

**Univerzita Karlova**

**3. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce

**Histopatologie a molekulární biologie nádorů gastrointestinálního traktu**



MVDr. Lenka Červenková

Plzeň, 2023

**Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor, předseda oborové rady:

**Biologie a patologie buňky**, doc. MUDr. Tomáš Kučera, Ph.D.

Školící pracoviště:

Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni, Biomedicínské centrum

Autor:

**MVDr. Lenka Červenková**

Školitel: **doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.**

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne     v     hod., kde:

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

## Obsah

Obsah.....	3
Souhrn .....	5
Summary .....	6
1 Teoretický úvod.....	7
1.1 Nádory gastrointestinálního traktu.....	7
1.1.1 Morfologická stavba solidních nádorů .....	7
1.1.2 Imunologie nádorů .....	7
1.1.3 Klasifikace nádorů .....	8
1.1.4 Molekulární klasifikace nádorů .....	8
1.1.5 Mezinárodní systém klasifikace nádorů – WHO klasifikace nádorů .....	8
1.1.6 Diagnostika nádorů .....	9
1.1.7 Transportéry zprostředkovaná léková rezistence .....	9
1.2 Molekulární metody v onkologii.....	10
1.2.1 Izolace DNA z formalínem fixované a parafínovou technikou zpracované tkáně.....	10
1.2.2 Polymerázová řetězová reakce.....	11
1.2.3 Sekvence nukleových kyselin.....	11
1.3 Imunohistochemické metody v onkologii .....	12
1.3.1 Využití IHC metod.....	12
1.3.2 Interpretace IHC .....	12
2 Cíle a hypotézy .....	13
3 Metody, výsledky a diskuze.....	14
3.1 Publikace č. 1: Proteinová exprese MRP2 a SLC22A3 souvisí s prognózou adenokarcinomu pankreatu .....	14
3.1.1 Metody .....	14
3.1.2 Výsledky – hlavní zjištění.....	14
3.1.3 Diskuze.....	15
3.2 Publikace č. 2: Proteinová exprese a lokalizace ABC transportérů u duktálního karcinomu pankreatu: prognostická role SUR1/ABCC8 .....	16
3.2.1 Metody .....	16
3.2.2 Výsledky – hlavní zjištění.....	17
3.2.3 Diskuze.....	18
3.3 Publikace č. 3: T a B lymfocyty ve vnitřním invazivním okraji hepatocelulárního karcinomu po resekci souvisí s příznivou prognózou.....	19
3.3.1 Metody .....	19
3.3.2 Výsledky – hlavní zjištění.....	20

3.3.3	Diskuze.....	20
3.4	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 .....	21
3.4.1	Metody .....	21
3.4.2	Výsledky – hlavní zjištění .....	22
3.4.3	Diskuze.....	23
3.5	Publikace č. 5: Sekvenování exomu párových vzorků kolorektálního karcinomu a synchronních jaterních metastáz pro prognózu a předpověď terapie.....	24
3.5.1	Metody .....	24
3.5.2	Výsledky – hlavní zjištění .....	24
3.5.3	Diskuze.....	25
4	Závěr .....	26
5	Použitá literatura .....	27
	Seznam publikací doktoranda: .....	33

## 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. K hlavním výsledkům patří imunohistochemicky prokázaná proteinová exprese transportérů MRP2, SLC22A3 a SUR1/ABCC8 a její významná souvislost s prognózou adenokarcinomu pankreatu. 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. 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. 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.

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Nádory gastrointestinálního traktu

### 1.1.1 Morfologická stavba solidních nádorů

Nádory jsou tvořeny vlastní nádorově transformovanou a proliferující složkou – **nádorovým parenchymem** a **stromatem**, které je tvořeno podpůrnou mezenchymální tkání s cévami.

**Nádorové buňky** mají charakteristické morfologické znaky, jako jsou velké jádro s nepravidelným tvarem a velikostí, prominující jadérko a bazofilie cytoplasmu. Buňky mají různou velikost a tvar. Jsou přítomné atypické mitózy. Tyto změny reflektují nádorový metabolismus buněk<sup>1</sup>.

**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. 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 pericyty<sup>2</sup>. Imunitní buňky rozdělujeme na buňky **přispívající k potlačení nádoru** (cytotoxické T lymfocyty, NK buňky, dendritické buňky (DCs), M1 makrofágy a N1 neutrofilie), buňky **umožňující progresi nádoru** (regulační T lymfocyty, M2 makrofágy a myeloidní supresorové buňky) a B lymfocyty s kontroverzní úlohou<sup>3,4</sup>.

### 1.1.2 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, neutrofil, makrofágy a komplement), tak adaptivní mechanismy (antigen specifické T a B lymfocyty)<sup>4,5</sup>.

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<sup>5,6</sup>.

### **1.1.3 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.

### **1.1.4 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 anti EGFR terapii<sup>7</sup>.

### **1.1.5 Mezinárodní systém klasifikace nádorů – WHO klasifikace nádorů**

Světová zdravotnická organizace (WHO) pravidelně vydává klasifikace nádorů pro jednotlivé orgánové soustavy. 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.

### 1.1.6 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.

**Typ nádoru** určuje patolog na základě histopatologického a molekulárně biologického vyšetření. Jednotlivé typy nádorů jsou popsány ve WHO Classification of Tumours<sup>8</sup>. Pro každý konkrétní typ nádoru je vypracován „gradingový“ systém, podle kterého patolog určí stupeň malignity neboli „**grade**“.

Nejčastěji používaným systémem k určování rozsahu nádorového onemocnění, čili „**stage**“, je systém založený na popisu rozsahu primárního nádoru (T), oblasti spádových lymfatických uzlin (N) a vzdáleného metastatického postižení (M) tzv. **TNM systém**, využívající klasifikační příručku TNM Classification of Malignant Tumours vydávanou Union for International Cancer Control<sup>9</sup>. Tento systém je vyvinut pro predikci klinického chování malignit, stanovení optimální terapie a usnadnění výměny přesných informací mezi lékaři.

V současné době je u CRC do TNM systému začleněno **hodnocení imunitní odpovědi** přímo v nádoru jako TNM – I (TNM – Immune) = **imunoscóre**. Toto hodnocení je založeno na počtu, typu a lokalizaci imunitních buněk v nádoru.

Předpokládá se, že v budoucnosti budou do TNM systému začleněny i výsledky **genomického a proteomického profilování** nádorů<sup>10</sup>.

### 1.1.7 Transportéry zprostředkovaná léková rezistence

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 efluxní<sup>11</sup>.

Klíčovou roli ve **zvýšeném vylučování léku** z buňky hrají **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<sup>12,13</sup>. Zvýšená exprese těchto tří proteinů vede ke zvýšenému vylučování léků z nádorových buněk a tím i ke snížení jejich intracelulární koncentrace a účinnosti<sup>14-16</sup>.

Ve **sníženém vstřebávání léků buňkami** se uplatňují **SLC** (solute carrier) **transportéry**. Ke snížení vstřebávání dochází snížením vazby na transportér nebo snížením počtu transportérů. Jsou popsány transportéry pouze pro endogenní substráty, transport převážně xenobiotik, či transportéry pro endogenní i cizorodé látky. Obvykle se jedná o multispecifické transportéry.

## 1.2 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. K izolaci nukleových kyselin lze využít fenol-chloroformovou extrakci, komerční kity nebo automatické izolátory.

V klinické onkologii lze molekulárních metod využít pro **diagnostiku hereditárních onkologických syndromů**; vyhledávání nosičů **mutací s predispozicí** k nádorovému onemocnění; pro stanovení **prognózy**; pro **personalizovaný výběr léků** (např. inhibitory EGFR, BRAF, ALK, ROS1 a PARP), **tekutou biopsií** pro neinvazivní monitorování onemocnění a pro **diagnostiku nádorů neznámého původu**<sup>17</sup>.

### 1.2.1 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. 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“ artefaktů<sup>18</sup>. Četnost výskytu mutací, zejména záměn C>T, je díky tomu v FFPE tkáních vyšší než v odpovídajících zmražených vzorcích<sup>19</sup>.

### 1.2.2 Polymerázová řetězová reakce

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 nemoci<sup>20</sup>. 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 metastázy<sup>21</sup>.

### 1.2.3 Sekvence nukleových kyselin

**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.** Sangerovo sekvenování se využívá k **detekci jednotlivých mutací** (např. *BRAF*, *BRCA1 a 2*, *c-KIT*, *EGFR* a *KRAS*) a **ověření specifiity PCR reakce**<sup>20</sup>.

**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.

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<sup>22</sup>.

### 1.3 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 zprostředkováná 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.

#### 1.3.1 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**).

IHC ztráta exprese v proteinech **MMR** má diagnostický, prognostický i terapeutický význam: může indikovat potencionální Lynchův syndrom (barvení proteinů MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6)<sup>23-25</sup>. CRC s MMR defekty mají obecně lepší prognózu; neodpovídají na léčbu 5-fluorouracilem, ale odpovídají na léčbu PD-1 inhibitory<sup>26</sup>. Nádorové buňky exprimující **PD-L1** mohou být cílem pro léčbu PD-L1 inhibitory u dlaždicobuněčného karcinomu jícnu, adenokarcinomu žaludku a CRC<sup>26</sup>. **HER2** abnormality u méně než 5 % CRC a 18 % adenokarcinomů jícnu a žaludku by mohly identifikovat případy vhodné k cílené léčbě<sup>27,28</sup>.

Proliferační marker protein Ki-67 (**Ki67**) se využívá jako prognostický marker pro určení grade u neuroendokrinních nádorů<sup>29</sup>. Molekulární abnormality u PDAC jsou dobře charakterizovány, ale nebyly zatím úspěšně využity jako IHC markery<sup>26</sup>.

#### 1.3.2 Interpretace IHC

Pro správnou interpretaci IHC je nutností používat adekvátní pozitivní a negativní kontrolu.

**Hodnocení vizualizace antigenu**<sup>30</sup>:

- 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

Může být hodnocena také abnormální nebo abnormálně lokalizovaná pozitivita v důsledku patologického procesu, např. u mutace genu *TP53*<sup>30,31</sup>. 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 systém<sup>32</sup>, 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 stanovení prognózy a predikci terapie?
- 6) Mají primární nádory a synchronní jaterní metastázy CRC stejný mutační profil?

### 3 Metody, výsledky a diskuze

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

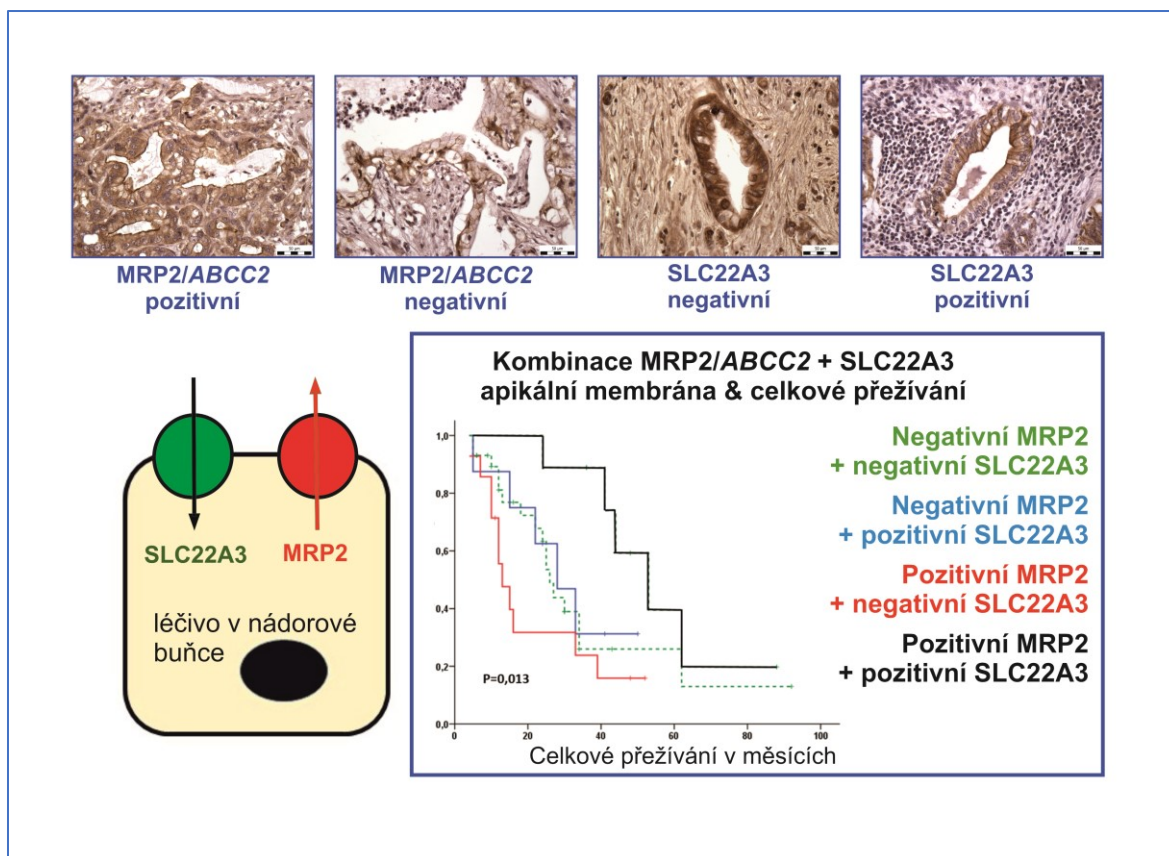
##### 3.1.1 Metody

Studie byla provedena na souboru archivních parafínových bloků. Bločky byly podrobeny imunohistochemické analýze exprese proteinů MRP2/ABCC2 a SLC22A3 (solute carrier family 22 member 3) s použitím primárních protilátek Anti-MRP2 antibody (M2 III-6), mouse monoclonal, abcam ab3373, ředění 1:100 a Anti SLC22A3 antibody (EPR6630), rabbit monoclonal, abcam ab124826, ředění 1:100. Hodnocena byla převládající cytoplasmatická lokalizace a přítomnost či nepřítomnost apikálního membránového barvení.

##### 3.1.2 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.

Bylo zjištěno, že **pacienti bez exprese proteinu SLC22A3 v apikální membráně mají signifikantně kratší DFS i 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**. Přehled barvení a nejdůležitějších výsledků je znázorněn na obrázku 1.



Obrázek 1: **Souhrnný grafický abstrakt:** Nejdůležitější výsledky, ukázky výsledku IHC barvení (apikální membrána) a základní funkční souvislosti; vlastní zpracování

### 3.1.3 Diskuze

Na základě předchozí transkriptomické studie<sup>33-35</sup> 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 epigeneticky<sup>36</sup>.

Předchozí studie zabývající se CRC, karcinomem prostaty<sup>37-39</sup>, HCC<sup>40</sup> a karcinomem jícnu<sup>41,42</sup> 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.

SLC22A3 se jako transportér léčiv může podílet na účinnosti protinádorové léčby: Odpověď pacientů s CRC na chemoterapii kombinací 5-fluorouracilu, kyseliny folinové a oxaliplatin<sup>43</sup>, pacientů s karcinomem hlavy a krku na terapii cisplatinou<sup>44</sup> naznačuje prediktivní charakter exprese proteinu. SLC22A3 hraje roli v léčbě jako transportér pro příjem metforminu<sup>45-47</sup>.

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 resekabilních 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.

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

#### **3.2.1 Metody**

Studie byla provedena na archivních parafinových blocích. Vybrané řezy byly barveny v plně automatizovaném IHC barvicím automatu s použitím primárních Anti-ABCD4 antibody produced in rabbit, HPA003396, Sigma-Aldrich, ředění 1:500; Anti-CFTR antibody produced in rabbit, HPA021939, Sigma-Aldrich, ředění 1:250; Anti-SUR1 antibody produced in rabbit, PA5-50836, Invitrogen, ředění 1:30 a Anti-TAP1 antibody produced in rabbit, 11114-1-AP, Proteintech, ředění 1:200.

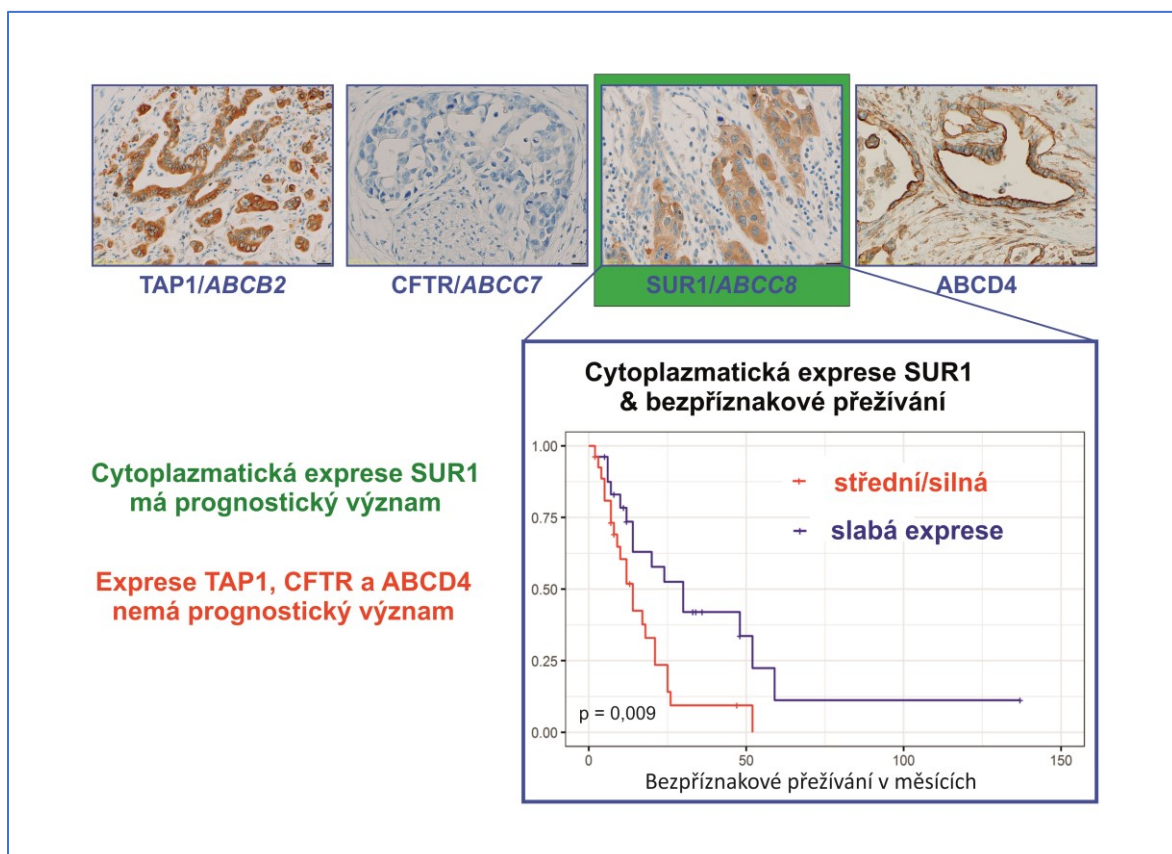


Lokalizace proteinu byla hodnocena jako negativní nebo pozitivní v cytoplasmě a v plasmatické membráně. Následně byla u vzorků s pozitivní cytoplasmatickou expresí hodnocena intenzita IHC exprese jako slabá, střední či silná v porovnání s pozitivní kontrolou.

### 3.2.2 Výsledky – hlavní zjištění

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

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



Obrázek 2: *Souhrnný grafický abstrakt: Nejdůležitější výsledky a ukázky výsledku IHC barvení; vlastní zpracování*

U všech vzorků byla detekována pozitivní cytoplasmatická exprese **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.

Expresie proteinu **ABCD4** (ATP binding cassette subfamily D member 4) v nádorových buňkách byla velmi variabilní. Ve většině případů se barvila jak cytoplazma, 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 exprese 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. Expresie proteinů TAP1/ABCB2, CFTR/ABCC7 nesouvisela s žádnými klinickými daty pacientů.

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. Expresie proteinů TAP1/ABCB2, CFTR /ABCC7 a ABCD4 nesouvisela s přežitím pacientů. Přehled barvení a nejdůležitějších výsledků je znázorněn na obrázku 2.

### 3.2.3 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 popsaných hladin transkriptů<sup>33,48</sup> a jejich prognostického významu.

Výsledky cytoplasmatického barvení SUR1/ABCC8 poprvé naznačují, že pacienti se středně nebo silně se barvícími nádorovými buňkami PDAC mají 3,5krát vyšší riziko progresivního 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 karcinomů<sup>49</sup>.

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 CRC<sup>50</sup> a PDAC<sup>48</sup> a rezistencí na cisplatinu u nemalobuněčného karcinomu plic *in vitro*<sup>51</sup>, přesto naše výsledky prognostický význam ABCD4 u PDAC nepotvrzují.

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.

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

#### **3.3.1 Metody**

Studie byla provedena na souboru archivních parafínových bloků. Ty byly podrobeny IHC detekci **CD3+** T lymfocytů, **CD8+** T lymfocytů a **CD20+** B lymfocytů s použitím automatického systému BOND RXm; s použitím následujících protilátek: 30ml CD3 (LN10) Bond RTU Primary, Leica Biosystems Newcastle Ltd, PA0122; 7ml CD8 (4B11) Bond RTU Primary, Leica Biosystems Newcastle Ltd, PA0183 a 7ml CD20 (L26) Bond RTU Primary, Leica Biosystems Newcastle Ltd, PA0200.

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.

### 3.3.2 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.

**Prognostický význam imunitních buněk:** 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**.

### 3.3.3 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<sup>52,53</sup>, opouzdření nádoru je spojováno se sníženou invazivitou nádoru a delším přežíváním pacientů<sup>53-55</sup>. 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 HCC<sup>56</sup> a jaterních metastáz CRC<sup>57</sup>. CD8+ T lymfocyty jsou považovány za hlavní protinádorové imunitní buňky u HCC a dalších nádorových onemocnění<sup>58,59</sup>. B lymfocyty se mohou uplatnit jako buňky

prezentující antigen, které spouštějí a modulují imunitní odpověď T lymfocytů<sup>60</sup>. Pozitivní korelace hustot CD8+ a CD20+ lymfocytů ve všech oblastech zájmu naznačuje spolupráci těchto buněk a omezení lokálního nebo systémového šíření nádoru<sup>61,62</sup>.

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 nádoru<sup>63</sup>. Souhrnné výsledky odpovídají zjištěním této studie a ukazují delší DFS u pacientů s vyšší hustotou CD8+ buněk v centru nádoru. Nesoulad s výsledky jiných studií<sup>64-67</sup> 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 konsorcia<sup>68</sup> 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, která je mnohem běžnější u neevropských populací. Na druhou stranu tato studie poskytuje pohled na pacienty se steatohepatitidou.

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

#### **3.4.1 Metody**

Studie byla provedena na archivních parafínových blocích. **Izolace DNA** z parafínových 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).

Vybrané řezy 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. 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.

### 3.4.2 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.

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.

### 3.4.3 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 onemocnění<sup>69</sup>. Výskyt mutace *TERTp* v našem souboru (75,8 %) je vyšší než u jiného evropského souboru nevirového HCC (56,6 %)<sup>70</sup>. Tato studie ukázala statisticky významnou asociaci genotypu GG rs2853669 s delším TTR a DFS, v souladu s prognostickými údaji pro další typy nádorových onemocnění<sup>71</sup>.

*CTNNB1* signální kaskády WNT/ $\beta$ -catenin je aktivován ve 30 až 50 % HCC<sup>72</sup> a jedná se o jeden z nejčastěji mutovaných genů ovlivňující HCC<sup>71</sup>. Frekvence mutací *CTNNB1* (35,6 %) i jejich lokalizace zjištěná v této studii souhlasila s literaturou<sup>73</sup>. V literatuře dostupné údaje ukazují asociace mutace *CTNNB1* s příznivou prognózou, zejména s delším celkovým přežíváním<sup>74</sup>, 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 nevirovou etiologií HCC u souboru našich pacientů, na rozdíl od asijských studií převážně s virovou etiologií.

TILs jsou zásadní složkou imunitní odpovědi na nádor<sup>63</sup>. Úloha imunitních buněk u HCC byla široce prozkoumána<sup>63,75-77</sup>, 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<sup>65,75,78,79</sup>, 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<sup>80,81</sup>. 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.

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

#### **3.5.1 Metody**

Studie byla provedena na souboru archivních parafínových bloků. **DNA byla izolována** pomocí sady RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit pro FFPE tkáně (Thermo Fisher Scientific) podle protokolu výrobce. 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 %.

Hrubá data pocházející přímo ze sekvenátoru byla předzpracována a následně byla provedena identifikace somatických variant a krátkých inzercí a delecí (indelů). Nalezené varianty byly anotovány pomocí nástroje Variant Effect Predictor (VEP) 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)<sup>82</sup> a detekována instabilita mikrosatelitní DNA<sup>83</sup>. Dále byla provedena **analýza nádorové mutační zátěže** (TMB) se srovnáním s daty z projektu TCGA MC3 (Multi-Center Mutation Calling in Multiple Cancers)<sup>84</sup> a **analýza variability počtu kopií** (CNV).

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

#### **3.5.2 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 ± 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 účinku<sup>85</sup> 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 CRC<sup>86</sup> 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.

**Genetický profil pacientů rozdělený podle objektivní odpovědi na neoadjuvantní systémovou terapii:** 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**.

Analýzou přežití byla nalezena řada asociací s 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).

### 3.5.3 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 pacientech<sup>87</sup>. Rozpor mezi dříve publikovanou četností mutací *KRAS* 40 %<sup>88</sup> a četností v naší studii 15 % přičítáme agresivnější povaze onemocnění nádorů s *KRAS* mutací, horší prognózou a nižší pravděpodobnosti chirurgické resekce metastáz<sup>89</sup>.

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 pacientů<sup>90-93</sup>. 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>T<sup>19</sup> a v současnosti neexistuje standardizovaná metoda jak tento jev eliminovat<sup>94</sup>. 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 nejasné<sup>95</sup>.

## 4 Závěr

Studie v této dizertační práci byly provedeny na archivních parafínových 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.

## 5 Použitá literatura

- 1 Baba, A. I. & Cătoi, C. in *Comparative Oncology* (The Publishing House of the Romanian Academy Copyright © 2007, The Publishing House of the Romanian Academy., 2007).
- 2 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>
- 3 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>
- 4 Hořejší, V. Protinádorové zbraně imunitního systému. *Klinická onkologie*, 15 (2015).
- 5 Büchler, T. *Obecná onkologie*. (Maxdorf, 2019).
- 6 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>
- 7 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>
- 8 *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. (IARC Press, 2010).

- 9 Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K. & Wittekind, C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. (Wiley, 2017).
- 10 Telsoni, 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](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_1)
- 11 TREJTAR, F. Základní mechanizmy transportu léčiv v organismu (Remedia).
- 12 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>
- 13 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>
- 14 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>
- 15 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>
- 16 Sun, Y.-L., Patel, A., Kumar, P. & Chen, Z.-S. Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. *Chinese journal of cancer* **31**, 51 (2012).
- 17 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>
- 18 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>
- 19 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)
- 20 Zámečník, J. *Patologie*. (LD Prager Publishing, 2019).
- 21 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-cnrc1>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19980415)82:8<1419::aid-cnrc1>3.0.co;2-4)
- 22 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>
- 23 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>
- 24 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>
- 25 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).
- 26 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>
- 27 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>
- 28 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>
- 29 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>
- 30 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>
- 31 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>
- 32 Lin, F., Prichard, J. W., Liu, H. & Wilkerson, M. L. *Handbook of Practical Immunohistochemistry: Frequently Asked Questions*. (Springer International Publishing, 2022).
- 33 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>
- 34 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>
- 35 Soucek, P. *et al.* in *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*. S46-S46 (SPANDIDOS PUBL LTD POB 18179, ATHENS, 116 10, GREECE).
- 36 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>
- 37 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>
- 38 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>
- 39 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>
- 40 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>
- 41 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>
- 42 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>
- 43 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>
- 44 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>
- 45 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.0b013e32833fe789>
- 46 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>

- 47 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>
- 48 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).
- 49 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).
- 50 Hlavata, I. *et al.* The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* **27**, 187-196 (2012).
- 51 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).
- 52 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>
- 53 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>
- 54 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>
- 55 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>
- 56 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>
- 57 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>
- 58 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>
- 59 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>
- 60 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>
- 61 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>
- 62 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>
- 63 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>
- 64 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>
- 65 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>



- 66 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>
- 67 Sun, C. *et al.* The predictive value of centre tumour CD8<sup>+</sup> T cells in patients with hepatocellular carcinoma: comparison with Immunoscore. *Oncotarget* **6**, 35602-35615 (2015). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5801>
- 68 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>
- 69 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>
- 70 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>
- 71 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>
- 72 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>
- 73 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>
- 74 Wang, Z. *et al.*  $\beta$ -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>
- 75 Xu, X. *et al.* Clinicopathologic and prognostic significance of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells in patients with hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **98**, e13923 (2019). <https://doi.org/10.1097/md.00000000000013923>
- 76 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>
- 77 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>
- 78 Huang, Y. *et al.* CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget* **6**, 17462-17478 (2015). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3958>
- 79 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>
- 80 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>
- 81 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>
- 82 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>
- 83 Han, X. *et al.* MSIsensor-ct: microsatellite instability detection using cfDNA sequencing data. *Brief Bioinform* **22** (2021). <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa402>

- 84 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>
- 85 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>
- 86 Riddell, R. H. *et al.* *Lewin, Weinstein, and Riddell's Gastrointestinal Pathology and Its Clinical Implications*. (Wolters Kluwer Health, 2014).
- 87 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>
- 88 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>
- 89 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>
- 90 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>
- 91 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>
- 92 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>
- 93 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>
- 94 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>
- 95 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>



## Seznam publikací doktoranda

### Publikace, které jsou podkladem disertace:

- ❖ **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.; IF 4,997
- ❖ **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.; IF 3,6
- ❖ 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.; IF 5,2
- ❖ 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.; IF 3,8
- ❖ 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.; IF 4,6

### Publikace bez vztahu k tématu dizertace:

#### a) 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. IF 2,2
- ❖ 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. IF 1,8
- ❖ 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. IF 5,7
- ❖ 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/ah.12765. IF 0,9
- ❖ 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. IF 8,5
- ❖ 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. IF 2,4
  - ❖ 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. IF 4,8
  - ❖ 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. IF 3,6
  - ❖ 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. IF 4,4
  - ❖ 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. IF 7,8
  - ❖ 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. IF 2,5
  - ❖ 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. IF 2,5
  - ❖ POKORNÝ, Martin - MRÁZOVÁ, Iveta - MALY, 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. IF 1,7
  - ❖ 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. IF 1,4
  - ❖ 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. IF 1,3

- ❖ 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 Cyp1a1-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. IF 2,0
- ❖ 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. IF 1,2
- ❖ 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. IF 2,5

#### **b) 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.
- ❖ 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.