

Neinvazívny skríning onkologických ochorení pomocou biomarkerov vo voľne cirkulujúcej DNA

Zuzana Holešová¹, Juraj Gazdarica^{1,2,4}, Jaroslav Budiš^{1,2,4}, Ondrej Pös^{1,2}, Tomáš Szemes^{1,2,3}

¹Geneton, s. r. o., Bratislava

²Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava

³Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

⁴Centrum vedecko-technických informácií, Bratislava

V súčasnosti sú účinné metódy skríningu dostupné len pre niektoré nádorové ochorenia a vo všeobecnosti sú relatívne komplikované. Preto je potrebné vyvinúť jednoduché a presné metódy na včasnú detekciu čo najväčšieho spektra nádorových ochorení. Takýto potenciál má detekcia genetických a epigenetických zmien v DNA voľne cirkulujúcej v plazme (cfDNA), vďaka ktorej by bolo možné veľmi skoro detegovať nádorové ochorenie a tak zlepšiť prežívanie pacientov. Molekulárne vlastnosti fragmentov cfDNA a ich distribúcia v genóme poskytujú informácie o tkanivách ich pôvodu. Organizácia nukleozómov a obsah nukleáz v pôvodnom tkanive ovplyvňujú veľkosť a motív zakončenia fragmentov cfDNA. Aj vďaka týmto vlastnostiam je tekutá biopsia jeden z najslubnejších nástrojov pre budúce klinické využitie.

Kľúčové slová: tekutá biopsia, cfDNA, ctDNA, biomarker, rakovina

Non-invasive screening of oncological diseases using biomarkers in freely circulating DNA

Effective screening methods are only available for some cancers and are generally relatively complicated. Therefore, it is necessary to develop simple and accurate methods for early detection of the most extensive possible spectrum of cancer. The detection of genetic and epigenetic changes in DNA freely circulating in plasma (cfDNA) has such potential, thanks to which it would be possible to detect cancer very early and thus improve the survival of patients. The molecular properties of cfDNA fragments and their distribution in the genome provide information about their tissue of origin. The organization of nucleosomes and the content of nucleases in the original tissue affect the size and termination motif of cfDNA fragments. These properties make liquid biopsy one of the most promising tools for future clinical use.

Keywords: liquid biopsy, cfDNA, ctDNA, biomarker, cancer

NewsLab, 2023; roč. 14 (1): 36 – 39

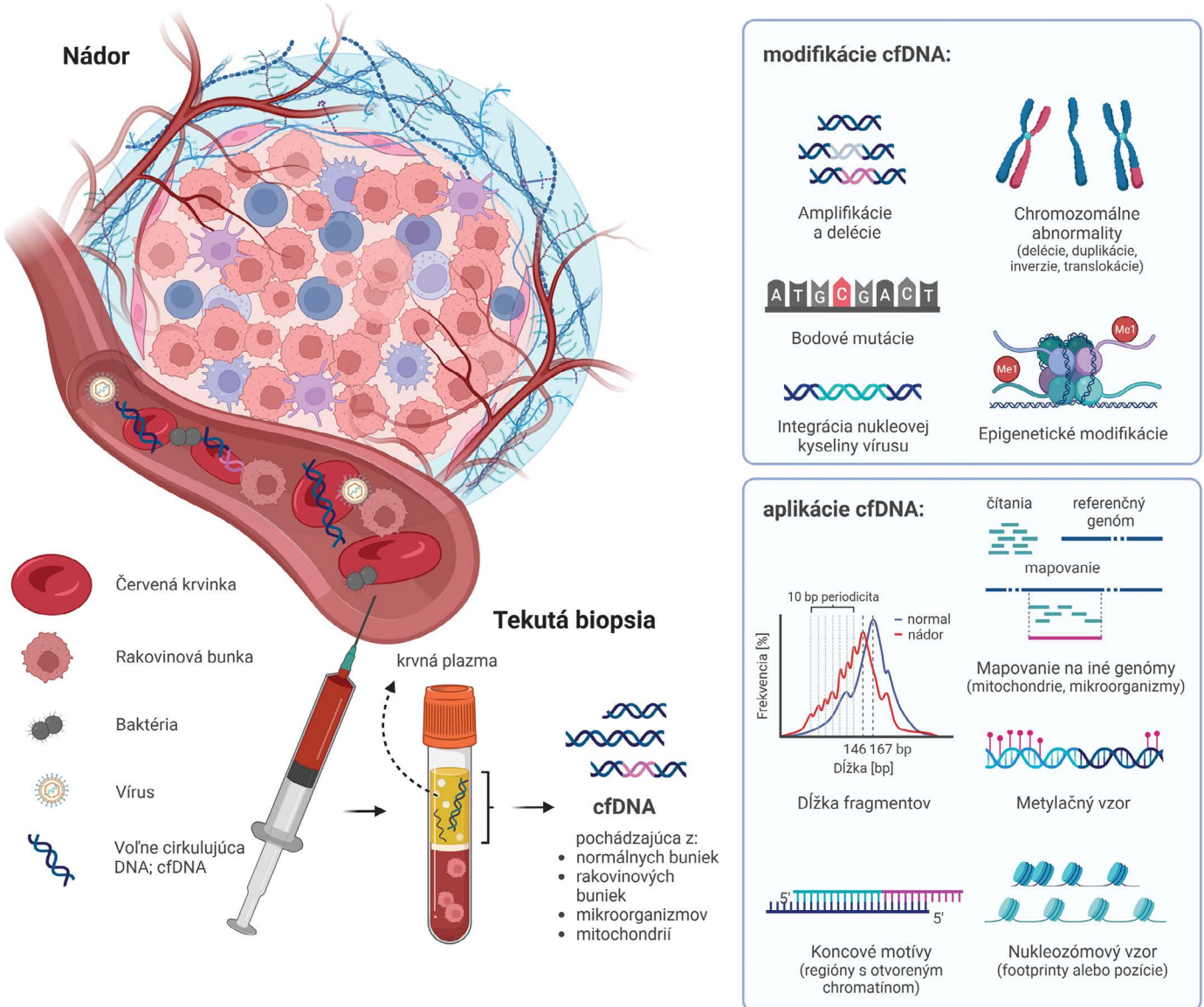
Úvod

Rakovina má významný vplyv na zdravie ľudí na celom svete. Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) je rakovina hlavnou príčinou úmrtí v mnohých štátoch a tento počet sa bude v dohľadnom čase zväčšovať⁽¹⁾. V roku 2020 zomrelo na rakovinu viac ako 10 miliónov ľudí najmä v dôsledku nedostatočného prístupu k vhodným diagnostickým metódam⁽²⁾. Príčinou vzniku nádorov je zmena v génoch riadiacich rast a delenie buniek, to spôsobí, že sa niektoré bunky začnú deliť bez zastavenia a šíria sa do okolitých tkanív. Rakovina tak môže vzniknúť takmer v akejkoľvek z miliárd buniek v ľudskom tele. Pri každom type nádoru dochádza k jedinečnej kombinácii genetických zmien, navyše, ako rastie, naďalej sa mení. Dokonca v rámci toho istého nádoru môžu bunky disponovať rôznymi genetickými zmenami. To je jeden z dôvodov, prečo je liečba rakoviny náročná. Preto je veľmi dôležité vyvinúť jednoduché, presné a čo najmenej invazívne metódy na jej včasné odhalenie, keďže štádium, v ktorom je diagnostikovaná, je jedným z najvýznamnejších prediktorov prežitia.

Jednou z takých metód je tzv. tekutá biopsia (LB). Jej prvé aplikácie boli založené na detekcii genetických markerov vo voľne cirkulujúcej DNA (cfDNA), ako sú napr. genetické polymorfizmy alebo mutácie. Štúdiom negenetických vlastností cfDNA – metylácie, fragmentácie a topológie – sa jej využitie rozšírilo, cfDNA si možno predstaviť ako genetický rezervoár, ktorý obsahuje genetickú informáciu zo všetkých buniek v tele⁽³⁾ vrátane zdravých, chorých i mikroorganizmov, ktoré sa v tele nachádzajú⁽⁴⁾. Ich pomer sa vzhľadom na aktuálny stav jedinca vrátane rakoviny môže meniť. Každý fragment cfDNA nesie molekulárne znaky bunky, z ktorej pochádza.

Prostredníctvom LB možno identifikovať rakovinové zmeny v cfDNA⁽⁵⁾, ktorá sa uvoľní z buniek po ich smrti⁽⁶⁾. Keďže väčšina nádorov je v kontakte s krvou, väčšinou sa pri LB odoberá vzorka krvi, je však možné analyzovať aj iné telesné tekutiny, napr. pleurálny výpotok, moč a mozgovomiechový mok⁽⁷⁾. Vďaka jednoduchosti odberu predstavuje analýza cfDNA minimálne invazívnu a nízkonákladovú alternatívu biopsie nádoru⁽⁸⁾. Okrem včasnej detekcie nádorov⁽⁹⁾

Obrázok 1. Schematické znázornenie tekutej biopsie. V periférnej krvi sa okrem krvných komponentov nachádza voľná cirkulujúca DNA (cfDNA), mikroorganizmy (baktérie, vírusy, huby), v prípade onkologického pacienta i cirkulujúce nádorové bunky a ďalšie komponenty (napr. RNA a vezikuly). Po oddelení krvnej plazmy centrifugáciou z nej možno izolovať cfDNA a následne ju analyzovať rôznymi prístupmi. Je možné sa zamerať na (epi)genetické zmeny a molekulárne vlastnosti fragmentov cfDNA, organizáciu nukleozómov, obsah nukleáz v súvislosti so zakončením fragmentov cfDNA a cfDNA pochádzajúcu z mitochondrií a mikrobiómu.



je možné pomocou LB rýchlejšie odhaliť recidívu nádorového ochorenia a na rozdiel od klasickej biopsie má vyššiu šancu zachytiť viaceré mutácie. Molekulárnou charakterizáciou cfDNA je zároveň možné získať informácie o pôvode a progresii nádoru, čo má veľký význam pre prevenciu a liečbu nádorového ochorenia.

Modifikácie a aplikácie cfDNA

Rozvoj vysokovýkonných sekvenčných technológií (NGS) umožňuje paralelné sekvenovanie miliónov fragmentov DNA rýchlym a ekonomickým spôsobom. Množstvo vygenerovaných údajov si vyžaduje okrem počítačového vybavenia bioinformatickú analýzu, ktorá vedie od spracovania surových údajov cez ich podrobnejšiu analýzu až k interpretácii variantov v klinickom kontexte⁽¹⁰⁾. Vďaka NGS možno odhaliť známe i nové mutácie, fúzie, abnormálny počet kópií génov

a variantov, zmeny v metylácii DNA i mutačnú záťaž alebo mikrosatelitovú nestabilitu (**obrázok 1**)⁽¹¹⁾. Veľkosť molekúl cfDNA, umiestnenie koncov fragmentov a koncové motívy sú ovplyvnené organizáciou nukleozómov, štruktúrou chromatinu, obsahom nukleáz a expresiou génov v tkanive, z ktorého pochádza.

Cirkulujúca DNA pochádzajúca z nádoru (ctDNA) tvorí u väčšiny onkologických pacientov nízky podiel k celkovej cfDNA, často < 1 %⁽¹²⁾, najmä v prípade raného štádia. Disponuje však rovnakými genetickými i epigenetickými zmenami, aké sú v samotnom nádore. Od cfDNA pochádzajúcej z normálnych buniek ju možno odlišiť podľa prítomnosti bodových mutácií, aneuploidie, zmien počtu kópií génov, odlišnej metylácie alebo prítomnosti vírusových sekvencií DNA^(13,14). Vzhľadom na jej nízku koncentráciu je potrebné jej spoľahlivé odlišenie od cfDNA zdravých buniek.

Metylácia DNA je nevyhnutná pre normálny vývoj a zohráva dôležitú úlohu v epigenetickej kontrole aktivity génov. Zmeny v metylácii DNA sa považujú za najčastejšie molekulárne zmeny v procese onkogenézy⁽¹⁵⁾. Je známe, že každé tkanivo má svoj charakteristický vzor metylácie, ktorý sa odlišuje medzi nádorovými a normálnymi bunkami⁽¹⁶⁾. Preto profilovanie metylácie celého genómu z cfDNA môže byť potenciálne účinným nástrojom na zisťovanie prítomnosti konkrétneho nádorového ochorenia.

Okrem zmien v metylácii je fragmentácia cfDNA a vzorce obsadenia nukleozómami ďalšími epigenetickými znakmi na sledovanie aktivity génov a pôvodu tkaniva. Počas bunkovej smrti dochádza k enzymatickému štiepeniu DNA nukleázami. DNA je počas toho chránená nukleozómami a tak majú fragmenty cfDNA charakteristickú veľkosť 167 bp, čo zodpovedá dĺžke otočenia okolo jedného nukleozómu⁽¹⁷⁾. Veľkosť fragmentov sa však môže u zdravých jedincov a onkologických pacientov líšiť. Fragmenty cfDNA pochádzajúce z nádorových buniek sú v porovnaní s fragmentmi zo zdravých buniek kratšie⁽¹⁸⁾. Sekvenovaním s rozlíšením na jeden bázo-ový pár sa zistilo, že kratšie fragmenty cfDNA v plazme pacientov s hepatocelulárnym karcinómom majú viac zmien asociovaných s nádormi ako dlhšie fragmenty cfDNA⁽¹⁹⁾, hoci niektoré konkrétne zriedkavé mutácie sú v dlhších fragmentoch cfDNA⁽²⁰⁾. Zhutnenie nukleozómových štruktúr vytvára prekážku pre prístup transkripčných faktorov k regulačným elementom. Umiestnenie nukleozómov súvisí s aktiváciou a expresiou génov v závislosti od vývinu a konkrétneho tkaniva⁽²¹⁾. Preto môže skúmanie polohy nukleozómov v cfDNA a identifikácia pôvodného tkaniva odhaliť existenciu špecifického typu nádoru⁽²²⁾.

Okrem veľkosti fragmentov cfDNA je zaujímavé i zloženie koncových motívov. Fragmentácia molekúl cfDNA nevzniká náhodným procesom. Preferované konce fragmentov sa vzťahujú na špecifické koncové miesta v genóme, zvyčajne v oblastiach s otvoreným chromatinom (ktoré sú prístupnejšie)⁽²³⁾. K fragmentácii cfDNA dochádza aktivitou deoxyribonukleáz (DNáz), z ktorých každá rozpoznáva inú sekvenciu⁽²⁴⁾. Pri viacerých onkologických ochoreniach bol pozorovaný rôzny pomer koncových motívov. Napr. v prípade hepatocelulárneho karcinómu bol koncový motív CCCA výrazne menej zastúpený ako pri kontrole, pravdepodobne pre zníženú expresiu DN-ázy1L3. Navyše profil koncových motívov cfDNA pochádzajúcej z toho istého orgánu je vo všeobecnosti rovnaký⁽²⁵⁾. Dôvodom týchto odlišností môžu byť genetické alebo epigenetické zmeny, ktoré mohli spôsobiť poruchy v expresii endonukleáz DNA⁽²⁵⁾. Jiang a kol. skúmali prítomnosť prečnievajúcich koncov po štiepení nukleázami a zistili, že boli zastúpené vo väčšine molekúl cfDNA (~ 90 %)⁽²⁶⁾. V predchádzajúcich štúdiách prečnievajúce konce neboli odhalené, pretože sú v procese prípravy sekvenčných knižníc opravené na tupé. Prečnievanie sa líšilo podľa veľkosti fragmentov cfDNA a zdá sa, že súviselo s nukleozómovými vzormi. V prípade pacientov s hepatocelulárnym karcinómom vykazovala cfDNA vyššie zastúpenie prečnievajúcich koncov ako nenádorová cfDNA⁽²⁶⁾.

Mitochondrie svojím genómom takisto prispievajú k celkovej cfDNA. Mitochondriálna DNA (mtDNA) sa na rozdiel od jadrovej DNA nachádza v bunke v tisíckach kópií⁽²⁷⁾. Okrem toho má vysokú mutačnú rýchlosť a pri nádorových ochore-

niach dochádza u nej k zásadným modifikáciám^(28,29). Obe tieto vlastnosti ju predurčujú stať sa vhodným kandidátom na tekutú biopsiu. To potvrdzujú i niektoré štúdie, ktoré preukázali rozdiel v obsahu i fragmentácii voľne cirkulujúcej mtDNA (mt-cfDNA) pri onkologických ochoreniach^(30,31). Veľkosť fragmentov mt-cfDNA bola menšia v porovnaní s jadrovou cfDNA, dôvodom môže byť to, že na rozdiel od jadrovej cfDNA nie je chránená nukleozómami, preto pri nej nie je pozorovaný ani charakteristický veľkostný pík ako pri jadrovej cfDNA (167 bp)⁽¹⁹⁾. Čo sa týka množstva kópií, zrejme nejde o jednoznačný marker, keďže v prípade hepatocelulárneho karcinómu bol pozorovaný v plazme pacientov nižší⁽³¹⁾ i vyšší počet kópií mt-cfDNA⁽¹⁹⁾. Pokiaľ ide o dĺžku mt-cfDNA, bolo pozorované, že nepriamo súvisí s veľkosťou nádoru i s koncentráciou cirkulujúcej nádorovej DNA^(19,30).

Na 10-15 % prípadov vzniku a progresie rakoviny sa podieľajú vírusy a baktérie⁽³²⁾. V kontexte onkológie je však cirkulujúca mikrobiálna DNA málo preskúmaná, uplatňovala sa najmä pri infekčných chorobách a sepse, kde jej sekvenovanie zlepšilo detekciu ťažko kultivovateľných mikroorganizmov⁽³³⁾. Súvislosť medzi zmenami v črevnom mikrobióme, tzv. dysbiózou a mnohými neinfekčnými chorobami je relatívne dobre známa, rakovina nie je výnimkou^(34,35). Charakteristický „podpis“ cirkulujúcej bakteriálnej DNA (cbDNA) pre daný typ rakoviny bol rovnaký dokonca aj v I. a II. štádiu rakoviny a tiež pri rakovine, v ktorej nedošlo ku genomickým zmenám. Je to významné zistenie, keďže súčasná analýza ctDNA sa spolieha práve na zisťovanie genomických zmien, ktoré sú prítomné v primárnom nádore. Naznačuje to, že cbDNA by mohla byť citlivejším a širšie použiteľným biomarkerom rakoviny.

Medzi najčastejšie onkogénne vírusy patrí vírus hepatitídy B (HBV) a ľudský papilomavírus (HPV), ktoré sú príčinou približne polovice nádorov vyvolaných vírusovou infekciou⁽³⁶⁾. Ku karcinogéze prispievajú produkciou onkogénnych proteínov, moduláciou imunity alebo prostredníctvom integrácie vírusovej DNA do DNA hostiteľa (vh-DNA)⁽³⁷⁾. Práve integrované úseky vírusovej DNA môžu byť detegované v krvnom obehú ešte pred vznikom samotného nádoru. Nie je však možné pomocou nich identifikovať štádium nádoru alebo odlíšiť vírusovú DNA integrovanú do normálnych tkanív od nádorových tkanív. Stanovenie hraničnej hodnoty na odlíšenie nádorovo špecifickej vh-DNA od vh-DNA uvoľnenej z nenádorového tkaniva je rozhodujúce na dosiahnutie klinicky významnej citlivosti a špecifickosti⁽³⁷⁾.

Záver

Tekutá biopsia v dohľadnej budúcnosti nenahradí celkom biopsiu tkaniva, môže ju však doplniť. Vzhľadom na to, že väčšina súčasných techník tekutej biopsie nemá dostatočnú detekčnú schopnosť, je potrebné jej definíciu rozšíriť i o nenádorové informácie. Predpokladá sa, že po štandardizácii metodických postupov sa bude viac využívať v rutinných podmienkach a pomôže zachytiť nádor ešte pred vznikom symptómov. Pred jej úplným zavedením je však potrebné zodpovedať niektoré otázky. Napríklad, do akej miery sa presnosť testov líši medzi jednotlivými typmi nádorov a štádiami ochorenia. Poskytuje tekutá biopsia reprezentatívnu vzorku všetkých genetických klonov v nádore alebo dochádza ku skresleniu na špecifické subregióny? Na to je však potrebných ešte veľa klinických štúdií.

Poďakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekty ITMS: 313011V578 (PreveLynch) a ITMS: 313021BUZ3 (USCCCORD) spolufinancované zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Práca bola tiež spolufinancovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja v rámci grantov APVV-21-0296 (INCAM) a APVV-18-0319 (GenoMicrosat).

LITERATÚRA

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71(1): 7-33.
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. Published online April 5, 2021. doi: 10.1002/ijc.33588
3. Qin Z, Ljubimov VA, Zhou C, et al. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chin J Cancer*. 2016; 35: 36.
4. Kowarsky M, Camunas-Soler J, Kertesz M, et al. Numerous uncharacterized and highly divergent microbes which colonize humans are revealed by circulating cell-free DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114(36): 9623-9628.
5. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. 2017; 17(4): 223-238.
6. Pös O, Biró O, Szemes T, Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *Eur J Hum Genet*. 2018; 26(7): 937-945.
7. Pös Z, Pös O, Styk J, et al. Technical and Methodological Aspects of Cell-Free Nucleic Acids Analyzes. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(22). doi: 10.3390/ijms21228634
8. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013; 10(8): 472-484.
9. Zhu JW, Charkhchi P, Akbari MR. Potential clinical utility of liquid biopsies in ovarian cancer. *Mol Cancer*. 2022; 21(1): 114.
10. Pereira R, Oliveira J, Sousa M. Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics. *J Clin Med Res*. 2020; 9(1). doi: 10.3390/jcm9010132
11. Saghafeina S, Mina M, Riggi N, et al. Pan-Cancer Landscape of Aberrant DNA Methylation across Human Tumors. *Cell Rep*. 2018; 25(4): 1066-1080.e8.
12. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease – latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019; 16(7): 409-424.
13. Chan KCA, Jiang P, Chan CWM, et al. Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(47): 18761-18768.
14. McBride DJ, Orpana AK, Sotiriou C, et al. Use of cancer-specific genomic rearrangements to quantify disease burden in plasma from patients with solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010; 49(11): 1062-1069.
15. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*. 2000; 16(4): 168-174.
16. Chen Y, Breeze CE, Zhen S, et al. Tissue-independent and tissue-specific patterns of DNA methylation alteration in cancer. *Epigenetics Chromatin*. 2016; 9: 10.
17. Heitzer E, Auinger L, Speicher MR. Cell-Free DNA and Apoptosis: How Dead Cells Inform About the Living. *Trends Mol Med*. 2020; 26(5): 519-528.
18. Moulriere F, Chandrananda D, Piskorz AM, et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med*. 2018; 10(466). doi: 10.1126/scitranslmed.aat4921
19. Jiang P, Chan CWM, Chan KCA, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(11): E1317-E1325.
20. Liu X, Lang J, Li S, et al. Fragment Enrichment of Circulating Tumor DNA With Low-Frequency Mutations. *Front Genet*. 2020; 11: 147.
21. Ulz P, Perakis S, Zhou Q, et al. Inference of transcription factor binding from cell-free DNA enables tumor subtype prediction and early detection. *Nat Commun*. 2019; 10(1): 4666.
22. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, et al. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*. 2016; 164(1-2): 57-68.
23. Oberhofer A, Bronkhorst AJ, Uhlig C, et al. Tracing the Origin of Cell-Free DNA Molecules through Tissue-Specific Epigenetic Signatures. *Diagnostics (Basel)*. 2022; 12(8). doi: 10.3390/diagnostics12081834
24. Han DSC, Ni M, Chan RWY, et al. The Biology of Cell-free DNA Fragmentation and the Roles of DNASE1, DNASE1L3, and DFFB. *Am J Hum Genet*. 2020; 106(2): 202-214.
25. Jiang P, Sun K, Peng W, et al. Plasma DNA End-Motif Profiling as a Fragmentomic Marker in Cancer, Pregnancy, and Transplantation. *Cancer Discov*. 2020; 10(5): 664-673.
26. Jiang P, Xie T, Ding SC, et al. Detection and characterization of jagged ends of double-stranded DNA in plasma. *Genome Res*. 2020; 30(8): 1144-1153.
27. Kelly RDW, Mahmud A, McKenzie M, Trounce IA, St John JC. Mitochondrial DNA copy number is regulated in a tissue specific manner by DNA methylation of the nuclear-encoded DNA polymerase gamma A. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(20): 10124-10138.
28. Hertweck KL, Dasgupta S. The Landscape of mtDNA Modifications in Cancer: A Tale of Two Cities. *Front Oncol*. 2017; 7: 262.
29. van Osch FHM, Voets AM, Schouten LJ, et al. Mitochondrial DNA copy number in colorectal cancer: between tissue comparisons, clinicopathological characteristics and survival. *Carcinogenesis*. 2015; 36(12): 1502-1510.
30. An Q, Hu Y, Li Q, et al. The size of cell-free mitochondrial DNA in blood is inversely correlated with tumor burden in cancer patients. *Precis Clin Med*. 2019; 2(3): 131-139.
31. Haupts A, Vogel A, Foersch S, et al. Comparative analysis of nuclear and mitochondrial DNA from tissue and liquid biopsies of colorectal cancer patients. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 16745.
32. Lunn RM, Jahnke GD, Rabkin CS. Tumour virus epidemiology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017; 372(1732). doi: 10.1098/rstb.2016.0266
33. Blauwkamp TA, Thair S, Rosen MJ, et al. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease. *Nat Microbiol*. 2019; 4(4): 663-674.
34. Vivarelli S, Salemi R, Candido S, et al. Gut Microbiota and Cancer: From Pathogenesis to Therapy. *Cancers*. 2019; 11(1). doi: 10.3390/cancers11010038
35. Huang YF, Chen YJ, Fan TC, et al. Analysis of microbial sequences in plasma cell-free DNA for early-onset breast cancer patients and healthy females. *BMC Med Genomics*. 2018; 11(Suppl 1): 16.
36. Plummer M, de Martel C, Vignat J, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health*. 2016; 4(9): e609-e616.
37. Li CL, Yeh SH, Chen PJ. Circulating Virus-Host Chimera DNAs in the Clinical Monitoring of Virus-Related Cancers. *Cancers*. 2022; 14(10). doi: 10.3390/cancers14102531

Mgr. Zuzana Holešová, PhD.

Geneton, s. r. o.

Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava

e-mail: zuzana.holesova@geneton.sk