

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2019**

**Bc. Oliver Pešát**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Cytogenetické zmeny u pacientov  
s kolorektálnym karcinómom**

**Diplomová práce**

**Bc. Oliver Pešát**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2019**

**Vedoucí práce: RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.**

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracoval samostatne v priebehu  
magisterského štúdia pod vedením vedúceho diplomovej práce RNDr. Radka  
Trojanca, Ph.D. a s použitím citovaných literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa : 25.4.2019

.....

## Súhrn

Kolorektálny karcinóm je jedno z najčastejších nádorových ochorení a predstavuje vážny globálny zdravotný problém. Dlhé rameno chromozómu 18 podlieha deléciám vo väčšine prípadov kolorektálneho karcinómu. V tejto súvislosti bol v 90. rokoch 20. storočia identifikovaný gén *Deleted in Colon Cancer (DCC)* ako potencionálny tumor supresorový gén ležiaci na dlhom ramene chromozómu 18, jeho význam je však dodnes predmetom diskusií. Recentnejšie boli identifikované ďalšie 3 gény takisto na dlhom ramene chromozómu 18 a to: *Zinc finger protein 516 (ZNF516)*, *Mex-3 RNA Binding Family Member C (MEX3C)* a *Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class N (PIGN)*. U týchto génov bola popísaná supresorová aktivita na chromozomálnu instabilitu. Chromozomálnou instabilitou sa vyznačuje až 70 % všetkých sporadických foriem karcinómu kolorekta. Výsledkom chromozomálnej instability sú celogenómové alternácie ako delécie, aneuploidie a straty heterozygoty. Výskyt chromozomálnej instability je spojený s nepriaznivou prognózou a rezistenciou na chemoterapeutiká.

V experimentálnej časti tejto práce bol vyšetrený súbor 174 pacientov s diagnózou kolorektálny karcinóm metódou interfáznej fluorescenčnej *in situ* hybridizácie s cieľom zistiť rozsah delécie a jej vplyv na toto ochorenie. Vyšetrované boli všetky zo spomenutých štyroch génov. Zo štatistických výsledkov vyplynulo, že najčastejšie sú tieto gény deletované spolu v skupine, pričom delécii samostatne najčastejšie podlieha gén *ZNF516*. Analýza prežitia pacientov preukázala signifikantne lepšie prežitie pacientov bez delécie ako pacientov s kombináciami delécií menovaných génov. Pacienti s deléciami majú podľa analýzy 2,9-4,9 krát väčšie riziko úmrtia v porovnaní s pacientmi bez delécie. Taktiež bola pozorovaná štatisticky významná asociácia génu *MEX3C* s génom *Kristen Rat Sarcoma Viral oncogene homolog (KRAS)*, kedy sa pri deletovanom *MEX3C* zvýšil podiel mutácií *KRAS*. Delécie génov *ZNF516*, *PIGN*, *MEX3C* a *DCC* boli v tejto práci potvrdené ako faktory ovplyvňujúce prežitie pacientov s kolorektálnym karcinómom, avšak mechanizmus ich vplyvu na tumorigenézu ostáva nejasný.

## Summary

Colorectal cancer is one of the most common cancers and represents a serious global health problem. The long arm of chromosome 18 undergoes deletions in most cases of colorectal cancer. In this context, the *Deleted in Colon Cancer (DCC)* gene was identified in the 1990s as a potential tumour suppressor gene lying on the long arm of chromosome 18, but its significance is still discussed. More recently, additional 3 genes have also been identified on the long arm of chromosome 18, namely: *Zinc finger protein 516 (ZNF516)*, *Mex-3 RNA Binding Family Member C (MEX3C)* and *Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class N (PIGN)*. Suppressor activity on chromosomal instability has been described for these genes. Up to 70 % of all sporadic forms of colorectal cancer are characterized by chromosomal instability. Chromosomal instability results in whole genome alterations such as deletions, aneuploidy, and loss of heterozygosity. The occurrence of chromosomal instability is associated with adverse prognosis and resistance to chemotherapeutic agents.

In the experimental part of this work, a set of 174 patients with colorectal cancer diagnosis were investigated using the interphase fluorescence *in situ* hybridization method to determine the extent of the deletion and its effect on the disease. All four genes were investigated. Statistical processing of the results revealed that most often these genes are deleted together in the group, whereas the *ZNF516* gene solely is the most frequently subject to deletion. Patient survival analysis showed significantly better survival of non-deletion patients than patients with combinations of deleted genes. Patients with deletion have, according to analysis, 2.9-4.9 times higher risk of death compared to patients without deletion. Also, a statistically significant association of the *MEX3C* gene with the Kristen Rat Sarcoma Viral oncogene homolog (*KRAS*) gene was observed, in which the deleted *MEX3C* increased the proportion of *KRAS* mutation. Deletions of the *ZNF516*, *PIGN*, *MEX3C* and *DCC* genes have been confirmed in this work as factors affecting the survival of colorectal carcinoma patients, but the mechanism of their effect on tumorigenesis remains unclear.

Chcel by som sa veľmi pekne poďakovať RNDr. Radkovi Trojancovi, Ph.D. za cenné rady, pripomienky a vedenie pri spracovávaní diplomovej práce. Množstvo cenných rád a pomoci pri vypracovaní experimentálnej časti mi poskytli aj Mgr. Zuzana Šporiková a pani Soňa Mlčochová. V neposlednom rade by som chcel poďakovať Mgr. Pavle Kouřilovej, Ph.D. z katedry matematické analýzy a aplikací matematiky, za jej pomoc so štatistickým spracovaním dát.

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Ciele práce.....	2
3	Literárny prehľad .....	3
3.1	Epidemiológia kolorektálneho karcinómu.....	3
3.2	Formy kolorektálneho karcinómu.....	5
3.3	Vznik kolorektálneho karcinómu.....	5
3.4	Molekulárna podstata vzniku kolorektálneho karcinómu.....	6
3.5	Molekulárna cesta chromozomálnej instability (CIN).....	6
3.5.1	<i>APC</i> a Wnt signalizačná dráha .....	7
3.5.2	Chromozomálna instabilita.....	9
3.5.3	Replikačný stres a chromozomálna instabilita .....	11
3.5.3.1	Gén <i>ZNF516</i> .....	12
3.5.3.2	Gén <i>PIGN</i> .....	12
3.5.3.3	Gén <i>MEX3C</i> .....	13
3.5.4	EGFR signalizačná dráha a <i>KRAS</i> .....	13
3.5.5	<i>DCC</i> , <i>SMAD</i> a delécie na 18q .....	15
3.5.6	Proteín p53.....	17
3.6	Mikrosatelitová instabilita .....	18
3.7	Hypermetylačná cesta .....	20
4	Materiál a metódy.....	21
4.1	Biologický materiál.....	21
4.2	Použité súpravy.....	21
4.3	Bakteriálne klony .....	21
4.4	Chemikálie .....	21
4.5	Roztoky .....	21

4.6	Pomôcky .....	23
4.7	Prístroje .....	23
4.8	Použité vyhodnocovacie postupy .....	23
4.9	Kultivácia baktérií a izolácia plazmidu .....	24
4.10	Príprava sondy na FISH .....	24
4.11	Fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia .....	25
4.12	ReFISH .....	26
5	Výsledky .....	28
5.1	Vyšetrenie súboru pacientov metódou FISH .....	28
5.2	Základná charakteristika súboru pacientov .....	28
5.3	Výsledky vyšetrenia delécií u pacientov .....	29
5.4	Výsledky porovnania charakteristík pacientov .....	31
6	Diskusia .....	36
7	Záver .....	41
8	Použitá literatúra .....	42
8.1	Použité internetové zdroje .....	52



## **Zoznam použitých skratiek**

*APC – Adenomatous Polyposis Coli*

*AURKA – Aurora Kinase A*

*BFB – bridge-fusion-bridge*

*BUB – budding uninhibited by benzimidazoles*

*CABLES1 – Cdk5 and Abl enzyme substrate 1*

*CBP – CREB-binding protein*

*Cdk – cyklín dependentná kináza*

*CIMP – CpG island methylator phenotype*

*CIN – chromozomálna instabilita*

*CK1 $\alpha$  – casein kinase 1 $\alpha$*

*CRC – kolorektálny karcinóm*

*DAPI – 4',6-diamidino-2-fenylindol*

*DCC – Deleted in Colon Cancer*

*EDTA – kyselina etyléndiamíntetraoctová*

*EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor*

*FFPE – fixované vo formalíne a zaliate v parafíne (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded)*

*FISH – fluorescenčná in situ hybridizácia*

*Grb2 – growth factor receptor-bound protein 2*

*GSK3 $\alpha$  – glycogen synthase kinase 3  $\alpha$*

*hMSH2/6 – mutS homolog 2/6*

*hRod – human Rough Deal*

*hZw10 – human ZW10 interacting protein-1*

*hZwilch – human Zwilch*

*IGF1 – insulin-like growth factor 1*

*KRAS – Kristen Rat Sarcoma Viral oncogene homolog*

LB - Luria-Bertani

LOH – strata heterozygoty (*Loss of heterozygoty*)

LSI – lokusovo špecifická sonda (*locus specific identifier*)

*MAD – mothers against decapentaplegic*

*MAPK – mitogénom aktivovaná proteín kináza*

*MCC – mitotic checkpoint complex*

*MDM2 – Mouse double minute 2 homolog*

*MEK – Mitogen-activated protein kinase kinase*

*MEX3C – Muscle excess 3 homologue C*

*MMR – mismatch repair*

MSI – mikrosatelitová instabilita

*mTOR – mammalian target of rapamycin*

*PBS – Phosphate-buffered saline*

*PGC1 $\alpha$  – Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

*PI3K/AKT – phosphatidylinositol 3-kinase – protein kinase B*

*PIGN – Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class N*

*RAF – rapidly accelerated fibrosarcoma*

*RBMS3 – RNA Binding Motif Single Stranded Interacting Protein 3*

*RKHD – RING Finger and KH-domain*

SAC – kontrolný bod zostavenia deliaceho vretienka (*spindle assembly checkpoint*)

*SMAD4/SMAD2 – Mothers Against Decapentaplegic Homolog 2/4*

SOS – *son of sevenless*

SSC – *saline-sodium citrate*

*TCF/LEF – T-cell factor/lymphoid enhancing factor*

*TGF- $\beta$  – Transforming growth factor  $\beta$*

*TRIS – tris-(hydroxymetyl)-aminometán*

*UCP1 – uncoupling protein 1*

*Wnt – Wingless/Integrated*

*ZNF516 – Zinc finger protein 516*

# 1 Úvod

Kolorektálny karcinóm patrí celosvetovo medzi jedno z najčastejších nádorových ochorení s najväčším výskytom v rozvinutých krajinách a predstavuje tak významný globálny zdravotný problém.

U sporadickej formy, ktorá je najčastejšou formou kolorektálneho karcinómu, vykazuje 65-70 % prípadov chromozomálnu instabilitu. Chromozomálna instabilita je typ genomickej instability, pri ktorej dochádza k mnohopočetným genetickým alternáciám ako sú delécie, aneuploidie, translokácie, inverzie a podobne. Výskyt chromozomálnej instability je spájaný s horšou prognózou ochorenia ale aj rezistenciou na chemoterapeutiká, nakoľko instabilita predstavuje pre rakovinové bunky adaptačný nástroj na selektívne tlaky v procese tumorigenézy. Včasnou diagnostikou výskytu chromozomálnej instability by bolo možné presnejšie stanoviť prognózu, ale aj nastaviť liečbu ochorenia. Mechanizmus vzniku chromozomálnej instability nie je celkom pochopený, je však zjavná jeho diverzita a dôsledky na genóm. Na identifikáciu nových klinicky aplikovateľných biomarkerov je potrebné hlbšie porozumenie celkového mechanizmu vzniku instability a jeho dopadu na priebeh nádorových ochorení akým je aj kolorektálny karcinóm ale aj mnohé iné onkologické diagnózy.

Novo identifikované potencionálne supresorové gény vo vzťahu ku chromozomálnej instabilite sú lokalizované na dlhom ramene chromozómu 18, ktoré je v kolorektálnom karcinóme predmetom častých delécií. Ich preukázateľný vplyv na supresiu chromozomálnej instability v klinických vzorkách od pacientov by v budúcnosti mohol pomôcť k objasneniu mechanizmov instability ako aj ku objavu nových významných biomarkerov a cieľov pre chemoterapeutiká.

## 2 Ciele práce

Kolorektálny karcinóm (CRC) patrí medzi najčastejšie diagnózy v onkológii. U pacientov s CRC býva často popisovaná delécia v oblasti chromozómu 18q. Predpokladá sa, že hlavný význam pre prognózu má zahrnutie génu *DCC* (*Deleted in Colon Cancer*), avšak jeho význam nebol nikdy presvedčivo preukázaný.

Novo boli v oblasti 18q detegované ďalšie 3 gény (*MEX3C*, *PIGN* a *ZNF516*), hrajúce úlohu v chromozomálnej instabilite. Cieľom tejto práce je overiť, či rozsah delécie (a teda spektrum do delécie zahrnutých génov) môže hrať úlohu v predikcii, liečbe či prognóze ochorenia.

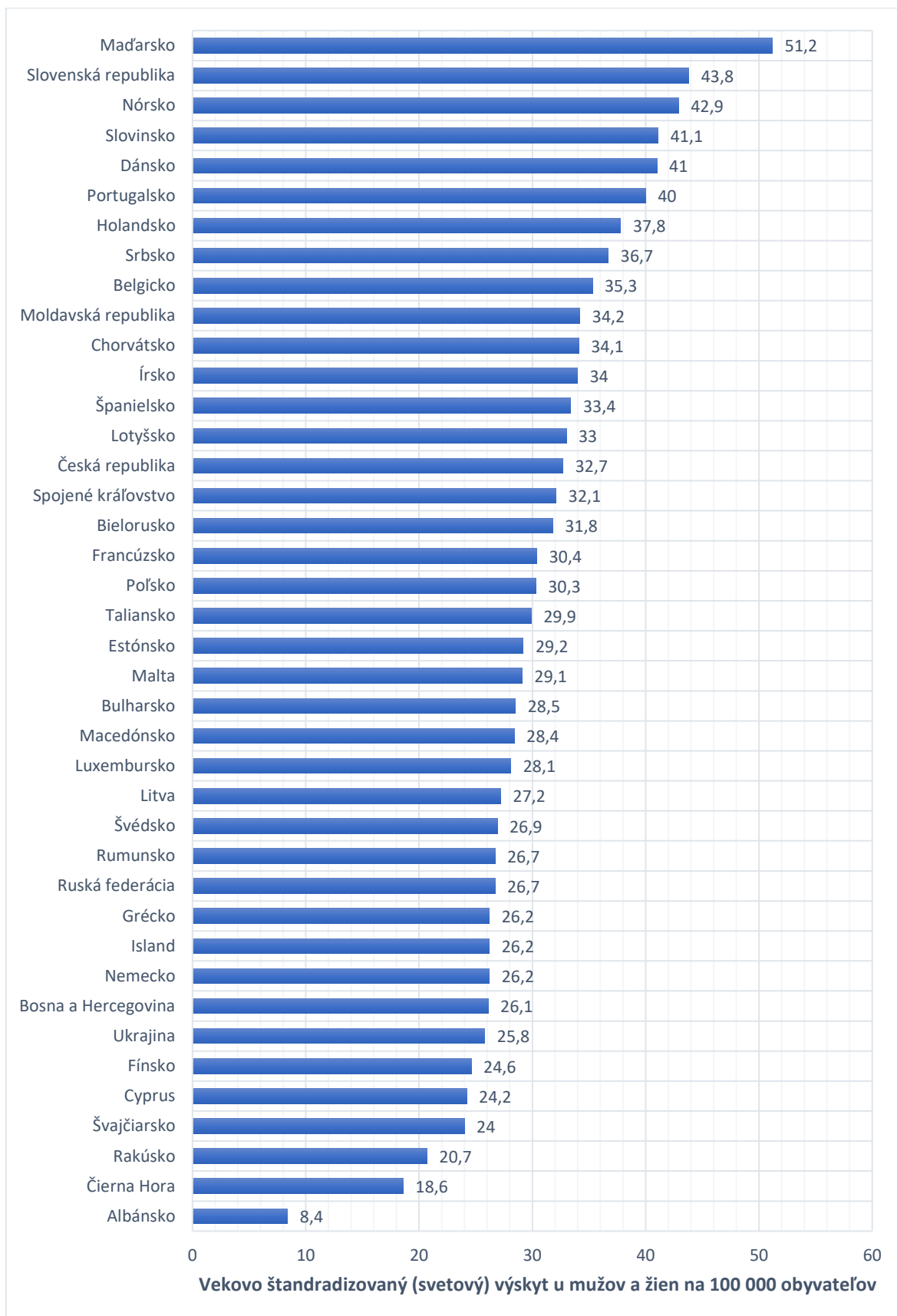
### 3 Literárny prehľad

#### 3.1 Epidemiológia kolorektálneho karcinómu

Zhubné novotvary hrubého čreva a konečníku patria k jedným z najčastejších nádorových ochorení na svete. Podľa recentných štatistík sa odhaduje ako 3. najčastejšie zhubné nádorové ochorenie celosvetovo (približne 1,85 milióna odhadovaných nových prípadov za rok 2018) a 2. najčastejšie v Európe (približne 0,5 milióna odhadovaných nových prípadov za rok 2018). Štáty západnej a strednej Európy vykazujú dlhodobu celosvetovo najvyššiu incidenciu. Medzi krajiny s najväčšou incidenciou patria Maďarsko, Slovensko, Slovinsko a Nórsko (viď graf č. 1). Česká republika je na 15. mieste v rámci celej Európy. Naopak krajiny južnej Ázie a Afriky vykazujú celosvetovo najnižšiu incidenciu (Bray *et al.*, 2018).

Nárast incidencie v priebehu rokov sa pripisuje najmä zmenám v stravovacích návykoch, zvýšenej obezite a životnému štýlu spojenému s nízkou fyzickou aktivitou. Zo stravy má najväčší vplyv zvýšený príjem mastných jedál, alkoholu a naopak nízky príjem ovocia a zeleniny (Arnold *et al.*, 2017; Larsson *et al.*, 2006; Renehan *et al.*, 2008; Samad *et al.*, 2005). Ako protektívne boli preukázané nasledujúce faktory: pravidelné užívanie aspirínu, užívanie estrogénu po menopauze a pravdepodobne aj príjem vitamínu D (Lin *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2011; Rothwell *et al.*, 2011).

Odhadovaná mortalita medzi zhubnými nádorovými ochoreniami je u kolorektálneho karcinómu (CRC) 2. najvyššia na svete, tvorí 9,3 % úmrtí zo všetkých zhubných nádorových ochorení (Bray *et al.*, 2018). So stúpajúcou incidenciou je možné sledovať aj klesajúcu mortalitu hlavne vo vyspelých krajinách, ako napr. v Severnej Amerike, Austrálii a Novom Zélande a väčšine Európskych krajín. Možno to pripisovať najmä adopcii pokročilých postupov v oblasti liečby a manažmentu kolorektálnych karcinómov (van Steenbergen *et al.*, 2009). Ako príklad možno uviesť kolonoskopiu alebo sigmoidoskopiu či podobné vyšetrenia, ktoré majú za cieľ odhalenie a prípadné odstránenie adenómových polypov hrubého čreva. Skriningové testy pomáhajú znižovať incidenciu aj mortalitu z dlhodobého hľadiska (Levin *et al.*, 2008). Niektoré krajiny Latinskej Ameriky, Karibiku a Ázie vykazujú stúpajúcu mortalitu za posledné roky, čo môže vysvetľovať limitovaná zdravotnícka infraštruktúra ako aj prístup pacientov k lekárskej pomoci, čo vedie k odhaleniu diagnózy v neskorých štádiách (Arnold *et al.*, 2017).



Graf č. 1: Incidencia svetového vekovo štandardizovaného výskytu kolorektálnych zhubných nádorov v Európsky krajinách. Údaje z roku 2018. Zdroj: GLOBOCAN 2018 (<http://gco.iarc.fr/>)

### 3.2 Formy kolorektálneho karcinómu

Z pohľadu pôvodu vzniku CRC rozlišujeme 3 hlavné formy výskytu:

- Hereditárna forma
- Familiárna forma
- Sporadická forma

Hereditárna forma je najmenej častou formou s výskytom asi 5-7 % všetkých CRC. Jedná sa o CRC s jednoznačnou genetickou predispozíciou. Rozdeľuje sa ďalej na polypózne a nepolypózne skupiny.

Familiárna forma predstavuje asi 25 % všetkých prípadov CRC. Jedná sa o zdanlivo hereditárne ochorenia s výskytom v rodinách, avšak bez známkov prítomnosti známych genetických zmien. Možnou príčinou je pravdepodobne kombinácia environmentálnych a genetických faktorov a celkového životného štýlu. (Armelaio *et de* Pretis, 2014).

Sporadická (nehereditárna) forma je najčastejšou formou CRC pri ktorej pacienti nemajú rodinnú históriu tohto ochorenia. Ide o 70 % všetkých CRC. Za hlavné etiologické príčiny sa považujú environmentálne a stravovacie návyky. Zvýšený výskyt je najmä u pacientov nad 50 rokov (Mlkvá, 2016; Stewart *et* Wild, 2014).

### 3.3 Vznik kolorektálneho karcinómu

Viac ako 90 % kolorektálnych karcinómov sú adenokarcinómy pochádzajúce z epiteliálnych buniek mukózy rekta a hrubého čreva. Mukóza hrubého čreva je orgánom s najvyššou proliferáciou v celom tele u cicavcov. Rýchla proliferácia môže viesť k akumulácii množstva genetických a epigenetických chýb v bunkách (Zhao *et* Michor, 2013). Ostatné typy kolorektálnych karcinómov sa vyvíjajú z neuroendokrinných buniek, adenoskvamózných buniek alebo nediferencovaných buniek (Fleming *et al.*, 2012). Lokálne zmeny epiteliálnych buniek rekta a hrubého čreva vyústia v tvorbu benígnych polypov, ktoré sa považujú za prekancerózne prekurzor. Časom sa z benígneho polypu nahromadením dostatočných genetických zmien môže stať malígny, čo má za následok ďalší vývoj invazívneho adenokarcinómu.

Proces prechodu z normálnej mukózy na adenóm a neskôr na adenokarcinóm trvá väčšinou 5-10 rokov (Mlkvá, 2016; Simon, 2016; Takayama *et al.*, 2001). Nie každý adenóm sa však vždy vyvinie na adenokarcinóm. Predpokladá sa, že asi iba 10 % najpokročilejších adenómov sa zmení na kancerózne (Simon, 2016).



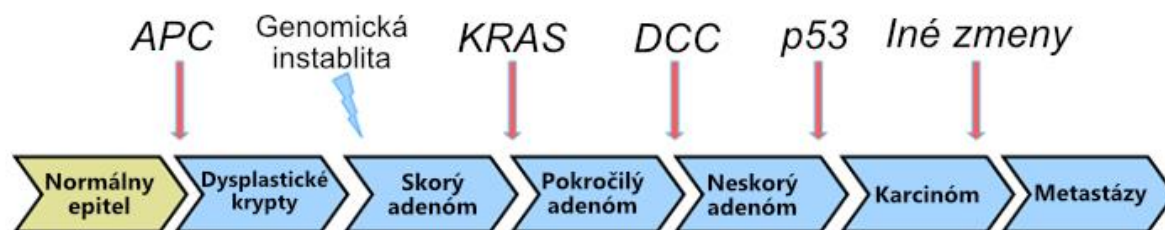
### **3.4 Molekulárna podstata vzniku kolorektálneho karcinómu**

Vznik kolorektálneho karcinómu zahŕňa postupné nahromadenie genetických a epigenetických mutácií a zmien, ktoré vedú k transformácii bežného črevného epitelu na malígnu. Tieto zmeny môžu byť vrodené (germinatívne) alebo získané (somatické).

V súčasnosti sa predpokladá existencia minimálne 3 molekulárnych ciest tumorigenézy. Prvá najstaršia, je cesta chromozomálnej instability (CIN) (Fearon *et* Vogelstein, 1990). Chromozomálna instabilitu možno pozorovať u 65-70 % sporadických foriem CRC (Lengauer *et al.*, 1998). Druhou cestou je cesta mikrosatelitovej instability (MSI), zodpovedná za asi 15 % prípadov sporadických foriem CRC. Treťou cestou je hypermetylačná cesta vyskytujúca sa asi v 20-30 % CRC (Ogino *et al.*, 2006). Každá z týchto molekulárnych ciest ale nie je výlučne exkluzívnou pre jeden prípad CRC. Napr. 25 % MSI karcinómov vykazuje CIN alebo väčšina hypermetylačne pozitívnych tumorov vykazuje vysoký stupeň MSI. (Cheng *et al.*, 2008; Pino *et* Chung, 2010).

### **3.5 Molekulárna cesta chromozomálnej instability (CIN)**

Jednou z veľmi dobre preskúmaných oblastí molekulárnej patogenézy je práve CIN cesta. Jej základ tvorí uznávaný lineárny model, ktorý je dnes doplnený o nové poznatky (viď obrázok č.1) (Fearon *et* Vogelstein, 1990). Treba podotknúť, že nie každý prípad CIN sa riadi presne týmto modelom. Existujú alternatívne gény k nižšie spomenutým, ktorých mutáciou môže model progredovať na ďalšie štádia a taktiež poradie mutácií nemusí byť zhodné s modelom (Pelengaris *et* Khan, 2009a).



Obrázok č.1: Fearonov a Vogelsteinov model vývoja kolorektálneho karcinómu. Upravené podľa Yalçın *et al.*, 2014.

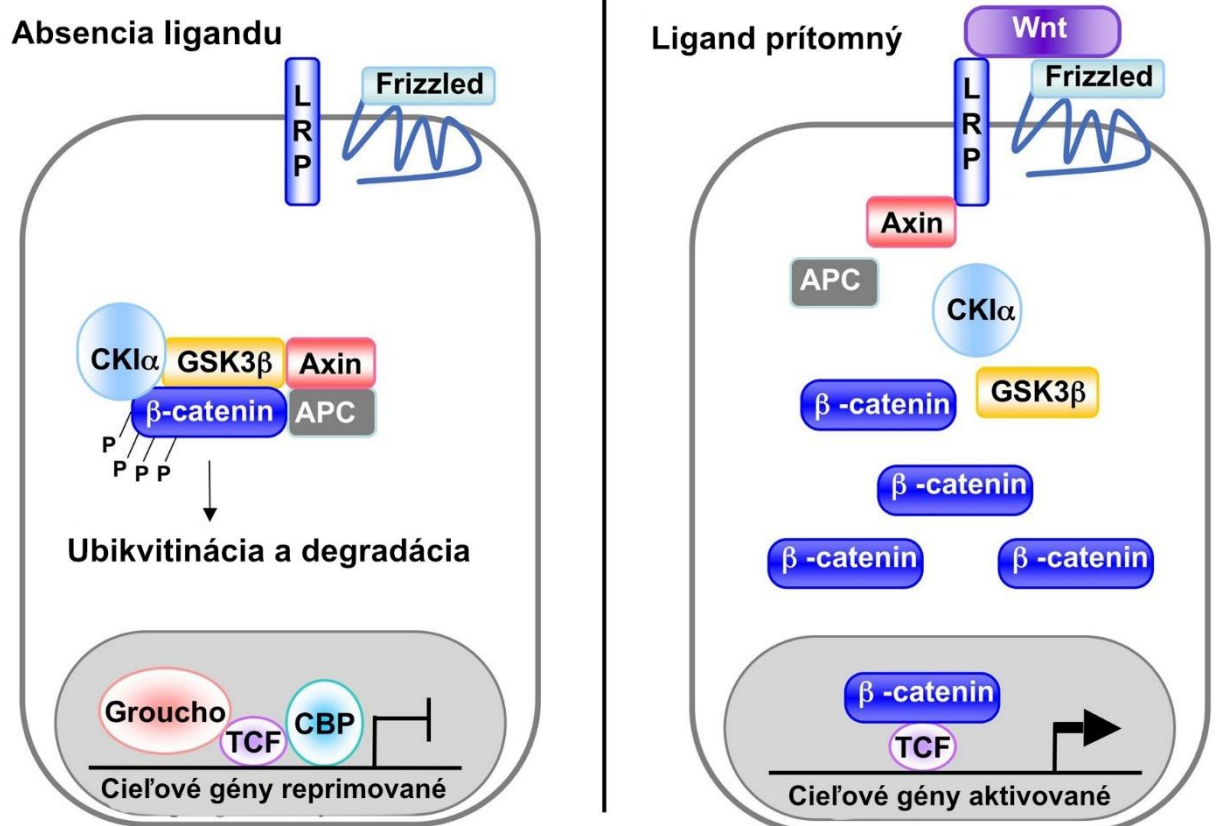
Legenda:.. *APC* - Adenomatous Polyposis Coli, *KRAS* - Kristen Rat Sarcoma Viral oncogene homolog, *DCC* – Deleted in colorectal cancer,

### 3.5.1 *APC* a Wnt signalizačná dráha

Prvou z iniciálnych mutácií je mutácia génu *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*). Tento gén sa nachádza na dlhom ramene chromozómu 5 na pozícii q22.2. Jedná sa o tumor supresorový gén. Jeho úlohou je kontrola kľúčových komponentov normálnej epiteliálnej morfogénzy, bunková polarita a komunikácia medzi bunkami. Taktiež kontroluje priebeh bunkového cyklu a stabilizuje mikrotubuly, čo je významné pre chromozomálnu stabilitu (Galiatsatos *et Foulkes*, 2006).

Presná funkcia proteínu APC spočíva v tvorbe a stabilite multiproteínových komplexov, ako napr.  $\beta$ -katenínový deštrukčný komplex v signálnej dráhe Wnt (*Wingless/Integrated*) (viď obrázok č. 2) ale aj tvorba iných komplexov (Lesko *et al.*, 2015). Signálna dráha Wnt kontroluje regeneráciu tkanív v hrubom čreve, dospeljej kostnej dreni a v črevách. Taktiež je zodpovedná za správny embryonálny vývoj (Goessling *et al.*, 2009). Hlavným efektorom signálnej dráhy je  $\beta$ -katenín, ktorý je za prítomnosti Wnt ligandu viazaného na receptorový komplex Frizzled/LRP-5/6 (*lipoprotein receptor-related protein*) stabilizovaný a interaguje s TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancing factor*) transkripčnými faktormi v jadre, odstraňuje represor Groucho a aktivuje transkripciu cieľových génov. Cieľové gény aktivované  $\beta$ -katenínom sú zapojené najmä do regulácie proliferácie, diferenciácie, prežitia bunky, migrácie a angiogenézy (Herbst *et al.*, 2014). Bez prítomnosti ligandu je cytoplazmický  $\beta$ -katenín degradovaný tzv. deštrukčným komplexom, ktorý tvoria proteíny APC, Axin, GSK3 $\alpha$  (*glycogen synthase kinase 3*) a CK1 $\alpha$  (*casein kinase 1 $\alpha$* ).  $\beta$ -katenín je

označený ubikvitináciou a následne degradovaný proteazómom (Minde *et al.*, 2011; Peifer *et Polakis*, 2000).



Obrázok č. 2: Zjednodušená schéma Wnt signalizačnej dráhy. Upravené podľa Eisenmann, 2005.

Legenda: LRP - lipoprotein receptor-related protein, TCF- T-cell factor, CBP - CREB-binding protein, GSK3 $\alpha$  - glycogen synthase kinase 3, CK1 $\alpha$  - casein kinase 1 $\alpha$ , APC - Adenomatous Polyposis Coli

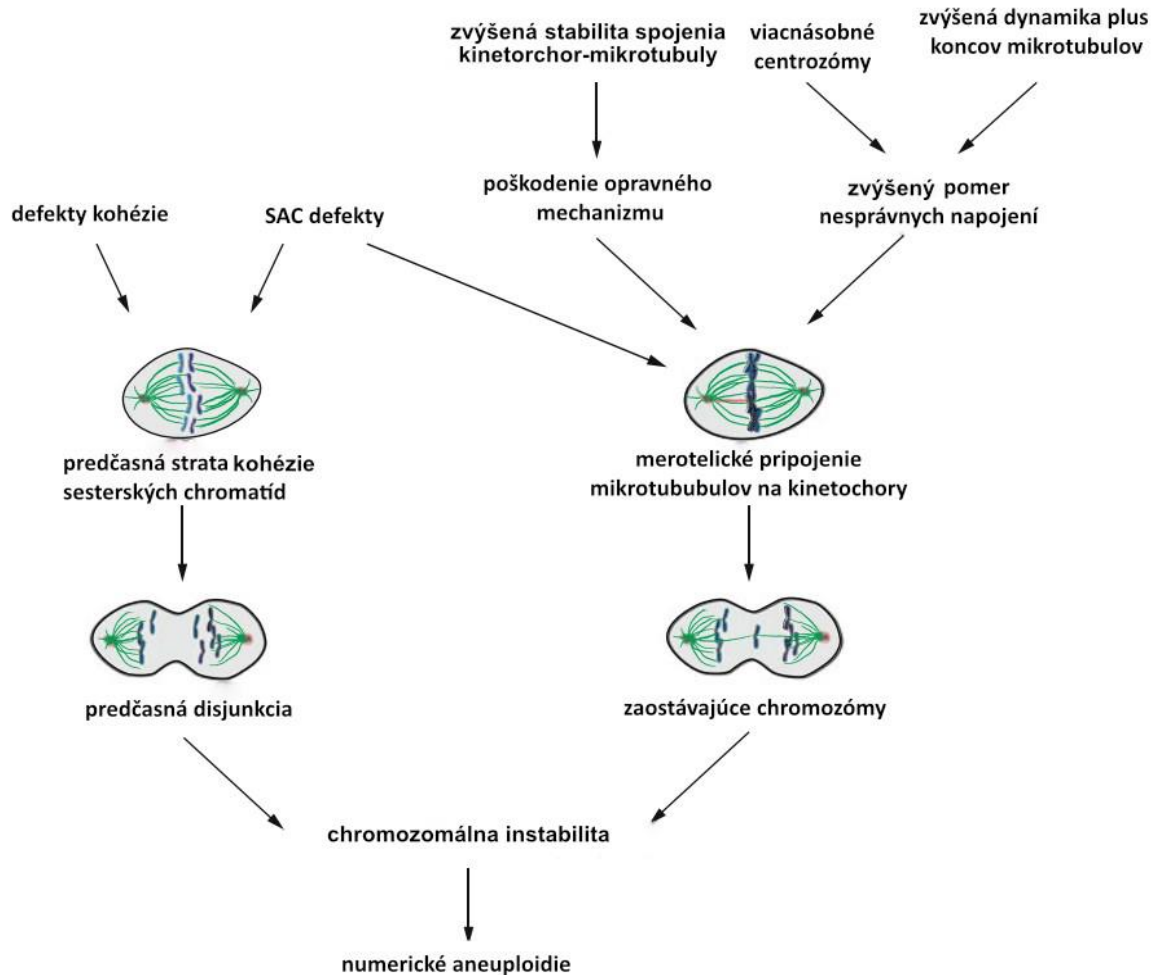
Inaktivácia APC v dôsledku mutácie či úplnej straty génu, vyústi v zvýšenú signalizáciu Wnt v dôsledku neschopnosti signálnej dráhy degradovať  $\beta$ -katenín. Biologický dôsledok tejto inaktivácie je následne zvýšená proliferácia, diferenciácia, migrácia a adhézia kolorektálnych buniek (Colussi *et al.*, 2013). Narušenie funkcie Wnt signálnej dráhy je teda prvým krokom, ktorý vedie k tvorbe kolorektálneho benígneho adenómu. Podľa výskumov je však málo pravdepodobné, že by samotná mutácia APC viedla k progresii na malígnu nádor (Hermsen *et al.*, 2002; Lamlum *et al.*, 2000). Syndróm familiárnej adenomatóznej polypózy býva v 60-80 % spájaný s vrodenu mutáciou génu APC (Powell *et al.*, 1993).

### 3.5.2 Chromozomálna instabilita

Chromozomálna instabilita (CIN) je typ genomickej instability. Prejavuje sa ako zvýšená karyotypická nestabilita medzi bunkami. CIN je možno definovať ako zvýšený rozdiel a variabilitu pri analýze karyotypov dcérskych buniek pri porovnaní s referenčnou populáciou. Výsledkom CIN sú zmeny na mnohých úrovniach genómu. Ku častým zmenám patria, napr. aneuploidie, translokácie (balancované alebo nebalancované), inverzie, delécie na chromozomálnej úrovni, subchromozomálne genomické amplifikácie a vysoká miera straty heterozygoty (LOH) (Geigl *et al.*, 2008; Pino *et al.*, 2010). Diverzita dôsledkov CIN naznačuje, že sa jedná o proces, pri ktorom dochádza k mnohopočetným genetickým alternáciám, avšak celkový presný mechanizmus je slabo pochopený (Vargas-Rondón *et al.*, 2017). CIN je podľa meta-analýzy 10 126 pacientov možné použiť na stratifikáciu prognózy pacientov s CRC (Walther *et al.*, 2008). Mechanizmy, ktorými CIN prispieva ku dôsledkom rakoviny možno poňať aj s darwinovského hľadiska. CIN spôsobuje vnútronádorovú heterogenitu tým, že prispieva ku generovaniu nových bunkových fenotypov genetickými variáciami na mnohých úrovniach. Selekcia poskytuje prostriedok tumoru na adaptáciu na environmentálne podmienky. Túto teóriu podporujú aj experimentálne výsledky s pokusmi na kvasinkách, u ktorých sa potvrdilo, že aneuploidia môže generovať fenotypické variácie, ktoré zlepšujú *fitness* za stresových podmienok (Gerlinger *et al.*, 2010; McGranahan *et al.*, 2012; Pavelka *et al.*, 2010).

Jedným z možných vznikov CIN sú defekty v dráhach zabezpečujúcich správnu chromozómovú segregáciu pri mitóze. Mutácie v génoch tzv. kontrolného bodu zostavovania vretienka – SAC (*spindle assembly checkpoint*) môžu spôsobovať CIN mis-segregáciou chromozómov pri delení. Takýmito génmi sú napr. *MAD* alebo *BUB*, ktoré sú súčasťou MCC (*mitotic checkpoint complex*) komplexu. Tento komplex je zodpovedný za aktiváciu *APC/C* a jeho následný efekt na oddelenie sesterských chromatíd v anafáze mitózy. Tento typ mutácie sa nepotvrdil pri CRC ale pri iných typoch rakovín áno. Pri CRC boli potvrdené mutácie v génoch *hZw10*, *hZwilch* a *hRod*, ktoré majú úlohu kinetochorových proteínov súvisiacich práve s kontrolným bodom mitózy (Cahill *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004). Existujú taktiež dôkazy o nadmernom počte centrozómov ako príčine CIN. Nadmerný počet centrozómov môže vyústiť v mis-segregáciu chromozómov. Aurora kináza A kódovaná génom *AURKA* bola identifikovaná ako príčina amplifikácie centrozómov. Pri jej nadmernej expresii sa vyskytli viacnásobné centrozómy, zastavenie mitózy s nekompletnou cytokinézou a viacjadrové bunky. Amplifikácia génu *AURKA* je

pozitívne asociovaná so stupňom CIN pri kolorektálnych nádoroch (Anand *et al.*, 2003; Ewart-Toland *et al.*, 2003). K ďalším príčinám vzniku CIN v priebehu mitózy možno zaradiť, napr. defekty v kohézii sesterských chromatíd, defekty mikrotubulov pri napájaní na kinetochor, abnormálna stabilita mikrotubulov napojených na kinetochor a zvýšená dynamika plus koncov mikrotubulov (viď obrázok č. 3) (Bastians, 2015)



Obrázok č. 3: Schéma hlavných mechanizmov vedúcich k vzniku CIN. Upravené podľa Bastians, 2015.

Druhou možnosťou vzniku CIN je dysfunkcia telomér. Skracovaním telomér sa za normálnych okolností aktivujú dráhy bunkovej senescencie a apoptózy. Za patologických podmienok bunka prežije a sesterské chromatidy môžu podstúpiť tzv. breakage-fusion-bridge cyklus. Konce sesterských chromatíd bez telomér sa spoja a pri anafáze vytvoria pomyselný mostík medzi jednotlivými centromérmi. Ťahom mikrotubulov deliaceho vretienka sa mostík pretrhne v dôsledku čoho vzniknú 2 dcérske chromozómy s proporčne nerovnakým zvyškom (Engelhardt *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2000).

### 3.5.3 Replikačný stres a chromozomálna instabilita

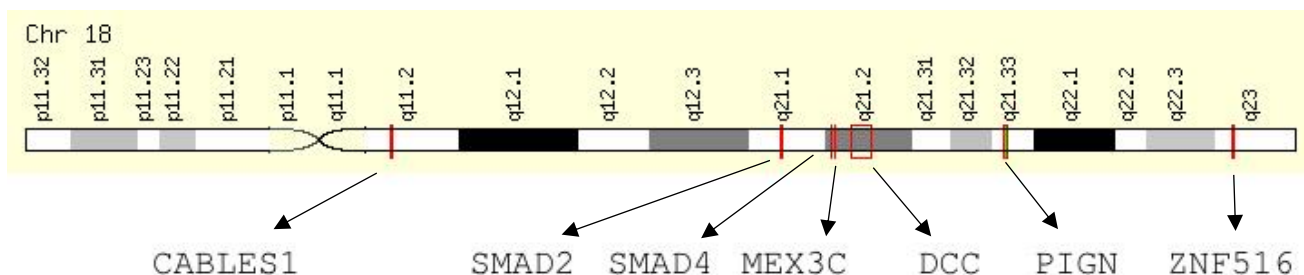
Bol navrhnutý ďalší spôsob vzniku CIN a to skrz replikačný stres (Burrell *et al.*, 2013). V štúdií poukazujú na vysoký počet segregračných chýb pri replikácii pozostávajúci z acentrických fragmentov chromozómov a anafáznych mostíkov, pričom zaostávajúce chromozómy sú skôr menej častý jav. Tieto pozorovania naznačujú, že množstvo aberácií vzniká pre-mitoticky v S fáze bunkového cyklu a zaostávajúce chromozómy nevysvetľujú väčšinu segregračných chýb u CIN (Burrell *et al.*, 2013).

V spomínanej štúdií experimentálne overili úlohu replikačného stresu ako zdroj štruktúrnych chromozomálnych aberácií. Po farmakologickej indukcií replikačného stresu pozorovali aberácie, z nich až 82 % boli anafázne mostíky alebo acentrické chromozómy. Indukovanie replikačného stresu taktiež viedlo k numerickým chromozomálnym instabilitám (Burrell *et al.*, 2013).

Ďalšou hypotézou, ktorú v štúdií overovali bol genetický podklad na zvýšené množstvo segregračných chýb. Najčastejšie deletovaným chromozómom v CIN je chromozóm 18, konkrétne jeho dlhé rameno (Rowan *et al.*, 2005). Na základe tejto znalosti bolo predpokladané, že na 18q sa nachádzajú CIN supresorové gény, ktoré by mohli mať vplyv na manifestáciu mis-segregácií. Tieto gény boli experimentálne identifikované na základe *in vitro* siRNA *knockdownu* v CRC bunkových líniách a sledovaní vplyvu *knockdownu* na mis-segregácie. Jedná sa o gény *ZNF516*, *MEX3X (RKHD2)* a *PIGN* (viď obrázok č. 4) (Burrell *et al.*, 2013).

Následne bolo experimentálne overené, že umlčováním spomenutých génov sa zvyšuje počet 53BP1 (*p53 binding protein 1*) teliesok, ktoré sú zodpovedné za reguláciu bunkovej odpovede na dvojvláknové zlomy DNA. Boli tiež pozorované aj poruchy replikačnej vidlice (Burrell *et al.*, 2013).

Tieto dáta nasvedčujú tomu, že chyby v segregračii chromozómov, ktoré vznikajú následkom umlčovania CIN-supresorových génov majú pôvod v replikačnom strese. Ďalšie potvrdenie tejto hypotézy spočívalo v dodávaní nukleozidov bunkám, ktoré majú umlčané CIN-supresorové gény. Dodávanie nukleozidov preukázateľne znižuje replikačným stresom indukované poškodenie DNA (Bester *et al.*, 2011). Nukleozidy teda redukovali indukciu segregračných chýb ako u bunkových línií s umlčanými CIN supresorovými génmi, tak aj u línií s deletovaným 18q. Naopak suplementácia nukleozidov nemala vplyv na segregračné chyby v CIN negatívnych líniách.



Obrázok č. 4: Ideogram chromozómu 18 a rozloženie génov *CABLES1*, *SMAD2*, *SMAD4*, *MEX3C*, *DCC*, *PIGN* a *ZNF516*. Upravené podľa [www.genecards.org](http://www.genecards.org)

### 3.5.3.1 Gén *ZNF516*

*ZNF516* (*Zinc finger protein 516*) sa nachádza na pozícii 18q23. Proteín patrí do skupiny  $\text{Cys}_2\text{His}_2$  *zinc finger*. Mnoho proteínov z tejto skupiny je transkripčnými faktormi, schopnými rozoznávať špecifické sekvencie DNA. *ZNF516* je lokalizovaný prevažne v jadre. Je zapojený do regulácie tvorby hnedého tukového tkaniva ako chladom indukovateľný transkripčný aktivátor génov ako *UCPI* alebo *PGC1 $\alpha$* . Jeho expresia je tiež ovplyvnená sympatickým nervovým systémom. Nadmerná expresia spôsobuje zvýšenie telesnej teploty, spotrebu energie a zabraňuje navodeniu obezity spôsobenej stravou (Dempersmier *et al.*, 2015). Iné publikácie uvádzajú rolu *ZNF516* ako faktora ovplyvňujúceho denzitu kostí svojou interakciou s génom *RBMS3* (Yang *et al.*, 2013). Recentnejšie výskumy poukazujú na častú metyláciu promótoru *ZNF516* v neopláziách krčka maternice (Brebi *et al.*, 2014; Ili *et al.*, 2018). Pri rakovine prsníka bol *ZNF516* preukázaný ako transkripčný represor a potencionalny supresor *EGFR*, čo podporuje teóriu o tumor resp. CIN supresorovom géne (Li *et al.*, 2017).

### 3.5.3.2 Gén *PIGN*

*PIGN* (*Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class N*) je lokalizovaný na 18q21.33. Gén kóduje fosfoetanolamín transferázu, ktorá je zúčastnená vo finálnych krokoch syntézy glykofosfatidylinozitolovej kotvy (GPI). GPI kotva je lipoproteín, ktorý je posttranslačnou modifikáciou naviazaný k proteínom, ktoré sú určené pre transport na bunkový povrch. Proteíny viazané GPI kotvou na bunkový povrch sa zúčastňujú množstva významných procesov, ako napr. transport, bunková adhézia, syntéza bunkovej steny, imunitné procesy či signalizačné dráhy (Kinoshita *et Inoue*, 2000). Mutácie v *PIGN* boli u ľudí asociované s výskytom vrodených porúch. Už u hetreozgotných mutácii boli sledované vrodené chyby ako hypotónia svalstva, epilepsia a atrofia mozgu (Maydan *et al.*,

2011; Ohba *et al.*, 2014). Recentnejšie výskumy ukázali, že homológ *PIGN* u *Caenorhabditis elegans* má aj druhú funkciu v regulácii kontroly kvality proteínov v endoplazmatickom retikule (Ihara *et al.*, 2017). Zmeny v expresii *PIGN* boli asociované so zvýšeným stupňom genomickej instability u akútnej myeloidnej leukémie. Bolo zistené, že *PIGN* proteín sa môže viazať a regulovať proteín *MAD1*, ktorý je dôležitým kontrolným proteínom zostavenia deliaceho vretienka v SAC. Tieto zistenia opäť podporujú teóriu, že *PIGN* by mohol mať rolu ako CIN-supresorový gén (Teye *et al.*, 2017).

### 3.5.3.3 Gén *MEX3C*

*MEX3C* (*Muscle excess 3 homologue C*) je lokalizovaný na 18q21.2. Gén pochádza z evolučne konzervovanej rodiny RNA viažúcich proteínov s ubikvitín ligázovou aktivitou. U *C. elegans* majú homológy *MEX3* génov úlohu vo vývoji organizmu, konkrétne určovanie bunkovej polarity a udržiavanie zárodočnej totipotencie (Ciosk *et al.*, 2006; Kemphues *et al.*, 1988). U človeka *MEX3C* reguluje mRNA skrz väzbu na 3'-UTR motív a reguluje jeho transláciu alebo priamo degradáciou mRNA. Týmto spôsobom bolo zistené jeho zapojenie do významných procesov ako napr. imunita (modulácia *HLA-A2* génu u človeka, väzba na virálnu RNA a indukcia imunitnej odpovede u myši ) alebo hypertenzia (Cano *et al.*, 2012; Guzmán *et al.*, 2006; Kuniyoshi *et al.*, 2014). Značný je význam v energetickom metabolizme, kde bolo dokázané, že *MEX3C* reguluje *IGF1* (*insulin-like growth factor 1*) a podporuje postnatálny rast či v prípade mutácie *MEX3C* sa zvyšuje energetický výdaj a znižuje výskyt lipidov v krvi u myši (Jiao *et al.*, 2012a, 2012b).

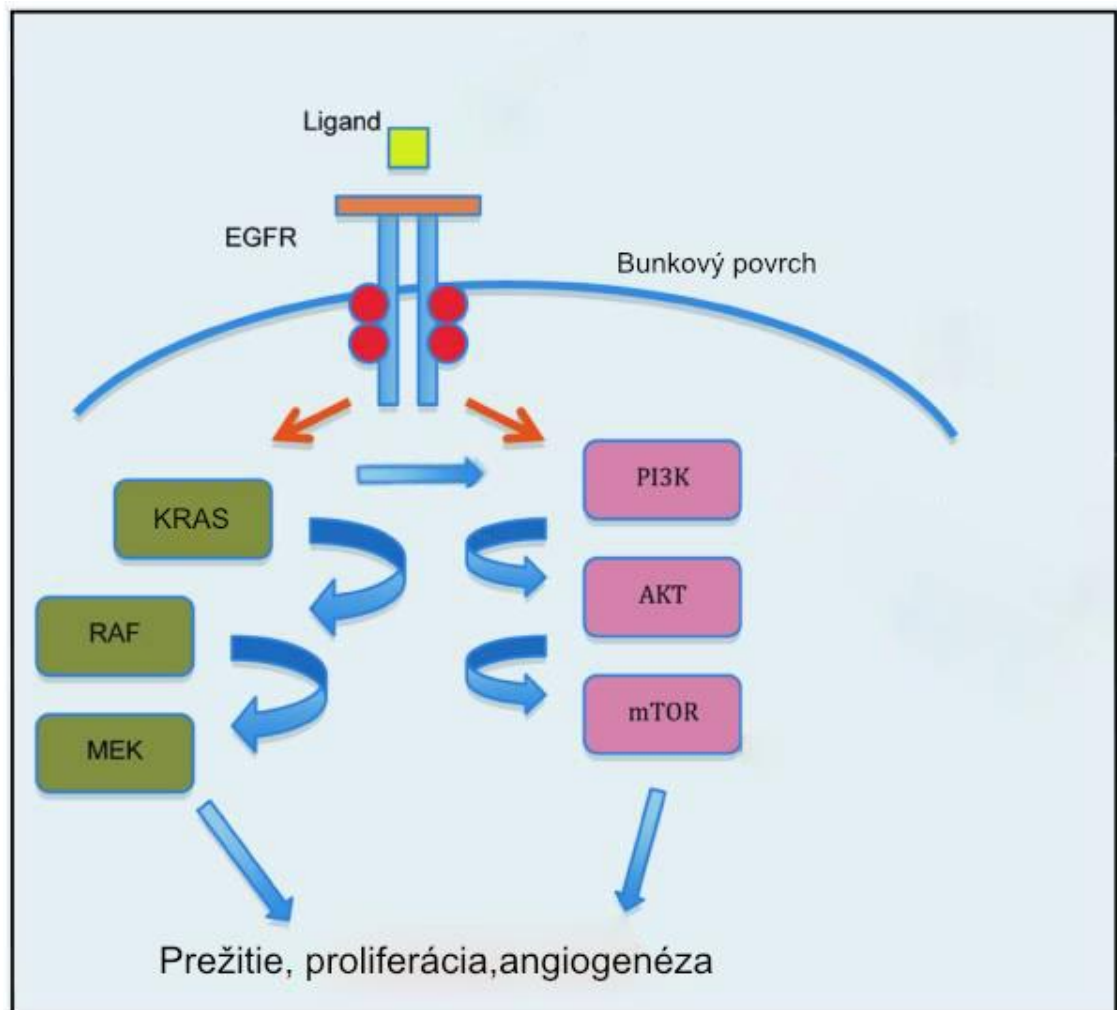
### 3.5.4 EGFR signálna dráha a *KRAS*

Gén *KRAS* (*Kristen Rat Sarcoma Viral oncogene homolog*) je ďalším významným génom prispievajúcim ku tumorigenéze, konkrétne značí prechod z adenómu na neskorší adenóm. *KRAS* patrí do rodiny protoonkogénov *RAS* a nachádza sa na 12 chromozóme na pozícii 12.1. Ďalšie dva *RAS* gény u človeka sú *NRAS* a *HRAS*. *KRAS* je mutovaný v 30-50 % všetkých prípadoch CRC (Santini *et al.*, 2008). Gén kóduje malý GTP-viažúci proteín, patriaci do rodiny *RAS* GTPáz, ktorý je zahrnutý v transdukcii a propagácii extracelulárnych signálov v EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) signálnej dráhe (vid' obrázok č. 5).

Ak je receptor EGFR za normálnych podmienok aktivovaný extracelulárnym ligandom, dochádza k jeho dimerizácii a autofosforylácii tyrozínových zvyškov. Nasleduje aktivácia *KRAS* proteínu za pomoci komplexu Grb2 (*growth factor receptor-bound*



*protein 2*) a SOS (*son of sevenless*) proteínov. KRAS ďalej sprostredkúva aktiváciu a kaskádovú signalizáciu niekoľkých ciest, z ktorých najdôležitejšie sú cesty MAPK (*mitogen activated protein kinase*) a PI3K/AKT (*phosphatidylinositol 3-kinase – protein kinase B*). Tieto dráhy vedú k aktivácii transkripčných faktorov v jadre, ktoré indukujú bunkovú odpoveď v podobe proliferácie, migrácie diferenciácie alebo apoptózy (Citri *et Yarden*, 2006).



Obrázok č. 5: Zjednodušená schéma signalizačnej dráhy EGFR. Upravené podľa Armaghany *et al.*, 2012.

Legenda: EGFR-*epithelial growth factor receptor*, PI3K-*phosphatidylinositol 3-kinase*, AKT- *protein kinase B*, mTOR- *mammalian target of rapamycin*, KRAS- *Kristen Rat Sarcoma Viral oncogene homolog*, RAF- *proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*, MEK- *Mitogen-activated protein kinase kinase*

Mutácie v *KRAS* géne sa v 85-90 % prípadov vyskytujú v kodóne 12 a 13 exónu 1. Obe mutácie sú *missense* mutácie a majú za následok zmenu aminokyseliny v proteínovom reťazci. Mutovaný *KRAS* proteín má zmenenú konformáciu, čo vedie k jeho zablokovaniu

v aktívnej forme. (Roock *et al.*, 2011; Scheffzek *et al.*, 1997). Mutácia v jednej alele génu môže viesť k nadmernej expresii mutovaného génu alebo sa transformačný účinok posilní deléciou *wild-tyповej* alely. Štúdie poukazujú na odlišný onkogenický fenotyp v závislosti výskytu mutácie v 12. alebo 13. kodóne (Guerrero *et al.*, 2000).

Z klinického hľadiska je testovanie na *KRAS* mutáciu dôležité v predikcii účinnosti biologickej liečby monoklonálnymi protilátkami. Biologická liečba, konkrétne cetuximab a panitumumab je cielená proti EGFR tyrozín-kinázovým receptorom, konkrétne ich extracelulárnej doméne. Pri výskyte mutovanej formy *KRAS* sa účinnosť biologickej liečby značne znižuje nakoľko je signalizačná dráha aktivovaná nezávisle na receptore EGFR (Baselga *et Rosen*, 2008; Sullivan *et Kozuch*, 2011).

### 3.5.5 *DCC*, *SMAD* a delécie na 18q

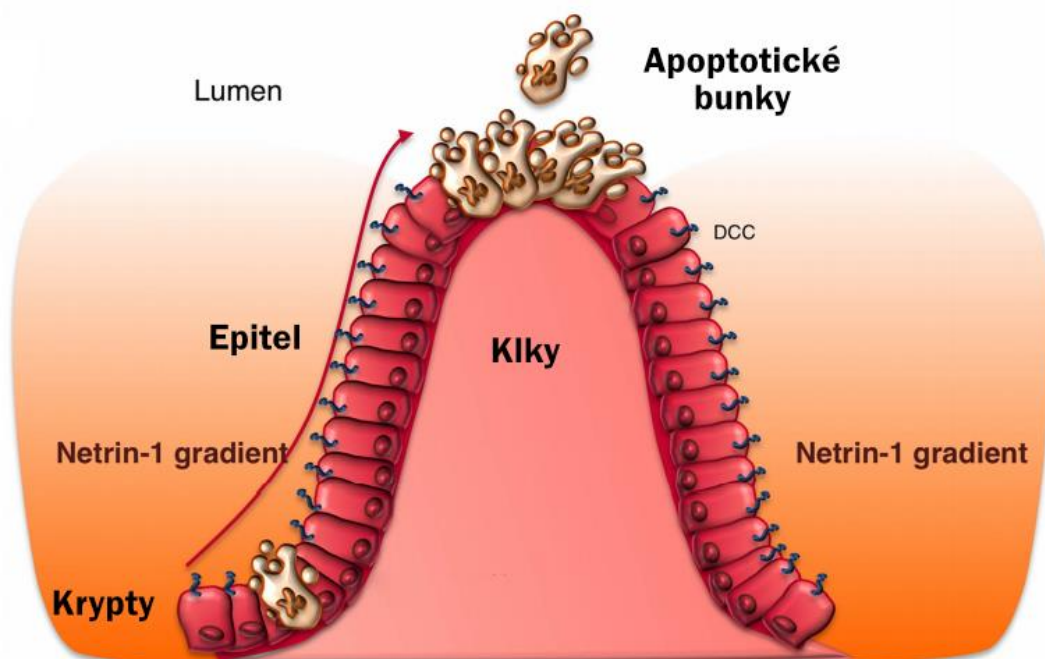
Delécie alebo straty heterozygoty (LOH – *loss of heterozygosity*) na 18q chromozóme sú častou mutáciou pri kolorektálnom karcinóme. Približne 70 % prípadov CRC vykazuje LOH z toho asi 10-30 % v štádiu skorých adenómov a incidencia stúpa pri vyšších štádiách adenómov (Boland *et al.*, 1995; Vogelstein *et al.*, 1989). Prvý kandidát na tumor supresorový gén v tomto regióne bol gén *DCC* (*deleted in colon cancer*). Následne to boli gény *SMAD2* a *SMAD4*. Najnovší kandidátny gén z tejto oblasti je gén *CABLES1* (Alazzouzi *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2017; Mehlen *et Fearon*, 2004).

18q LOH a jej vplyv na CRC ako prognostický marker nízkeho prežitia sa pokúsilo evaluovať už niekoľko štúdií. Avšak výsledky sú ťažko interpretovateľné vzhľadom na to, že sa štúdie v zisteniach rozchádzajú. Niektoré nenašli žiadnu asociáciu 18q LOH s prognózou (Bertagnolli *et al.*, 2011; Ogino *et al.*, 2009; Popat *et al.*, 2007) a niektoré naopak potvrdzujú úlohu 18q LOH ako markeru nízkeho prežitia (Jen *et al.*, 1994; Jernvall *et al.*, 1999; Sarli *et al.*, 2004). Meta-analýza 27 štúdií o vzťahu medzi 18qLOH a prognóze CRC preukázala signifikantne horšie prežitie u pacientov s 18q LOH. Závery tejto meta-analýzy poukazujú však na publikačné skreslenie v dôsledku možného nepublikovania štúdií s negatívnym alebo neurčitým záverom (Popat *et Houlston*, 2005).

*DCC* je gén v oblasti 18q21.2. Jeho proteín je receptor pre netrín-1, ligand ktorý je potrebný na axónove vedenie pri raste axónov (Keino-Masu *et al.*, 1996). *DCC* bol navrhnutý ako tumor supresorový gén vzhľadom na to, že jeho znížená expresia sa objavuje hneď pri niekoľkých druhoch nádorových ochorení a je spojená s horšou prognózou a odozvou na chemoterapiu. Ďalším dôkazom bol fakt, že obnovenie expresie *DCC* u myši

potlačilo nádorový rast *in vitro* (Kato *et al.*, 2000). Avšak vyskytli sa výsledky protichodných štúdií, ktoré nepotvrdili status *DCC* ako tumor supresorového génu a navyše boli objavené nové tumor supresorové gény *SMAD2* a *SMAD4* (Thiagalingam *et al.*, 1996). V neposlednom rade sa experimentálne potvrdilo, že *knockout* myši *DCC* *-/-* v hlodavčom ortológnom géne neboli životaschopné pre nevyvinutú nervovú sústavu a *DCC* *+/-* línia nevykazovala náchylnosť na tvorbu tumorov po dobu 2 rokov (Fazeli *et al.*, 1997).

Najnovšie zistenia zaradzujú *DCC* k tzv. dependentným receptorom, t.j. receptorom, ktoré nie sú inaktívne v neprítomnosti ligandu, ale namiesto toho indukujú apoptózu (Mehlen *et al.*, 1998; Mehlen *et Tauszig-Delamasure*, 2014). Epiteliálne bunky hrubého čreva vznikajú z kmeňových buniek lokalizovaných v črevných kryptách a rastom sa posúvajú smerom hore ku klkom. Tento proces od začiatku po dosiahnutie vrcholu trvá asi 5 dní, pričom po dosiahnutí vrcholu podstupujú apoptózu. Predpokladá sa, že v tomto procese zohráva úlohu práve *DCC* receptor a gradient koncentrácie ligandu netrínu-1, ktorý klesá od krýpt smerom ku klkom (viď obrázok č 6.). K patologickým procesom môže dochádzať 2 spôsobmi, a to buď znefunkčnením receptoru mutáciou alebo autokrinnou produkciou ligandu (Mazelin *et al.*, 2004; Mehlen *et al.*, 1998).



Obrázok č. 6: Vplyv gradientu ligandu *DCC*, netrínu-1 na apoptózu epiteliálnych buniek hrubého čreva. Upravené podľa Mehlen *et Tauszig-Delamasure*, 2014.

*SMAD4* (*Mothers Against Decapentaplegic Homolog*) sa nachádza na pozícii 18q21.2 a *SMAD2* v pozícii 18q21.1. Oba gény kódujú proteíny zo skupiny 8 druhov SMAD proteínov. *SMAD4* slúži ako mediátor signalizačnej dráhy TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ) a *SMAD2* je jeho heterodimerizačný partner. Signalizačnú dráhu iniciuje TGF- $\beta$  ligand, ktorý sa naviaže na receptor T-  $\beta$ R II, ktorý fosforyluje koreceptor T-  $\beta$ R I, ktorý zasa fosforyluje *SMAD2*. Konformačnou zmenou sa *SMAD2* oddelí od receptora a vytvorí heterodimérny komplex so *SMAD4*. Komplex je transportovaný do jadra, kde na seba naviaže ďalšie transkripčné faktory a aktivuje cieľové gény indukujúce apoptózu. *SMAD2* a *SMAD4* gény sú teda tumor supresorové gény a ich mutácia má vplyv na priebeh rakovinového ochorenia najmä v zníženej odpovedi na chemoterapiu 5-fluórouracilom (Boulay *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2018).

*CABLES1* (*Cdk5 and Abl enzyme substrate 1*) sa nachádza na pozícii 18q11.2. Jeho proteín je lokalizovaný najmä v jadre. *CABLES1* je proteín interagujúci s mnohými cyklín dependetnými kinázami (cdk). Funkčne reguluje aktivitu cdk tým, že funguje ako adaptorová molekula medzi nereceptorovými tyrozín-kinázami a cdk. Taktiež interaguje s proteínom p53 a potencuje bunkovú smrť vyvolanú p53 (Tsuji *et al.*, 2002; Zukerberg *et al.*, 2000). Celkový účinok *CABLES1* tkvie v regulácii bunkového cyklu, hlavne v jeho inhibícii v proliferujúcich tkanivách. Je teda považovaný za tumor supresorový gén. Gén je mutovaný, resp. má negatívne ovplyvnenú expresiu v 55-65 % prípadov kolorektálnych karcinómov (Park *et al.*, 2007; Zukerberg *et al.*, 2000). Taktiež bolo preukázané, že *CABLES1*, interaguje s množstvom ďalších proteínov, ktoré patria do niekoľkých signalizačných dráh. Jeho mutácia je pravdepodobne spojená s narušením bunkového cyklu a jeho kontroly, avšak doteraz toho nie je o *CABLES1* veľa známe a je potreba ďalších štúdií (Huang *et al.*, 2017).

### 3.5.6 Proteín p53

Tumor supresorový gén *p53* je lokalizovaný na chromozóme 17, konkrétne na 17p13.1. Funkcia p53 proteínu je dobre známa, jedná sa o sekvenčne špecifický DNA väzobný proteín. Kontroluje transkripciu a expresiu až stoviek ďalších génov, ktoré sa podieľajú na zablockovaní bunkovej proliferácie, stimulovaní DNA opráv alebo navodení apoptózy. Za normálnych okolností je p53 udržiavaný v bunkách v nízkych hladinách proteínom MDM2 (*Mouse double minute 2 homolog*), ktoré sa viažu na transaktivačnú doménu p53 a označujú ho na degradáciu ubiquitináciou. Aktivácia funkcií *p53* začína rôznymi druhmi bunkového stresu, ako napr. genotoxický stres (UV a gama žiarenie, karcinogény a pod.) alebo

onkotoxický stres spôsobený hyperproliferatívnymi signálmi (Leslie *et al.*, 2002; Pelengaris *et Khan*, 2009b; Pino *et Chung*, 2010). Fosforyláciou p53 vplyvom rôznych aktivátorových kináz dôjde k zmene konformácie a znemožneniu naviazania MDM2, p53 sa teda hromadí v jadre ako tetramér a reguluje transkripciu cieľových génov.

p53 je mutovaný alebo má zmenenú expresiu v približne 50-75 % CRC a taktiež jeho expresia je ovplyvnená rôznymi spôsobmi u viac ako polovice zo všetkých ľudských onkologických ochorení. Stratou funkcie p53 sa bunka dostáva mimo rastovú kontrolu, prestáva odpovedať na stresové signály a poškodenia čo vedie ku akumulácii ďalších genomických instabilit a genetických abnormalít. Dysfunkcia p53 sa považuje za prechodový bod z adenómu na karcinóm (Leslie *et al.*, 2002; Pino *et Chung*, 2010).

### 3.6 Mikrosatelitová instabilita

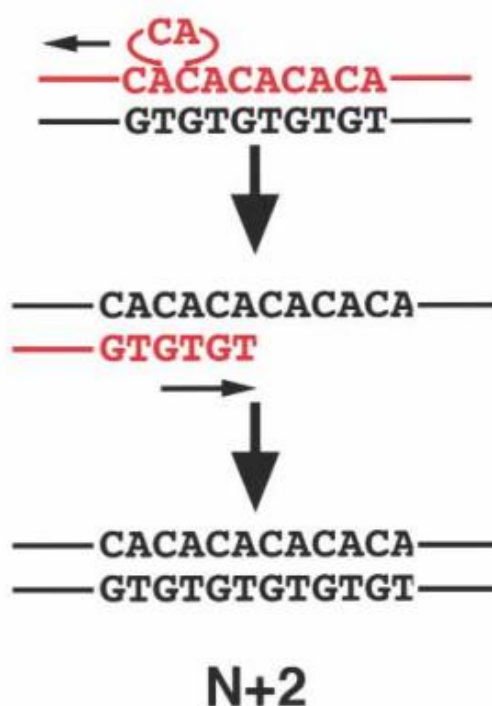
Mikrosatelitová instabilita (MSI) bola objavená a asociovaná so stratou funkcie DNA mismatch repair systému (MMR). Pri výskyte chybného párovania báz v DNA spôsobeného spontánnymi mutáciami alebo chybami pri replikácii systém MMR kontroluje a opravuje defekty, ktoré nemôže opraviť, napr. DNA polymeráza svojou *proof-reading* aktivitou (Grady *et Carethers*, 2008).

MMR je vysoko konzervovaný systém na opravu chybného párovania, ale taktiež vie detegovať inzerčne-delečné slučky. Za pomoci MMR je replikačný aparát bunky tisíckrát presnejší odstraňovaním svojich chýb. Chybné párovanie je rozoznané heterodimérom komplexom mutS homolog 2 (*hMSH2*) a mutS homolog 6 (*hMSH6*), pričom sa naviaže na DNA ako svorka. Nasleduje vytvorenie tzv. *nicku* (zárezu) vedľa nukleotidu naviazaním ďalšieho heterodiméru hMHL1-hPMS2. Exonukleáza 1 odstráni niekoľko nukleotidov, ktoré sú následne opravené polymerázami  $\delta$  alebo  $\epsilon$ . Ligáza nakoniec spojí rozpojené konce. Podobný systém avšak s inými homológmi heterodimérov je určený na opravu inzerčných slučiek pozostávajúcich z 2 a viac nukleotidov až do dĺžky 16 nukleotidov (Armaghany *et al.*, 2012; Geiersbach *et Samowitz*, 2011; Jaspersen *et al.*, 2010; McCulloch *et al.*, 2003).

Pokiaľ by nedošlo k oprave nesprávne spárovaných báz, mohlo by dôjsť ku transverzii alebo tranzícii a teda bodovej mutácii v dôsledku čoho by sa mohli akumulovať mutácie v bunke. Takéto hromadenie, aj keď spočiatku náhodné, by mohlo mať v neskorších klonoch za následok neoplastický rast (odtiaľ druhé pomenovanie pre MSI – mutátorový typ CRC). Mutácie v génoch MMR systému ako sú *hMSH2* alebo *hMSH6* sú spojené s Lynchovým syndrómom (Grady *et Markowitz*, 2015).

Lynchov syndróm, tiež známy ako hereditárny nepolypózny kolorektálny karcinóm, je najčastejšie sa vyskytujúca hereditárna forma CRC. Ide o autozomálne dominantné ochorenie, ktoré utvára predispozície aj pre iné druhy nádorových ochorení (Mlkvá, 2016). Jedinci s LS majú zdedenú jednu mutovanú alelu, zatiaľ čo druhá alela je plne funkčná. Na znefunkčnenie MMR systému je potrebná ešte jedna mutácia druhej *wild-type* alely, čo korešponduje s Kundsonovou teóriou dvoch zásahov. K vyradeniu druhej alely môže teda dôjsť napr. deléciou, génovou konverziou alebo metyláciou. Práve metyláciou môže byť gén inaktivovaný aj pri sporadickej forme CRC a to konkrétne hypermetyláciou promotóru (Geiersbach *et* Samowitz, 2011; Veigl *et al.*, 1998).

Nefunkčný MMR systém prispieva k hromadeniu mutácií v genóme avšak aj v oblastiach mikrosatelitov, kde môže spôsobovať zmeny počtu opakovaní repetitívnych sekvencií či už nárastom alebo poklesom (viď obrázok č. 7). To sa prejaví ako mikrosatelitová instabilita, ktorú možno laboratórne identifikovať napr. amplifikáciou vybraných mikrosatelitných markerov a ich elektroforetickým rozlíšením (Grady *et* Markowitz, 2015).



Obrázok č. 7 : Schéma mechanizmu inzercie repetitívnej sekvencie v mikrosatelitoch.

Upravené podľa Oda *et al.*, 2002.

### 3.7 Hypermetylačná cesta

Epigenetická regulácia génovej expresie je základným mechanizmom, ktorý má rolu v genomickej stabilite, embryonickom vývoji a diferenciácii tkanív. CpG ostrovy sú regióny DNA sekvencie so zvýšeným výskytom sekvencie, kde je cytozín nasledovaný guanínom v smere 5'-3'. U človeka je okolo 70 % všetkých génov regulovaných výskytom CpG ostrovov v promótoroch a ich metyláciou je regulovaná expresia (Deaton *et* Bird, 2011).

V rakovinových bunkách môže dochádzať k epigenetickým zmenám hypermetyláciou. Na základe toho bola identifikovaná nová cesta vzniku CRC, ktorá je charakteristická epigenetickými nestabilitami, epidemiológiou, histológiou a klinickými prejavmi. Táto cesta bola pomenovaná ako metylátorová alebo hypermetylačná cesta CpG ostrovov (*CpG island methylator phenotype* – CIMP). Presná príčina, ktorá je zodpovedná za vznik nie je úplne známa. Pravdepodobne sa jedná o heterogénne mechanizmy. Uvažuje sa o nadmernej expresii génov DNA metyltransferáz alebo o inkativácii bariér zabraňujúcich metylácii normálne nemetylovaných CpG oblastí. Výsledok je však jednoznačný, a to inaktivácia tumor supresorových génov a progresia v malígný nádor (Grady *et* Carethers, 2008; Issa *et al.*, 2005; Mojarad *et al.*, 2013).

## 4 Materiál a metódy

### 4.1 Biologický materiál

Boli použité tkanivové rezy s hrúbkou 4-6  $\mu\text{m}$  fixované vo formalíne a zaliaté v parafíne (FFPE). Tkanivo pochádzalo od pacientov Onkologickej kliniky Fakultnej nemocnice Olomouc v rámci rutinného vyšetovania pacientov laboratóriom cytogenetiky. Pacientom bol diagnostikovaný CRC v rôznych štádiách vývoja. Pacienti pri odbere súhlasili so spracovaním biologického materiálu a anonymných osobných údajov na vedecké účely.

### 4.2 Použité súpravy

Platinum Bright Nucleic Acid Labeling kit (Kreatech<sup>TM</sup>), Plasmid Mega kit 25 (QIAGEN)

### 4.3 Bakteriálne klony

Bakteriálne klony *Escherichia coli* s inzertom daného génu v plazmide. Použité boli bakteriálne línie: RP11879D16 pre gén *DCC*, RP11837D10 pre gén *MEX3C*, RP11162B22 pre gén *PIGN* a RP11684C19 pre gén *ZNF516*.

### 4.4 Chemikálie

70% etanol (Fagron), 96% etanol (Fagron), xylén (Mikrochem), izopropanol (Lach-Ner), octan sodný (Lach-Ner), deionizovaná voda, deionizovaná sterilná voda (Ambion), Cot-1 DNA – FISH grade Cot (Kreatech), hybridization solution (Cytocell), formaldehyd 36-38% (Lach-ner), formamid (Ambion), DAPI Antifade (Vysis), 35-38% kyselina chlorovodíková (Lach-Ner), tiokyanát sodný (Sigma-Aldrich), chlorid sodný (Sigma-Aldrich), citrát sodný (Sigma-Aldrich), chlorid draselný (Lach-Ner), dodekahydrát hydrogénfosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich), dihydrogénfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich), TRIS (Sigma-Aldrich), EDTA (Sigma-Aldrich), pepsín-2500 U/mg (Sigma-Aldrich), NP-40 (Vysis), LB broth base (Invitrogen), kaučukový cement (Marabu), NaOH na úpravu pH roztokov (PENTA), ampicilín (Sigma-Aldrich)

### 4.5 Roztoky

zásobný roztok 20x SSC

- 175 g NaCl
- 88 g citrátu sodného
- doplniť do 1 l deionizovanou vodou, upraviť pH na 5,3



#### premyvací pufer

- 100 ml zásobného roztoku 20x SSC
- doplnit' do 1 l deionizovanou vodou, upravit' pH na 7,0

#### proteázový pufer

- 0,9% roztok NaCl, pH upravit' na 2

#### 10x zásobný roztok PBS

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 30,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- doplnit' do 1 l deionizovanou vodou

#### 10% pufrovaný formalín

- 40 ml formaldehydu
- 100 ml zásobného 10x PBS
- doplnit' do 0,5 l deionizovanou vodou a uchovávat' v tme

#### premyvací roztok I

- 20 ml zásobného roztoku 20x SSC
- 3 ml NP-40
- doplnit' do 1 l deionizovanou vodou, upravit' pH na 7

#### premyvací roztok II

- 100 ml zásobného roztoku 20x SSC
- 1 ml NP-40
- doplnit' do 1 l deionizovanou vodou, upravit' pH na 7

#### LB médium

- 20 g LB broth base
- 4,7 g NaCl
- doplnit' do 1 l vodou a autoklávovat'

TE pufer

- 200 µl 0,5mol/l TRIS
- 200 µl 0,05 mol/l EDTA
- 9,6 ml deionizovanej vody

pufrovaný formamid

- 24,5 ml formamidu
- 7 ml deionizovanej vody
- 3,5 ml zásobného roztoku 20x SSC
- pH upraviť na 7,0-7,8

#### **4.6 Pomôcky**

pozitívne nabité mikroskopické podložné sklá (Superfrost™ Plus Adhesion Slides – Thermo Fisher scientific), krycie mikroskopické sklá rôznych veľkostí (Thermo Fisher scientific), špičky do mikropipiet (Eppendorf dualfilter tips), mikroskúmavky, pasteurove pipety, ochranné rukavice, odmerné valce, buničitá vata, ľadová triešť, centrifugačné falkóny, centrifugačné mikroskúmavky, kadičky, farbiace nádoby podľa Coplina, reagenčné autoklávovateľné fľaše

#### **4.7 Prístroje**

Mikroskop Olympus BX51 (Olympus), mikropipety (research/plus-Eppendorf), laminárny box (Herasafe KS12 – Thermo Fisher Scientific), digestor (N1200 – Merci), minicentrifúga (miniSpin plus – Eppendorf), chladená centrifúga (Rotina 420R – Hettich), centrifúga (Smart 15 – Hanil), váhy (ED4235 – Sartorius), sonifikačný systém Bioruptor® (Diagenode), vírivá trepačka (Lab dancer-IKA, C24 – New Brunswick), vodný kúpeľ (TW8 – Julabo, ED5 – Julabo), termoblok (BSH200-Benchmark Scientific), hybridizér (Hot-Brite – Vysis, 5500-24 – Leica), magnetická miešačka (Arec-x – Velp scientific), pH meter (Hanna instruments), kombinovaná chladnička s mrazničkou (Gorenje, Liebherr), inkubátor (Mettler), výrobník ľadu (GB 902 – Brema), vákuový rotačný koncentrátor (Concentrator 2301 – Eppendorf)

#### **4.8 Použité vyhodnocovacie postupy**

Údaje získane po vyšetrení FISH metódou boli vyhodnotené v spolupráci s katedrou Matematické analýzy a aplikácií matematiky UPOL. Použitý bol štatistický software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019), verzia 3.5.2. Pre

porovnanie charakteristík pacientov boli použité štatistické metódy: ANOVA test, Pearsonov test, Fisherov test. Hladina signifikantnosti bola stanovená na 5 %. Na hodnotenie prežitia bol použitý Kaplan- Meierov odhad funkcie prežitia spolu s log-rank testom.

#### **4.9 Kultivácia baktérií a izolácia plazmidu**

Na izoláciu použiť Plasmid Mega kit 25 (QIAGEN). Bakteriálne línie obsahujúce plazmid s daným inzertom génu inokulovať do 1 l LB média s prídavkom 50 mg ampicilínu a kultivovať cez noc na vyhrievanej trepačke pri 37 °C. Médium s baktériami centrifugovať 15 minút v predchladenej centrifúge pri 4 °C a pri 6000 g.

1. Sediment resuspendovať v 50 ml pufru P1 (súčasť kitu).
2. Pridať 50 ml pufru P2 (súčasť kitu) a premiešať prevrátením 4-6x a nechať stáť 5 minút pri laboratórnej teplote.
3. Potom pridať 50 ml pufru P3 (súčasť kitu) a roztok znovu premiešať prevrátením 4-6x a nechať stáť 30 minút na ľade.
4. Roztok centrifugovať 30 minút pri 2000 g a pri 4 °C.
5. Upevniť kolónu QIAGEN-tip na 1000 ml zbernú nádobu a kolónu premyť 35 ml QBT pufru (súčasť kitu).
6. Na kolónu naliať číry supernatant po centrifugácii nechať voľne pretiecť.
7. Kolónu premyť 200 ml QC pufru (súčasť kitu) a pretečenú tekutinu vyliat' do odpadu, umiestniť kolónu na novú čistú zbernú nádobu.
8. Eluovať DNA z valca naliatím 35 ml QF pufru (súčasť kitu).
9. K eluátu pridať 24,5 ml čistého izopropanolu, zamiešať a preliať do čistej centrifugačnej falkóny.
10. Falkónu centrifugovať 30 minút pri 15000 g a pri 4 °C.
11. Supernatant vyliat' do odpadu a k sedimentu pridať 7 ml 70% etanolu laboratórnej teploty.
12. Roztok znova centrifugovať 10 minút pri 15000 g a pri 4 °C
13. Supernatant vyliat' do odpadu a sediment ponechať vyschnúť 10-20 minút.
14. Peletu rozpustiť v 10 ml TE pufru.

#### **4.10 Príprava sondy na FISH**

Za použitia vyizolovaných plazmidov boli pripravené sondy daných génov (LSI sondy) za použitia Platinum Bright Nucleic Acid Labeling kitu (Kreatech™) využívajúceho metódu priameho značenia ULS®.

1. 1 µg DNA vyizolovaného plazmidu o známej koncentrácii DNA rozriediť do 100 µl sterilnej deionizovanej vody do 0,5ml mikroskúmavky určenej pre sonifikátor.
2. Sonifikátor naplniť destilovanou vodou spolu s drveným ľadom z destilovanej vody a umiestniť vzorky. Sonifikáciu nastaviť na 20 cyklov (1 cyklus=30 sekúnd sonifikácie, 90 sekúnd bez sonifikácie)
3. Po sonifikácii roztok zakoncentrovať vo vákuovej odparke na konečný objem 16 µl.
4. Následne pridať v laminárnom boxe 2 µl ULS dye a 2 µl 10x labeling solution.
5. Uzavreté mikroskúmavky inkubovať vo vodnom kúpeli 30 minút pri teplote 85 °C. Po inkubácii preniesť vzorky na ľad až do ďalšieho použitia.
6. Resuspendovať náplň prečist'ovacích kolón a kolóny umiestniť do prázdnych mikroskúmaviek.
7. Centrifugovať kolóny pri 20000 g 1 minútu, tekutinu čo pretekla vyliat' do odpadu.
8. Na kolónu naniest' 300 µl sterilnej deionizovanej vody a kolóny s mikroskúmavkami centrifugovať pri 20000 g 1 minútu. Mikroskúmavku aj s pretečenou vodou vyhodiť a kolónu nasadiť na novú mikroskúmavku.
9. Na kolónu naniest' vzorky, ktoré boli doteraz uložené na ľade a centrifugovať pri 20000 g 1 minútu.
10. Ku pretečeným vzorkám pridať 3 µl octanu sodného o koncentrácii 3 mol/l a pH 5, 10 µl Cot-1 blokovacej DNA a 83 µl čistého etanolu.
11. Vzorky uložiť do mrazničky do mrazničky pri -80 °C do nasledujúceho dňa. Následne centrifugovať 30 minút pri 20000 g v predchladenej centrifúge pri 4 °C.
12. Supernatant vyliat' a sediment nechať vysušiť v laminárnom boxe do úplného zaschnutia, potom resuspendovať sediment v 25 µl hybridizačného pufru.

#### **4.11 Fluorescenčná *in situ* hybridizácia**

Použité boli tkanivové rezy s hrúbkou 4-6 µm fixované vo formalíne a zaliaté v parafíne (FFPE). Rezy boli fixované na podložných mikroskopických sklách s pozitívne nabitou plochou.

1. Sklá s rezmi tri-krát po 7 minút premyť v xyléne, následne dva krát v 96% etanole po dobu 5 minút.
2. Vysušiť sklá na vyhrievanej platničke pri konštantnej teplote 49 °C.
3. Sklá ponoriť do kyseliny chlorovodíkovej o koncentrácii 0,2 mol/l na 20 minút a potom do deionizovanej vody na 3 minúty.
4. Premyť sklá premývacím pufrom po dobu 3 minút.

5. Umiestniť sklá na 20 min do roztoku tiokynatanu sodného o koncentrácii 1 mol/l vyhriateho na 80 °C vo vodnom kúpeli.
6. Premyť sklá deionizovanou na 1 minútu a potom dvakrát premývacím pufrom po dobu 5 minút.
7. Sklá umiestniť do proteázového pufru s prídavkom pepsínu o celkovej koncentrácii 0,5 mg/ml, vyhriateho v inkubátore na 37 °C. Ponechať v inkubátore po dobu 55 minút.
8. Potom sklá dvakrát premyť premývacím pufrom po dobu 5 minút.
9. Sklá usušiť na vyhrievanej platničke pri konštantnej teplote 49 °C.
10. Sklá umiestniť do 10% pufrovaného formalínu na 10 minút a následne premyť dvakrát premývacím pufrom po dobu 5 minút a deionizovanou vodou 1 minútu.
11. Sklá usušiť na vyhrievanej platničke pri konštantnej teplote 49 °C.
12. Napipetovať na tkanivo 5-10 µl sondy a priložiť krycie sklíčko. Vytlačiť všetky vzduchové bubliny a zalepiť kaučukovým cementom.
13. Sklá vložiť do hybridizéru a nastaviť teplotu denaturácie na 85 °C - 1 minútu a teplotu hybridizácie 37 °C na dobu 12-24 hodín.
14. Po hybridizácii odobrať krycie sklíčka a sklá premyť v premývacom roztoku I vyhriatom vo vodnom kúpeli na 73 °C po dobu 1 minúty a 45 sekúnd a potom v premývacom roztoku II pri laboratórnej teplote po dobu 30 sekúnd.
15. Sklá opláchnuť deionizovanou vodou a nechať usušiť pri laboratórnej teplote bez prístupu svetla až do úplného zaschnutia.
16. Na tkanivo naniest' cca 5 µl DAPI roztoku (podľa veľkosti tkaniva) a priložiť čisté krycie sklo.
17. Odčítať na mikroskope Olympus BX51.

#### **4.12 ReFISH**

Vzorky, ktoré nevykazovali úspešnú hybridizáciu boli podrobené tzv. reFISH.

1. Podložné sklíčka aj s kryciami sklíčkami ponoriť na 3 minúty do 96% etanolu. Po 3 minútach odobrať krycie sklíčka a znovu ponoriť na 3 minúty do 96% etanolu.
2. Následne sklá ponoriť do pufrovaného formamidu na 5 minút za stáleho ohrevu roztoku na 73 °C vo vodnom kúpeli.
3. Potom sklá namočiť postupne do 75% etanolu, 80% etanolu a 96% etanolu. Každý krát po 1 minúte.
4. Nechať sklá zaschnúť na vyhrievanej platničke pri 49 °C.

5. Napipetovať na tkanivo 5-10  $\mu\text{l}$  sondy a priložiť krycie sklíčko. Vytlačiť všetky vzduchové bubliny a zalepiť kaučukovým cementom.
6. Sklá vložiť do hybridizéru a nastaviť teplotu denaturácie na 85 °C - 1 minútu a teplotu hybridizácie 37 °C na dobu 12-24 hodín.
7. Po hybridizácii odobrať krycie sklíčka a sklá premyť v premývacom roztoku I vyhriatom vo vodnom kúpeli na 73°C po dobu 1 minúty a 45 sekúnd a potom v premývacom roztoku II laboratórnej teploty po dobu 30 sekúnd.
8. Sklá opláchnuť deionizovanou vodou a nechať usušiť pri laboratórnej teplote bez prístupu svetla až do úplného zaschnutia.
9. Na tkanivo naniest' cca 5  $\mu\text{l}$  DAPI roztoku (podľa veľkosti tkaniva) a priložiť čisté krycie sklo.
10. Odčítať na mikroskope Olympus BX51.

## 5 Výsledky

### 5.1 Vyšetrenie súboru pacientov metódou FISH

Pacientske vzorky boli vyšetrené metódou FISH. Vyšetrované boli gény lokalizované na dlhom ramene chromozómu 18 a to konkrétne *ZNF516*, *PIGN*, *DCC* a *MEX3C*. Boli použité duálne sondy pre urýchlenie práce a šetrenie s biologickým materiálom. Na určenie priemerného počtu kópií jednotlivých génov vo vzorke bolo potrebné posúdiť minimálne 50 jadier, optimálne však 100, na odpočet jednotlivých signálov. Vzorka bola vyhodnotená vypočítaním priemerného počtu signálov pre každý gén. V prípade neúspešnej hybridizácie bola vzorka podrobená tzv. reFISH, teda postupu na opätovnú hybridizáciu a nové odčítanie signálov.

### 5.2 Základná charakteristika súboru pacientov

Súbor pacientov pozostával zo 174 pacientov z toho 76 žien a 98 mužov (viď tab. č. 1). Vekový priemer pacientov v čase diagnózy bol 64,1 roka so smerodajnou odchýlkou 10,79. Medián veku bol 64 rokov. Vekové rozpätie pacientov bolo od 31 do 91 rokov. Pri 165 pacientoch bola dostupná informácia o *KRAS* mutácii z predošlých vyšetrení, z toho bolo 67 s mutáciou a 98 bez mutácie. U 158 pacientov bol dostupný údaj o histologickom gradingu - stupeň diferenciacie malígneho nádoru. Podľa WHO rozoznávame 3 stupne gradingu adenokarcinómu hrubého čreva a konečníka (Bosman *et al.*, 2010). Prvý stupeň znamená dobre diferencovaný adenokarcinóm, druhý stupeň stredne diferencovaný a tretí nízko diferencovaný. Prvý stupeň bol diagnostikovaný u 22 pacientov, druhý u 108 pacientov a tretí u 28 pacientov.

Tabuľka č. 1: Základná údajová charakteristika súboru pacientov

	Kategória	Počet pacientov	Percentuálny podiel	Spolu
Pohlavie	Ženy	76	43,7 %	174
	Muži	98	56,3 %	
KRAS	<i>Wild-type</i>	67	59,4 %	165
	mutovaný	98	40,6 %	
Grade	1	22	13,9 %	158
	2	108	68,4 %	
	3	28	17,7%	

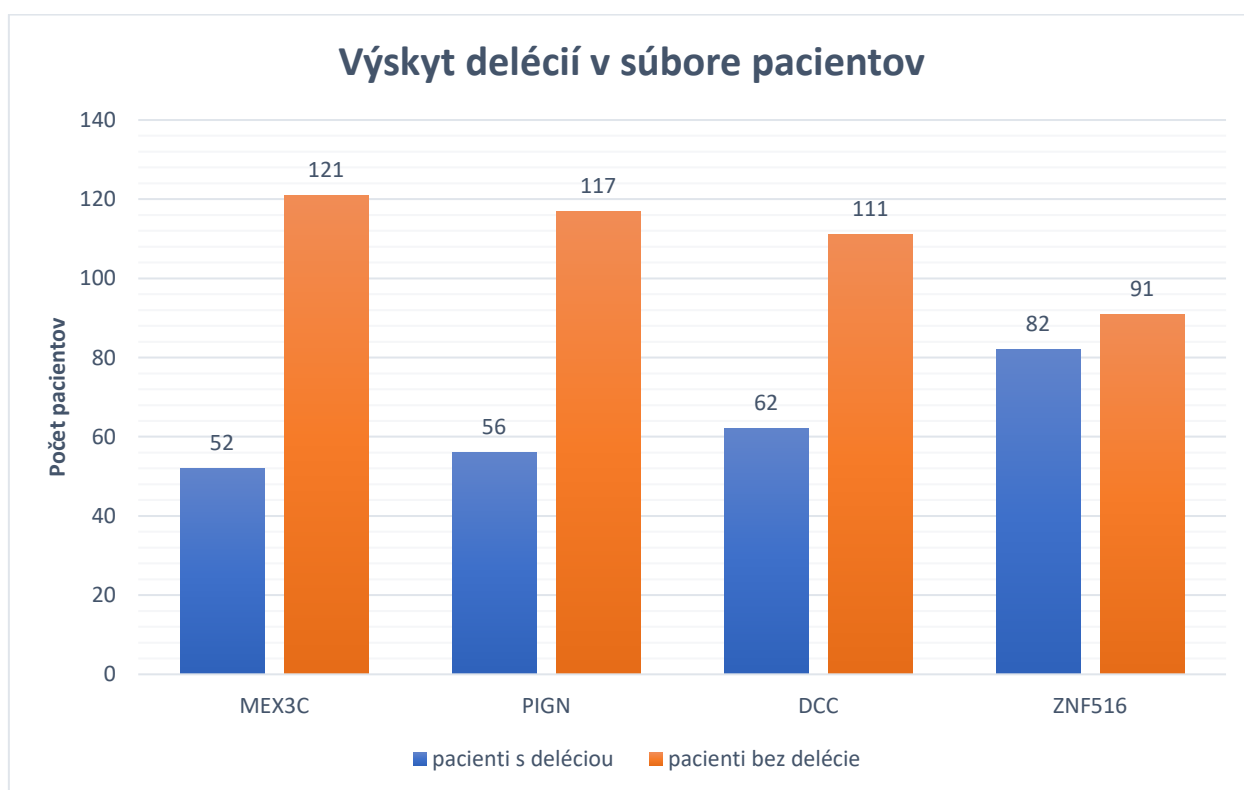
### 5.3 Výsledky vyšetrenia delécií u pacientov

Bez delécie boli označení pacienti s priemerným počtom kópií génu vyšším ako 1,8 a s deléciou pacienti s priemerným počtom kópií génu menším alebo rovným 1,8. Tieto hodnoty (*cut-off*) boli určené experimentálne v spolupráci s bioštatistikom. Najčastejšie deletovaným génom bol *ZNF516* a v poradí nasledujú postupne *DCC*, *PIGN* a *MEX3C*. Výskyt delécií v génoch *MEX3C*, *DCC*, *PIGN* a *ZNF516* je zobrazený v grafe č. 2. Pri jednom pacientovi neboli k dispozícii informácie o génoch *MEX3C* a *PIGN* a pri jednom pacientovi informácie o génoch *DCC* a *ZNF516* z dôvodu nedostatku biologického materiálu. Spolu bolo teda 172 pacientov s kompletnou vyšetrenou sadou sledovaných génov (*MEX3C*, *DCC*, *PIGN* a *ZNF516*) a 2 pacienti s polovicou sady. Ďalšie štatistické údaje o zistených priemerných počtoch génov u pacientov sú v tabuľke č. 2 a 3 a grafe č. 3.

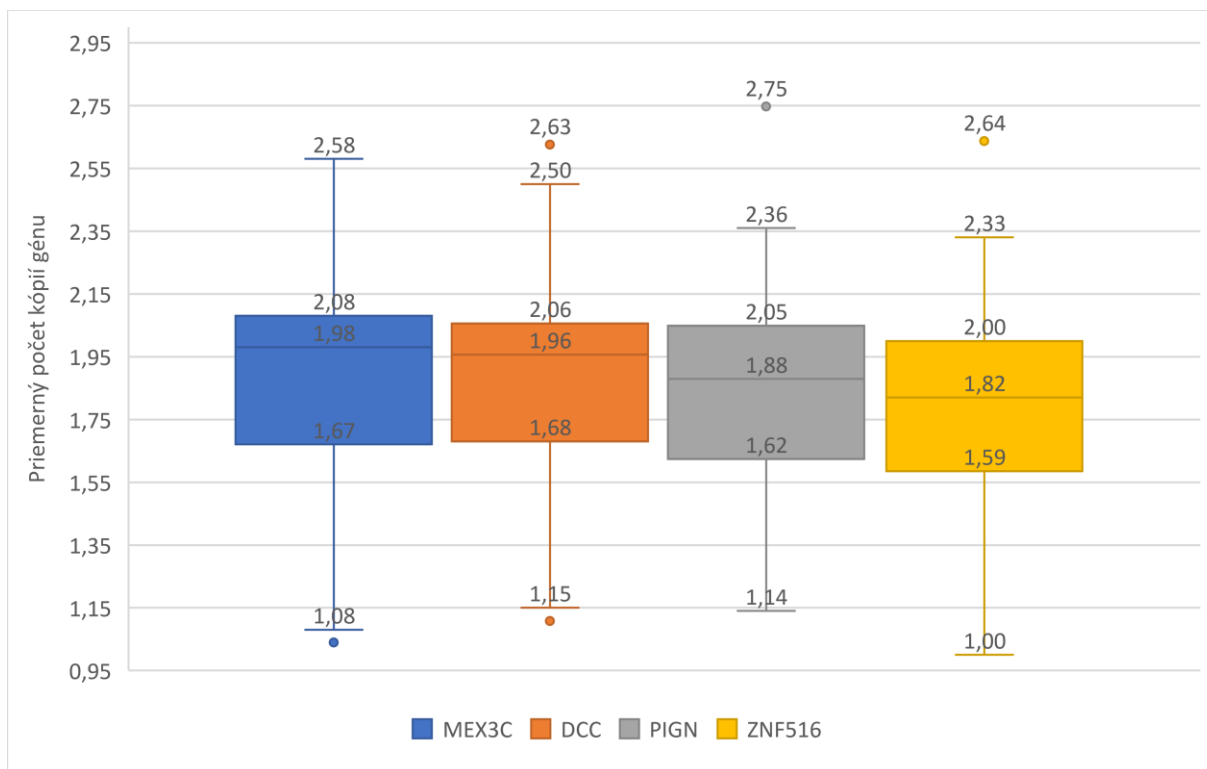


Tabuľka č. 2: Počty pacientov so zistenou deléciou a bez delécie v jednotlivých sledovaných génoch

Gén	Kategória	Počet pacientov	Percentuálny podiel	Spolu
<i>MEX3C</i>	S deléciou	52	30,1 %	173
	Bez delécie	121	69,9 %	
<i>DCC</i>	S deléciou	56	32,4 %	173
	Bez delécie	117	67,7 %	
<i>PIGN</i>	S deléciou	62	35,8 %	173
	Bez delécie	111	64,2 %	
<i>ZNF516</i>	S deléciou	82	47,4 %	173
	Bez delécie	91	52,6 %	



Graf č. 2: Výskyt delécií v génoch *MEX3C*, *DCC*, *PIGN* a *ZNF516*



Graf č. 3: Namerané priemerné počty kópií génu u pacientov v jednotlivých génoch a ich distribúcia.

Tabuľka č. 3: Doplnujúce údaje o zistených údajoch sledovaných génov

Gén	Celkový priemer	Smerodajná odchýlka	Medián (1.kvartil-3.kvartil)
<i>MEX3</i>	1,9	0,32	1,98 (1,67-2,08)
<i>DCC</i>	1,9	0,31	1,96 (1,68-2,06)
<i>PIGN</i>	1,8	0,30	1,88 (1,62-2,05)
<i>ZNF516</i>	1,8	0,31	1,80 (1,59-2,00)

#### 5.4 Výsledky porovnania charakteristík pacientov

Pre potreby štatistického spracovania výsledkov bolo nutné rozdeliť pacientov do skupín s kombináciami delécií. Na základe toho boli vytvorené skupiny pacientov nasledovne: pacienti s deléciou v géne *ZNF516*, pacienti s deléciou v génoch *ZNF516* a *PIGN*, pacienti s deléciou v génoch *ZNF516*, *PIGN* a *DCC*, pacienti s deléciou v génoch *ZNF516*, *PIGN*, *DCC* a *MEX3C*. V ďalších skupinách boli pacienti s inou kombináciou delécií a pacienti bez akejkoľvek delécie. Pacientske skupiny boli označené ako skupiny Z

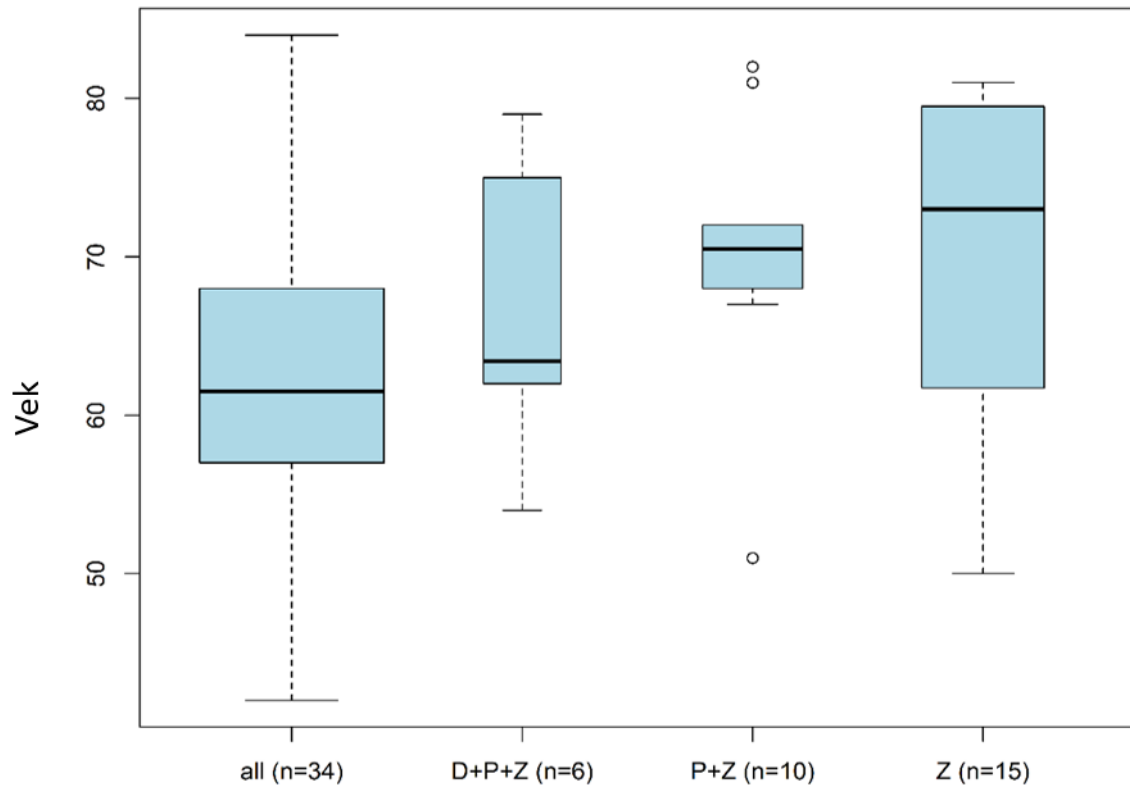
(*ZNF516*), P+Z (*PIGN ZNF516*), D+P+Z(*DCC,PIGN, ZNF516*), *all*, *none* a *other* (vid' tab. č. 4).

Tabuľka č. 4: Vytvorené skupiny pacientov a ich charakteristika na základe kombinácií deletovaných génov

Delécia v génoch	Počet pacientov	Percentuálny podiel	Označenie
<i>ZNF516</i>	15	8,62 %	„Z“
<i>PIGN + ZNF516</i>	10	5,75 %	„P+Z“
<i>DCC + PIGN + ZNF516</i>	6	3,45 %	„D+P+Z“
<i>MEX3C + DCC + PIGN + ZNF516</i>	35	20,11 %	„all“
Bez delécie	79	45,40 %	„none“
Iná kombinácia	29	16,66 %	„other“
Spolu	174	100 %	-

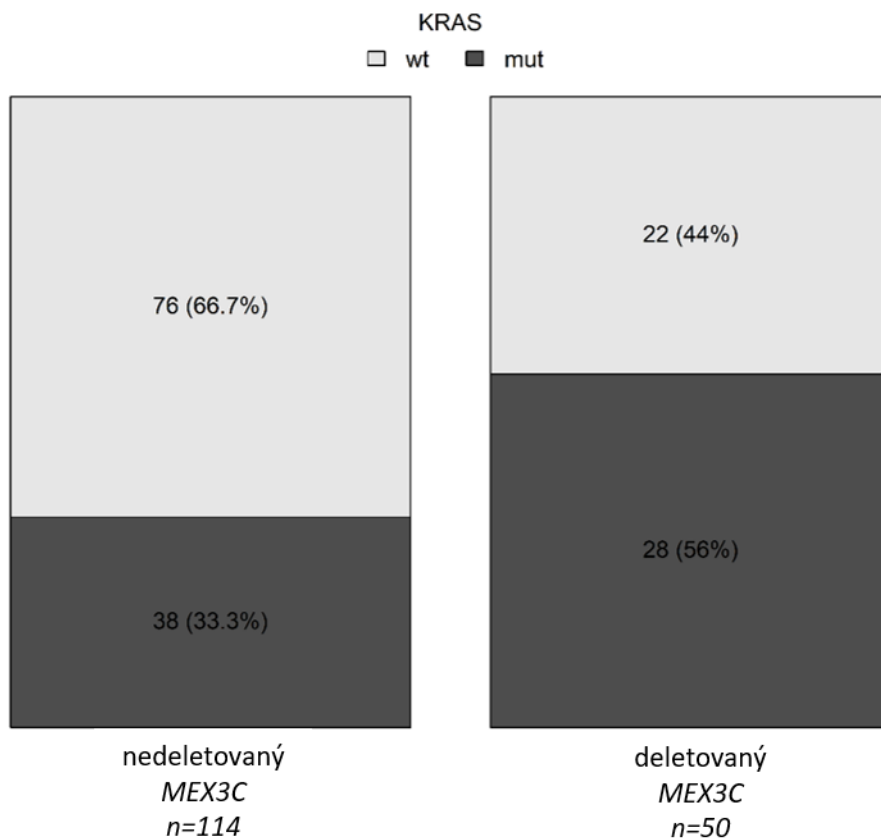
Na otestovanie hypotézy vplyvu veku na rozsah delécií u pacientov bola vykonaná analýza rozptylu (ANOVA test). Posúdené boli všetky skupiny pacientov okrem skupiny bez akejkoľvek delécie („none“) a skupiny s inými kombináciami delécií („other“). Výsledok testu poukazuje na signifikantný rozdiel vo veku pacientov v jednotlivých skupinách ( $p=0,031$ ). Možno konštatovať, že častejšie majú deléciu v génoch *MEX3C*, *DCC*, *PIGN* a *ZNF516* skôr vekovo mladší pacienti. Pri kombinácii génov D+P+Z a P+Z je možné pozorovať mutácie skôr u starších pacientov. Mutáciu iba v géne *ZNF516* vykazovalo vekovo širšie spektrum pacientov ako predošlé dve skupiny (vid' graf č. 4).

Pomocou Fisherovho exaktného testu boli porovnávané charakteristiky jednotlivých skupín pacientov. Porovnávané charakteristiky boli: pohlavie ( $p=0,210$ ), *KRAS* ( $p=0,860$ ) a grading nádoru ( $p=0,608$ ). Ani v jednom z prípadov porovnania týchto charakteristík nebola zistená štatisticky signifikantná závislosť medzi charakteristikami a skupinami pacientov s deléciami.



Graf č. 4: Vekový rozptyl pacientov v skupinách s jednotlivými kombináciami mutácií

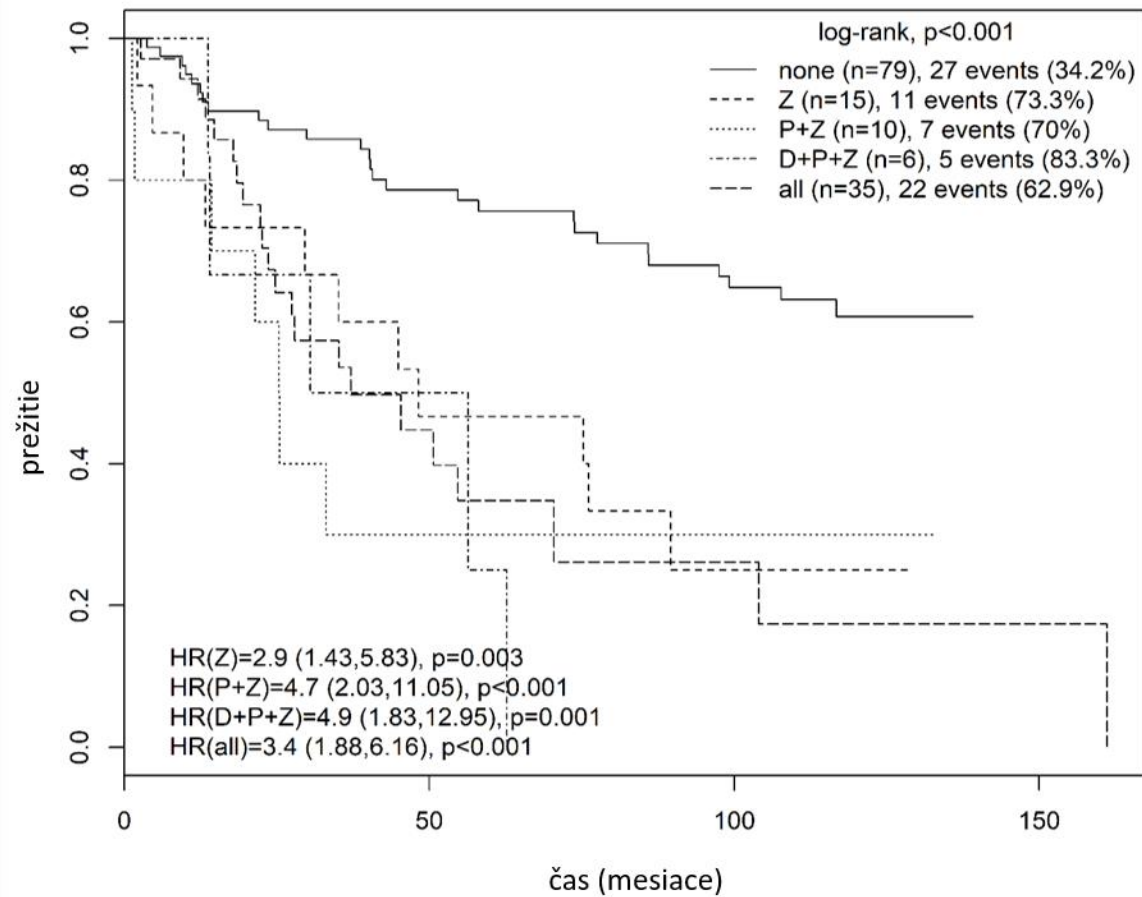
Na základe Pearsonovho testu bola zistená štatisticky významná asociácia delécie génu *MEX3C* s mutáciou *KRAS* ( $p=0,011$ ). Pearsonov test v tomto prípade preukázal rozdiel medzi skupinami pacientov s deléciou a bez delécie *MEX3C*, kedy pacienti s deléciou majú vyšší podiel mutácii (56 %) *KRAS* ako pacienti bez delécie (33 %) (vid' graf č. 5).



Graf č. 5: Podiel mutácií v géne *KRAS* u pacientov s deletovaným a nedeletovaným génom *MEX3C*

Legenda: wt – *wild type*, mut – mutovaný

Na analýzu vplyvu delécie sledovaných génov na prežívanie pacientov bol využitý Kaplan-Meierov odhad funkcie prežitia spolu s log-rank testom. Porovnaním všetkých skupín pacientov okrem skupiny „*other*“ bolo zistené, že pacienti bez akejkoľvek delécie prežívajú významne dlhšie ako pacienti z ostatných testovaných skupín. Podľa log-rank testu ( $p < 0,001$ ) bola tiež zamietnutá hypotéza, že všetky krivky prežitia sú rovnaké. Za použitia „*none*“ ako referenčnej skupiny môžeme konštatovať, že pomer rizík (*Hazard ratio* – HR) je v rozsahu 2,9 - 4,9 v závislosti podľa skupín (viď graf č. 6).



Graf č. 6: Kaplan-Meierov graf prežitia jednotlivých skupín pacientov s kombináciami delécií a bez akejkoľvek delécie.

Legenda: HR – Hazard ratio – pomer rizika

## 6 Diskusia

Cieľom tejto práce bolo overiť vplyv delécie génov *DCC*, *ZNF516*, *PIGN* a *MEX3C* na dlhom ramene 18 chromozómu na diagnózu a prognózu kolorektálneho karcinómu.

Gén *DCC* bol identifikovaný už v roku 1990 ako jeden z pravdepodobných tumor-supresorových génov kvôli jeho veľmi častej delécii pri stratách heterozygosity (LOH) na 18q (Fearon *et al.*, 1990). Z dostupných publikácií možno konštatovať, že *DCC* má pravdepodobne vplyv na progresiu CRC, jeho význam a vplyv je však doteraz predmetom diskusií. V tejto práci je gén *DCC* zaradený ako potencionalny tumor supresorový gén (Mehlen *et al.*, 2004; Popat *et al.*, 2007; Thiagalingam *et al.*, 1996). Novšie zistenia identifikovali 3 gény na 18q s potencionalnou CIN-supresorovou aktivitou a to: *ZNF516*, *PIGN* a *MEX3C* (Burrell *et al.*, 2013). Bola preukázaná spojitosť medzi týmito génmi a zvýšenou CIN pri ich umlčovaní. Na základe tejto štúdie boli tieto gény navrhnuté ako ďalšie potencionalne tumor-supresorové gény ležiace na 18q.

Na vyšetrenie súboru pacientov boli použité duálne LSI sondy pre gény *DCC*, *ZNF516*, *PIGN* a *MEX3C* a to z dôvodu nedostupnosti komerčných duálnych sond pre tieto oblasti. Použitie duálnej sondy umožnilo znížiť spotrebu biologického materiálu, ktorého je v prípade FFPE vzoriek málo, ako aj značne znížiť čas potrebný na vyšetrenie 1 pacienta. Vysoká špecificita väzby sond pripravená z bakteriálnych klonov bola overená v diplomovej práci, ktorá sa venovala tematike týchto génov (Loubalová, 2016). Príprava sond bola oproti spomenutej práci zdokonalená použitím optimalizovaného postupu za využitia nového kitu na prípravu značených sond (Platinum Bright Nucleic Aid Labeling kit od firmy Kreatech™).

Vyšetrený bol súbor 174 pacientov z toho 76 žien a 98 mužov (viď tab. č. 1). Vekový priemer pacientov v čase diagnózy bol 64,1 roka. Najstarší pacient mal 91 rokov a najmladší 31. Z vekového zloženia pacientov možno usúdiť, že vekový priemer pacientov približne zodpovedá štatistickým priemerom incidencie CRC v Českej republike (zdroj dát: www.svod.cz - Dušek *et al.*, 2005). Vekovou kategóriou s najčastejšou incidenciou CRC v ČR sú pacienti medzi 70-74 rokmi a druhou najčastejšou 65-69.

Najčastejšie deletovaným génom bol *ZNF516* a v poradí nasledujú postupne *DCC*, *PIGN* a *MEX3C* (viď graf č. 2). Gény sú lokalizované na dlhom ramene chromozómu 18, usporiadané v smere od teloméry k centromére nasledovne: *ZNF516*, *PIGN*, *DCC*, *MEX3C*. Frekvencia delécie je teda v zhode s polohou génov smerom od teloméry k centromére v génoch *MEX3C* a *ZNF516*.

Je pravdepodobné, že za častú deléciu *ZNF516* môže jeho lokalizácia v blízkosti teloméry. Jedným z možných mechanizmov prispievajúcim k terminálnej delícii je napr. strata telomér. Strata telomér je jedným z dôležitých mechanizmov vzniku CIN. Skracovanie telomér vedie k senescencii bunky, avšak za patologických podmienok môže bunka bez telomér prežiť. Bez telomér môže dochádzať k fúzii sesterských chromatíd po replikácii chromozómu a následnému vzniku mostíku počas anafázy mitózy (tzv. BFB – *breakage fusion bridge* cyklus). Ťahom centromér opačným smerom sa chromozóm pretrhne v náhodnom mieste v blízkosti miesta fúzie. Následkom toho vznikajú 2 dcérske bunky pričom jedna má terminálnu deléciu a druhá má terminálnu invertovanú repetíciu. Pravdepodobnosť delécie génu v blízkosti teloméry akým je aj *ZNF516* je teda vysoké. Proces sa môže opakovať pokiaľ nie je teloméra obnovená, napr. translokáciou z iného chromozómu, čím sa môže proces CIN propagovať aj na ostatné chromozómy (Bailey *et al.*, 2006; Fouladi *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2002; Rudolph *et al.*, 2001). Druhým pravdepodobným mechanizmom terminálnej delécie je vznik acentrických fragmentov v dôsledku defektov v oprave dvojlákových zlomov. Defekty opravy pri CRC boli vo viacerých štúdiách spojované s horším prežívaním pacientov ako aj so vznikom CIN (Beggs *et al.*, 2012; Grabsch *et al.*, 2006; Komuro *et al.*, 2002). Dvojlákový zlom, ktorý nie je opravený umožní vznik acentrickému fragmentu chromozómu, ktorý je následne v ďalšej mitóze stratený v dôsledku missegregácie (Gisselsson, 2001). Nádorová bunka môže následkom straty terminálnych génov získať selekčnú výhodu pri jej nekontrolovateľnom delení. Túto teóriu potvrdzuje aj fakt, že *ZNF516* patrí do skupiny *Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinc finger* proteínov, z ktorých mnohé sú transkripčnými faktormi širokého spektra génov. *ZNF516* bol preukázaný ako aktivátor tak aj represor transkripcie génov ako *EGFR*, *UCP1* a pravdepodobne aj ďalších zatiaľ neznámych génov. Recentnejšie štúdie potvrdzujú pravdepodobnú úlohu *ZNF516* ako tumor supresorového génu v tumorigenéze rakoviny krčka maternice a prsníku (Brebí *et al.*, 2014; Dempersmier *et al.*, 2015; Ili *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2017). Naopak gén *MEX3C*, ktorý je najbližšie k centromére vykazoval najmenšiu početnosť delécií čo opäť korešponduje s teóriou o BFB.

Pre potreby ďalšieho štatistického spracovania boli podľa kombinácii delécií vytvorené skupiny pacientov (viď tabuľka č. 4). Skupiny boli vytvorené podľa lokalizácie génov v smere od teloméry k centromére kvôli porovnaniu rozsahu delécií. Počty v jednotlivých skupinách poukázali na vysoký počet pacientov s kombináciou delécií všetkých génov (skupina „all“ – 35 pacientov) a opäť na vyšší pomer pacientov iba s deléciou v géne



*ZNF516* (skupina „Z“ – 15 pacientov) v pomere so zvyšnými skupinami (skupiny „P+Z“ – 10 pacientov a „D+P+Z“ 6 pacientov). Tieto skutočnosti môžu naznačovať, že delécie génov na dlhom ramene chromozómu 18 sa pravdepodobne dejú častejšie vo väčšom rozsahu ako v menšom. Zaujímavá je častejšia delécia samostatného génu *ZNF516*. Pravdepodobné vysvetlenie by mohlo spočívať v silnejšej CIN supresorovej aktivite génu *ZNF516* oproti ostatným génom, a teda zvýhodneniu progresie tumorigenézy v bunkách s deléciou *ZNF516* oproti ostatným deléciám, nakoľko indukcia CIN je spojená s progresiou CRC v prevažne v skorších štádiách ochorenia (Fearon *et* Vogelstein, 1990; Pino *et* Chung, 2010). Počet pacientov v jednotlivých skupinách je však malý na podporenie tejto hypotézy.

Analýza rozptylu (ANOVA test) preukázala štatisticky signifikantný rozdiel ( $p=0,031$ ) veku pacientov v jednotlivých skupinách pacientov s deléciami (viď graf č. 4). Test poukázal na rozdiel medzi pacientmi s deléciami vo všetkých génoch a pacientmi s deléciami len v 3 alebo 2 génoch (D+P+Z a P+Z), pričom vekovo mladší sú skôr pacienti deléciami vo všetkých študovaných génoch. Pravdepodobne i v dôsledku malého počtu pacientov v jednotlivých vekových skupinách pacientov s deléciami sa pri ostatných charakteristikách (grading nádoru, pohlavie a *KRAS* status) nepotvrdila štatistická závislosť danej charakteristiky pacienta so skupinami delécií.

Pearsonov test odhalil štatisticky významnú asociáciu medzi pacientmi s deléciou v *MEX3C* a génom *KRAS*, pričom pacienti s deléciou *MEX3C* majú vyšší podiel mutácií *KRAS* (56 %) ako pacienti bez delécie (33 %) (viď graf. č. 4). *KRAS* gén je lokalizovaný na krátkom ramene chromozómu 12 a je zapojený do EGFR signalizačnej dráhy. Jeho mutácia je asociovaná so zlou odpoveďou na biologickú liečbu (Baselga *et* Rosen, 2008; Sullivan *et* Kozuch, 2011). Gén *MEX3C* je RNA viažuci proteín s ligázovou aktivitou, ktorého funkcia je málo známa. Zo zvieracích modelov je známe jeho zapojenie do regulácie IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) (Jiao *et al.*, 2012a). Asociácia medzi *MEX3C* a *KRAS* predtým nebola popísaná a je obtiažne ju interpretovať kvôli nedostatku informácií o *MEX3C* géne a jeho význame v organizme.

Analýza prežitia skupín pacientov s deléciami preukázala, že pacienti bez akejkoľvek delécie v študovaných génoch prežívajú signifikantne lepšie ako skupiny pacientov s kombináciami delécií ( $p<0,001$  – log-rank test) (viď graf č. 6). Podľa výpočtu pomeru rizík je zrejmé, že skupiny pacientov (Z, P+Z, D+P+Z a *all*) majú 2,9 až 4,9-krát vyššie riziko úmrtia ako pacienti bez akejkoľvek delécie. Táto analýza teda preukázala, že gény *ZNF516*,

*PIGN*, *MEX3C* a *DCC* majú vplyv na prežívanie súboru pacientov s diagnózou kolorektálny karcinóm a ich delécia je asociovaná s horším prežitím. Spomenuté gény sú vhodnými kandidátmi pre ďalšie analýzy, ktoré budú potrebné na overenie supresorovej aktivity.

Význam génu *DCC* ako tumor supresorového génu v dostupnej literatúre nie je presvedčivo preukázaný. Jeho delécia je pomerne častá (až 70 % prípadov CRC). Protichodné výsledky štúdií, ktoré analyzujú prežitie pacientov s CRC, ale aj myších modelov s *knockout* génom *DCC*, poukazujú na nejasnú rolu tohto génu v prognóze CRC (Fazeli *et al.*, 1997; Kato *et al.*, 2000; Thiagalingam *et al.*, 1996). Výsledky štúdií taktiež poukazujú na význam okolitých génov na dlhom ramene chromozómu 18 ako *SMAD2* a *SMAD4* alebo *CABLES* ako potencionálnych tumor supresorových génov (Huang *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2007; Thiagalingam *et al.*, 1996; Zukerberg *et al.*, 2000).

Zvyšné gény *ZNF516*, *PIGN* a *MEX3C*, ktoré boli nedávno identifikované ako CIN-supresorové boli v tejto diplomovej práci preukázateľne späté s horším prežitím (Burrell *et al.*, 2013). Gény *ZNF516* a *PIGN* boli medzi časom ich prvej identifikácie v spojitosti s CIN a vypracovaním tejto diplomovej práce identifikované v rôznych iných typoch nádorových ochorení, kde sa predpokladá ich tumor supresorová funkcia, čo podporuje pôvodnú teóriu o ich funkcii. Pri géne *ZNF516* to bola rakovina krčka maternice a prsníku a pri géne *PIGN* akútna myeloidná leukémia (Ili *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2017; Teye *et al.*, 2017). Gén *MEX3C* zatiaľ nebol v žiadnej publikácii spojený s iným nádorovým ochorením okrem pôvodnej publikácie, ktorá ho identifikovala ako CIN-supresor v CRC. Dôvodom je jeho pomerne neznáma biologická funkcia. Treba poznamenať, že pôvodná publikácia identifikujúca tieto 3 gény pracovala výlučne s nádorovými bunkovými líniami *in vitro* pomocou génového *knockdownu* RNA interferenciou.

Táto práca ako aj mnohé publikácie, nebrala do úvahy vplyv výskytu mikrosatelitovej instability a epigenetických zmien hypermetyláciou. Obidva procesy by mohli značne ovplyvniť výsledky a podať skreslený obraz o výsledku vyšetrenia na delécie. Klinické prejavy, liečba, prognóza a prežitie by v týchto prípadoch boli odlišné (Boland *et* Goel, 2010).

Pri solídnych nádoroch je dôležité tiež brať do úvahy vplyv heterogenity tumoru, ktorá môže existovať medzi tumormi na 2 rôznych miestach, ale aj v rámci jedného nádoru. Heterogenita nádoru sa môže prejavovať na odlišných úrovniach expresie proteínov ako aj na úrovniach genetických či epigenetických. Existenciou niekoľkých mierne sa odlišujúcich

klonálnych populácií v rámci nádorového mikro-environmentálneho prostredia môže dochádzať pri liečbe k problémom v dôsledku prežitia malej populácie nádorových buniek, ktorá je voči liečivu odolná. Chromozomálna instabilita je jedným z hlavných príčin vzniku heterogenity v rámci nádoru. Pri vyšetrení tenkých FFPE rezov metódou FISH môže práve vplyvom heterogenity dochádzať k nepresnostiam. Predchádzať tomu možno vyšetrením niekoľkých rezov, či použitím iných metód ako celogenómové sekvenovanie, či multiplexná FISH. Heterogenita nádorov predstavuje problém, ktorý je nutné v budúcnosti vyriešiť aplikáciou nových metód na jej analýzu ako aj určiť jej klinické dôsledky (Gerlinger *et Swanton*, 2010).

## 7 Záver

Chromozomálna instabilita je forma genomickej instability, ktorá je pozorovaná v 65-75 % prípadov sporadického kolorektálneho karcinómu. Mechanizmus jej vzniku je málo pochopený, avšak jej výskyt je z klinického hľadiska spájaný s horším prežitím pacientov nielen u kolorektálneho karcinómu, ale aj u iných typov nádorových ochorení. V súvislosti s chromozomálnou instabilitou boli popísané 3 gény (*ZNF516*, *PIGN* a *MEX3C*) na dlhom ramene chromozómu 18, ktoré by mohli vykazovať supresorovú aktivitu voči výskytu chromozomálnej instability. Dlhé rameno chromozómu 18 je často deletované v kolorektálnom karcinóme. Gén *DCC* sa nachádza taktiež na dlhom ramene chromozómu 18 a jeho tumor supresorová aktivita je už dlhší čas predmetom diskusií.

Cieľom tejto práce bolo overiť či rozsah delécie génov *ZNF516*, *PIGN*, *MEX3C* a *DCC* môže hrať úlohu v predikcii, liečbe či prognóze kolorektálneho karcinómu. Výsledky FISH vyšetrení pomocou lokus špecifických sond na jednotlivé gény dokázali, že gény podliehajú deléciám, pričom najčastejšie deletovaným génom bol gén *ZNF516*. Vytvorením skupín pacientov s kombináciami delécií bolo poukázané na častejšiu deléciu všetkých génov súčasne, a teda je možné, že k deléciám na dlhom ramene chromozómu 18 dochádza častejšie vo väčšom rozsahu. Ďalším zistením je asociácia génu *MEX3C* s génom *KRAS*, kde bolo zistené, že vyšetrení pacienti s deléciou *MEX3C* majú štatisticky signifikantne vyšší podiel mutácií *KRAS* ako pacienti bez delécie *MEX3C*. Analýza prežitia skupín pacientov s rôznymi kombináciami delécií preukázala signifikantne horšie prežívanie pacientov s deléciami voči pacientom bez akejkoľvek delécie v analyzovaných génoch. Z výpočtu pomeru rizík vyplýva, že skupiny pacientov s deléciami (*Z*, *P+Z*, *D+P+Z* a *all*) majú 2,9 až 4,9-krát vyššie riziko úmrtia ako pacienti bez delécií.

Delécie génov *ZNF516*, *PIGN*, *MEX3C* a *DCC* boli v tejto práci preukázané ako faktory ovplyvňujúce prežitie pacientov s CRC. Mechanizmus ich vplyvu na tumorigenézu však ostáva nejasný. U génov *ZNF516* a *PIGN* bola v štúdiách supresorová aktivita preukázaná na iných typoch nádorových ochorení. Pre ďalšiu prácu v tejto oblasti by bolo vhodné rozšíriť súbor pacientov a zvážiť vyšetrenie aj ostatných génov na dlhom ramene chromozómu 18 s potencionálnou tumor supresorovou aktivitou, ako napr. *SMAD2* a *SMAD4* alebo *CABLES*.

## 8 Použitá literatura

- Alazzouzi H., Alhopuro P., Salovaara R., Sammalkorpi H., Järvinen H., Mecklin J.-P., Hemminki A., Schwartz S., Aaltonen L.A., Arango D.,** (2005): SMAD4 as a Prognostic Marker in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* 11, 2606.
- Anand S., Penrhyn-Lowe S., Venkitaraman A.R.,** (2003): AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* 3, 51–62.
- Armaghany T., Wilson J.D., Chu Q., Mills G.,** (2012): Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointestinal Cancer Research : GCR* 5, 19–27.
- Armelao F., de Pretis G.,** (2014): Familial colorectal cancer: A review. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20, 9292–9298.
- Arnold M., Sierra M.S., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F.,** (2017): Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66, 683-691.
- Bailey S.M., Murnane J.P.,** (2006): Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Research* 34, 2408–2417.
- Baselga J., Rosen N.,** (2008): Determinants of Resistance to anti-epidermal growth factor receptor agents. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 1582–1584.
- Bastians H.,** (2015): Causes of Chromosomal Instability. In: Ghadimi, B.M., Ried, T. (Eds.), *Chromosomal Instability in Cancer Cells*. Springer International Publishing, Cham, pp. 95–113.
- Beggs A.D., Domingo E., McGregor M., Presz M., Johnstone E., Midgley R., Kerr D., Oukrif D., Novelli M., Abulafi M., Hodgson S.V., Fadhil W., Ilyas M., Tomlinson I.P.,** (2012): Loss of expression of the double strand break repair protein ATM is associated with worse prognosis in colorectal cancer and loss of Ku70 expression is associated with CIN. *Oncotarget* 3, 1348–1355.
- Bertagnolli M.M., Redston M., Compton C.C., Niedzwiecki D., Mayer R.J., Goldberg R.M., Colacchio T.A., Saltz L.B., Warren R.S.,** (2011): Microsatellite instability and loss of heterozygosity at chromosomal location 18q: prospective evaluation of biomarkers for stages II and III colon cancer--a study of CALGB 9581 and 89803. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 3153–3162.
- Bester A.C., Roniger M., Oren Y.S., Im M.M., Sarni D., Chaoat M., Bensimon A., Zamir G., Shewach D.S., Kerem B.,** (2011): Nucleotide Deficiency Promotes Genomic Instability in Early Stages of Cancer Development. *Cell* 145, 435–446.
- Boland C.R., Goel A.,** (2010): Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology, Colon Cancer: An Update and Future Directions* 138, 2073-2087.e3.

- Boland C.R., Sato J., Appelman H.D., Bresalier R.S., Feinberg A.P., (1995):** Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumour suppressor gene loci during colorectal cancer progression. *Nature Medicine* 1, 902-909.
- Bosman F.T., Carneiro F., Hruban R.H., Theise N.D., (2010):** WHO classification of tumours of the digestive system. World Health Organization.
- Boulay J.L., Mild G., Lowy A., Reuter J., Lagrange M., Terracciano L., Laffer U., Herrmann R., Rochlitz C., (2002):** SMAD4 is a predictive marker for 5-fluorouracil-based chemotherapy in patients with colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 87, 630–634.
- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A., (2018):** Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68, 394–424.
- Brebi P., Maldonado L., Noordhuis M.G., Ili C., Leal P., Garcia P., Brait M., Ribas J., Michailidi C., Perez J., Soudry E., Tapia O., Guzman P., Muñoz S., Van Neste L., Van Criekinge W., Irizarry R., Sidransky D., Roa J.C., Guerrero-Preston R., (2014):** Genome-wide methylation profiling reveals Zinc finger protein 516 (ZNF516) and FK-506-binding protein 6 (FKBP6) promoters frequently methylated in cervical neoplasia, associated with HPV status and ethnicity in a Chilean population. *Epigenetics* 9, 308–317.
- Burrell R.A., McClelland S.E., Endesfelder D., Groth P., Weller M.-C., Shaikh N., Domingo E., Kanu N., Dewhurst S.M., Gronroos E., Chew S.K., Rowan A.J., Schenk A., Sheffer M., Howell M., Kschischo M., Behrens A., Helleday T., Bartek J., Tomlinson I.P., Swanton C., (2013):** Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* 494, 492–496.
- Cahill D.P., Lengauer C., Yu J., Riggins G.J., Willson J.K., Markowitz S.D., Kinzler K.W., Vogelstein B., (1998):** Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392, 300–303.
- Cano F., Bye H., Duncan L.M., Buchet-Poyau K., Billaud M., Wills M.R., Lehner P.J., (2012):** The RNA-binding E3 ubiquitin ligase MEX-3C links ubiquitination with MHC-I mRNA degradation. *The EMBO Journal* 31, 3596–3606.
- Cheng Y.-W., Pincas H., Bacolod M.D., Schemmann G., Giardina S.F., Huang J., Barral S., Idrees K., Khan S.A., Zeng Z., Rosenberg S., Notterman D.A., Ott J., Paty P., Barany F., (2008):** CpG Island Methylator Phenotype Associates with Low-Degree Chromosomal Abnormalities in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* 14, 6005–6013.
- Ciosk R., DePalma M., Priess J.R., (2006):** Translational regulators maintain totipotency in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Science (New York, N.Y.)* 311, 851–853.
- Citri A., Yarden Y., (2006):** EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7, 505–516.

- Colussi D., Brandi G., Bazzoli F., Ricciardiello L.**, (2013): Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 16365–16385.
- Deaton A.M., Bird A.**, (2011): CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development* 25, 1010–1022.
- Dempersmier J., Sambeat A., Gulyaeva O., Paul S.M., Hudak C.S.S., Raposo H.F., Kwan H.-Y., Kang C., Wong R.H.F., Sul H.S.**, (2015): Cold-inducible Zfp516 Activates UCP1 Transcription to Promote Browning of White Fat and Development of Brown Fat. *Molecular cell* 57, 235–246.
- Dušek L., Mužík J., Kubásek M., Koptíková J., Vyzula R., Žaloudík J.**, (2005): Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita.
- Eisenmann D.M.**, (2005): Wnt signaling. *Wormbook* 1–17.
- Engelhardt M., Drullinsky P., Guillem J., Moore M.A.**, (1997): Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 3, 1931–1941.
- Ewart-Toland A., Briassouli P., de Koning J.P., Mao J.-H., Yuan J., Chan F., MacCarthy-Morrogh L., Ponder B.A.J., Nagase H., Burn J., Ball S., Almeida M., Linardopoulos S., Balmain A.**, (2003): Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nature Genetics* 34, 403–412.
- Fazeli A., Dickinson S.L., Hermiston M.L., Tighe R.V., Steen R.G., Small C.G., Stoeckli E.T., Keino-Masu K., Masu M., Rayburn H., Simons J., Bronson R.T., Gordon J.I., Tessier-Lavigne M., Weinberg R.A.**, (1997): Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386, 796–804.
- Fearon E.R., Vogelstein B.**, (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.
- Fleming M., Ravula S., Tatishchev S.F., Wang H.L.**, (2012): Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 3, 153–173.
- Fouladi B., Sabatier L., Miller D., Pottier G., Murnane J.P.**, (2000): The Relationship Between Spontaneous Telomere Loss and Chromosome Instability in a Human Tumor Cell Line. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 2, 540–554.
- Galiatsatos P., Foulkes W.D.**, (2006): Familial adenomatous polyposis. *The American Journal of Gastroenterology* 101, 385–398.
- Geiersbach K.B., Samowitz W.S.**, (2011): Microsatellite instability and colorectal cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 135, 1269–1277.
- Geigl J.B., Obenauf A.C., Schwarzbraun T., Speicher M.R.**, (2008): Defining ‘chromosomal instability.’ *Trends in Genetics* 24, 64–69.

- Gerlinger M., Swanton C.**, (2010): How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *British Journal of Cancer* 103, 1139–1143.
- Gisselsson D.**, (2001): Chromosomal instability in cancer: causes and consequences. *Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology*.
- Goessling W., North T.E., Loewer S., Lord A.M., Lee S., Stoick-Cooper C.L., Weidinger G., Puder M., Daley G.Q., Moon R.T., Zon L.I.**, (2009): Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell* 136, 1136–1147.
- Grabsch H., Dattani M., Barker L., Maughan N., Maude K., Hansen O., Gabbert H.E., Quirke P., Mueller W.**, (2006): Expression of DNA double-strand break repair proteins ATM and BRCA1 predicts survival in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12, 1494–1500.
- Grady W.M., Carethers J.M.**, (2008): Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* 135, 1079–1099.
- Grady W.M., Markowitz S.D.**, (2015): The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. *Digestive diseases and sciences* 60, 762–772.
- Guerrero S., Casanova I., Farré L., Mazo A., Capellà G., Mangués R.**, (2000): K-ras Codon 12 Mutation Induces Higher Level of Resistance to Apoptosis and Predisposition to Anchorage-independent Growth Than Codon 13 Mutation or Proto-Oncogene Overexpression. *Cancer Research* 60, 6750–6756.
- Guzmán B., Cormand B., Ribasés M., González-Núñez D., Botey A., Poch E.**, (2006): Implication of chromosome 18 in hypertension by sibling pair and association analyses: putative involvement of the RKHD2 gene. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 48, 883–891.
- Herbst A., Jurinovic V., Krebs S., Thieme S.E., Blum H., Göke B., Kolligs F.T.**, (2014): Comprehensive analysis of  $\beta$ -catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *BMC Genomics* 15, 74.
- Hermesen M., Postma C., Baak J., Weiss M., Rapallo A., Sciotto A., Roemen G., Arends J.-W., Williams R., Giaretti W., De Goeij A., Meijer G.**, (2002): Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 123, 1109–1119.
- Huang J.-R., Tan G.-M., Li Y., Shi Z.**, (2017): The Emerging Role of Cables1 in Cancer and Other Diseases. *Molecular Pharmacology* 92, 240.
- Ihara S., Nakayama S., Murakami Y., Suzuki E., Asakawa M., Kinoshita T., Sawa H.**, (2017): PIGN prevents protein aggregation in the endoplasmic reticulum independently of its function in the GPI synthesis. *J Cell Sci* 130, 602–613.



- Ili C., Lopez J., Buchegger K., Riquelme I., Retamal J., Zanella L., Mora-Lagos B., Vivallo C., Roa J.C., Brebi P.,** (2018): Loss of ZNF516 protein expression is related with HR-HPV infection and cervical preneoplastic lesions. *Archives of Gynecology and Obstetrics*.
- Issa J.-P.J., Shen L., Toyota M.,** (2005): CIMP, at last. *Gastroenterology* 129, 1121–1124.
- Jasperson K.W., Tuohy T.M., Neklason D.W., Burt R.W.,** (2010): Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* 138, 2044–2058.
- Jen J., Kim H., Piantadosi S., Liu Z.F., Levitt R.C., Sistonen P., Kinzler K.W., Vogelstein B., Hamilton S.R.,** (1994): Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 331, 213–221.
- Jernvall P., Mäkinen M.J., Karttunen T.J., Mäkelä J., Vihko P.,** (1999): Loss of heterozygosity at 18q21 is indicative of recurrence and therefore poor prognosis in a subset of colorectal cancers. *British Journal of Cancer* 79, 903–908.
- Jiao Y., Bishop C.E., Lu B.,** (2012a): Mex3c regulates insulin-like growth factor 1 (IGF1) expression and promotes postnatal growth. *Molecular Biology of the Cell* 23, 1404–1413.
- Jiao Y., George S.K., Zhao Q., Hulver M.W., Hutson S.M., Bishop C.E., Lu B.,** (2012b): Mex3c Mutation Reduces Adiposity and Increases Energy Expenditure. *Molecular and Cellular Biology* 32, 4350–4362.
- Kato H., Zhou Y., Asanoma K., Kondo H., Yoshikawa Y., Watanabe K., Matsuda T., Wake N., Barrett J.C.,** (2000): Suppressed tumorigenicity of human endometrial cancer cells by the restored expression of the DCC gene. *British Journal of Cancer* 82, 459–466.
- Keino-Masu K., Masu M., Hinck L., Leonardo E.D., Chan S.S., Culotti J.G., Tessier-Lavigne M.,** (1996): Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87, 175–185.
- Kemphues K.J., Priess J.R., Morton D.G., Cheng N.S.,** (1988): Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 52, 311–320.
- Kinoshita T., Inoue N.,** (2000): Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* 4, 632–638.
- Komuro Y., Watanabe T., Hosoi Y., Matsumoto Y., Nakagawa K., Tsuno N., Kazama S., Kitayama J., Suzuki N., Nagawa H.,** (2002): The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma. *Cancer* 95, 1199–1205.
- Kuniyoshi K., Takeuchi O., Pandey S., Satoh T., Iwasaki H., Akira S., Kawai T.,** (2014): Pivotal role of RNA-binding E3 ubiquitin ligase MEX3C in RIG-I-mediated antiviral innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 5646–5651.

- Lamlum H., Papadopoulou A., Ilyas M., Rowan A., Gillet C., Hanby A., Talbot I., Bodmer W., Tomlinson I.**, (2000): APC mutations are sufficient for the growth of early colorectal adenomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2225–2228.
- Larsson S.C., Wolk A.**, (2006): Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Cancer* 119, 2657-2664.
- Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B.**, (1998): Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649.
- Lesko A.C., Goss K.H., Yang F.F., Schwertner A., Hular I., Onel K., Prospero J.R.**, (2015): The APC tumor suppressor is required for epithelial cell polarization and three-dimensional morphogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1854, 711–723.
- Leslie A., Carey F.A., Pratt N.R., Steele R.J.C.**, (2002): The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *The British Journal of Surgery* 89, 845–860.
- Levin B., Lieberman D.A., McFarland B., Smith R.A., Brooks D., Andrews K.S., Dash C., Giardiello F.M., Glick S., Levin T.R., Pickhardt P., Rex D.K., Thorson A., Winawer S.J., American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory Group, US Multi-Society Task Force, American College of Radiology Colon Cancer Committee**, (2008): Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA: a cancer journal for clinicians* 58, 130–160.
- Li L., Liu Xinhua, He L., Yang J., Pei F., Li W., Liu S., Chen Z., Xie G., Xu B., Ting X., Zhang Z., Jin T., Liu Xujun, Zhang W., Yuan S., Yang Z., Wu C., Zhang Y., Yang X., Yi X., Liang J., Shang Y., Sun L.**, (2017): ZNF516 suppresses EGFR by targeting the CtBP/LSD1/CoREST complex to chromatin. *Nature Communications* 8, 691.
- Lin K.J., Cheung W.Y., Lai J.Y.-C., Giovannucci E.L.**, (2012): The effect of estrogen vs. combined estrogen-progestogen therapy on the risk of colorectal cancer. *International Journal of Cancer* 130, 419–430.
- Lo A.W.I., Sabatier L., Fouladi B., Pottier G., Ricoul M., Murnane J.P.**, (2002): DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 4, 531–538.
- Loubalová Z.**, (2016): Sledování cytogenetických změn chromozomu 18 u kolorektálního karcinomu, Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Ma Y., Zhang P., Wang F., Yang J., Liu Z., Qin H.**, (2011): Association Between Vitamin D and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. *Journal of Clinical Oncology* 29, 3775–3782.
- Maydan G., Noyman I., Har-Zahav A., Neriah Z.B., Pasmanik-Chor M., Yeheskel A., Albin-Kaplanski A., Maya I., Magal N., Birk E., Simon A.J., Halevy A., Rechavi**

- G., Shohat M., Straussberg R., Basel-Vanagaite L.,** (2011): Multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome is caused by a mutation in PIGN. *Journal of Medical Genetics* 48, 383–389.
- Mazelin L., Bernet A., Bonod-Bidaud C., Pays L., Arnaud S., Gespach C., Bredesen D.E., Scoazec J.-Y., Mehlen P.,** (2004): Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 431, 80–84.
- McCulloch S.D., Gu L., Li G.-M.,** (2003): Bi-directional processing of DNA loops by mismatch repair-dependent and -independent pathways in human cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 3891–3896.
- McGranahan N., Burrell R.A., Endesfelder D., Novelli M.R., Swanton C.,** (2012): Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges. *EMBO Reports* 13, 528–538.
- Mehlen P., Fearon E.R.,** (2004): Role of the Dependence Receptor DCC in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Journal of Clinical Oncology* 22, 3420–3428.
- Mehlen P., Rabizadeh S., Snipas S.J., Assa-Munt N., Salvesen G.S., Bredesen D.E.,** (1998): The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 395, 801–804.
- Mehlen P., Tauszig-Delamasure S.,** (2014): Dependence receptors and colorectal cancer. *Gut* 63, 1821–1829.
- Minde D.P., Anvarian Z., Rüdiger S.G., Maurice M.M.,** (2011): Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Molecular Cancer* 10, 101.
- Mlkvá I.,** (2016): Genetics of Colorectal Tumorigenesis (Possibilities of Testing and Screening Prediction of Hereditary Form of Colorectal Cancer – Lynch Syndrome). *Klinická onkologie* 29, S55–S61.
- Mojarad E.N., Kuppen P.J., Aghdaei H.A., Zali M.R.,** (2013): The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench* 6, 120–128.
- Nakamura K., Furugori E., Esaki Y., Arai T., Sawabe M., Okayasu I., Fujiwara M., Kammori M., Mafune K., Kato M., Oshimura M., Sasajima K., Takubo K.,** (2000): Correlation of telomere lengths in normal and cancers tissue in the large bowel. *Cancer Letters* 158, 179–184.
- Oda S., Maehara Y., Sumiyoshi Y., Sugimachi K.,** (2002): Microsatellite instability in cancer: What problems remain unanswered? *Surgery* 131, S55–S62.
- Ogino S., Noshō K., Irahara N., Shima K., Baba Y., Kirkner G.J., Meyerhardt J.A., Fuchs C.S.,** (2009): Prognostic Significance and Molecular Associations of 18q Loss of Heterozygosity: A Cohort Study of Microsatellite Stable Colorectal Cancers. *Journal of Clinical Oncology* 27, 4591–4598.

- Ogino S., Odze R.D., Kawasaki T., Brahmandam M., Kirkner G.J., Laird P.W., Loda M., Fuchs C.S.,** (2006): Correlation of Pathologic Features With CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) by Quantitative DNA Methylation Analysis in Colorectal Carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 30, 1175.
- Ohba C., Okamoto N., Murakami Y., Suzuki Y., Tsurusaki Y., Nakashima M., Miyake N., Tanaka F., Kinoshita T., Matsumoto N., Saito H.,** (2014): PIGN mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy. *Neurogenetics* 15, 85–92.
- Park D.Y., Sakamoto H., Kirley S.D., Ogino S., Kawasaki T., Kwon E., Mino-Kenudson M., Lauwers G.Y., Chung D.C., Rueda B.R., Zukerberg L.R.,** (2007): The Cables gene on chromosome 18q is silenced by promoter hypermethylation and allelic loss in human colorectal cancer. *The American Journal of Pathology* 171, 1509–1519.
- Pavelka N., Rancati G., Zhu J., Bradford W.D., Saraf A., Florens L., Sanderson B.W., Hattem G.L., Li R.,** (2010): Aneuploidy confers quantitative proteome changes and phenotypic variation in budding yeast. *Nature* 468, 321–325.
- Peifer M., Polakis P.,** (2000): Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus. *Science (New York, N.Y.)* 287, 1606–1609.
- Pelengaris S., Khan M.,** (2009a): Nature and Nurture in Oncogenesis. In: *The Molecular Biology of Cancer*. John Wiley & Sons, pp. 67–109.
- Pelengaris S., Khan M.,** (2009b): Tumor Suppressors. In: *The Molecular Biology of Cancer*. John Wiley & Sons, pp. 67–109.
- Pino M.S., Chung D.C.,** (2010): The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2059–2072.
- Popat S., Houlston R.S.,** (2005): A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *European Journal of Cancer* 41, 2060–2070.
- Popat S., Zhao D., Chen Z., Pan H., Shao Y., Chandler I., Houlston R.S.,** (2007): Relationship between chromosome 18q status and colorectal cancer prognosis: a prospective, blinded analysis of 280 patients. *Anticancer Research* 27, 627–633.
- Powell S.M., Petersen G.M., Krush A.J., Booker S., Jen J., Giardiello F.M., Hamilton S.R., Vogelstein B., Kinzler K.W.,** (1993): Molecular Diagnosis of Familial Adenomatous Polyposis. *New England Journal of Medicine* 329, 1982–1987.
- Rehman A.G., Tyson M., Egger M., Heller R.F., Zwahlen M.,** (2008): Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet (London, England)* 371, 569–578.
- Roock W.D., Vriendt V.D., Normanno N., Ciardiello F., Tejpar S.,** (2011): KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *The Lancet Oncology* 12, 594–603.

- Rothwell P.M., Fowkes F.G.R., Belch J.F.F., Ogawa H., Warlow C.P., Meade T.W.,** (2011): Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet (London, England)* 377, 31-41.
- Rowan A., Halford S., Gaasenbeek M., Kemp Z., Sieber O., Volikos E., Douglas E., Fiegler H., Carter N., Talbot I., Silver A., Tomlinson I.,** (2005): Refining molecular analysis in the pathways of colorectal carcinogenesis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 3, 1115–1123.
- Rudolph K.L., Millard M., Bosenberg M.W., DePinho R.A.,** (2001): Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nature Genetics* 28, 155–159.
- Samad A.K.A., Taylor R.S., Marshall T., Chapman M. a. S.,** (2005): A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer. *Colorectal Disease: The Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 7, 204–213.
- Santini D., Loupakis F., Vincenzi B., Floriani I., Stasi I., Canestrari E., Rulli E., Maltese P.E., Andreoni F., Masi G., Graziano F., Baldi G.G., Salvatore L., Russo A., Perrone G., Tommasino M.R., Magnani M., Falcone A., Tonini G., Ruzzo A.,** (2008): High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *The Oncologist* 13, 1270-1275.
- Sarli L., Bottarelli L., Bader G., Iusco D., Pizzi S., Costi R., D'Adda T., Bertolani M., Roncoroni L., Bordi C.,** (2004): Association between recurrence of sporadic colorectal cancer, high level of microsatellite instability, and loss of heterozygosity at chromosome 18q. *Diseases of the Colon and Rectum* 47, 1467–1482.
- Scheffzek K., Ahmadian M.R., Kabsch W., Wiesmüller L., Lautwein A., Schmitz F., Wittinghofer A.,** (1997): The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science (New York, N.Y.)* 277, 333–338.
- Simon K.,** (2016): Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical Interventions in Aging* 11, 967–976.
- Stewart B.W., Wild C.P.,** (2014): *World Cancer Report 2014*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. World Health Organization 630.
- Sullivan K.M., Kozuch P.S.,** (2011): Impact of KRAS Mutations on Management of Colorectal Carcinoma. *Pathology Research International* 2011.
- Takayama T., Ohi M., Hayashi T., Miyanishi K., Nobuoka A., Nakajima T., Satoh T., Takimoto R., Kato J., Sakamaki S.,** (2001): Analysis of K-ras, APC, and  $\beta$ -catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 121, 599–611.
- Teye E.K., Sido A., Xin P., Finnberg N.K., Gokare P., Kawasaki Y.I., Salzberg A.C., Shimko S., Bayerl M., Ehmann W.C., Claxton D.F., Rybka W.B., Drabick J.J.,**

- Wang H.-G., Abraham T., El-Deiry W.S., Brodsky R.A., Hohl R.J., Pu J.J.,** (2017): PIGN gene expression aberration is associated with genomic instability and leukemic progression in acute myeloid leukemia with myelodysplastic features. *Oncotarget* 8, 29887–29905.
- Thiagalingam S., Lengauer C., Leach F.S., Schutte M., Hahn S.A., Overhauser J., Willson J.K., Markowitz S., Hamilton S.R., Kern S.E., Kinzler K.W., Vogelstein B.,** (1996): Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nature Genetics* 13, 343–346.
- Tsuji K., Mizumoto K., Yamochi T., Nishimoto I., Matsuoka M.,** (2002): Differential Effect of ik3-1/Cables on p53- and p73-induced Cell Death. *Journal of Biological Chemistry* 277, 2951–2957.
- van Steenbergen L.N., Lemmens V.E.P.P., Louwman M.J., Straathof J.W.A., Coebergh J.W.W.,** (2009): Increasing incidence and decreasing mortality of colorectal cancer due to marked cohort effects in southern Netherlands. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* 18, 145–152.
- Vargas-Rondón N., Villegas V.E., Rondón-Lagos M.,** (2017): The Role of Chromosomal Instability in Cancer and Therapeutic Responses. *Cancers* 10.
- Veigl M.L., Kasturi L., Olechnowicz J., Ma A.H., Lutterbaugh J.D., Periyasamy S., Li G.M., Drummond J., Modrich P.L., Sedwick W.D., Markowitz S.D.,** (1998): Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8698–8702.
- Vogelstein B., Fearon E.R., Kern S.E., Hamilton, Preisinger A.C., Nakamura Y., White R.,** (1989): Allelotyping of colorectal carcinomas. *Science* 244, 207–211.
- Walther A., Houlston R., Tomlinson I.,** (2008): Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* 57, 941–950.
- Wang Z., Cummins J.M., Shen D., Cahill D.P., Jallepalli P.V., Wang T.-L., Parsons D.W., Traverso G., Awad M., Silliman N., Ptak J., Szabo S., Willson J.K.V., Markowitz S.D., Goldberg M.L., Karess R., Kinzler K.W., Vogelstein B., Velculescu V.E., Lengauer C.,** (2004): Three classes of genes mutated in colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Research* 64, 2998–3001.
- Yalçın A.S., Attaallah W., Yilmaz A.M., Aktan A.Ö.,** (2014): Free radicals, whey proteins and colorectal cancer. *Marmara Medical Journal* 27 1–6.
- Yang T.-L., Guo Y., Li J., Zhang L., Shen H., Li S.M., Li S.K., Tian Q., Liu Y.-J., Papasian C.J., Deng H.-W.,** (2013): Gene-gene interaction between RBMS3 and ZNF516 influences bone mineral density. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 28, 828-837.
- Zhao M., Mishra L., Deng C.-X.,** (2018): The role of TGF- $\beta$ /SMAD4 signaling in cancer. *International Journal of Biological Sciences* 14, 111–123.

**Zhao R., Michor F.**, (2013): Patterns of proliferative activity in the colonic crypt determine crypt stability and rates of somatic evolution. *PLoS computational biology* 9.

**Zukerberg L.R., Patrick G.N., Nikolic M., Humbert S., Wu C.L., Lanier L.M., Gertler F.B., Vidal M., Van Etten R.A., Tsai L.H.**, (2000): Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. *Neuron* 26, 633–646.

### 8.1 Použité internetové zdroje

The Global Cancer Observatory. [online] [navštívené 12.2.2019] Dostupné z <http://gco.iarc.fr/>

GeneCards®: The Human Gene Database [online] [navštívené 15.2.2019] Dostupné z [www.genecards.org](http://www.genecards.org)

Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online] [navštívené 17.3.2019] Dostupné z [www.svod.cz](http://www.svod.cz)