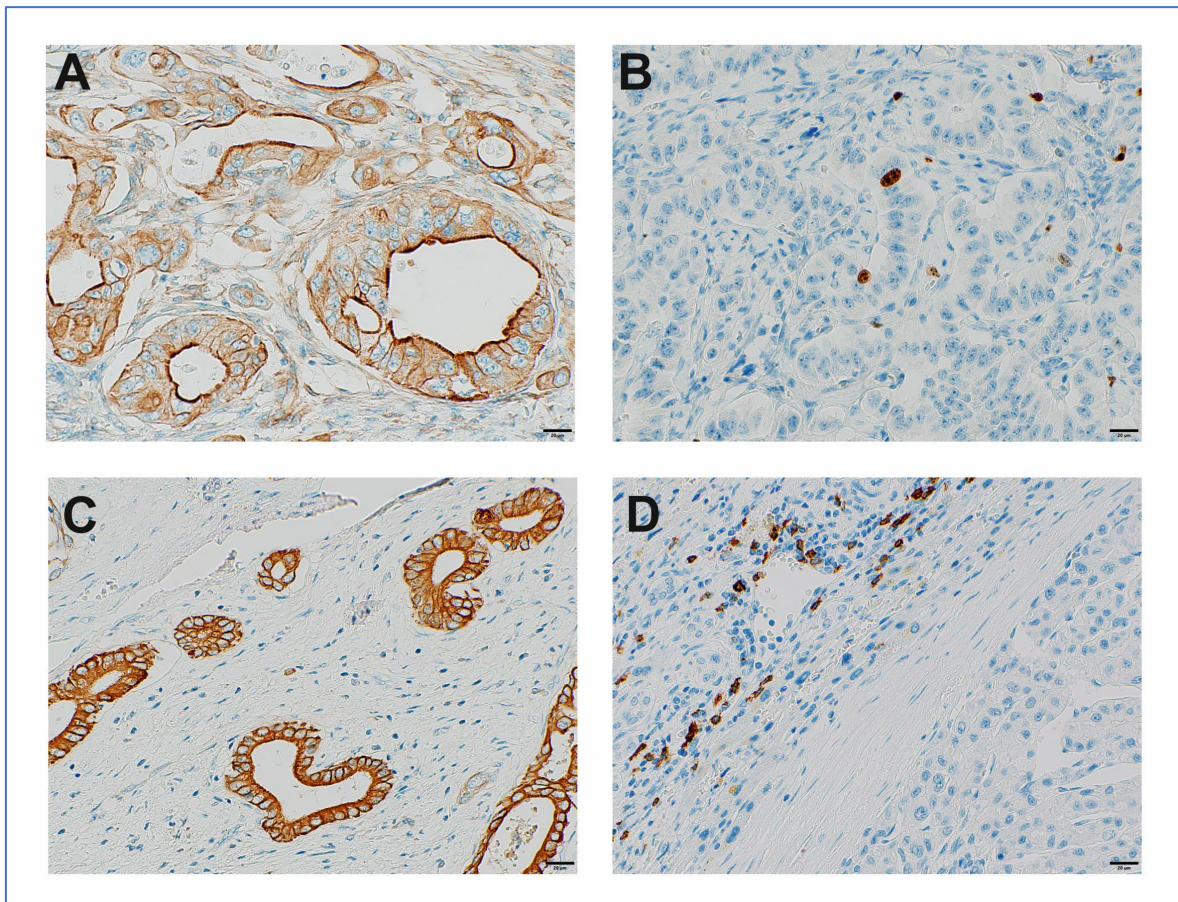
1.6.5 Interpretace IHC

Pro správnou interpretaci IHC je nutností používat adekvátní pozitivní a negativní kontrolu. **Pozitivní kontrola** je potřebná k vyloučení falešně negativního výsledku a negativní kontrola k vyloučení falešně pozitivního výsledku. Jako pozitivní kontrola se používají tkáně, u kterých je jistá pozitivní exprese antigenu. Výhodou je, pokud předpokládáme pozitivní buňky přímo ve vyšetřované tkáni (např. endotel) a můžeme je využít jako vnitřní pozitivní kontrolu. Pro **negativní kontrolu** se používá testovaná tkáň inkubovaná bez primární protilátky (s ředícím roztokem primární protilátky)^{108,109}.

Hodnocení vizualizace antigenu¹²⁰:

- 1) Přítomnost nebo nepřítomnost signálu
- 2) Mikroanatomická distribuce signálu (extracelulární prostor, typ buněk)
- 3) Subcelulární lokalizace signálu:
 - a. **Membránová**, u epitelových buněk lze navíc rozlišit apikální a bazolaterální lokalizaci signálu
 - b. **Jaderná**
 - c. **Cytoplasmatická**
 - i. Granulární (organely)
 - ii. Fibrilární (cytoskelet)
 - iii. Homogenní

Příklady subcelulární lokalizace IHC signálu jsou znázorněny na obrázku 13.



Obrázek 13: Příklady apikální membránové pozitivity: protein ABCD4 u PDAC (A), jaderné pozitivity: protein Ki67 u neuroendokrinního nádoru pankreatu (B), cytoplasmatické pozitivity: pancytokeratin u PDAC (C) a membránové pozitivity CD20 v blízkosti HCC (D); zvětšení 40x, měřítko 20 μ m; vlastní zpracování

Může být hodnocena také abnormální nebo abnormálně lokalizovaná pozitivita v důsledku patologického procesu, např. u mutace genu *TP53*^{120,121}. V některých případech se uvádí procentuální zastoupení nádorové populace exprimující stanovený antigen, např. proliferační marker Ki67.

Přesná **kvantifikace intenzity** reakce je obtížná a neexistuje žádný univerzální skórovací systém¹⁰⁹, proto se používají různá semikvantitativní hodnocení např. slabá, střední či silná intenzita signálu.

2 Cíle a hypotézy

Dizertační práce je založena na 5 studiích věnujících se PDAC, CRC a HCC. Základním cílem bylo získat nové poznatky v oblasti biomarkerů pro nádory GIT pomocí korelací s prognostickými ukazateli a prediktory léčebné odpovědi nebo chemorezistence. Definovali jsme tyto výzkumné otázky:

- 1) Souvisí **exprese a lokalizace proteinů MRP2/ABCC2, SLC22A3, TAP1/ABCB2, CFTR/ABCC7, SUR1/ABCC8 a ABCD4** v nádorových buňkách **PDAC** s klinickými daty a přežíváním pacientů?
- 2) Má **exprese proteinů MRP2/ABCC2, SLC22A3, TAP1/ABCB2, CFTR/ABCC7, SUR1/ABCC8 a ABCD4** v nádorových buňkách **PDAC** prokázaná imunohistochemicky stejnou prognostickou váhu jako hladiny jejich transkriptů v předchozích studiích?
- 3) Mají **distribuce a počet T a B lymfocytů** prognostický význam u pacientů s resekovaným **HCC**?
- 4) Má součinnost genetických (**mutace *TERTp* a *CTNNB1***) a imunitních (**cytotoxické CD8+ T lymfocyty**) faktorů prognostickou hodnotu pro pacienty s **HCC**?
- 5) Má **sekvence exomu** (tj. kompletní kódující sekvence genomu) u párových vzorků primárního **CRC** nádoru a synchronních jaterních metastáz význam pro stanovená prognózy a predikci terapie?
- 6) Mají primární nádory a synchronní jaterní metastázy **CRC** stejný mutační profil?

3 Přehled publikací

Publikace č. 1: Cervenková L, Vycital O, Bruha J, Rosendorf J, Palek R, Liska V, Daum O, Mohelnikova-Duchonova B, Soucek P. **Protein expression of ABCC2 and SLC22A3 associates with prognosis of pancreatic adenocarcinoma.** Sci Rep. 2019 Dec 24;9(1):19782. doi: 10.1038/s41598-019-56059-w. PMID: 31874997; PMCID: PMC6930301. **11 citací, IF 4,997**

Podíl na článku: Optimalizovala, provedla a vyhodnotila jsem imunohistochemické experimenty, připravila jsem snímky do publikace. Podílela jsem se na hodnocení výsledků, psaní a finální revizi publikace.

Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-56059-w>



Publikace je součástí dizertační práce jako příloha 1.

Publikace č. 2: Cervenková L, Palek R, Moulisova V, Liska V, Daum O, Mohelnikova-Duchonova B, Soucek P. **Protein expression and localization of ABC transporters in pancreatic adenocarcinoma: Prognostic role of ABCC8.** Pancreatology. 2023 Oct 10:S1424-3903(23)01794-5. doi: 10.1016/j.pan.2023.10.008. Epub ahead of print. PMID: 37839922. **0 citací, IF 3,6**

Podíl na článku: Optimalizovala, provedla a vyhodnotila jsem imunohistochemické experimenty, připravila jsem snímky do publikace. Podílela jsem se na hodnocení výsledků a psaní a finální revizi publikace.

Dostupné

z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1424390323017945?via%3Dihub>



Publikace je součástí dizertační práce jako příloha 2.

Publikace č. 3: Trailin A, Červenková L, Ambrozkiwicz F, Ali E, Kasi P, Pálek R, Hošek P, Třeška V, Daum O, Tonar Z, Liška V, Hemminki K. **T- and B-Cells in the Inner Invasive Margin of Hepatocellular Carcinoma after Resection Associate with Favorable Prognosis.** Cancers (Basel). 2022 Jan 25;14(3):604. doi: 10.3390/cancers14030604. PMID: 35158872; PMCID: PMC8833821. **3 citace, IF 5,2**

Podíl na článku: Vyhledávala jsem parafínové bloky vhodné pro studii, optimalizovala jsem IHC, koordinovala jsem IHC barvení jednotlivých markerů. Podílela jsem se na návrhu stanovení jednotlivých oblastí zájmu a stereologického vzorkování. Podílela jsem se na zpracování metodiky do publikace, psaní a finální revizi publikace.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8833821/>



Publikace je součástí dizertační práce jako příloha 3.

Publikace č. 4: Ambrozkiwicz F, Trailin A, Červenková L, Vaclavikova R, Hanicinec V, Allah MAO, Palek R, Třeška V, Daum O, Tonar Z, Liška V, Hemminki K. **CTNNB1 mutations, TERT polymorphism and CD8+ cell densities in resected hepatocellular carcinoma are associated with longer time to recurrence.** BMC Cancer. 2022 Aug 13;22(1):884. doi: 10.1186/s12885-022-09989-0. PMID: 35962322; PMCID: PMC9375422. **9 citací, IF 3,8**

Podíl na článku: Vyhledávala jsem parafínové bloky vhodné pro studii, optimalizovala jsem IHC, koordinovala jsem IHC barvení. Podílela jsem se na návrhu stanovení jednotlivých oblastí zájmu a stereologického vzorkování. Podílela jsem se na optimalizaci izolace DNA z parafínových bloků. Podílela jsem se na zpracování metodiky do publikace, psaní a finální revizi publikace.

Dostupné z: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-022-09989-0>



Publikace je součástí dizertační práce jako příloha 4.

Publikace č. 5: Hlaváč V, Červenková L, Šušová S, Holý P, Liška V, Vyčítal O, Šorejs O, Fiala O, Daum O, Souček P. **Exome Sequencing of Paired Colorectal Carcinomas and Synchronous Liver Metastases for Prognosis and Therapy Prediction.** JCO Precis Oncol. 2023 May;7:e2200557. doi: 10.1200/PO.22.00557. PMID: 37141551. **0 citací, IF 4,6**

Podíl na článku: Vyhledávala jsem parafínové bloky vhodné pro studii. Podílela jsem se na optimalizaci izolace a izolaci DNA z parafínových bloků. Podílela jsem se na zpracování metodiky do publikace, psaní a finální revizi publikace.

Dostupné z: <https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/PO.22.00557>



Publikace je součástí dizertační práce jako příloha 5.

4 Metody, výsledky a diskuze

4.1 Publikace č. 1: Proteinová exprese MRP2 a SLC22A3 souvisí s prognózou adenokarcinomu pankreatu

4.1.1 Metody

Pacienti: Studie byla provedena na souboru archivních parafinových bloků Šiklova patologického ústavu Fakultní nemocnice Plzeň z let 2002 až 2016. Jednalo se o 65 biopsií resekovaných nádorů s potvrzenou diagnózou PDAC a dostupným klinickým sledováním. Studie byla schválena příslušnou etickou komisí.

IHC: Bločky byly nakrájeny na 5 mikrometrů tlusté řezy a barveny hematoxylin-eosinem pro posouzení morfologie a podrobeny imunohistochemické analýze exprese proteinů MRP2/*ABCC2* a SLC22A3 (solute carrier family 22 member 3) podle manuálního protokolu uvedeného v tabulce 12.

Jako pozitivní kontrolní tkáň byly použity játra pro MRP2/*ABCC2* a ledvina pro SLC22A3, jako negativní kontrola byla použita nádorová tkáň PDAC inkubovaná bez primární protilátky. Vzorky s nejednoznačným výsledkem barvení byly vyloučeny. Hodnocena byla převládající cytoplasmatická lokalizace a přítomnost či nepřítomnost apikálního membránového barvení.

Analýza dat: Pro statistické analýzy byl použit software IBM® SPSS® Statistics verze 16.0. Pro zjištění rozdílů mezi skupinami pacientů rozdělených dle klinických dat byla použita analýza rozptylu ANOVA (ANalysis Of VAriance) a Pearsonův χ -kvadrát test. Pro odhad funkce přežití pacientů byla použita Kaplanova-Meierova metoda, Log-rank a Breslow test s analýzou poměrů rizik Coxovou regresí.

4.1.2 Výsledky – hlavní zjištění

Bazální lokalizace proteinu MRP2/*ABCC2* a SLC22A3 v cytoplasmě byla zjištěna u 49 % pacientů a 45 % pacientů. Apikální membrána se pozitivně barvila v 45 % u proteinu MRP2/*ABCC2* a v 29 % u SLC22A3. Přehled výsledků je uvedený v tabulce 13.

Tabulka 12: Manuální IHC protokoly pro detekci MRP2/ABCC2 a SLC22A3 proteinů

	MRP2/ABCC2	SLC22A3	
Odhalení antigenních epitopů	Novocastra™ Epitope Retrieval Solution pH 6 (citrate-based buffer containing surfactant)	Novocastra™ Epitope Retrieval Solution pH 9 (Tris/EDTA-based buffer containing surfactant)	20 min 96°C + 20 min chladnutí
Oplach	Destilovaná voda		
Blokování endogenní peroxidázy	Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution S2023		10 min
Oplach	Destilovaná voda		
Blokování pozadí	Bez blokování	5% normální kozí sérum	30 min
Inkubace s primární protilátkou	Anti-MRP2 antibody (M2 III-6), mouse monoclonal, abcam ab3373, ředění 1:100	Anti SLC22A3 antibody (EPR6630), rabbit monoclonal, abcam ab124826, ředění 1:100	přes noc, 4°C
Oplach	Pufr		
Inkubace s polymerem sekundární protilátky a enzymu	Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse and – Rabbit Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI)		30 min
Oplach	Pufr		
Chromogen	DAB		5 min
Oplach	Destilovaná voda		
Dobarvení jader	Mayerův hematoxylin		5 min
Modrání	Tekoucí voda		5 min

Bylo zjištěno, že **pacienti bez exprese proteinu SLC22A3 v apikální membráně mají signifikantně kratší přežití bez nemoci (DFS) i dobu do úmrtí (OS) než pacienti s pozitivní expresí.** Analýzou kombinace exprese obou proteinů v apikální membráně bylo zjištěno, že u **pozitivní exprese MRP2/ABCC2 i SLC22A3 je delší DFS** a u kombinace

pozitivní exprese MRP2/ABCC2 a negativní SLC22A3 je kratší OS. U skupiny pacientů léčených gemcitabinem a 5-fluorouracilem bylo prokázáno, že absence exprese SLC22A3 v apikálním lemu souvisí s horším DFS i OS. Neprokázali jsme souvislost lokalizace obou proteinů v **cytoplazmě** s klinickými daty a přežíváním pacientů. Přehled barvení a nejdůležitějších výsledků je znázorněn na obrázku 14.

Tabulka 13: Přehled výsledků IHC barvení

ABC transportér	Lokalizace	IHC exprese	Počet
MRP2/ABCC2	cytoplasma	bazální	32
		apikální	33
	membrána	negativní	36
		pozitivní	29
SLC22A3	cytoplasma	bazální	30
		apikální	36
	membrána	negativní	47
		pozitivní	19

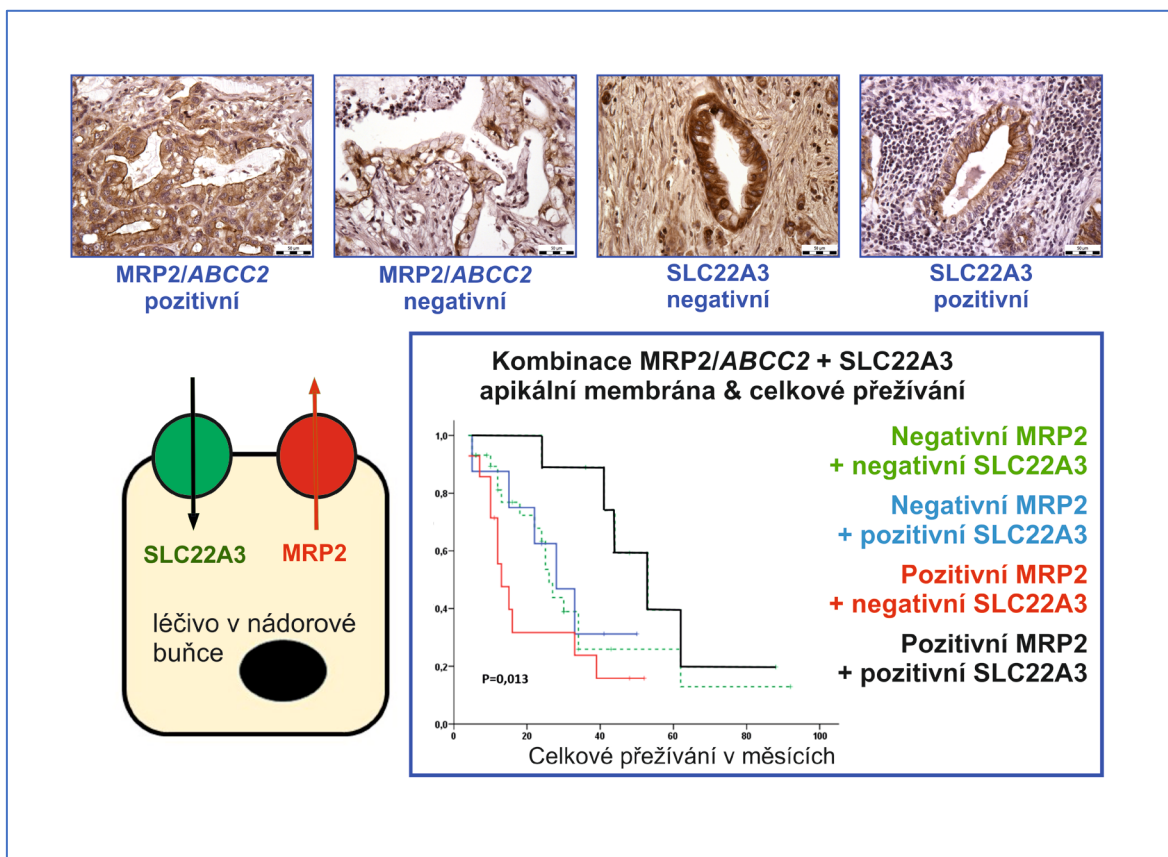
4.1.3 Diskuze

Na základě předchozí transkriptomické studie¹²²⁻¹²⁴ membránových transportérů (všechny ABC a vybrané SLC transportující cytostatika), která zjistila prognostickou hodnotu MRP2/ABCC2 a SLC22A3, jsme analyzovali souvislost jejich proteinové exprese v buňkách PDAC s prognózou. Prokázali jsme, že exprese proteinu SLC22A3 souvisí s prognózou pacientů s PDAC.

Tato studie se jako první zabývá proteinovou expresí SLC22A3 v nádorových buňkách PDAC. Pacienti s proteinovou expresí SLC22A3 v apikální membráně nádorových buněk mají významně delší OS i DFS. SLC22A3 je exprimován v plasmatické membráně buněk mnoha tkání, kde transportuje vysoký počet substrátů, včetně protinádorových léčiv, čímž se může přímo podílet na účinnosti protinádorové léčby. Genová exprese SLC22A3 je regulována geneticky i epigeneticky¹²⁵.

Předchozí studie zabývající se CRC, karcinomem prostaty¹²⁶⁻¹²⁸, HCC¹²⁹ a karcinomem jícnu^{130,131} ukazují, že genetická, epigenetická nebo fenotypová povaha

SLC22A3 má prediktivní či prognostický potenciál u nádorových onemocnění GIT. Naše studie na PDAC tyto údaje a jejich význam potvrzuje.



Obrázek 14: **Souhrnný grafický abstrakt:** Nejdůležitější výsledky, ukázky výsledku IHC barvení (apikální membrána) a základní funkční souvislosti; vlastní zpracování

SLC22A3 se jako transportér léčiv může podílet na účinnosti protinádorové léčby: Odpověď pacientů s CRC na chemoterapii kombinací 5-fluorouracilu, kyseliny folinové a oxaliplatin¹³², pacientů s karcinomem hlavy a krku na terapii cisplatinou¹³³ naznačuje prediktivní charakter exprese proteinu. SLC22A3 hraje roli v léčbě jako transportér pro příjem metforminu¹³⁴⁻¹³⁶.

Výsledky této i předchozích studií naznačují možnost použití SLC22A3 po validaci a funkční studii jako prognostický a prediktivní marker u PDAC a dalších gastrointestinálních nádorů. Pozitivní předpoklad pro zavedení SLC22A3 jako imunohistochemického markeru je rutinní použití IHC ve všech patologických laboratořích.

Na rozdíl od dříve publikovaných studií s prokázanou souvislostí mezi MRP2/ABCC2 a prognózou a léčebnou odpovědí u PDAC pacientů^{137,138} a in-vitro studii na pankreatické buněčné linii¹³⁹ nebyla v této studii prokázána souvislost mezi samotnou expresí proteinu MRP2/ABCC2 a přežíváním pacientů.

Kombinace exprese proteinů MRP2/*ABCC2* a SLC22A3 a jejich prognostický význam je zcela novou oblastí. Vzhledem k funkci těchto transportérů jsme předpokládali, že negativní exprese u MRP2/*ABCC2* (eflux) a pozitivní exprese SLC22A3 (influx) bude souviset s delším přežíváním pacientů a naopak. Prokázali jsme však, že kombinace pozitivní exprese MRP2/*ABCC2* a pozitivní exprese SLC22A3 souvisí s nejdelším bezpříznakovým i celkovým přežíváním pacientů, což naznačuje vliv celkové dysregulace exprese těchto proteinů na prognózu pacientů.

Omezením studie je nízký počet vzorků, což souvisí s nízkým počtem resektabilních nádorů v době diagnózy a omezenou dostupností sledování pacientů z důvodů vysoké úmrtnosti. Na druhou stranu se jedná o homogenní skupinu pacientů léčených a sledovaných v jednom velkém regionálním centru. Tyto výsledky je třeba ověřit nezávislými studiemi na dalších pacientech s PDAC i dalšími nádorovými onemocněními.

4.2 Publikace č. 2: Proteinová exprese a lokalizace ABC transportérů u duktálního karcinomu pankreatu: prognostická role SUR1/ABCC8

4.2.1 Metody

Pacienti: Studie byla provedena na archivních parafinových blocích z let 2002 až 2016, získaných z Šiklova patologického ústavu Fakultní nemocnice Plzeň. Bylo použito 65 biopsií resekovaných nádorů s potvrzenou diagnózou PDAC, které měly dostupné klinické sledování. Studie byla schválena příslušnou etickou komisí.

IHC: Řezy tlusté 5 µm byly nabarveny hematoxylinem-eozinem a posouzeny ohledně morfolgie. Další vybrané řezy byly barveny v plně automatizovaném IHC barvicím automatu s použitím primárních protilátek uvedených v tabulce 14. Byly použity pozitivní a negativní kontroly IHC barvení. Vzorky s nejednoznačným nálezem byly vyloučeny.

Tabulka 14: Primární protilátky a pozitivní kontroly použité pro IHC detekci

IHC barvicí automat: Imunostainer BenchMark ULTRA IHC/ISH (Roche Diagnostics)			
Detekční kit: UltraView Universal DAB			
Primární protilátka	Katalogové číslo, dodavatel	Ředění	Pozitivní kontrola
Anti- ABCD4 antibody produced in rabbit	HPA003396, Sigma-Aldrich	1:500	Ledvina medula
Anti- CFTR antibody produced in rabbit	HPA021939, Sigma-Aldrich	1:250	Exokrinní pankreas
Anti- SUR1 antibody produced in rabbit	PA5-50836, Invitrogen	1:30	Langerhansovy ostrůvky pankreatu
Anti- TAP1 antibody produced in rabbit	11114-1-AP, Proteintech	1:200	Karcinom plic

Lokalizace proteinu byla hodnocena jako negativní nebo pozitivní v cytoplasmě a v plasmatické membráně. Následně byla u vzorků s pozitivní cytoplasmatickou expresí hodnocena intenzita IHC exprese jako slabá, střední či silná v porovnání s pozitivní kontrolou.

Analýza dat: Pro statistické analýzy byl použit software IBM® SPSS® Statistics verze 16.0. Analýza rozptylu ANOVA (ANalysis Of VAriance) a Pearsonův χ -kvadrát test byly použity pro hodnocení rozdílů mezi skupinami pacientů stratifikovanými podle klinických dat. Pro odhad funkce přežití pacientů byla použita Kaplanova-Meierova metoda, Log-rank a Breslow test s analýzou poměrů rizik Coxovou regresí.

4.2.2 Výsledky – hlavní zjištění

Byla detekována slabá až střední intenzita cytoplasmatického barvení **TAP1/ABCB2** (antigen peptide transporter 1) v nádorových buňkách, membránové barvení nebylo detekováno.

Expresce modulátoru transmembránového regulátoru vodivosti (**CFTR/ABCC7**) nebyla v nádorových buňkách detekována, ačkoli apikální membrána nemaligních pankreatických ductů se barvila se silnou intenzitou.

U všech vzorků byla detekována pozitivní cytoplasmatická expresce **SUR1/ABCC8** (sulfonylurea receptor 1) v nádorových buňkách se slabou až silnou intenzitou barvení. U 9 vzorků bylo detekováno pozitivní barvení apikální membrány nádorových buněk. Ve stromatu některých vzorků v blízkém okolí nádorových tubulů se vyskytovaly jednotlivé silně se barvící SUR1+ buňky.

Expresce proteinu **ABCD4** (ATP binding cassette subfamily D member 4) v nádorových buňkách byla velmi variabilní. Ve většině případů se barvila jak cytoplasma, tak membrána. U některých vzorků s pozitivním barvením membrány byla nalezena výrazná pozitivita pouze apikální membrány nebo apikální a bazální membrány nádorových buněk.

Porovnání exprese proteinů a **klinických dat pacientů**: U buněk nádorů stádia III nebo IV častěji chyběla expresce proteinu **ABCD4** v membráně (33 %) ve srovnání s méně pokročilými stádii I a II (2 %). Většina nádorů stádia III nebo IV měla ojedinělé nebo středně početné **SUR1/ABCC8** pozitivní buňky ve stromatu kolem nádorových tubulů. Expresce proteinů **TAP1/ABCB2**, **CFTR/ABCC7** nesouvisela s žádnými klinickými daty pacientů. Přehled IHC výsledků je uvedený v tabulce 15.

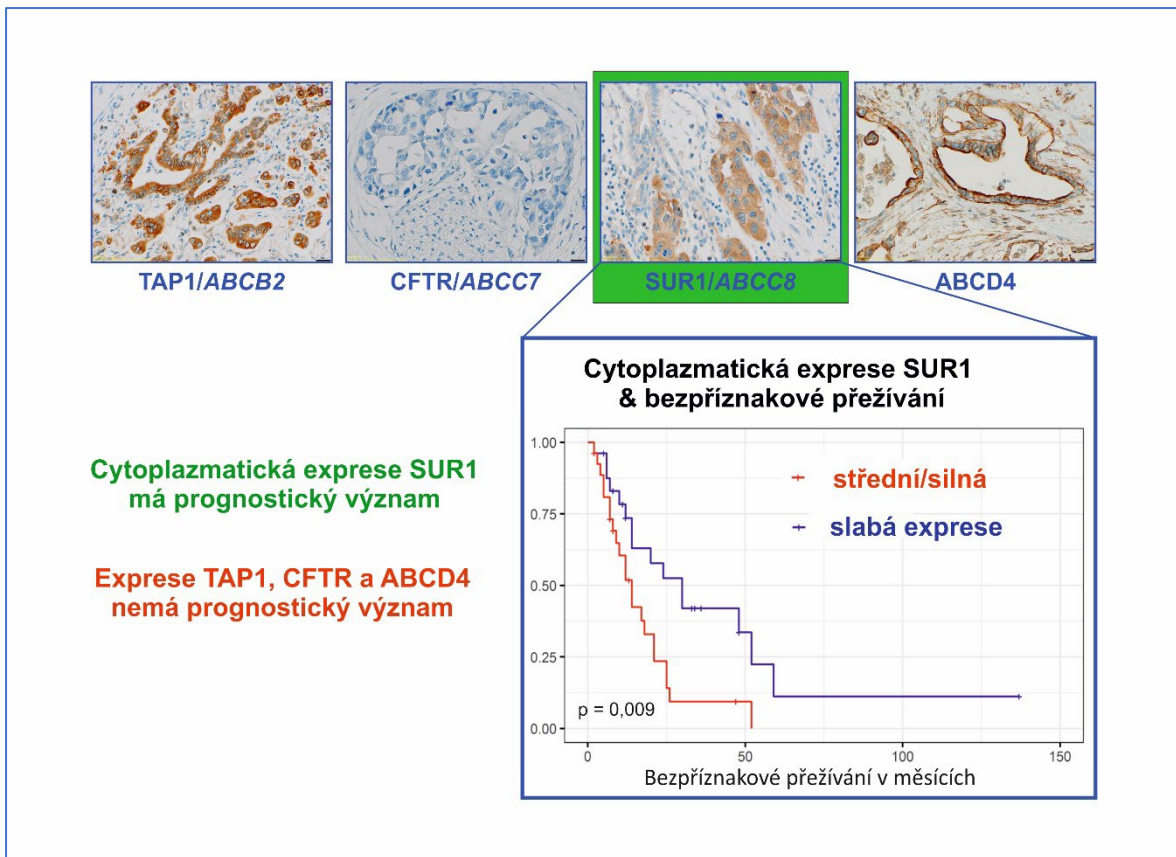
Analýzou funkcí **přežití** bylo zjištěno, že pacienti se střední nebo silnou intenzitou cytoplasmatického barvení **SUR1/ABCC8** měli významně kratší PFS než pacienti se slabou intenzitou. Expresce proteinů **TAP1/ABCB2**, **CFTR/ABCC7** a **ABCD4** nesouvisela s přežitím pacientů. Přehled barvení a nejdůležitějších výsledků je znázorněn na obrázku 15.

Tabulka 15: Přehled výsledků IHC barvení ABC transportérů

ABC transportér	Lokalizace	IHC exprese	Počet
TAP1/ABCB2	cytoplasma	negativní	15
		slabá	23
		střední	18
		silná	4
	membrána	negativní	60
CFTR/ABCC7	cytoplasma	negativní	61
	membrána	negativní	61
SUR1/ABCC8	cytoplasma	slabá	28
		střední	25
		silná	3
	membrána	negativní	48
		slabá apikální	9
	pozitivní buňky ve stromatu	žádné	26
		ojedinělé	18
středně početné		12	
ABCD4	cytoplasma	negativní	8
		slabá	51
	membrána	negativní	4
		pozitivní	56
		pouze silná apikální	24
		pouze silná apikální a bazální	5

4.2.3 Diskuze

Ve studii jsme se pokusili ověřit proteinovou expresi méně často studovaných ABC transportérů TAP1/ABCB2, CFTR/ABCC7, SUR1/ABCC8 a ABCD4 v nádorových buňkách PDAC na základě dříve popsanych hladin transkriptů^{122,140} a jejich prognostického významu.



Obrázek 15: *Souhrnný grafický abstrakt: Nejdůležitější výsledky a ukázky výsledku IHC barvení; vlastní zpracování*

Výsledky cytoplazmatického barvení SUR1/ABCC8 poprvé naznačují, že pacienti se středně nebo silně se barvícími nádorovými buňkami PDAC mají 3,5krát vyšší riziko progresse onemocnění, než pacienti se slabou intenzitou. Souvislost mezi SUR1/ABCC8 a prognózou pacientů je podpořena i výskytem SUR1/ABCC8 pozitivních buněk ve stromatu kolem nádorových tubulů u pokročilých stádií. Hypotéza, že SUR1/ABCC8 může souviset s progresí onemocnění je podpořena předchozím nálezem ukazujícím, že nádorové buňky exprimující SUR1/ABCC8 mohou indukovat transformaci fibroblastů v mikroprostředí nádoru a podporovat progresi nemalobuněčných plicních karcinomů¹⁴¹.

SUR1/ABCC8 se vyskytuje, spolu s dalšími draslíkovými kanály, v mnoha tkáních a podílí se na regulaci mnoha fyziologických funkcí¹⁴². V této studii zjištěná lokalizace proteinu odpovídá údajům uvedeným v databázi Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org). Draslíkové kanály se uplatňují zejména v β -buňkách endokrinního pankreatu¹⁴³ a SUR1/ABCC8 je spojen s diabetem¹⁴⁴, ale jeho exprese nebo změny genu nebyly spojeny s výsledkem terapie a prognózou PDAC. Gen ABCC8 je součástí prognostického skórovacího modelu u serózního karcinomu ovaria¹⁴⁵ a je spojován

s prognózou a chemosenzitivitou u gliomu¹⁴⁶ a karcinomu prsu¹⁴⁷. Naše současná studie obohacuje poznání o prognostický význam SUR1/*ABCC8* u PDAC.

Tato studie, na základě souvislosti negativní exprese ABCD4 v membráně nádorových buněk a pokročilým stádiem PDAC, naznačuje možný vztah se špatnou prognózou, ale analýza přežití pacientů tento předpoklad nepotvrdila. Dřívější studie uvádějí souvislost ABCD4 transportéru s prognózou pacientů s CRC¹⁴⁸ a PDAC¹⁴⁰ a rezistencí na cisplatinu u nemalobuněčného karcinomu plic *in vitro*¹⁴⁹, přesto naše výsledky prognostický význam ABCD4 u PDAC nepotvrzují.

Expres TAP1/*ABCB2* neměla žádnou prognostickou hodnotu pro pacienty s PDAC. TAP1 transportér hraje roli v prezentaci antigenů a je diskutována jeho role v imunoterapii¹⁵⁰, proto může být tento protein užitečný pro predikci výsledků imunoterapie, která však zatím u PDAC využití nenalezla.

Absence proteinu CFTR/*ABCC7* byla prokázána jak v cytoplasmě, tak v membráně u všech vzorků. Toto pozorování je jedinečné a je třeba dalších studií k odhalení mechanismu umlčování CFTR a jejího významu pro nádorové bujení.

Omezením této studie je malý soubor vzorků z důvodu nízké resekability a nepříznivé prognózy PDAC. Z důvodu vysoké heterogenity barvení a absence systému hodnocení proteinové exprese ABC transportérů v nádorových buňkách jsme zvolili kombinaci kvalitativního a kvantitativního hodnocení v jednotlivých kompartmentech buňky. Výhodou studie je stejnorodost skupiny pacientů, kteří byli přijati, ošetřeni a sledováni jedním centrem jednotným stylem.

4.3 Publikace č. 3: T a B lymfocyty ve vnitřním invazivním okraji hepatocelulárního karcinomu po resekci souvisí s příznivou prognózou

4.3.1 Metody

Pacienti: Studie byla provedena na souboru archivních parafinových bloků Šiklova patologického ústavu Fakultní nemocnice Plzeň z let 1997 až 2019. Byly vyšetřeny biopsie ze 70 pacientů. Jednalo se o resekované nádory s potvrzenou diagnózou HCC stádia I až IV a dostupným klinickým sledováním. Studie byla schválena příslušnou etickou komisí.

IHC: 2 až 4 bloky z každého nádoru obsahující centrum nádoru, okraj nádoru a jaterní tkáň bez nádoru byly nakrájeny na 4 mikrometry silné řezy a barveny hematoxylin–eozinem a Massonovým trichromem pro posouzení morfolgie. Dále byly podrobeny IHC detekci **CD3+** T lymfocytů, **CD8+** T lymfocytů a **CD20+** B lymfocytů s použitím automatického systému BOND RXm; specifikace IHC detekce je na obrázku 16 a v tabulce 14. Jako pozitivní kontrola byla použita tkáň tonzily, jako negativní kontrola byla použita nádorová tkáň HCC inkubovaná bez primární protilátky.

Edit protocol properties


Name:

Abbreviated name:

Description:

Staining method: Single First Second Preferred

Protocol type: IHC staining

Preferred detection system: 

Step N°	Wash	Reagent	Supplier	Ambient	Temperature	Inc. (min)	Dispense type
1		*Peroxide Block	Leica Microsystems	✓		5:00	Selected vol.
5		*MARKER	Leica Microsystems	✓		15:00	Selected vol.
9		*Post Primary	Leica Microsystems	✓		8:00	Selected vol.
13		*Polymer	Leica Microsystems	✓		8:00	Selected vol.
17		*Mixed DAB Refine	Leica Microsystems	✓		0:00	Selected vol.
18		*Mixed DAB Refine	Leica Microsystems	✓		10:00	Selected vol.
22		*Hematoxylin	Leica Microsystems	✓		5:00	Selected vol.

Show wash steps

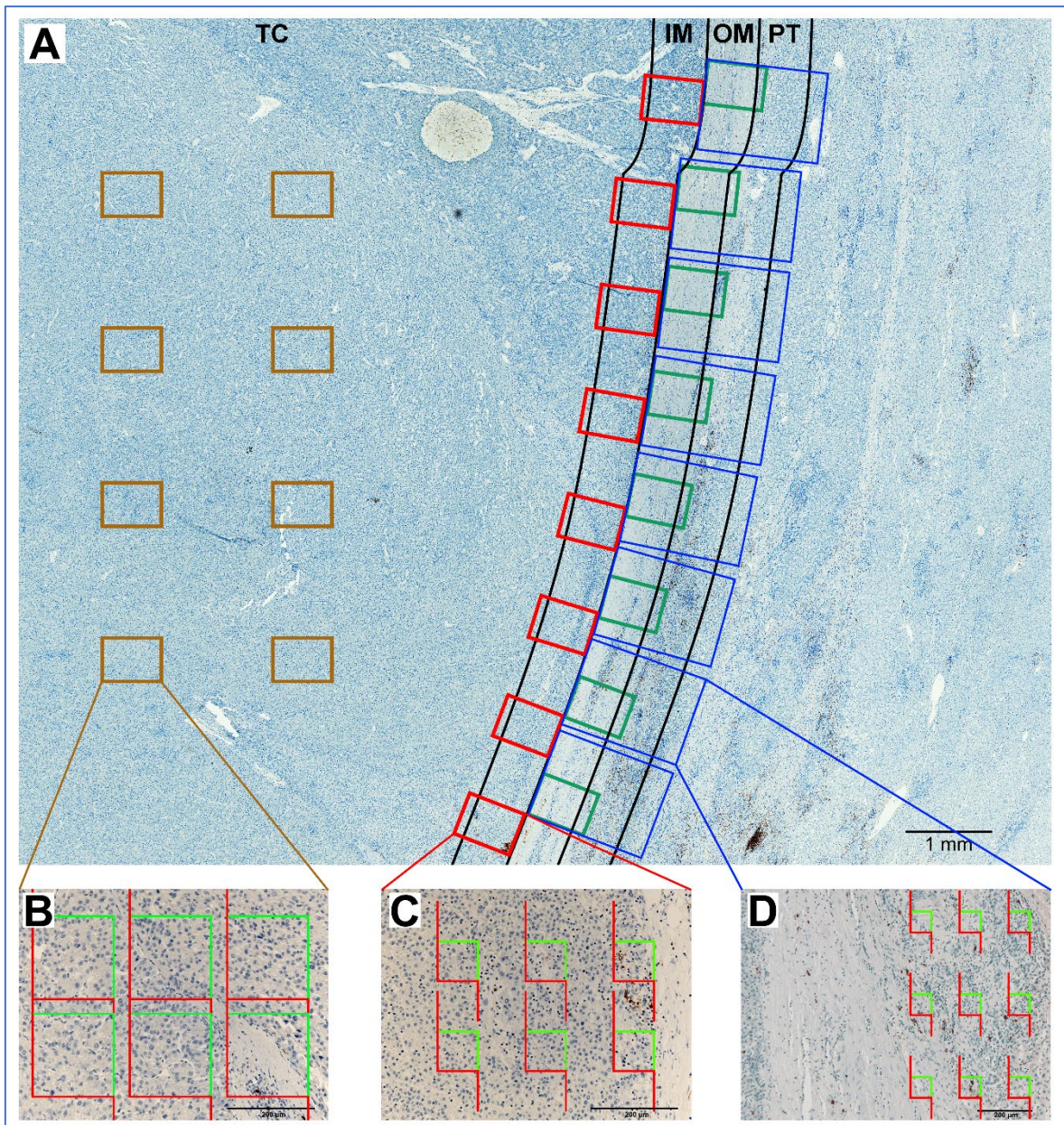
Obrázek 16: BOND RXm IHC protokol; print screen

Tabulka 16: Specifikace IHC detekce T a B lymfocytů

IHC barvicí automat: Autostainer BOND RXm (Leica Biosystems)				
Barvicí protokol: *IHC Protocol F				
Primární protilátka	Klon	Výrobce	Katalogové číslo	Odhalení antigenních epitopů
30ml CD3 (LN10) Bond RTU Primary	LN10	Leica Biosystems Newcastle Ltd	PA0122	BOND Epitope Retrieval Solution 2, 20 minut
7ml CD8 Bond RTU Primary	4B11		PA0183	BOND Epitope Retrieval Solution 2, 20 minut
7ml CD20 (L26) Bond RTU Primary	L26		PA0200	BOND Epitope Retrieval Solution 1, 20 minut

Vyšetřovaná tkáň byla rozdělena do oblastí zájmu na **centrum nádoru**, **vnitřní a vnější invazivní okraj** nádoru (500 mikrometrů od hranic nádoru dovnitř a vně), **jaterní tkáň v blízkosti nádoru** (500 mikrometrů tlustý lem přiléhající k oblasti vnějšího invazivního okraje) a **nemaligní jaterní tkáň** (oblast více jak 1 000 mikrometrů od hranice nádoru). Následně byly jednotlivé oblasti náhodně systematicky vzorkovány pro analýzu prostřednictvím stereologického software Ellipse (ViDiTo), kde byly počítány CD3+, CD8+ a CD20+ jaderné profily. Zobrazení vzorkování je znázorněno na obrázku 17. Hustota jednotlivých pozitivních buněk byla pro statistickou analýzu kategorizována na základě percentilových hodnot na **nízkou** (pod 25. percentil) vs. **střední** (25.–70. percentil) vs. **vysokou** (nad 70. percentil) nebo na **nízkou** vs. **středně vysokou** s hranicí na 25. percentilu.

Analýza dat: Pro statistické analýzy byly použity Statistica 10 (StatSoft Inc), GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software LLC) a prostředí R (v.4.1.1). Srovnání dat, jejichž distribuce se významně odchylovala od normálního rozdělení, bylo provedeno Mann-Whitneyovým U-testem nebo analýzou rozptylu Friedmanovým ANOVA testem, následovaným párovým Wilcoxonovým testem s Bonferroniho korekcí. Spearmanova korelace byla použita pro stanovení souvislosti mezi dvojicemi spojených veličin. Doba do recidivy (TTR), DFS a OS pacientů byly vypočteny Kaplan-Meierovou metodou a porovnány mezi skupinami log-rank testem s následnou Coxovou regresní analýzou.

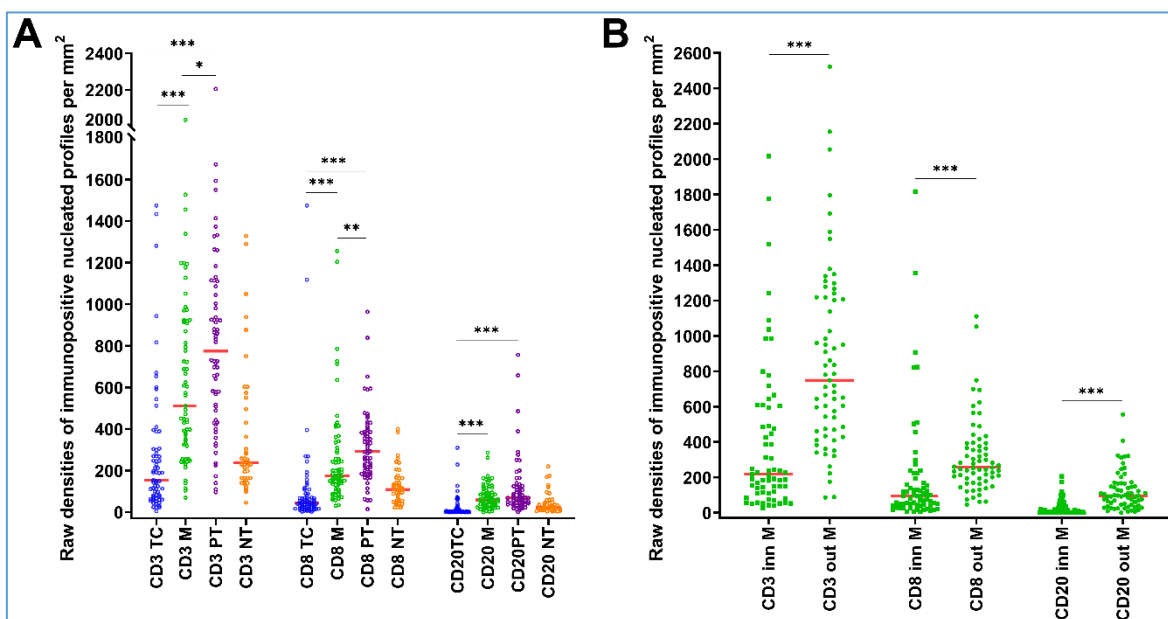


Obrázek 17: **Oblasti zájmu vyšetřované tkáně:** TC = centrum nádoru, IM = vnitřní invazivní okraj, OM = vnější invazivní okraj, PT = jaterní tkáň v blízkosti nádoru a **vzorkování pro stereologii** pomocí systematického rovnoměrného náhodného výběru. Pro vzorkování TC, IM a OM byl použit 20× objektiv, zatímco pro oblast PT byl použit 10× objektiv. IHC CD20+ lymfocytů u hepatocelulárního karcinomu; měřítka 1000 µm (A), 200 µm (B-D); převzato z publikace

4.3.2 Výsledky – hlavní zjištění

Distribuce imunitních buněk v jednotlivých oblastech zájmu: Hustota jaderných profilů CD3+ i CD8+ T lymfocytů byla významně vyšší než hustota CD20+ B lymfocytů ve všech oblastech zájmu. Nejvyšší hustota všech typů sledovaných buněk byla v nemaligní tkáni

přiléhající k okraji nádoru a nejnižší hustota byla v centru nádoru. Vnější část invazivního okraje obsahovala významně vyšší počty všech typů buněk než vnitřní část, proto byly tyto oblasti zájmu hodnoceny samostatně. Statisticky zpracované výsledky jsou znázorněny na obrázku 18. Poměry hustot T a B lymfocytů mezi vnitřním a vnějším invazivním okrajem nesoúvisely s rozsahem pouzdření nádoru.



Obrázek 18: Statistika zobrazující prostorové rozložení jaderných profilů CD3+, CD8+ a CD20+ TILs na mm² řezu v centru nádoru (TC), invazivním okraj nádoru (M), jaterní tkáni v blízkosti nádoru (PT) a nemaligní jaterní tkáni (NT) (A) a ve vnitřním (inn M) a vnějším invazivním okraji (out M) nádoru (B). Červené čáry: medián. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$; převzato z publikace

Prognostický význam imunitních buněk: Po úpravě vícerozměrným Coxovým modelem byla **nezávislá schopnost predikce** prokázána u těchto parametrů: **TTR** byl spojen se střední a vysokou hustotou CD8+ buněk v centru nádoru. Vysoká hustota CD3+ a CD20+ buněk v centru nádoru, vysoká hustota CD3+, CD8+ a CD20+ buněk ve vnitřním okraji nádoru a střední hustota CD20+ buněk v jaterní tkáni v blízkosti nádoru byly nezávislými prediktory **nízkého rizika recidivy**. Vysoké **poměry hustot** CD3+ a CD20+ buněk mezi vnitřním a vnějším okrajem souvisely s delším **TTR**.

4.3.3 Diskuze

Tato práce analyzovala imunitní mikroprostředí HCC z hlediska typu, hustoty, lokalizace a případné interakce CD3+, CD8+ a CD20+ buněk v různých oblastech nádoru a nemaligní

tkáně. Poprvé byl okraj nádoru rozdělen na vnitřní a vnější lem se statistickými rozdíly hustoty jednotlivých buněk. S ohledem na menší význam CD3+ T lymfocytů nebudou tyto buňky dále diskutovány.

Větší infiltrace vnějšího invazivního okraje ve srovnání s vnitřním, může být částečně zapříčiněna pouzdrem nádoru. Námi pozorovaná četnost opouzdření nádoru je v souladu s literaturou^{151,152}, opouzdření nádoru je spojováno se sníženou invazivitou nádoru a delším přežíváním pacientů¹⁵²⁻¹⁵⁴. Poměry hustoty imunitních buněk mezi vnitřním a vnějším invazivním okrajem nesouvisely s opouzdřením nádoru, z čehož vyplývá, že samotné pouzdro není překážkou pro infiltraci nádoru lymfocyty.

Jednotlivé prediktivní schopnosti CD8+ T lymfocytů a CD20+ B lymfocytů se zvýšily, pokud byly spojeny. Pacienti se středně vysokou hustotou CD8+ i CD20+ lymfocytů ve vnitřním okraji nádoru měli nejdelší TTR i DFS. Podobné nálezy už byly publikovány u HCC¹⁵⁵ a jaterních metastáz CRC¹⁵⁶. CD8+ T lymfocyty jsou považovány za hlavní protinádorové imunitní buňky u HCC a dalších nádorových onemocnění^{157,158}. B lymfocyty se mohou uplatnit jako buňky prezentující antigen, které spouštějí a modulují imunitní odpověď T lymfocytů¹⁵⁹. Pozitivní korelace hustot CD8+ a CD20+ lymfocytů ve všech oblastech zájmu naznačuje spolupráci těchto buněk a omezení lokálního nebo systémového šíření nádoru^{160,161}.

Větší poměry CD8+ T lymfocytů a CD20+ B lymfocytů mezi vnitřním a vnějším invazivním okrajem nádoru souvisely s delším TTR i DFS. Poměry hustot vnitřního k vnějšímu okraji nádoru korelovaly s příslušnou hustotou buněk v centru nádoru, proto nádory s vyšším poměrem hustot vnitřního k vnějšímu okraji nádoru lze považovat za nádory „horkého“ nádorového fenotypu a naopak. Proto by poměry hustoty buněk mezi vnitřním a vnějším okrajem mohly pomoci lépe charakterizovat nádorové imunitní mikroprostředí i stratifikovat rizika úniku nádorových buněk imunitní reakci.

Velká většina prací studujících prognostickou hodnotu tumor infiltrujících lymfocytů (TILs) u HCC hodnotila pouze infiltraci centra nádoru¹⁶². Souhrnné výsledky odpovídají zjištěním této studie a ukazují delší DFS u pacientů s vyšší hustotou CD8+ buněk v centru nádoru. Nesoulad s výsledky jiných studií¹⁶³⁻¹⁶⁶ může souviset s různými kohortami pacientů (cirhóza, virová hepatitida), odlišnou anotací oblastí zájmu a odlišnou metodou hodnocení počtu lymfocytů. Standardizace hodnocení TILs podle doporučení mezinárodního konsorcia¹⁶⁷ by zlepšila konzistenci a reprodukovatelnost těchto dat.

Hlavním omezením této studie je malá velikost vzorku. Nízká prevalence pacientů s hepatitidou a cirhózou neumožňuje reprodukovat výsledky na pacienty s virovou etiologií,

kteřá je mnohem běžnější u neevropských populací. Na druhou stranu tato studie poskytuje pohled na pacienty se steatohepatidou.

4.4 Publikace č. 4: *CTNNB1* mutace, *TERT* polymorfismus a hustota CD8+ buněk u resekovaného hepatocelulárního karcinomu souvisí s delší dobou do relapsu

4.4.1 Metody

Pacienti: Studie byla provedena na archivních parafrinových blocích Šiklova patologického ústavu Fakultní nemocnice Plzeň z let 1997 až 2019. Jednalo se o biopsie resekovaných nádorů 67 pacientů s potvrzenou diagnózou HCC a dostupným klinickým sledováním. Studie byla schválena příslušnou etickou komisí.

Izolace DNA, sekvenování: Izolace DNA z parafrinových bloků nádorové tkáně a přilehlé nemaligní tkáně byla provedena pomocí RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit pro FFPE podle protokolu výrobce. Následně byla provedena amplifikace DNA v úseku pro promotor genu *TERT* (*TERTp*) a exon 3 genu *CTNNB1* prostřednictvím PCR s příslušnými primery a následně sekvenována v obou směrech Sangerovým sekvenováním. Chromatogramy byly hodnoceny vizuálně.

Genotypizace polymorfismu rs2853669 *TERTp* byla provedena alelickou diskriminací pomocí TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Bioscience) na přístroji CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

IHC: 2 až 4 bločky z každého nádoru obsahující centrum nádoru, okraj nádoru a jaterní tkáň bez nádoru byly nakrájeny na 4 mikrometry silné řezy podrobeny imunohistochemické detekci CD8+ T lymfocytů v automatickém systému BOND RXm. Byla použita primární protilátka 7ml **CD8 Bond RTU Primary (PA0183), klon 4B11**, Leica Biosystems Newcastle Ltd. Jako pozitivní kontrola byla použita tkáň tonzila, jako negativní kontrola byla použita nádorová tkáň HCC inkubovaná bez primární protilátky. Vzorky s nádorovou tkání byly rozděleny na **centrum nádoru, invazivní okraj** nádoru a **nemaligní jaterní tkáň**. Invazivní okraj nádoru byl definován jako 1000 µm oblast se středem na hranici nádoru. Následně byly jednotlivé oblasti náhodně systematicky vzorkovány pro stereologickou analýzu prostřednictvím stereologického software Ellipse (ViDiTo), kde byly počítány CD8+ jaderné profily. Hustota jaderných profilů byla hodnocena jako **nízká** (pod 25. percentil) a **středně vysoká** (25. až 100. percentil).

Statistická analýza byla provedena v prostředí R (v.4.1.1). Spearmanova korelace byla použita pro hodnocení jednotlivých proměnných. Vliv proměnných na přežívání pacientů byl hodnocen Coxovou regresí. Analýza přežití byla provedena Kaplan-Meierovou

metodou. Rozdíly mezi skupinami pacientů byly hodnoceny log-rank testem. Hustoty CD8+ buněk byly porovnány Wilcoxonovým testem.

4.4.2 Výsledky – hlavní zjištění

Mutace *TERTp* byla detekována u 44 (75,8 %) pacientů a mutace *CTNNB1* u 21 (35,6 %) pacientů pouze v nádorové tkáni. Všechny vzorky byly pozitivní na **polymorfismus rs2853669 *TERTp***. U většiny genetických nálezů nebyla prokázána korelace s klinickými daty pacientů.

Nejvyšší hustota CD8+ buněk byla v invazivním okraji nádoru, následovala nemaligní jaterní tkáň a nejméně CD8+ buněk bylo v centru nádoru.

Prognostický význam: Jedinci s mutovaným *CTNNB1* měli delší TTR. Mutace *TERTp* prognostický význam neměly, avšak sledovaný polymorfismus rs2853669 v tomto genu ano. Homozygotní GG jedinci měli delší TTR a též delší DFS ve srovnání s nosiči polymorfismu v divoké (AA) nebo heterozygotní (AG) formě. Vyšší hustota CD8+ buněk v centru a invazivním okraji nádoru souvisela s nižším rizikem recidivy a delším DFS.

Přítomnost mutace *CTNNB1* v kombinaci s vysokou hustotou CD8+ buněk v centru a invazivním okraji nádoru souvisela s nižším rizikem recidivy a delším DFS. Stejně tak kombinace genotypu GG pro polymorfismus rs2853669 v *TERTp* s vysokou hustotou CD8+ buněk v centru a invazivním okraji nádoru souvisela s delším TTR a DFS.

4.4.3 Diskuze

Jedná se o první prezentaci výsledků součinnosti genetických a imunitních faktorů a jejich prognostického významu u HCC. Každý z jednotlivých faktorů: GG polymorfismus rs2853669 v *TERTp*, mutace v *CTNNB1* a vysoká hustota CD8+ buněk je spojen s delším TTR a DFS. Kombinace těchto genetických a imunitních faktorů zlepšila vzájemný prognostický význam s ohledem na přežívání pacientů.

V této studii jsme potvrdili vysokou frekvenci mutace *TERTp*, která je příčinou reaktivace telomerázy u nádorových onemocnění⁷⁴. Výskyt mutace *TERTp* v našem souboru (75,8 %) je vyšší než u jiného evropského souboru nevírového HCC (56,6 %)¹⁶⁸. Tato studie ukázala statisticky významnou asociaci genotypu GG rs2853669 s delším TTR a DFS, v souladu s prognostickými údaji pro další typy nádorových onemocnění¹⁶⁹.

CTNNB1 signální kaskády WNT/ β -catenin je aktivován ve 30 až 50 % HCC¹⁷⁰ a jedná se o jeden z nejčastěji mutovaných genů ovlivňující HCC¹⁶⁹. Frekvence mutací *CTNNB1* (35,6 %) i jejich lokalizace zjištěná v této studii souhlasila s literaturou¹⁷¹. V literatuře dostupné údaje ukazují asociace mutace *CTNNB1* s příznivou prognózou, zejména s delším celkovým přežíváním¹⁷², ale v této studii pozorujeme nižší riziko recidivy. Zároveň jsme nepozorovali souvislost mutace *CTNNB1* s klinickými daty a patologickou charakteristikou nádoru, což může souviset s neviróvou etiologií HCC u souboru našich pacientů, na rozdíl od asijských studií převážně s virovou etiologií.

TILs jsou zásadní složkou imunitní odpovědi na nádor¹⁶². Úloha imunitních buněk u HCC byla široce prozkoumána^{162,173-175}, buňky mohou působit pronádorově či protinádorově. Tyto studie ukazují, že příznivá prognóza je spojena s vysokou hustotou NK buněk, B-buněk, T-lymfocytů a DCs, zatímco vysoký počet monocytů, neutrofilů a T regulačních lymfocytů souvisí se špatnou prognózou pacientů. Vysoká hustota CD8+ lymfocytů je spojována s lepší prognózou pacientů^{164,173,176,177}, což se v této studii potvrdilo.

V předchozích studiích byly použity buď pouze genetické, nebo imunitní biomarkery, ale nebyly studovány ve spojitosti. Mutace a imunitní odpověď se vzájemně ovlivňují a frekvence mutací může stimulovat imunitní odpověď v mikroprostředí nádoru^{178,179}. Kombinace vlivu hustoty CD8+ lymfocytů a genetických změn (mutace *CTNNB1* a genotypizace rs2853669 *TERTp*) zpřesnily prognostickou hodnotu výsledků.

Omezením této studie je malý soubor pacientů, pro zpřesnění prognostických nástrojů je třeba provést studii na větším počtu vzorků.

4.5 Publikace č. 5: Sekvenování exomu párových vzorků kolorektálního karcinomu a synchronních jaterních metastáz pro prognózu a předpověď terapie

4.5.1 Metody

Pacienti: Studie byla provedena na souboru archivních parafinových bloků Šiklova patologického ústavu Fakultní nemocnice Plzeň z let 2003 až 2017. Jednalo se o resekované nádory s potvrzenou diagnózou CRC a dostupným klinickým sledováním. Před resekci primárního tumoru byly u všech pacientů mimo jednoho diagnostikovány synchronní jaterní metastázy, u jednoho pacienta byly jaterní metastázy diagnostikovány při první pooperační kontrole. K izolaci DNA byly použity vzorky 50 pacientů, po kontrole kvality a kvantity izolované DNA a připravených knihoven bylo ze studie vyloučeno 30 pacientů. Úspěšně sekvenovány a vyhodnoceny byly páry vzorků od 20 pacientů. Studie byla schválena příslušnou etickou komisí.

Izolace DNA, kvantifikace a kontrola kvality: DNA byla izolována pomocí sady RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit pro FFPE tkáně (Thermo Fisher Scientific) podle protokolu výrobce. DNA byla kvantifikována pomocí soupravy Agilent FFPE QC Kit (Agilent) nebo testu Qubit dsDNA (Thermo Fisher Scientific) v případě vysoké kvality vstupní DNA na základě výsledku FFPE QC kitu. Čistota DNA (poměry A260/280 a A260/230) byla kontrolována pomocí NanoDrop Spectrophotometer 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Příprava knihovny a sekvenování celého exomu: Z izolované DNA byly připraveny knihovny pomocí sady SureSelect XT Low Input for Illumina Kit se sadou sond Human All Exon V7 (obě Agilent) podle protokolu výrobce. Po hodnocení kvality a kvantity DNA knihoven byly knihovny sloučeny ekvimolárním způsobem a sekvenovány na platformě NovaSeq 6000 (Illumina Inc.) s využitím sekvenační soupravy S2 a nastavením 100 cyklů párového čtení. Zamýšlené průměrné pokrytí cíle bylo 150–200x s očekávanou průměrnou mírou duplicit 50–60 %.

Zpracování hrubých dat a vlastní detekce variant: Hrubá data pocházející přímo ze sekvenátoru byla předzpracována a následně byla provedena identifikace somatických variant a krátkých inzercí a delecí (indelů). V souvislosti s velkým počtem artefaktů u FFPE tkání byly v analýzách použity pouze varianty, které prošly všemi filtry podle velmi přísných kritérií.

Anotace a interpretace variant: Nalezené varianty byly anotovány pomocí nástroje Variant Effect Predictor v99.2 a provedena **analýza mutačních podpisů** typu substituce jedné báze (SBS) s využitím referenčních podpisů z databáze COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer)¹⁸⁰ a detekována instabilita mikrosatelitní DNA¹⁸¹. Dále byla provedena **analýza nádorové mutační zátěže** (TMB) se srovnáním s daty z projektu TCGA MC3 (Multi-Center Mutation Calling in Multiple Cancers)¹⁸² a **analýza variability počtu kopií** (CNV).

Externí validace: Validace *in silico* pomocí The Cancer Genome Atlas (TCGA) dat byla provedena na datové sadě TCGA COAD-READ (The Cancer Genome Atlas Rectum Adenocarcinoma Collection), včetně somatických mutací, fenotypu a údajů o přežití.

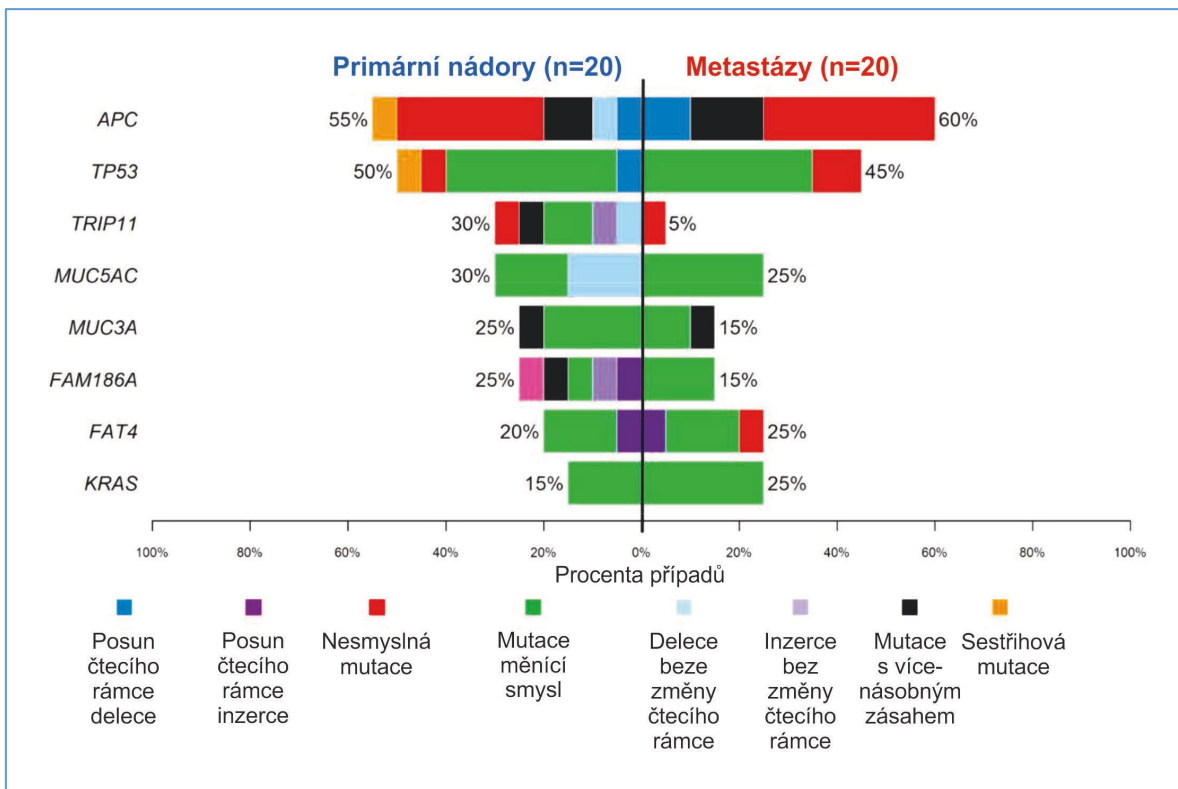
Analýza dat: Pro statistické analýzy byl použit program SPSS v16 (SPSS Inc.). Analýzy společného výskytu u všech skupin byly provedeny pomocí Fisherova exaktního testu. Rozdíly mezi stratifikovanými pacienty byly porovnány pomocí Pearsonova χ -kvadrát testu nebo Mann-Whitneyova testu. Korelace kontinuálních dat byly hodnoceny pomocí Spearmanova ρ -testu. Přežívání pacientů bylo zpracováno Kaplan-Meierovou metodou a významnost vypočtena Log-rank testem.

4.5.2 Výsledky – hlavní zjištění

Obecné deskriptory sekvenování celého exomu a profilování variant: Celkový počet somatických variant po filtraci na základě vybraných kritérií byl v průměru $206,8 \pm 71,9$ u vzorků z primárních nádorů a $207,9 \pm 53,1$ u metastáz. U žádného vzorku nebyla klasifikována přítomnost vysoké mutační zátěže nebo s vysokou mikrosatelitovou nestabilitou (MSI-H). Jak u primárních nádorů, tak u metastáz byla nejčastější třídou variant záměnová (missense) mutace a nejčastějším typem jednonukleotidová varianta, následovaná delecí a inzercí. Nejčastější změnou nukleotidu byla varianta C>T. Nejčastěji změněné geny byly *APC*, *TP53* a *TTN* v obou typech vzorků.

Po odfiltrování změněných genů bez patogenního účinku¹⁸³ dle FLAGS (FrequentLy mutAted GeneS) zůstaly nejčastěji změněnými geny *APC*, *TP53*, *TRIP11*, *MUC5AC*, *MUC3A* a *FAM186A* v primárních nádorech a *APC*, *TP53*, *MUC5AC*, *FAT4* a *KRAS* v metastázách, znázorněno na obrázku 19.

Analýzou zavedených signálních drah u CRC⁶⁴ bylo nalezeno ve vzorcích z metastáz více variant v **RTK-RAS** (receptor tyrosine kinase –RAS) a **Hippo dráhách** a více variant ve **WNT signální dráze** u primárních nádorů. Rozdíly však nebyly statisticky významné.



Obrázek 19: Onkoplot genů s nejvyšším počtem somatických variant v primárních nádorech a metastázách; převzato z publikace

Genetický profil pacientů rozdělený podle objektivní odpovědi na neoadjuvantní systémovou terapii: Pacienti léčení neoadjuvantní systémovou léčbou byli rozděleni na dobře a špatně odpovídající na léčbu a následně porovnání s nádorovou mutační zátěží, jednotlivými variantami genů a signálních drah, mutačními podpisy a variabilitou počtu kopií u primárních nádorů i metastáz. Primární nádory špatně odpovídajících pacientů nesly významně více variant v **dráze TRAIL** (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), v metastatických tkáních měli špatně odpovídající pacienti významně více variant v genu **MUC3A**.

Analýza přežití: Analýzou přežití byla nalezena řada asociací s přežitím bez relapsu (RFS) nebo s OS pacientů, ale u většiny primárních nádorů se nepodařilo tyto vztahy validovat ve veřejně dostupné databázi TCGA. Pacienti s variantami **MUC5AC** v **metastázách** měli kratší RFS a OS, s variantami **DNAH11** v **metastázách** měli výrazně kratší OS a s variantami **ATM** v **metastázách** měli kratší RFS. Jediným validovaným prognostickým biomarkerem byla frekvence záměnových mutací v genu KRAS, která byla v primárních nádorech významně vyšší u pacientů s kratším RFS. Tento vztah byl ověřen i na validačním externím setu TCGA (n=380).

4.5.3 Diskuze

Cílem studie bylo poskytnout přehled genetických změn kódující části genomu v párových vzorcích primárních nádorů CRC a synchronních jaterních metastáz v souvislosti s odpovědí na léčbu a přežíváním pacientů. Primární nádory a jaterní metastázy se v celkové nádorové mutační zátěži výrazně nelišily.

Pacienti s variantami *KRAS* v primárních nádorech měli kratší přežívání bez relapsu a celkové přežívání, tento negativní prognostický význam prokázala i velká studie na 13 101 pacientech¹⁸⁴. Rozpor mezi dříve publikovanou četností mutací *KRAS* 40 %¹⁸⁵ a četností v naší studii 15 % přičítáme agresivnější povaze onemocnění nádorů s *KRAS* mutací, horší prognózou a nižší pravděpodobnosti chirurgické resekce metastáz¹⁸⁶.

Několik genů mutovaných v metastázách bylo významně spojeno s přežitím pacientů, ale z důvodu nedostatku validačních dat je posouzení klinického významu nemožné.

Na základě velkého rozdílu v počtech variant u primárních nádorů (30 %) a metastáz (5 %) může *TRIP11* představovat nový kandidátní řídicí (oncdriver) gen v metastázách CRC.

Za omezení studie může být považován malý počet pacientů, avšak párové vzorky primárních nádorů a metastáz je obtížné získat a předchozí studie uvádějí obdobně malé počty pacientů¹⁸⁷⁻¹⁹⁰. Zahrnutím metachronních metastáz do studie bychom získali populaci velmi heterogenních pacientů a proto jsme studii omezili pouze na pacienty se synchronními metastázami.

Dalším omezením může být použití FFPE vzorků, u kterých se zvyšuje riziko nadhodnocení zejména tranzice C>T⁹⁹ a v současnosti neexistuje standardizovaná metoda jak tento jev eliminovat¹⁹¹. Z toho důvodu byla aplikována velice přísná filtrační kritéria během předzpracování dat, která harmonizovala mutační frekvence s veřejně dostupnými daty v TCGA.

Design WES neumožňuje analýzu velkých strukturálních variant a nekódující části genomu, které by bylo možné detekovat pomocí celogenomového sekvenování. Sekvence exomu s vysokým pokrytím přesto přináší hlubší vhled do částí genomu, které jsou potenciálně funkční. Navíc vazby mezi nekódujícími oblastmi a nádorovým onemocněním jsou zatím relativně nejasné¹⁹².

5 Závěr

Studie v této dizertační práci byly provedeny na archivních parafinových blocích. Tyto vzorky jsou i přes některé nevýhody významným zdrojem materiálu pro výzkum nádorových onemocnění. Vyšetřeny však mohou být pouze resekované nádory, což je omezení zvláště u onemocnění, kde je vysoké procento nádorů neresekabilních.

- 1) Potvrdili jsme předchozí výsledky naznačující prognostický význam *SLC22A3* pro maligní nádory GIT.
- 2) Prokázali jsme prognostickou roli exprese proteinu *SUR1/ABCC8* u pacientů s PDAC a potvrdili jsme předpoklady získané pomocí transkriptomiky.
- 3) Prokázali jsme prognostický význam *CD8+* a *CD20+* lymfocytů ve vnitřním a vnějším okraji HCC.
- 4) Prokázali jsme prognostický význam kombinace mutace *CTNNB1* a hustoty *CD8+* lymfocytů v resekovaných HCC.
- 5) Potvrdili jsme vysokou četnost somatických variant v genech *APC*, *TP53* a *KRAS* a obecnou podobnost mutačních profilů mezi párovými vzorky primárních nádorů a synchronních jaterních metastáz CRC. Objevili jsme nové kandidátní geny s rozdíly mezi primárním nádorem a metastázou a možným prognostickým dopadem.

Studie prokázaly, že kombinace imunohistochemických a molekulárních metod a studium interakce imunitních a genetických faktorů může zpřesnit stanovení prognózy na rozdíl od použití jednotlivých biomarkerů pro stanovení prognózy. Dalším důležitým zjištěním bylo, že výsledky transkriptomických studií je potřeba ověřit stanovením exprese proteinů v nádorové tkáni, což výrazně zvyšuje jejich validitu pro další výzkum. U hodnocení infiltrace nádorů lymfocyty je klíčové stanovení jednotlivých oblastí zájmu.

6 Podpora:

- AZV **NV19-03-00097** Studium specifických podskupin u pacientů s adenokarcinomem pankreatu
- AZV **NV19-08-00113** Studie využitelnosti sekvenování nové generace pro individualizovanou léčbu pacientů se solidními nádory
- MŠMT INTER-EXCELLENCE INTER-COST **LTC19015** Identifikace farmakogenomických biomarkerů pomocí celoexomového sekvenování u pacientů s kolorektálním karcinomem
- MŠMT **UNCE/MED/006** Centrum experimentální a klinické jaterní chirurgie
- MŠMT (EFRR) **CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007280** Aplikace moderních technologií v medicíně a průmyslu
- MŠMT **LO1503** Národním program udržitelnosti I (NPU I)
- UK **Cooperatio** Surgical Disciplines č. 207043
- Projekt Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU
- Research Executive Agency **856620** ERA Chair Position for Excellent Research in Oncology
- AZV **NU21-03-00506** Význam mutačního spektra nádorových buněk ve vývoji kolorektálního karcinomu
- Program rozvoje vědních oblastí UK **Q39** Náhrada, podpora a regenerace životně důležitých tkání a orgánů
- MŠMT INTER-ACTION **LTA USA 19032** Studium vztahu mezi strukturou a funkcí nových taxanových derivátů v boji proti rezistenci nádorových buněk
- GAČR **21-14082S** Úloha Notch signální dráhy v mechanismu působení nových taxanových derivátů

7 Literatura:

- 1 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- 2 Baba, A. I. & Câtoi, C. in *Comparative Oncology* (The Publishing House of the Romanian Academy Copyright © 2007, The Publishing House of the Romanian Academy., 2007).
- 3 Turley, S. J., Cremasco, V. & Astarita, J. L. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* **15**, 669-682 (2015). <https://doi.org/10.1038/nri3902>
- 4 Lei, X. *et al.* Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. *Cancer Lett* **470**, 126-133 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.11.009>
- 5 Hořejší, V. Protinádorové zbraně imunitního systému. *Klinická onkologie*, 15 (2015).
- 6 Büchler, T. *Obecná onkologie*. (Maxdorf, 2019).
- 7 Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1-10 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
- 8 Tran, N. H. *et al.* Precision medicine in colorectal cancer: the molecular profile alters treatment strategies. *Ther Adv Med Oncol* **7**, 252-262 (2015). <https://doi.org/10.1177/1758834015591952>
- 9 Weinstein, J. N. *et al.* The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nature genetics* **45**, 1113-1120 (2013).
- 10 Zámečník, J. *Patologie*. (LD Prager Publishing, 2019).
- 11 Pobłocki, J., Jasińska, A., Syrenicz, A., Andrysiak-Mamos, E. & Szczuko, M. The Neuroendocrine Neoplasms of the Digestive Tract: Diagnosis, Treatment and Nutrition. *Nutrients* **12** (2020). <https://doi.org/10.3390/nu12051437>
- 12 Miettinen, M. & Lasota, J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* **23**, 70-83 (2006). <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2006.09.001>
- 13 Liegl, B., Hornick, J. L. & Lazar, A. J. Contemporary pathology of gastrointestinal stromal tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* **23**, 49-68, vii-viii (2009). <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2008.12.002>
- 14 Sbaraglia, M., Businello, G., Bellan, E., Fassan, M. & Dei Tos, A. P. Mesenchymal tumours of the gastrointestinal tract. *Pathologica* **113**, 230-251 (2021). <https://doi.org/10.32074/1591-951x-309>
- 15 *WHO Classification of Tumours. Digestive System Tumours: WHO Classification of Tumours, Volume 1*. (World Health Organization, 2019).
- 16 Freeman, C., Berg, J. W. & Cutler, S. J. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer* **29**, 252-260 (1972). [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197201\)29:1<252::aid-cnrc2820290138>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197201)29:1<252::aid-cnrc2820290138>3.0.co;2-#)
- 17 Crump, M., Gospodarowicz, M. & Shepherd, F. A. Lymphoma of the gastrointestinal tract. *Semin Oncol* **26**, 324-337 (1999).
- 18 Liang, R. *et al.* Prognostic factors for primary gastrointestinal lymphoma. *Hematol Oncol* **13**, 153-163 (1995). <https://doi.org/10.1002/hon.2900130305>
- 19 Disibio, G. & French, S. W. Metastatic patterns of cancers: results from a large autopsy study. *Arch Pathol Lab Med* **132**, 931-939 (2008). <https://doi.org/10.5858/2008-132-931-mpocrf>
- 20 Washington, K. & McDonagh, D. Secondary tumors of the gastrointestinal tract: surgical pathologic findings and comparison with autopsy survey. *Mod Pathol* **8**, 427-433 (1995).
- 21 *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. (IARC Press, 2010).
- 22 Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K. & Wittekind, C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. (Wiley, 2017).

- 23 Pagès, F. *et al.* International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* **391**, 2128-2139 (2018). [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)30789-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)30789-x)
- 24 Galon, J. *et al.* Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* **232**, 199-209 (2014). <https://doi.org/10.1002/path.4287>
- 25 Telloni, S. M. Tumor Staging and Grading: A Primer. *Methods Mol Biol* **1606**, 1-17 (2017). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_1
- 26 Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**, 209-249 (2021). <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- 27 Arnold, M. *et al.* Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology* **159**, 335-349.e315 (2020). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.068>
- 28 Švihovec, J. *Farmakologie*. (Grada Publishing, 2018).
- 29 Osborne, C. M. & Mullard, A. P. A review of systemic anticancer therapy in disease palliation. *Br Med Bull* **125**, 43-53 (2018). <https://doi.org/10.1093/bmb/ldx045>
- 30 Lee, Y. T., Tan, Y. J. & Oon, C. E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur J Pharmacol* **834**, 188-196 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.034>
- 31 Schwartzberg, L., Kim, E. S., Liu, D. & Schrag, D. Precision Oncology: Who, How, What, When, and When Not? *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 160-169 (2017). https://doi.org/10.1200/edbk_174176
- 32 O'Dwyer, P. J. *et al.* The NCI-MATCH trial: lessons for precision oncology. *Nat Med* **29**, 1349-1357 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02379-4>
- 33 Riley, R. S., June, C. H., Langer, R. & Mitchell, M. J. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 175-196 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z>
- 34 Zhong, L. *et al.* Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduct Target Ther* **6**, 201 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00572-w>
- 35 Pucci, C., Martinelli, C. & Ciofani, G. Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience* **13**, 961 (2019). <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961>
- 36 Zahreddine, H. & Borden, K. L. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front Pharmacol* **4**, 28 (2013). <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00028>
- 37 Nosková, V., Hajdúch, M., Mihál, V. & Cwiertka, K. Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. *Klinická onkologie* **13**, 10-17 (2000).
- 38 Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S. & Baradaran, B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull* **7**, 339-348 (2017). <https://doi.org/10.15171/apb.2017.041>
- 39 TREJTNAR, F. Základní mechanismy transportu léčiv v organismu (Remedia, 2023).
- 40 Emran, T. B. *et al.* Multidrug Resistance in Cancer: Understanding Molecular Mechanisms, Immunoprevention and Therapeutic Approaches. *Front Oncol* **12**, 891652 (2022). <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.891652>
- 41 Cojoc, M., Mäbert, K., Muders, M. H. & Dubrovská, A. A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. *Semin Cancer Biol* **31**, 16-27 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.06.004>
- 42 Kunjachan, S., Rychlik, B., Storm, G., Kiessling, F. & Lammers, T. Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. *Adv Drug Deliv Rev* **65**, 1852-1865 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.018>
- 43 Sun, Y.-L., Patel, A., Kumar, P. & Chen, Z.-S. Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. *Chinese journal of cancer* **31**, 51 (2012).

- 44 Choi, C. H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int* **5**, 30 (2005).
<https://doi.org/10.1186/1475-2867-5-30>
- 45 Qian, Y. *et al.* Extracellular ATP is internalized by macropinocytosis and induces intracellular ATP increase and drug resistance in cancer cells. *Cancer Lett* **351**, 242-251 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.06.008>
- 46 Wang, X. *et al.* Extracellular ATP, as an energy and phosphorylating molecule, induces different types of drug resistances in cancer cells through ATP internalization and intracellular ATP level increase. *Oncotarget* **8**, 87860-87877 (2017).
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.21231>
- 47 Wang, X., Zhang, H. & Chen, X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist* **2**, 141-160 (2019). <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>
- 48 Petzinger, E. & Geyer, J. Drug transporters in pharmacokinetics. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372**, 465-475 (2006). <https://doi.org/10.1007/s00210-006-0042-9>
- 49 Ford, R. C. & Beis, K. Learning the ABCs one at a time: structure and mechanism of ABC transporters. *Biochem Soc Trans* **47**, 23-36 (2019). <https://doi.org/10.1042/bst20180147>
- 50 Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B. & Giacomini, K. M. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 543-560 (2015).
<https://doi.org/10.1038/nrd4626>
- 51 Puris, E., Fricker, G. & Gynther, M. The Role of Solute Carrier Transporters in Efficient Anticancer Drug Delivery and Therapy. *Pharmaceutics* **15** (2023).
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020364>
- 52 Tsunoda, S. M., Bednarczyk, D. & Okochi, H. Chapter 7. Drug transporters. *Pharmacogenomics: An Introduction and Clinical Perspective*. McGraw-Hill (2013).
- 53 Dušek, L. *et al.* Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online] (Masarykova univerzita, Brno, 2007).
- 54 Soumarová, R. & Kubecová, M. Onkologie: Učební text pro studenty 3. LF UK (3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha, 2019).
- 55 Tong, Y. *et al.* High fat diet, gut microbiome and gastrointestinal cancer. *Theranostics* **11**, 5889-5910 (2021). <https://doi.org/10.7150/thno.56157>
- 56 Medina Pabón, M. A. & Babiker, H. M. in *StatPearls* (StatPearls Publishing Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC., 2023).
- 57 Gillen, C. D., Walmsley, R. S., Prior, P., Andrews, H. A. & Allan, R. N. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* **35**, 1590-1592 (1994). <https://doi.org/10.1136/gut.35.11.1590>
- 58 Kolligs, F. T. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. *Visc Med* **32**, 158-164 (2016). <https://doi.org/10.1159/000446488>
- 59 Harada, S. & Morlote, D. Molecular Pathology of Colorectal Cancer. *Adv Anat Pathol* **27**, 20-26 (2020). <https://doi.org/10.1097/pap.0000000000000247>
- 60 Baran, B. *et al.* Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Res* **11**, 264-273 (2018).
<https://doi.org/10.14740/gr1062w>
- 61 Stang, A. & Kluttig, A. Etiologic insights from surface adjustment of colorectal carcinoma incidences: an analysis of the U.S. SEER data 2000-2004. *Am J Gastroenterol* **103**, 2853-2861 (2008). <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2008.02087.x>
- 62 Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330-337 (2012). <https://doi.org/10.1038/nature11252>
- 63 Nguyen, L. H., Goel, A. & Chung, D. C. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology* **158**, 291-302 (2020). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.059>
- 64 Riddell, R. H. *et al.* *Lewin, Weinstein, and Riddell's Gastrointestinal Pathology and Its Clinical Implications*. (Wolters Kluwer Health, 2014).

- 65 Kiss, I. *Modrá kniha České onkologické společnosti* (Masarykův onkologický ústav, Brno, 2023).
- 66 Wang, Q. *et al.* Clinical prognostic variables in young patients (under 40 years) with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *J Dig Dis* **13**, 214-218 (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1751-2980.2012.00577.x>
- 67 Raimondi, S., Bruno, S., Mondelli, M. U. & Maisonneuve, P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol* **50**, 1142-1154 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.01.019>
- 68 Anthony, P. P., Morris, D. S. & Vowles, K. D. Multiple and recurrent inflammatory fibroid polyps in three generations of a Devon family: a new syndrome. *Gut* **25**, 854-862 (1984). <https://doi.org/10.1136/gut.25.8.854>
- 69 Schlesinger, S. *et al.* Diabetes mellitus, insulin treatment, diabetes duration, and risk of biliary tract cancer and hepatocellular carcinoma in a European cohort. *Ann Oncol* **24**, 2449-2455 (2013). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt204>
- 70 Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K. & Thun, M. J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* **348**, 1625-1638 (2003). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021423>
- 71 Chu, Y. J. *et al.* Aflatoxin B(1) exposure increases the risk of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection or alcohol consumption. *Eur J Cancer* **94**, 37-46 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.02.010>
- 72 Lynch, S. M. *et al.* Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *Am J Epidemiol* **170**, 403-413 (2009). <https://doi.org/10.1093/aje/kwp134>
- 73 Nault, J. C., Galle, P. R. & Marquardt, J. U. The role of molecular enrichment on future therapies in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **69**, 237-247 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.02.016>
- 74 Nault, J. C. *et al.* Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Hepatology* **60**, 1983-1992 (2014). <https://doi.org/10.1002/hep.27372>
- 75 Torrecilla, S. *et al.* Trunk mutational events present minimal intra- and inter-tumoral heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **67**, 1222-1231 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.013>
- 76 Goossens, N., Sun, X. & Hoshida, Y. Molecular classification of hepatocellular carcinoma: potential therapeutic implications. *Hepat Oncol* **2**, 371-379 (2015). <https://doi.org/10.2217/hep.15.26>
- 77 Hoshida, Y. *et al.* Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **69**, 7385-7392 (2009). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-1089>
- 78 Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P. & Lowenfels, A. B. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg* **393**, 535-545 (2008). <https://doi.org/10.1007/s00423-007-0266-2>
- 79 Vrieling, A. *et al.* Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* **126**, 2394-2403 (2010). <https://doi.org/10.1002/ijc.24907>
- 80 Stolzenberg-Solomon, R. Z., Schairer, C., Moore, S., Hollenbeck, A. & Silverman, D. T. Lifetime adiposity and risk of pancreatic cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study cohort. *Am J Clin Nutr* **98**, 1057-1065 (2013). <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.058123>
- 81 Genkinger, J. M. *et al.* Central adiposity, obesity during early adulthood, and pancreatic cancer mortality in a pooled analysis of cohort studies. *Ann Oncol* **26**, 2257-2266 (2015). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv355>

- 82 Farris, M. S., Mosli, M. H., McFadden, A. A., Friedenreich, C. M. & Brenner, D. R. The Association between Leisure Time Physical Activity and Pancreatic Cancer Risk in Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **24**, 1462-1473 (2015). <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-15-0301>
- 83 Jiao, L. *et al.* Low-fat Dietary Pattern and Pancreatic Cancer Risk in the Women's Health Initiative Dietary Modification Randomized Controlled Trial. *J Natl Cancer Inst* **110**, 49-56 (2018). <https://doi.org/10.1093/jnci/djx117>
- 84 Koushik, A. *et al.* Intake of fruits and vegetables and risk of pancreatic cancer in a pooled analysis of 14 cohort studies. *Am J Epidemiol* **176**, 373-386 (2012). <https://doi.org/10.1093/aje/kws027>
- 85 Genkinger, J. M. *et al.* Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**, 765-776 (2009). <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-0880>
- 86 Hruban, R. H. *et al.* K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* **143**, 545-554 (1993).
- 87 Blackford, A. *et al.* Genetic mutations associated with cigarette smoking in pancreatic cancer. *Cancer Res* **69**, 3681-3688 (2009). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-0015>
- 88 Green, J. *et al.* Menopausal hormone therapy and risk of gastrointestinal cancer: nested case-control study within a prospective cohort, and meta-analysis. *Int J Cancer* **130**, 2387-2396 (2012). <https://doi.org/10.1002/ijc.26236>
- 89 Roberts, N. J. *et al.* Whole Genome Sequencing Defines the Genetic Heterogeneity of Familial Pancreatic Cancer. *Cancer Discov* **6**, 166-175 (2016). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-15-0402>
- 90 Wood, L. D., Canto, M. I., Jaffee, E. M. & Simeone, D. M. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology* **163**, 386-402.e381 (2022). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.03.056>
- 91 Rezaee, N. *et al.* Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) with high-grade dysplasia is a risk factor for the subsequent development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *HPB (Oxford)* **18**, 236-246 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2015.10.010>
- 92 Oyama, H. *et al.* Long-term Risk of Malignancy in Branch-Duct Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Gastroenterology* **158**, 226-237.e225 (2020). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.032>
- 93 Pereira, S. P. *et al.* Early detection of pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **5**, 698-710 (2020). [https://doi.org/10.1016/s2468-1253\(19\)30416-9](https://doi.org/10.1016/s2468-1253(19)30416-9)
- 94 Hong, S. M., Park, J. Y., Hruban, R. H. & Goggins, M. Molecular signatures of pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* **135**, 716-727 (2011). <https://doi.org/10.5858/2010-0566-ra.1>
- 95 Sokolenko, A. P. & Imyanitov, E. N. Molecular Diagnostics in Clinical Oncology. *Frontiers in Molecular Biosciences* **5** (2018). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00076>
- 96 Cazzato, G. *et al.* Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Samples for Next Generation Sequencing: Problems and Solutions. *Genes (Basel)* **12** (2021). <https://doi.org/10.3390/genes12101472>
- 97 Singh, H., Narayan, B., Urs, A. B., Kumar Polipalli, S. & Kumar, S. A novel approach for extracting DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue using microwave. *Med J Armed Forces India* **76**, 307-311 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2019.02.007>
- 98 Sengüven, B., Baris, E., Oygur, T. & Berktaş, M. Comparison of methods for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Int J Med Sci* **11**, 494-499 (2014). <https://doi.org/10.7150/ijms.8842>

- 99 Williams, C. *et al.* A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* **155**, 1467-1471 (1999). [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65461-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65461-2)
- 100 Koshiba, M. *et al.* The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular-weight DNA from fixed and embedded tissues. *Pathol Res Pract* **189**, 66-72 (1993). [https://doi.org/10.1016/s0344-0338\(11\)80118-4](https://doi.org/10.1016/s0344-0338(11)80118-4)
- 101 Shi, S.-R. *et al.* DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution.
- 102 Raj, G. V., Moreno, J. G. & Gomella, L. G. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer* **82**, 1419-1442 (1998). [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19980415\)82:8<1419::aid-cncr1>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19980415)82:8<1419::aid-cncr1>3.0.co;2-4)
- 103 Mardis, E. R. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* **6**, 287-303 (2013). <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062012-092628>
- 104 Hu, T., Chitnis, N., Monos, D. & Dinh, A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology* **82**, 801-811 (2021).
- 105 Sabour, L., Sabour, M. & Ghorbian, S. Clinical Applications of Next-Generation Sequencing in Cancer Diagnosis. *Pathol Oncol Res* **23**, 225-234 (2017). <https://doi.org/10.1007/s12253-016-0124-z>
- 106 Welch, J. S. & Link, D. C. Genomics of AML: clinical applications of next-generation sequencing. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2011**, 30-35 (2011). <https://doi.org/10.1182/asheducation-2011.1.30>
- 107 van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y. & Thermes, C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* **30**, 418-426 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>
- 108 Suvarna, S. K., Layton, C. & Bancroft, J. D. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. (Elsevier, 2019).
- 109 Lin, F., Prichard, J. W., Liu, H. & Wilkerson, M. L. *Handbook of Practical Immunohistochemistry: Frequently Asked Questions*. (Springer International Publishing, 2022).
- 110 Werner, M., Chott, A., Fabiano, A. & Battifora, H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* **24**, 1016-1019 (2000). <https://doi.org/10.1097/0000478-200007000-00014>
- 111 Takahashi, Y. *et al.* Application of Immunohistochemistry in the Pathological Diagnosis of Liver Tumors. *Int J Mol Sci* **22** (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22115780>
- 112 Taliano, R. J., LeGolvan, M. & Resnick, M. B. Immunohistochemistry of colorectal carcinoma: current practice and evolving applications. *Human Pathology* **44**, 151-163 (2013). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.04.017>
- 113 Peltomäki, P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* **21**, 1174-1179 (2003). <https://doi.org/10.1200/jco.2003.04.060>
- 114 Shia, J. *et al.* Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol* **29**, 96-104 (2005). <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000146009.85309.3b>
- 115 Caldés, T. *et al.* Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Oncol Rep* **12**, 621-629 (2004).
- 116 Rosenbaum, M. W. & Gonzalez, R. S. Immunohistochemistry as predictive and prognostic markers for gastrointestinal malignancies. *Semin Diagn Pathol* **39**, 48-57 (2022). <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2021.10.003>
- 117 Nowak, J. A. HER2 in Colorectal Carcinoma: Are We There yet? *Surg Pathol Clin* **13**, 485-502 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.path.2020.05.007>

- 118 Abrahao-Machado, L. F. & Scapulatempo-Neto, C. HER2 testing in gastric cancer: An update. *World J Gastroenterol* **22**, 4619-4625 (2016).
<https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i19.4619>
- 119 Rindi, G. *et al.* A common classification framework for neuroendocrine neoplasms: an International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO) expert consensus proposal. *Mod Pathol* **31**, 1770-1786 (2018).
<https://doi.org/10.1038/s41379-018-0110-y>
- 120 Cheuk, W. & Chan, J. K. Subcellular localization of immunohistochemical signals: knowledge of the ultrastructural or biologic features of the antigens helps predict the signal localization and proper interpretation of immunostains. *Int J Surg Pathol* **12**, 185-206 (2004). <https://doi.org/10.1177/106689690401200301>
- 121 Köbel, M. *et al.* Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: Toward Increased Reproducibility. *Int J Gynecol Pathol* **38 Suppl 1**, S123-s131 (2019).
<https://doi.org/10.1097/pgp.0000000000000488>
- 122 Mohelnikova-Duchonova, B. *et al.* Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues. *Pancreas* **42**, 707-716 (2013). <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e318279b861>
- 123 Mohelnikova-Duchonova, B. *et al.* The association between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **72**, 669-682 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2246-2>
- 124 Soucek, P. *et al.* in *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*. S46-S46 (SPANDIDOS PUBL LTD POB 18179, ATHENS, 116 10, GREECE).
- 125 Chen, L. *et al.* Genetic and epigenetic regulation of the organic cation transporter 3, SLC22A3. *Pharmacogenomics J* **13**, 110-120 (2013). <https://doi.org/10.1038/tpj.2011.60>
- 126 Cui, R. *et al.* Common variant in 6q26-q27 is associated with distal colon cancer in an Asian population. *Gut* **60**, 799-805 (2011). <https://doi.org/10.1136/gut.2010.215947>
- 127 Ren, A. *et al.* Genetic variants in SLC22A3 contribute to the susceptibility to colorectal cancer. *Int J Cancer* **145**, 154-163 (2019). <https://doi.org/10.1002/ijc.32079>
- 128 Hoffmann, T. J. *et al.* A large multiethnic genome-wide association study of prostate cancer identifies novel risk variants and substantial ethnic differences. *Cancer Discov* **5**, 878-891 (2015). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-15-0315>
- 129 Namisaki, T. *et al.* Differential expression of drug uptake and efflux transporters in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Drug Metab Dispos* **42**, 2033-2040 (2014). <https://doi.org/10.1124/dmd.114.059832>
- 130 Fu, L. *et al.* RNA editing of SLC22A3 drives early tumor invasion and metastasis in familial esophageal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E4631-e4640 (2017).
<https://doi.org/10.1073/pnas.1703178114>
- 131 Xiong, J. X. *et al.* Epigenetic alterations of a novel antioxidant gene SLC22A3 predispose susceptible individuals to increased risk of esophageal cancer. *Int J Biol Sci* **14**, 1658-1668 (2018). <https://doi.org/10.7150/ijbs.28482>
- 132 Le Roy, B. *et al.* Assessment of the Relation between the Expression of Oxaliplatin Transporters in Colorectal Cancer and Response to FOLFOX-4 Adjuvant Chemotherapy: A Case Control Study. *PLoS One* **11**, e0148739 (2016).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148739>
- 133 Hsu, C. M. *et al.* Upregulated SLC22A3 has a potential for improving survival of patients with head and neck squamous cell carcinoma receiving cisplatin treatment. *Oncotarget* **8**, 74348-74358 (2017). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20637>
- 134 Chen, L. *et al.* Role of organic cation transporter 3 (SLC22A3) and its missense variants in the pharmacologic action of metformin. *Pharmacogenet Genomics* **20**, 687-699 (2010).
<https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328333fe789>
- 135 Madera, D. *et al.* Prevention of tumor growth driven by PIK3CA and HPV oncogenes by targeting mTOR signaling with metformin in oral squamous carcinomas expressing OCT3.

- Cancer Prev Res (Phila)* **8**, 197-207 (2015). <https://doi.org/10.1158/1940-6207.capr-14-0348>
- 136 Cai, H., Everett, R. S. & Thakker, D. R. Efficacious dose of metformin for breast cancer therapy is determined by cation transporter expression in tumours. *Br J Pharmacol* **176**, 2724-2735 (2019). <https://doi.org/10.1111/bph.14694>
- 137 Gentiluomo, M. *et al.* Genetic variability of the ABCC2 gene and clinical outcomes in pancreatic cancer patients. *Carcinogenesis* **40**, 544-550 (2019). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz006>
- 138 Tanaka, M., Okazaki, T., Suzuki, H., Abbruzzese, J. L. & Li, D. Association of multi-drug resistance gene polymorphisms with pancreatic cancer outcome. *Cancer* **117**, 744-751 (2011). <https://doi.org/10.1002/cncr.25510>
- 139 Biswas, R. *et al.* Transport-Mediated Oxaliplatin Resistance Associated with Endogenous Overexpression of MRP2 in Caco-2 and PANC-1 Cells. *Cancers (Basel)* **11** (2019). <https://doi.org/10.3390/cancers11091330>
- 140 Dvorak, P. *et al.* Downregulation of ABC transporters in non-neoplastic tissues confers better prognosis for pancreatic and colorectal cancer patients. *Journal of Cancer* **8**, 1959 (2017).
- 141 Chen, H. *et al.* Sulfonylurea receptor 1-expressing cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to promote non-small cell lung cancer progression. *Cancer Letters* **536**, 215611 (2022).
- 142 Martin, G. M., Patton, B. L. & Shyng, S.-L. KATP channels in focus: Progress toward a structural understanding of ligand regulation. *Current Opinion in Structural Biology* **79**, 102541 (2023).
- 143 Pipatpolkai, T., Usher, S., Stansfeld, P. J. & Ashcroft, F. M. New insights into KATP channel gene mutations and neonatal diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* **16**, 378-393 (2020).
- 144 Patch, A., Flanagan, S., Boustred, C., Hattersley, A. & Ellard, S. Mutations in the ABCC8 gene encoding the SUR1 subunit of the KATP channel cause transient neonatal diabetes, permanent neonatal diabetes or permanent diabetes diagnosed outside the neonatal period. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **9**, 28-39 (2007).
- 145 Xiang, J., Su, R., Wu, S. & Zhou, L. Construction of a prognostic signature for serous ovarian cancer based on lactate metabolism-related genes. *Frontiers in Oncology* **12**, 967342 (2022).
- 146 Zhou, K. *et al.* ABCC8 mRNA expression is an independent prognostic factor for glioma and can predict chemosensitivity. *Scientific Reports* **10**, 12682 (2020).
- 147 Hlaváč, V. *et al.* The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics* **14**, 515-529 (2013).
- 148 Hlavata, I. *et al.* The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* **27**, 187-196 (2012).
- 149 Panneerselvam, J. *et al.* DCLK1 regulates tumor stemness and cisplatin resistance in non-small cell lung cancer via ABCD-member-4. *Molecular Therapy-Oncolytics* **18**, 24-36 (2020).
- 150 Mantel, I., Sadiq, B. A. & Blander, J. M. Spotlight on TAP and its vital role in antigen presentation and cross-presentation. *Molecular Immunology* **142**, 105-119 (2022).
- 151 Schlageter, M., Terracciano, L. M., D'Angelo, S. & Sorrentino, P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* **20**, 15955-15964 (2014). <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.15955>
- 152 Ishizaki, M. *et al.* The formation of capsule and septum in human hepatocellular carcinoma. *Virchows Arch* **438**, 574-580 (2001). <https://doi.org/10.1007/s004280000391>
- 153 Lockwood, D. S. *et al.* Tumor progression in hepatocellular carcinoma: relationship with tumor stroma and parenchymal disease. *J Gastroenterol Hepatol* **18**, 666-672 (2003). <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2003.03018.x>

- 154 Nielsen, K., Rolff, H. C., Eefsen, R. L. & Vainer, B. The morphological growth patterns of colorectal liver metastases are prognostic for overall survival. *Mod Pathol* **27**, 1641-1648 (2014). <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.4>
- 155 Shi, J. Y. *et al.* Margin-infiltrating CD20(+) B cells display an atypical memory phenotype and correlate with favorable prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **19**, 5994-6005 (2013). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-12-3497>
- 156 Mlecnik, B. *et al.* Comprehensive Intrametastatic Immune Quantification and Major Impact of Immunoscore on Survival. *J Natl Cancer Inst* **110** (2018). <https://doi.org/10.1093/jnci/djx123>
- 157 Galon, J. & Bruni, D. Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories. *Immunity* **52**, 55-81 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.018>
- 158 Chen, D. S. & Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* **541**, 321-330 (2017). <https://doi.org/10.1038/nature21349>
- 159 Qin, M. *et al.* Current Perspectives on B Lymphocytes in the Immunobiology of Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol* **11**, 647854 (2021). <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.647854>
- 160 Bruni, D., Angell, H. K. & Galon, J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer* **20**, 662-680 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0285-7>
- 161 Lund, F. E. & Randall, T. D. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat Rev Immunol* **10**, 236-247 (2010). <https://doi.org/10.1038/nri2729>
- 162 Ding, W. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **97**, e13301 (2018). <https://doi.org/10.1097/md.00000000000013301>
- 163 Giușcă, S. E., Wierzbicki, P. M., Amălinei, C., Căruntu, I. D. & Avădănei, E. R. Comparative analysis of CD4 and CD8 lymphocytes - evidences for different distribution in primary and secondary liver tumors. *Folia Histochem Cytobiol* **53**, 272-281 (2015). <https://doi.org/10.5603/fhc.a2015.0027>
- 164 Zheng, B. H. *et al.* The distribution of immune cells within combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma predicts clinical outcome. *Clin Transl Med* **10**, 45-56 (2020). <https://doi.org/10.1002/ctm2.11>
- 165 Ramzan, M. *et al.* Liver-infiltrating CD8(+) lymphocytes as prognostic factor for tumour recurrence in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Liver Int* **36**, 434-444 (2016). <https://doi.org/10.1111/liv.12927>
- 166 Sun, C. *et al.* The predictive value of centre tumour CD8+ T cells in patients with hepatocellular carcinoma: comparison with Immunoscore. *Oncotarget* **6**, 35602-35615 (2015). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5801>
- 167 Hendry, S. *et al.* Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Adv Anat Pathol* **24**, 235-251 (2017). <https://doi.org/10.1097/pap.000000000000162>
- 168 Pezzuto, F., Buonaguro, L., Buonaguro, F. M. & Tornesello, M. L. Frequency and geographic distribution of TERT promoter mutations in primary hepatocellular carcinoma. *Infect Agent Cancer* **12**, 27 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0138-5>
- 169 Guichard, C. *et al.* Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* **44**, 694-698 (2012). <https://doi.org/10.1038/ng.2256>
- 170 Llovet, J. M. *et al.* Immunotherapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol* **19**, 151-172 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00573-2>

- 171 Gao, C. *et al.* Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: a review. *Oncotarget* **9**,
5492-5508 (2018). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23695>
- 172 Wang, Z. *et al.* β -catenin mutation is correlated with a favorable prognosis in patients
with hepatocellular carcinoma. *Mol Clin Oncol* **3**, 936-940 (2015).
<https://doi.org/10.3892/mco.2015.569>
- 173 Xu, X. *et al.* Clinicopathologic and prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ T cells
in patients with hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **98**,
e13923 (2019). <https://doi.org/10.1097/md.00000000000013923>
- 174 Hiraoka, N. Tumor-infiltrating lymphocytes and hepatocellular carcinoma: molecular
biology. *Int J Clin Oncol* **15**, 544-551 (2010). <https://doi.org/10.1007/s10147-010-0130-1>
- 175 Hsiao, Y. W., Chiu, L. T., Chen, C. H., Shih, W. L. & Lu, T. P. Tumor-Infiltrating Leukocyte
Composition and Prognostic Power in Hepatitis B- and Hepatitis C-Related Hepatocellular
Carcinomas. *Genes (Basel)* **10** (2019). <https://doi.org/10.3390/genes10080630>
- 176 Huang, Y. *et al.* CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression
and outcome. *Oncotarget* **6**, 17462-17478 (2015).
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.3958>
- 177 Mei, Z. *et al.* Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer:
systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* **110**, 1595-1605 (2014).
<https://doi.org/10.1038/bjc.2014.46>
- 178 Bi, F., Chen, Y. & Yang, Q. Significance of tumor mutation burden combined with immune
infiltrates in the progression and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Cell Int* **20**, 373
(2020). <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01472-9>
- 179 Melo, C. M. *et al.* The Role of Somatic Mutations on the Immune Response of the Tumor
Microenvironment in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci* **22** (2021).
<https://doi.org/10.3390/ijms22179550>
- 180 Wang, S. *et al.* Copy number signature analysis tool and its application in prostate cancer
reveals distinct mutational processes and clinical outcomes. *PLoS Genet* **17**, e1009557
(2021). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009557>
- 181 Han, X. *et al.* MSIsensor-ct: microsatellite instability detection using cfDNA sequencing
data. *Brief Bioinform* **22** (2021). <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa402>
- 182 Ellrott, K. *et al.* Scalable Open Science Approach for Mutation Calling of Tumor Exomes
Using Multiple Genomic Pipelines. *Cell Syst* **6**, 271-281.e277 (2018).
<https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.03.002>
- 183 Shyr, C. *et al.* FLAGS, frequently mutated genes in public exomes. *BMC Med Genomics* **7**,
64 (2014). <https://doi.org/10.1186/s12920-014-0064-y>
- 184 Ugai, T. *et al.* Prognostic role of detailed colorectal location and tumor molecular
features: analyses of 13,101 colorectal cancer patients including 2994 early-onset cases. *J*
Gastroenterol **58**, 229-245 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00535-023-01955-2>
- 185 Serebriiskii, I. G. *et al.* Comprehensive characterization of RAS mutations in colon and
rectal cancers in old and young patients. *Nat Commun* **10**, 3722 (2019).
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11530-0>
- 186 Modest, D. P. *et al.* Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as
KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal
cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol* **27**, 1746-1753 (2016).
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdw261>
- 187 Ishaque, N. *et al.* Whole genome sequencing puts forward hypotheses on metastasis
evolution and therapy in colorectal cancer. *Nat Commun* **9**, 4782 (2018).
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-07041-z>
- 188 Chen, H. N. *et al.* Genomic evolution and diverse models of systemic metastases in
colorectal cancer. *Gut* **71**, 322-332 (2022). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323703>

- 189 Shiomi, A. *et al.* Comprehensive genomic analysis contrasting primary colorectal cancer and matched liver metastases. *Oncol Lett* **21**, 466 (2021).
<https://doi.org/10.3892/ol.2021.12727>
- 190 Mogensen, M. B. *et al.* Genomic alterations accompanying tumour evolution in colorectal cancer: tracking the differences between primary tumours and synchronous liver metastases by whole-exome sequencing. *BMC Cancer* **18**, 752 (2018).
<https://doi.org/10.1186/s12885-018-4639-4>
- 191 Mariani, S. *et al.* Awareness of mutational artefacts in suboptimal DNA samples: possible risk for therapeutic choices. *Expert Rev Mol Diagn* **18**, 467-475 (2018).
<https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1468254>
- 192 Rheinbay, E. *et al.* Analyses of non-coding somatic drivers in 2,658 cancer whole genomes. *Nature* **578**, 102-111 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1965-x>

Online zdroje:

- **Linkos.cz** - Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně a ISSN 2570-8791. [cit. 2023-11-22]. Dostupný z WWW: <https://www.linkos.cz/>
- **SVOD.cz** - DUŠEK Ladislav, MUŽÍK Jan, KUBÁSEK Miroslav, KOPTÍKOVÁ Jana, ŽALOUDÍK Jan, VYZULA Rostislav. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2023-11-22]. Dostupný z WWW: <https://svod.cz/>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.
- **Human Protein Atlas proteinatlas** - Protein Atlas version 23.0. [cit. 2023-11-22]. Dostupný z WWW: <https://www.proteinatlas.org/>

8 Publikační činnost autorky

Publikace podkládající dizertační práci:

ČERVENKOVÁ, Lenka - VYČÍTAL, Ondřej - BRŮHA, Jan...et al. Protein expression of ABCC2 and SLC22A3 associates with prognosis of pancreatic adenocarcinoma. *Scientific Reports*. 2019, **9** (1), 1-9. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-019-56059-w.

ČERVENKOVÁ, Lenka - PÁLEK, Richard - MOULISOVÁ, Vladimíra...et al. Protein expression and localization of ABC transporters in pancreatic adenocarcinoma: prognostic role of ABCC8. *Pancreatology*. 2023, **2023** (), ISSN 1424-3903. DOI 10.1016/j.pan.2023.10.008.

TRAILIN, Andriy - ČERVENKOVÁ, Lenka - AMBROŹKIEWICZ, Filip...et al. T-and B-cells in the Inner Invasive Margin of Hepatocellular Carcinoma after Resection Associate with Favorable Prognosis. *Cancers*. 2022, **14** (3), 604. ISSN 2072-6694. DOI 10.3390/cancers14030604.

AMBROŹKIEWICZ, Filip - TRAILIN, Andriy - ČERVENKOVÁ, Lenka...et al. CTNNB1 mutations, TERT polymorphism and CD8+ cell densities in resected hepatocellular carcinoma are associated with longer time to recurrence. *BMC Cancer*. 2022, **22** (August), 884. ISSN 1471-2407. DOI 10.1186/s12885-022-09989-0.

HLAVÁČ, Viktor - ČERVENKOVÁ, Lenka - ŠŮSOVÁ, Simona...et al. Exome Sequencing of Paired Colorectal Carcinomas and Synchronous Liver Metastases for Prognosis and Therapy Prediction. *JCO Precision Oncology*. 2023, **7** (May), 1-11. ISSN 2473-4284. DOI 10.1200/PO.22.00557.

Další publikace autorky

Vědecké články v časopisech s IF:

KURAL, Tomáš - GRAJCIAROVÁ, Martina - ROSENDORF, Jáchym...et al. Histological mapping of healing of the small and large intestine - a quantitative study in a porcine model. *Annals of Anatomy*. 2023, **249** (August), 1-14. ISSN 0940-9602. DOI 10.1016/j.aanat.2023.152095.

ROSENDORF, Jáchym - KLÍČOVÁ, M - HERRMANN, I...et al. Intestinal Anastomotic Healing: What do We Know About Processes Behind Anastomotic Complications. *Frontiers in Surgery*. 2022, **9** (June), 1-6. ISSN 2296-875X. DOI 10.3389/fsurg.2022.904810.

MASSARO, Maria Stefania - KOCHOVÁ, Petra - PÁLEK, Richard...et al. Decellularization of Porcine Carotid Arteries: From the Vessel to the High-Quality Scaffold in Five Hours. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022, **10** (May), 833244. ISSN 2296-4185. DOI 10.3389/fbioe.2022.833244.

KOLINKO, Yaroslav - MALEČKOVÁ, Anna - KOCHOVÁ, Petra...et al. Using virtual microscopy for the development of sampling strategies in quantitative histology and design-based stereology. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 2022, **51** (1), 3-22. ISSN 0340-2096. DOI 10.1111/ahe.12765.

MASSARO, Maria Stefania - PÁLEK, Richard - ROSENDORF, Jáchym...et al. Decellularized xenogeneic scaffolds in transplantation and tissue engineering: Immunogenicity versus positive cell stimulation. *Materials Science & Engineering C*. 2021, **127** (August), 1-13. ISSN 0928-4931. DOI 10.1016/j.msec.2021.112203.

ROSENDORF, Jáchym - KLÍČOVÁ, Markéta - ČERVENKOVÁ, Lenka...et al. Double-layered Nanofibrous Patch for Prevention of Anastomotic Leakage and Peritoneal Adhesions, Experimental Study. *In Vivo*. 2021, **35** (2), 731-741. ISSN 0258-851X. DOI 10.21873/invivo.12314.

ROSENDORF, Jáchym - KLICOVA, M. - ČERVENKOVÁ, Lenka...et al. Reinforcement of colonic anastomosis with improved ultrafine nanofibrous patch: Experiment on pig. *Biomedicines [online]*. 2021, **9** (2), 1-18. ISSN 2227-9059. DOI 10.3390/biomedicines9020102.

JIŘÍK, Miroslav - GRUBER, Ivan - MOULISOVÁ, Vladimíra...et al. Semantic Segmentation of Intralobular and Extralobular Tissue from Liver Scaffold H&E Images. *Sensors*. 2020, **20** (24), 7063. ISSN 1424-8220. DOI 10.3390/s20247063.

ROSENDORF, Jáchym - HORAKOVA, Jana - KLICOVA, Marketa...et al. Experimental fortification of intestinal anastomoses with nanofibrous materials in a large animal model. *Scientific Reports*. 2020, **10** (1), 1-12. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-020-58113-4.

MOULISOVÁ, Vladimíra - JIŘÍK, Miroslav - SCHINDLER, Claudia...et al. Novel morphological multi-scale evaluation system for quality assessment of decellularized liver scaffolds. *Journal of Tissue Engineering*. 2020, **11** (May), 2041731420921121. ISSN 2041-7314. DOI 10.1177/2041731420921121.

SVITOK, Pavel; HUSKOVÁ, Zuzana; ČERVENKOVÁ, Lenka; KIKERLOVÁ, Soňa; VAŇOURKOVÁ, Zdenka et al. The exaggerated salt-sensitive response in hypertensive transgenic rats (TGR mRen-2) fostered by a normotensive female. Online. *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2019, roč. 42, č. 4, s. 459-468. ISSN 0916-9636. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41440-018-0157-7>. [cit. 2023-12-18].

SEDLAKOVA, Lenka - KIKERLOVA, Sona - HUSKOVA, Zuzana...et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid antagonist attenuates the development of malignant hypertension and reverses it once established: a study in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats. *Bioscience Reports*. 2018, **38** (September), BSR20171496. ISSN 0144-8463. DOI 10.1042/BSR20171496.

POKORNÝ, Martin - MRÁZOVÁ, Iveta - ŠOCHMAN, J...et al. Isovolumic loading of the failing heart by intraventricular placement of a spring expander attenuates cardiac atrophy after heterotopic heart transplantation. *Bioscience Reports*. 2018, **38** (3), BSR20180371. ISSN 0144-8463. DOI 10.1042/BSR20180371.

POKORNÝ, Martin - MRÁZOVÁ, Iveta - MALÝ, J...et al. Effects of Increased Myocardial Tissue Concentration of Myristic, Palmitic and Palmitoleic Acids on the Course of Cardiac atrophy of the Failing Heart Unloaded by Heterotopic Transplantation. *Physiological Research*. 2018, **67** (1), 13-30. ISSN 0862-8408.

SEDLÁKOVÁ, Lenka - ČERTÍKOVÁ-CHÁBOVÁ, Věra - DOLEŽELOVÁ, Šárka...et al. Renin-angiotensin system blockade alone or combined with ETA receptor blockade: effects on the course of chronic kidney disease in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic hypertensive rats. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2017, **39** (2), 183-195. ISSN 1064-1963. DOI 10.1080/10641963.2016.1235184.

TÁBORSKÝ, Miloš - RICHTER, David - TONAR, Zbyněk...et al. Early morphologic alterations in renal artery wall and renal nerves in response to catheter-based renal denervation procedure in sheep: difference between single-point and multiple-point ablation catheters. *Physiological Research*. 2017, **66** (4), 601-614. ISSN 0862-8408. DOI 10.33549/physiolres.933503.

HUSKOVA, Zuzana - KOPKAN, Libor - ČERVENKOVÁ, Lenka...et al. Intrarenal alterations of the angiotensin-converting enzyme type 2/angiotensin 1-7 complex of the renin-angiotensin system do not alter the course of malignant hypertension in Cyp11a1-Ren-2 transgenic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology [online]*. 2016, **43** (4), 438-449. ISSN 0305-1870. DOI 10.1111/1440-1681.12553.

KOPKAN, Libor - HUSKOVÁ, Zuzana - JÍCHOVÁ, Šárka...et al. Conditional knockout of collecting duct bradykinin B-2 receptors exacerbates angiotensin II-induced hypertension during high salt intake. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2016, **38** (1), 1-9. ISSN 1064-1963. DOI 10.3109/10641963.2015.1047945.

ALÁNOVÁ, Petra - HUSKOVÁ, Zuzana - KOPKAN, Libor...et al. Orally active epoxyeicosatrienoic acid analog does not exhibit antihypertensive and reno- or cardioprotective actions in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertensive rats. *Vascular Pharmacology*. 2015, **73** (October), 45-56. ISSN 1537-1891. DOI 10.1016/j.vph.2015.08.013.

Vědecké články v zahraničních časopisech bez IF:

MASSARO, Maria Stefania - PÁLEK, Richard - ROSENDORF, Jáchym...et al. Recellularization of decellularized porcine caval veins. *Biomedical Sciences and Engineering*. 2021, **4** (s1), 84-85. ISSN 2531-9892. DOI 10.4081/bse.2021.181.

Vědecké články v českých a slovenských časopisech bez IF:

PÁLEK, Richard - ROSENDORF, Jáchym - ŠARČEVIĆ, Sima...et al. Permanentní žilní přístup v experimentální chirurgii - naše zkušenosti. *Rozhledy v chirurgii*. 2022, **101** (12), 577-583. ISSN 0035-9351. DOI 10.33699/PIS.2022.101.12.57-583.

LIŠKA, Václav - MOULISOVÁ, Vladimíra - PÁLEK, Richard...et al. Cesta k novým játrům: Decelularizace prasečích jater a jejich znovuosídlení buňkami. *Rozhledy v chirurgii*. 2019, **98** (10), 388-393. ISSN 0035-9351.

9 Přílohy – plná znění předložených prací

- 9.1 Příloha č. I: Proteinová exprese MRP2 a SLC22A3 souvisí s prognózou adenokarcinomu pankreatu
- 9.2 Příloha č. II: Proteinová exprese a lokalizace ABC transportérů u duktálního karcinomu pankreatu: prognostická role SUR1/ABCC8
- 9.3 Příloha č. III: T a B lymfocyty ve vnitřním invazivním okraji hepatocelulárního karcinomu po resekci souvisí s příznivou prognózou
- 9.4 Příloha č. IV: *CTNNB1* mutace, *TERT* polymorfismus a hustota CD8+ buněk u resekovaného hepatocelulárního karcinomu souvisí s delší dobou do relapsu
- 9.5 Příloha č. V: Sekvenování exomu párových vzorků kolorektálního karcinomu a synchronních jaterních metastáz pro prognózu a předpověď terapie

Příloha č. I: Proteinová exprese MRP2 a SLC22A3 souvisí s prognózou adenokarcinomu pankreatu

OPEN

Protein expression of ABCC2 and SLC22A3 associates with prognosis of pancreatic adenocarcinoma

Lenka Cervenkova^{1,2}, Ondrej Vycital^{1,3}, Jan Bruha^{1,3}, Jachym Rosendorf^{1,3}, Richard Palek^{1,3}, Vaclav Liska^{1,3}, Ondrej Daum^{1,4}, Beatrice Mohelnikova-Duchonova⁵ & Pavel Soucek^{1*}

ATP-binding cassette (ABC) and solute carrier (SLC) transporters translocate diverse substances across cellular membranes and their deregulation may cause drug resistance of cancers. This study investigated significance of protein expression and cellular localization of the previously suggested putative prognostic markers ABCC2 and SLC22A3 in pancreatic cancer patients. Protein localization and brush border staining intensity of ABCC2 and SLC22A3 was assessed in tumor tissue blocks of 65 pancreatic cancer patients and associated with clinical data and survival of patients with regard to therapy. Negative SLC22A3 brush border staining in pancreatic tumors significantly increased the risk of both disease progression and patient's death in univariate analyses. Multivariate analyses confirmed the association of SLC22A3 expression with progression-free survival of patients. A subgroup analysis of patients treated with regimens based on nucleoside analogs suggested that patients with negative brush border staining or apical localization of SLC22A3 in tumor cells have worse overall survival. The combination of positive ABCC2 and negative SLC22A3 brush border staining predicted worst overall survival and patients with positive brush border staining of both proteins had best overall and progression-free survival. The present study shows for the first time that the protein presence and to some extent also localization of SLC22A3 significantly associate with prognosis of pancreatic cancer in both unstratified and chemotherapy-treated patients. The combination of ABCC2 and SLC22A3 brush border staining also needs further attention in this regard.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC, OMIM: 260350) incidence ranks 12th among cancer diagnoses worldwide, but its mortality is predicted to become the second leading cause of cancer death in the USA within the next decade^{1,2}. PDAC clinically manifests by late diagnosis, poor prognosis and overall lack of long term response to the systemic chemotherapy.

Overexpression of ATP-binding cassette (ABC) transporters and downregulation of solute carrier (SLC) transporters is suspected to influence effective intracellular concentration of anticancer chemotherapeutics including some targeted agents^{3,4}. There are numerous examples of such effects demonstrated in various *in vitro* model systems^{5,6}. The resulting chemoresistance of tumor cells leads to progression of the disease to more advanced stages. Thus, discovery of prognostic factors indicating a high risk of such scenarios and development of tools decreasing the chance of chemoresistance or re-sensitizing chemoresistant cells are urgently needed.

In previous studies, we have found dysregulation of transcript levels of several ABC and SLC transporters in tumor tissues of PDAC patients compared to paired adjacent non-tumorous control tissues. Moreover, intratumoral levels of a number of transporters significantly associated with clinical characteristics of patients^{7,8}. Most interestingly, combination of high transcript level of ABCC2 (OMIM: 601107) with low SLC22A3 (OMIM: 604842) level significantly predicted worse overall survival (OS) of patients⁹.

Main goal of the present study was to validate on the protein level the previously suggested putative prognostic role of this combination in independent series of PDAC patients. Thus, we determined protein content of these

¹Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic. ²Department of Pathology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic. ³Department of Surgery, Faculty Hospital and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic. ⁴Department of Pathology, Faculty Hospital and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic. ⁵Department of Oncology and Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic. *email: pavel.soucek@lfp.cuni.cz

Characteristics	N = 65
Age (median \pm S.D.)	66 \pm 8
Gender	
Female	32
Male	33
UICC stage	
Stage IA	4
Stage IB	14
Stage IIA	8
Stage IIB	32
Stage III	6
Unknown	1
Tumor size (pT)	
pT1	10
pT2	27
pT3	23
pT4	4
pTx	1
Lymph node metastasis (pN)	
pN0	28
pN1-2	28
pNx	9
Distant metastasis (cM)	
cM0	60
cMx	5
Grade	
G1	28
G2	29
G3	4
Gx	4
Resection margins (R)	
R0	54
R1	11
Chemotherapy	
None	27
Adjuvant	27
Unknown	11

Table 1. Clinical data of patients included in this study.

biomarkers in a larger cohort of PDAC patients and compared it with the patient' survival in order to substantiate further mechanistic studies behind this association.

Materials and Methods

Patients. In total, 65 surgically treated patients with histologically confirmed diagnosis of PDAC and available clinical follow up were included into the study. All patients were recruited and underwent surgery and oncological treatment at the Department of Surgery and Oncology, Teaching Hospital and Medical School in Pilsen, between years 2002 and 2016.

The following data on patients were retrieved from medical records: age, sex, date of diagnosis, date of surgery, resection margins, tumor size (pT), lymph node metastasis (pN), distant metastasis (cM), clinical stage, histological grade, adjuvant treatment regimen, and survival. Clinical characteristics of patients are described in Table 1. None of the patients had received neoadjuvant chemotherapy. The progression-free survival (PFS) served as a measure of the treatment outcome. The PFS was defined as the time elapsed between surgical resection and disease recurrence or death. The OS was defined as the time elapsed between surgical resection and death of any cause.

All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the Ethical Commission of the Medical Faculty and Teaching Hospital in Pilsen, Czech Republic (approval reference no. 301/2019) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Experimental protocol of this study was also approved by the Ethical Commission of the Medical Faculty and Teaching Hospital in Pilsen, Czech Republic (approval reference no. 301/2019). Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Immunohistochemical analysis. Tissue for light microscopy was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin using routine procedures. Five micrometer-thick sections were cut from the tissue blocks and stained with hematoxylin and eosin. For the immunohistochemical (IHC) study samples were first processed by Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) using Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions pH 6 for ABCC2 and pH 9 for SLC22A3 (Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA). Then, endogenous peroxidase activity was blocked using Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), 5% normal goat serum was used for background blocking (slides for SLC22A3) and slides were incubated with the following primary antibodies: ABCC2 (dilution 1:100, cat. no. ab3373, Abcam, Cambridge, UK) and SLC22A3 (1:100, cat. no. ab124826, Abcam). The polymerized reporter enzyme staining system (Universal Immuno-peroxidase Polymer) with Anti-Mouse and Rabbit N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Cosmo Bio USA, Carlsbad, CA, USA) were used for visualization. Slides were counterstained by Gill's hematoxylin. Appropriate positive and negative controls were employed. First, predominant localization was evaluated as basal or apical. Then staining in brush border was evaluated as negative or positive. Ambiguous samples were excluded from further statistical analysis ($n = 5$).

Data analysis. All statistical analyses were performed using SPSS v16.0 Software (SPSS Inc., Chicago, IL). Differences between groups of patients stratified by clinical data were assessed by the ANOVA and the Pearson tests. Survival function was plotted by the Kaplan-Meier method and the Log Rank and Breslow tests were used for evaluation of the compared groups of patients. Multivariate analysis adjusted to clinical factors which significantly modified survival of patients, i.e. resection margins and lymph node metastasis was performed by the Cox regression.

All P -values were calculated from two-sided tests. P -values lower than 0.05 were considered statistically significant.

Results

ABCC2 and SLC22A3 proteins were stained by IHC in formalin-fixed paraffin-embedded sections of 65 PDAC patients (clinical data in Table 1). The representative IHC slides are presented on Fig. 1. ABCC2 and SLC22A3 were predominantly localized in basal side of plasma membrane in 49% and 45% samples, respectively. Positive IHC brush border staining was observed in 45% and 29% of patients for ABCC2 and SLC22A3, respectively. Both followed characteristics were then combined.

No significant associations of ABCC2 and SLC22A3 IHC brush border staining or localization with gender and age of the patients, stage, tumor size, presence of local and distant metastasis, tumor grade and resection margins have been observed. The median PFS and OS of all patients were 14 ± 7 and 28 ± 9 months, respectively. Five patients were lost to follow up and were not further evaluated. Patients with R1 resection had significantly worse PFS ($P = 0.038$, Log Rank) and OS ($P = 0.001$) than completely resected (R0) ones. Patients with regional lymph nodes invaded by tumor cells (pN1-2) had significantly worse PFS ($P = 0.039$, Log Rank), but not OS than patients without such invasion (pN0). Therefore, subsequent multivariate analyses were adjusted to lymph node metastasis and resection margins.

We then performed univariate analysis of survival functions in groups of patients divided by localization or IHC brush border staining. PDAC patients with negative IHC brush border staining of SLC22A3 had significantly shorter PFS ($P = 0.041$, Log Rank and $P = 0.024$, Breslow; Fig. 2A) and OS ($P = 0.007$, Log Rank and $P = 0.020$, Breslow; Fig. 2B) than patients with positive staining in tumor cells. ABCC2 brush border staining or localization and SLC22A3 localization did not associate with survival of the patients.

Multivariate analysis adjusted to resection margins and lymph node metastasis confirmed that the negative SLC22A3 IHC brush border staining presents high risk factor for disease progression (PFS) ($P = 0.049$, hazard ratio = 2.3, 95% confidence interval = 1.0–5.1), but not for death (OS).

The analysis of combinations of IHC characteristics of both proteins has shown that patients with positive ABCC2 and SLC22A3 brush border staining had the best PFS, but the effect of other combinations was equal ($P = 0.035$, Log Rank and $P = 0.092$, Breslow; Fig. 3A). The combination of positive ABCC2 and SLC22A3 brush border staining was also predictive of best OS, but additionally, patients with combination of positive ABCC2 and negative SLC22A3 intratumoral brush border staining had apparently the worst OS ($P = 0.048$, Log Rank and $P = 0.013$, Breslow; Fig. 3B). The combination of localizations did not influence OS as well as PFS. Multivariate analysis was not performed due to too small numbers of observations in compared subgroups of patients.

Stratified analyses of patients treated with regimens based on nucleoside analogs (gemcitabine and 5-fluorouracil, $N = 27$) again demonstrated that patients with negative IHC brush border staining of SLC22A3 have significantly worse PFS ($P = 0.010$, Log Rank and $P = 0.013$, Breslow; Fig. 4A) and OS ($P = 0.030$, Log Rank and $P = 0.040$, Breslow; Fig. 4B). Moreover, patients with apical SLC22A3 localization had significantly worse OS than those with basal localization ($P = 0.021$, Log Rank and $P = 0.029$, Breslow; Fig. 4C). Analyses of combinations and multivariate analyses were not performed due to too small numbers of observations in compared subgroups of patients.

Discussion

Based on the previously observed associations of transcript levels of two less frequently studied membrane transporters with survival of PDAC patients^{7–9}, we analyzed prognostic significance of their protein staining intensity and cellular localization by IHC in a larger study. Our data clearly show that presence of SLC22A3 protein associates with prognosis of PDAC patients.

Role of protein expression of SLC22A3 in pancreatic cancer was not addressed to date. Present study demonstrates that patients with detectable SLC22A3 brush border IHC staining in their tumor cells have significantly longer OS and PFS than those without it. SLC22A3 is expressed across a broad spectrum of human tissues mostly

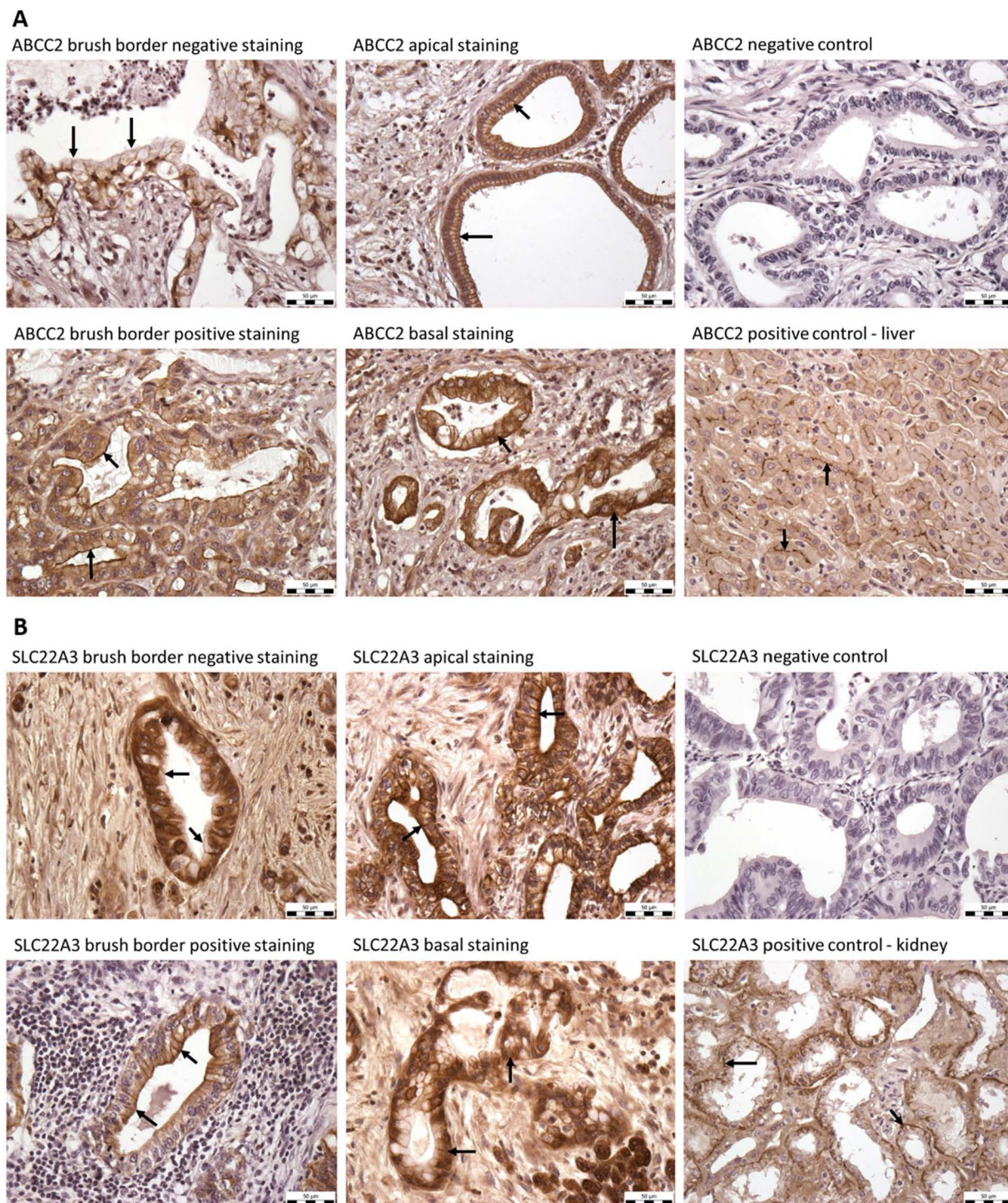


Figure 1. Immunohistochemistry of the ABCC2 and SLC22A3 transporters. **(A)** Examples of ABCC2 negative and positive brush border staining, apical and basal staining, and negative and positive controls. Negative control: tumor tissue stained without primary antibody. Positive control: human kidney cortex. **(B)** Examples of SLC22A3 negative and positive brush border IHC staining, apical and basal staining, and positive and negative controls. Negative control: tumor tissue stained without primary antibody. Positive control: human liver. Arrows allow easier visual control of results. Scale bar 50 µm.

in cellular plasma membrane where it actively uptakes a high number of both endogenous substrates and xenobiotics including antineoplastic drugs. Gene expression of SLC22A3 is both genetically and epigenetically regulated¹⁰. The current view about role of SLC22A3 in cancer has two aspects.

First, SLC22A3 expression was previously connected with onset and progression of several cancers. Specifically, genetic variability of *SLC22A3* predisposes to colorectal and prostate cancer^{11–13}. Association of

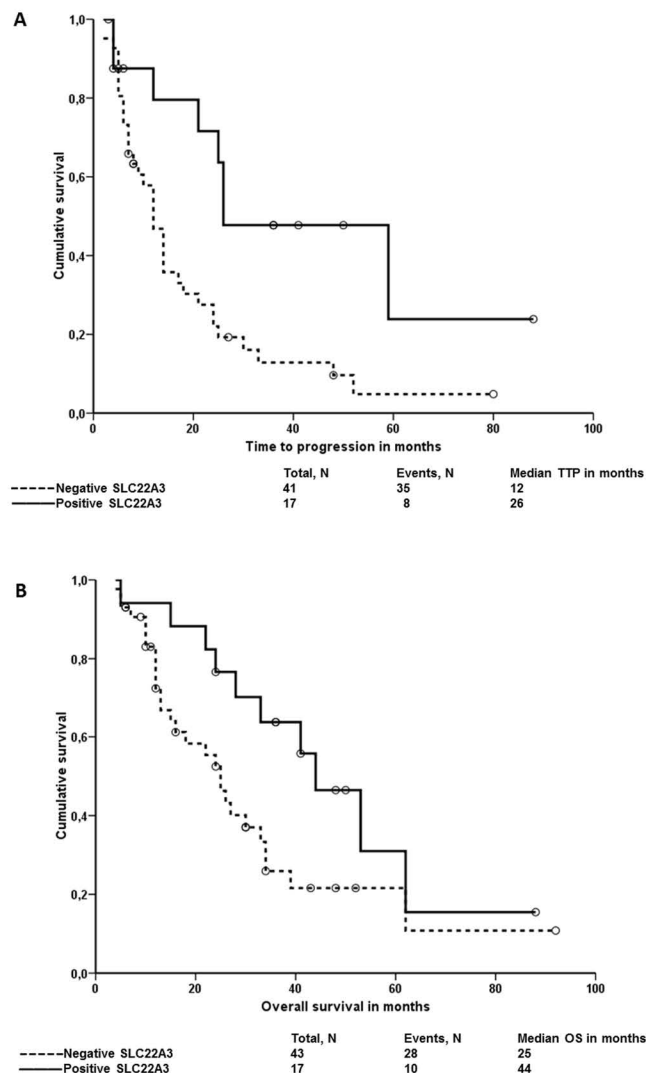


Figure 2. Associations between SLC22A3 brush border staining and the survival of all patients. Kaplan-Meier survival curves were plotted for the PFS or the OS of patients divided into negative and positive staining groups. Dashed line represents the group with negative staining and solid line the group with positive staining. Plot (A) shows results of PFS analysis and plot (B) of OS analysis.

genetic variant rs2504938 in *SLC22A3* with overall survival of pancreatic cancer patients was recently published¹⁴. Hepatocellular carcinomas express lower SLC22A3 protein levels than non-tumor tissues¹⁵ and larger size and number of chemically-induced liver tumors were observed in SLC22A3 knock-out mice model compared to wild type mice¹⁶. In line with these observations, SLC22A3 was reported as metastasis suppressor in familial esophageal squamous cell carcinoma where it directly inhibits ACTN4 (alpha actin 4, OMIM: 604638)¹⁷. More recently, a correlation between *SLC22A3* promoter hypermethylation and a higher risk for developing familial esophageal squamous cell carcinoma in Chinese was described, together with a new function of SLC22A3 in heat stress-induced oxidative DNA damage¹⁸. On the other hand, SLC22A3 overexpression promoted cell proliferation and stimulated migration and invasion of colorectal carcinoma cell line models, while repression of the expression reversed these effects¹³. Taken together previous studies suggested that genetic, epigenetic or phenotypic nature of SLC22A3 can serve as putative risk predictive or prognostic biomarker in cancer.

Second, SLC22A3 function as uptake transporter of number of chemicals including antineoplastic drugs was implicated in cancer treatment efficacy and individualization. Higher pre-treatment intratumoral SLC22A3 protein expression was observed in colorectal cancer patients responding to adjuvant chemotherapy with FOLFOX (combination of 5-fluorouracil, folinic acid and oxaliplatin) regimen than in non-responders¹⁹ suggesting a potential predictive character of this biomarker. In agreement with our findings, patients with head and neck squamous cell carcinoma classified as having high SLC22A3 protein level had improved overall survival after cisplatin therapy and correspondingly, the *in vitro* sensitivity of cell line models to this compound correlated with SLC22A3 expression²⁰. Besides frequently used platinum compounds, SLC22A3 also plays a role in the therapeutic action of metformin²¹. High SLC22A3 expression is being tested as a potential surrogate biomarker predicting response of several cancers to metformin^{22,23}.

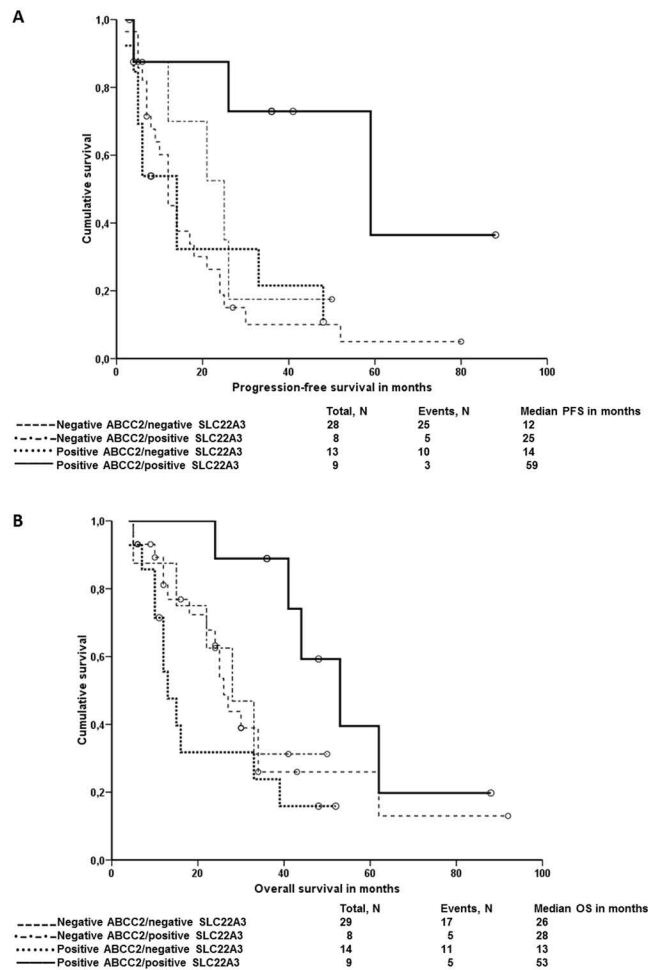


Figure 3. Survival analysis of combinations of SLC22A3 and ABCC2 brush border staining in all patients. Kaplan-Meier survival curves were plotted for the PFS or the OS of patients divided into ABCC2-negative/SLC22A3-negative (dashed lines), ABCC2-negative/SLC22A3-positive (hatched lines), ABCC2-positive/SLC22A3-negative (dotted lines), and ABCC2-positive/SLC22A3-positive (solid lines). Plot (A) shows results of PFS analysis and plot (B) of OS analysis.

Collectively, the present study and previous reports suggest that SLC22A3 may serve as a putative prognostic and predictive biomarker for follow up validation and functional studies aimed at personalized therapy of PDAC and several other, mostly gastrointestinal, cancers. IHC is routine method established in all pathology departments of larger medical centers worldwide and thus quick application of verified biomarker(s) is envisaged.

Recent genetic study reported that several polymorphisms in the *ABCC2* gene (rs3740067, rs3740073 and rs717620) significantly associate with OS of PDAC patients in an early disease stage and may become prognostic biomarkers²⁴. This observation complements previous studies suggesting that *ABCC2* polymorphism rs2273697 associates with poor OS and response to chemoradiotherapy of PDAC patients²⁵ and upregulated *ABCC2* protein expression leads to an altered sensitivity to gemcitabine and irinotecan *in vitro*²⁶. Another study recently pointed out that silencing *ABCC2* protein expression increases oxaliplatin accumulation and cytotoxicity in PANC-1 pancreatic cell line model *in vitro*²⁷. Although the relation between *ABCC2* and PDAC therapy response and prognosis was already well demonstrated in various experimental settings, the present study did not prove association of *ABCC2* protein expression alone with survival of PDAC patients.

Prognostic potential of *ABCC2* and SLC22A3 combination detected in the present study represents completely new area. Combinations of efflux and uptake transporters by definition of their major functions, i.e. export of drugs outside cells or cellular compartments by ABCs and import of drugs inside by SLCs may have much stronger effect than single biomarker-based predictions. Thus we hypothesized that negative *ABCC2* and positive SLC22A3 protein expression should associate with long survival and opposite combination with poor survival of patients. In fact, combination of positive *ABCC2* and positive SLC22A3 predicted longest survival (both PFS and OS) suggesting that the extent of overall protein expression dysregulation is prognostic in this case. On the other hand, combination of positive *ABCC2* and negative SLC22A3 protein expression indeed predicted shortest overall survival of patients and complied with the function-based hypothesis. However, the breaking up the cohort to very small subgroups poses a problem with statistical power especially in rarely studied diseases and thus, these observations must be replicated.

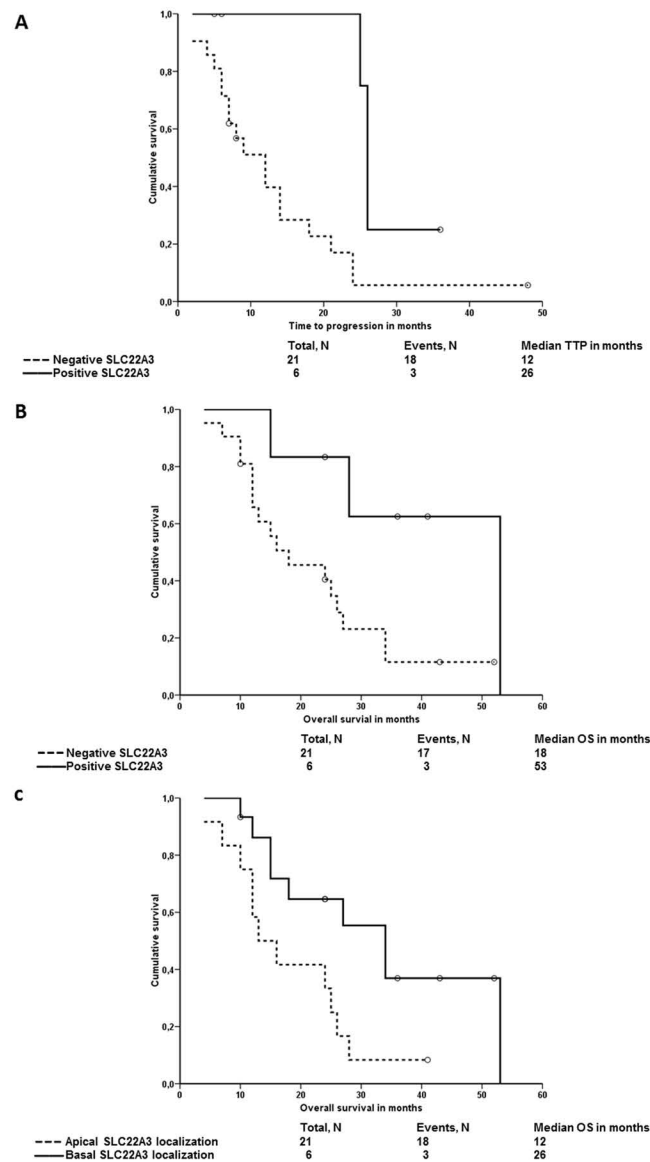


Figure 4. Associations of SLC22A3 brush border staining and localization with the survival of chemotherapy-treated patients. Kaplan-Meier survival curves were plotted for the PFS or the OS of patients divided into negative and positive or apical and basal localization groups. Dashed line represents the group with negative staining, solid line the group with positive staining. Plot A shows results of PFS analysis and plot (B) of OS analysis. In the plot (C), the solid line represents the group with basal localization and dashed line the group with apical localization of SLC22A3 protein in plasma membrane compared with OS of patients.

We are aware of some limitations of our study. First, the modest sample size may be seen as rather low. However, the incidence of PDAC, although quickly rising, is still quite low and mainly the percentage of its resectability is very limited (10–15%). Thus, it is rather difficult to put together larger series of patients with available clinical follow up. The rate of drop-out of patients from the follow up due to very dismal character of the disease is also quite high. Second, numerous systems of evaluation of protein appearance in tumor cells were published and especially in experimental and less studied proteins it is complicated to decide which of the reported approaches should be used. Therefore, we have chosen both semi-quantitative and qualitative measures to robustly assess relevance of proteins of interest. It is necessary to conduct next studies to validate present results.

On the other hand, this study has also certain advantages. All patients were recruited and followed in one regional center and thus represent homogeneous group of patients treated and surveyed in uniform way. Moreover, the present study was driven by previous observations on different patient group (also single center cohort) at the transcript level and thus congruent results obtained now cannot be attributed to the chance as in the case of hypothesis-generating screens.

Taken together, our results confirm the prognostic role of SLC22A3 protein in PDAC previously suggested by targeted transcriptomic study. ABCC2 transporter seems to play rather marginal role in this regard, but the effect

of combinations of both biomarkers observed in a small scale subgroup analysis should be further validated by independent studies.

Compliance with Ethical Standards

Ethical approval. All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the Ethical Commission of the Medical Faculty and Teaching Hospital in Pilsen, Czech Republic (reference no. 301/2019) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

Informed consent. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Received: 13 September 2019; Accepted: 3 December 2019;

Published online: 24 December 2019

References

1. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.* **67**, 7–30 (2017).
2. Rahib, L. *et al.* Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* **74**, 2913–2921 (2014).
3. Ford, R. C. & Beis, K. Learning the ABCs one at a time: structure and mechanism of ABC transporters. *Biochem. Soc. Trans.* **47**, 23–36 (2019).
4. Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B. & Giacomini, K. M. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 543–560 (2015).
5. Akan, I., Akan, S., Akca, H., Savas, B. & Ozben, T. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) mediated vincristine resistance: effects of N-acetylcysteine and Buthionine sulfoximine. *Cancer Cell International* **5**, 22 (2005).
6. Yonezawa, A., Masuda, S., Yokoo, S., Katsura, T. & Inui, K. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**, 879–886 (2006).
7. Mohelnikova-Duchonova, B. *et al.* Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and non-neoplastic tissues. *Pancreas* **42**, 707–716 (2013).
8. Mohelnikova-Duchonova, B. *et al.* The association between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **72**, 669–682 (2013).
9. Soucek, P. *et al.* Biotransformation genes as prognostic markers in pancreatic adenocarcinoma. *Int. J. Mol. Med.* **32**, S46 (2013).
10. Chen, L. *et al.* Genetic and epigenetic regulation of the organic cation transporter 3, SLC22A3. *Pharmacogenomics J.* **13**, 110–120 (2013).
11. Cui, R. *et al.* Common variant in 6q26-q27 is associated with distal colon cancer in an Asian population. *Gut* **60**, 799–805 (2011).
12. Hoffmann, T. J. *et al.* A large multiethnic genome-wide association study of prostate cancer identifies novel risk variants and substantial ethnic differences. *Cancer Discov.* **5**, 878–891 (2015).
13. Ren, A. *et al.* Genetic variants in SLC22A3 contribute to the susceptibility to colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **145**, 154–163 (2019).
14. Mohelnikova-Duchonova, B. *et al.* SLC22A3 polymorphisms do not modify pancreatic cancer risk, but may influence overall patient survival. *Sci. Rep.* **7**, 43812 (2017).
15. Namisaki, T. *et al.* Differential expression of drug uptake and efflux transporters in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Drug Metab. Dispos.* **42**, 2033–2040 (2014).
16. Vollmar, J. *et al.* Loss of organic cation transporter 3 (Oct3) leads to enhanced proliferation and hepatocarcinogenesis. *Oncotarget* **8**, 115667–115680 (2017).
17. Fu, L. *et al.* RNA editing of SLC22A3 drives early tumor invasion and metastasis in familial esophageal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, E4631–E4640 (2017).
18. Xiong, J. X. *et al.* Epigenetic alterations of a novel antioxidant gene SLC22A3 predispose susceptible individuals to increased risk of esophageal cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 1658–1668 (2018).
19. Le Roy, B. *et al.* Assessment of the Relation between the Expression of Oxaliplatin Transporters in Colorectal Cancer and Response to FOLFOX-4 Adjuvant Chemotherapy: A Case Control Study. *PLoS One* **11**, e0148739 (2016).
20. Hsu, C. M. *et al.* Upregulated SLC22A3 has a potential for improving survival of patients with head and neck squamous cell carcinoma receiving cisplatin treatment. *Oncotarget* **8**, 74348–74358 (2017).
21. Chen, L. *et al.* Role of organic cation transporter 3 (SLC22A3) and its missense variants in the pharmacologic action of metformin. *Pharmacogenet. Genomics* **20**, 687–699 (2010).
22. Madera, D. *et al.* Prevention of tumor growth driven by PIK3CA and HPV oncogenes by targeting mTOR signaling with metformin in oral squamous carcinomas expressing OCT3. *Cancer Prev. Res. (Phila)* **8**, 197–207 (2015).
23. Cai, H., Everett, R. S. & Thakker, D. R. Efficacious dose of metformin for breast cancer therapy is determined by cation transporter expression in tumours. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 2724–2735 (2019).
24. Gentiluomo, M. *et al.* Genetic variability of the ABCC2 gene and clinical outcomes in pancreatic cancer patients. *Carcinogenesis* **40**, 544–550 (2019).
25. Tanaka, M., Okazaki, T., Suzuki, H., Abbruzzese, J. L. & Li, D. Association of multi-drug resistance gene polymorphisms with pancreatic cancer outcome. *Cancer* **117**, 744–751 (2011).
26. Skrypek, N. *et al.* The oncogenic receptor ErbB2 modulates gemcitabine and irinotecan/SN-38 chemoresistance of human pancreatic cancer cells via hCNT1 transporter and multidrug-resistance associated protein MRP-2. *Oncotarget* **6**, 10853–10867 (2015).
27. Biswas, R. *et al.* Transport-Mediated Oxaliplatin Resistance Associated with Endogenous Overexpression of MRP2 in Caco-2 and PANC-1 Cells. *Cancers (Basel)* **11**, E1330 (2019).

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Health Research Council, project no.: NV19-03-00097 (to B.M.D.), the Charles University project “Center of Clinical and Experimental Liver Surgery”, no.: UNCE/MED/006 (to V.L.), the European Regional Development Fund - project “Application of Modern Technologies in Medicine and Industry” no.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007280 (to V.L.) and by the National Sustainability Program I (NPU

I) no. LO1503 (to P.S.) provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic. Authors with to thank Dr. Vera Krizkova from Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic for advice about the strategy of the IHC evaluation.

Author contributions

C.L. established and performed immunohistochemistry, evaluated results, prepared Fig. 1, and drafted final manuscript. V.O., B.J., J.R. and R.P. retrieved clinical data of patients, prepared Table 1, and drafted final manuscript. V.L. curated clinical data, interpreted results and drafted final manuscript. O.D. retrieved and checked all archival blocks, curated immunohistochemical results, and drafted final manuscript. B.M.-D. contributed to the study design by pilot study, curated survival data and their interpretation and substantially revised manuscript. P.S. designed and coordinated the work, made final evaluation of results and drafted all paper versions.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

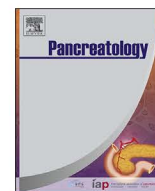
Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Příloha č. II: Proteinová exprese a lokalizace ABC transportérů u duktálního karcinomu pankreatu: prognostická role SUR1/ABCC8



Protein expression and localization of ABC transporters in pancreatic adenocarcinoma: Prognostic role of ABCC8



Lenka Cervenkova^{a, b}, Richard Palek^{a, c}, Vladimira Moulisova^a, Vaclav Liska^{a, c},
Ondrej Daum^{a, d}, Beatrice Mohelnikova-Duchonova^e, Pavel Soucek^{a, *}

^a Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

^b Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

^c Department of Surgery, Faculty Hospital and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

^d Department of Pathology, Faculty Hospital and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

^e Department of Oncology and Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2023

Received in revised form

3 October 2023

Accepted 8 October 2023

Available online 10 October 2023

Keywords:

Pancreas

Adenocarcinoma

ATP-Binding cassette transporters

Immunohistochemistry

Prognosis

ABSTRACT

Background: ATP-binding cassette (ABC) transporters translocate various substances across cellular membranes. Their deregulation may cause cancer drug resistance or perturbations in the supply of building blocks for cancer cells and modify patients' prognosis. This study investigated protein expression and cellular localization of the previously suggested putative prognostic biomarkers – ABCB2/TAP1, ABCC7/CFTR, ABCC8/SUR1, and ABCD4 in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC).

Methods: Protein expression and localization were assessed by immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded primary tumor tissue blocks of 61 PDAC patients and associated with clinical data and the survival of patients.

Results: No CFTR protein expression was observed in PDAC, while TAP1 and ABCC8 were expressed predominantly in the cytoplasm of tumor cells. Most samples (81 %) had detectable both membranous and cytoplasmic ABCD4 staining and 42 % had ABCD4 expressed in the apical orientation. Negative membranous ABCD4 staining was significantly more frequent in advanced stage III or IV tumors ($p = 0.022$). Small or medium counts of individual ABCC8-positive cells in the stroma surrounding tumor tubules were also more often found in stage III or IV ($p = 0.044$). Patients with moderate or strong ABCC8 cytoplasmic staining intensity in tumor cells had a 3.5-fold higher risk of disease progression than those with weak staining ($p = 0.002$).

Conclusions: The study shows for the first time that the cytoplasmic ABCC8 protein expression has prognostic value in PDAC.

© 2023 IAP and EPC. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) remains one of the most deadly cancers with a quickly rising incidence [1]. Predictions warn that PDAC will become the second leading cause of cancer

death in the USA within the next decade [2].

We have previously demonstrated that the notoriously known PDAC resistance to cytotoxic and targeted therapy may be at least partly attributed to the overexpression of ATP-binding cassette (ABC) transporters and downregulation of solute carrier (SLC) transporters, resulting in an imbalance between drug uptake and efflux decreasing their intracellular concentration [3,4]. Additionally, intratumoral levels of individual transporters or their combinations are significantly associated with the clinical characteristics of patients [3,4]. Most interestingly, a combination of high ABCC2 and low SLC22A3 transcript levels significantly predicted worse overall survival (OS) of patients [5]. We later confirmed this observation on a protein level [6].

* Corresponding author. Laboratory of Pharmacogenomics, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, alej Svobody 1655/76, 323 00, Pilsen, Czech Republic.

E-mail addresses: lenka.cervenkova@lfp.cuni.cz (L. Cervenkova), palekr@fnplzen.cz (R. Palek), vladimira.moulisova@lfp.cuni.cz (V. Moulisova), vena.liska@skaut.cz (V. Liska), daum@fnplzen.cz (O. Daum), d.beatrice@seznam.cz (B. Mohelnikova-Duchonova), pavel.soucek@lfp.cuni.cz (P. Soucek).

Additionally, we recently reported associations of ABCB2/TAP1, ABCC7/CFTR, ABCC8/SUR1, and ABCD4 intratumoral or non-malignant tissue transcript levels with PDAC prognosis [7]. These transporters belong to physiological ones and their direct participation in drug resistance is neglected. Transporter associated with antigen processing 1 (TAP1), together with TAP2/ABCB3, forms the antigen-presenting machinery [8]. Its transcript was recently shown overexpressed in several cancers [9], and its high level was significantly associated with the risk of progression and death [10]. Moreover, a high expression of TAP1 observed in immune cells may be relevant for tumor-host response, immunotherapy, and resistance to targeted drugs [11]. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein functions as a membrane channel controlling the exit of chloride anions from secretory cells producing mucus, sweat, saliva, tears, and digestive enzymes [12]. Therefore it is highly relevant to the pancreas, and its pathogenic mutations cause not just cystic fibrosis but also pancreatitis [13], which is connected with an increased risk for pancreatic cancer as well as cystic fibrosis alone [14]. Sulfonylurea receptor 1 protein, encoded by the ABCC8 gene, in cooperation with other ATP-sensitive potassium (KATP) channels, regulates a plethora of physiological functions [15]. Most importantly, it seems connected with diabetes [16], the notoriously debated issue in pancreatic cancer [17]. ABCD4 is predominantly expressed in the lysosomal membrane where it interacts with the lysosomal cobalamin transport escort protein LMBD1 and both proteins transport vitamin B12 (cobalamin) to the cytosol [18]. Its contribution to cancer onset and progression is virtually unknown.

It is accepted that transcript level does not readily correlate with protein expression or activity. Thus, proper validation of clinical associations based on transcript levels is urgently needed. Therefore, the main goal of the present study was to validate on the protein level a previously demonstrated (on transcript level) [7] significance of four physiological ABC transporters in an independent set of PDAC patients. We report for the first time the protein expression and localization of these less studied ABCs in a series of PDAC tissue blocks and confirm that the protein expression of ABCC8 is prognostic in PDAC.

2. Materials and methods

2.1. Patients

We retrospectively collected archival formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks of 61 patients with histologically confirmed PDAC resected at the Department of Surgery and Department of Oncology, Teaching Hospital and Medical School in Pilsen, from 2002 to 2016.

The following data on patients were retrieved from medical records: age, sex, date of diagnosis, date of surgery, resection margins (R), tumor extent (pT), lymph node metastasis (pN), distant metastasis (cM), stage and histological grade, adjuvant treatment regimen, and patient survival (Table 1).

Samples from patients treated with neoadjuvant chemotherapy were excluded. The progression-free survival (PFS) defined as the time elapsed between surgical resection and disease recurrence or death served as a measure of the treatment outcome. The OS was defined as the time elapsed between surgical resection and death of any cause. Three patients with perioperative mortality (death within 30 days of surgery) were excluded from survival analyses.

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the Ethical Commission of the Medical Faculty and Teaching Hospital in Pilsen, Czech Republic (approval no. 301/2019) and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical

Table 1
Clinical characteristics of the patients.

Parameter	Number of patients	%
Age at diagnosis, median & range (years)	65 (47–81)	100
Gender		
Male	31	51
Female	30	49
Tumor extent (pT)		
pT1	9	15
pT2	25	42
pT3	21	35
pT4	5	8
pTX	1	–
Lymph node involvement (pN)		
pN0	25	47
pN1	26	49
pN2	2	4
pNX	8	–
Distant metastasis (cM)		
Absent	59	97
Present	2	3
Stage		
I	15	25
II	37	62
III	6	10
IV	2	3
Not available	1	–
Histological grade (G)		
G1	28	48
G2	24	42
G3	6	10
GX	3	–
Resection margins (R)		
Negative (R0)	52	85
Positive (R1)	9	15
Adjuvant chemotherapy		
Administered	34	62
Not administered	21	38
Data not available	6	–

standards. This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors. Due to the retrospective nature of the study, a high fatality of the disease, anonymized clinical data, and the fact that the research could not practicably be carried out without the waiver, the Ethical Commission of the Medical Faculty and Teaching Hospital in Pilsen, Czech Republic waived the requirement to obtain an informed consent (reference no. 301/2019).

2.2. Rationale for selection of candidate proteins

ABCs selected for the study had to fulfill at least one of the following criteria: i/significant transcript dysregulation in PDAC compared with non-neoplastic tissue of pancreas (ABCB2/TAP1 and ABCD4 overexpressed, CFTR and ABCC8 downregulated) [3], ii/part of transcript expression clusters associating with patient prognosis (ABCD4) [7], or iii/relevance to pancreatic tissue or cancer in general (TAP1, CFTR, and ABCC8) [8–18].

2.3. Immunohistochemical analysis

Five micrometer-thick sections were cut from the FFPE tissue blocks and stained with hematoxylin and eosin. Tissue samples or sections with low tumor cell content were excluded from the analysis. For the immunohistochemical study, slides were incubated with primary antibodies (Suppl. Table S1) using the autostainer BenchMark ULTRA IHC/ISH staining module (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Switzerland) with procedure UltraView DAB.

The microscope Olympus BX53 (Olympus Europa SE & Co, Hamburg, Germany) was used for the final assessment of localization and staining intensity of proteins of interest in tumor cells by immunohistochemistry.

Positive (Suppl. Table S1) and negative controls (pancreatic tissue for CFTR and tumor tissue for ABCD4, ABCC8, and TAP1) stained without primary antibodies were employed. We also used internal positive controls for each evaluated tumor tissue block, namely endothelial cells for ABCD4, non-neoplastic pancreatic tissue for CFTR, and interstitial cells for ABCC8 and TAP1. All samples with absent internal and external control staining were excluded from the analysis.

The localization was first scored as 1/negative in the cytoplasm and plasmatic membrane, 2/positive in the cytoplasm, or 3/positive in the plasmatic membrane. For cytoplasmic expression, we further stratified samples to those with weak – moderate – strong intensity as evaluated semi-quantitatively by comparing the prevailing intensity in tumor cells with positive control cells, including the internal controls. The samples with positive staining in the plasmatic membrane were divided into strong apical, strong basal, and strong apical and basal staining groups. Negative staining was called for samples without expression in all tumor cells assessed. For all analyses, minimally 10 HPF (high power fields) at 40× lens magnification was used.

2.4. Data analysis

Differences between groups of patients stratified by clinical data were assessed by ANOVA or Pearson's chi-squared tests. The survival functions were plotted by the Kaplan-Meier method and the Log Rank test was used for the evaluation of differences between the compared groups of patients (positive versus negative staining and where applicable apical versus basal localization). Multivariate Cox regression analysis, adjusted to lymph node involvement, was performed for significant associations in univariate analyses. All p-values come from two-sided tests and p-values <0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS v16.0 Software (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results

3.1. Staining intensity and localization of studied ABC transporters in PDAC cells

3.1.1. TAP1

One sample was excluded due to inconsistent staining results. We detected weak to strong TAP1 cytoplasmic staining in most PDAC samples (n = 45, 75 %). No membrane staining was detected. The representative immunohistochemistry slides are in Fig. 1 and the overall results are in Suppl. Table S2.

3.1.2. CFTR

No CFTR staining was found in PDAC cells of any of the analyzed samples (n = 61, 100 %, Suppl. Table S2), while the apical membrane of non-neoplastic pancreatic duct cells was positive in all samples (Fig. 2).

3.1.3. ABCC8

Four samples had to be excluded from the analysis due to inconsistent staining results. In the rest of the samples, all PDACs had positive cytoplasmic ABCC8 staining. However, its intensity varied from weak to strong (Fig. 3). ABCC8 weak apical membrane staining was present in nine tumor samples. Stroma surrounding tumor tubules contained strong ABCC8 staining in small (n = 18) or medium (n = 12) counts of cells (Suppl. Table S2). ABCC8-positive

cells in the stroma morphologically resembled histiocytes.

3.1.4. ABCD4

Two samples were excluded due to inconsistent staining results. The ABCD4 protein expression pattern was more variable compared to the above transporters (Fig. 4A–D). In most cases (n = 48, 81 %), both membranous and cytoplasmic staining were observed in PDAC cells. Eight (14 %) samples had ABCD4 localized exclusively in the membrane and four in the cytoplasm (7 %). Of those with plasma membrane positivity, ABCD4 was found on the apical side of 24 samples and five of these had it localized also on the basal side (Suppl. Table S2).

3.2. Associations with clinical data

We further statistically evaluated associations of TAP1, ABCC8, and ABCD4 protein localization and staining intensity with clinical data of patients. For ABCC8 we also evaluated counts of individual ABCC8-positive cells in the stroma surrounding tumor tubules.

Tumors of patients with advanced disease (stage III or IV) more often lacked ABCD4 membranous staining (33 %) compared to early or regionally advanced ones (2 % in stage I or II combined) and even the trend among stages was significant (p = 0.022, Table 2).

Additionally, the majority of tumor samples from patients with stage III or IV had small or moderate counts of isolated ABCC8 positive cells in the stroma and the trend among stages was also significant (p = 0.044, Table 3). No significant associations of ABCD4 or ABCC8 protein expression or localization with the gender or age of the patients at the diagnosis, tumor extent (pT), lymph node (pN) or distant metastasis (cM), tumor grade, and resection margins have been observed. Other histopathological parameters (perineural or endolymphatic propagation, or angioinvasion) also did not associate with ABC transporters' expression and localization (p > 0.05, Tables 2 and 3). TAP1 transporter did not associate with any clinical parameter, including the stage (p > 0.05, Table 4).

The median PFS and OS of all patients were 18 and 26 months, respectively. First, we performed a univariate analysis of survival functions in groups of patients divided by membranous staining localization (apical versus basal) or cytoplasmic or membranous immunohistochemistry staining (positive versus negative). No significant association was found. We then followed the staining intensity (weak versus moderate or strong). The analysis revealed, that patients with moderate or strong cytoplasmic ABCC8 staining intensity had significantly poorer PFS than patients with weak intensity (p = 0.009, Fig. 5A). This association was even stronger in the multivariate Cox regression adjusted for lymph node involvement where the hazard ratio (HR) for ABCC8 moderate or strong staining intensity was 3.5 with a 95 % confidence interval (CI) 1.58–7.69 (p = 0.002). The univariate association with OS was not significant (p = 0.087, Fig. 5B). The expression or localization of the rest of the transporters was not prognostic (p > 0.05, Fig. 5C–F).

We then stratified patients according to the administered adjuvant chemotherapy to subgroups treated vs. untreated. The treatment administration did not associate with the PFS or OS (p = 0.364 and p = 0.752, respectively). Patients from the treated group (n = 31, three patients excluded due to perioperative mortality) with moderate or strong cytoplasmic ABCC8 staining had significantly poorer PFS (p = 0.029), while this was not true for patients in the untreated subgroup (n = 17, four patients excluded due to inconsistent staining; p > 0.05).

4. Discussion

Based on the previously observed associations of the transcript level of the less frequently studied ABCD4, TAP1, CFTR, and ABCC8

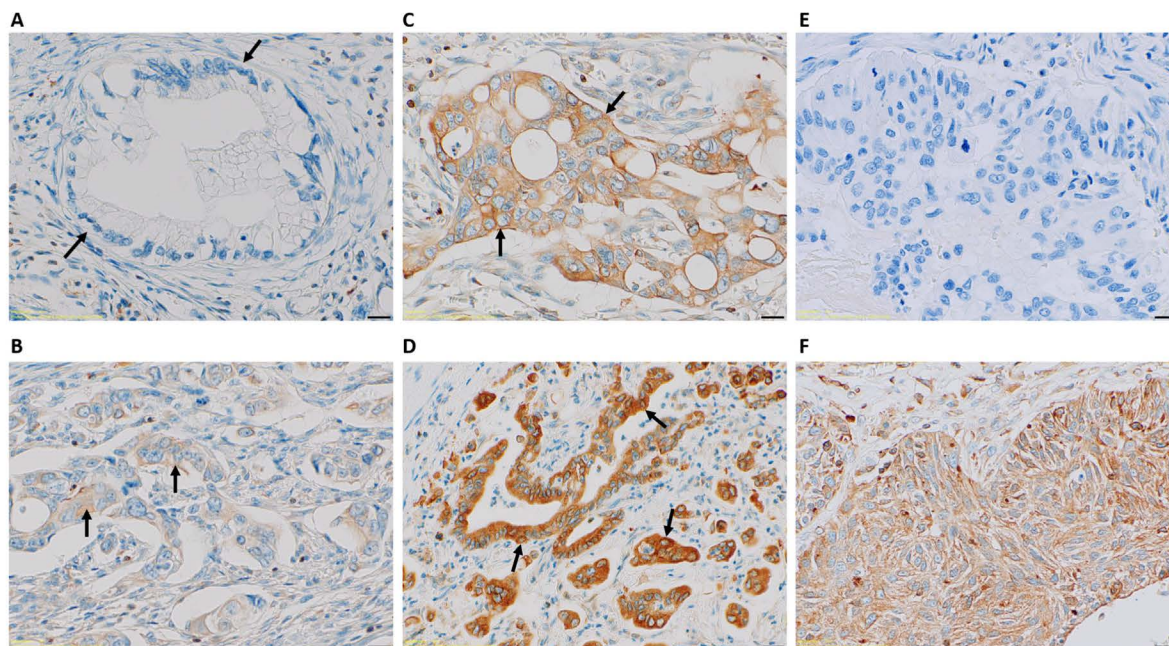


Fig. 1. Images of immunohistochemical staining of TAP1. Examples of (A) negative, (B) weak, (C) moderate, and (D) strong cytoplasmic positivity of tumor cells are highlighted by arrows. (E) Represents negative (tumor tissue) and (F) positive (lung carcinoma) controls. Magnification 40x, scale bar 20 μ m.

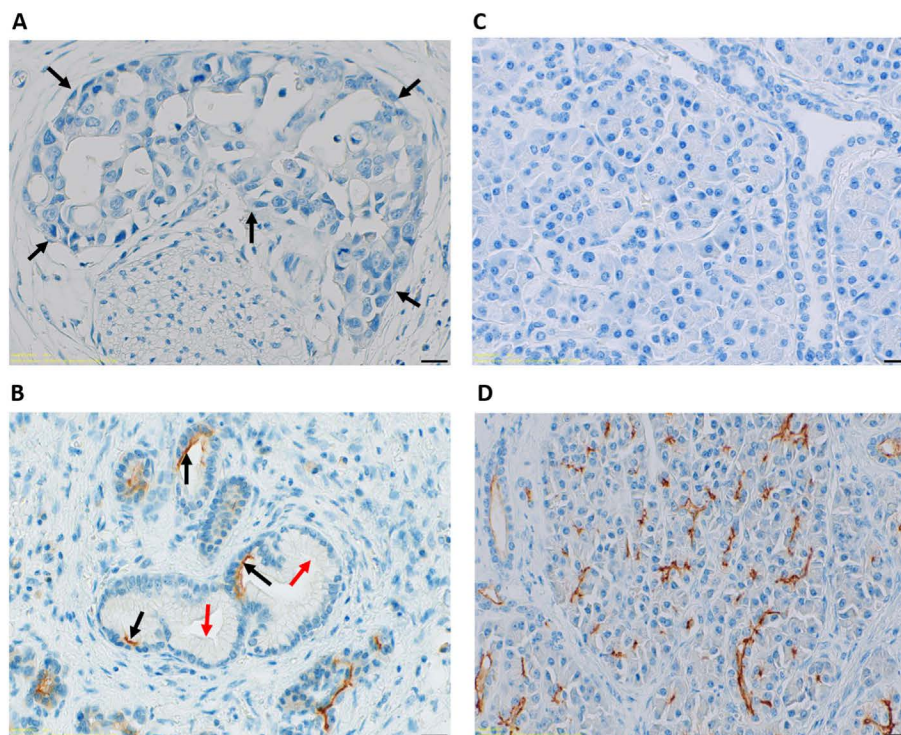


Fig. 2. Images of immunohistochemical staining of CFTR. Examples of (A) negative staining of tumor cells (black arrows), (B) the process of loss of protein expression: intercalated duct cells with apical membrane staining (black arrows) and negative dysplastic cells (red arrows), (C) negative (pancreatic tissue), and (D) positive (pancreatic tissue) controls. Magnification 40x, scale bar 20 μ m.

membrane transporters with the survival of PDAC patients [3,7], we attempted to replicate the prognostic significance on protein level by immunohistochemistry in a larger and independent patient cohort from a single center.

The main results indicate for the first time that patients with

PDAC cells having moderate or strong cytoplasmic ABCC8 staining intensity have a 3.5 times higher risk of disease relapse than patients with weak intensity. The suggested connection between ABCC8 and the prognosis of patients was corroborated by the fact that patients with advanced stage III or IV diseases had small or

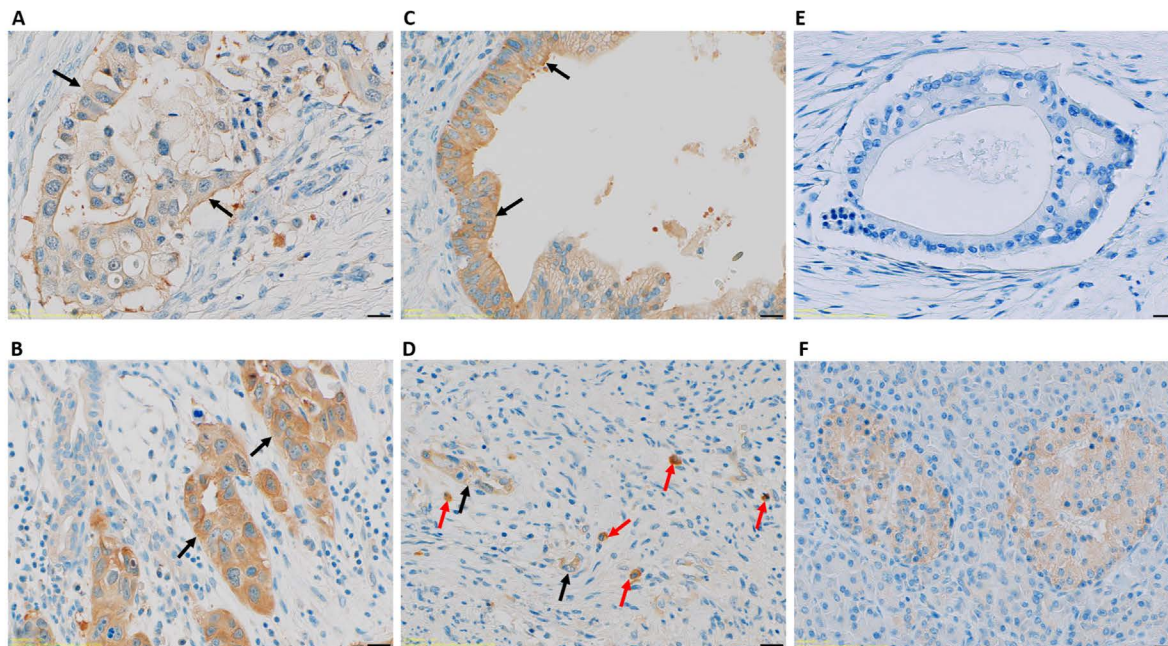


Fig. 3. Images of immunohistochemical staining of ABCC8. Examples of (A) weak and (B) strong cytoplasmic staining of tumor cells (black arrows), (C) weak apical membranous staining of tumor cells (black arrows), (D) strong positive cells (red arrows) around tumor tubules (black arrows), (E) negative (tumor tissue), and (F) positive (Langerhans islet of the pancreas) controls. Magnification 40x, scale bar 20 μm.

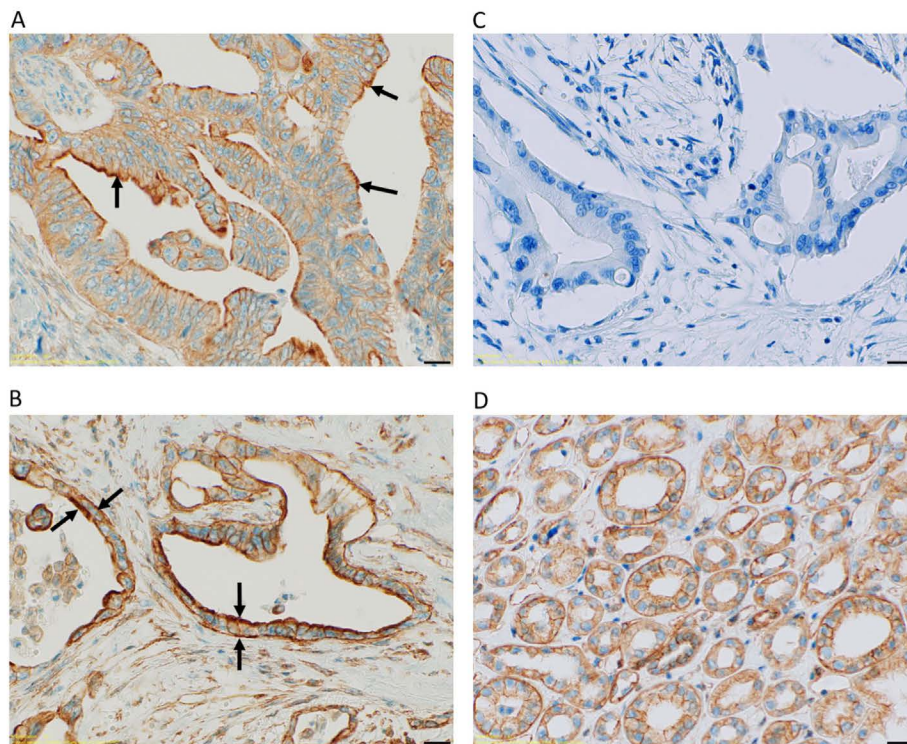


Fig. 4. Images of immunohistochemical staining of ABCD4. Examples of (A) strong apical (black arrows), (B) strong apical and basal membranous positivity of tumor cells (black arrows), (C) negative (tumor tissue), and (D) positive (kidney medulla) controls. Magnification 40x, scale bar 20 μm.

moderate counts of isolated ABCC8-positive cells in the stroma surrounding tumor tubules while no such cells were found in the vast majority of patients with less advanced stage I or II. This observation leads us to a hypothesis that ABCC8 expression may be

connected with disease progression. A recent report indicating that ABCC8-expressing cancer cells can induce the transformation of regular into cancer-associated fibroblasts (CAFs) in the tumor microenvironment and promote the progression of non-small cell

Table 2
Association of membranous ABCD4 staining with clinical characteristics.

Parameter	ABCD4 - cytoplasmic staining ^a			ABCD4 - membranous staining ^a		
	negative	positive	p-value ^b	negative	positive	p-value ^b
Age (mean)	64.2 (n = 8)	65.1 (n = 51)	0.768 ^c	64.7 (n = 4)	65.0 (n = 55)	0.949 ^c
Gender						
Male	5	25	0.478	4	26	0.112
Female	3	26		0	29	
Tumor extent (pT)						
pT1	2	7	0.657	0	9	0.157
pT2	4	21		0	25	
pT3	2	17		2	17	
pT4	0	5		1	4	
Lymph node involvement (pN)						
pN0	4	21	0.781	2	23	0.917
pN1	3	22		2	23	
pN2	0	2		0	2	
Distant metastasis (cM)						
cM0	6	48	0.102	3	51	0.139
cM1	1	1		1	1	
Stage						
SI	4	11	0.234	0	15	0.022
SII	3	32		1	34	
SIII/SIV	1	7		2	6	
Grade						
G1	5	21	0.453	2	24	0.769
G2	3	21		2	22	
G3	0	6		0	6	
Resection margins (R)						
Negative (R0)	7	43	0.816	2	48	0.106
Positive (R1)	1	8		2	7	

Footnotes:

^a Numbers of patients with negative or positive ABCD4 staining in tumor cells.

^b p-value by the Pearson's chi squared test.

^c p-value by the Mann-Whitney test.

Table 3
Association of ABCC8 cytoplasmic staining or counts of isolated ABCC8 positive cells in the tumor stroma with clinical characteristics.

Parameter	ABCC8 - cytoplasmic staining ^a			ABCC8 - Positive cells in tumor stroma ^a		
	weak	moderate/strong	p-value ^b	none	small/moderate counts	p-value ^b
Age (mean)	66.4 (n = 28)	64.1 (n = 28)	0.242 ^c	66.4 (n = 28)	64.1 (n = 28)	0.242 ^c
Gender						
Male	13	14	0.789	14	13	0.432
Female	15	14		12	17	
Tumor extent (pT)						
pT1	5	2	0.560	4	3	0.197
pT2	10	13		14	9	
pT3	11	9		7	13	
pT4	2	3		1	4	
Lymph node involvement (pN)						
pN0	13	12	0.364	15	10	0.157
pN1	11	11		9	13	
pN2	0	2		0	2	
Distant metastasis (cM)						
cM0	25	26	0.173	25	26	0.978
cM1	0	2		1	1	
Stage						
SI	9	6	0.337	11	4	0.044
SII	17	15		13	19	
SIII/SIV	2	6		2	6	
Grade						
G1	16	10	0.206	12	14	0.950
G2	11	12		11	12	
G3	1	4		2	3	
Resection margins (R)						
Negative (R0)	23	24	0.716	23	24	0.313
Positive (R1)	5	4		3	6	

Footnotes:

^a Numbers of patients with weak or moderate/strong ABCC8 staining in tumor cells or none versus small/moderate counts of ABCC8 positive cells in tumor stroma.

^b p-value by the Pearson's chi squared test.

^c p-value by the Mann-Whitney test.

Table 4
Association of cytoplasmic TAP1 staining with clinical characteristics.

Parameter	TAP1 - cytoplasmic staining ^a		p-value ^b
	negative	weak to strong	
Age (mean)	65.8 (n = 15)	65.1 (n = 45)	0.773 ^c
Gender			
Male	9	22	0.456
Female	6	23	
Tumor extent (pT)			
pT1	3	6	0.861
pT2	5	19	
pT3	6	15	
pT4	1	4	
Lymph node involvement (pN)			
pN0	7	18	0.670
pN1	6	19	
pN2	0	2	
Distant metastasis (cM)			
cM0	12	43	0.351
cM1	1	1	
Stage			
SI	5	10	0.708
SII	8	28	
SIII/SIV	2	6	
Grade			
G1	9	18	0.196
G2	3	21	
G3	2	4	
Resection margins (R)			
Negative (R0)	12	39	0.531
Positive (R1)	3	6	

Footnotes:

^a Numbers of patients with positive (weak to strong) or negative cytoplasmic TAP1 staining in tumor cells.

^b p-value by the Pearson's chi squared test.

^c p-value by the Mann-Whitney test.

lung carcinomas [19] further substantiates this hypothesis. Assuming that tumor stroma contains many different types of cells, e.g., blood and lymphatic, endothelial, immune, and mesenchymal cells, including mesenchymal stem cells, CAFs, and pericytes [20,21], we suggest that a more detailed follow-up study should be focused on the identification of the origin of ABCC8-positive isolated cells.

ABCC8 is expressed in many human tissues and, together with other KATP channels, regulates, e.g., vascular tone, memory, learning, cardiac, and neuronal functions [15]. According to the Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org), it is predominantly localized in the cytoplasm, which well corresponds with our results. Specifically, in pancreatic β -cells, KATP channels provide indirect sensing of blood glucose concentration and gate insulin secretion [22]. Despite ABCC8 being connected with diabetes [16], which is both a risk factor and consequence of pancreatic cancer [17], its expression or gene alterations were not yet associated with PDAC prognosis or therapy outcome. It is also intriguing that insulinomas (rare neuroendocrine tumors of pancreatic islets), which manifest with hypersecretion of insulin and the resulting hypoglycemia, have ABCC8 protein overexpression compared to normal pancreatic islets [23]. More importantly, insulin was shown to promote the invasion and migration of transformed KRAS mutant human pancreatic ductal cells in vitro through activation of the key oncogenic PI3K/AKT and MAPK pathways [24]. Only one study suggested a link between ABCC8 transcript expression and the development and prognosis of pancreatic neuroendocrine tumors [25]. Additionally, the ABCC8 gene is part of a 12-gene expression signature recently suggested as a prognostic scoring model in serous ovarian carcinoma [26], and other works connected its transcript expression also with prognosis and

chemosensitivity of glioma [27] and breast carcinoma [28]. Thus, our report extends current knowledge to PDAC prognosis. We may hypothesize that ABCC8 overexpression may be a critical sign of progressing PDAC cells resulting in the worsened patient prognosis. It would be extremely interesting to analyze metastatic loci of PDAC in the liver or lungs. However, such samples are not readily available due to the dismal character of the disease. Further research should be focused on the interplay between ABCC8 and insulin secretion and its role in PDAC prognosis.

The present study also demonstrates that patients with advanced stage III or IV significantly more often lack ABCD4 in tumor cell membranes. This result would imply that patients without ABCD4 expression also have a poor prognosis as generally patients with advanced stages live shorter. However, survival analyses disproved this assumption because none of the evaluated ABCD4 characteristics were significantly associated with PFS or OS. No other clinical parameter was associated with ABCD4 expression or localization. As regards expression intensity and pattern, it is evident that ABCD4 is expressed in both the membrane and cytoplasm of tumor cells and that the expression in basal orientation is quite a rare event. The expression in apical orientation is more frequent but has no clinical meaning. ABCD4 is a less-studied member of the D subfamily of ABC transporters providing intracellular translocation of vitamin B12 from the lysosomal lumen to the cytosol. Its defect causes X-linked adrenoleukodystrophy and cobalamin deficiency [29,30], and its link to patient prognosis was mentioned in colorectal [31] and pancreatic [7] cancers. Recently, ABCD4 was also reported to participate in the doublecortin-like kinase1 (DCLK1) mediated cisplatin resistance in non-small cell lung cancer in vitro [32]. Nevertheless, according to our results, ABCD4 does not contribute to the progression of PDAC and has no prognostic value.

Although we detected unambiguous cytoplasmic expression of TAP1 protein in the majority of PDACs, it had no prognostic value for the patients. TAP1 (and TAP2) are very interesting transporters because they constitute the antigen (including cancer-associated) presenting machinery and became broadly discussed in connection with immunotherapy [8]. Despite, we report negative observations for TAP1 in terms of prognosis, both proteins still may be useful for the prediction of immunotherapy outcomes. It is worth mentioning, however, that clinical trials using the most prominent types of immunotherapies failed in PDAC [33]. Thus, we conclude that TAP1's role in this regard, if any, seems to be cancer type-specific.

Finally, yet importantly, we show that the CFTR expression is virtually absent in both the cytoplasm and membrane of PDAC cells. Mutations in the ABCC7 gene encoding CFTR are responsible for cystic fibrosis, intestinal and pulmonary dysfunctions, and mainly pancreatitis [13], which is a suspected precancerous condition of PDAC. From this perspective, the lack of CFTR production in PDAC observed by us confirms the overall tumor suppressor role of CFTR in gastrointestinal malignancies demonstrated by epidemiological surveys of cystic fibrosis patients [14] or ABCC7 gene mutations in PDAC patients [34]. Nevertheless, our observation of null expression in all PDACs is unique in the literature and calls for further studies on its utilization in personalized oncology. After the revelation of the exact mechanism of CFTR silencing, the potential utilization of this phenomenon may be further elaborated.

We acknowledge the following limitations of our study. First, the modest sample size may decrease the study's appeal. The low resectability rate (<20 %) and a rather high drop-out of patients from the study due to the very dismal character of the disease preclude the collection of larger series of patients with available clinical follow-up. Moreover, the sample dropout during re-evaluation of tissue blocks (some had low content of tumor cells

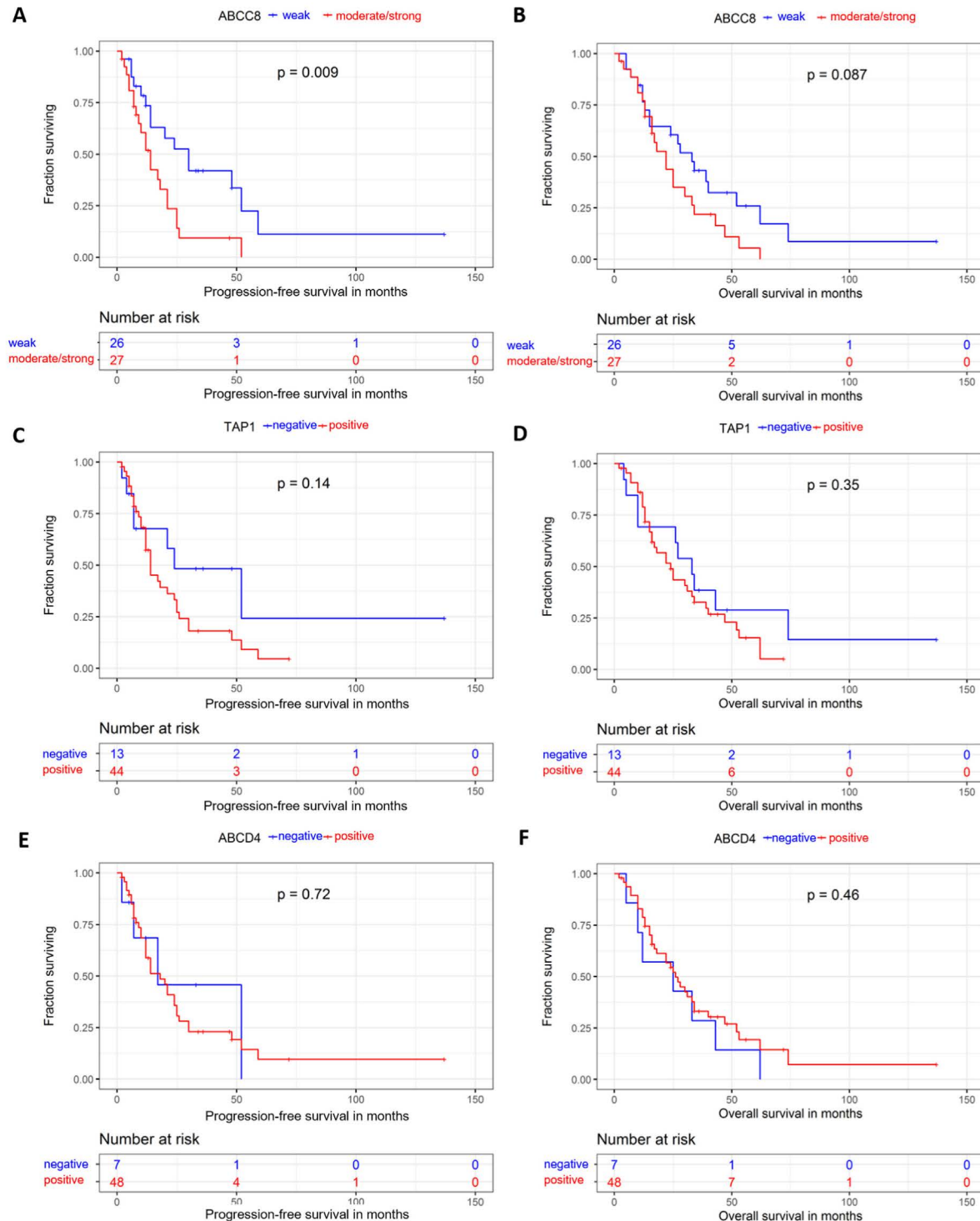


Fig. 5. Kaplan-Meier survival functions of PDAC patients stratified by the ABCC8 (A – PFS, B - OS), TAP1 (C – PFS, D - OS), and ABCD4 (E – PFS, F - OS) cytoplasmic staining. For ABCC8 weak versus moderate or strong staining categories were used. For TAP1 no staining versus weak, moderate, or strong staining categories were used. For ABCD4 no staining versus weak staining categories were used.

or were spent by previous diagnostic and research procedures) and the lack of follow-up data for some patients, precluded obtaining a larger sample size. Second, despite several systems of evaluation of protein expression and topology in tumor cells being published, their use in less-studied proteins remains challenging. For robust assessment of the relevance of candidate ABCs for PDAC prognosis,

we have chosen both qualitative and semi-quantitative measures enabling us to report a unique dataset. Briefly, due to the heterogeneous cytoplasmic staining of TAP1, ABCC8, and ABCD4 proteins, we evaluated staining intensity in each analyzed tissue slide by comparing it with the positive control, which was present at each evaluated slide and with the internal positive control. We evaluated

all tumor cells in the sample of a minimum of 10 high power fields (HPF) at 40× lens magnification. The cytoplasmic staining intensity and presence of a signal in the apical membrane were assessed according to the prevailing pattern. On the other hand, this study has also clear advantages. All patients were recruited and followed by a single center and represented a homogeneous group. Moreover, the present study was driven by previous observations at the transcript level on patient groups collected by different centers, substantially increasing its power compared to purely exploratory studies, and eventual confirmation would strengthen the hypothesis-generating screens.

We attempted to validate our results with publicly available data. For ABCC8, we found medium protein expression for endocrine and exocrine glandular cells of the normal pancreas in the Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org). Out of 12 available pancreatic cancer tissues, one has high staining, five medium, four low, and two undetected statuses using the HPA042318 antibody. Data gained using another antibody (CAB011451) show three high, eight medium, and one undetected. No publicly available database provides immunohistochemistry protein data connected with prognostic coordinates of PDAC patients. For the TAP1, medium protein expression for endocrine and exocrine glandular cells of the normal pancreas and six pancreatic cancers with high and six with medium expression (CAB009516) are available. ABCD4 is low in endocrine and undetected in exocrine glandular cells of normal pancreas. Four cancers have medium, two low, and four undetected (HPA003396) protein levels. CFTR protein is expressed at a high level in the exocrine glandular and undetected in the endocrine cells of the normal pancreas. Using the HPA021939 antibody, tumors were classified as one with medium and one with low expression, while nine were undetected. Two other antibodies have shown eight undetected (HPA079652) and three with low and six undetected (CAB001951) tissue samples.

Taken together, we demonstrate for the first time the prognostic role of ABCC8 protein expression in PDAC and confirm previous indications obtained with targeted transcriptomics. This report should help in further clarification of the clinical roles of rarely studied genes and proteins in cancer.

Author contributions

Conceptualization: B.M.D. and P.S.
 Methodology: L.C. and V.M.
 Data curation: R.P., V.L., and O.D.
 Investigation: L.C. and P.S.
 Visualization: L.C. and V.M.
 Validation: O.D. and R.P.
 Resources: V.L.
 Supervision: V.L. and P.S.
 Funding acquisition: B.M.D., V.L., and P.S.
 Project administration: P.S. and V.L.
 Writing – original draft: L.C. and P.S.
 Writing – review & editing, L.C., R.P., V.M., V.L., O.D., B.M.D., and P.S.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data availability statement

All data generated or analyzed during this study are included in this published article. Stained slides of all samples are available upon reasonable request to the corresponding author (P.S.).

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Acknowledgements

This research was funded by the Czech Medical Council, project no.: NV19-03-00097 (to B.M.D.), the National Institute for Cancer Research – NICR (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NP05102) - Funded by the European Union - Next Generation EU (to P.S.) and the Grant Agency of Charles University, program Cooperatio “Surgical Disciplines” no. 207043 (to V.L.).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.pan.2023.10.008>.

References







- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca - Cancer J Clin* 2021;71: 209–49.
- [2] Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 2014;74: 2913–21.
- [3] Mohelnikova-Duchonova B, Brynychova V, Oliverius M, Honsova E, Kala Z, Muckova K, et al. Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and non-neoplastic tissues. *Pancreas* 2013;42: 707–16.
- [4] Mohelnikova-Duchonova B, Brynychova V, Hlavac V, Kocik M, Oliverius M, Hlavsa J, et al. The association between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;72:669–82.
- [5] Soucek P, Mohelnikova-Duchonova B, Brynychova V, Hlavac V, Oliverius M, Honsova E, et al. Biotransformation genes as prognostic markers in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Mol Med* 2013;32:S46.
- [6] Cervenková L, Vycital O, Bruha J, Rosendorf J, Palek R, Liska V, et al. Protein expression of ABCC2 and SLC22A3 associates with prognosis of pancreatic adenocarcinoma. *Sci Rep* 2019;9:19782.
- [7] Dvorak P, Hlavac V, Mohelnikova-Duchonova B, Liska V, Pesta M, Soucek P. Downregulation of ABC transporters in non-neoplastic tissues confers better prognosis for pancreatic and colorectal cancer patients. *J Cancer* 2017;8: 1959–71.
- [8] Mantel I, Sadiq BA, Blander JM. Spotlight on TAP and its vital role in antigen presentation and cross-presentation. *Mol Immunol* 2022;142:105–19.
- [9] Tabassum A, Samdani MN, Dhali TC, Alam R, Ahammad F, Samad A, Karpiński TM. Transporter associated with antigen processing 1 (TAP1) expression and prognostic analysis in breast, lung, liver, and ovarian cancer. *J Mol Med (Berl)* 2021;99:1293–309.
- [10] Tu Z, Li K, Ji Q, Huang Y, Lv S, Li J, Wu L, Huang K, Zhu X. Pan-cancer analysis: predictive role of TAP1 in cancer prognosis and response to immunotherapy. *BMC Cancer* 2023;23:133.
- [11] Li B, Feng Y, Hou Q, Fu Y, Luo Y. Antigen peptide transporter 1 (TAP1) promotes resistance to MEK inhibitors in pancreatic cancers. *Int J Mol Sci* 2022;23:7168.
- [12] Saint-Criq V, Gray MA. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:93–115.
- [13] Hegyi P, Seidler U, Kunzelmann K. CFTR-beyond the airways: recent findings on the role of the CFTR channel in the pancreas, the intestine and the kidneys. *J Cyst Fibros* 2023;22(Suppl 1):S17–22.
- [14] Maisonneuve P, Marshall BC, Knapp EA, Lowenfels AB. Cancer risk in cystic fibrosis: a 20-year nationwide study from the United States. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:122–9.
- [15] Martin GM, Patton BL, Shyng SL. KATP channels in focus: progress toward a structural understanding of ligand regulation. *Curr Opin Struct Biol* 2023;79: 102541.
- [16] Patch AM, Flanagan SE, Boustred C, Hattersley AT, Ellard S. Mutations in the ABCC8 gene encoding the SUR1 subunit of the KATP channel cause transient neonatal diabetes, permanent neonatal diabetes or permanent diabetes diagnosed outside the neonatal period. *Diabetes Obes Metabol* 2007;9(Suppl 2):28–39.
- [17] Li Y, Bian X, Wei S, He M, Yang Y. The relationship between pancreatic cancer

- and type 2 diabetes: cause and consequence. *Cancer Manag Res* 2019;11:8257–68.
- [18] Kawaguchi K, Okamoto T, Morita M, Imanaka T. Translocation of the ABC transporter ABCD4 from the endoplasmic reticulum to lysosomes requires the escort protein LMBD1. *Sci Rep* 2016;6:30183.
- [19] Chen H, Zhao L, Meng Y, Qian X, Fan Y, Zhang Q, et al. Sulfonylurea receptor 1-expressing cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to promote non-small cell lung cancer progression. *Cancer Lett* 2022;536:215611.
- [20] Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2015;15:669–82.
- [21] Sperb N, Tsesmelis M, Wirth T. Crosstalk between tumor and stromal cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Mol Sci* 2020;21:5486.
- [22] Pipatpolkai T, Usher S, Stansfeld PJ, Ashcroft FM. New insights into KATP channel gene mutations and neonatal diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2020;16:378–93.
- [23] Li CJ, Zhou HL, Li J, Yao HT, Su R, Li WP. Roles of sulfonylurea receptor 1 and multidrug resistance protein 1 in modulating insulin secretion in human insulinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2011;10:88–94.
- [24] Wang G, Yin L, Peng Y, Gao Y, Gao H, Zhang J, et al. Insulin promotes invasion and migration of KRASG12D mutant HPNE cells by upregulating MMP-2 gelatinolytic activity via ERK- and PI3K-dependent signalling. *Cell Prolif* 2019;52:e12575.
- [25] Xiao Y, Yang Y, Wang Y, Li X, Wang W. Five novel genes related to the pathogenesis and progression of pancreatic neuroendocrine tumors by bioinformatics analysis with RT-qPCR verification. *Front Neurosci* 2019;13:937.
- [26] Xiang J, Su R, Wu S, Zhou L. Construction of a prognostic signature for serous ovarian cancer based on lactate metabolism-related genes. *Front Oncol* 2022;12:967342.
- [27] Zhou K, Liu Y, Zhao Z, Wang Y, Huang L, Chai R, et al. ABCC8 mRNA expression is an independent prognostic factor for glioma and can predict chemosensitivity. *Sci Rep* 2020;10:12682.
- [28] Hlaváč V, Brynychová V, Václavíková R, Ehrlichová M, Vrána D, Pecha V, et al. The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics* 2013;14:515–29.
- [29] Kawaguchi K, Imanaka T. Substrate specificity and the direction of transport in the ABC transporters ABCD1–3 and ABCD4. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2022;70:533–9.
- [30] Szakacs G, Abele R. An inventory of lysosomal ABC transporters. *FEBS Lett* 2020;594:3965–85.
- [31] Hlavata J, Mohelnikova-Duchonova B, Vaclavikova R, Liska V, Pitule P, Novak P, et al. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* 2012;27:187–96.
- [32] Panneerselvam J, Mohandoss P, Patel R, Gillan H, Li M, Kumar K, et al. DCLK1 regulates tumor stemness and cisplatin resistance in non-small cell lung cancer via ABCD-member-4. *Mol Ther Oncolytics* 2020;18:24–36.
- [33] Tieniber AD, Perez JE, Hanna AN, DeMatteo RP. Immunotherapy for GI malignancies, ready for prime time? *Ann Surg Oncol* 2023;30:1787–93.
- [34] Cazacu IM, Farkas N, Garami A, Balaskó M, Mosdósi B, Alizadeh H, et al. Pancreatitis-associated genes and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Pancreas* 2018;47:1078–86.

Příloha č. III: T a B lymfocyty ve vnitřním invazivním okraji hepatocelulárního karcinomu po resekci souvisí s příznivou prognózou

Article

T- and B-Cells in the Inner Invasive Margin of Hepatocellular Carcinoma after Resection Associate with Favorable Prognosis

Andriy Trailin ^{1,*}, Lenka Červenková ^{2,3}, Filip Ambrozkiewicz ¹, Esraa Ali ¹, Phanindra Kasi ⁴, Richard Pálek ^{2,5}, Petr Hošek ², Vladislav Třeška ⁵, Ondrej Daum ^{6,7}, Zbyněk Tonar ^{8,9}, Václav Liška ^{2,5} and Kari Hemminki ^{1,10}

- ¹ Laboratory of Translational Cancer Genomics, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Alej Svobody 1665/76, 32300 Pilsen, Czech Republic; filip.ambrozkiewicz@lfp.cuni.cz (F.A.); esraa.ali@lfp.cuni.cz (E.A.); kari.hemminki@lfp.cuni.cz (K.H.)
 - ² Laboratory of Cancer Treatment and Tissue Regeneration, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Alej Svobody 1665/76, 32300 Pilsen, Czech Republic; lenka.cervenkova@lfp.cuni.cz (L.Č.); palekr@fnplzen.cz (R.P.); petr.hosek@lfp.cuni.cz (P.H.); liskav@fnplzen.cz (V.L.)
 - ³ Department of Pathology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Ruská 87, 10000 Prague, Czech Republic
 - ⁴ Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Karlovarská 48, 30166 Pilsen, Czech Republic; phanindra.kasi@lfp.cuni.cz
 - ⁵ Department of Surgery and Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Alej Svobody 80, 32300 Pilsen, Czech Republic; treska@fnplzen.cz
 - ⁶ Sikl's Institute of Pathology, Faculty of Medicine and Teaching Hospital in Plzen, Charles University, ul. Dr. E. Beneše 13, 30599 Pilsen, Czech Republic; daum@fnplzen.cz
 - ⁷ Biopstická Laboratoř s.r.o., Mikulášské Nám. 4, 32600 Pilsen, Czech Republic
 - ⁸ Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Karlovarská 48, 30166 Pilsen, Czech Republic; zbynek.tonar@lfp.cuni.cz
 - ⁹ Laboratory of Quantitative Histology, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Alej Svobody 1665/76, 32300 Pilsen, Czech Republic
 - ¹⁰ Department of Cancer Epidemiology, German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany
- * Correspondence: andriy.trailin@lfp.cuni.cz; Tel.: +420-377-593-862



Citation: Trailin, A.; Červenková, L.; Ambrozkiewicz, F.; Ali, E.; Kasi, P.; Pálek, R.; Hošek, P.; Třeška, V.; Daum, O.; Tonar, Z.; et al. T- and B-Cells in the Inner Invasive Margin of Hepatocellular Carcinoma after Resection Associate with Favorable Prognosis. *Cancers* **2022**, *14*, 604. <https://doi.org/10.3390/cancers14030604>

Academic Editor: Matteo Donadon

Received: 29 December 2021

Accepted: 24 January 2022

Published: 25 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancers in the world, which frequently recurs after curative resection. Several options to predict recurrence of HCC have been proposed, however, their prognostic ability is limited. This study aimed to test the hypothesis that distribution and numbers of T- and B-lymphocytes in different regions of the resected tumor may have different prognostic significance. Different subregions of HCC demonstrated uneven lymphocyte infiltration. CD20+ B-lymphocytes and CD8+ T-lymphocytes, or their combination in the inner tumor invasive margin and inner/outer margin ratios, convey the best prediction for time to recurrence and disease-free survival. The results offer a novel approach to the stratification of the risk of early tumor recurrence after curative liver resection.

Abstract: In this retrospective study on 67 patients with hepatocellular carcinoma (HCC), after tumor resection, we evaluated the significance of CD3+ and CD8+ T-lymphocytes and CD20+ B-lymphocytes in tumor and non-tumor liver for time to recurrence (TTR), disease-free survival (DFS) and overall survival. After immunohistochemical staining, the density of nucleated lymphocyte profiles (Q_A) was estimated stereologically in the tumor center (TC), inner margin (inn M), outer margin (out M), peritumor and non-tumor liver. In TC, intermediate and high Q_A of CD8+ cells predicted longer TTR, whereas CD3+ and CD20+ were predictive only at high Q_A . DFS was predicted by high Q_A of CD3+, CD8+ and CD20+ cells in TC. The inn M harbored smaller Q_A of CD3+, CD8+ and CD20+ lymphocytes than out M. In contrast to out M, high T-cells' Q_A and intermediate and high B-cell Q_A in inn M predicted longer TTR and DFS. High inn M/out M Q_A ratios of CD3+ and CD20+ cells were associated with longer TTR and DFS, whereas high inn M/out M Q_A ratio of CD8+ was predictive only for DFS. Patients with intermediate-high Q_A of combined CD8+ and CD20+ cells in inn M showed longer TTR and DFS, compared to CD8+-high or CD20+-high alone. Our findings highlight

overall heterogeneity of the tumor invasive margin, the importance of inn M, and the predictive role of B-cells.

Keywords: hepatocellular carcinoma; tumor-infiltrating lymphocytes; T-cells; B-cells; tumor invasive margin; stereology; heterogeneity; prognosis; time to recurrence; disease-free survival

1. Introduction

Liver cancer, which in 75–90% of cases is represented by hepatocellular carcinoma (HCC), ranked as the sixth most common cancer in the world in 2020 and is the third leading cause of cancer death worldwide [1]. It is estimated that more than 1 million people will suffer from liver cancer each year by 2025 [2]. Liver resection and transplantation are the main therapeutic modalities for the treatment of HCC [3].

Several options to predict recurrence of HCC have been proposed, including TNM staging, microvascular invasion, tumor multiplicity, serum α -fetoprotein level, satellitosis [4,5] or neutrophil-lymphocyte ratio (reviewed in Najjar et al. [6]). However, their prognostic ability is limited and non-standardized [7,8]. Patients diagnosed with the same stage of disease often have markedly different outcomes, which can be related to varying involvement of endogenous anti-tumor mechanisms [9]. Recently, considerable data from large cohorts of various tumors have demonstrated that the assessment of number, type, location and functional orientation of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), together termed the tumor immune microenvironment (TIME), could improve the prediction of clinical outcome [10].

For colorectal cancer, the Immunoscore, based on the quantification of CD3+ and CD8+ T-cells in the tumor center (TC) and in the advancing tumor margin (margin), has turned out to be a better predictor of patient survival than histopathological methods, TNM staging, lymphovascular invasion, tumor differentiation or microsatellite instability status [11]. Immunoscore was further confirmed to be beneficial for the prognosis of disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in many different cancers. However, the predictive role of infiltration by adaptive immune cells in patients with HCC, who underwent resection, remains less clear. A vast majority of studies evaluated only intra-tumor lymphocytes (reviewed in Ding et al. [12]), whereas tumor margin attracted less attention. At the same time, guidelines for the assessment of TILs in solid tumors recommend separate reporting of cell densities in TC and the invasive margin, and designate margin as a 1 mm region centered on the border separating the malignant cell nests from the host tissue [13]. Shi et al. in their study reported an uneven distribution and prognostic significance of margin-infiltrating lymphocytes on both sides of the tumor capsule [14]. This observation corresponded to the results of our pilot study, which showed the presence of a discernible capsule around tumor nests in the majority of patients and unbalanced distribution of immune cells through the margin [15]. Furthermore, contradictory data have often been reported regarding the prognostic value of a particular cell type in a single region of interest (ROI) or their combinations [12,16,17]. Although T-cells were recognized as the most important players within the adaptive immunity arm, several groups have reported inconsistent data on the prognostic impact of B-cells infiltrating the tumor and the invasive margin of HCC [12,14].

We therefore hypothesized that the heterogeneity of immune cell densities through the tumor invasive margin of HCC may confer different prognostic significance, and that the assessment of B-cells, besides T-cells, may improve prognostication of unfavorable outcomes after curative HCC resection. To test this hypothesis, we evaluated the significance of CD3+ and CD8+ T-cell and CD20+ B-cell infiltration in different regions of the tumor and non-tumor liver, with the emphasize on the tumor invasive margin, as individual or associated prognostic factors for time to recurrence (TTR), DFS and OS.

2. Results

2.1. Demographics of HCC Patients

The demographics and clinical characteristics of the patients are shown in Table S1. The median age of the patients was 69 years, and males accounted for 77.6%. Regarding the etiology of HCC, the most frequent background disease was chronic non-viral hepatitis with prevalence of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) (23.9%). Forty-six patients, thirteen patients, five patients and three patients were at TNM stages I, II, III and IV, respectively. Pathology characteristics of the resected tumors are presented in Table S2. Using the Edmondson–Steiner system, most of the tumors (70.1%) were histologically graded as G2. Predominant growth types were mixed (50.7%) and desmoplastic (46.3%). No evidence of extracellular matrix deposition at the tumor interface was observed in 1.5% cases, incomplete encapsulation of <50% and >50% interface was found in 13.4% and 38.8% cases, and complete encapsulation of interface in 46.3% of cases.

2.2. Outcomes

At the time of the last follow-up, 29 (41.8%) patients had tumor recurrence, and 38 (56.7%) patients had died. Using the Kaplan–Meier methodology, the recurrence-free proportion was 48.7%, and the estimated probability of DFS and OS were found to be 33.2% and 49.4% at 5 years, respectively (Table S3).

2.3. Distribution of Immune Cells in Different Regions of Interest (ROIs)

Both CD3+ and CD8+ T-cells populations displayed significantly greater density of nucleated cell profiles (Q_A) than CD20+ B-cells ($p < 0.001$) in each ROI (shown in Figure 1A). There was a gradient of Q_A of CD20+ B-cells, CD3+ and CD8+ T-cells between ROIs from the highest in peritumor (PT) liver through the margin to the lowest in TC (as it is demonstrated for CD20+ cells on Figure 2A). The outer margin displayed remarkably greater Q_A of all cell types in the vast majority of patients compared to the inner margin (shown in Figure 1B, $p < 0.001$). We thus decided to treat the inner and outer layers of the margin as distinct ROIs. Q_A of CD20+ ($p < 0.01$), CD3+ ($p < 0.001$) and CD8+ cells ($p < 0.001$) were smaller in TC compared with the inner margin; however, they did not differ significantly between the outer margin and PT liver ($p > 0.05$). In non-tumor (NT) liver, Q_A of CD20+ cells were greater compared with TC ($p < 0.01$), however Q_A of all cell types were smaller than in the margin and PT liver ($p < 0.05$) (shown in Figure 1A).

Q_A of CD3+, CD8+ and CD20+ cells were more than ten times smaller in the inner margin compared with the outer margin in 9%, 13%, and 46% of patients, respectively (shown in Figure S1).

2.4. Prognostic Values of Immune Cells

We analysed the associations between the Q_A of immune cells in each ROI and TTR, DFS and OS. None of the clinical, pathology or immunohistochemistry (IHC) variables correlated with OS. Among the clinical and pathology variables, younger age and higher TNM tumor stage were associated with greater risk of recurrence, whereas no variable was associated with DFS (Table S4).

Both intermediate and high Q_A of CD8+ cells in TC and of CD20+ cells in the inner margin (as it is depicted for CD20+ cells in Figure 3) were associated with low risk of recurrence (Table 1). Only high Q_A of CD3+ and CD20+ cells in TC, of CD3+ and CD8+ in the inner margin, as well as intermediate Q_A of CD20+ cells in PT liver, were associated with low risk of recurrence. These findings were confirmed in the Kaplan–Meier analysis (shown in Figure S2), which also showed a longer TTR in patients with high vs. intermediate Q_A of CD3+ and CD20+ cells in TC ($p = 0.047$ and $p = 0.023$, respectively) and inner margin ($p = 0.005$ and $p = 0.017$, respectively).

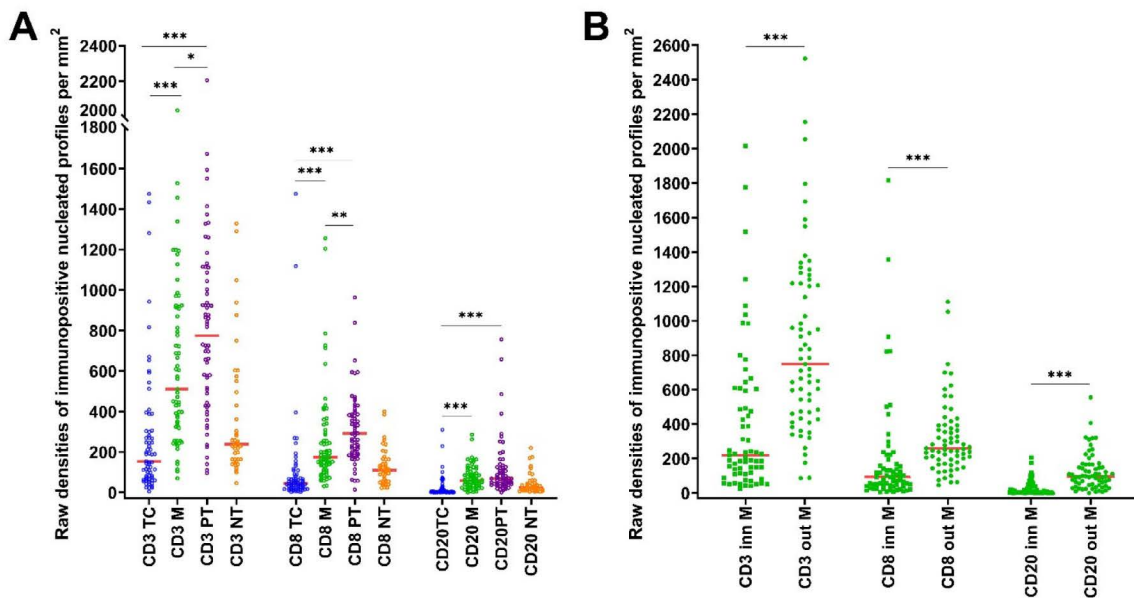


Figure 1. Statistics depicting the spatial distribution of nucleated profiles of CD3+, CD8+ and CD20+ tumor infiltrating lymphocytes per mm² of the section (Q_A) in the TC, M, PT liver and NT liver (A) and in the inner and outer tumor invasive margin (B). Red lines: median. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. Abbreviations: TC: tumor center, M: tumor invasive margin, inn M: inner invasive margin, out M: outer invasive margin, PT: peritumor liver, NT: non-tumor liver.

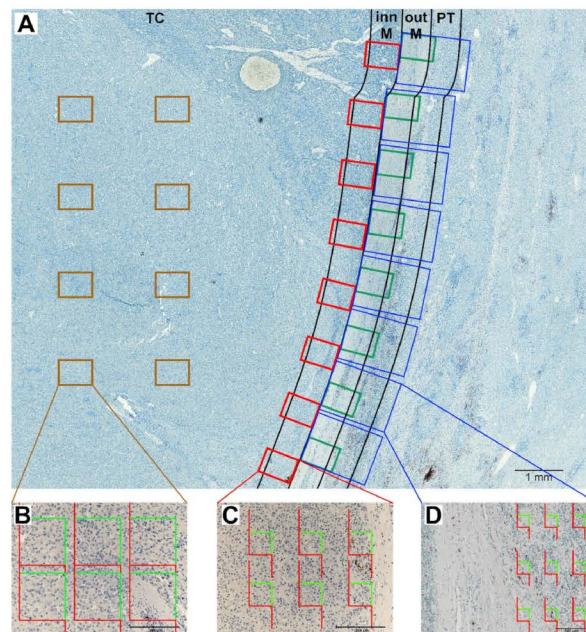


Figure 2. Immunoperoxidase staining for CD20+ lymphocytes in hepatocellular carcinoma. (A) Regions of interest (ROIs) are denoted: TC (tumor center), inn M (inner margin), out M (outer margin), PT (peritumor liver). The inn M and out M were defined as 500 μm on each side of the border separating the malignant cell nests and adjacent non-tumor tissue. The TC represented the remaining tumor area. The PT region was defined as the 500 μm thick region immediately adjacent to the out M. Eight equidistant fields of view (FOV) were taken from each ROI using systematic uniform random sampling. To sample TC, inn M and out M objective 20 \times was used, whereas objective 10 \times was used for PT region. This figure shows an example of low density of CD20+ nucleated cell profiles in the TC and inn M. (B–D) CD20+ nucleated cell profiles were counted using sets of unbiased counting frames. Examples of counting in single FOV in the TC with low density of CD20+ nucleated cell profiles (B), in the inn M (C), and in the PT liver (D). Scale bars 1000 μm (A), 200 μm (B–D).

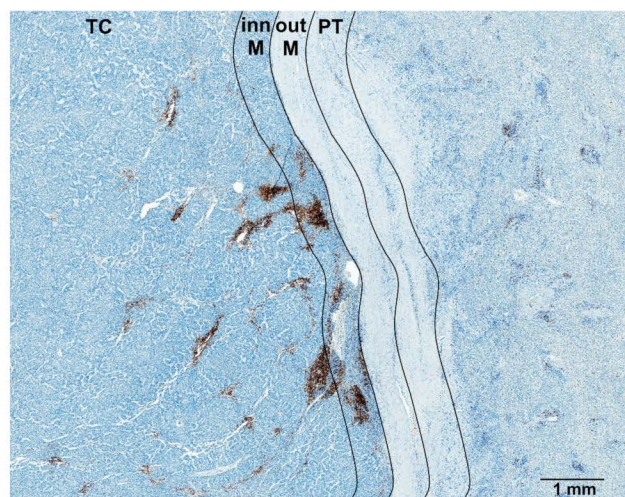


Figure 3. Immunoperoxidase staining for CD20+ lymphocytes in hepatocellular carcinoma that shows high density of CD20+ nucleated cell profiles (Q_A) in the tumor center and inner margin. Regions of interest (ROIs) are denoted: TC (tumor center), inn M (inner margin), out M (outer margin), PT (peritumor liver). Scale bar 1000 μ m.

Table 1. Densities of nucleated profiles of tumor infiltrating lymphocytes (Q_A) per individual ROI associated with time to recurrence and disease-free survival (univariable analysis).

Q_A		TTR			DFS		
		HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
Tumor Center							
CD3, <i>n</i> = 67 <i>p</i> = 0.030 *, 0.014 †	int vs. low	0.61	0.26–1.40	0.243	0.62	0.31–1.23	0.170
	high vs. low	0.20	0.06–0.66	0.008	0.28	0.12–0.66	0.003
CD8, <i>n</i> = 67 <i>p</i> = 0.010 *, 0.004 †	int vs. low	0.34	0.14–0.81	0.014	0.53	0.27–1.07	0.075
	high vs. low	0.25	0.09–0.70	0.008	0.23	0.09–0.55	0.001
CD20, <i>n</i> = 67 <i>p</i> = 0.031 *, 0.020 †	int vs. low	0.63	0.27–1.48	0.289	0.67	0.32–1.37	0.270
	high vs. low	0.18	0.05–0.65	0.009	0.27	0.11–0.69	0.006
Inner invasive margin							
CD3, <i>n</i> = 65 <i>p</i> = 0.014 *, 0.005 †	int vs. low	0.77	0.33–1.79	0.545	0.77	0.39–1.55	0.472
	high vs. low	0.14	0.04–0.54	0.004	0.24	0.09–0.59	0.002
CD8, <i>n</i> = 66 <i>p</i> = 0.029 *, 0.006 †	int vs. low	0.52	0.23–1.19	0.120	0.77	0.40–1.51	0.455
	high vs. low	0.23	0.08–0.69	0.009	0.22	0.09–0.57	0.002
CD20, <i>n</i> = 66 <i>p</i> = 0.002 *, <0.001 †	int vs. low	0.38	0.16–0.90	0.026	0.36	0.18–0.74	0.005
	high vs. low	0.09	0.02–0.36	0.001	0.13	0.05–0.35	<0.001
Outer invasive margin							
CD3, <i>n</i> = 65 <i>p</i> = 0.354 *, 0.280 †	int vs. low	0.66	0.26–1.65	0.371	0.58	0.27–1.23	0.153
	high vs. low	0.47	0.17–1.32	0.151	0.56	0.26–1.24	0.153
CD8, <i>n</i> = 66 <i>p</i> = 0.325 *, 0.061 †	int vs. low	0.55	0.22–1.37	0.197	0.48	0.23–0.98	0.044
	high vs. low	0.50	0.18–1.36	0.174	0.41	0.18–0.92	0.030
CD20, <i>n</i> = 66 <i>p</i> = 0.680 *, 0.475 †	int vs. low	0.99	0.40–2.44	0.986	0.99	0.49–2.00	0.974
	high vs. low	0.68	0.25–1.87	0.452	0.65	0.29–1.45	0.290
Peritumor liver							
CD3, <i>n</i> = 64 <i>p</i> = 0.418 *, 0.676 †	int vs. low	0.53	0.20–1.38	0.193	0.74	0.34–1.63	0.452
	high vs. low	0.78	0.30–2.04	0.608	0.95	0.42–2.14	0.902
CD8, <i>n</i> = 65 <i>p</i> = 0.753 *, 0.952 †	int vs. low	0.82	0.33–2.04	0.663	1.09	0.52–2.26	0.828
	high vs. low	1.15	0.43–3.04	0.780	1.14	0.50–2.62	0.757
CD20, <i>n</i> = 65 <i>p</i> = 0.014 *, 0.053 †	int vs. low	0.24	0.09–0.64	0.004	0.43	0.20–0.92	0.030
	high vs. low	0.72	0.30–1.71	0.452	0.86	0.40–1.84	0.699

For all cells and regions of interest, the raw densities of nucleated profiles of CD3+, CD8+ and CD20+ tumor infiltrating lymphocytes per area section (mm^2) were converted into percentiles and then categorized into low (0–25 percentile), intermediate (25–70 percentile) or high (70–100 percentile). Hazard ratios shows the relative risk compared with 1 for the low density. Bold values indicate statistical significance at the $p < 0.05$ level. * Type 3 Wald test *p* value for all 3 levels of cell densities for TTR. † Type 3 Wald test *p* value for all 3 levels of cell densities for DFS. Abbreviations: HR: hazard ratio; CI: confidence interval; TTR: time to recurrence; DFS: disease-free survival; int: intermediate.

Both intermediate and high Q_A of CD20+ cells in the inner margin and of CD8+ in the outer margin, high Q_A of CD3+, CD8+ and CD20+ cells in the TC, high Q_A of CD3+ and CD8+ cells in the inner margin, and intermediate Q_A of CD20+ cells in the PT liver were associated with longer DFS (Table 1). Kaplan–Meier analysis also demonstrated a longer DFS in patients with high vs. intermediate Q_A of CD3+, CD8+ and CD20+ cells in TC ($p = 0.040$, $p = 0.043$ and $p = 0.019$, respectively) and inner margin ($p = 0.004$, $p = 0.004$ and $p = 0.014$, respectively) (shown in Figure S3).

Combined intermediate-high versus low Q_A of CD8+ T-cells in the TC demonstrated associations with TTR (hazard ratio (HR) = 0.34, confidence interval (CI): 0.15–0.74, $p = 0.007$) and DFS (HR = 0.43, CI: 0.22–0.83, $p = 0.012$). Intermediate-high Q_A of CD20+ B-cells in the inner margin were also associated with TTR (HR = 0.26, CI: 0.11–0.61, $p = 0.002$) and DFS (HR = 0.27, CI: 0.13–0.54, $p < 0.001$).

To decrease the possible effects of the long duration of the study, we excluded three patents who were operated on before 2005. This gave us a cohort size of 64 patients and reduced the duration of the study to 15 years, with a median follow-up of 73 (95%CI: 40–106) months. The associations between the Q_A of immune cells in each ROI and TTR in terms of HRs and p -values (provided in Table S5) were very close to that obtained for the whole cohort for Q_A per individual region of interest (Table 1). As for clinical and pathology variables, association of age with TTR remained significant in the cohort of 64 patients, whereas the effect of the TNM stage was borderline (Table S6).

Intermediate and high Q_A of CD8+ cells in the entire margin were associated with lower risk or recurrence and longer DFS (Table S7). No cell type in the NT liver showed associations with TTR or DFS (Table S7).

We performed univariable Cox regression using ratios of Q_A of immune cells between different ROIs that were dichotomized at the median level (Table 2). Above-median Q_A ratio of CD20+ cells between inner and outer margins had the lowest HRs and p -values in predicting TTR and DFS. Above-median inner/outer margin Q_A ratio of CD3+ cells was associated with both longer TTR and DFS, whereas above-median Q_A ratio of CD8+ cells predicted only longer DFS. Our findings were confirmed in Kaplan–Meier analysis (shown in Figures S4 and S5).

Table 2. Ratios between densities of nucleated profiles of tumor infiltrating lymphocytes (Q_A) in two ROIs associated with time to recurrence and disease-free survival (univariable analysis).

	TTR			DFS		
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
CD3+ T cells						
Inn M/out M > 0.361 [†] , <i>n</i> = 65	0.36	0.16–0.85	0.019	0.45	0.24–0.86	0.016
TC/out M > 0.201, <i>n</i> = 65	0.41	0.18–0.92	0.031	0.56	0.31–1.02	0.057
TC/M > 0.330, <i>n</i> = 65	0.53	0.24–1.17	0.117	0.64	0.35–1.16	0.138
TC/PT > 0.219, <i>n</i> = 64	0.43	0.19–1.00	0.050	0.61	0.33–1.13	0.116
CD8+ T cells						
Inn M/out M > 0.349, <i>n</i> = 66	0.53	0.24–1.17	0.119	0.45	0.24–0.85	0.013
TC/out M > 0.166, <i>n</i> = 66	0.59	0.27–1.29	0.187	0.63	0.34–1.15	0.131
TC/M > 0.218, <i>n</i> = 66	0.76	0.36–1.62	0.478	0.85	0.47–1.54	0.598
TC/PT > 0.161, <i>n</i> = 65	0.41	0.18–0.93	0.032	0.42	0.22–0.81	0.010
CD20+ B cells						
Inn M/out M > 0.113, <i>n</i> = 66	0.28	0.12–0.65	0.003	0.29	0.15–0.57	<0.001
TC/out M > 0.051, <i>n</i> = 66	0.23	0.09–0.54	0.001	0.40	0.21–0.75	0.004
TC/M > 0.078, <i>n</i> = 66	0.24	0.10–0.57	0.001	0.41	0.22–0.76	0.005
TC/PT > 0.049, <i>n</i> = 65	0.27	0.12–0.65	0.003	0.49	0.27–0.90	0.022

For all cells and regions of interest the raw densities of nucleated profiles of CD3+, CD8+ and CD20+ tumor infiltrating lymphocytes per area section (mm^2) were dichotomized at the median value into lower-the-median and above-the-median values. Hazard ratios shows the relative risk compared with 1 for the lower-the-median group. Bold values indicate statistical significance at the $p < 0.05$ level. [†] Median. Abbreviations: HR: hazard ratio; CI: confidence interval; TTR: time to recurrence; DFS: disease-free survival; TC: tumor center; M: margin; inn M: inner invasive margin; out M: outer invasive margin; PT: peritumor liver; NT: non-tumor liver.

Multivariable Cox regression models for each immunohistochemical parameter adjusted for TNM staging and age were built to assess their independent ability to predict TTR (Table 3). Among the Q_A of individual cells, both intermediate and high CD8+ in TC were independently associated with TTR. Only high Q_A of CD3+ and CD20+ in TC and high Q_A of all cell types in the inner margin, as well as intermediate Q_A of CD20+ cells in PT liver, were also independently predictive of low risk of recurrence. Ratios of CD3+ and CD20+ Q_A between inner and outer margin and ratios of CD20+ Q_A between TC and outer margin or PT liver all retained significant associations with TTR.

Table 3. Multivariable Cox-regression for time to recurrence adjusted for age and TNM stage.

		TTR		
		HR	95% CI	<i>p</i>
Density of nucleated profiles of TIL (Q_A) per ROI				
CD3 TC †	int vs. low	0.78	0.32–1.96	0.601
<i>p</i> = 0.082 *	high vs. low	0.26	0.07–0.89	0.032
CD8 TC	int vs. low	0.34	0.14–0.81	0.014
<i>p</i> = 0.010 *	high vs. low	0.25	0.09–0.70	0.008
CD20 TC †	int vs. low	0.91	0.35–2.35	0.842
<i>p</i> = 0.017 *	high vs. low	0.18	0.05–0.64	0.008
CD3 inn M †	int vs. low	1.02	0.41–2.53	0.961
<i>p</i> = 0.014 *	high vs. low	0.16	0.04–0.62	0.008
CD8 inn M †	int vs. low	0.60	0.25–1.39	0.230
<i>p</i> = 0.065 *	high vs. low	0.26	0.09–0.81	0.020
CD20 inn M †	int vs. low	0.50	0.20–1.27	0.147
<i>p</i> = 0.004 *	high vs. low	0.10	0.03–0.39	0.001
CD20 PT †	int vs. low	0.24	0.09–0.66	0.005
<i>p</i> = 0.018 *	high vs. low	0.70	0.29–1.67	0.420
Ratios between densities of nucleated profiles of TIL (Q_A) in two ROIs				
CD3 inn M/out M ‡	above vs. under median (0.361)	0.35	0.15–0.81	0.015
CD3 TC/out M ‡	above vs. under median (0.201)	0.45	0.21–1.03	0.058
CD3 TC/PT ‡	above vs. under median (0.219)	0.48	0.21–1.13	0.093
CD8 TC/PT ‡	above vs. under median (0.161)	0.48	0.20–1.12	0.091
CD20 inn M/out M ‡	above vs. under median (0.113)	0.26	0.11–0.62	0.002
CD20 TC/out M ‡	above vs. under median (0.051)	0.21	0.09–0.51	0.001
CD20 TC/PT ‡	above vs. under median (0.049)	0.28	0.12–0.66	0.004

† For all cells and regions of interest, raw densities of nucleated profiles of CD3+, CD8+ and CD20+ tumor infiltrating lymphocytes per mm² (Q_A) were converted into percentiles and then categorized into low (0–25 percentile), intermediate (25–70 percentile) and high (70–100 percentile). ‡ for all cells and regions of interest raw densities of nucleated profiles of CD3+, CD8+ and CD20+ tumor infiltrating lymphocytes per mm² were dichotomized at the median level. TC: center of the tumor, M: tumor invasive margin, PT: peritumor liver, inn M: inner invasive margin, out M: outer invasive margin. Bold values indicate statistical significance at the *p* < 0.05 level. * Type 3 Wald test *p* value for all 3 levels of cell densities. Abbreviations: HR: hazard ratio; CI: confidence interval; ROI: region of interest; TTR: time to recurrence; TC: tumor center; inn M: inner invasive margin; out M: outer invasive margin; PT: peritumor liver; NT: non-tumor liver; TIL: tumor infiltrating lymphocytes.

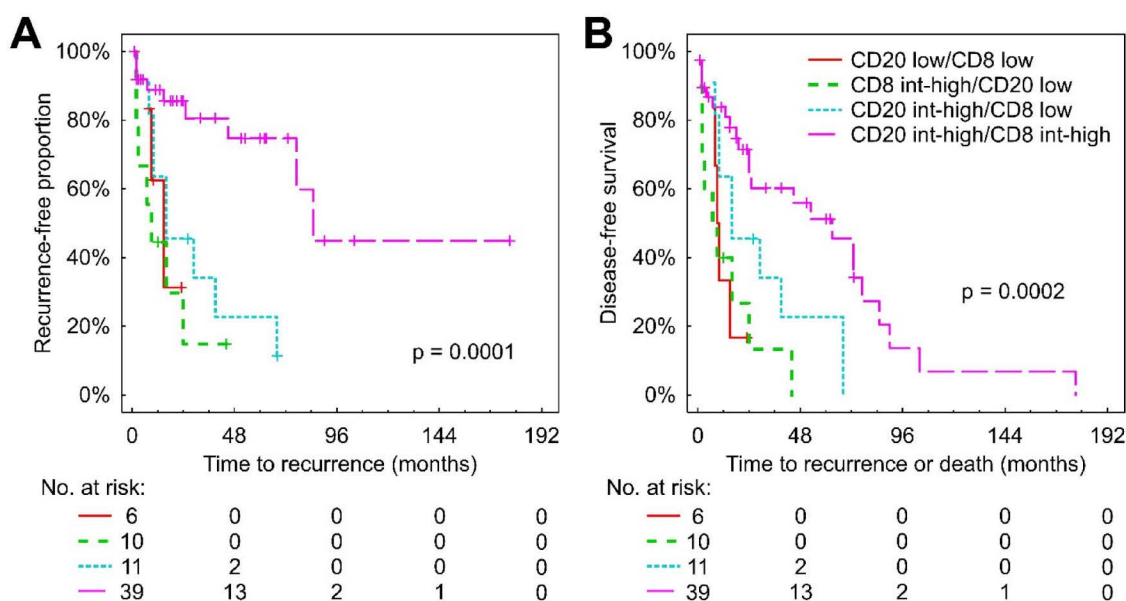


Figure 4. Kaplan–Meier analysis for TTR (A) and DFS (B) according to combined low vs. int-high densities of nucleated profiles of CD8+ and CD20+ lymphocytes in the inner margin. Abbreviations: int: intermediate.

2.5. Association between Subtypes of Immune Cells and Clinical and Pathology Variables

For all cell types, the strongest correlations were observed between their Q_A in TC and inner margin (Table S8). For each cell type, the inner/outer margin Q_A ratio correlated with respective cell Q_A in the TC: $\rho = 0.50$ for CD3+, $\rho = 0.63$ for CD8+ and $\rho = 0.47$ for CD20+ cells ($p < 0.001$).

Q_A of CD3+, CD8+ and CD20+ cells correlated between each other within each ROI (Table S9).

Table S10 shows correlations of Q_A of CD3+, CD8+ and CD20+ cells with clinical and pathology variables. High Q_A of CD3+, CD8+ and CD20+ cells in TC and high Q_A of CD3+ and CD8+ cells in the inner margin were observed in less differentiated tumors since they correlated with greater Edmondson–Steiner grading score and nuclear grades. High amounts of stroma inside tumor nests correlated with high Q_A of CD3+, CD8+ and CD20+ cells in TC and high Q_A of CD3+ and CD8+ cells in the inner margin, indicating stromal localization of TIL. Inner/outer margin Q_A ratios of T- and B-cells did not correlate with any clinical or pathology variables, including the extent of tumor encapsulation (data not shown).

Q_A of immune cells in the PT liver did not correlate with any of the tumor pathology features, however high Q_A of CD3+ cells correlated with higher grade of chronic hepatitis and high Q_A of CD8+ cells correlated with higher grades of NASH and chronic hepatitis (Table S11). High Q_A of CD3+ and CD20+ cells in the NT liver correlated with higher grades and stages of NASH and chronic hepatitis.

3. Discussion

In our paper, we analysed the immune microenvironment of HCC after a curative resection in terms of type, density, location and eventual interaction of adaptive immune cells within distinct tumor regions. For the first time, we examined the tumor margin as two separate entities: inner and outer margin, which demonstrated statistical differences in immune cell infiltration with different prognostic significance. The inner margin harbored smaller Q_A of CD3+ and CD8+ T-cells and CD20+ B-cells than the outer margin. However, in contrast to the outer margin, high Q_A of T-cells and intermediate and high Q_A of B-cells in the inner margin strongly predicted longer TTR and DFS. High inner/outer margin Q_A ratios of T- and B-cells were also associated with longer TTR and DFS. By contrast, low cells'

Q_A and ratios were associated with worse TTR and DFS. Patients with intermediate-high Q_A of combined CD8+ and CD20+ cells in the inner margin showed superior TTR and DFS, compared to CD8+-high or CD20+-high alone. In TC, intermediate and high Q_A of CD8+ cells predicted longer TTR, whereas CD3+ and CD20+ were predictive only at high Q_A . DFS was predicted by high Q_A of CD3+, CD8+ and CD20+ cells in TC. In view of the lower importance of CD3+ T-cells, we will further discuss only CD8+ and CD20+ cells.

3.1. Heterogeneity of the Tumor Invasive Margin

We believe that greater infiltration of the outer 500 μm of invasive margin compared with the inner 500 μm might be partially attributed to the encapsulation of the tumor nests present in a vast majority of the patients in our cohort (Table S2). The observed frequency of encapsulation is in agreement with the literature [18,19]. The histological pattern of the tumor margin corresponded to its macroscopic description: 62.7% of patients presented with a single distinctly nodular tumor, which is usually characterized by the presence of a discernible capsule [18]. The encapsulation in primary and metastatic HCC has been reported to be associated with decreased invasiveness and improved survival [19–21]. However, contrary to immune cells' parameters, encapsulation was not associated with outcomes in our study (Table S4). Inner/outer margin ratios of Q_A of immune cells were also not associated with tumor encapsulation, therefore, the fibrotic capsule itself is not a serious obstacle for cell penetration into the tumor. Instead, the characteristics of the tumor and immune cells, as well as other players in the tumor microenvironment, might be more important mechanisms regulating cell traffic, however, all those hypotheses are awaiting testing in HCC [22,23].

3.2. CD8+ Cells in TC and CD20+ Cells in the Inner Margin Confer the Best Prediction of TTR and DFS

High immune infiltration of TC and the inner margin correlated with tumor de-differentiation (Table S10), which was shown previously in breast cancer [24] but not in HCC [25]. This observation implies substantial antigenicity of HCC for the initiation of immune response. Our data also propose a major importance of CD8+ in TC and CD20+ cells in the inner margin for generating memory response, as they conferred lower risk of recurrence and longer DFS at both intermediate and high Q_A in those ROIs, whereas low cell Q_A conferred shorter TTR and DFS, accordingly. Patterns of TIME with high vs. low infiltration of the interior of the tumor are referred to in the literature as “hot” or “immune-inflamed” and “cold” or “immune-desert”, and are associated with a better and worse prognosis, respectively [22,26].

3.3. CD8+ and CD20+ Cells in the Inner Margin Cooperate in Initiating Antitumor Immune Response

The individual predictive abilities of CD8+ T-cells and CD20+ B-cells in the inner margin increased when we combined them. Patients with intermediate-high Q_A of both markers in the inner margin (but not in the TC) had the best TTR and DFS, which were significantly longer than in only CD20+high and only CD8+high groups, whereas patients with low Q_A of both markers displayed the worst TTR and DFS. Similar findings were reported earlier by Shi et al. [14], who demonstrated longer TTR and OS in patients with both high CD8+ and CD20+ cell densities in the entire invasive margin of HCC. Mlecnik et al. [27] concluded that the TB-score, which is based on the assessment of CD8+ T-cells and CD20+ B-cells, along with Immunoscore in liver metastases of colorectal cancer were the strongest predictors of DFS and OS. Tumor-infiltrating CD8+ T-cells are thought to represent the effector memory phenotype, which is considered the main anti-tumor actor in HCC and many other cancers [9,26]. Tumor-infiltrating B-cells can exert their prolonged anti-tumor impact as antigen-presenting cells that trigger and modulate T-cell immune response, through production of antibodies against tumor antigens, and by the direct killing of cancer cells (reviewed in [28]). Along with the positive correlation between CD8+ and

CD20+ cells in all ROIs, our results suggest that these cells cooperate in the mounting of a long-lasting memory response, able to limit local or systemic tumor dissemination [10,29].

3.4. Greater T- and B-Cell Ratios between Inner and Outer Margin Associate with Longer TTR and DFS

In addition to individual and combined cell Q_A in the TC and inner margin, above-median inner/outer margin Q_A ratios were strongly associated with longer DFS and TTR for CD20+ cells, and longer DFS for CD8+ T cells. On the contrary, under-median ratios conferred a worse prognosis. Inner/outer margin ratios correlated with respective cell Q_A in the TC, therefore, patients with above-median ratios apparently had “hot” tumors and vice versa. We propose that the Q_A ratios between the inner and outer margin, which may be a measure of cell penetration through the tumor border, could help to better characterize TIME phenotypes and risk stratification. “Poor” (<0.1) inner/outer margin Q_A ratio corresponds to the immune-excluded phenotype, which reflects the effective mounting of the host T- and B-cell immune response, along with the ability of the tumour to escape such a response [22]. To our knowledge, only one previous HCC study [14] has explored the impact of penetration of CD20+ lymphocytes into the tumor, which was accompanied by better survival. In our paper, we expanded this finding to T-cells and quantified the extent of cell penetration into the tumor. Despite their very limited ability to pass through the tumor border, CD20+ cells in the inner margin predicted TTR and DFS at the lowest HRs and p -values and conferred better survival, not only at high but at intermediate and intermediate-high Q_A as well, which points at the importance of B-cells. Of note, the immune-excluded and cold phenotypes are accompanied by resistance to therapy with immune-check-point inhibitors [22,26]. For a mechanistic basis, it has been shown that blockade of TGF β signalling or vascular-targeted therapy in preclinical models permitted lymphocyte infiltration into the tumor [23,30].

3.5. Comparison to Relevant Literature

About 60 papers assessing the prognostic value of TIL in HCC had been published as of 2018 (reviewed in [12]), however, a vast majority of these assessed cell infiltration in TC. In general, the pooled results correspond to our findings, showing better DFS in HCC patients with greater CD8+ cell densities in TC. Only a minority of previous studies aimed at evaluating TIL in the entire margin of HCC and demonstrated the positive impact of CD3+ [17] and CD8+ cells on DFS [17,31], and CD20+ on TTR and OS [14]. Several groups reported results discordant with ours. Guiscia et al. [32] did not observe significant associations of intratumoral CD8+ T-cell with progression-free survival in HCC. Zheng and co-authors [33] found an association of high density of CD3+ or CD8+ T-cells in the TC, but not in the margin, and of CD8+ cells in PT liver with better OS after resection of HCC. Ramzan et al. [34] correlated high densities of CD8+ T-cells in cirrhotic parenchyma, but not in TC with recurrence and lower OS after resection. Sun et al. [17] stated that T-cells in TC were more positively influential on DFS and OS than those in the margin region. These discrepancies can be related to the study of cohorts of different sizes and ethnicity, with a varying percentage of patients with cirrhosis or viral hepatitis, and several other factors, which were highlighted in the systematic review by Yao et al. [35]. Another source of the discordant results might be different or poor annotation of the margin, PT and NT liver, and assessment of cell numbers per several representative high-power FOV, instead of estimating their densities [17,32,33]. We believe that adherence to the recommendations of international consortium on assessment of TIL [13] might improve the reproducibility of the reported data.

3.6. Limitations

Our study has several limitations, the small sample size being the main one. Low prevalence of hepatitis and cirrhosis may not allow the reproduction of data on other cohorts, such as Asian patients. On the other hand, our study provides insight into TIME

of the HCC in patients with steatohepatitis as a background disease. A relatively low rate of deaths, along with the small sample size, did not allow us to demonstrate associations of any variable with OS; however, meta-analysis by Ding et al. [12] also showed frequent absence or even inverse associations of immune cells densities with OS, compared to DFS. The death of a patient in the late postoperative period can often be caused by a number of reasons not directly related to the primary HCC itself. In our study, we aimed at assessing the role of adaptive immunity, however, it should also be noted that innate immune cells can control cancer directly by interacting with tumor cells, and/or indirectly by favoring the anti-tumor activities of CD8+ T-cells [9,23,26]. Currently, a more extensive inclusion of other players in TIME is ongoing in our laboratory.

4. Patients and Methods

We conducted a single-center retrospective cohort study of 70 consecutive patients with pathologically confirmed HCC stages I to IV, who underwent tumor resection at the Pilsen University Hospital (Czech Republic) between 1997 and 2019. Two of them were operated for recurrence of HCC. All pathology reports were reviewed. None of the patients had distant metastasis or received any neoadjuvant therapies such as radiotherapy and chemotherapy before operation. After exclusion of three patients with low quality of histological samples, the remaining 67 patients were included into the study (Table S1). This retrospective research was carried out in accordance with the ethical standards laid down in the Declaration of Helsinki (2013 version); it was approved by the Ethical Board of Faculty of Medicine and University hospital in Pilsen (118/2021, 11 March 2021). Clinical tumor stage was determined according to the 8th edition of the *American Joint Commission on Cancer* [7].

Patients were followed until December 2020, with a median observation time of 101 (confidence interval: 59–143) months (assessed by the inverse Kaplan–Meier method). A diagnosis of recurrence was based on typical imaging appearance in computed tomography and/or magnetic resonance imaging scan and an elevated α -fetoprotein level. Post-operative treatment was in accordance with generally accepted guidelines.

4.1. Pathology and Immunohistology

For each patient, 2 to 4 blocks of formalin-fixed paraffin-embedded tissue containing the center of the tumor, invasive margin and separate block with non-tumor liver, 2- to 3 cm distant from the tumor site (if available), were retrieved from the pathology archive. Hematoxylin and eosin and Masson's trichrome stained sections were used to evaluate the histopathology features of tumor and non-tumor tissue. The Edmondson–Steiner and WHO grading systems were used to assess tumor differentiation [36] (Table S2). In addition, architectural, nuclear and nucleolar grades were scored [36]. Desmoplastic, pushing or infiltrative growth type [21], cytologic type, micronodularity, presence of microsatellites, microvascular invasion, and necrosis were also recorded [37]. Amount of stromal component inside the tumor was assessed on a semiquantitative scale (0–3). The extent of encapsulation was graded according to [20] as 0 (no evidence of extracellular matrix deposition at tumor interface), 1 (incomplete encapsulation, at <50% of interface), 2 (incomplete encapsulation >50% of interface, or 3 (complete encapsulation). One or two tissue sections of 4- μ m thickness were cut and mounted onto BOND Plus Microscope Slides (Cat# 00270, Leica Biosystems Newcastle Ltd., Newcastle, UK). Immunohistochemical detection of CD3+ T cells, CD8+ T cells and CD20+ B cells was performed using fully automated BOND-III IHC/ISH stainer. Ready-to-use monoclonal primary antibodies for CD3 (clone LN10), CD8 (clone 4B11) and CD20 (clone L26) all from Leica Biosystems (Newcastle Ltd., UK) were used. Binding of primary antibodies with cell membranes was visualized using horseradish peroxidase (HRP)-linker antibody conjugate system (Bond™ Polymer Refine Detection). Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin and embedded into Micromount mounting medium (Leica Biosystems Newcastle Ltd., UK). Appropriate positive (tonsils) and negative tissue control samples were used throughout. Non-tumor liver was exam-

ined for the features of chronic hepatitis and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), including NASH. Grading and staging for NAFLD and chronic hepatitis were performed according with Brunt [38] and Ishak [39] approaches, respectively.

4.2. Definitions of Regions of Interest

All sections were examined under Olympus CX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) by two pathologists (AT and LC). To evaluate the spatial heterogeneity of immune components, the reference space within each section was microanatomically divided into TC, inner and outer invasive margin, PT liver and NT liver (shown in Figures 2 and 3). The inner margin and outer margin were defined as 500 μm on each side of the border separating the malignant cell nests and adjacent non-tumor liver tissue or fibrous capsule [13] towards TC or NT liver, respectively. The TC represents the remaining tumor area. The PT region was defined as the 500 μm thick region immediately adjacent to the outer M. For each ROI (TC, inner margin, outer margin, PT liver and NT liver), eight FOV were selected by systematic uniform random sampling using the objective 20 \times for all ROIs except PT liver (Figure 2A). Since it was not possible to sample PT area correctly with the objective 20 \times , we used the objective 10 \times , which provided an acceptable resolution. Pictures were captured by the PromiCam 3–3CP digital camera (Promicra, Prague, Czech Republic), coupled with the QuickPhoto Industrial 3.2 software (Promicra, Prague, Czech Republic).

4.3. Stereological Analysis

The stereological analysis was performed by AT, EA and PK, who were blinded to the clinical outcome, using the computer assisted stereology software Ellipse (ViDiTo, Kosice, Slovak Republic). CD3-, CD8- or CD20-immunopositive nucleated cell profiles were counted using a probe consisting of a set of 2D unbiased counting frames (UCF) (Figure 2B–D). Only cells transected during cutting in the mid portion, which were found inside UCF and were not touching or being transected by exclusion lines, were counted. For TC and NT liver sizes of UCF (from 8700 to 34,801 μm^2) and their number (6–9) per image varied according to the lymphocytic density and, therefore, sampling fraction varied from 417,611 μm^2 to 1,670,443 μm^2 . Six UCFs per image with a total area of 417,611 μm^2 were used for the inner and outer margin, and nine UCFs with a total area of 417,215 μm^2 were used for the PT region. Q_A of CD3+, CD8+ or CD20+ cells was estimated as the number of nucleated immunopositive cell profiles divided by the total area of unbiased counting frames [40]. Inter-observer variations over 10% were re-estimated for a concord result.

4.4. Prognostic Factors and Outcomes

The prognostic associations of two types of immune cell parameters were explored. First, we evaluated Q_A of individual immune cell types in each ROI. To eliminate skewness in the distribution, the raw cell Q_A for the most of analyses were converted into corresponding percentile values and categorized into low (below 25th percentile) vs. intermediate (25th–70th percentile) vs. high (above 70th percentile), as well as into low vs. intermediate-high at the 25th percentile.

Second, we calculated ratios of cell Q_A between TC and inner margin from one side, and outer margin or PT liver from the other side that might have characterized the efficiency of penetration of immune cells into the tumor. For this purpose, we used raw cell Q_A , and we performed dichotomization into the above-median and under-median groups. Considering the significant associations of CD20+ and CD8+ cells' Q_A in the inner margin with TTR and DFS, we assessed their combined influence. To do so, patients were classified into four groups, using the 25th percentile as the cut-off: both CD20+ and CD8+ intermediate-high, only CD20+ intermediate-high, only CD8+ intermediate-high, both CD20+ and CD8+ low.

The endpoints of the study were TTR, DFS and OS. TTR was defined as the time from the date of tumor resection to the date of diagnosis of recurrence/metastasis. If recurrence was not diagnosed, patients were censored at either the date of death or the date of last

follow-up. The appropriate proportion of patients without recurrence was denoted as recurrence-free proportion. DFS was considered as the time from tumor resection to the date of diagnosis of recurrence/metastasis or death due to any cause. OS was defined as the time from tumor resection to death due to any cause. Patients without recurrence or death were censored at the last follow-up.

4.5. Statistical Analysis

Continuous nonparametric data are expressed as median (min-max); their comparison was made either by Mann–Whitney U-test or by Friedman ANOVA, followed by Wilcoxon matched pairs test with Bonferroni correction. Proportions are expressed as raw data (percentages). The associations between pairs of ordinal or quantitative variables were assessed using Spearman correlation. To determine the prognostic value of individual predictors for TTR, DFS and OS, a univariable followed by backward stepwise multivariable Cox regression analysis was performed. Only variables that were significant in univariable analysis were included into the multivariable model [41]. Hazard ratios showing the relative risk for the intermediate or high groups separately or combined intermediate-high group or over-median group compared with 1 for the low or under-median group, were calculated.

TTR, DFS and OS were calculated by the Kaplan–Meier method and compared between groups by the log-rank test. Statistica 10 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA), GraphPad Prism 9.0, (GraphPad Software LLC) and R environment (v.4.1.1) were used for statistical analyses. Kaplan–Meier analysis was performed with survival package and plots were generated with survminer package [42,43].

A 2-sided p value < 0.05 was considered statistically significant.

5. Conclusions

The overall results show distinct features of the inner and outer margin of primary HCC in most of the patients after curative resection. The inner margin, despite its smaller T- and B-cell Q_A compared with outer margin, conveys the best prediction for TTR and DFS. The prediction is further improved by combining CD20+ and CD8+ cells in the inner margin or by assessing inner margin/outer margin ratios. Our findings highlight first the importance of the inner margin, and secondly the predictive role of B-cells. The results should be independently confirmed, but they offer a novel approach for the stratification of patients after curative liver resection and for identifying those who are at risk for early tumor recurrence.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14030604/s1>, Figure S1: Distribution of the patients according to the inner M/outer M ratios of nucleated profiles of tumor infiltrating lymphocytes; Figure S2: Kaplan–Meier analysis for time to recurrence according to low vs. intermediate vs. high densities of nucleated profiles of tumor infiltrating lymphocytes in the tumor center (A–C) and inner margin (D–F); Figure S3: Kaplan–Meier analysis for disease-free survival according to low vs. intermediate vs. high densities of nucleated profiles of tumor infiltrating lymphocytes in the tumor center (A–C) and inner margin (D–F); Figure S4: Kaplan–Meier analysis for time to recurrence according to above-median vs. under-median ratios between densities of nucleated profiles of tumor infiltrating lymphocytes in different regions of interest; Figure S5: Kaplan–Meier analysis for disease-free survival according to above-median vs. under-median ratios between densities of nucleated profiles of tumor infiltrating lymphocytes in different regions of interest; Table S1: Clinical backgrounds of enrolled hepatocellular carcinoma patients; Table S2: Histopathological features of hepatocellular carcinoma; Table S3: The estimated probability of outcomes in Kaplan–Meier analysis; Table S4: Univariable analysis of clinical and pathology variables associated with time to recurrence (TTR) and disease-free survival (DFS); Table S5: Densities of nucleated profiles of tumor infiltrating lymphocytes (Q_A) per individual ROI associated with time to recurrence and disease-free survival (univariable analysis) in 64 most recent patients; Table S6: Univariable analysis of clinical and pathology variables associated with time to recurrence (TTR) and disease-free survival (DFS) in 64 most recent patients; Table S7: Densities of nucleated

profiles of tumor infiltrating lymphocytes (Q_A) in the invasive margin and non-tumor liver associated with time to recurrence and disease-free survival (univariable analysis); Table S8: Correlation between densities of nucleated profiles of tumor infiltrating lymphocytes (Q_A) in different ROIs (Spearman ρ); Table S9: Significant correlations between densities of nucleated profiles of tumor infiltrating lymphocytes (Q_A) in different ROIs (Spearman ρ , $p < 0.05$); Table S10: Significant associations between densities of nucleated profiles of tumor infiltrating lymphocytes (Q_A) in different ROIs and clinical and pathology variables; Table S11: Significant associations between densities of nucleated profiles of tumor infiltrating lymphocytes (Q_A) in the PT and NT liver and pathology features of non-alcoholic fatty liver disease or chronic hepatitis (Spearman ρ , $p < 0.05$).

Author Contributions: Conceptualization: K.H. and V.L., data curation: A.T., L.Č., F.A., E.A., P.K., R.P., P.H., V.T. and O.D., methodology: A.T., L.Č., F.A., Z.T. and O.D., validation: A.T., O.D., Z.T., V.L. and K.H., formal analysis: A.T., L.Č., F.A., E.A., P.K., R.P. and P.H., writing original draft: A.T. and K.H., review and editing: K.H., Z.T., O.D. and V.L., resources: K.H. and V.L., supervision: K.H., project administration: V.L., funding acquisition: K.H. and V.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme, grant N°856620; the Ministry of Health of the Czech Republic, grant AZV NU21-03-00506, and Charles University Research Fund, grant Progres Q39 to Z.T.

Institutional Review Board Statement: This study protocol was reviewed and approved by the Ethical Board of Faculty of Medicine and University hospital in Pilsen (118/2021, 11 March 2021). This study was carried out in accordance with the ethical standards laid down in the Declaration of Helsinki (2013 version).

Informed Consent Statement: Due to retrospective design it was not possible to obtain informed consent of patients to participate in the study.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included in this article and its Supplementary Material files. Further enquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)]
2. Llovet, J.M.; Kelley, R.K.; Villanueva, A.; Singal, A.G.; Pikarsky, E.; Roayaie, S.; Lencioni, R.; Koike, K.; Zucman-Rossi, J.; Finn, R.S. Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2021**, *7*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Roayaie, S.; Obeidat, K.; Sposito, C.; Mariani, L.; Bhoori, S.; Pellegrinelli, A.; Labow, D.; Llovet, J.M.; Schwartz, M.; Mazzaferro, V. Resection of hepatocellular cancer ≤ 2 cm: Results from two Western centers. *Hepatology* **2013**, *57*, 1426–1435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Shinkawa, H.; Tanaka, S.; Takemura, S.; Amano, R.; Kimura, K.; Kinoshita, M.; Takahashi, K.; Matsuzaki, S.; Kubo, S. Nomograms predicting extra- and early intrahepatic recurrence after hepatic resection of hepatocellular carcinoma. *Surgery* **2021**, *169*, 922–928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Centonze, L.; De Carlis, R.; Vella, I.; Carbonaro, L.; Incarbone, N.; Palmieri, L.; Sgrazzutti, C.; Ficarelli, A.; Valsecchi, M.G.; Dello Iacono, U.; et al. From LI-RADS Classification to HCC Pathology: A Retrospective Single-Institution Analysis of Clinico-Pathological Features Affecting Oncological Outcomes after Curative Surgery. *Diagnostics* **2022**, *12*, 160. [[CrossRef](#)]
6. Najjar, M.; Agrawal, S.; Emond, J.C.; Halazun, K.J. Pretreatment neutrophil-lymphocyte ratio: Useful prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatocell. Carcinoma* **2018**, *5*, 17–28. [[CrossRef](#)]
7. Kamarajah, S.K.; Frankel, T.L.; Sonnenday, C.; Cho, C.S.; Nathan, H. Critical evaluation of the American Joint Commission on Cancer (AJCC) 8th edition staging system for patients with Hepatocellular Carcinoma (HCC): A Surveillance, Epidemiology, End Results (SEER) analysis. *J. Surg. Oncol.* **2018**, *117*, 644–650. [[CrossRef](#)]
8. Zhou, L.; Rui, J.A.; Ye, D.X.; Wang, S.B.; Chen, S.G.; Qu, Q. Edmondson-Steiner grading increases the predictive efficiency of TNM staging for long-term survival of patients with hepatocellular carcinoma after curative resection. *World J. Surg.* **2008**, *32*, 1748–1756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Galon, J.; Bruni, D. Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories. *Immunity* **2020**, *52*, 55–81. [[CrossRef](#)]
10. Bruni, D.; Angell, H.K.; Galon, J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20*, 662–680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. Pages, F.; Mlecnik, B.; Marliot, F.; Bindea, G.; Ou, F.S.; Bifulco, C.; Lugli, A.; Zlobec, I.; Rau, T.T.; Berger, M.D.; et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: A prognostic and accuracy study. *Lancet* **2018**, *391*, 2128–2139. [[CrossRef](#)]
12. Ding, W.; Xu, X.; Qian, Y.; Xue, W.; Wang, Y.; Du, J.; Jin, L.; Tan, Y. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **2018**, *97*, e13301. [[CrossRef](#)]
13. Hendry, S.; Salgado, R.; Gevaert, T.; Russell, P.A.; John, T.; Thapa, B.; Christie, M.; van de Vijver, K.; Estrada, M.V.; Gonzalez-Ericsson, P.I.; et al. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Adv. Anat. Pathol.* **2017**, *24*, 235–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Shi, J.Y.; Gao, Q.; Wang, Z.C.; Zhou, J.; Wang, X.Y.; Min, Z.H.; Shi, Y.H.; Shi, G.M.; Ding, Z.B.; Ke, A.W.; et al. Margin-infiltrating CD20(+) B cells display an atypical memory phenotype and correlate with favorable prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 5994–6005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kolinko, Y.; Maleckova, A.; Kochova, P.; Grajciarova, M.; Blassova, T.; Kural, T.; Trailin, A.; Cervenkova, L.; Havrankova, J.; Vistejnova, L.; et al. Using virtual microscopy for the development of sampling strategies in quantitative histology and design-based stereology. *Anat. Histol. Embryol.* **2021**. [[CrossRef](#)]
16. Gabrielson, A.; Wu, Y.; Wang, H.; Jiang, J.; Kallakury, B.; Gatalica, Z.; Reddy, S.; Kleiner, D.; Fishbein, T.; Johnson, L.; et al. Intratumoral CD3 and CD8 T-cell Densities Associated with Relapse-Free Survival in HCC. *Cancer Immunol. Res.* **2016**, *4*, 419–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sun, C.; Xu, J.; Song, J.; Liu, C.; Wang, J.; Weng, C.; Sun, H.; Wei, H.; Xiao, W.; Sun, R.; et al. The predictive value of centre tumour CD8(+) T cells in patients with hepatocellular carcinoma: Comparison with Immunoscore. *Oncotarget* **2015**, *6*, 35602–35615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Schlageter, M.; Terracciano, L.M.; D'Angelo, S.; Sorrentino, P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 15955–15964. [[CrossRef](#)]
19. Ishizaki, M.; Ashida, K.; Higashi, T.; Nakatsukasa, H.; Kaneyoshi, T.; Fujiwara, K.; Nouse, K.; Kobayashi, Y.; Uemura, M.; Nakamura, S.; et al. The formation of capsule and septum in human hepatocellular carcinoma. *Virchows. Arch.* **2001**, *438*, 574–580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Lockwood, D.S.; Yeadon, T.M.; Clouston, A.D.; Crawford, D.G.; Fawcett, J.; Callaghan, S.A.; Gotley, D.C. Tumor progression in hepatocellular carcinoma: Relationship with tumor stroma and parenchymal disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2003**, *18*, 666–672. [[CrossRef](#)]
21. Nielsen, K.; Rolff, H.C.; Eefsen, R.L.; Vainer, B. The morphological growth patterns of colorectal liver metastases are prognostic for overall survival. *Mod. Pathol.* **2014**, *27*, 1641–1648. [[CrossRef](#)]
22. Galon, J.; Bruni, D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 197–218. [[CrossRef](#)]
23. Joyce, J.A.; Fearon, D.T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* **2015**, *348*, 74–80. [[CrossRef](#)]
24. Figenschau, S.L.; Fismen, S.; Fenton, K.A.; Fenton, C.; Mortensen, E.S. Tertiary lymphoid structures are associated with higher tumor grade in primary operable breast cancer patients. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Martin-Sierra, C.; Martins, R.; Laranjeira, P.; Coucelo, M.; Abrantes, A.M.; Oliveira, R.C.; Tralhao, J.G.; Botelho, M.F.; Furtado, E.; Domingues, M.R.; et al. Functional and Phenotypic Characterization of Tumor-Infiltrating Leukocyte Subsets and Their Contribution to the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma. *Transl. Oncol.* **2019**, *12*, 1468–1479. [[CrossRef](#)]
26. Chen, D.S.; Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* **2017**, *541*, 321–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Mlecnik, B.; Van den Eynde, M.; Bindea, G.; Church, S.E.; Vasaturo, A.; Fredriksen, T.; Lafontaine, L.; Haicheur, N.; Marliot, F.; Debetancourt, D.; et al. Comprehensive Intrametastatic Immune Quantification and Major Impact of Immunoscore on Survival. *J. Natl. Cancer Inst.* **2018**, *110*, 97–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Qin, M.; Wang, D.; Fang, Y.; Zheng, Z.; Liu, X.; Wu, F.; Wang, L.; Li, X.; Hui, B.; Ma, S.; et al. Current Perspectives on B Lymphocytes in the Immunobiology of Hepatocellular Carcinoma. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 647854. [[CrossRef](#)]
29. Lund, F.E.; Randall, T.D. Effector and regulatory B cells: Modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 236–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Mariathasan, S.; Turley, S.J.; Nickles, D.; Castiglioni, A.; Yuen, K.; Wang, Y.; Kadel, E.E., III; Koepfen, H.; Astarita, J.L.; Cubas, R.; et al. TGFbeta attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature* **2018**, *554*, 544–548. [[CrossRef](#)]
31. Brunner, S.M.; Rubner, C.; Kesselring, R.; Martin, M.; Griesshammer, E.; Ruemmele, P.; Stempf, T.; Teufel, A.; Schlitt, H.J.; Fichtner-Feigl, S. Tumor-infiltrating, interleukin-33-producing effector-memory CD8(+) T cells in resected hepatocellular carcinoma prolong patient survival. *Hepatology* **2015**, *61*, 1957–1967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Giusca, S.E.; Wierzbicki, P.M.; Amalinei, C.; Caruntu, I.D.; Avadanei, E.R. Comparative analysis of CD4 and CD8 lymphocytes—Evidences for different distribution in primary and secondary liver tumors. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2015**, *53*, 272–281. [[CrossRef](#)]

33. Zheng, B.H.; Ma, J.Q.; Tian, L.Y.; Dong, L.Q.; Song, G.H.; Pan, J.M.; Liu, Y.M.; Yang, S.X.; Wang, X.Y.; Zhang, X.M.; et al. The distribution of immune cells within combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma predicts clinical outcome. *Clin. Transl. Med.* **2020**, *10*, 45–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ramzan, M.; Sturm, N.; Decaens, T.; Bioulac-Sage, P.; Bancel, B.; Merle, P.; Tran Van Nhieu, J.; Slama, R.; Letoublon, C.; Zarski, J.P.; et al. Liver-infiltrating CD8(+) lymphocytes as prognostic factor for tumour recurrence in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* **2016**, *36*, 434–444. [[CrossRef](#)]
35. Yao, W.; He, J.C.; Yang, Y.; Wang, J.M.; Qian, Y.W.; Yang, T.; Ji, L. The Prognostic Value of Tumor-infiltrating Lymphocytes in Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7525. [[CrossRef](#)]
36. Martins-Filho, S.N.; Paiva, C.; Azevedo, R.S.; Alves, V.A.F. Histological Grading of Hepatocellular Carcinoma—A Systematic Review of Literature. *Front. Med. (Lausanne)* **2017**, *4*, 193. [[CrossRef](#)]
37. Saxena, R. *Practical Hepatic Pathology*; Elsevier Saunders: Philadelphia, PA, USA, 2011; p. 675.
38. Brunt, E.M.; Janney, C.G.; Di Bisceglie, A.M.; Neuschwander-Tetri, B.A.; Bacon, B.R. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am. J. Gastroenterol.* **1999**, *94*, 2467–2474. [[CrossRef](#)]
39. Ishak, K.; Baptista, A.; Bianchi, L.; Callea, F.; De Groote, J.; Gudat, F.; Denk, H.; Desmet, V.; Korb, G.; MacSween, R.N.; et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J. Hepatol.* **1995**, *22*, 696–699. [[CrossRef](#)]
40. Gundersen, H.J. Estimators of the number of objects per area unbiased by edge effects. *Microsc. Acta* **1978**, *81*, 107–117. [[PubMed](#)]
41. Rothman, K.J.; Greenland, S. Introduction to regression models. In *Modern Epidemiology*, 2nd ed.; Winters, R., O'Connor, E., Eds.; Lippincott-Raven: Philadelphia, PA, USA, 1998; pp. 154–196.
42. Kassambara, A.; Kosinski, M.; Biecek, P.; Fabian, S. *Survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'* 2021. Available online: <https://rpkgs.datanovia.com/survminer/index.html> (accessed on 25 November 2021).
43. Therneau, T.M. *A Package for Survival Analysis in R*. R Package Version 3.2–13. 2021. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=survival> (accessed on 25 November 2021).

Příloha č. IV: *CTNNB1* mutace, *TERT* polymorfismus a hustota CD8⁺ buněk u resekovaného hepatocelulárního karcinomu souvisí s delší dobou do relapsu

RESEARCH

Open Access



CTNNB1 mutations, TERT polymorphism and CD8+ cell densities in resected hepatocellular carcinoma are associated with longer time to recurrence

Filip Ambrozkiwicz^{1*}, Andriy Trailin¹, Lenka Červenková^{2,3}, Radka Vaclavikova^{4,5}, Vojtech Hanicinec⁴, Mohammad Al Obeed Allah⁴, Richard Palek^{2,6}, Vladislav Třeška⁶, Ondrej Daum^{7,8}, Zbyněk Tonař^{9,10}, Václav Liška^{2,6} and Kari Hemminki^{1,11}

Abstract

Background: Hepatocellular carcinoma (HCC) is a fatal disease characterized by early genetic alterations in telomerase reverse transcriptase promoter (TERTp) and β -catenin (CTNNB1) genes and immune cell activation in the tumor microenvironment. As a novel approach, we wanted to assess patient survival influenced by combined presence of mutations and densities of CD8+ cytotoxic T cells.

Methods: Tissue samples were obtained from 67 HCC patients who had undergone resection. We analysed CD8+ T cells density, TERTp mutations, rs2853669 polymorphism, and CTNNB1 mutations. These variables were evaluated for time to recurrence (TTR) and disease free survival (DFS).

Results: TERTp mutations were found in 75.8% and CTNNB1 mutations in 35.6% of the patients. TERTp mutations were not associated with survival but polymorphism rs2853669 in TERTp was associated with improved TTR and DFS. CTNNB1 mutations were associated with improving TTR. High density of CD8+ T-lymphocytes in tumor center and invasive margin correlated with longer TTR and DFS. Combined genetic and immune factors further improved survival showing higher predictive values. E.g., combining CTNNB1 mutations and high density of CD8+ T-lymphocytes in tumor center yielded HRs of 0.12 (0.03–0.52), $p = 0.005$ for TTR and 0.25 (0.09–0.74), $p = 0.01$ for DFS.

Conclusion: The results outline a novel integrative approach for prognostication through combining independent predictive factors from genetic and immune cell profiles. However, larger studies are needed to explore multiple cell types in the tumor microenvironment.

Keywords: β -Catenin, TERT promoter, CD8+ cells, rs2853669, Hepatocellular carcinoma

Background

Primary liver cancer are the sixth most frequent diagnosed tumors globally and the third cause of cancer related death worldwide. Hepatocellular carcinoma (HCC) encompasses up to 85% of all primary liver cancers [1]. It develops as a result of a chronic liver disease which stepwise progresses from chronic inflammation to cirrhosis, fibrosis and HCC [2]. Malignant transformation

*Correspondence: filip.ambrozkiwicz@lfp.cuni.cz

¹ Laboratory of Translational Cancer Genomics, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Alej Svobody 1665/76, 323 00 Pilsen, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



of hepatocytes is a complex molecular process comprising numerous genetic and epigenetic alterations. These changes increase genetic diversity and accelerate evolution of tumor cells. However, increasing diversity stimulates immune system to action against cells presenting neoepitopes [3]. CD8+ cytotoxic T cells play a pivotal role in antitumor immune response. They are also one of many tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), which are vital in predicting clinical outcome (overall survival (OS) and disease free-survival (DFS)) in primary and metastatic liver cancer. Evidence shows that high densities of CD8+ cells in HCC are associated with better OS and DFS [4]. These attributes point to the role of intratumor CD8+ cells as a potential prognostic biomarker [4, 5].

In cancer cells, reactivation of telomerase prevents telomere shortening and may lead to unlimited cellular proliferation, enabling subsequent transformation. Almost 90% of human cancers show reactivation of telomerase [6]. Telomerase reverse transcriptase (TERT) is the catalytic subunit of telomerase, which additionally contains the telomerase RNA component (TERC) [7]. In HCC, TERT promoter (TERTp) mutations are the most frequent and earliest somatic alterations with a prevalence of about 60% [8, 9]. Until to-date, two recurrent somatic mutations in TERTp (−124 and −146 upstream of the ATG start site) have been associated with many types of cancer, including HCC. They create de novo binding sites for the ETS family of transcription factors and increase TERT expression [10]. TERT single nucleotide polymorphism (SNP) rs2853669 disrupts an existing ETS2 binding site, which results in decreased telomerase activity [11]. It was shown that SNP rs2853669 correlates with patient survival with variable effects in various cancers [12–14]. On the other hand, the same SNP was associated with poor prognosis in HCC [15]. Hot-spot mutations present in exon 3 of the β -catenin (CTNNB1) gene are critical for hepatocarcinogenesis and are among the most frequent alterations (20–40% of cases) [16]. They predominantly occur at the phosphorylation sites, induce accumulation of nuclear β -catenin and lead to activation of the Wnt signaling pathway [17]. Moreover, mutations in exon 3 of CTNNB1 tend to be associated with favourable prognosis in HCC [18, 19].

Research in the past decade has improved our understanding of hepatocarcinogenesis highlighting the multitude of genetic changes in the tumor but also the repertoire of interacting cells in the tumor microenvironments [20–22]. The aim of present study is to examine the interplay of most frequent driver mutations and one well-known immune marker. As a novel hypothesis, we posit that these two environments may act independently in influencing survival but when combined they may act additively supporting each other's action. We

chose to examine the interplay between genetic factors (TERTp and CTNNB1) in the tumor and immune factors (cytotoxic CD8+ cells) in the tumor microenvironment and their prognostic value in terms of time to recurrence (TTR), DFS and OS among resected HCC patients. Although the present patient series of 67 patients is relatively small it was homogenous as to the treatment by resection in a single center and precise follow-up thus providing a valuable addition to HCC patients.

Methods

Patient selection and characteristic

The study cohort consisted of 67 HCC patients (16 women and 51 men) of median age 69 years (range 24–86) who underwent primary tumor resection in Pilsen University hospital between 1997 and 2019. Patients were not subjected to neo-adjuvant therapy before operation, nor had distant metastasis. Clinical characteristics of the enrolled patients are presented in Table 1. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical

Table 1 Clinical characteristics of recruited patients

Variable	n (%)
Gender (<i>n</i> = 67)	
Male	51 (76.1%)
Female	16 (23.9%)
Disease background (<i>n</i> = 67)	
Cirrhosis	14 (20.9%)
Hepatitis C	3 (4.5%)
Alcoholic steatohepatitis	7 (10.4%)
Cryptogenic chronic hepatitis	7 (10.4%)
Mixed etiology of hepatitis	9 (13.4%)
NAFLD/NASH	2 (3.0%)/15 (22.4%)
Unknown	10 (14.9%)
Tumor Size (<i>n</i> = 67)	
< 5 cm	27 (40.3%)
> 5 cm	34 (50.7%)
Unknown	4 (6.0%)
Tumor Number (<i>n</i> = 67)	
Solitary	56 (83.6%)
Multiple	8 (11.9%)
Unknown	3 (4.5%)
Tumor Stage (<i>n</i> = 67)	
I	45 (67.2%)
II	14 (20.9%)
III	5 (7.5%)
IV	3 (4.5%)
Event (<i>n</i> = 67)	
Recurrence	29 (43.3%)
Death	38 (56.7%)

Board of the Faculty of Medicine and University hospital in Pilsen (118/2021, March 11 2021).

DNA extraction, sanger sequencing

DNA was extracted from FFPE (formaldehyde fixed paraffin embedded) tumor tissue with RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE according to the manufacturer's protocol. Isolated DNA was used to obtain TERTp and CTNNB1 exon 3 mutation profiles. Mutations were analyzed in tumor and non-tumor adjacent tissue. PCR was carried out in 25- μ l volume containing 40 ng DNA, 0.1 mM dNTP, 2.5 mM Mg²⁺ and 0.11 μ M of each primer and 1 unit Taq polymerase (Taq DNA polymerase, Top-Bio) and 5% glycerol for TERTp. For CTNNB1, 20 ng of DNA, 0.2 mM dNTP, 2.5 mM Mg²⁺ and 0.2 μ M of each primer and 1 unit Taq polymerase was used. TERTp and CTNNB1 amplification PCR was performed under following conditions: 95 °C for 5 min/3 min, next 33 cycles of 95 °C for 30 sec, 68 °C/60 °C for 1 min, 72 °C for 45 sec respectively. Primer pairs were described previously [23, 24]. Sanger sequencing was performed in both directions. Chromatograms were analyzed by visual comparison and mutation was called when the height of the over-lapping peak encompassed at least 33% of the primary peak.

Polymorphism rs2853669 genotyping

SNP rs2853669 at TERTp was genotyped with TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Bioscience) and 20 ng of isolated DNA on CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Genotyping conditions were as followed: 95 °C for 10 min, next 50 cycles of 95 °C for 15 sec and 60 °C for 1 min.

Histology and immunohistochemistry

For each patient FFPE tissue blocks containing center of the tumor (TC) and invasive margin (IM) and, when available, separate block with non-tumor liver, 2- to 3-cm distant from the tumor site, were retrieved from the pathology archive; the detailed procedure are described elsewhere [25]. One or two tissue sections of 4- μ m thickness were cut and mounted onto BOND Plus microscope slides (K8020, Leica Bio-systems Newcastle Ltd., United Kingdom). Immunoperoxidase detection of CD8+ T cells was performed using fully automated BOND-III IHC/ISH stainer with anti-CD8 monoclonal primary antibodies (clone 4B11) from Leica Biosystems (Newcastle Ltd., United Kingdom) and horseradish peroxidase (HRP)-linker antibody conjugate system (Bond™ Polymer Refine Detection). Sections were counterstained with Mayer's hema-toxylin and embedded into Micro-mount mounting medium (Leica). Appropriate positive (tonsils) and negative tissue control samples were used.

All sections were examined under Olympus CX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) by two pathologists (AT and LC). Sections were microanatomically divided into TC and IM and non-tumor liver. The IM was defined as a 1000 μ m-region centered on the border separating the malignant cell nests from the host tissue (Hendry et al. 2017), whereas TC represents the remaining tumor area [26]. Eight fields of view were selected by systematic uniform random sampling from the TC and IM using the objective 20 \times . Pictures were captured by the PromiCam 3-3CP digital camera (Promicra, Prague, Czech Republic), coupled with the QuickPhoto Industrial 3.2 software (Promicra, Prague, Czech Republic). The stereological analysis was performed by AT, who was blinded to the clinical outcome, using the computer assisted stereology software Ellipse (ViDiTo, Kosice, Slovak Republic). CD8+ nucleated cell profiles were counted using a probe consisting of a set of 2D unbiased counting frames (UCF). The number of CD8+ profiles per mm² of area (Q_A = numerical density) was calculated as the number of positive lymphocytic profiles divided by the total, investigated counting frame area. To eliminate skewness in the distribution, the raw density of CD8+ nucleated cell profiles CD8+ (further denoted as density) was converted into corresponding percentile values and categorized into Low (below 25th percentile) vs Intermediate-High (25th–100th percentile) (further denoted as high).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed in the R environment (v.4.1.1). Spearman correlation was used to evaluate relations between variables. Survival analysis was performed with the Finalfit package [27]. Influence of individual and combined variables on TTR, DFS, OS was assessed by univariate and multivariable Cox regression. TTR was defined as period from tumor resection to recurrence/metastasis diagnosis. DFS was described as time from tumor resection until recurrence/metastasis detection or death due to any cause. OS was determined as the time from tumor resection to death due to any cause. Kaplan-Meier analysis was performed with the survival package and plots were generated with the survminer package [28, 29]. Differences between groups were assessed with Log-rank test. CD8+ densities in TC and IM were compared with the Wilcoxon test. Results were considered statistically significant when p -value < 0.05.

Results

TERT promoter and CTNNB1 mutations and polymorphism rs2853669

We sequenced 67 HCC cases for TERTp and CTNNB1 mutation analysis. Good quality sequences were obtained for 58 and 59 cases, respectively. We detected TERTp

mutation in 44 (75.8%) patients. TERTp mutations were located in two mutually exclusive hotspots –124bp in 41 and –146bp in three cases, all of them were heterozygous changes. CTNNB1 mutations were identified in 21 patients (35.6%): 20 heterozygous and 1 homozygous. Of them 16 patients had one missense mutation, one had a missense mutation accompanied by a synonymous change, one had three missense mutations and two has only a synonymous change (Supplementary Table 1). Mutational changes in TERTp and CTNNB1 were not observed in adjacent non-tumor tissue. Additionally, all patients were successfully genotyped for polymorphism rs2853669. Overall frequencies for AA, AG and GG genotypes were 44.8, 32.8 and 22.4%, respectively. For most of our genetic and clinical data, we did not find any correlations. However, correlations were found between –146bp TERTp mutation and concentration of alpha-fetoprotein ($p=0.004$), and between CTNNB1 mutations and diabetes mellitus ($p=0.004$) and extent of encapsulation ($p=0.03$) (Supplementary Table 2). We did not detect any correlations between mutations and the polymorphism. Clinical data were discussed in more detail in our previous work (25); only TNM stage ($HR=1.5$, $p=0.032$) and age ($HR=0.96$, $p=0.007$) had impact on patients TTR.

CD8+ distribution

IM displayed significantly higher density of CD8+ cells than TC ($p<0.0001$). CD8+ cell densities in non-tumor liver were higher compared with TC ($p<0.0001$), and lower when compared with IM. (Fig. 1., Table 2).

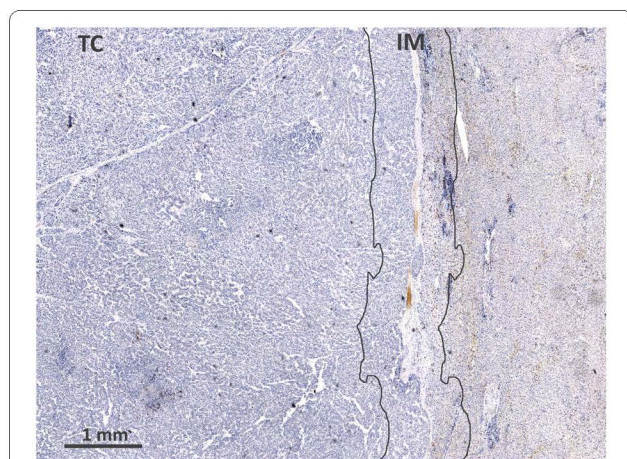


Fig. 1 Immunoperoxidase staining for CD8+ lymphocytes in HCC. Regions of interest are denoted: TC (tumor center) and IM (invasive margin). The IM was defined as a 1-mm region centered on the border separating the malignant cell nests from the host tissue. The TC represented the remaining tumor area. Scale bar 1000µm

Table 2 Density of CD8+ cell (number of nucleated cell profiles/mm²)

Tumor center (n = 67)	Invasive margin (n = 66)	Non-tumor liver (n = 43)
44 (2–1475)	174 (31–1256)	109 (23–400)

Significant correlations between clinical data and CD8+ cells are presented in Supplement (Supplementary Table 3).

Prognostic values of CTNNB1, TERTp mutation, rs2853669 and CD8+ cell densities

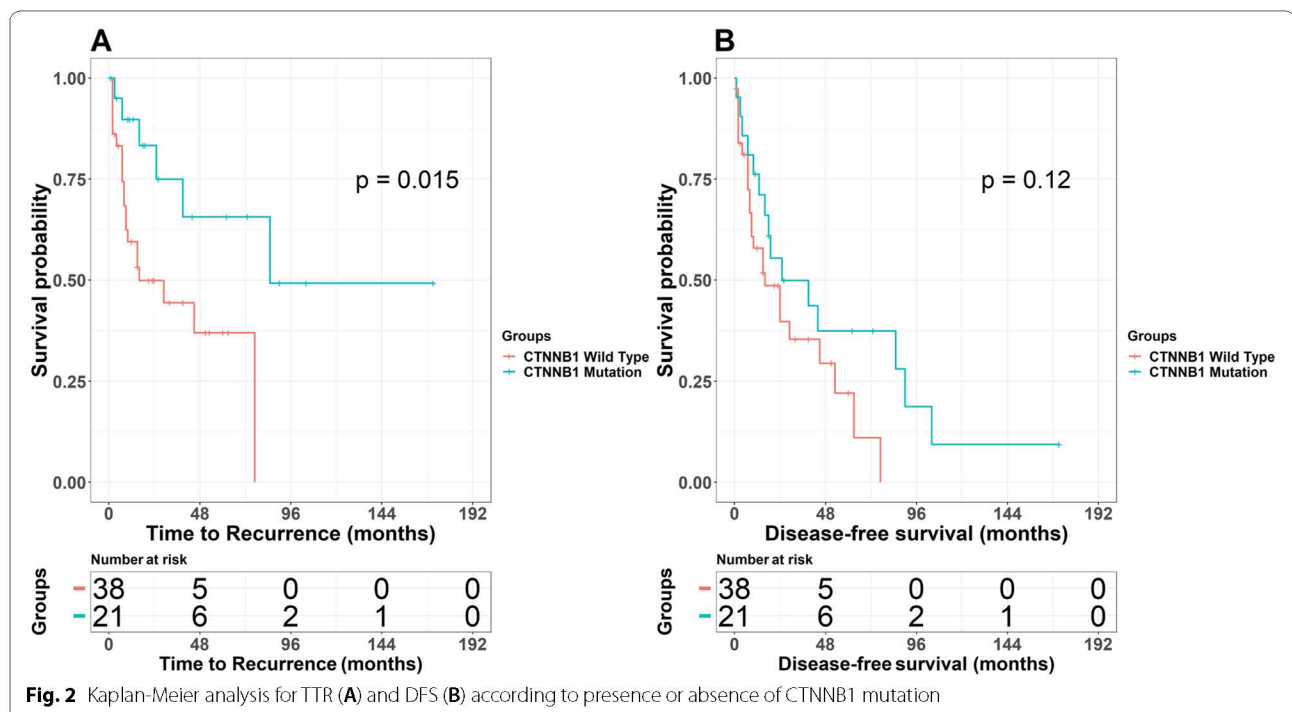
We performed univariate Cox regression and Kaplan-Meier analysis to investigate the association between genetic, immune factors and TTR, DFS, OS. To confirm differences between groups we performed Log-rank test (Supplementary Table 4). None of the variables were associated with OS. We did not detect any associations between TERTp mutations and TTR or DFS. Presence of a CTNNB1 mutation was associated with longer TTR but did not affect DFS (Table 3, Fig. 2). Presence of homozygote GG in rs2853669 polymorphism was associated with longer TTR and longer DFS, whereas heterozygotes were not associated (Table 3, Supplementary Fig. 1). High CD8+ cell densities in TC and IM were associated with lower risk of recurrence and longer DFS. (Table 3, Supplementary Fig. 2).

Combined genetic and immune variables and their prognostic value

Next, we analyzed associations of combined genetic and immune factors with TTR, DFS and OS. The variables were grouped as follows: presence or absence CTNNB1 mutation, presence of AA, AG, or GG genotype for rs2853669 with low or high density of CD8+ cells. Although TERTp mutations were not statistically significant in our individual analysis, due to previous reports [15, 30] we decided to combine them with polymorphism rs2853669 and evaluate their impact on patient’s outcomes. Individual analyses of CTNNB1 mutation and CD8+ cells density showed that the presence of mutation and high cell densities (HD) could be considered a favorable prognostic factor. Thus, we decided to analyze their combined influence on TTR and DFS. Cases were divided in 3 groups: presence of two good prognostic factors (CTNNB1(+)/CD8+(HD)), presence of only one (CTNNB1(+/-)/CD8(LD/HD)) and presence of adverse prognostic factor (CTNNB1(-)/CD8(LD)). Presence of mutation in CTNNB1 and high CD8+ cells densities in TC and IM were associated with lower risk of recurrence ($HR=0.12$ $p=0.005$ and $HR=0.17$ $p=0.012$ respectively) and longer disease-free survival ($HR=0.25$,

Table 3 Univariable analysis of genetic and immune variables associated with TTR and DFS

Variable	Group	N	TTR	DFS
			HR	HR
TERTp mutation (124bp)	WT	17	1.00	1.00
	MT	41	0.62 (0.27–1.40, $p=0.248$)	0.72 (0.37–1.40, $p=0.335$)
TERTp mutation (146bp)	WT	61	1.00	1.00
	MT	3	1.88 (0.44–8.02, $p=0.392$)	2.00 (0.61–6.55, $p=0.252$)
CTNNB1 Mutation	WT	38	1.00	1.00
	MT	21	0.31 (0.11–0.83, $p=0.020$)	0.57 (0.28–1.16, $p=0.121$)
rs2853669	A/A	30	1.00	1.00
	A/G	22	0.73 (0.33–1.63, $p=0.443$)	0.71 (0.36–1.40, $p=0.330$)
	G/G	15	0.29 (0.09–0.88, $p=0.028$)	0.42 (0.20–0.90, $p=0.025$)
CD8 TC	LD	16	1.00	1.00
	HD	49	0.32 (0.14–0.71, $p=0.005$)	0.41 (0.21–0.80, $p=0.009$)
CD8 IM	LD	16	1.00	1.00
	HD	48	0.34 (0.15–0.78, $p=0.011$)	0.37 (0.19–0.73, $p=0.004$)



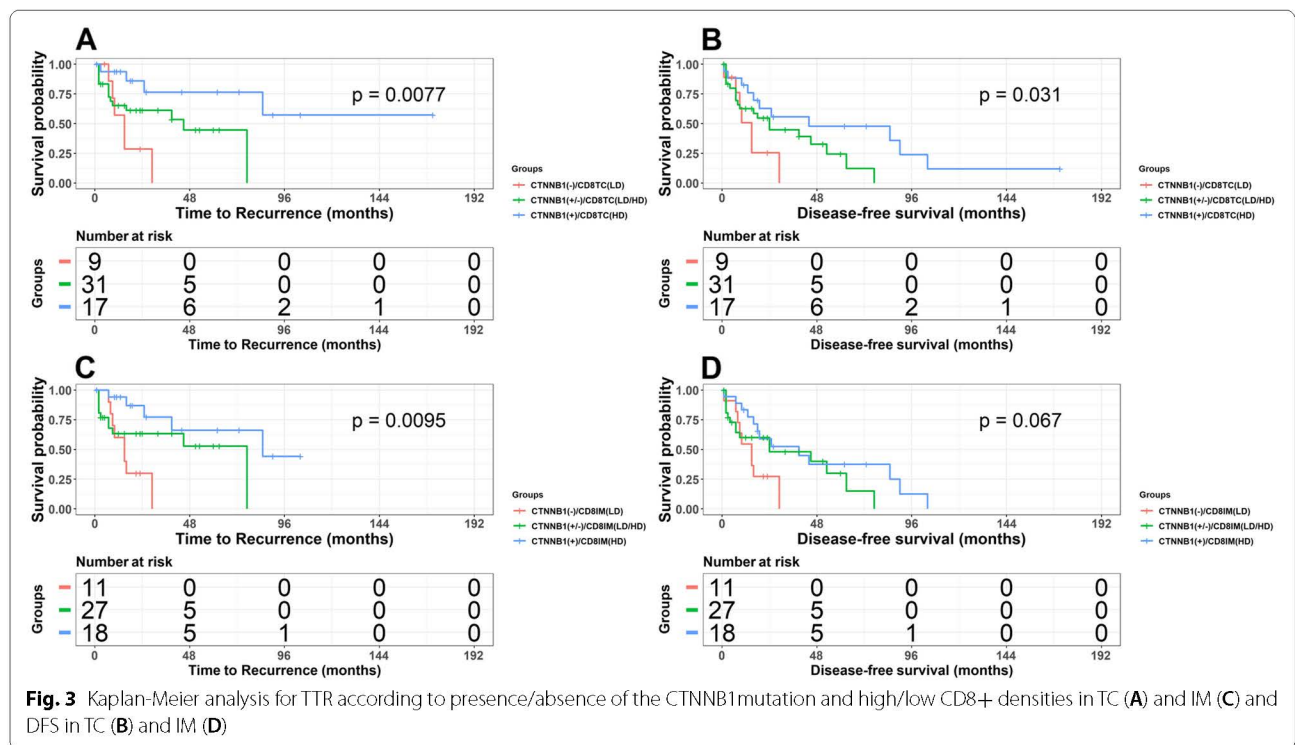
$p=0.005$ and $HR=0.34$ $p=0.025$ respectively) (Table 4 and Fig. 3).

Similar to mutation in CTNNB1, the GG genotype in SNP rs2853669 can also be considered a “good” prognostic factor (Table 3). Therefore, we combined it with CD8+ cell densities in TC and IM. We observed statistically significant association between combination of density CD8+ with the GG genotype with TTR in TC and IM ($HR=0.10$, $p=0.013$ and $HR=0.17$, $p=0.015$,

respectively) and with DFS in TC and IM ($HR=0.19$, $p=0.011$ and $HR=0.22$, $p=0.003$, respectively). Additionally, combination of CD8+ cell densities and the AG heterozygote in IM was associated with longer DFS survival ($HR=0.36$, $p=0.037$). These findings were con-confirmed in Kaplan-Meier analysis. (Fig. 3 and Supplementary Fig. 3) Combination of TERTp mutation (–124bp position) and polymorphism rs2853669 (where GG genotype can be considered as “good”

Table 4 Analysis for TTR and DFS for combined genetic and immune variables

Variables	Group	N	TTR	DFS
			HR	HR
CTNNB1 Mutation + CD8+ (TC)	CTNNB1(-)/CD8TC(LD)	9	1.00	1.00
	CTNNB1(+)/CD8TC(HD)	17	0.12 (0.03–0.52, p = 0.005)	0.25 (0.09–0.74, p = 0.012)
CTNNB1 Mutation + CD8+ (IM)	CTNNB1(-)/CD8TIM(LD)	11	1.00	1.00
	CTNNB1(+)/CD8TIM(HD)	18	0.17 (0.05–0.59, p = 0.005)	0.34 (0.13–0.87, p = 0.025)
rs2853669 + CD8+ (TC)	AA/CD8TC(LD)	5	1.00	1.00
	AA/CD8TC(HD)	23	0.51 (0.14–1.92, p = 0.319)	0.53 (0.17–1.64, p = 0.271)
	GG/CD8TC(LD)	3	0.91 (0.15–5.46, p = 0.913)	1.00 (0.22–4.52, p = 0.995)
	GG/CD8TC(HD)	12	0.10 (0.02–0.62, p = 0.013)	0.19 (0.05–0.69, p = 0.011)
rs2853669 + CD8+ (IM)	AA/CD8TIM(LD)	8	1.00	1.00
	AA/CD8TIM(HD)	19	0.75 (0.24–2.33, p = 0.614)	0.69 (0.28–1.70, p = 0.416)
	GG/CD8TIM(LD)	2	1.07 (0.12–9.29, p = 0.953)	0.69 (0.09–5.59, p = 0.728)
	GG/CD8TIM(HD)	13	0.17 (0.04–0.71, p = 0.015)	0.22 (0.08–0.61, p = 0.003)
TERTp mutation (-124 bp) + rs2853669	TERTp(-)/AA	8	1.00	1.00
	TERTp(+)/AA	17	0.38 (0.12–1.16, p = 0.089)	0.43 (0.16–1.15, p = 0.092)
	TERTp(-)/GG	5	0.08 (0.01–0.72, p = 0.024)	0.23 (0.06–0.82, p = 0.024)
	TERTp(+)/GG	10	0.15 (0.03–0.62, p = 0.009)	0.20 (0.06–0.64, p = 0.007)



prognostic factor) revealed that there was statistically significant association between GG genotype and lack of TERTp mutation and longer TTR (HR=0.08, p=0.024) and longer DFS survival (HR=0.23,

p=0.024). Similar pattern was observed for presence of TERTp mutation and GG genotype, showing longer TTR and longer DFS (0.15, p=0.009 and 0.20, p=0.007, respectively).

Multivariable analysis for individual and combined variables

Multivariable Cox regression models for each individual and combined parameters adjusted for TNM staging and age were built to assess their independent ability to predict TTR (Supplementary Table 5 and 6). Among the individual parameters, CTNNB1 mutation and rs2853669 were independently associated with TTR. Immune markers (CD8+ T cell densities in TC and IM) lost predictive capabilities after adjustment for TNM stage and age. Among combined parameters, combinations between rs2853669 and cell densities in TC and IM were associated with TTR. Moreover, combination of TERTp mutation and rs2853669 retain their predictive value after adjustment for TNM stage and age and was associated with longer TTR.

Discussion

The novelty of the present study was that for the first time results were presented on the interplay between genetic (CTNNB1 mutation and TERTp SNP rs2853669) and immune (CD8+ cells density) factors, their prognostic value and present usefulness of TTR in HCC prognostication. The GG genotype of SNPrs2853669, mutation in CTNNB1 and high CD8+ cell density were individually associated with improved TTR and DFS. Presence of CTNNB1 mutation and high CD8+ cell densities in both region of interest (TC or IM) strongly predicted longer TTR and DFS. Similarly, high CD8+ cell densities in TC or IM and presence of GG genotype were also associated with longer TTR and DFS. Combining positive genetic and immune factors additively improved each other's influence.

TERTp mutations are a well-known cause of telomerase reactivation in many cancers [31]. We confirmed high frequency of TERTp mutation in the present HCC, not associated with viral hepatitis patients (75.8%). Our mutation frequency is somewhat higher than has been reported for another European dataset (56.6%) for non-viral HCC [32]. In concordance with available data, the nucleotide change in -124bp was the most common TERTp mutation (93.2%). TERTp mutation and polymorphism rs2853669 did not show any correlation with clinical and pathological data in our analysis. Neither did we observe any associations with TTR, DFS or OS for the TERTp mutation; the relation with prognosis is rather controversial, some literature showing association of TERTp mutation with poor DFS and OS [33] other does not [34, 35]. Our data showed a statistically significant association of GG genotype of SNP rs2853669 with longer TTR (HR=0.29, $p=0.02$) and longer DFS (HR=0.42, $p=0.025$). The associations were not significant for the AG heterozygotes. Presence of G allele

modulated effect of TERTp mutations because the SNP destroys the pre-existing binding site for transcription factors EST [36]. Our data on the association of this SNP with favourable patient outcome are in agreement with prognostic data for various cancers [37]. Nevertheless, even deviant results have been reported for unknown reasons in an Asian population [15]. Previous reports which evaluate impact of TERTp mutation and rs2853669 and their combined effect on patient survival are not in agreement showing no correlation with survival or correlation with poor prognosis [15, 30]. Our data show opposite pattern where combination of GG allele and lack/presence of TERTp mutation is significantly correlated with longer TTR and longer DFS. We speculate firstly, that our patient etiology differed from the previous reports on viral etiology. Secondly, our data show a lesser role for a TERTp mutational status compared to higher predictive values for the rs2853669 GG allele.

The CTNNB1 gene is a key partner of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, which is activated in 30–50% of HCC cases [2]. This gene is one of the most frequently mutated cancer driver genes in HCC [37]. CTNNB1 mutations are missense mutations, most of which are located at the exon 3 phosphorylation sites and they increase the expression of β -catenin protein in the cytoplasm and nucleus [17, 38]. According to the literature, nuclear expression is associated with improved prognosis, opposite to cytoplasmic and membranous expression, which are associated with poorer prognosis [39, 40]. CTNNB1 mutations have been identified preferentially in early stages and HCV-related HCC [41, 42]. Our observed frequency of CTNNB1 mutations (35.6%) and the affected nucleotide sequences (Supplement Table 1) agreed with the literature (17). Available data show associations of CTNNB1 mutation with favorable prognosis (especially with longer OS) [19]. Our data showed no association with OS or DFS, but we observe longer TTR (HR=0.31, $p=0.02$). Moreover, we found no association between CTNNB1 mutations and clinical or pathological data, which may be related to the non-viral etiology of the present patients compared to the majority of data originating from Asian populations with viral etiology.

TILs (T cells, B cells, natural killer (NK) cells) represent one of the elements of host immune response to tumor [5]. They may manifest pro- or anti-tumor characteristics dependent on lymphocyte subsets and their phenotypic orientation [43]. The role of TILs has been extensively explored in HCC [4, 5, 43, 44]. These results show that patients with high numbers of NK cells, B-cells, T-lymphocytes and dendritic cells had a favorable prognosis while poor prognosis was associated with high numbers of monocytes, neutrophils and Tregs [44]. Role of high CD8+ cell densities has been explored in many

cancers, including HCC, usually showing associations with improved prognosis [4, 45–47]. In HCC, CD8+ cells were among the prognostic factors considered in the meta-analysis by Xu et al., showing associations of CD8+ densities in tumor and its margin with higher OS and DFS [4]. As high density of CD8+ cells predicts a favorable OS and DFS they may be used as biomarker of patient prognosis. On par with available data, our CD8+ analysis also showed high predictive value for DFS (HR=0.41, $p=0.009$), but not OS [48]. In our research, we also observed influence of high density of CD8+ cells on longer TTR (HR=0.32, $p=0.005$).

Many analyses have been published showing association with DFS or OS, but we did not find any data considering TTR. We believe that among the survival parameters analysed by us, TTR is highly relevant for prognostication. TTR is a tumor-specific outcome in contrast to less specific endpoints DFS and OS.

Previous prognostic studies have either used genetic or immune cell markers, but we are not aware of previous studies combining the two. There is a scientific rationale for the combination, because mutations are present in the tumor and immune response is mounted by the tumor microenvironment. These may be viewed as independent predictors of outcome although they interact, and mutation frequency may generally stimulate immune response [49, 50]. We decided to explore combined effect of CTNNB1 mutation and CD8+ cells in TC and IM as the first scenario. The second scenario was to combine three observed genotypes in rs2853669 with CD8+ cell densities. In both scenarios, certain combinations of CD8+ cell densities with genetic alteration refined prognostic value of our results. Cases presenting β -catenin mutation and high CD8+ cell densities in TC/IM presented much longer TTR (HR=0.12, $p=0.005$ /HR=0.17, $p=0.005$ respectively) and longer DFS (HR=0.25, $p=0.01$ /HR=0.34, $p=0.02$) than cases presenting only one of these “good” prognostic factors (Table 3 and Fig. 2). Similar to the first scenario, the GG genotype in SNP rs2853669 combined with high density of CD8+ cells presented longer TTR and longer DFS in both tumor regions of interest (Table 3). We could demonstrate that the combination of genetic and immune variable presents a much better prognostic value than individual variables. Multivariable Cox regression was performed for both individual and combined factors. Some individual and combined factors lost their significance after adjustment. We believe that was provoked by size of our group thus, our multivariate results are not reliable.

Our study presents few limitations, the foremost being the low case number. The case numbers limit particularly our analysis for combined factors. Thus, our present data cover only a small segment of genetic and immune

landscape of tumor microenvironment. Nevertheless, we believe that a follow up study performed on greater number of cases and exploring different genetic alterations and different types of immune cells may further refine the prognostic tools. These data could be invaluable in treatment decision making.

Conclusion

Our results show that factors both in the tumor and its environment influence HCC survival. The best predictive values for TTR were obtained by combining data for CTNNB1 mutations and CD8+ cell densities. Although we were able to analyze the most common somatic mutations in HCC, we were able to use only one immune cell marker, CD8+ cells, in this first analysis validating the integrative approach. In the future, many more cell types of the tumor microenvironment need to be tested in combination with the genetic markers. Moreover, it seems that combination of TERTp mutation (position – 124bp) and rs2853669 may be a separate predictive factor for patients with non – viral etiology of HCC. The results, although based on small numbers of resected patients, are encouraging for study further integrative approaches for HCC risk stratification.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09989-0>.

Additional file 1.

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

Conceptualization: K.H. and V.L., methodology: F.A., A.T., L.C., R.V., O.D., Z.T., validation: F.A., A.T., R.V. and K.H., formal analysis: F.A., R.V. and A.T., investigation: F.A., A.T., V.H., M.A., resources: V.T., R.P., and V.L., data curation: F.A., A.T., R.P., V.T., L.C., writing original draft: F.A. and K.H., review and editing: A.T., K.H., R.V., V.L., O.D., supervision: K.H., project administration: V.L., funding acquisition: K.H. and V.L. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation pro-gramme under grant agreement N°856620, a grant of Ministry of Health of the Czech Republic AZV NU21–03–00506, Czech Science Foundation, project no. 21-14082S, project of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (INTER-ACTION no. LTA-USA-19032) and the programme Cooperatio no. 43 – Surgical Disciplines.

Availability of data and materials

The datasets generated and analyzed during the current study are available in the Open Science Forum repository. Data can be accessed openly from the link: <https://osf.io/2rwkj/>.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The Ethical approval for the study was given by the Ethical Board of Faculty of Medicine and University hospital in Pilsen (118/2021, 11 March 2021). The

need for informed consent was waived by the Ethical Board of Faculty of Medicine and University hospital in Pilsen (118/2021, 11 March 2021) because of the retrospective nature of the study. This study was carried out in accordance with the ethical standards laid down in the Declaration of Helsinki (2013 version).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Laboratory of Translational Cancer Genomics, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Alej Svobody 1665/76, 323 00 Pilsen, Czech Republic. ²Laboratory of Cancer Treatment and Tissue Regeneration, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Prague, Czech Republic. ³Department of Pathology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Ruská 87, 100 00, Prague 10, Czech Republic. ⁴Laboratory of Pharmacogenomics, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic. ⁵Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health in Prague, Prague, Czech Republic. ⁶Department of Surgery, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Alej Svobody 80, 323 00 Pilsen, Czech Republic. ⁷Sikl's Institute of Pathology, Faculty of Medicine and Teaching Hospital in Plzen, Charles University, Plzen, Czech Republic. ⁸Bioptická laboratoř s.r.o., Mikulášské nám, 4, 326 00 Pilsen, Czech Republic. ⁹Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Karlovarska 48, 301 66 Pilsen, Czech Republic. ¹⁰Laboratory of Quantitative Histology, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Alej Svobody 1665/76, 323 00 Pilsen, Czech Republic. ¹¹Department of Cancer Epidemiology, German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany.

Received: 30 March 2022 Accepted: 8 August 2022

Published online: 13 August 2022

References

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.
- Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Prim*. 2021;7:1.
- Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541(7637):321–30.
- Xu X, Tan Y, Qian Y, Xue W, Wang Y, Du J, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ T cells in patients with hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(2):e13923.
- Ding W, Xu X, Qian Y, Xue W, Wang Y, Du J, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(50):e13301.
- Bell RJA, Rube HT, Xavier-Magalhães A, Costa BM, Mancini A, Song JS, et al. Understanding TERT promoter mutations: a common path to immortality. *Mol Cancer Res*. 2016;14(4):315–23.
- Daniel M, Peek GW, Tollefsbol TO. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene*. 2012;498(2):135–46.
- Dratwa M, Wysoczanska B, Lacińska P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. TERT regulation and roles in Cancer formation. *Front Immunol*. 2020;11:589929.
- Chakravarti D, LaBella KA, DePinho RA. Telomeres: history, health, and hallmarks of aging. *Cell*. 2021;184(2):306–22.
- Heidenreich B, Kumar R. TERT promoter mutations in telomere biology. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2017;771:15–31.
- Hsu CP, Hsu NY, Lee LW, Ko JL. Ets2 binding site single nucleotide polymorphism at the hTERT gene promoter—effect on telomerase expression and telomere length maintenance in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2006;42(10):1466–74.
- Nagore E, Rachakonda S, Kumar R. TERT promoter mutations in melanoma survival. *Oncotarget*. 2019;10(16):1546–8.
- Rachakonda PS, Hosen I, de Verdier PJ, Fallah M, Heidenreich B, Ryk C, et al. TERT promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(43):17426–31.
- Simon M, Hosen I, Gousias K, Rachakonda S, Heidenreich B, Gessi M, et al. TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neuro-Oncology*. 2015;17(1):45–52.
- Ko E, Seo HW, Jung ES, Kim BH, Jung G. The TERT promoter SNP rs2853669 decreases E2F1 transcription factor binding and increases mortality and recurrence risks in liver cancer. *Oncotarget*. 2016;7(1):684–99.
- Tornesello ML, Buonaguro L, Tatangelo F, Botti G, Izzo F, Buonaguro FM. Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Genomics*. 2013;102(2):74–83.
- Gao C, Wang Y, Broadus R, Sun L, Xue F, Zhang W. Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: a review. *Oncotarget*. 2018;9(4):5492–508.
- Mo Z, Wang Y, Cao Z, Li P, Zhang S. An integrative analysis reveals the underlying association between CTNNB1 mutation and immunotherapy in hepatocellular carcinoma. *Front Oncol*. 2020;10:853.
- Wang Z, Sheng YY, Gao XM, Wang CQ, Wang XY, Lu XU, et al. beta-catenin mutation is correlated with a favorable prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Clin Oncol*. 2015;3(4):936–40.
- Galluzzi L, Chan TA, Kroemer G, Wolchok JD, Lopez-Soto A. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. *Sci Transl Med*. 2018;10(459).
- Galon J, Bruni D. Tumor immunology and tumor evolution: intertwined histories. *Immunity*. 2020;52(1):55–81.
- Shalpour S, Karin M. Pas de Deux: control of anti-tumor immunity by Cancer-associated inflammation. *Immunity*. 2019;51(1):15–26.
- Friemel J, Rechsteiner M, Frick L, Böhm F, Struckmann K, Egger M, et al. Intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2015;21(8):1951–61.
- Yuan X, Cheng G, Yu J, Zheng S, Sun C, Sun Q, et al. The TERT promoter mutation incidence is modified by germline TERT rs2736098 and rs2736100 polymorphisms in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(14):23120–9.
- Trailin A, Cervenková L, Ambrozkiwicz F, Ali E, Kasi P, Palek R, Hošek P, Třeška V, Daum O, Tonar Z, Liška V, Hemminki K. T- and B-cells in the inner invasive margin of hepatocellular carcinoma after resection associate with favorable prognosis. *Cancers*. 2022;14(3):604.
- Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, et al. Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the international Immunooncology biomarkers working group: part 1: assessing the host immune response, TILs in invasive breast carcinoma and ductal carcinoma in situ, metastatic tumor deposits and areas for further research. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(5):235–51.
- finalfit: Quickly Create Elegant Regression Results Tables and Plots when Modelling. <https://github.com/ewenharrison/finalfit>.
- survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. <https://rpkgs.datanovia.com/survminer/index.html>.
- A Package for Survival Analysis in R. R package version 3.2–13. <https://CRAN.R-project.org/package=survival>.
- Pezzuto F, Izzo F, Buonaguro L, Annunziata C, Tatangelo F, Botti G, et al. Tumor specific mutations in TERT promoter and CTNNB1 gene in hepatitis B and hepatitis C related hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(34):54253–62.
- Nault JC, Calderaro J, Di Tommaso L, Balabaud C, Zafrani ES, Bioulac-Sage P, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Hepatology*. 2014;60(6):1983–92.
- Pezzuto F, Buonaguro L, Buonaguro FM, Tornesello ML. Frequency and geographic distribution of TERT promoter mutations in primary hepatocellular carcinoma. *Infect Agent Cancer*. 2017;12:27.
- Pezzuto F, Izzo F, De Luca P, Biffali E, Buonaguro L, Tatangelo F, Buonaguro FM, Tornesello ML. Clinical significance of telomerase reverse-transcriptase promoter mutations in hepatocellular carcinoma. *Cancers*. 2021;13(15):3771.
- Chen YL, Jeng YM, Chang CN, Lee HJ, Hsu HC, Lai PL, et al. TERT promoter mutation in resectable hepatocellular carcinomas: a strong association with hepatitis C infection and absence of hepatitis B infection. *Int J Surg*. 2014;12(7):659–65.

35. Lee HW, Park TI, Jang SY, Park SY, Park WJ, Jung SJ, et al. Clinicopathological characteristics of TERT promoter mutation and telomere length in hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(5):e5766.
36. Rachakonda S, Hoheisel JD, Kumar R. Occurrence, functionality and abundance of the TERT promoter mutations. *Int J Cancer*. 2021;149(11):1852–62.
37. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad IB, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2012;44(6):694–8.
38. Waisberg J, Saba GT. Wnt β -catenin pathway signaling in human hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2015;7(26):2631–5.
39. Wong CM, Fan ST, Ng IO. β -catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer*. 2001;92(1):136–45.
40. Mao TL, Chu JS, Jeng YM, Lai PL, Hsu HC. Expression of mutant nuclear β -catenin correlates with non-invasive hepatocellular carcinoma, absence of portal vein spread, and good prognosis. *J Pathol*. 2001;193(1):95–101.
41. Hsu HC, Jeng YM, Mao TL, Chu JS, Lai PL, Peng SY. β -catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *Am J Pathol*. 2000;157(3):763–70.
42. Khalaf AM, Fuentes D, Morshid AI, Burke MR, Kaseb AO, Hassan M, et al. Role of Wnt/ β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. *J Hepatocell Carcinoma*. 2018;5:61–73.
43. Hiraoka N. Tumor-infiltrating lymphocytes and hepatocellular carcinoma: molecular biology. *Int J Clin Oncol*. 2010;15(6):544–51.
44. Hsiao Y-W, Chiu L-T, Chen C-H, Shih W-L, Lu T-P. Tumor-infiltrating leukocyte composition and prognostic power in hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinomas. *Genes*. 2019;10(8):630.
45. Zheng X, Song X, Shao Y, Xu B, Chen L, Zhou Q, et al. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(34):57386–98.
46. Huang Y, Ma C, Zhang Q, Ye J, Wang F, Zhang Y, et al. CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*. 2015;6(19):17462–78.
47. Mei Z, Liu Y, Liu C, Cui A, Liang Z, Wang G, et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2014;110(6):1595–605.
48. Sun C, Xu J, Song J, Liu C, Wang J, Weng C, et al. The predictive value of Centre tumour CD8 $^{+}$ T cells in patients with hepatocellular carcinoma: comparison with Immunoscore. *Oncotarget*. 2015;6(34):35602–15.
49. Bi F, Chen Y, Yang Q. Significance of tumor mutation burden combined with immune infiltrates in the progression and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Cell Int*. 2020;20:373.
50. Melo CM, Vidotto T, Chaves LP, Lautert-Dutra W, Reis RBD, Squire JA. The role of somatic mutations on the immune response of the tumor micro-environment in prostate Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(17):9550.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Příloha č. V: Sekvenování exomu párových vzorků kolorektálního karcinomu a synchronních jaterních metastáz pro prognózu a předpověď terapie

Exome Sequencing of Paired Colorectal Carcinomas and Synchronous Liver Metastases for Prognosis and Therapy Prediction

Viktor Hlaváč, PhD, MSc¹; Lenka Červenková, MD^{2,3}; Simona Šusová, MSc¹; Petr Holý, MSc^{1,3}; Václav Liška, MD, PhD^{2,4}; Ondřej Vyčítal, MD, PhD^{2,4}; Ondřej Šorejs, MD^{2,5}; Ondřej Fiala, MD, PhD^{2,5}; Ondřej Daum, MD, PhD⁶; and Pavel Souček, PhD, MSc¹

PURPOSE Analysis of somatic variant profiles in retrospectively collected pairs of primary tumors and synchronous liver metastases from surgically treated patients with colorectal carcinomas. Mutational profiles were compared between groups of patients stratified by response to chemotherapy and survival.

PATIENTS AND METHODS The study used whole-exome sequencing of tumor sample pairs from 20 patients diagnosed and treated at a single center. The Cancer Genome Atlas COAD-READ data set (n = 380) was used for validation in silico, where possible.

RESULTS The most frequently altered oncodrivers were *APC* (55% in primaries and 60% in metastases), *TP53* (50/45), *TRIP11* (30/5), *FAT4* (20/25), and *KRAS* (15/25). Harboring variants with a high or moderate predicted functional effect in *KRAS* in primary tumors was significantly associated with poor relapse-free survival in both our sample set and the validation data set. We found a number of additional prognostic associations, including mutational load, alterations in individual genes, oncodriver pathways, and single base substitution (SBS) signatures in primary tissues, which were not confirmed by validation. Altered *ATM*, *DNAH11*, and *MUC5AC*, or a higher share of SBS24 signature in metastases seemed to represent poor prognostic factors, but because of a lack of suitable validation data sets, these results must be treated with extreme caution. No gene or profile was significantly associated with response to chemotherapy.

CONCLUSION Taken together, we report subtle differences in exome mutational profiles between paired primary tumors and synchronous liver metastases and a distinct prognostic relevance of *KRAS* in primary tumors. Although the general scarcity of primary tumor-synchronous metastasis sample pairs with high-quality clinical data makes robust validation difficult, this study provides potentially valuable data for utilization in precision oncology and could serve as a springboard for larger studies.

JCO Precis Oncol 7:e2200557. © 2023 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Colorectal carcinoma (CRC) is the second leading cause of death among malignant diagnoses (915,880 deaths in 2020) worldwide.¹ Although the 5-year survival of patients with localized or regional disease is between 70% and 90%, patients diagnosed with advanced stage IV have a 5-year survival rate below 20%.² Approximately 20%-25% of patients with CRC present with synchronous liver metastases, defined in this study as metastases diagnosed before, during, or in the period 3-6 months after the primary tumor surgery.^{3,4}

Most of the patients undergo chemotherapy with FOLFOX or FOLFIRI regimen, eventually combined with targeted therapy on the basis of the patient's *RAS/BRAF* mutational status, for example, monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors blocking vascular endothelial growth factor (VEGF) or epidermal growth factor

receptor (EGFR), such as bevacizumab, regorafenib, cetuximab, or panitumumab.⁵ Surgical resection of metastatic loci improves survival, but most patients experience relapse and have a poor prognosis.⁶

Genomics has brought the first useful biomarkers for the choice of therapy for patients with CRC, that is, assessment of variants in the *RAS* gene panel or *BRAF* became mandatory for treatment with the anti-EGFR therapy.⁷ Thus, the assessment of intratumoral genetic profiles is an integral part of personalized therapy in CRC. Previous whole-genome sequencing (WGS) or whole-exome sequencing (WES) studies focused predominantly on the characterization of primary tumors.^{8,9} Only a few studies characterized WGS/WES somatic profiles of primary and hepatic metastatic loci in patients with CRC,¹⁰⁻¹² and even fewer used synchronous metastases only.^{13,14} More importantly, information about the genetic signature of the response

ASSOCIATED CONTENT

Data Supplement

Author affiliations and support information (if applicable) appear at the end of this article.

Accepted on February 28, 2023 and published at ascopubs.org/journal/po on May 4, 2023; DOI <https://doi.org/10.1200/P0.22.00557>

CONTEXT

Key Objective

Metastatic colorectal cancer has a high relapse rate and poor prognosis despite a number of targeted therapies available.

Routine genomic testing is predominantly used in primary tumors. Differences in genomic profiles of primary and metastatic tumors have not been sufficiently described. To address this, we performed whole-exome sequencing of primary-synchronous hepatic metastasis pairs from a highly curated set of 20 Czech patients.

Knowledge Generated

We describe differences in mutation rates in multiple genes, as well as in single base substitution mutational signature spectra, and confirm the prognostic relevance of *KRAS* in primary tumors, but its lack in synchronous hepatic metastases.

Relevance

We provide unique mutation data in hard-to-obtain samples in a specific homogeneous cohort. We underline the fact that synchronous metastases often differ from primary tumors in mutational profiles, which may influence therapy effectiveness, but also provide therapeutic opportunities. The need for larger high-quality studies of primary-metastasis colorectal carcinoma pairs is apparent.

to therapy, which could be used for targeted treatment of metastases and to limit further cancer spread, is still very scarce.

This study aimed to analyze the whole-exome somatic variant spectra in primary tumors and synchronous hepatic metastases of a retrospectively collected cohort of patients with surgically resected CRC, treated with antimetabolite-based regimens. We compared genetic alterations in individual genes and pathways, copy-number variation (CNV), and mutational signatures in patients stratified by their response to therapy and survival, providing a lead for follow-up studies focused on using these somatic profiles in precision oncology.

PATIENTS AND METHODS

The complete data about patients, DNA isolation and quality control, library preparation, raw data preprocessing and variant detection, variant annotation and interpretation, external validation, and statistical evaluation are provided in the Data Supplement.

All authors had access to the study data, and reviewed and approved the final manuscript. Procedures performed in this study followed the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or other but highly comparable ethical standards. The study protocol was approved by the Ethical Commission of the Faculty of Medicine and University Hospital in Pilsen (approval no. 19-08-00113 of June 7, 2018).

RESULTS

Clinical Characteristics of the Patients

The baseline clinical characteristics of all patients with WES data are summarized in the Data Supplement. The median relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS) of the patients were 13 and 42 months, respectively. In total, 17 patients (85%) deceased during the follow-up.

General Descriptors of Whole-Exome Sequencing and Variant Profiling

The average coverage of sequenced regions in primary tumors and metastases was 199.4 ± 125.9 (median 165) and 186.6 ± 104.8 (median 136), respectively. As the median, 54% (min. 5%-max. 92%) of bases were covered at least 30× in primary tumors and 45% (6%-85%) of bases were covered at least 30× in metastatic tissues. A median of 49% of bases was covered at least 30× in all samples.

To minimize the number of false-positive calls in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples, somatic variants were then filtered on the basis of selected quality filtration criteria. This filtering improved the comparability of the sample set with The Cancer Genome Atlas (TCGA) variant counts (Data Supplement). More importantly, the correlation of variant counts with the initial quality of input DNA (assessed by quantitative polymerase chain reaction) assessed by Pearson's correlation test decreased from 0.83 to 0.50, suggesting a value of the filtering step for the improvement of data quality. The total number of somatic variants per sample after filtering was 206.8 ± 71.9 on average (median 183, ranging from 137 to 452) in primaries and 207.9 ± 53.1 (210, 97-335) in metastases. Counts of somatic variants for all patients and both sample types, including tumor mutation burden (TMB) and microsatellite instability (MSI), are shown in the Data Supplement. No sample was classified as TMB-high (cutoff 10 variants/Mb) or MSI-unstable (threshold 20%). The most common class of variants in both primary tumors and metastases was missense variant (Fig 1A) and the most frequent type was single-nucleotide variant (Fig 1B), followed by deletion and insertion. The most common nucleotide change was the C to T transition (Fig 1C). The top altered genes in both sample types were *APC*, *TP53*, and *TTN* with somatic variants in more than 50% of patients (Fig 1D).

Frequently mutated genes (FLAGS)¹⁵ described genes that are altered in solid tumors but are unlikely to have a

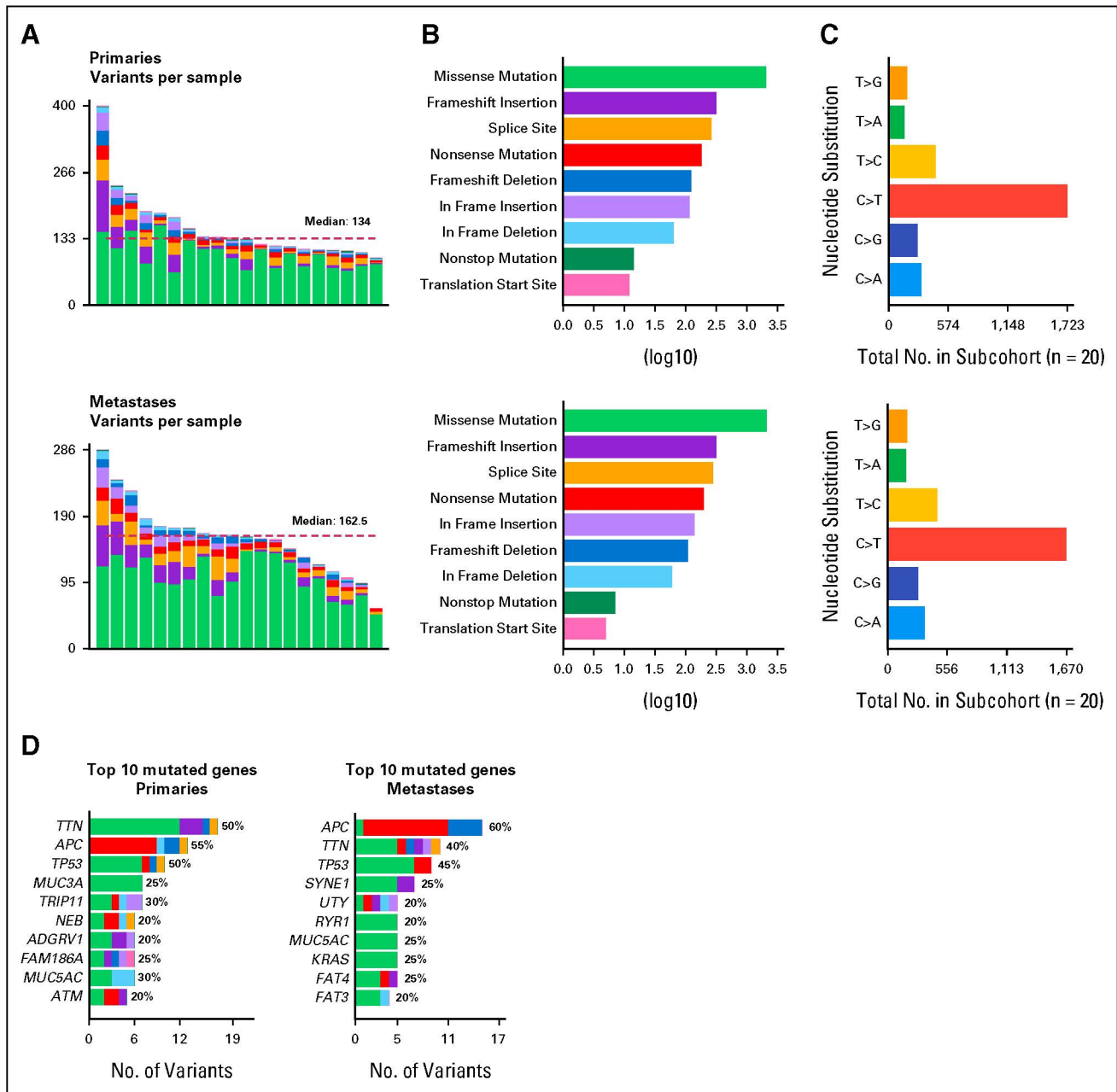
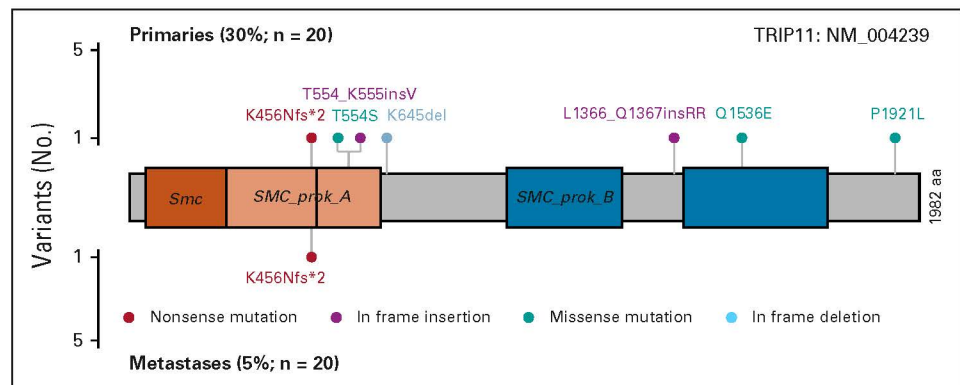


FIG 1. Distribution of somatic variants in primary and synchronous hepatic metastasis samples of patients with CRC. (A) Variant counts per sample with color corresponding to classification in (B). (B) Classification of variants according to their functional impact with counts on the x-axis in the log10 scale to help visualize also less frequent classes. (C) Types of nucleotide changes and (D) top 10 genes by the number of unique variants (x-axis), percentages of patients harboring any variant in the indicated genes next to the bars, and color coding the same as for (B). CRC, colorectal carcinoma.

pathogenic effect. When we filtered out the top 20 scored genes listed in FLAGS (Data Supplement), the most frequently altered genes with >20% mutational rates remained *APC*, *TP53*, *TRIP11*, *MUC5AC*, *MUC3A*, and *FAM186A* in primaries, and *APC*, *TP53*, *MUC5AC*, *FAT4*, and *KRAS* in metastases, all of which are depicted in the Data Supplement. Especially, the mutational rates in *TRIP11* differed markedly (30% in primaries v 5% in metastases—Fig 2), although the result was not statistically significant because of the low number of patients involved ($P = .091$).

Closer inspection of variant types in individual highly altered genes indicated that most variants in *APC* have a predicted functional effect (nonsense or frameshift), although they are located outside of functional domains, while in the *TP53*, missense variants dominate (Data Supplement). Concerning *KRAS* (altered in 15% primaries v 25% metastases), two patients had the G12V variant in metastatic tissues, which was not seen in paired primary tumors. One patient had the G12C and two G13D consensual variant calls in both tissue types (Data Supplement).

FIG 2. Lollipop plot of topology of *TRIP11* variants in primary tumors (top) and metastases (bottom) of patients with CRC. CRC, colorectal carcinoma.



Furthermore, we performed pathway analysis by comparing variant rates in 13 established colorectal cancer pathways.^{16,17} We found more variants in RTK-RAS and Hippo pathways in metastases compared with primaries (Data Supplement). By contrast, primaries had more WNT pathway variants than metastases (Data Supplement). However, none of these differences were statistically significant. Three pathways (cell cycle, MYC, and NRF2) were not altered in any sample and thus were not evaluated further.

Analysis of co-occurrence (genes that tend to be altered together) revealed a significant cosegregation of variants in *DNAH11* with *ZFC3H1* and *BAZB1* with *MUC17* ($P < .01$), while no significant mutual exclusivity (the opposite of co-occurrence) was observed in primary tumors. However, in metastases, variants in *ADGRL3* significantly cosegregated with those in *NPIP11* ($P < .01$). No mutual exclusivity was again apparent (Data Supplement).

Next, relative contributions of reference single base substitution (SBS) mutational signatures were determined for each tumor sample (Data Supplement). A total of 72 SBSs were found in either primary or metastatic tissues. The comparison of the top 12 SBS mutational signatures for primaries and paired metastases (SBS1/6/7b/10b/15/16/24/30/39/54/86/87) is shown in Figure 3A. The share of SBS17a and SBS28 was significantly higher ($P = .031/P_{\text{adj}} = 1.000$ and $P = .043/P_{\text{adj}} = 1.000$, respectively), while that of SBS55 was lower ($P = .028/P_{\text{adj}} = 1.000$) in metastases compared with primaries. SBS3, SBS11, SBS27, SBS56, and SBS85 were found only in primary tumors and not metastases, and SBS18, SBS27, SBS45, SBS84, SBS89, and SBS90 were unique to metastases. However, no tissue-specific SBSs were observed in more than three samples and the majority were private (Fig 3B). High correlations ($r^2 > 0.7$; $P < .001$) between SBS pairs 1-7b and 17a-86 in primaries and 7b-13, 7c-60, 17a-16, and 17b-86 in metastases were observed. Identical analysis with the TCGA validation data set generated the same top SBSs for primary tumors (Data Supplement).

CNVs were also called and filtered on read depth and B-allele frequency (Data Supplement). The frequency plot of CNVs showing the difference between primary tumors and liver metastases is depicted in Figure 4. Obviously, higher

differences were in copy-number losses than gains. More CNV losses in metastases than primary tumors were seen on chromosomes 1, 10, and 16, and fewer on chromosomes 6, 7, 11, 12, 14, 17, 18, and 19. More gains in metastases than in primaries were located on chromosomes 7, 10, 15, and 18, and fewer gains were on chromosomes 1, 8, and 12.

The counts of segments with CNVs were comparable among primary tumors and synchronous metastases ($P > .05$). Primary tumors bore on average 57.4 ± 45.9 (median, 33.5; range, 15-150) CNVs, while metastases bore 49.0 ± 38.5 (median, 33; range, 8-130) CNVs on average. The average size of CNVs was almost equal (23 and 21 Mbp, respectively). Primary tumors did not significantly differ from metastases in the average size of CNVs ($P > .05$).

The Genetic Profile of Patients Divided by the Objective Response to the Neoadjuvant Systemic Therapy

In total, 67% of patients treated with neoadjuvant systemic therapy achieved partial remission (PR) (no patient achieved complete response) and the rest were considered poor responders (those achieving stable disease or progressive disease; Data Supplement). We compared the TMB, individual gene and pathway variants (genes and pathways listed in the Data Supplement), SBS mutational signature exposures, and CNVs in primary tumors and metastases of these two patient subgroups. Patients classified as good responders had a lower TMB than poor responders (134 v 154 and 158 v 161 variants per primary tumor and metastasis sample, respectively), while this difference was not significant ($P > .05$). Primary tumors of two poor responders had functionally impactful types of alterations (nonsense and splice site, plus two missense in the main P53 domain), which were not seen in the good responder subgroup, where just one frameshift deletion and several missense variants were found (Data Supplement).

We then performed analyses with individual genes and pathways according to functional predictions. For this purpose, separate analyses were made with genes having variants classified as a HIGH or MODERATE effect. Primary tumors of poor responders carried significantly more variants in the TRAIL pathway than good responders

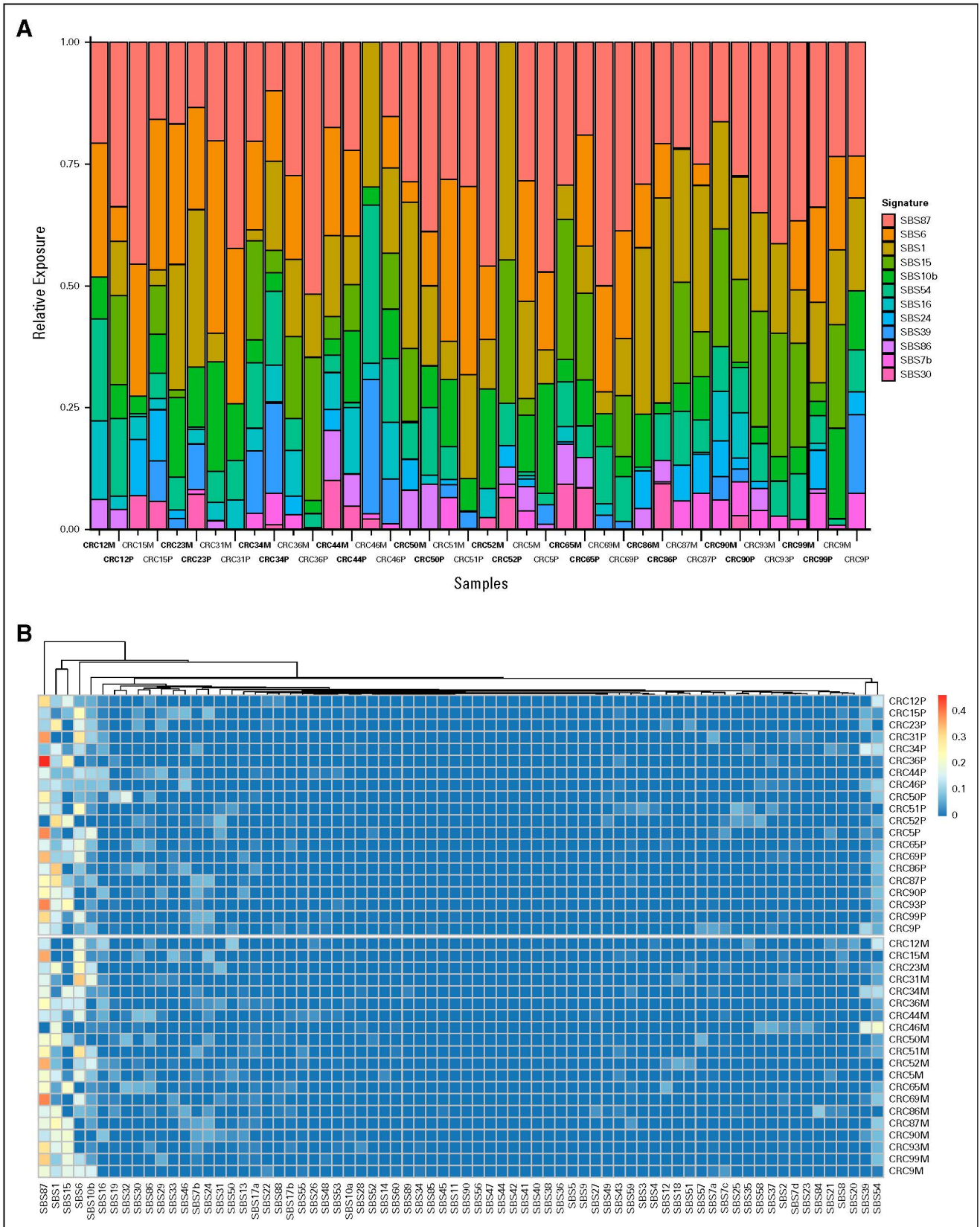


FIG 3. Mutational signatures in primary tumors and hepatic metastases from patients with CRC. Mutational signatures in primary tumors (CRC-P) and paired liver metastases (CRC-M). (A) Bar plot of top 12 signatures in pairs of metastases and primary tumors and (B) heatmap of the relative exposure to all 72 COSMIC SBS mutational signatures (v3.1) in primary tumors (top) and paired metastases (bottom), with horizontal hierarchical clustering. CRC, colorectal carcinoma; SBS, single base substitution.

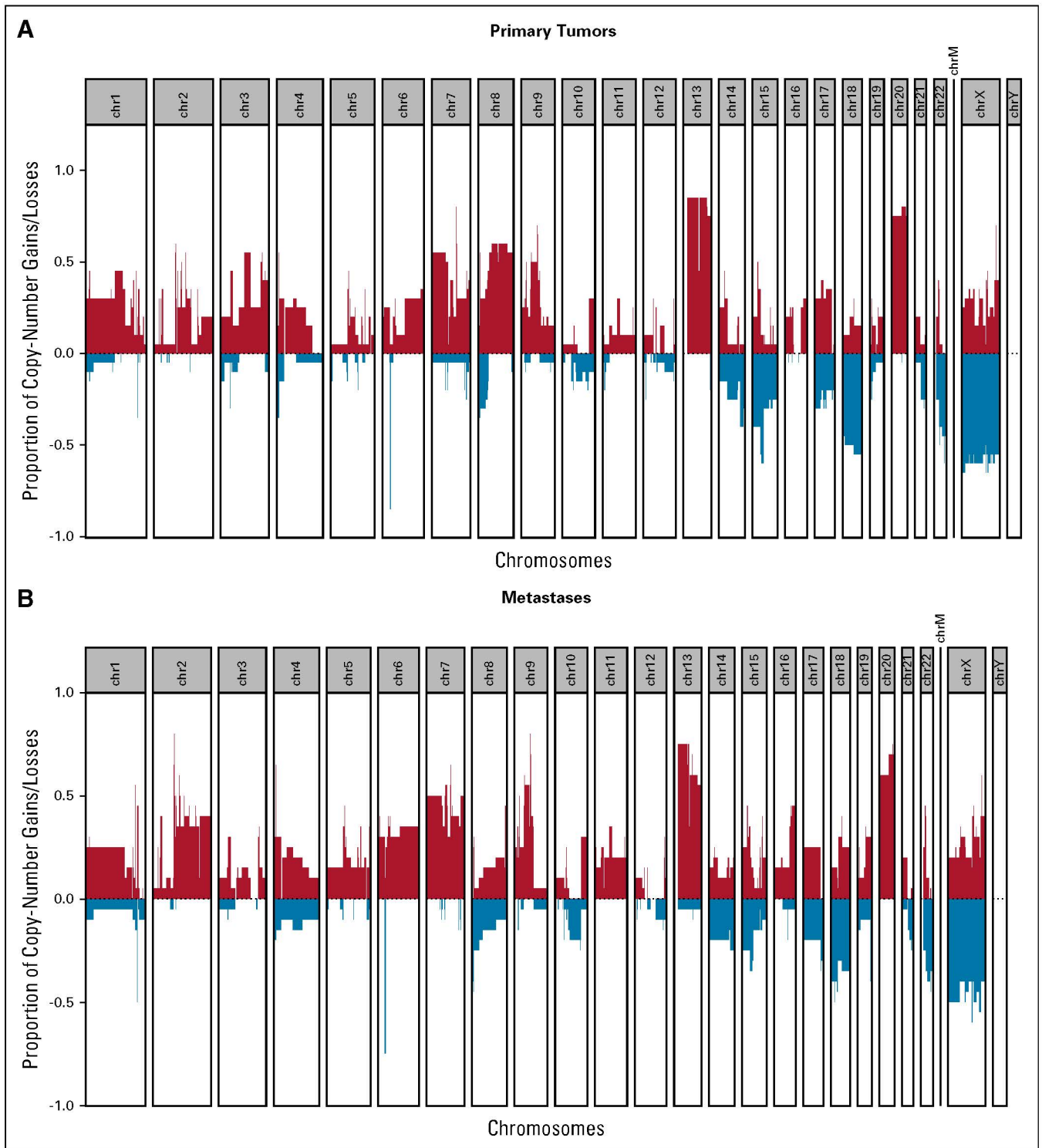


FIG 4. Copy-number aberrations in (A) primary tumors and (B) synchronous liver metastases depicted as gains (red) and losses (blue).

($P = .022/P_{adj} = .219$). In metastatic tissues, poor responders had significantly more variants in the *MUC3A* ($P = .022/P_{adj} = .506$; Data Supplement).

The comparison of TMB of primaries or metastases ($n = 20$) with the TCGA COAD and READ data sets ($n = 406$ and 150 , respectively) showed comparable results (Data Supplement).

Between subgroups stratified by the response, there was no notable difference in TMB as well (Data Supplement).

The distribution of SBSs and the average count or size of CNVs per tumor sample did not significantly associate with the chemotherapy response status of patients ($P > .05$; Data Supplement).

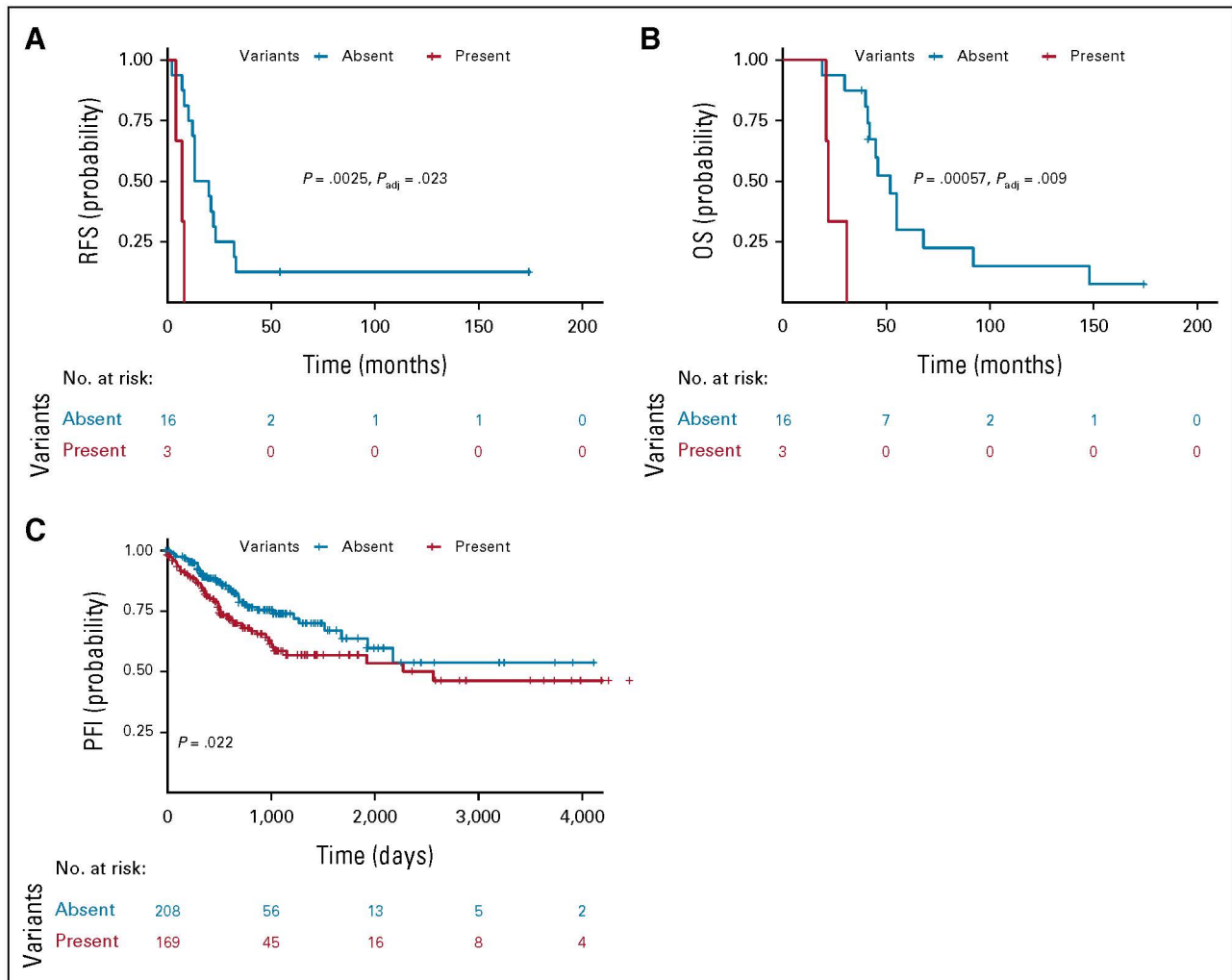


FIG 5. Kaplan-Meier plots of associations of alterations in *KRAS* in primary tumors of colorectal cancer patients with their survival. (A) RFS and (B) OS of patients in this study, and (C) PFI of the TCGA data set divided by *KRAS* variants with HIGH or MODERATE predicted effect in primary tumors. It should also be taken into consideration that patients with primary tumors in the TCGA have much better prognosis because of the overwhelming fraction of locally and regionally advanced disease character compared with our sample set. Therefore, the median PFI was not reached and its mean is shown instead. PFI in days is displayed to maintain authenticity. OS, overall survival; PFI, progression-free interval; RFS, relapse-free survival; TCGA, The Cancer Genome Atlas.

Genetic Profile of Patients Divided by Response to the Palliative Systemic Therapy After Relapse

We also compared overall TMB, individual gene and pathway variants, the distribution of SBSs, and CNVs in metastases of patients experiencing relapse after liver metastasis resection and subsequently receiving palliative systemic therapy, with the available response. In total, 67% ($n = 4$) of treated patients achieved PR and the rest were considered poor responders ($n = 2$; Data Supplement). We observed that all liver metastases of patients with good response to palliative systemic therapy harbored functional variants in *APC*, while only one poor responder had such a variant. Both poor responders and none of the good responders had variants in *HERC1*. Several other genes had disproportion in variant frequencies between both subgroups of patients (Data Supplement). Patients poorly responding to palliative

systemic therapy had a significantly higher share of SBS39 than good responders ($P = .018/P_{adj} = .216$). No difference in CNVs was observed ($P > .05$). Because this analysis is based on small numbers of observations, its results must be treated with extreme caution.

Survival Analysis

Finally, we performed a survival analysis. We considered the overall TMB, frequently altered individual genes, oncogene pathways, SBSs, CNVs, and known cancer-driving, actionable, or druggable pathways.¹⁸⁻²¹ For analyses, we used only variants whose predicted functional impact was HIGH or MODERATE. A number of associations with RFS or OS were found, but the TCGA validation of most associations in primary tumors failed, and as such, the results are presented in the Data Supplement. Associations of alterations in metastatic tissues with RFS or OS could not be validated because of the

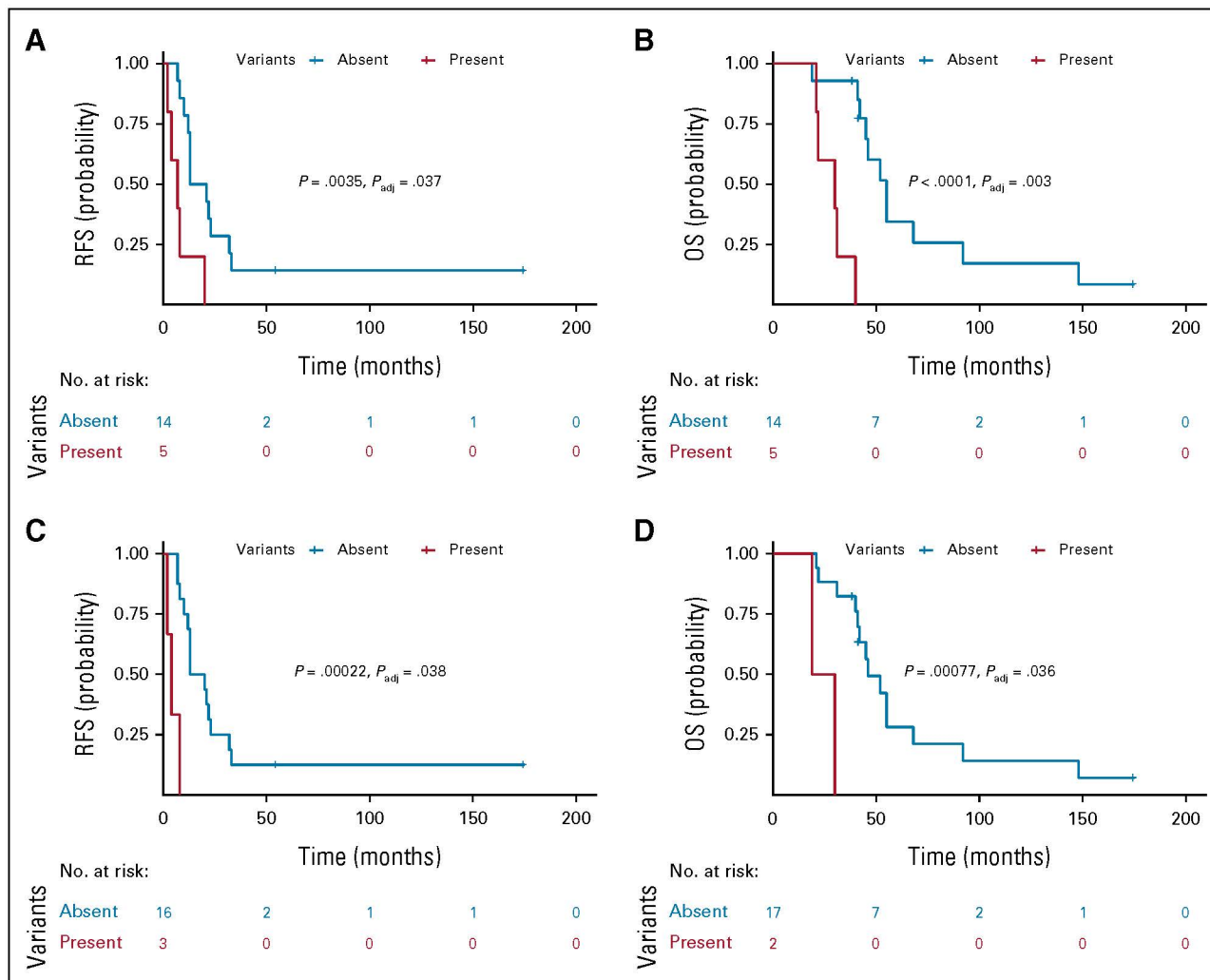


FIG 6. Kaplan-Meier plots of survival associations of genes altered in hepatic metastases of colorectal cancer patients with their survival. (A) RFS and (B) OS of patients in this study divided by the presence of *MUC5AC* variants with HIGH or MODERATE predicted effect in hepatic metastases, (C) RFS for *ATM*, and (D) OS for *DNAH11* in the same setting. OS, overall survival; RFS, relapse-free survival.

lack of suitable data sets and thus must be considered with extreme caution before such validation can be performed.

Patients with primary tumors harboring *KRAS* variants had significantly shorter RFS and OS ($P = .002/P_{adj} = .023$ and $P = .0006/P_{adj} = .009$, respectively; Figs 5A and 5B) than patients without such variants, while no such association was observed in metastases. The association with RFS was validated in the TCGA COAD-READ data set (Fig 5C). Conversely, patients with variants in *MUC5AC* in metastases had significantly shorter RFS and OS ($P = .004/P_{adj} = .037$ and $P = .00006/P_{adj} = .003$, respectively; Figs 6A and 6B) than those without, and no such association was found in primary tumors. In addition, patients harboring variants in *DNAH11* in metastases had significantly worse OS ($P = .0008/P_{adj} = .038$; Fig 6C). Finally, the presence of variants in *ATM* was associated with shorter RFS in both primary tumors ($P = .018/P_{adj} = .138$; Data Supplement) and

metastases ($P = .0002/P_{adj} = .005$; Fig 6D), while in primary tumors, it was not confirmed by the TCGA analysis (Data Supplement). All associations presented in Figure 6 passed the false discovery rate (FDR) correction.

Analyses of oncogene pathways, top 12 most frequently occurring SBSs (top 10 in primaries + top 10 in metastases), CNVs, and clinically actionable gene panels revealed a number of associations whose TCGA validation failed for primary tumors or did not pass the FDR test for metastases (Data Supplement).

Because of the low number of patients ($n = 5$), the progression-free survival of patients after treatment with palliative systemic therapy was not evaluated.

DISCUSSION

In this study, we aimed to provide a comprehensive overview of genetic alterations within the coding part of the

genome of paired primary tumors and synchronous hepatic metastases of patients with CRC stratified by the response to oncological therapy and survival.

Generally, our results show that primary tumors and liver metastases do not considerably differ in the overall TMB. We observed certain discrepancies in counts and types of variants in individual genes or oncodriver pathways between both tumor loci, but no statistically significant associations with response to neoadjuvant systemic therapy before metastasis resection.

Despite the above, we noticed that primary tumors of two poor responders had functionally impactful types of *TP53* alterations (nonsense and splice site, plus two missense in the main P53 domain). By contrast, just one frameshift deletion and several missense variants were found in the good responder subgroup. This observation suggests that tumor cells with inactivating *TP53* variants may be one of the key features of relapsing tumors and suitable for targeted therapy,²² for example, by adavosertib, an inhibitor of WEE1, the principal regulator of the G2/M checkpoint.²³

Patients harboring *KRAS* variants in primary tumors had poor RFS and OS, while the association with progression-free interval was confirmed in the TCGA COAD-READ data set.²⁴ A recent large study (N = 13,101) also demonstrated the negative prognostic significance of *KRAS* mutant status in the overall CRC patient population (multivariable hazard ratio, 1.11; 95% CI, 1.01 to 1.22 for the CRC-specific mortality²⁵). The count of *KRAS* variants in primary tumors in this study (15%) was somewhat lower than the previously published frequency of around 40%.²⁶ We attribute this discrepancy to the fact that patients with tumors harboring *KRAS* variants have generally more aggressive disease, a worse prognosis, and a lower probability of getting their liver metastases surgically resected.²⁷ In terms of therapeutic intervention, we also noticed the accumulation of *KRAS* variants in metastases compared with primary tumors (25%). Thus, targeted therapy with anti-EGFR antibodies or tyrosine kinase inhibitors may be less accessible for these patients. One patient carried the potentially targetable *KRAS*-G12C variant²⁸ in both primary tumor and metastasis, opening wider options for individualized therapy. It is also worth mentioning that other *KRAS* variants seem to be targetable by adavosertib.²⁹

Several genes, for example, *MUC5AC* and *DNAH11*, were significantly, after FDR, associated with survival of patients only when altered in metastases, and the presence of variants in *ATM* was associated with poor RFS no matter the tumor tissue type. However, because of the lack of suitable data sets for validation in synchronous hepatic metastatic loci, a conclusive assessment is not possible. Data from previous studies are not available in the Sequence Read Archive or comparable publicly accessible databases, representing a serious hurdle.

To enhance the clinical context of our findings, we present a simplified overview of potentially targetable somatic profiles of patients with poorly responding primary tumors and metastases or generally poor survival (Data Supplement). This comparison shows that all patients responding poorly to neoadjuvant systemic therapy (n = 5) had potentially targetable variants in actionable genes, including *KRAS* or *TP53*, in their primary tumors, while this potential decreased in corresponding liver metastases. This tendency is obvious also in poorly surviving patients with RFS \leq median (13 months; n = 11), where the target information is less trackable in metastases than in primary tumors. We need more studies to validate the present data and extend considerations about the clinical context of genomic primary-metastatic loci profiling.

According to our results, *TRIP11* may represent a new candidate driver gene in CRC metastasis because of the remarkable difference in counts of its variants observed between primary tumors and corresponding metastases (30% v 5%). The analysis of protein-protein interaction networks by the STRING tool³⁰ identified associations with the RAS family of proteins (Data Supplement), highly relevant to CRC oncogenesis, prognosis, and therapy. Future functional studies should help better understand these observations.

A modest sample size, especially in subgroup analyses, may be seen as a major study limitation. Sample pairs of primary tumors and metastatic tissues of suitable quality are, for many reasons, hard to obtain. Therefore, previous studies have reported comparable patient numbers.¹¹⁻¹⁴ We considered increasing the size by including metachronous metastases, but both types of CRC liver metastases have different prognoses³¹ and therapy scenarios. Metachronous metastases have a better prognosis, but it is also definitely a more heterogeneous setting, given the different times to progression after adjuvant therapy. We, therefore, limited the current study to a more homogeneous group of synchronous metastases. However, our study was designed to deliver substantially higher coverage compared with available reports. Second, the use of FFPE samples increases the risk of overestimation of mainly C>T transitions because of the formation of cross-linking byproducts during long-term storage³² and currently, no standardized method for elimination of this phenomenon exists.³³ In this study, we applied very stringent filtering criteria during the preprocessing of raw data, on the basis of high variant allele frequency, the number of reads required, and very low allelic frequencies in the gnomAD database. This processing harmonized TMB output with the TCGA data sets COAD and READ. Last, the WES design, together with the FFPE type of samples, did not allow an analysis of large structural variants and the noncoding part of the genome, all of which could be detected by WGS. Nonetheless, the high-coverage WES chosen by us brings deeper insight into potentially functional parts of the genome. Moreover, a

relative scarcity of clear links between noncoding areas and cancer was reported recently.³⁴ We also need to stress the limitations connected with the TCGA validation, that is, incompleteness of data on many clinical covariates in TCGA, variability in sample types and quality, differences in sequencing platforms and target coverage, and the overall uncertainty regarding the clinical comparability of the cohorts (eg, ethnic and prognostic heterogeneity).

In conclusion, our study confirms the previously reported high rates of *APC*, *TP53*, and *KRAS* variants, and the general similarity of mutational profiles between primary tumors and paired hepatic metastases. However, we discovered new candidate genes with putative prognostic impact, which differ between both tumor tissue loci and may further contribute to the future concept of precision medicine.

AFFILIATIONS

¹Laboratory of Pharmacogenomics, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

²Laboratory of Translational Cancer Genomics, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

³Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

⁴Department of Surgery, Faculty of Medicine and University Hospital in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

⁵Department of Oncology and Radiotherapeutics, Faculty of Medicine and University Hospital in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

⁶Department of Pathology, Faculty of Medicine and University Hospital in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

CORRESPONDING AUTHOR

Pavel Souček, Laboratory of Pharmacogenomics, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen 306 05, Czech Republic; e-mail: pavel.soucek@fp.cuni.cz.

PRIOR PRESENTATION

Presented at EU Inter-Cost Action CA17118 Transcolonic Meeting, Barcelona, Spain, June 1-3, 2022, as an invited presentation.

SUPPORT

Supported by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports project no. LTC19015, EU Inter-Cost Action CA 17118 (TRANSCOLONCAN), the Czech Health Research Council grant no. NV19-08-00113 to P.S., and the Grant Agency of Charles University Program Cooperation—Surgical Disciplines, no. 207043 to V.L.

DATA SHARING STATEMENT

All data generated or analyzed during this study are included in this published article. Sequencing data aligned to the canonical hg38 reference genome (BAM files) were submitted to the Sequence Read Archive (SRA) under the BioProject ID: PRJNA866168 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA866168>).

REFERENCES

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al: Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 71:209-249, 2021
- American Cancer Society: Information and resources about cancer: Breast, colon, lung, prostate, skin. <https://www.cancer.org>
- Manfredi S, Lepage C, Hatem C, et al: Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg* 244:254-259, 2006
- Siriwardena AK, Mason JM, Mullamitha S, et al: Management of colorectal cancer presenting with synchronous liver metastases. *Nat Rev Clin Oncol* 11:446-459, 2014
- Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al: ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 27:1386-1422, 2016
- Imai K, Allard MA, Benitez CC, et al: Early recurrence after hepatectomy for colorectal liver metastases: What optimal definition and what predictive factors? *Oncologist* 21:887-894, 2016
- De Rooij W, Claes B, Bernasconi D, et al: Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 11:753-762, 2010

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Pavel Souček

Collection and assembly of data: All authors

Data analysis and interpretation: Viktor Hlaváč, Petr Holý, Pavel Souček

Manuscript writing: All authors

Final approval of manuscript: All authors

Accountable for all aspects of the work: All authors

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The following represents disclosure information provided by authors of this manuscript. All relationships are considered compensated unless otherwise noted. Relationships are self-held unless noted. I = Immediate Family Member, Inst = My Institution. Relationships may not relate to the subject matter of this manuscript. For more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to www.asco.org/rwc or ascopubs.org/po/author-center.

Open Payments is a public database containing information reported by companies about payments made to US-licensed physicians ([Open Payments](http://OpenPayments)).

Ondřej Fiala

Honoraria: Novartis/Pfizer, Janssen Oncology, Merck/Pfizer, Pfizer

Speakers' Bureau: Novartis/Pfizer, Janssen Oncology, Merck/Pfizer, Pfizer

No other potential conflicts of interest were reported.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank the National Center for Medical Genomics (<https://ncmg.cz/en>) for data on Czech population-specific genetic variants used during base recalibration and all participating patients for their kind consent to the study and clinical personnel for outstanding support.

8. The Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487:330-337, 2012
9. Giannakis M, Mu XJ, Shukla SA, et al: Genomic correlates of immune-cell infiltrates in colorectal carcinoma. *Cell Rep* 15:857-865, 2016
10. Naxerova K, Reiter JG, Brachtel E, et al: Origins of lymphatic and distant metastases in human colorectal cancer. *Science* 357:55-60, 2017
11. Ishaque N, Abba ML, Hauser C, et al: Whole genome sequencing puts forward hypotheses on metastasis evolution and therapy in colorectal cancer. *Nat Commun* 9:4782, 2018
12. Chen HN, Shu Y, Liao F, et al: Genomic evolution and diverse models of systemic metastases in colorectal cancer. *Gut* 71:322-332, 2022
13. Shiomi A, Kusuvara M, Sugino T, et al: Comprehensive genomic analysis contrasting primary colorectal cancer and matched liver metastases. *Oncol Lett* 21:466, 2021
14. Mogensen MB, Rossing M, Østrup O, et al: Genomic alterations accompanying tumour evolution in colorectal cancer: Tracking the differences between primary tumours and synchronous liver metastases by whole-exome sequencing. *BMC Cancer* 18:752, 2018
15. Shyr C, Tarailo-Graovac M, Gottlieb M, et al: FLAGS, frequently mutated genes in public exomes. *BMC Med Genomics* 7:64, 2014
16. Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, et al: Oncogenic signaling pathways in the cancer genome atlas. *Cell* 173:321-337.e10, 2018
17. Kim JC, Bodmer WF: Genomic landscape of colorectal carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 148:533-545, 2022
18. Norquist BM, Brady MF, Harrell MI, et al: Mutations in homologous recombination genes and outcomes in ovarian carcinoma patients in GOG 218: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *Clin Cancer Res* 24:777-783, 2018
19. Gajic ZZ, Deshpande A, Legut M, et al: Recurrent somatic mutations as predictors of immunotherapy response. *Nat Commun* 13:3938, 2022
20. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al: COSMIC: The catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res* 47:D941-D947, 2019
21. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, et al: ONCOMINE: A cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* 6:1-6, 2004
22. Zhang S, Carlsen L, Hernandez Borrero L, et al: Advanced strategies for therapeutic targeting of wild-type and mutant p53 in cancer. *Biomolecules* 12:548, 2022
23. Beck H, Nähse-Kumpf V, Larsen MSY, et al: Cyclin-dependent kinase suppression by WEE1 kinase protects the genome through control of replication initiation and nucleotide consumption. *Mol Cell Biol* 32:4226-4236, 2012
24. Ellrott K, Bailey MH, Sakkena G, et al: Scalable open science approach for mutation calling of tumor exomes using multiple genomic pipelines. *Cell Syst* 6:271-281.e7, 2018
25. Ugai T, Akimoto N, Haruki K, et al: Prognostic role of detailed colorectal location and tumor molecular features: Analyses of 13,101 colorectal cancer patients including 2994 early-onset cases. *J Gastroenterol* 58:229-245, 2023
26. Serebriiskii IG, Connelly C, Frampton G, et al: Comprehensive characterization of RAS mutations in colon and rectal cancers in old and young patients. *Nat Commun* 10:3722, 2019
27. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, et al: Outcome according to KRAS-NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: Pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol* 27:1746-1753, 2016
28. Schirripa M, Nappo F, Cremolini C, et al: KRAS G12C metastatic colorectal cancer: Specific features of a new emerging target population. *Clin Colorectal Cancer* 19:219-225, 2020
29. Selgmann JF, Fisher DJ, Brown LC, et al: Inhibition of WEE1 is effective in *TP53*- and *RAS*-mutant metastatic colorectal cancer: A randomized trial (FOCUS4-C) comparing adavosertib (AZD1775) with active monitoring. *J Clin Oncol* 39:3705-3715, 2021
30. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al: The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res* 49:D605-D612, 2021
31. Colloca GA, Venturino A, Guarneri D: Different variables predict the outcome of patients with synchronous versus metachronous metastases of colorectal cancer. *Clin Transl Oncol* 22:1399-1406, 2020
32. Williams C, Pontén F, Moberg C, et al: A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 155:1467-1471, 1999
33. Mariani S, Bertero L, Coppola V, et al: Awareness of mutational artefacts in suboptimal DNA samples: Possible risk for therapeutic choices. *Expert Rev Mol Diagn* 18:467-475, 2018
34. Rheinbay E, Nielsen MM, Abascal F, et al: Analyses of non-coding somatic drivers in 2,658 cancer whole genomes. *Nature* 578:102-111, 2020

