

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2016

Bc. Zuzana Loubalová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Sledování cytogenetických změn chromozomu 18
u kolorektálního karcinomu**

Diplomová práce

Bc. Zuzana Loubalová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

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

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Podpis.....

Souhrn

Chromozomální nestabilita (CIN) je jednou z typických cest, které vedou k maligní transformaci a vzniku kolorektálního karcinomu. Charakterizuje ji rozsáhlá nerovnováha v počtu chromozomů (aneuploidie) a genetické aberace. Chromozomální nestabilita je spojena s nepříznivou prognózou a lékovou rezistencí, ale také se předpokládá její asociace s chybami v průběhu mitózy.

Jako nejčastější genetická změna u kolorektálního karcinomu (CRC) bývá popisována delece v chromozomu 18q a tato ztráta je markerem pro špatnou prognózu. Byl hledán kandidátní gen, jehož delece je zodpovědná za špatnou prognózu a léčbu tohoto onemocnění. Vhodným kandidátem se jevil gen DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*), potenciální tumor supresorový gen, jeho vliv však nebyl nikdy přesvědčivě dokázán. Nedávno bylo zjištěno, že v této oblasti jsou lokalizovány další tři CIN – supresorové geny, jejichž umlčení vede k replikačnímu stresu, abnormalitám ve struktuře chromozomů a chybné segregaci chromozomů v průběhu mitózy. Těmito geny jsou ZNF516 (*Zinc-finger Protein 516*), PIGN (*Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class N*) a MEX3C (*Mex-3 RNA Binding Family Member C*). Delece v oblasti 18q je popisována v různém rozsahu, u jednotlivých pacientů s delecí 18q tedy může docházet ke ztrátě jednoho či více těchto genů, včetně DCC. Cílem práce bylo zjistit, jaký vliv má rozsah delece 18q (resp. delece genů DCC, ZNF516, PIGN a MEX3C) na průběh onemocnění a zda by některý z uvedených genů mohl být využit jako prognostický faktor, případně jako cíl pro budoucí biologickou léčbu.

Summary

Chromosomal instability (CIN) is one of the typical pathways, which lead to malignant transformation and formation of colorectal cancer. It is characterized by widespread imbalance in chromosome number (aneuploidy) and genetic aberrations. Chromosomal instability is associated with poor prognosis and drug resistance and it is thought to be associated with errors in mitosis.

18q deletion has been described as the most common genetic variation in colorectal cancer (CRC) and this loss is a marker for poor prognosis. Candidate gene whose deletion is responsible for poor prognosis and treatment of this disease was searched. As a potential tumor suppressor gene was proposed DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) gene, but its influence has never been conclusively proven. Recently, it was found that there are three CIN – suppressor genes located on chromosome 18q, whose silencing leads to the replication stress, structural chromosome abnormalities and chromosome missegregation during mitosis. These genes are ZNF516 (*Zinc-finger Protein 516*), PIGN (*Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class N*) a MEX3C (*Mex-3 RNA Binding Family Member C*). Deletions of 18q have been observed in different range, the individual patients with 18q deletions may therefore have the loss of one or more of these genes, including DCC. The aim of the study was to determine the effect of a range of 18q deletion (accordingly deletion of DCC, ZNF516, PIGN and MEX3C genes) to disease progression and whether any of these genes could be used as a prognostic marker or as a target for future biological treatment.

Tímto chci vyjádřit velké poděkování vedoucímu diplomové práce RNDr. Radkovi Trojancovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a čas, který mi věnoval během vypracování mé diplomové práce. Dále mé poděkování patří celému týmu Laboratoře experimentální medicíny Ústavu molekulární a translační medicíny za umožnění zpracování této práce, vstřícný přístup a pomoc při práci, a také týmu Laboratoře genomové integrity Ústavu molekulární a translační medicíny, zde zejména Mgr. Juraji Kramarovi, Ph.D., za poskytování cenných rad.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav řešené problematiky.....	11
2.2	Mortalita kolorektálního karcinomu.....	13
2.3	Biologie kolorektálního karcinomu.....	13
2.4	Molekulární genetika hereditární formy CRC	14
2.4.1	Familiární adenomatózní polypóza	14
2.4.2	Lynchův syndrom.....	15
2.5	Molekulární cesty sporadické formy CRC	16
2.5.1	Mikrosatelitová nestabilita.....	16
2.5.2	Metylace CpG ostrůvků	18
2.5.3	Chromozomální nestabilita	20
2.6	CIN – pozitivní kolorektální karcinomy	21
2.6.1	Vogelsteinův model	21
2.6.2	APC	23
2.6.3	RAS proteiny.....	24
2.6.3.1	KRAS	25
2.6.3.2	Anti – EGFR terapie	26
2.6.4	p53.....	27
2.6.5	Delece 18q	28
2.6.5.1	SMAD proteiny	28
2.6.5.2	Gen DCC.....	29
2.7	CIN a replikační stres	30
2.7.1	Gen PIGN	32
2.7.2	Gen ZNF516	33
2.7.3	Gen MEX3C.....	33
2.8	Prognostické faktory.....	34
2.9	Léčba CRC.....	35
3	Cíl práce.....	37
4	Materiál a metody.....	38
4.1	Materiál	38
4.1.1	Pomůcky a přístrojové vybavení	38

4.1.2	Chemikálie a roztoky	38
4.1.3	Soubor pacientů.....	39
4.1.4	Bakteriální klony	39
4.2	Metody	40
4.2.1	Kultivace bakterií a izolace plazmidové DNA.....	40
4.2.2	Zamražování bakterií	40
4.2.3	Příprava FISH sond	41
4.2.4	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	41
4.2.5	re-FISH	42
5	Výsledky	44
5.1	Příprava sond pro FISH.....	44
5.2	Analýza aberací u patientských vzorků CRC.....	47
6	Diskuze	53
7	Závěr	57
8	Literatura	58
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	68

1 Úvod

Kolorektální karcinom (CRC) je považován za civilizační onemocnění, jehož incidence meziročně stoupá. V roce 2012 bylo celosvětově diagnostikováno 1,36 miliónu lidí s tímto karcinomem. Jedná se o třetí nejčastěji diagnostikované rakovinné onemocnění ve světě a hned po rakovině plic, také o nejčastější příčinu úmrtí na rakovinu v Evropě. Stávající situace je přisuzována sedavému stylu života a způsobu současného stravování (Ouakrim a kol., 2015; Yiu a Yiu, 2016).

Tlusté střevo je jedním ze základních částí zažívacího traktu a nachází se mezi tenkým střevem a konečníkem. Charakteristický vzhled sliznici udávají četné lymfatické uzliny. Sliznice má několik trubkovitých invaginací nazývaných krypty, které se nacházejí podél povrchu epitelu, kde zároveň dochází k jeho regeneraci. Vzhledem k biologické funkci tlustého střeva, je zde vysoká úroveň buněčné regenerace a působí zde vlivy fyzikální, chemické a biologické povahy, což zvyšuje riziko vzniku patologických stavů, včetně rakoviny. Karcinom se vyvíjí postupným hromaděním genetických a epigenetických změn vedoucích k přeměně normální sliznice tlustého střeva do invazivního karcinomu. Většina CRC vzniká již v rámci existujících adenomů. Nádory tlustého střeva a konečníku lze dělit na formu dědičnou a sporadickou (Al-Sohaily a kol., 2012; Arvelo a kol., 2015).

Obecně je kolorektální karcinom diagnostikován spíše v pozdních fázích, což je jednou z hlavních překážek v dosažení účinnější léčby, a to hlavně kvůli rychlému vzniku metastáz a vysoké rychlosti přenosu krevním oběhem (Arvelo a kol., 2015). V posledních letech se díky terapeutickým pokrokům, především zavedením cílené léčby, prodloužilo přežití pacientů i s pokročilým stádiem onemocnění. Nastala řada změn v možnostech léčby, které zahrnují začlenění nových léčiv, stejně tak jako vhodné chirurgické resekce u vybraných pacientů s metastatickým onemocněním (Semrad a Kim, 2015).

Zejména v minulých třiceti letech došlo k významnému pokroku odhalení molekulární podstaty CRC a charakteristiky agresivity nádoru. Identifikace molekulárních drah vzniku kolorektálního karcinomu odhalila heterogenitu tohoto onemocnění, které vede k různým fenotypům. Klíčovým prvkem v rozvoji nádorů je akvizice genomové nestability a v případě CRC existují nejméně tři dráhy této nestability. Jedná se o chromozomální nestabilitu (CIN – *Chromosomal instability*), která je základem většiny zhoubných nádorů tlustého střeva

a konečnicku, mikrosatelitovou nestabilitu a fenotyp CpG hypermetylovaných ostrůvků (CIMP – *CpG island hypermethylator phenotype*). Tato expanze nových genetických a epigenetických dat přispěla k objevu dalších možných cílených léčeb pro tyto pacienty. Kromě toho, využívání různých molekulárních technik umožnilo vytipovat kandidátní biomarkery, které by mohly předpovídat klinickou odezvu i toxické účinky léčby (Al-Sohaily a kol., 2012; Pino a Chung, 2010; Ross a kol., 2010; Wilson a kol., 2007).

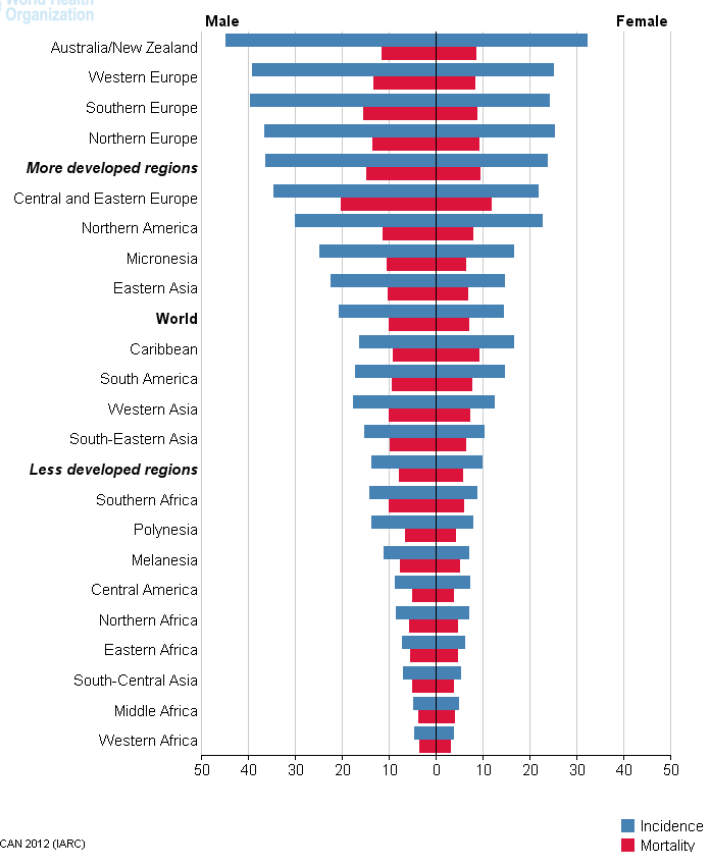
V rámci léčby je, mimo chirurgie, využívána především radioterapie, klasická chemoterapie (5-fluorouracil, kapecitabin) či biologická léčba anti-EGFR inhibitory (cetuximab, panitumumab), po předchozím vyšetření genů RAS, případně bevacizumab jako inhibitor VEGF (Vaskulární endoteliální růstový faktor) (Vyzula a kol., 2016).

2 Současný stav řešené problematiky

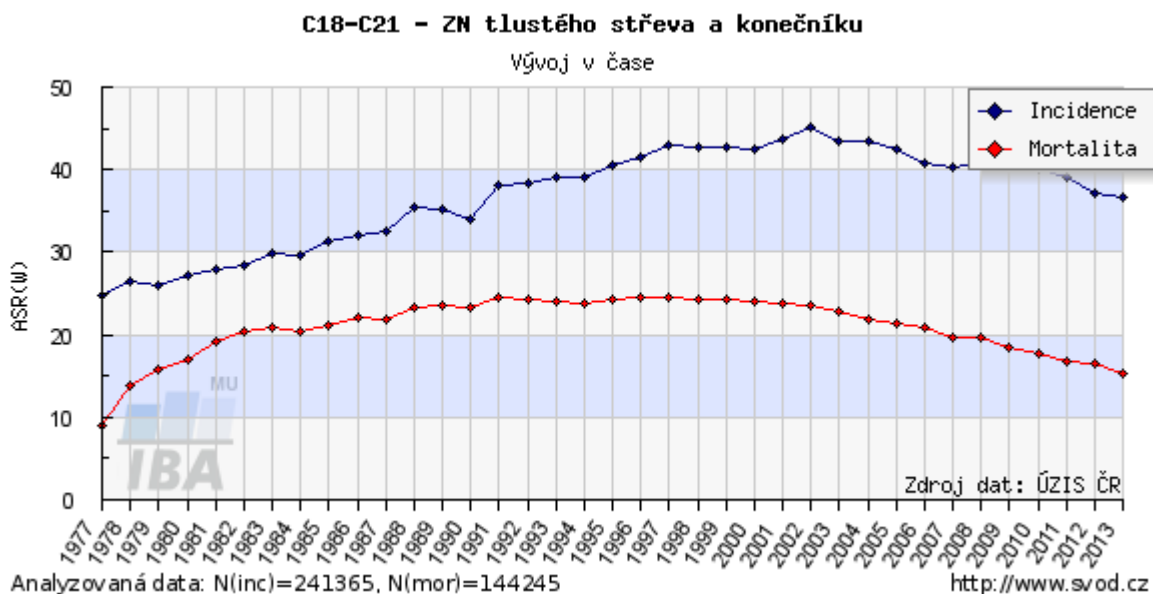
2.1 Incidence kolorektálního karcinomu

Výskyt kolorektálního karcinomu se zvyšuje jak v důsledku růstu a stárnutí populace, tak kvůli rizikovým faktorům zahrnujícím střešní choroby, rodinnou anamnézu rakoviny tlustého střeva, příjem červeného masa, kouření, nízkou fyzickou aktivitu, nízkou spotřebu ovoce a zeleniny a zvýšený *body mass index* (BMI) (Brooke a kol., 2016; Torre a kol., 2015).

Nejvyšší výskyt CRC je sledován v Austrálii a Novém Zélandě, Evropě a Severní Americe, naopak nejnižší byl zjištěn v Africe a jiho-centrální Asii. V roce 2012 činil celosvětový odhad 1 360 602 nových případů, což představuje 9,7% zastoupení CRC v rámci výskytu všech typů rakovin, s výjimkou nemelanomových nádorů kůže. Z toho 447 136 případů je přisuzováno Evropě, přičemž nález je častější u mužů než u žen ve většině zemí světa (viz obrázek č. 1) (Ferlay a kol., 2013; Torre a kol., 2015). Incidence se zvyšuje především v oblastech s historicky nízkým rizikem jako je Španělsko a země východní Asie a východní Evropy. Jako typický zástupce oblasti východní Evropy je uvedena Česká republika, která zaznamenala obrovský nárůst hlavně v letech 1983–2003 (viz obrázek č. 2) (Center a kol., 2009; Jemal a kol., 2011). Česká republika má jeden z nejvyšších výskytů kolorektálního karcinomu ve světě, momentálně je spolu s Norskem na šestém místě v přepočtu výskytů na 100 000 obyvatel. Vyšší výskyt je pozorován především u mužů. Čeští muži zaujímají čtvrté místo světového žebříčku a třetí místo v Evropě, zatímco ženy jsou celosvětově na šestnáctém místě a desátém v Evropě. Další země Evropy, které vykazují nejvyšší incidenci v odhadech z roku 2012, jsou Slovensko, Maďarsko, Dánsko a Nizozemsko. Kolorektální karcinom je v Evropských zemích stále spojen s vysokou mírou úmrtnosti (Ferlay a kol., 2013).



Obrázek č. 1: Světový odhad věkově standardizovaného výskytu kolorektálního karcinomu u mužů a žen na 100 000 obyvatel (Převzato z Ferlay a kol., 2013).



Obrázek č. 2: Incidence a míra mortality kolorektálního karcinomu v České republice v letech 1977-2013 (Převzato z Dušek a kol., 2005 [cit. 2016-4-25]).

2.2 Mortalita kolorektálního karcinomu

Podle odhadů Světové zdravotnické organizace WHO pro rok 2011, způsobuje rakovina více úmrtí než veškeré ischemické choroby srdeční nebo mozkové mrtvice. Jen v roce 2012 byl odhad úmrtí na kolorektální karcinom ve světě 694 000 případů, což je 8,5% zastoupení celkového počtu úmrtí na rakovinu. Větší počet zemřelých je pozorován v rozvojových oblastech světa, což odráží horší prognózu onemocnění v těchto regionech. V Evropě jsou počty úmrtí na CRC odhadovány na 214 866 případů, tedy 12,2 % z celkového počtu rakovinou zapříčiněných úmrtí. V roce 2012 byl počet pacientů s kolorektálním karcinomem s přežitím >5 let odhadnut na 3 543 582 celosvětově a 1 203 943 v Evropě (Ferlay a kol., 2013). Konkrétně v České republice dochází každým rokem přibližně k 3 716 úmrtí z důvodů rakoviny tlustého střeva a konečníku (údaje k roku 2013). V posledních letech však lze pozorovat stabilizaci incidence a mírný pokles mortality (viz obrázek č. 2) (Dušek a kol., 2005).

2.3 Biologie kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom je lokalizován v tlustém střevě nebo konečníku, což jsou části gastrointestinálního systému. CRC má různé vlastnosti v závislosti na přesném místě vzniku v tlustém střevě nebo rektu. Nádory v proximální části tlustého střeva jsou častější u žen a starších pacientů, zatímco nádory v distální části jsou běžné pro muže a mladší pacienty (American Cancer Society, 2014).

Vývoj karcinomu je obvykle pomalý, trvá i 10 až 20 let. Zpočátku se většinou jedná o nerakovinný výrůstek, který se vyvíjí na vnitřní výstelce tlustého střeva nebo rekta, takzvaný polyp. Z polypu může vznikat adenom, což je benigní nádor ze žlázových buněk. Adenomatózní polypy se však mohou dalším vývojem změnit ve zhoubný nádor, přičemž tato pravděpodobnost narůstá i v závislosti na jejich velikosti. Asi v 96 % případů kolorektálních karcinomů se jedná o adenokarcinomy, ovšem hrozbu malignity lze očekávat cca u 5 % adenomů (American Cancer Society, 2014; Bujanda a kol., 2010).

2.4 Molekulární genetika hereditární formy CRC

Dědičnost je považována za důležitý faktor ve výskytu kolorektálního karcinomu. CRC je spojován s rodinnou historií až ve 25 % případů. Tyto dědičné syndromy mají různé spektrum rizik, věku, endoskopických a histologických nálezů, mimokolonických projevů a způsobů dědičnosti (Gala a Chung, 2011). Populační studie ukazují, že pravděpodobnost vzniku tohoto nádoru je dvakrát až třikrát vyšší, pokud rodinní příslušníci s primární příbuzností trpí sporadickým typem CRC (Arvelo a kol., 2015). Riziko vzniku CRC je hodnoceno v závislosti na počtu příbuzných s diagnózou CRC a na počtu příbuzných s diagnózou v ranném věku (Sjöström a kol., 2016).

Hrozba vzniku tumoru kolorekta nastává u osob s pozitivní rodinnou anamnézou asi o 10 let dříve (Lin, 2012). Chang a kol. (2012) ve své studii hodnotili kohortu 75 pacientů s diagnostikovaným nádorem tlustého střeva a konečníku, ve věku mladším než 40 let. Zjistili, že 22 % těchto nádorů bylo způsobeno vrozenými syndromy. U 17 % pacientů byly prokázány abnormality v genech *DNA mismatch repair* systému, souvisejících s mikrosatelitovou nestabilitou a u 5 % pacientů se jednalo o zárodečné genetické poruchy predisponující k CRC. Rostoucí výskyt CRC v mladém věku, což je jeden z charakteristických znaků dědičných CRC syndromů, zdůrazňuje spolu s jeho agresivní povahou důležitost včasného screeningu u mladých jedinců s příznaky (Ballester a kol., 2016). Vhodná klinická léčba u jedinců s rodinnou anamnézou CRC je závislá na zhodnocení souvisejícího rizika, a proto je jeho přesný odhad u těchto osob zásadní. Například jedincům, u nichž riziko překračuje předem stanovený práh, mohou být nabízena screeningová vyšetření jako kolonoskopie či testování na přítomnost okultního krvácení (Butterworth a kol., 2006).

Většina dědičných CRC syndromů má typické fenotypové projevy a identifikace zárodečných mutací potvrzují diagnózu (Ballester a kol., 2016). Mezi nevýznamnější dědičné syndromy rakoviny tlustého střeva a konečníku patří familiární adenomatózní polypóza a Lynchův syndrom (Burt, 2008).

2.4.1 Familiární adenomatózní polypóza

Familiární adenomatózní polypóza je autozomálně dominantně dědičné onemocnění, způsobené mutací genu *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) v oblasti chromozomu 5q21. Toto onemocnění je charakterizováno stovkami až tisíci adenomatózních kolorektálních

polypů s následnou progresí v karcinom, tyto polypy se začínají tvořit již okolo věku 16 let. Jedná se o poměrně vzácné onemocnění, které postihuje asi jednoho jedince z počtu 10 000. S tímto onemocněním souvisí fenotypové projevy jako polypy v horní části trávicího ústrojí, vrozená hypertrofie pigmentového epitelu sítnice, zubní abnormality a extrakolonické nádory. Jestliže se v rodině vyskytují mimostřevní léze, byl stav dříve nazýván Gardnerův syndrom (Burt, 2008; Galiatsatos a Foulkes, 2006; Jaspersen a kol., 2010).

2.4.2 Lynchův syndrom

Lynchův syndrom neboli hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC – *Hereditary non – polyposis colorectal cancer*) je autozomálně dominantní onemocnění, při kterém jedince postihuje rozvoj rakoviny tlustého střeva a konečníku nebo extrakolonických typů rakovin již v raném věku (Green a kol., 1998). HNPCC vyplývá z mutace jednoho ze čtyř genů účastnících se *DNA mismatch repair* systému, tedy MLH1 (homolog MutL), MSH2 (MutS homolog 2) a MSH6 (homolog MutSa) nebo PMS2 (homolog MutL). Ve více než 90 % se mutace nachází v genech MLH1 nebo MSH2. Lynchův syndrom je spojován s mikrosatelitovou nestabilitou, typickou pro defektní *DNA mismatch repair* systém. Mikrosatelitová nestabilita koreluje se zárodečnými mutacemi v *mismatch repair* genech u rodin s HNPCC, ale může se vyskytovat také jako výsledek epigenetické inaktivace exprese genu MLH1, ke které dochází metylací jeho promotoru. Dokonce více než 90 % HNPCC vykazuje mikrosatelitovou nestabilitu. Díky tomu se jako první diagnostický screeningový test pro HNPCC používá analýza mikrosatelitů (Müller a kol., 2004; Murphy a kol., 2006).

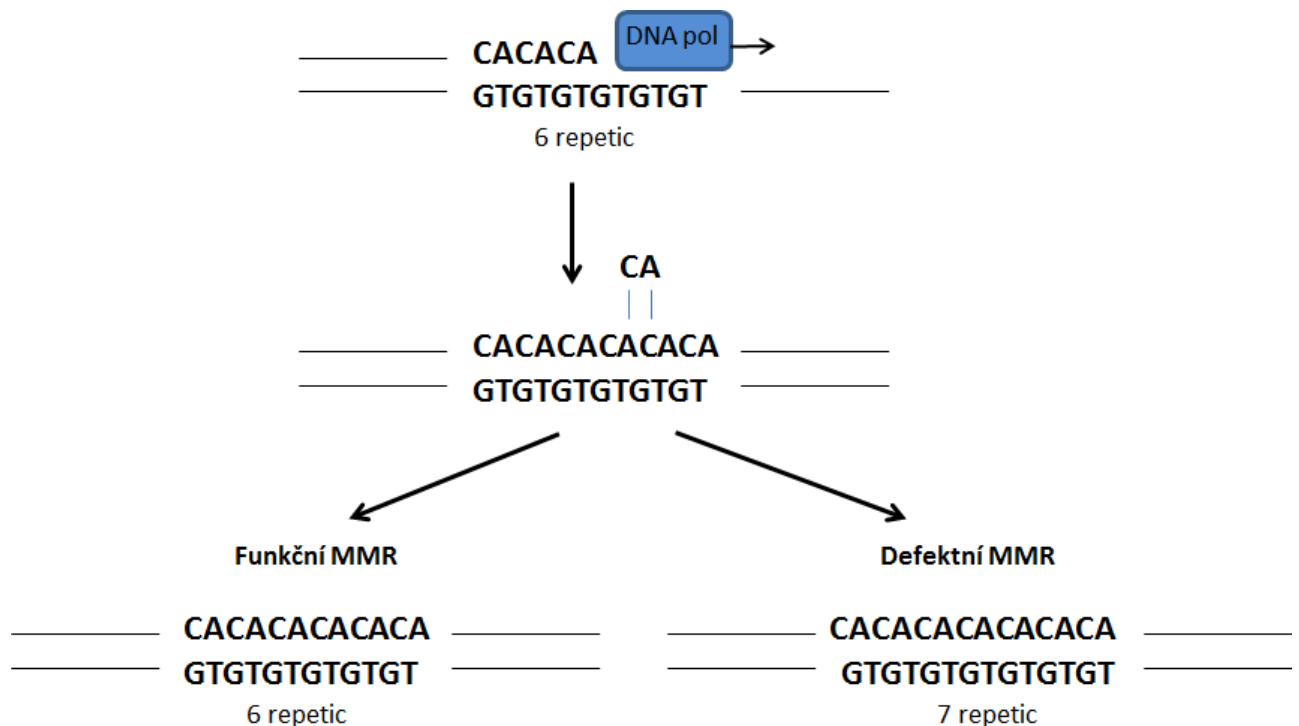
Mikrosatelitová nestabilita byla původně určována porovnáváním nukleotidových repetitivních nálezů v nádorových a normálních buňkách, nyní je detekována specifickými mikrosatelitovými markery. Pro testování je používán panel pěti markerů s vhodnou citlivostí a specifičností pro správnou analýzu, který obsahuje dva mononukleotidy BAT-25 a BAT-26 a tři dinukleotidy D2S123, D5S346 a D17S250. Nově je doporučeno použití mononukleotidových repetitivních nálezů BAT-25, BAT-26, NR21, NR24 a NR27, které se vyznačují konstantním počtem nukleotidových repetitivních nálezů a jednotnou velikostí u zdravých jedinců (Buecher a kol., 2013). Zjištění stavu mikrosatelitové nestability u CRC, ať už se jedná o defekty dědičné nebo sporadické, může být využito pro prognostické účely a efektivnější terapeutické přístupy. Mnoho studií prokázalo zlepšenou prognózu a prodloužené přežívání pacientů s vysokými stavy mikrosatelitové nestability, v porovnání s mikrosatelitově stabilními tumory (Murphy a kol., 2006).

2.5 Molekulární cesty sporadické formy CRC

Identifikace různých molekulárních drah kolorektální karcinogeneze odhalila rozličné příčiny CRC. Asi v 15 % sporadických CRC jsou za maligní transformaci zodpovědné defekty v *DNA mismatch repair* systému vedoucí k mikrosatelitové nestabilitě. U maligní transformace dráhou CIMP je podstatou umlčování funkce genů epigenetickou hypermetylací. Třetím modelem je vznik kolorektální neoplasie v důsledku chromozomální nestability, což je nejběžnější příčina vzniku sporadických CRC. Tyto dráhy se vzájemně nevylučují, některé nádory vykazují vlastnosti více než jedné z nich (Al-Sohaily a kol., 2012; Colussi a kol., 2013).

2.5.1 Mikrosatelitová nestabilita

Mikrosatelity jsou repetitivní sekvence DNA vyskytující se napříč celým lidským genomem. Tyto sekvenční motivy jsou náchylné k akumulaci mutací, a to zejména proto, že DNA polymeráza během replikace a rekombinace nemůže efektivně vázat tuto oblast DNA. Nejčastějšími chybami jsou nekomplementarita párů bází a chybné inserce či delecce bází, které unikají opravné aktivitě DNA polymerázy. Mikrosatelitová nestabilita je forma genomické nestability asociovaná s defekty v *DNA mismatch repair* systému, který se účastní oprav chyb vznikajících v průběhu DNA replikace (viz obrázek č. 3). Kromě toho také potlačuje homologní rekombinaci a účastní se signalizace poškození DNA. Defekty v reparačním systému *DNA mismatch repair* jsou spojeny s celogenomovou nestabilitou, predispozicí pro kolorektální karcinom a nižší citlivostí těchto nádorů na léčbu 5-fluorouracilem, podávaném v adjuvantním režimu (Grady a Markowitz, 2000; Li, 2008; Murphy a kol., 2006; Vilar a Gruber, 2010).

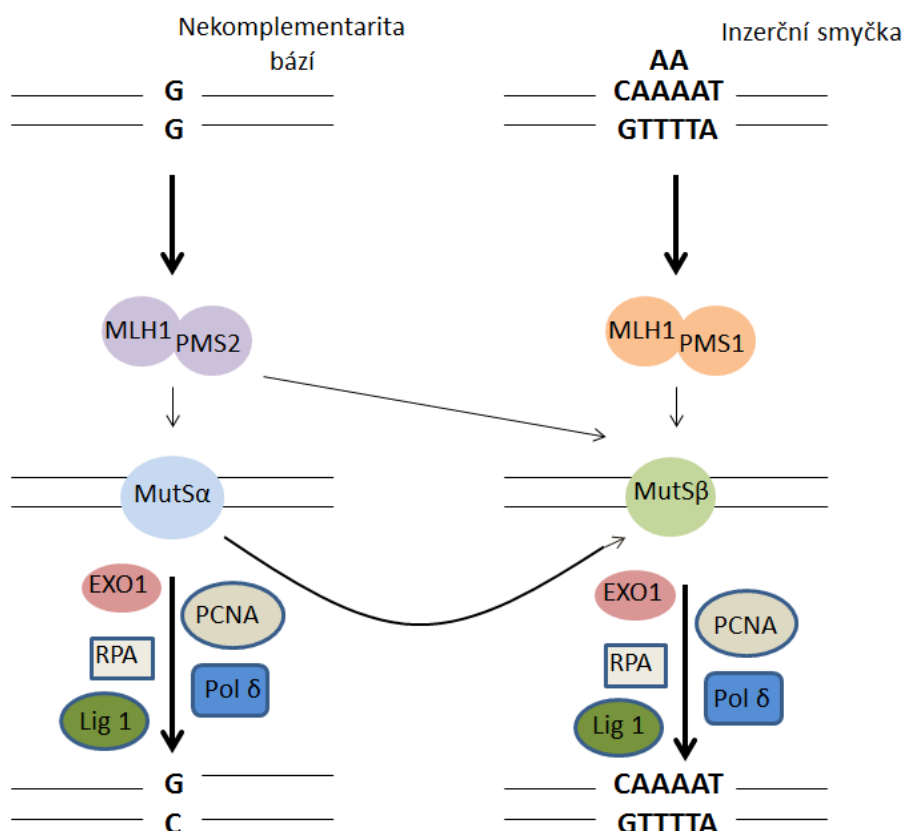


Obrázek č. 3: Mikrosatelitová nestabilita jako výsledek defektního *mismatch repair* systému, MMR – *mismatch repair* systém. Chybnou replikací DNA dochází k nekomplementaritě bází, která bývá opravována *mismatch repair* systémem. V případě defektní opravné dráhy může dojít k inzerci repetice, tedy mikrosatelitové nestabilitě (Upraveno dle Chung a Rustgi, 2003).

Mismatch repair systém je v eukaryotní DNA zahájen rozpoznáním špatně spárovaných bází dvěma heterodimerními komplexy MutS α a MutS β (heterodimer složený z MSH2 a MutS homologu 3 MSH3). Předpokládá se, že MutS α je zodpovědný za rozpoznání chybného spárování bází, zatímco MutS β hraje hlavní roli v opravě chybných inzercí či delecí většího rozsahu. Ani jeden z těchto komplexů pravděpodobně není schopen opravit chybné inserce a delece jedné báze. Obecně MutS α nejlépe rozpoznává základní substituce a malé inserční smyčky, zatímco MutS β je vhodnější pro rozpoznání větší inserční smyčky. Po vazbě proteinů MutS dochází k jejich interakci s proteiny heterodimerního komplexu MutL, které tak zvyšují účinnost rozpoznání chybného párování bází proteiny MutS (Kolodner, 1996; Wheeler a kol., 2000).

Jakmile je rozpoznána nekomplementarita DNA a naváže se komplexy MutS a MutL, oprava neshodného úseku DNA probíhá aktivací endonukleázami zprostředkované degradace DNA ze zářezu, který je vzdálen 1 – 2 kilobáze od chybného spárování bází. V opravě je zapojena také exonukleáza EXO1, jednovláknovou DNA – vázající protein RPA a protein

PCNA (*Proliferating Cellular Nuclear Antigen*). Degradace pokračuje až do chvíle odstranění nekomplementarity a výsledná délka excizní plochy je doplněna DNA polymerázou δ , která vkládá správné nukleotidy do sekvence. Proces je následně zakončen ligací prostřednictvím DNA ligázy 1 (viz obrázek č. 4) (Li, 2008; Wheeler a kol., 2000).



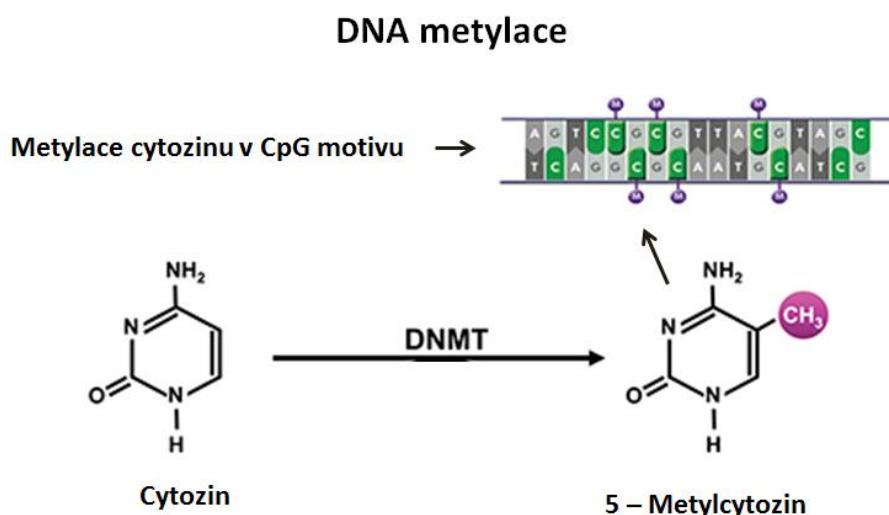
Obrázek č. 4: Mismatch repair systém. Chybně spárované báze jsou rozpoznány komplexem MutS α , zatímco inzerční smyčka je rozpoznána komplexem MutS β . Komplex MutS α se může účastnit i při opravě inzerční smyčky. MutL heterodimerní komplexy (MLH1/PMS2 a MLH1/PMS1) poté interagují s MutS proteiny. Po této interakci následuje oprava zprostředkovaná exonukleázou EXO1, proteinem RPA, proteinem PCNA, DNA polymerázou δ a závěrečná ligace probíhá prostřednictvím DNA ligázy 1 (Upraveno dle Wheeler a kol., 2012).

2.5.2 Metylace CpG ostrůvků

DNA hypermethylace promotorů bohatých na CpG oblasti je důležitým mechanismem v lidské karcinogenezi, patofyziologie hypermethylace je však nejednoznačná. U jednotlivých nádorů se stupeň metylace může lišit. Hypermethylace má za následek „vypnutí“ tumor supresorových genů nebo genů s nimi spjatých. Nádory s vysokým stupněm metylace představují klinicky a etiologicky významnou skupinu, která se vyznačuje epigenetickou

nestabilitou. Vzhledem k tomu, že se nejedná o změny v sekvenci DNA, ale spíše o samostatné molekulární události, které jsou potenciálně reversibilní, mohou tak poskytovat nové cíle pro diagnózu a léčebnou strategii (Issa, 2004; Mojarad, 2013; Ogino a kol., 2006).

DNA metylace je enzymatický proces, v průběhu kterého je přidávána metylová skupina k 5 – pozici cytozinu DNA metyltransferázami (DNMT), za vzniku 5–metylcytozinu (viz obrázek č. 5). Typickým substrátem metyltransferáz jsou CpG ostrůvky, což jsou oblasti v rámci genomu, které jsou běžné v promotorových oblastech bohatých na CpG dinukleotidy. Zatímco metylace v oblasti promotoru vede k transkripčnímu umlčení genů, metylace mimo tyto oblasti může vést k transkripční aktivaci (Mojarad, 2013; Yiu a Yiu, 2016).



Obrázek č. 5: Methylace CpG ostrůvků, DNMT – DNA metyltransferáza. Cytosiny, které jsou následovány guaniny (CpG motiv) jsou typickým substrátem metylace. K metylaci dochází prostřednictvím metyltransferáz, které kovalentně připojují metylovaný zbytek na pátý uhlík cytozinu, za vzniku 5–metylcytozinu (Upraveno dle Zakhari, 2013).

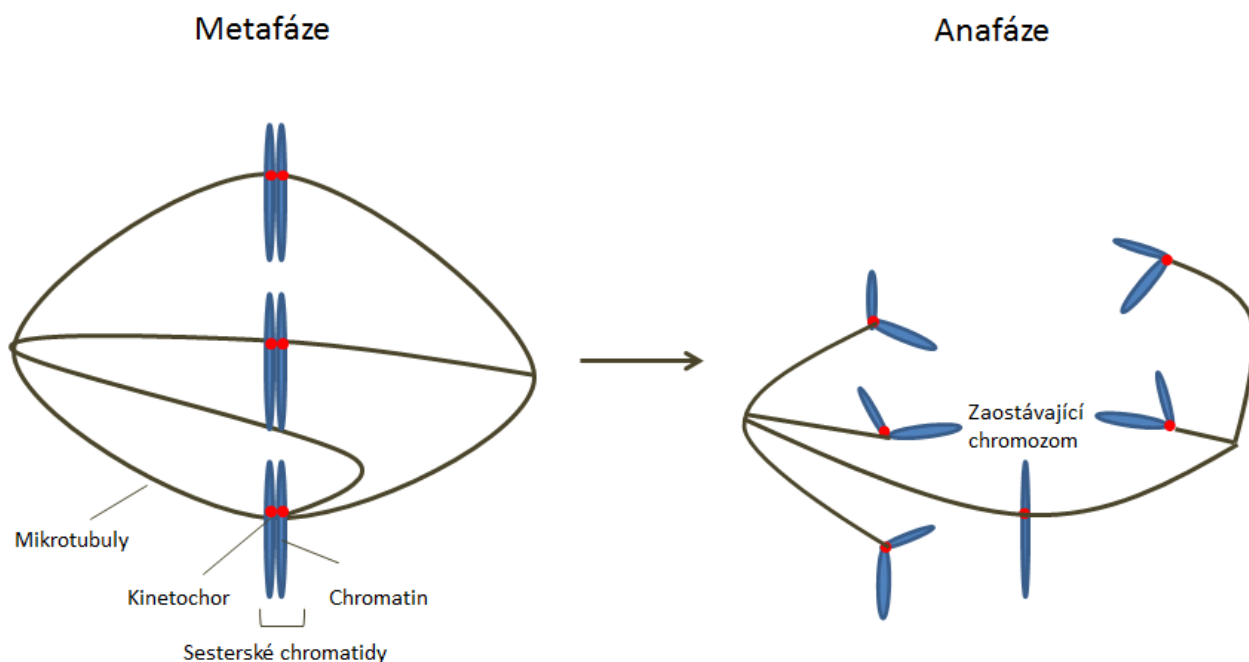
Předpokládá se, že jednou z prvních událostí dráhy CIMP v kolorektálním karcinomu, je mutace genu BRAF V600E. Data ukazují, že tato mutace u myši indukuje zvýšenou expresi metyltransferázy DNMT3B (*DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3 Beta*), *de novo* metylaci a *down*-regulaci specifických CpG dinukleotidů. Nicméně, prozatím není žádný existující důkaz, že BRAF V600E mutace je stěžejní událostí pro CIMP. Proto je možné, že je v dráze zahrnut jiný kauzální gen, který podmiňuje mutaci BRAF V600E. Kromě toho, většina CIMP kolorektálních karcinomů je charakterizována hypermetylací promotorových CpG ostrůvků

DNA mismatch repair genu komplexu MutL, což vede k jeho transkripční inaktivaci, jak bylo zmíněno v případě HNPCC. Předpokládá se, že ztráta tohoto genu způsobuje rapidní progresi maligní transformace (Hughes a kol., 2013; Zong a kol., 2016).

2.5.3 Chromozomální nestabilita

Chromozomální nestabilita je pozorována u 65 – 70 % sporadických kolorektálních karcinomů a je spojována se špatnou prognózou a lékovou rezistencí. Jedná se o vady stability telomer, odpovědi na poškození DNA a zvýšenou míru chybné segregace chromozomů v mitóze. Aberantní chromozomální stav buňky je klasifikován na základě změny ploidie, zisku či ztráty celých nebo velkých částí chromozomů, hrubých chromozomálních přestaveb a dalších aberací (Burrell a kol., 2013; Pino a Chung, 2010; Yuen, 2010).

Na zajišťování správné segregace chromozomů v průběhu mitózy se podílí desítky genových produktů, zajišťující přesné zachycení chromozomů na mikrotubuly v kinetochorech. Pro karcinomy všeobecně jsou typické defekty mechanismů podílejících se na chromozomální segregaci. Mezi tyto mechanismy patří chybná koheze sesterských chromatid, defektní duplikace centrozomů, dysfunkce telomer, hyperaktivní nebo hypoaktivní kontrolní bod vřeténka (SAC – *Spindle assembly checkpoint*) a příliš stabilní přichycení mikrotubulů na chromozomy. Většina z těchto mechanismů vede k zaostávání chromozomů během anafáze, z důvodu chybného připojení na mikrotubuly (viz obrázek č. 6). Důsledkem jsou aneuploidní buňky a v mnoha případech heterogenní aneuploidie koreluje s agresivitou a stádiem nádoru (Bakhom a Compton, 2012; Tusell a kol., 2010).



Obrázek č. 6: Zaostávající chromozom v průběhu anafáze. Mitotické vřeténko se v metafázi váže na chromozomy. Jeden chromozom je uchycen současně oběma póly vřeténka. Po vstupu do anafáze může toto špatné uchycení vést k zaostávajícímu chromozomu (Upraveno dle Bakhoun a Compton, 2012).

2.6 CIN – pozitivní kolorektální karcinomy

S typickými karyotypickými abnormalitami pozorovanými v CIN nádorech souvisí akumulace charakteristických mutací určitých nádorových supresorových genů spojená s mutační aktivací onkogenů. Tyto mutace aktivují onkogenní dráhy, které jsou zásadní pro patogenezi kolorektálního karcinomu (Pino a Chung, 2010; Thiagalingam a kol., 2001).

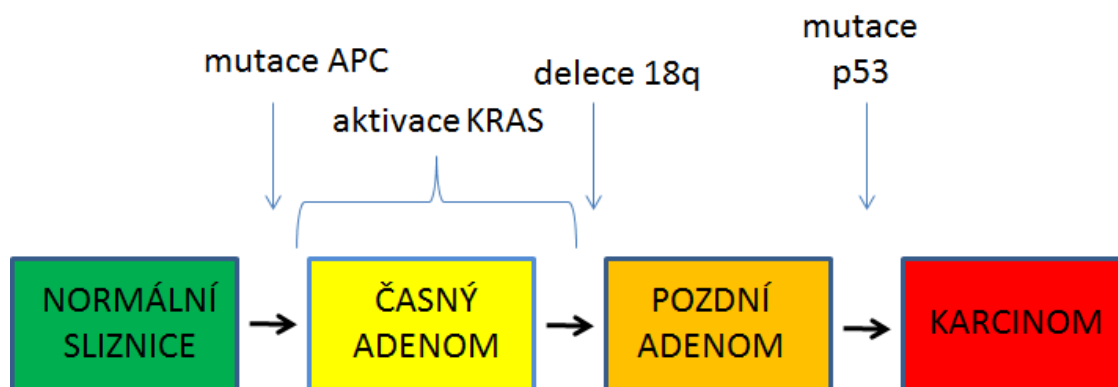
2.6.1 Vogelsteinův model

V roce 1990 Fearon a Vogelstein navrhli vícestupňový genetický model kolorektální karcinogeneze, kde specifické genetické události korelují s vyvíjející se morfologií tkáně. V tomto modelu je popisován vývoj normální sliznice, přes malý a velký polyp, až k invazivnímu nádoru. Daný vývoj je v každém kroku řízen dobře definovanými změnami v genomu (Gatenby a Vincent, 2003).

Popisovaný model je charakterizován několika obecnými vlastnostmi. Vznik kolorektálního karcinomu je zapříčiněn mutační aktivitou onkogenů spojenou s mutační

inaktivací tumor supresorových genů. Formace maligního tumoru je výsledkem mutace alespoň čtyř až pěti genů. Pro formaci benigního nádoru stačí menší počet mutovaných genů. Za biologické vlastnosti tumoru zodpovídá spíše akumulace genetických změn, než jejich pořadí. Některé nádorové supresory nemusí být pouze recesivní. O tom svědčí fenotypový projev jako výsledek mutantního tumor supresorového genu, který je v heterozygotním stavu. V tumorech je tedy přítomná jedna wild-typová alela daného genu, nedokáže však potlačit progresi nádoru. Například heterozygotní ztráta genu SMAD4 (*SMAD Family Member 4*), účastnícího se kolorektální karcinogeneze, napomáhá časným stádiím vzniku tumoru. K dalšímu vývoji je však důležitá ztráta zbylé wild-typové alely (Fearon a Vogelstein, 1990; Santarosa a Ashworth, 2004).

Dle Vogelsteinova modelu (viz obrázek č. 7) nejdříve dochází k inaktivaci tumor supresorového genu APC, čímž ve střevě nastává tvorba četných adenomatózních polypů. Dalším krokem je zvýšená exprese RAS proteinů, ke které vede mutační aktivace genů, a to zejména bodová mutace protoonkogenu KRAS (*Kirsten Ras*). Tato mutace je pozorována až u 50 % CRC. V pozdějších stádiích vývoje lze až u 70 % kolorektálních karcinomů pozorovat celkové nebo částečné delece dlouhého raménka chromozomu 18 (18q). Pozdní stádia adenomu jsou charakterizovány ztrátami krátkého ramene chromozomu 17 (17p). V této oblasti dochází k inaktivaci genu p53, což má za následek poruchy kontroly buněčného cyklu (Pino a Chung, 2010; Fearon a Vogelstein, 1990).

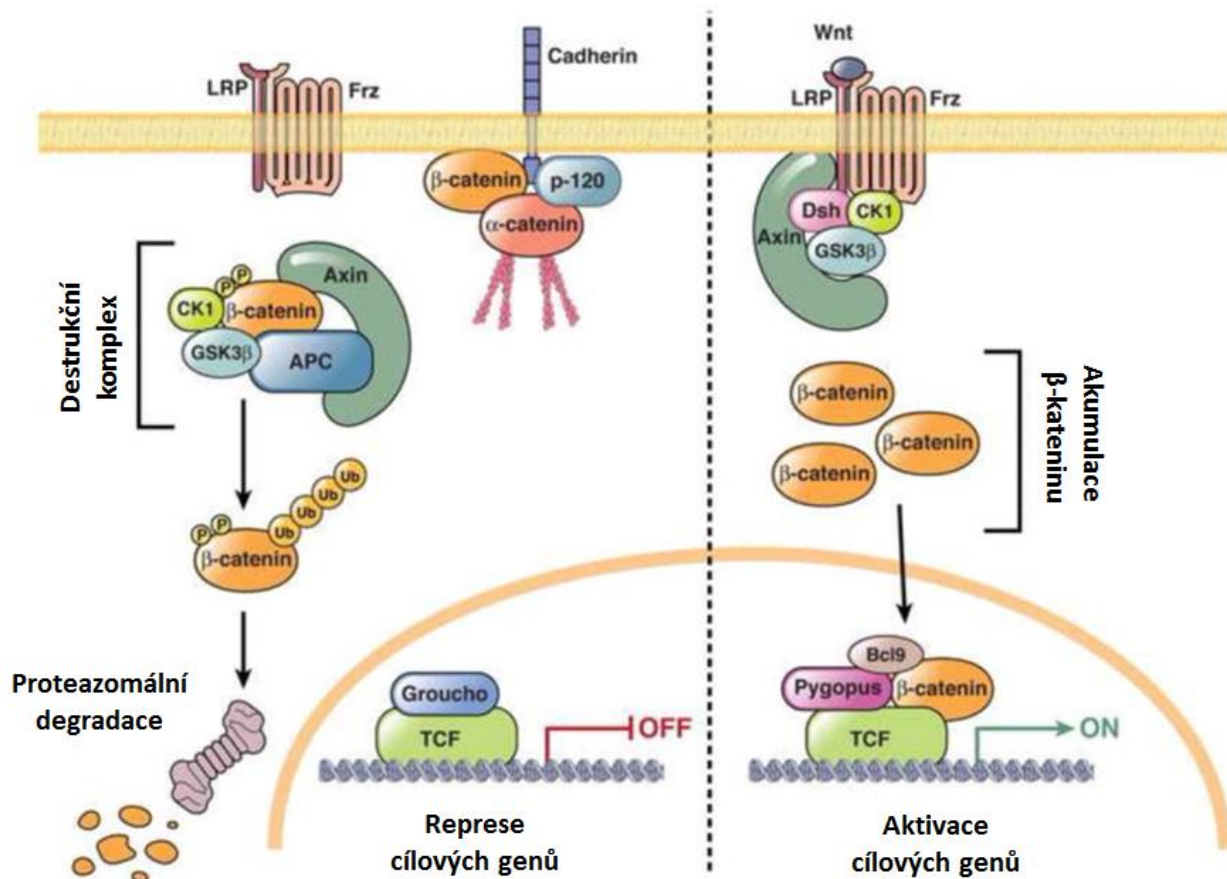


Obrázek č. 7: Vogelsteinův model. Počátečním krokem vývoje kolorektálního karcinomu je aktivace Wnt signální dráhy, ke které dochází mutací genu APC. Progrese do větších adenomů vyžaduje aktivační mutaci proto-onkogenu KRAS a delecí v q oblasti chromozomu 18. K vývoji časných karcinomů dochází na základě mutací p53 (Upraveno dle Pino a Chung, 2010).

2.6.2 APC

Nejčasnější genetickou událostí ve vývoji kolorektálního nádoru je aktivace Wnt signální dráhy prostřednictvím genu APC v lokusu 5q21. Pokud je Wnt dráha stimulována, transkripční ko – aktivátor β -katenin aktivuje transkripční faktor TCF (*T-cell* faktor) – dependentní transkripci Wnt – cílových genů, což může vést k nadměrné buněčné proliferaci. Produkt genu APC je velký multidoménový protein, který reguluje diferenciaci, adhezi, polaritu, vývoj, apoptózu a chromozomální segregaci. Tento protein je esenciální složkou destrukčního komplexu v dráze Wnt, zapojeného do vazby a downregulace β -kateninu (Aoki a Taketo, 2007; Pino a Chung, 2010).

APC inhibuje β -katenin/TCF – dependentní transkripci několika mechanismy (viz obrázek č. 8). Za první, APC poskytuje „lešení“ pro destrukční komplex spolu s proteinem Axin, kasein kinázou 1 (CK1) a glykogen syntáza kinázou 3 (GSK3), což vede k degradaci cytoplazmatického proteinu β -kateninu. K tomu dochází díky CK1 a GSK3, které fosforylují amino – koncovou oblast β -kateninu. Ta je rozpoznána podjednotkou E3 ubikvitin ligázy, přičemž dále následuje ubikvitinace a proteazomová degradace β -kateninu (MacDonald a Tamai, 2009). Za druhé, APC podporuje export β -kateninu z jádra, který zde migruje z cytoplazmy, díky čemuž se snižuje množství jaderného β -katenin/TCF komplexu. Dalším mechanismem je zabránění interakce β -kateninu s TCF vazbou APC na β -katenin (Aoki a Taketo, 2007; Neufeld a kol., 2000). Poslední způsob inhibice β -katenin/TCF – dependentní transkripce probíhá prostřednictvím přímé interakce s represorovým komplexem. APC se váže na β TrCP (*β -transducing Repeat-containing Protein*) a transkripční represor CtBP (*C-terminal Binding Protein*), a tvoří tak stabilní komplex s dalšími korepresory TLE-1 (*Transducin-like Enhancer Protein 1*) a HDAC1 (*Histone Deacetylase 1*), díky čemuž dochází k represí Wnt – cílových genů (Aoki a Taketo, 2007; Spiegelman a kol., 2000).



Obrázek č. 8: APC/Wnt signalizace. V nepřítomnosti molekuly Wnt je destrukční komplex, složený z APC, GSK3 a CK1 na axinovém „lešení“, zacílen na degradaci cytoplazmatického β -kateninu, prostřednictvím proteazomu. Zároveň jsou cílové geny Wnt signalizace umlčovány represorem interagujícím s TCF. V přítomnosti Wnt ligandu dochází k obsazení receptorů pro Wnt a nedochází k fosforylaci β -kateninu. Ten se díky tomu akumuluje a následně translokuje do jádra. Zde dochází k odsunutí represoru a interakci β -kateninu s TCF, čímž je zahájena aktivace cílových genů (Upraveno dle Pino a Chung, 2010).

2.6.3 RAS proteiny

RAS onkogen má zavedenou roli v buněčném růstu a regulaci a jeho proteinový produkt je zapojen do mnoha buněčných funkcí, včetně buněčné proliferace, apoptózy, migrace a diferenciaci. RAS protein je aktivován přechodně v odpovědi na extracelulární signály, jako jsou růstové faktory, cytokiny a hormony, stimulující povrchové receptory (Brink a kol., 2003). Detailněji se jedná o membránou uchycený guanozin trifosfát/guanozin difosfát (GTP/GDP) – vázající protein (Tan a Du, 2012). Aktivace RAS vede k následné aktivaci široké škály efektorů, včetně serin/threonin kináz, GTPázu – aktivujícím proteinům, fosfoinositid 3 – kinázy a faktoru měnícího GTP za GDP (*Guain Exchange – factor*).

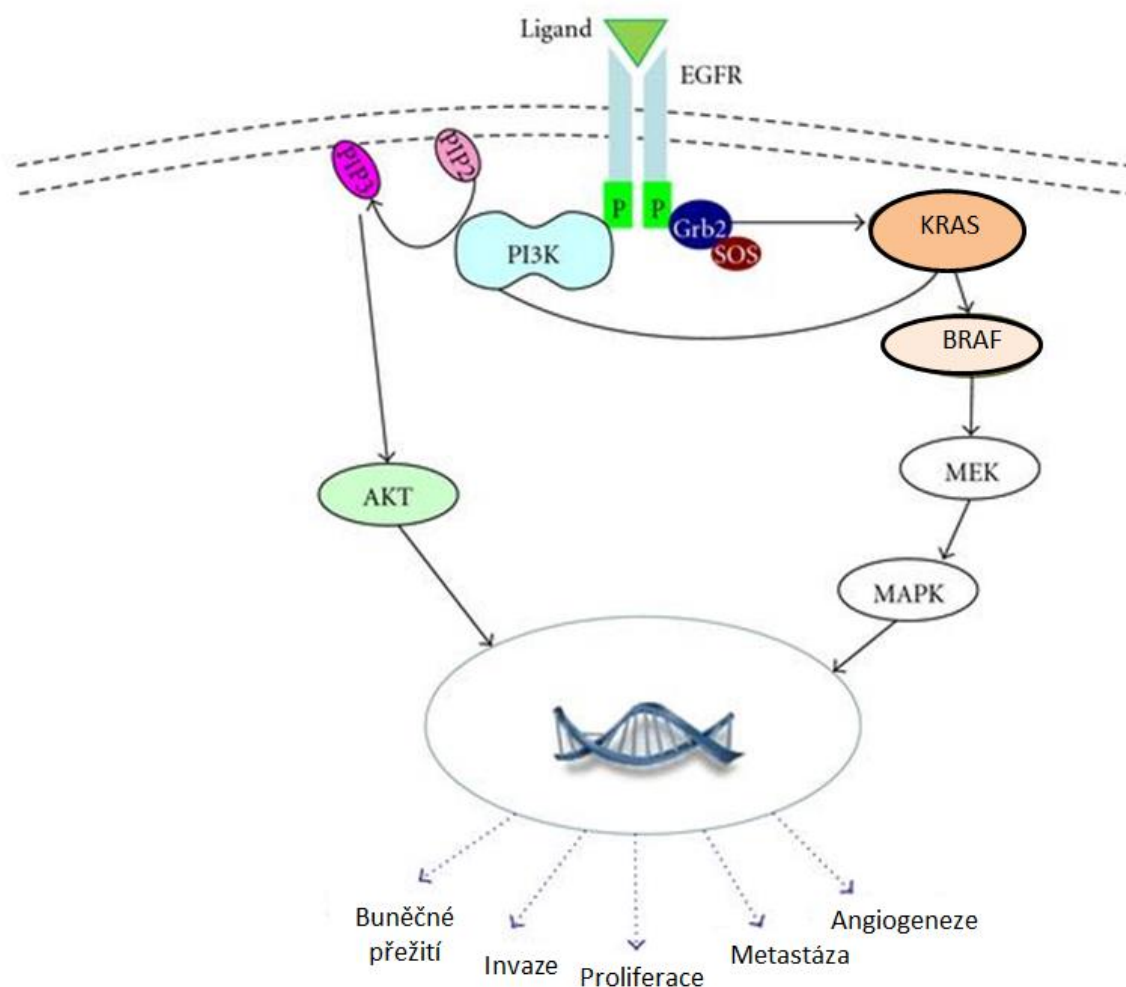
Mutantní proteiny RAS jsou konstitutivně aktivní díky snížené vnitřní GTPázové aktivitě a necitlivosti vůči GTPázu – aktivujícím proteinům. Existují tři známé izoformy genu RAS, a to HRAS (*Transforming Protein P21*), NRAS (*Transforming Protein N-Ras*) a KRAS. HRAS je nejméně často mutovaným genem v lidských nádorech. V CRC je výskyt mutantní formy NRAS spíše vzácný, častý je však výskyt mutované izoformy KRAS (Arrington a kol., 2012; Irahara a kol., 2010).

2.6.3.1 KRAS

KRAS je lokalizovaný na chromozomu 12 a jeho mutace u CRC přispívá k přechodu ze středního adenomu do pozdního adenomu nebo karcinomu. Těmito mutacemi jsou převážně jednonukleotidové bodové mutace. Nejčastější forma mutace KRAS probíhá v kodonu 12 a jedná se o tranzici GGT na GAT. Produkt genu KRAS je protein o velikosti 21 kDa, který se nachází na vnitřní straně plazmatické membrány a podílí se na přenosu mitogenních signálů (Arrington a kol., 2012; Brink a kol., 2003). Mutace KRAS narušují jeho vnitřní GTPázovou aktivitu, a vedou přes konstitutivně aktivní GTP – vázané stavy k aktivaci následných pro – proliferačních signálních drah. Z tohoto důvodu hrají kritickou roli ve vývoji nádorů (Tan a Du, 2012).

Jako malá GTPáza je KRAS zodpovědný zejména za aktivaci EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) signalizace (viz obrázek č. 9) (Tan a Du, 2012). EGFR je membránou vázaný tyrozin kinázový receptor růstového faktoru, který řídí signální dráhy zapojené do buněčné diference, proliferace a angiogeneze. Je exprimován v celé řadě lidských nádorů, včetně CRC, gliomů, karcinomů plic, hlavy a krku, slinivky břišní, prsu, vaječníků, močového měchýře a ledvin. KRAS je v tomto případě důležitým mediátorem odpovídným za přenos signálu z ligandem vázaného EGFR do jádra. V normálních buňkách dochází po vazbě ligandu na EGFR k jeho dimerizaci a následné aktivaci tyrozin kinázy. Tyrozin kinázová rezidua se stávají autofosforylovanými a indukují aktivaci transdukčních signálních drah. Těmito drahami jsou mitogenem aktivovaná protein kinázová dráha (MAPK) a fosfatidylinositol 3 – kináza (PI3K) protein kinázová dráha (AKT), které vedou k aktivaci různých transkripčních faktorů a následnému ovlivnění buněčné proliferace, migrace, diference a apoptózy. KRAS se účastní MAPK dráhy. V tomto případě tyrozin kinázová rezidua aktivují KRAS, který rekrutuje a aktivuje protein BRAF (B-Raf proto – onkogen), s následnou fosforylací a aktivací MEK (*Mitogen-activated Protein Kinase/Extra-cellular Signal-regulated Kinase*) a zahájením MAPK dráhy. Vliv na prognózu onemocnění mají

genové mutace či amplifikace a proteinová overexprese různých prvků této dráhy (Krasinskas, 2011; Markman a kol., 2010; Milano a kol., 2008).



Obrázek č. 9: EGFR signaling. Vazba ligandu indukuje dimerizaci a aktivuje EGFR. Dochází k autofosforylaci tyrozin kinázových reziduí a aktivaci downstreamové signalizace, tedy KRAS – BRAF – MEK – MAPK, což vede k aktivaci transkripčních faktorů a následné buněčné odpovědi. Druhou cestou signalingu EGFR je PI3K – AKT dráha. Fosforylaci tyrozinových reziduí dochází k translokaci PI3K do buněčné membrány a následné aktivaci AKT. Aktivovaný AKT poté řídí podobné buněčné procesy jako MAPK dráha (Upraveno dle Krasinskas, 2011).

2.6.3.2 Anti-EGFR terapie

EGFR je nadměrně exprimován v 70 % – 75 % CRC, jedná se tedy o významný počet pacientů, kteří mohou mít prospěch z léčby anti-EGFR terapie (Meropol, 2005). Studie prokazují souvislost mezi mutovaným KRAS genem a sníženou odpovědí na anti-EGFR

léčbu. Mutace genu KRAS a overexprese EGFR bývá spojována se špatnou prognózou a zvýšeným rizikem metastáz v CRC. Pacienti s wild-typem KRAS vykazují lepší celkové přežití než ti, kteří jsou nositeli mutované alely (Arrington a kol., 2012).

Anti-EGFR terapie zahrnuje dva přístupy, které působí prostřednictvím různých mechanismů. Jedná se o inhibitory tyrozin kinázy a monoklonální protilátky. Inhibitory tyrozin kinázy se váží na intracelulární doménu EGFR a inhibují tak aktivaci následných efektorů. V závislosti na typu molekuly se může jednat o inhibici reversibilní i nereversibilní. Monoklonální protilátky se specificky a s vysokou afinitou váží na extracelulární doménu, čímž zabraňují navázání ligandu a následné signální dráze. Jedná se o kompetitivní inhibici, které se účastní epidermální růstový faktor a transformační růstový faktor α . Monoklonální protilátky mohou aktivovat imunologicky zprostředkované mechanismy, včetně antitumor – závislé buněčné cytotoxicity a komplementem – zprostředkované cytotoxicity, i když tento přínos nebyl na účinnost jednoznačně prokázán (Vokes a Chu, 2006).

2.6.4 p53

Gen TP53 (*Tumor Protein p53*) je lokalizován na krátkém rameni chromozomu 17. Produktem genu je transkripční faktor, který je nádorový supresor a koordinátor buněčné odpovědi na stres, včetně poškození DNA, aberantní proliferační signály a oxidativní stres. p53 je regulátor, který kontroluje transkripci genů zahrnutých v DNA metabolismu, apoptóze, regulaci buněčného cyklu, senescenci, angiogenezi, imunitní odpovědi, buněčné diferenciaci, pohyblivosti a migraci. Klasický model aktivace p53 začíná jeho stabilizací indukovanou fosforylací zprostředkovanou ATM/ATR proteiny, vazbou p53 do specifických DNA sekvencí a aktivací cílených genů interakcí s obecnou transkripční mašinerií. Za normálních podmínek je p53 negativně regulován proteinem MDM2 (*Mouse Double Minute 2* homolog), E3 ubikvitin ligázou a proteinem MDMX (*Mouse Double Minute 4* homolog), které se váží na transaktivační doménu p53 a zacilují jej tak pro degradaci ubikvitinací. V buňkách vystavených vyšší hladině stresu je interakce mezi MDM2, MDMX a p53 narušena, což umožňuje p53 uplatnit jeho transkripční aktivitu. Ztráta funkce p53 je často nalézána téměř u všech typů lidských nádorových onemocnění (Kruse a Gu, 2009; Pino a Chung, 2010).

Ztráta funkce p53 je pozdní událostí v progresi CRC, s výskytem až v 60 % těchto nádorů. Mutace TP53 je často spojována se CIN nádory, ovšem ne všechny tyto tumory nesou neaktivní p53. Přibližně polovina všech CRC vykazuje vyšší frekvenci mutace TP53

v distální oblasti výskytu CRC, a naopak nižší frekvenci mutací v proximálních nádorech, mikrosatelitově nestabilních nádorech a tumorech definovaných CIMP. Mutace tohoto genu mají zřejmě jen velmi malou nebo dokonce žádnou prognostickou hodnotu pro pacienty s CRC léčené chirurgicky, ale jsou spojovány s horším přežitím pacientů léčených chemoterapií. Předpokládá se, že přítomnost mutace TP53 je prediktivní pro sníženou citlivost rakovinných buněk vůči většině DNA poškozujících chemoterapeutik, například 5-fluorouracilu (Hoff, 2005; Iacopetta, 2003; Sarasqueta a kol., 2013).

2.6.5 Delece 18q

Jak bylo uvedeno výše, pozdější stádia CRC zahrnují delece na chromozomu 18q. Dlouhé rameno chromozomu 18 je nejčastěji deletovanou oblastí u kolorektálního karcinomu. Předpokládá se, že tato delece je molekulární prediktor, který ovlivňuje přežití. Přítomnost delece 18q je spojována s nižším přežitím u CRC, nepotvrzují to však všechny studie. Mnohé studie, hodnotící prognostický význam 18q, nezvažovaly potenciální zkreslující účinek mikrosatelitové nestability či rozsah delece v oblasti 18q (Kirley a kol., 2005; Ogino a kol., 2009; Tanaka a kol., 2006).

S vlivem delece 18q v CRC by mohla souviset přítomnost předpokládaných tumor supresorových genů v daném regionu. Nádorové supresorové geny cílené touto delecí však ještě nebyly definovány. Jako odpovědné supresory v oblasti chromozomu 18q jsou, mimo jiné, zvažovány geny DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*), SMAD2 (*SMAD Family Member 2*) nebo SMAD4 (Khan a kol., 2011; Tanaka a kol., 2006; Woodford-Richens a kol., 2001; Zhang a kol., 2014).

2.6.5.1 SMAD proteiny

SMAD4 (člen rodiny proteinů SMAD) je intracelulární mediátor signálů TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) superrodiny, kde jsou TGF- β , aktivin a BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) aktivačními ligandy regulace buněčného růstu. Členové rodiny TGF- β mohou regulovat proliferaci, diferenciaci, motilitu a smrt buněk. Další funkcí je také zvýšení tvorby extracelulární matrix, podpora angiogeneze a inhibice imunitní funkce. Nejvýznamnější biologickou aktivitou je však silná inhibice růstu buněk, což je umožněno zastavením buněčného cyklu v G1 fázi. SMAD proteiny umožňují transdukovat TGF- β signál z buněčného povrchu do jádra (Isaksson-Mettavainio a kol., 2012; Liu, 2001). SMAD4, společně se SMAD2 a SMAD3 (*SMAD Family Member 3*) mohou snižovat expresi *c-myc*

proto – onkogenu a zvyšovat expresi inhibitorů cyklin – dependentních kináz (CDK), a to p15 (P15 protein) a p21 (*Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1*), což vede k zastavení buněčného cyklu díky TGF- β (Liu, 2001). Mutace v genech SMAD4 a SMAD2 byly identifikovány v CRC, nicméně frekvence výskytu je velmi nízká. V závislosti na statusu SMAD může TGF- β působit buď jako tumorový promotor nebo jako supresor. Ztráta SMAD4 exprese podporuje progresi CRC a souvisí s rezistencí na léčbu 5-fluorouracilem. Pacienti přežívají lépe, jestliže vykazují vysoké hladiny exprese SMAD4 (Miyaki a kol., 1999; Zhang a kol., 2014).

2.6.5.2 Gen DCC

Gen DCC je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 18q21.3 a kóduje skupinu strukturálně podobných transmembránových proteinů, které v jejich extracelulárních doménách obsahují 4 imunoglobuliny a 6 fibronektinů typu III (Fazeli a kol., 1997). DCC transkripty se vyskytují v nízkých koncentracích u téměř všech normálních dospělých tkání, nejvyšších úrovní však dosahují v nervových tkáních (Keino-Masu, 1996). Po dlouhou dobu je DCC zvažován jako gen zodpovědný za nepříznivou prognózu pacientů s delecí 18q (Khan a kol., 2011; Mehlen a Fearon, 2004).

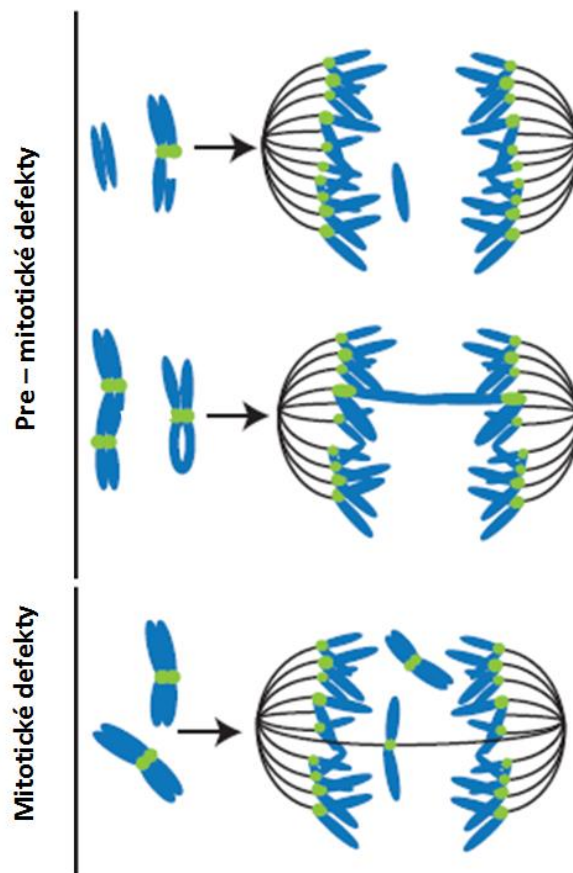
Produkt genu DCC, receptor DCC je tzv. závislý receptor, je tedy aktivní jak v případě navázaného, tak i chybějícího ligandu, avšak po navázání ligandu se typ signálu mění. Ligandem receptoru DCC je netrin-1. Netrin-1 je lamininu příbuzná molekula, která je zapojena do axonového vedení a neuronové migrace, DCC je tedy součástí vývoje nervové soustavy. Jinou možnou funkcí je regulace buněčné životnosti, do které by DCC mohlo být zapojeno ve střevních klících. Pokud je receptor obsazen ligandem, dochází k potlačení proapoptotické aktivity, opačná situace vede k indukci apoptotické dráhy. Produkce netrinu-1 je omezena na spodní část střevní krypty, kde jsou vysoce proliferující buňky a distribuován DCC. Tyto buňky se v průběhu diferenciaci pohybují do distální části klků nebo krypty, kde jsou eliminovány. V tomto konceptu by proliferující buňky krypty, které exprimují DCC v netrin-1 bohatém prostředí, mohly být eventuálně chráněny před buněčnou smrtí. Naopak epitelové buňky, které přestaly proliferovat a pohybují se směrem ke špičce klků, tedy až do prostředí zbaveného netrinu-1, jsou vedeny k apoptotické smrti (Forcet a kol., 2001; Mehlen a Bredesen, 2004; Mehlen a Fearon, 2004; Mehlen a Llambi, 2005).

DCC je substrátem kaspázy, což je hlavní proteáza apoptotické dráhy, a právě toto štěpení je vyžadováno pro uplatnění proapoptotického účinku (Forcet a kol., 2001). Kaspázy

zapojené do apoptózy se dělí na iniciátorové (kaspáza 8 a kaspáza 9) a efektorové (kaspázy 3, 6 a 7). Místo štěpení receptoru DCC, přesněji intracelulární doména, je rozpoznáváno kaspázou 3, neznámá to však, že tato proteáza nutně štěpí DCC (Mehlen a Llambi, 2005). Předpokládá se, že štěpení umožňuje expozici nebo uvolnění proapoptické domény ADD (*Addiction Dependence Domain*). DCC-ADD zřejmě rekrutuje kaspázu – aktivující komplex, jehož dráha se však liší od dráhy receptoru smrti a mitochondriální apoptotické cesty (Mehlen a Guenebeaud, 2010; Mehlen a Llambi, 2005). Při absenci netrinu-1, ADD receptor interaguje s kaspázou 9, což vede k aktivaci kaspázy 3. Tento proces však nezahrnuje uvolnění cytochromu c a tvorbu apoptozomu, jako je tomu u klasické mitochondriální apoptotické dráhy. Schopnost DCC vyvolat apoptózu za podmínek nepřítomnosti netrinu-1 naznačuje, že by se mohlo jednat o možný ochranný mechanismus prevence primárního nádorového bujení, tedy o potenciální tumor supresorový gen (Mehlen a Guenebeaud, 2010).

2.7 CIN a replikační stres

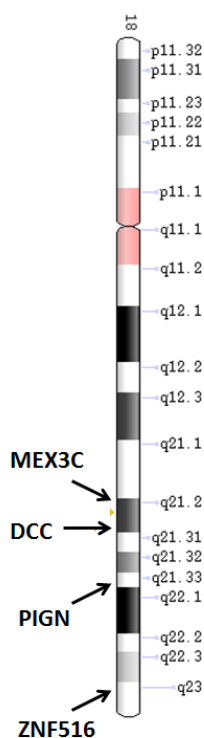
Jak bylo zmíněno výše, chromozomální nestabilita je spojena se zvýšenou mírou změn v počtu a struktuře chromozomů a generuje intratumorovou heterogenitu. Předpokládá se, že za tyto defekty zodpovídají hlavně chyby v mechanismech, které řídí správnou segregaci chromozomů v mitóze (Bakhoun a Compton, 2012; Burrell a kol., 2013). Burrell a kolektiv (2013) však nedávno pozorovali spojitost mezi CIN a replikačním stresem. V této studii zaznamenali, že chyby v segregaci související se zaostávajícími chromozomy s centromerami byly spíše vzácné, což naznačuje, že mitotické dysfunkce vedoucí k chybnému chromozomálnímu zachycení nemohou vysvětlit většinu segregčních chyb v CIN – pozitivních buňkách kolorektálního karcinomu. Naproti tomu, většina chyb v segregaci chromozomů ve sledovaných CIN – pozitivních buňkách CRC sestávala z chromozomových fragmentů bez centromery (acentrických chromozomů) a anafázních můstků (viz obrázek č. 10), což svědčí o strukturních aberacích vzniklých díky pre – mitotickým defektům. Dále také při porovnání CIN – pozitivních a CIN – negativních buněk nepozorovali rozdíly v mitotickém časování, funkci mitotického kontrolního bodu, kohezi sesterských chromatid nebo nadpočetném množství centriol. Tato data odkazují na nízké frekvence mitotických dysfunkcí a pravděpodobnost, že většina chyb v segregaci je výsledkem strukturních aberací chromozomů. V daných buňkách dále zaznamenali aktivaci odpovědi na poškození DNA a ukázali, že replikační stres může vést jak ke strukturní, tak k numerické chromozomální nestabilitě.



Obrázek č. 10: Porovnání pre – mitotických a mitotických defektů buňky. Pre – mitotické defekty zahrnují výskyt acentrických chromozomů (nahore) a anafázních můstků (uprostřed) v průběhu dělení buňky a jsou výsledkem strukturních aberací chromozomů. Mitotické chyby jsou oproti tomu defektem v přichycení mitotického vřeténka na chromozomy a jedná se o zaostávající chromozomy (dole) (Upraveno dle Burrell a kol., 2013).

Burrell a kolektiv (2013) dále pozorovali významnou asociaci delece 18q s aneuploidními buňkami CIN – pozitivních CRC a identifikovali kandidátní CIN – supresorové geny v tomto regionu, a to PIGN (*Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class N*), ZNF516 (*Zinc-finger Protein 516*) a MEX3C (*Mex-3 RNA Binding Family Member C*) (viz obrázek č. 11). Replikační stres, který vznikl po umlčení daných CIN – supresorů, primárně indukoval acentrické chromozomy a anafázní můstky, vedoucí k chybám v segregaci, a to v absenci větších mitotických defektů. Tato studie tedy zdůrazňuje replikační stres jako hlavní příčinu chromozomální nestability u CRC. Díky těmto poznatkům

se lze zaměřit na replikační stres jako na příčinu CIN a intratumorové heterogenity, a nalézt tak cestu k novým možnostem predikce a cílené léčby (Burrell a kol., 2013).



Obrázek č. 11: Ideogram chromozomu 18 – lokalizace genů MEX3C, DCC, PIGN a ZNF516 (Upraveno dle National Library of Medicine (US), 2016).

2.7.1 Gen PIGN

Gen PIGN je lokalizován na chromozomu 18q21.33 a je jedním z více než 20 genů podílejících se na biosyntéze glykofosfatidylinositolové (GPI) kotvy, jejíž funkcí je třídění signálů pro transport GPI – kotvených proteinů v sekrečních a endocytických drahách a umožňuje jejich zakotvení v lipidových raftech buněčných membrán. GPI – kotvené proteiny se účastní přenosu signálu, buněčné adheze a prezentace antigenu. Protein kódovaný genem PIGN je exprimován v endoplazmatickém retikulu a v procesu biosyntézy GPI řídí přidávání fosfoethanolaminu k první manóze v GPI. Mutace genu PIGN a sedmi dalších genů, zapojených do biosyntézy GPI, jsou asociovány s různými neurologickými abnormalitami (GTR; Khayat a kol., 2016; Nakagawa a kol., 2016). Homozygotní mutace v PIGN způsobují dysmorfické rysy, různé vrozené anomálie, opožděný vývoj, hypotonii, epilepsii a progresivní cerebrální atrofii (Ohba a kol., 2014).

2.7.2 Gen ZNF516

ZNF516 je lokalizován na chromozomu 18q23. Obecně se *Zinc finger* proteiny váží na nukleové kyseliny a hrají důležitou roli v různých buněčných funkcích jako je buněčná proliferace, diferenciace a apoptóza (GeneCards; GTR). ZNF516 je zapojen do regulace transkripce. Jedná se o transkripční regulátor, který aktivuje transkripci genů, podporujících diferenciaci hnědé tukové tkáně. Váže se na proximální část promotoru genu UCP1 (*Uncoupling Protein 1*) a aktivuje jeho transkripci, čímž reguluje termogenezi (Dempersmier a kol., 2015). Gen ZNF516 se vzhledem k odlišné metylaci jeho promotoru v normálních buňkách a buňkách rakoviny děložního čípku, jeví jako vhodný biomarker pro detekci tohoto onemocnění (Brebí a kol., 2014). Dále byla prokázána interakce genu ZNF516 s genem RBMS3 (*RNA Binding Motif, Single Stranded Interacting Protein 3*), která ovlivňuje hustotu kostního minerálu, tedy náchylnost k osteoporóze (Yang a kol., 2013).

2.7.3 Gen MEX3C

MEX3C se nachází na chromozomu 18q21.2 a jedná se o RNA – vazebný protein (GTR). Gen kóduje E3 ubikvitin ligázu zodpovědnou za post – transkripční regulaci společných alotypů HLA-A. Váže se na 3' UTR HLA-A2 mRNA a reguluje jeho hladinu podporou degradace (Cano a kol., 2012). Gen MEX3C je také klíčový pro regulaci funkce genu RIG-1 (*Retinoic Acid Inducible Gene-1*), který je jedním ze zprostředkovatelů vrozené antivirové imunitní odpovědi (Kuniyoshi a kol., 2014). Důležitou roli by MEX3C mohl hrát v regulaci energetické bilance, a to ovlivněním centrálního nervového systému (Jiao a kol., 2012). Jiao a kol. (2012) ve své studii uvedli, že i bez inhibice příjmu potravy, mutace MEX3C genu vedla k pozitivním vlivům na metabolismus glukózy a lipidů. Kromě toho, tato mutace zmírňuje jaterní steatózu, spojovanou s nedostatkem leptinu. Tento účinek by mohl souviset s náchylností k hypertenzi, s níž mutantní MEX3C souvisí. I přesto, že mutace MEX3C způsobují zpomalení růstu během vývoje, se tento gen jeví jako možný cíl léčby zaměřené na obezitu (Jiao a kol., 2012).

2.8 Prognostické faktory

Prognóza kolorektálního karcinomu je výrazně závislá na stádiu onemocnění a souvisí s přežitím pacientů. Pro určení prognózy u pacientů s CRC je široce využívaný systém TNM (*Tumor, node, metastases*), stanovující klinické stádium nemoci ovlivňující pacientovo přežití (Li a kol., 2016; Moreno a Sanz-Pamplona, 2015). Stádium I, tedy postižení sliznice a submukózy, vykazuje pětileté přežití přesahující 88 %. U stádia II, kdy dochází k průniku všemi vrstvami střešní stěny, je pětileté přežití pacientů téměř 75 % a u stádia III, kdy přibývá postižení lymfatických uzlin, je pětileté přežití 50 – 60 %. Minimální přežití vykazuje stádium IV, při kterém jsou diagnostikovány vzdálené metastázy (Cunningham a kol., 2010; Deschoolmeester a kol., 2010; Dušek a kol., 2012).

Navzdory mnoha studiím jsou naše poznatky stále nedostatečné (Walther a kol., 2009). Léčba na personalizované bázi zahrnuje simultánní specifickou analýzu klinických a patologických charakteristik a analýzu genetiky pacienta a profilu nádorových biomarkerů. V posledních letech došlo k významnému pokroku v pochopení molekulárních podstaty vzniku CRC a toto nahlédnutí do genetického základu onemocnění umožnilo identifikaci nových prognostických a prediktivních molekulárních markerů, stejně tak jako nové přístupy léčby pacientů (Luo a Xu, 2014; Pino a Chung, 2010; Wilson a Ladner, 2007). Získaná data ukazují, že celkový fenotyp CIN je asociován s méně příznivým výsledkem pacientů v porovnání s pacienty, kteří mají nádory vykazující mikrosatelitovou nestabilitu (Pino a Chung, 2010).

Geny, jako například APC, které mají rozhodující význam pro vývoj kolorektálního karcinomu, jsou pro použití jako klinický biomarker limitované. Naproti tomu, mezi prognostické a prediktivní markery CRC spadají, kromě potvrzených genů KRAS a NRAS, také *DNA mismatch repair* geny, BRAF a oblast chromozomu 18q, které mají značnou potenciální roli v rutinní klinické praxi (Arrington a kol., 2012; George a Kopetz, 2011; Vyzula a kol., 2016). Právě ztráta 18q, která je popisována v různém rozsahu, je jedním z nejslibnějších doposud studovaných markerů, pozorovaných až v 70 % případů karcinomu kolorekta (Popat a Houlston, 2005; Thiagalingam a kol., 1996). Vztah mezi 18q delecí a přežitím u pacientů s CRC je však stále nejasný, nicméně domněnka, že se jedná o určující faktor prognózy je vysoce pravděpodobná právě proto, že je zde mapována řada kandidátních tumor supresorových genů (Popat a Houlston, 2005, Popat a kol., 2007).

2.9 Léčba CRC

Léčba pokročilého kolorektálního karcinomu se v posledních letech výrazně zlepšila a celkové přežití u pacientů s metastazujícím CRC se zvýšilo. V závislosti na stádiu a progresi onemocnění jsou voleny různé léčebné metody. Ve stádiu 0, I a brzkém stádiu II je volbou většinou chirurgický zásah. Pooperační adjuvantní terapie se využívá ve stádiu III a v některých případech i ve stádiu II. Chemoterapie v kombinaci s lékovou terapií, zahrnující 5-fluorouracil a leukovorin, kapecitabin a oxaliplatinu, je typická pro stádium II a u pokročilého onemocnění nastupuje radiační terapie (Mundade a kol., 2014; Vyzula a kol., 2016).

Kurativní onkoterapii karcinomu tlustého střeva lze uplatnit u nádorů, které je možné odstranit spolu s postiženou částí střeva a u blízkých tkání postižených nádorem, zejména v případě lymfatických uzlin. Jsou – li diagnostikovány časně nádory v tlustém střevě či konečniku, je pro jejich odstranění často možné využít endoskopických technik. Hlavním cílem chirurgického zákroku je odstranění veškeré tkáně postižené nádorem a udržení střevní průchodnosti pacientů (Dušek a Hoch, 2012). V případě přítomnosti vzdálených metastáz, a to hlavně v játrech a plicích, je velmi důležité zhodnocení stavu pacienta. Hodnotí se zejména resekabilita metastáz a volbou léčby bývá převážně systémová paliativní chemoterapie, často kombinována s cílenou biologickou léčbou (Vyzula a kol., 2016).

Pokroky v adjuvantní chemoterapeutické léčbě CRC jsou limitovány množstvím dostupných licencovaných léčiv, které jsou používány po mnoho let. Těmito léky jsou oxaliplatinu, 5-fluorouracil, irinotecan a kapecitabin. 5-fluorouracil, který se používá také k léčbě rakoviny prsu, žaludku a slinivky břišní, zůstává základní léčebnou strategií CRC a je široce používán v kombinaci jak s oxaliplatinou a irinotecanem, tak s jinými léčivy, zejména leukovorinem. 5-fluorouracil je antimetabolit, který po konverzi do jeho hlavních aktivních metabolitů indukuje, kromě jiného, poškození RNA a DNA. K tomu dochází inkorporací jeho metabolitů do nukleových kyselin a inhibicí thymidylátsyntázy, tedy i následné syntézy DNA. (Bracht a kol., 2010; Vyzula a kol., 2016). Kapecitabin, což je perorální fluoropyrimidin, který je pomocí thymidinfosforylázy převeden na 5-fluorouracil, by mohl nahradit infuzní 5-fluorouracil v léčbě CRC. K přeměně dochází přednostně v místě nádoru, kde je aktivita thymidinfosforylázy vyšší než v normální tkáni. Studie ukazují, že je kapecitabin minimálně

stejně účinný jako kombinace 5-fluorouracilu s leukovorinem. V roce 2005 byl tento lék schválen ve Spojených státech a Evropě k adjuvantní léčbě CRC ve stádiu III (Carrato, 2008).

Významný pokrok v léčbě byl učiněn díky objevu nových léků, včetně biologicky cílených léčiv. Selektce nejprospěšnějších léčebných přístupů zůstává i nadále velkou výzvou, a to zejména kvůli nedostatku prediktivních a prognostických markerů. Současný standard péče neresekabilního CRC kombinuje cytotoxickou chemoterapii s biologickými látkami. Používanými biologickými činidly jsou monoklonální protilátky proti EGFR – cetuximab a panitumumab a antiangiogenní inhibitory zacilující nádorovou vaskularizaci, namířené proti VEGF a jeho receptorům – bevacizumab. Studia ukázala, že použití cetuximabu s FOLFIRI chemoterapií (FOL – folinová kyselina, F – 5-fluorouracil, IRI – irinotecan) v první linii výrazně zlepšuje rychlost odezvy, přežití bez progresu a celkové přežití pacientů s CRC, jestliže jsou nositeli wild-typu genu KRAS. Cetuximab byl v kombinaci s FOLFIRI schválen v roce 2005. Panitumumab byl v kombinaci s FOLFOX (FOL – folinová kyselina, F – 5-fluorouracil, OX – oxaliplatin) terapií schválen o rok později, vykazuje však nižší vliv na přežití pacientů v porovnání s cetuximabem a FOLFIRI. Jedním z hlavních problémů v klinické aplikaci těchto inhibitorů EGFR je získání rezistence vůči lékům. Rezistence se vyvíjí již během několika měsíců léčby cetuximabem či panitumumabem. S touto rezistencí mohou souviset mutace v KRAS, NRAS, BRAF a dalších genech účastnících se signalizace EGFR, stejně tak jako overexprese ligandů a receptorů EGFR (Seow a kol., 2016). Pro léčbu metastatického CRC je dále chválen bevacizumab v kombinaci se standardní chemoterapií, leukovorinem a irinotecanem. Bevacizumab se váže na VEGF a brání tak jeho vazbě na receptory. VEGF je klíčovým faktorem podporujícím růst nádoru, angiogenezi a tvorbu metastáz. Ve srovnání s použitím samostatné chemoterapie bylo pozorováno výrazné zlepšení v přežití i progresi nádoru. I v tomto případě je účinnost léčby individuální a může být omezena například mutacemi v RAS nebo p53 drahách. Kromě bevacizumabu, se účinně jeví nová antiangiogenní léčiva, například aflibercept a regorafenib, což je perorální inhibitor intracelulárních kináz, účastnících se různých signálních kaskád, zahrnujících VEGFR a RAF kinázy. Několik dalších biologických činidel je momentálně ve fázi klinického vývoje, například ramucirumab a vatalanib (Lambrechts a kol., 2013; Seow a kol., 2016; Vyzula a kol., 2016; Wilson a kol., 2007).

Vývoj cílených terapií na základě nových prediktivních a prognostických biomarkerů zůstává nezbytným pro zlepšení léčby CRC (Luo a Xu, 2014).

3 Cíl práce

Cílem experimentální části diplomové práce bylo připravit kombinované fluorescenčně přímo značené sondy pro gen DCC a geny PIGN, MEX3C a ZNF516, tři nedávno objevené supresorové geny odpovídající za chromozomální nestabilitu. Následně metodou FISH vyšetřit status těchto genů na souboru patientských vzorků kolorektálního karcinomu a získaná data korelovat s klinickými údaji. Ke změnám v počtu kopií genů DCC, PIGN, MEX3C a ZNF516 dochází v souvislosti s rozsahem delece na q-rameni chromozomu 18 (18q). Cílem této pilotní studie bylo ověřit, zda rozsah delece (a tím i ztráta konkrétních tumor supresorových genů) ovlivňuje prognózu či přežití pacientů.

4 Materiál a metody

Metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) byl testován soubor 54 pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem v různých stádiích vývoje. Byly připraveny lokusově specifické sondy pro geny DCC, ZNF516, PIGN a MEX3C. Pro přípravu sond byla z bakterií vyizolována plazmidová DNA, fluorescenčně naznačena a purifikována. Poté byla na chromozomových preparátech ověřena vazebná oblast sondy (specifita sondy). Použitím těchto sond byl sledován rozsah delece chromozomu 18q a následně vyhodnocen vliv rozsahu delece 18q na celkové přežití pacientů s CRC.

4.1 Materiál

4.1.1 Pomůcky a přístrojové vybavení

Při zpracování experimentální části diplomové práce byly použity následující pomůcky a přístroje: rukavice, mikrozskumavky, pipety a špičky Eppendorf, plastové lžičky, navažovací misky, plastové stříčky, odměrné válce, běžné laboratorní sklo, stojánky, plastové falkony, umělohmotné lahve, krycí skla, led, zamrazovací ampule, barvicí nádobky, filtrační papír, buničina, flowbox s horizontálním prouděním vzduchu Thermo Fisher Herasafe, minicentrifuga Minispin Eppendorf, minicentrifuga Hanil R15 Smart15, termoblok Techne DRI – BLOCK DB – 2A, vodní lázeň Julabo TW8, váha Sartorius ED423S – OCE, hybridizační stanice HyBrite Vysis, temperovaná třepačka New Brunswick Scientific, vortex Vortex Genie 2 Scientific Industries, termostat Memmert, pH metr, chlazená centrifuga Schoetter Rotina 420R, Nanophotometer P360 Implen, fluorescenční mikroskop Olympus BX60, objektiv Olympus LWDCPLAN a software Metasystems ISIS.

4.1.2 Chemikálie a roztoky

Pro jednotlivé experimenty byly použity následující chemikálie a roztoky: izopropanol, etanol, 3 mol/l octan sodný, chloramfenikol (Sigma), 10% glycerol (1 ml glycerolu, 1 ml 10x PBS, 8 ml deionizované vody), TE pufr (200 μ l 0,5 mol/l TRIS, 200 μ l 0,05 mol/l EDTA, 9,6 ml deionizované vody), hybridizační pufr (5 ml formamidu, 2 ml 50% dextran sulfátu, 100 μ l 10% SDS, 16,5 μ l 0,05 mol/l TRIS, 250 μ l Salmon sperm, 2 620 μ l deionizované vody), LB médium (20 g média LB, 4,17 g NaCl, 1 l deionizované vody), pepsin (Sigma), thiokyanát sodný (Sigma), dihydrát citrátu sodného (Aldrich), NaCl,

KCl·Na₂HPO₄·12H₂O, KH₂PO₄, formaldehyd, fyziologický roztok, xylen, NP – 40 (Vysis, Downers Grove), HCl a NaOH na úpravu pH roztoků, pufr pro proteázu (fyziologický roztok, pH 2.0), proteáza (25 mg pepsinu, 50 ml pufru pro proteázu), 0,2 mol/l HCl (17 ml HCl doplněno do 1 l deionizovanou vodou), 10x PBS (80 g NaCl, 2 g KCl, 32,1 g Na₂HPO₄·12H₂O, 2 g KH₂PO₄, doplnit do 1 l deionizovanou vodou), 10% pufovaný formalín (4 ml formaldehydu, doplnit do 100 ml PBS), 20x SSC (1,75 g NaCl, 88 g citrátu sodného dihydrátu, doplnit do 1 l deionizovanou vodou, pH 5.3), promývací roztok I (20 ml 20x SSC, 3 ml NP – 40, doplnit do 1 l deionizovanou vodou, pH 7.0 – 7.5), promývací roztok II (100 ml 20x SSC, 1 ml NP – 40, doplnit do 1 l deionizovanou vodou, pH 7.0), oplachovací pufr (100 ml 20x SSC, doplnit do 1 l deionizovanou vodou), roztok na ošetření preparátu před hybridizací (81,07 g 1 mol/l thiokyanátu sodného, doplnit do 1 l deionizovanou vodou), DAPI II (Vysis, Downers Grove), kit Jetfilter Plasmid GIGA Kit (Jetstar), kit BioPrime[®] Purification Module (Invitrogen), kit BioPrime[®] Array CGH Genomic Labeling System (Invitrogen), lepidlo Fixogum a imerzní olej (Olympus).

4.1.3 Soubor pacientů

Pro experiment byly použity histologicky ověřené formalínem fixované, v parafínu zalité (FFPE) tkáňové řezy pacientů s diagnostikovaným CRC v různých stádiích vývoje, které byly poskytnuty Onkologickou klinikou Fakultní nemocnice Olomouc. Jedná se o pilotní soubor pacientů, u kterého bylo úkolem ověřit vliv rozsahu delece 18q na prognózu pacientů. V rámci další práce bude probíhat vyšetření statisticky významnějšího souboru, jak retrospektivních, tak prospektivních vzorků pacientů s CRC.

4.1.4 Bakteriální klony

Pro přípravu FISH sond byly použity bakteriální klony RP-11837D10 (plazmid s inzertem DNA sekvence pro gen MEX3C), RP-11879D16 (plazmid s inzertem DNA sekvence pro gen DCC), RP-11162B22 (plazmid s inzertem DNA sekvence pro gen PIGN) a RP-11684C19 (plazmid s inzertem DNA sekvence pro gen ZNF516), které byly dodány firmou Life Technologies Czech Republic s.r.o. Jako selekční antibiotikum pro dané klony byl použit chloramfenikol. Práce probíhala v souladu s platným Oznámením pro práci s GMO.

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace bakterií a izolace plazmidové DNA

Bakteriální klony, obsahující plazmid s inzertem pro daný gen, byly inokulovány do 1 l LB média s 20 mg selekčního antibiotika chloramfenikolu. Bakterie byly kultivovány na temperované třepačce přes noc ve 37 °C při 220 RCF. Část namnožených bakterií byla použita pro izolaci plazmidové DNA, zbytek byl zamražen pro další použití. Plazmidová DNA byla z bakterií vyizolována pomocí kitu Jetfilter Plasmid GIGA Kit. Namnožené bakterie byly 15 min centrifugovány v chlazené centrifuze při 4 500 RPM a 4 °C, supernatant byl slit a peleta resuspendována ve 125 ml pufru E1 s RNázou. K roztoku bylo přidáno 125 ml lyzačního pufru E2 (kit) a po promíchání a 5 min inkubaci byla lýza zatavena přidáním 50 ml pufru E3 (kit). Roztok byl míchán až do chvíle, kdy byl homogenní. Poté byl nalit na Giga Lysate Filter Cartridge (kit) připevněný na 0,5l láhev, ponechán 5 min na pokojové teplotě a odsát vakuem. Na filtr bylo nanášeno 50 ml promývacího pufru E5 (kit), který byl následně odsát vakuem. Na Giga DNA Binding Cartridge (kit), připevněný na 1 l lahev, bylo nanášeno 200 ml pufru E4 (kit). Ten byl odsát vakuem a vylit. Poté byl nanášen eluát z Giga Lysate Filter Cartridge a odsát vakuem. Ve dvou opakováních bylo nanášeno a vakuově odsáto 275 ml promývacího pufru E5 (kit). Navázaný plazmid byl eluován do čisté láhve s přídavkem 100 ml pufru E6 (kit). K eluátu byl přidán izopropanol (70 % objemu eluátu) a roztok byl 45 min centrifugován při 4 500 RPM a 4 °C. Supernatant byl slit a k peletě bylo přidáno 5 – 7 ml etanolu. Následovala 10min centrifugace, slití supernatantu a vysušení sedimentu. Po vysušení byl sediment rozpuštěn v TE pufru. Koncentrace a čistota plazmidu byly změřeny na Nanophotometru P360 Implen a vzorek byl skladován při -20 °C. Tento postup byl použit pro všechny bakteriální klony, nesoucí plazmidy s inzerty DNA sekvencí pro geny DCC, MEX3C, PIGN a ZNF516.

4.2.2 Zamražování bakterií

Po kultivaci bylo 50 ml média LB media stočeno ve chlazené centrifuze a získaný sediment byl rozsuspendován v 5 ml 10% pufrovaného glycerolu. Výsledná suspenze bakterií byla rozdělena po 1 ml do zmrazovacích ampulí a uskladněna při -80 °C pro další použití. Tento postup byl použit pro všechny bakteriální klony.

4.2.3 Příprava FISH sond

DNA vyizolovaná z namnožených bakterií byla použita pro přípravu FISH sond pomocí kitu BioPrime[®] Array CGH Genomic Labeling System. 500 ng plazmidové DNA bylo doplněno do celkového objemu 21 μ l sterilní vodou. K roztoku bylo přidáno 20 μ l 2,5x random primerů (kit) s následným promícháním na vortexu a krátkým stočením v minicentrifuze. Roztok byl inkubován 5 min ve vodní lázni při 95 °C, 5 min chlazen na ledu a krátce stočen. Poté bylo na ledu přidáno 5 μ l 10x mix dUTP (kit) a 1,5 μ l fluorescenčně značeného dUTP (kit), vše bylo opět promícháno na vortexu a krátce stočeno. Roztok byl doplněn 1 μ l Exo-Klenowova fragmentu DNA (kit), promíchán, stočen a inkubován minimálně 2 hod v termobloku při 37 °C. Následně byl vzorek purifikován pomocí BioPrime[®] Purification Module kitu. Po inkubaci bylo k roztoku přidáno 200 μ l Binding pufu B2 (kit). Po krátkém promíchání a stočení byl vzorek přenesen na purifikační kolonu ve sběrné zkumavce (kit). Ta byla centrifugována 1 min při 13 500 g, filtrát byl odstraněn a na kolonku bylo nanášeno 650 μ l promývacího pufu W1 (kit). Ta byla opět centrifugována nejprve 1 min při 13 500 g, poté 2 min při 13 500 g, za průběžného odstraňování filtrátů. Kolona byla přenesena do sterilní mikrozkuhavky (kit) a bylo na ni nanášeno 55 μ l elučního pufu E1 (kit). Následovala 1 min inkubace na pokojové teplotě a 2 min centrifugace při 13 500 g. K filtrátu bylo přidáno 25 μ l Cot-1 DNA, 7,5 μ l 3 mol/l octanu sodného a 206 μ l 96% etanolu. Vzorek byl po promíchání zchlazen minimálně na 20 min v -20 °C, a poté 15 min centrifugován v chlazené centrifuze při 13 500 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a vzorek ponechán v temnu až do vyschnutí. Stejný postup byl použit pro každý vzorek vyizolované plazmidové DNA. Pelety pro přípravu FISH sond DCC a PIGN byly rozpuštěny v 50 μ l hybridizačního pufu, promíchány, stočeny a inkubovány 10 min při 37 °C. Výsledná sonda DCC (značena zeleně) byla po závěrečné inkubaci kombinována se sondou ZNF516 (značena oranžově) a sonda PIGN (značena zeleně) se sondou MEX3C (značena oranžově). Směsi byly promíchány a znovu inkubovány po dobu 10 min při 37 °C. Sondy byly skladovány v mrazáku při -20 °C. Specifita připravených duálních sond DCC/ZNF516 a PIGN/MEX3C byla ověřena FISH na chromozomových preparátech.

4.2.4 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Již připravené FFPE řezy patientských vzorků na podložních sklech byly inkubovány třikrát po dobu 7 min v xylenu. Poté následovalo dvakrát promytí v 96% etanolu po dobu

5 min a sušení preparátů na vyhřívané plotýnce při 49 °C po dobu 3 – 5 minut. Proces pokračoval 20 min inkubací v 0,2 mol/l HCl, 3 min v deionizované vodě, 3 min v oplachovacím pufru a 20 min v thiokyanátu sodném vyhřátém na 80 °C. Po 1 min chlazení na pokojové teplotě byla skla inkubována 1 min v deionizované vodě a dvakrát po 5 min v oplachovacím pufru. Následovalo natrávení preparátu proteázou. Skla byla na 80 min umístěna do roztoku pepsinu v přehřátém proteázovém pufru. Poté byla dvakrát po 5 min promyta v oplachovacím pufru a 3 – 5 min sušena na vyhřívané plotýnce při 49 °C. Preparáty byly přefixovány ponecháním v 10% pufrovaném formalínu po dobu 10 min. Následovalo dvakrát promytí v oplachovacím pufru po 5 minutách, krátký oplach deionizovanou vodou a 10 min vysušení na plotýnce při 49 °C. Roztok sondy byl nanesen na krycí sklíčko, kterým byl zakryt připravený vzorek na skle podložním. Případnému vysychání sondy bylo zabráněno zalepením obvodu krycího sklíčka rubber cementem (Fixogum). Samotná denaturace/hybridizace probíhala v hybridizační stanici s nastavením programu: 85 °C, 1 min a následně 37 °C přes noc. Poté bylo odstraněno krycí sklíčko a preparát byl umístěn do promývacího roztoku I vyhřátého na 73 °C. Sklíčko bylo 3 – 5 s protřepáváno a poté inkubováno po dobu 1 min 45 s. Následně bylo přeneseno do promývacího roztoku II, opět 3 – 5 s protřepáváno a inkubováno 30 s. Preparáty byly ponechány volnému zasychání v tmavém prostoru po dobu minimálně 30 min. Následně bylo na krycí sklo naneseo barvicí medium DAPI, kterým byl překryt vzorek. Takto připravený preparát byl vyhodnocen na fluorescenčním mikroskopu Olympus BX60.

4.2.5 re-FISH

Vzorky tkání kolorektálního karcinomu jsou často obtížné na odečet pod fluorescenčním mikroskopem a je nutné FISH znovu opakovat (s úpravou hybridizačních či denaturačních podmínek). Zároveň, v některých případech je k dispozici pouze málo biologického materiálu. Z tohoto důvodu byla na pracovišti zavedena metoda re-FISH. Jedná se o odmytí stávající a opětovné nanesení (stejně či jiné) sondy na již použitý preparát.

Vzorky tkání byly ponechány v 96% etanolu po dobu 3 min. Poté byla odstraněna krycí sklíčka a podložní skla se vzorky byla opět ponořena do 96% etanolu na dobu 3 min. Preparáty byly na dobu 5 min přeneseny do roztoku formamidu (24,5 ml formamidu, 3,5 ml 20x SSC, 7 ml deionizované vody, pH 7.0 – 7.8), který byl přehřátý na 73 °C. Následovala inkubace v 75% etanolu, 80% etanolu a 96% etanolu, vždy po 1 minutě. Po vysušení skel na

plotýnce při 49 °C následovalo nanesení fluorescenčně značených sond, denaturace, hybridizace a následné promytí, dle protokolu FISH.

5 Výsledky

5.1 Příprava sond pro FISH

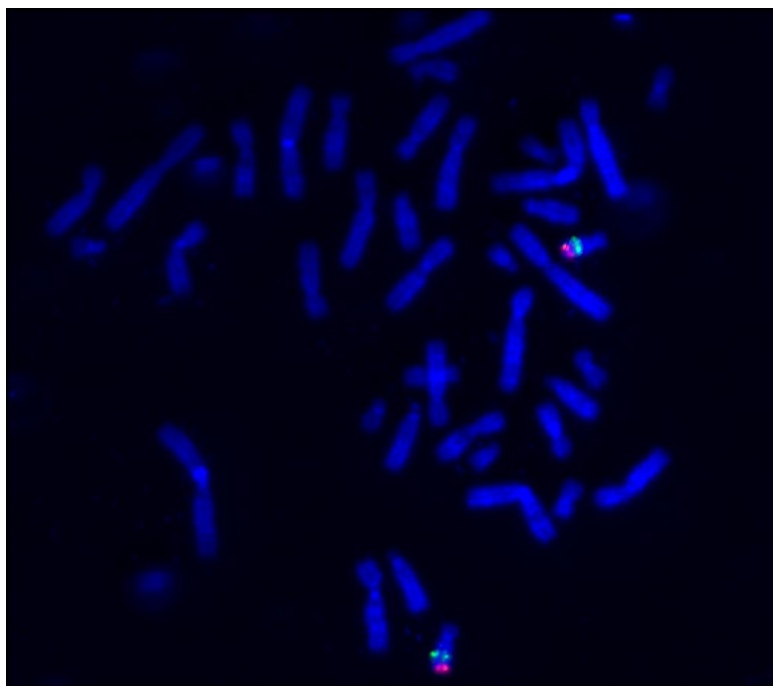
Bakteriální klony, obsahující plazmid s daným inzertem, potřebné pro přípravu DNA sond, byly inokulovány do média se selekčním antibiotikem a kultivovány na temperované třepačce. Z bakterií byla vyizolována plazmidová DNA a výsledná koncentrace jednotlivých plazmidů byla měřena na nanophotometru (viz tabulka č. I).

Tabulka č. I: Koncentrace vyizolované plazmidové DNA z daných bakteriálních klonů

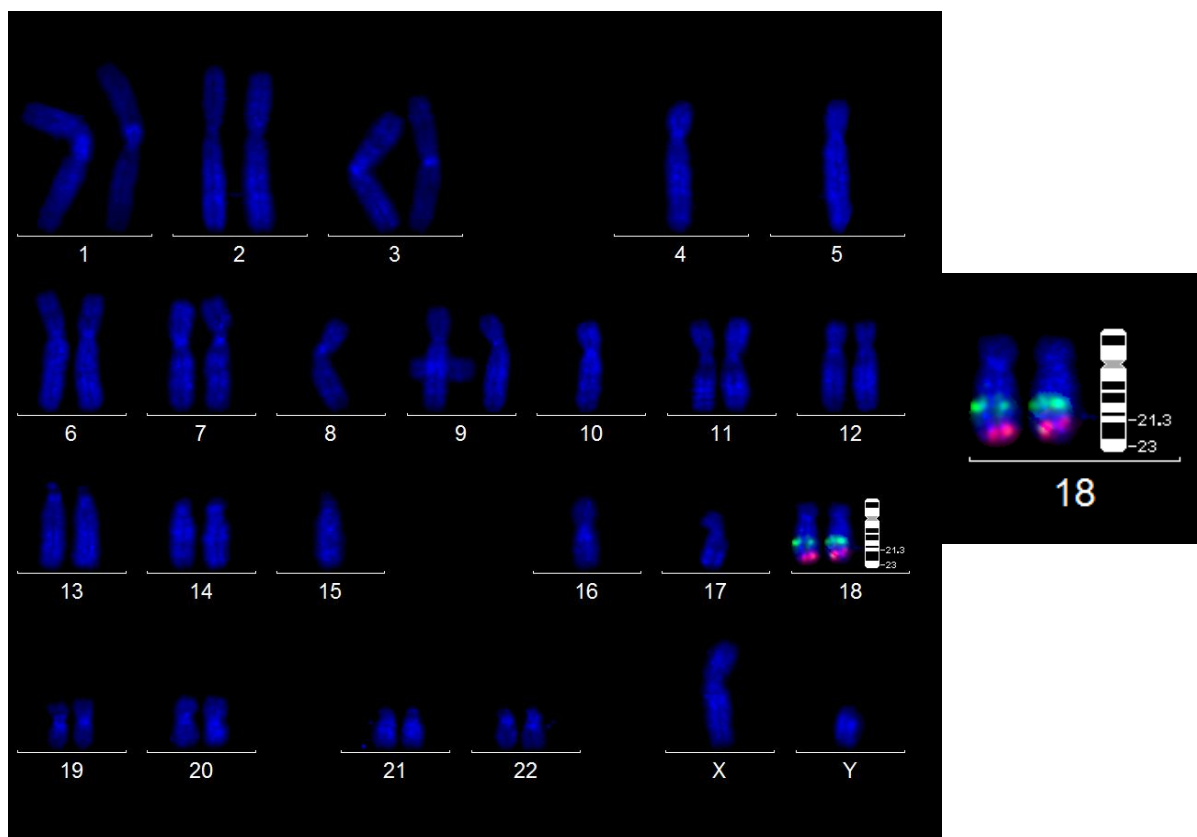
Sonda pro gen	Bakteriální klon	Výsledná koncentrace plazmidové DNA
MEX3C	RP-11837D10	200 ng/μl
DCC	RP-11879D16	184 ng/μl
PIGN	RP-11162B22	240 ng/μl
ZNF516	RP-11684C19	168 ng/μl

Vyizolovaná DNA byla následně použita pro přípravu lokusově specifických sond pomocí metody Random Primer Labeling s využitím kitu BioPrime[®] Array CGH Genome Labeling System. SONDY pro geny ZNF516 a MEX3C byly naznačeny pomocí fluorescenčně značeného dUTP (SpectrumOrange) a sondy pro geny DCC a PIGN pomocí dUTP (SpectrumGreen). Po přečistění byla vytvořena jedna duální sonda pro detekci genů DCC a ZNF516 a druhá ke sledování genů PIGN a MEX3C. Specifita sond byla testována na chromozomových preparátech.

Připravené chromozomové preparáty byly po hybridizaci s FISH sondami snímány s využitím CCD kamery a programu ISIS. V případě duální sondy DCC/ZNF516 lze pozorovat vysokou specifitu, neboť se na snímku nevyskytuje žádný signál z jiných oblastí chromozomů, kde by proběhla hybridizace se sondou (viz obrázek č. 12). Po identifikaci chromozomů se potvrdila vazebná oblast sondy DCC na lokusu 18q21.3, což odpovídá lokalizaci genu DCC a vazebná oblast sondy ZNF516 na lokusu 18q23, tedy místu lokalizace genu ZNF516 (viz obrázek č. 13).

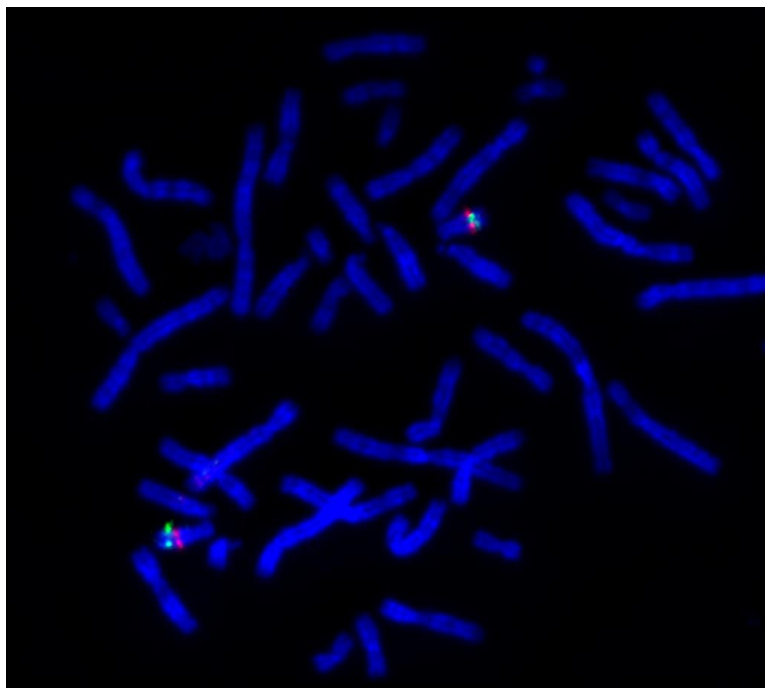


Obrázek č. 12: Ověření specifity duální sondy DCC (zelená)/ZNF516 (oranžová) na chromozomových preparátech fluorescenční *in situ* hybridizací

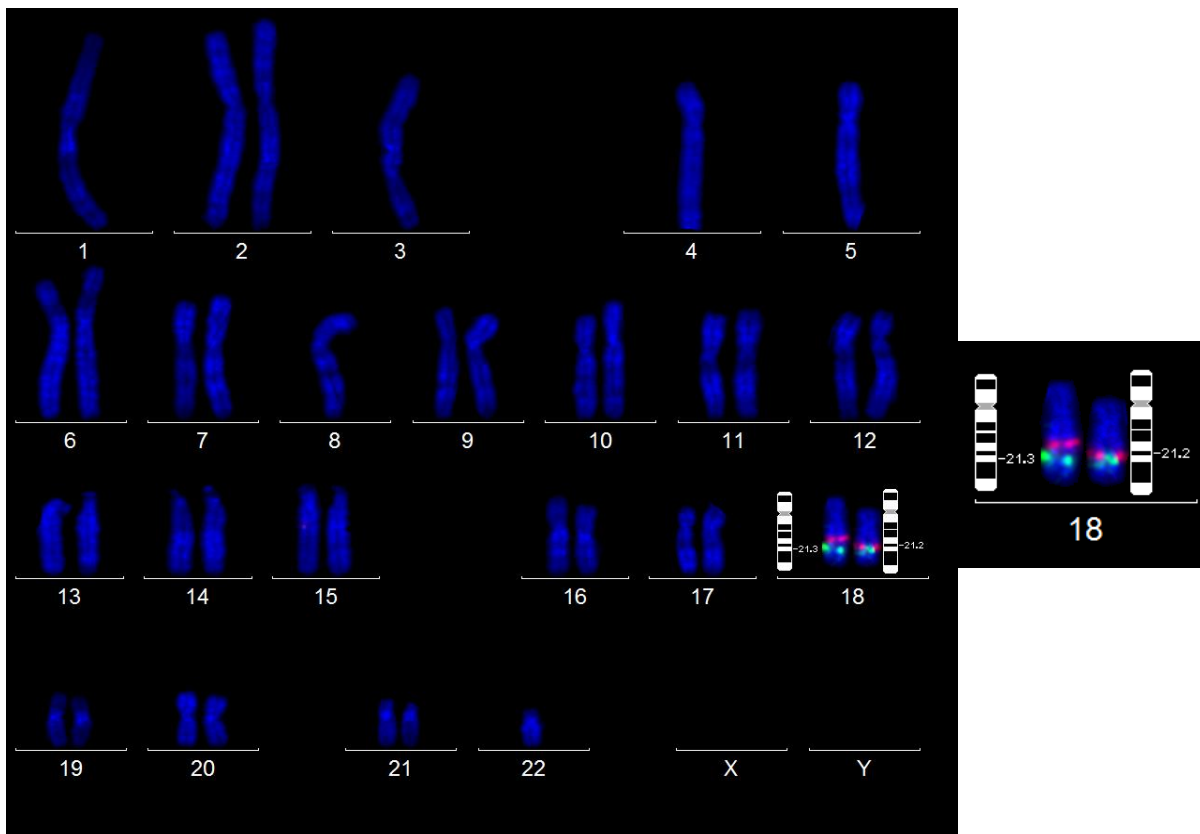


Obrázek č. 13: Ověření vazebné oblasti duální sondy DCC (zelená)/ZNF516 (oranžová) v místě lokalizace genů DCC a ZNF516 fluorescenční *in situ* hybridizací

Vysoká specifita hybridizace byla potvrzena i v případě duální sondy PIGN/MEX3C, kde také nejsou pozorovány žádné nežádoucí signály (viz obrázek č. 14). Potvrdila se i vazebná oblast sondy PIGN na lokusu 18q21.3, odpovídající genu PIGN a sondy MEX3C na lokusu 18q21.2, kde se nachází gen MEX3C (viz obrázek č. 15).



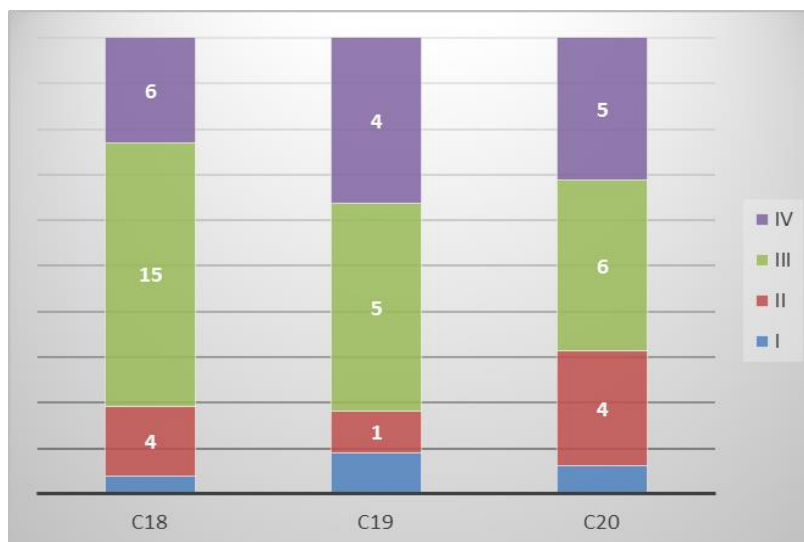
Obrázek č. 14: Ověření specifity duální sondy PIGN (zelená)/MEX3C (oranžová) na chromozomových preparátech fluorescenční *in situ* hybridizací



Obrázek č. 15: Ověření vazebné oblasti duální sondy PIGN (zelená)/MEX3C (oranžová) v místě lokalizace genů PIGN a MEX3C fluorescenční *in situ* hybridizací

5.2 Analýza aberací u patientských vzorků CRC

Pro tuto práci bylo vybráno 54 pacientů s diagnózou kolorektálního karcinomu. Jednalo se o 31 (57 %) mužů a 23 (43 %) žen v průměrném věku 67 let. 42 pacientů z daného souboru podstoupilo chemoterapii, z toho 4 v kombinaci s avastinem. 37 pacientů bylo vyšetřeno na přítomnost mutace KRAS. U 17 byla potvrzena mutace genu KRAS a u 20 pacientů se vyskytoval wild-type genu KRAS. Pacienti v testovaném souboru se nacházeli v různých stádiích nemoci, s rozlišnou lokalizací CRC (viz graf č. 1). Lokalizace C18 odpovídá zhoubnému novotvaru tlustého střeva, C19 zhoubnému novotvaru rektosigmoideálního spojení a C20 zhoubnému novotvaru konečníku – rekta (ÚZIS ČR).



Graf číslo 1: Rozdělení souboru pacientů dle stádia a lokalizace CRC

Vzorky pacientů byly analyzovány metodou FISH, za použití sond připravených pro detekci genů DCC, ZNF516, MEX3C a PIGN. U jednotlivých vzorků bylo hodnoceno vždy nejméně 50 jader, a to prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu Olympus BX60. Cytogenetické abnormality byly hodnoceny výpočtem průměrného počtu signálů v jádře. Za delecí byla považována hodnota $<1,8$ (viz tabulka č. II).

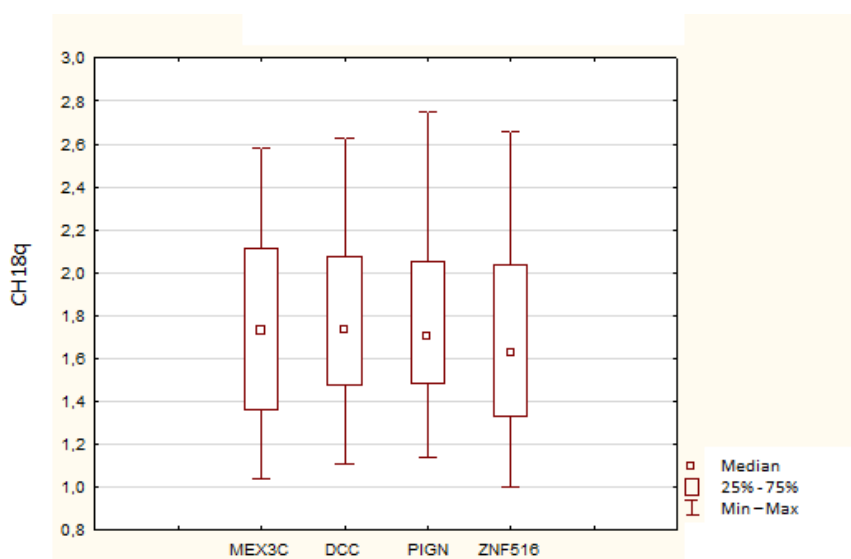
Tabulka číslo II: Vyhodnocení statusu genů MEX3C, DCC, PIGN a ZNF516 u patientských vzorků kolorektálního karcinomu

Číslo pacienta	MEX3C (průměrný počet kopií)	DCC (průměrný počet kopií)	PIGN (průměrný počet kopií)	ZNF516 (průměrný počet kopií)
8627	1,82	2,04	1,92	2,04
8611	2,36	2,03	2,36	2,04
7647	2,125	2,02	2,125	2,02
7009	2,25	2,15	2,08	2,13
8993	1,596	1,686	1,617	1,65
6839a	2	1,924	1,875	1,5283
6276	2,196	2,159	2,098	1,95
4389	2,09	2,143	2,09	1,86
6161	1,98	2,078	1,92	2,06
7291	1,667	2,295	1,84	1,977
6562	1,859	1,68	1,436	1,397
7688	2,18	2,5	2	2,25
7667	1,915	1,94	1,489	1,33
8746a	1,302	1,989	2,166	1,479

Číslo pacienta	MEX3C (průměrný počet kopií)	DCC (průměrný počet kopií)	PIGN (průměrný počet kopií)	ZNF516 (průměrný počet kopií)
7008a	2,58	2,057	2,75	2,075
8317	1,7	2,032	2,18	1,709
7561	2,37	2,098	1,608	1,53
7853	1,787	1,161	2,36	2,118
8748	2,16	2,204	1,323	1,688
5249	2,08	2,08	2,051	2,08
7790	2,19	1,247	2,01	1,071
7947	2,11	2,01	2,11	2,04
8558	2,437	2,626	2,747	2,637
6900	1,758	1,68	1,747	1,637
4576	2,06	2,022	2,01	2,054
6005	1,04	2,277	1,606	2,33
8822	2,48	2,489	2,217	2,655
7643a	2,2	1,592	2,04	1,592
7019	1,604	1,612	1,604	1,612
5707	1,968	2,077	2	1,798
8843	1,647	1,585	1,647	1,15
7899	2	1,745	2	1,745
8793	1,66	1,89	1,598	1,78
8900	1,578	1,72	1,578	1,72
6164	1,674	1,561	1,652	1
8832	2,11	2,22	2,11	2,22
6553	1,316	1,49	1,737	1,196
7933	1,574	1,881	1,486	1,373
9050	1,14	1,438	1,263	1,167
4608	1,362	1,306	1,345	1,122
7412	1,377	1,329	1,377	1,235
5992	1,537	1,618	1,5	1,273
4984	1,102	1,23	1,237	1,269
8175	1,164	1,725	1,382	1,647
7776	1,5	1,404	1,666	1,365
5990	1,333	1,42	1,614	1,26
8191	1,309	1,22	1,345	1,296
7579	1,327	1,304	1,473	1,357
5963	1,32	1,529	1,528	1,569
8873a	1,362	1,48	1,414	1,442
7913	1,283	1,377	1,358	1,472
8534	1,053	1,208	1,14	1,094
6082	1,385	1,108	1,519	1,077

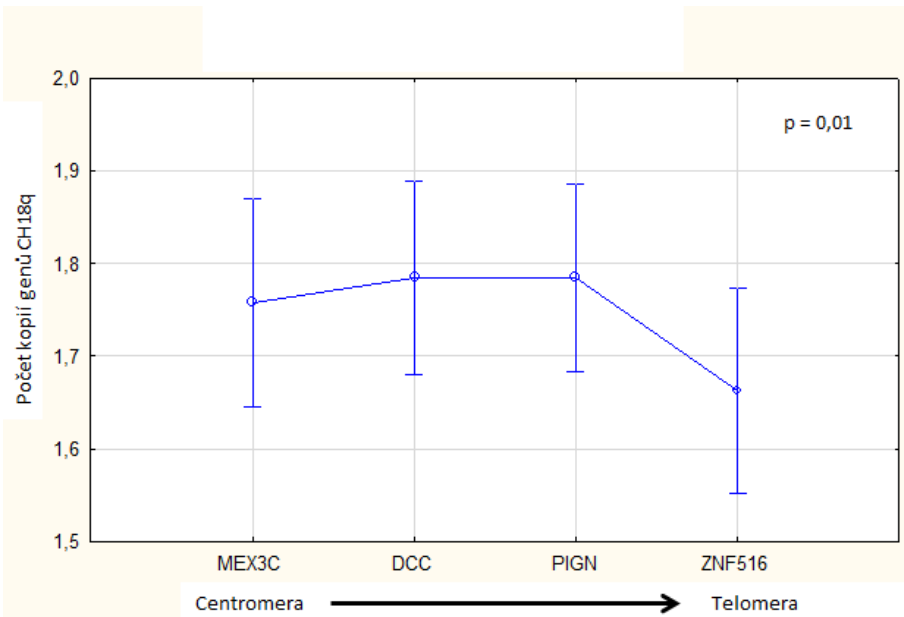
Číslo pacienta	MEX3C (průměrný počet kopií)	DCC (průměrný počet kopií)	PIGN (průměrný počet kopií)	ZNF516 (průměrný počet kopií)
7909	1,962	1,673	2,019	1,618

Uvedené hodnoty patientských vzorků byly statisticky zpracovány. Výsledný průměr počtu kopií genu MEX3C byl $1,75 \pm 0,43$, genu DCC $1,79 \pm 0,38$, genu PIGN $1,78 \pm 0,37$ a $1,66 \pm 0,41$ v případě genu ZNF516 (viz graf č. 2). Vzhledem k tomu, že medián počtu kopií sledovaných genů byl ve všech případech $< 1,8$, delece každého z genů byla častou událostí ve vzorcích kolorektálního karcinomu.



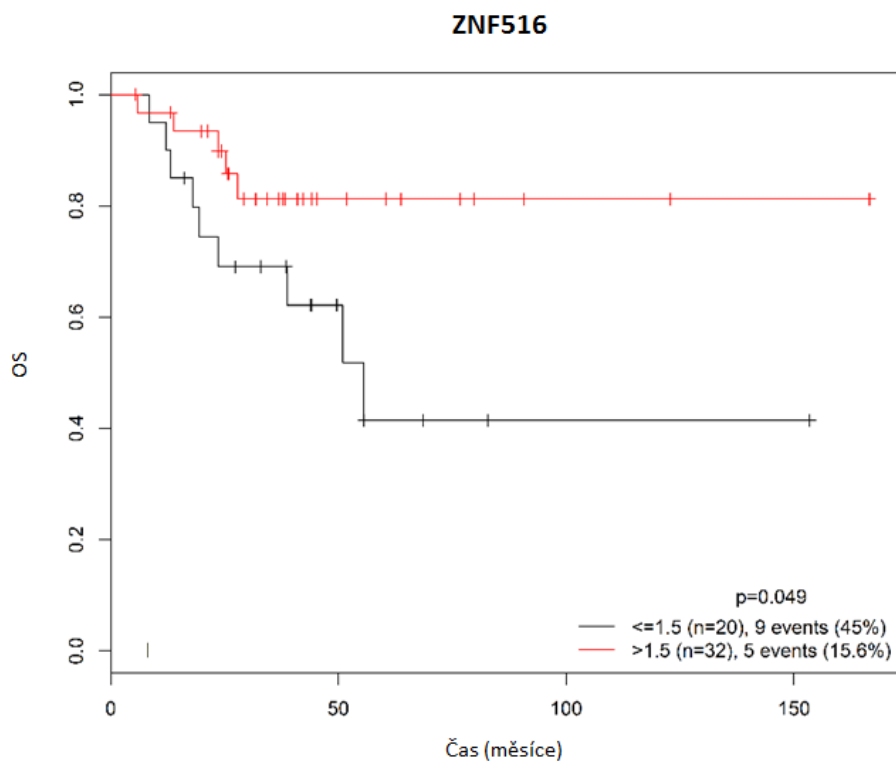
Graf číslo 2: Medián počtu kopií genů MEX3C, DCC, PIGN a ZNF516 na chromozomu 18q u patientských vzorků

Dále byl neparametrickým testem ANOVA pro opakovaná měření statisticky vyhodnocen rozsah delece v oblasti chromozomu 18q. Sledované geny jsou na chromozomu 18q umístěny v pořadí MEX3C, DCC, PIGN a ZNF516 ve směru od centromery k telomeře (viz obr. 10). Lze však pozorovat, že průměrné hodnoty počtu kopií genů směrem k telomeře klesají ($p=0,01$), zejména v případě genu ZNF516 se jednalo o významný posun delece (viz graf č. 3). Hodnota hladiny statistické významnosti byla 1 %.



Graf číslo 3: Rozsah delecí genů MEX3C, DCC, PIGN a ZNF516 na chromozomu 18q

Rovněž byl u souboru pacientů sledován medián přežití. I přes nízký počet vyšetřených pacientů, byl nalezen trend mezi delecí ZNF516 a přežitím pacientů. Význam ZNF516 pro celkové přežití, který je nezávislý na pohlaví, přítomnosti metastáz, stádiu tumoru i terapii, se jeví jako trend ($p=0,049$) na 10% hladině významnosti. Statistické výsledky ukazují, že pacienti s hodnotami počtu kopií genu ZNF516 $>1,5$ přežívají déle (viz graf č. 4). Gen ZNF516 se tedy jeví jako důležitý faktor celkového přežití pacientů, pro kvalitní zhodnocení tohoto parametru je však potřebné prošetřit větší soubor pacientů.



Graf číslo 4: Závislost celkového přežití na statusu genu ZNF516 u pacientů s kolorektálním karcinomem, OS = doba od diagnózy do úmrtí nebo poslední kontroly

6 Diskuze

Cílem praktické části diplomové práce bylo zjistit status genů DCC, MEX3C, PIGN a ZNF516 u pacientů s kolorektálním karcinomem, a to zejména se zaměřením na rozsah delece 18q a závislost celkového přežití pacientů. 18q je nejčastěji deletovanou oblastí CRC a je považován za negativní prognostický faktor tohoto onemocnění. Ne všechny studie ale potvrzují spojitost mezi delecí 18q a kratším přežitím pacientů (Popat a kol., 2007). V mnohých studiích nebyl zvažován podíl mikrosatelitové nestability (Ogino a kol., 2009) a rozsah delece chromozomu 18q, které mohli výrazně zkreslit výsledky celkového přežití pacientů, proto se práce na rozsah delece 18q zaměřila. S vlivem delece 18q v CRC může souviset přítomnost tumor supresorových genů, které však ještě nebyly identifikovány. Za potenciálně odpovědný tumor supresorový gen je po delší dobu považován DCC (Popat a kol., 2007). Jak bylo zmíněno v kapitole 5, Burrell a kolektiv (2013) identifikovali tři nové CIN – supresorové geny ZNF516, PIGN a MEX3C v oblasti dlouhého ramene chromozomu 18, které by mohly být zodpovědné za vznik strukturních a numerických chromozomálních aberací. Tímto navrhli další potenciální tumor supresorové geny, které by právě u CRC mohly zodpovídat za negativní prognostický význam delece 18q. Přesný mechanismus u CRC však ještě není znám a jejich podíl na prognóze pacientů je potřeba stanovit.

Problémem při vyšetřování FFPE vzorků bývá často nedostatek materiálu. Bohužel, na komerčním trhu dosud neexistují kombinované DNA FISH sondy pro geny DCC, ZNF516, PIGN a MEX3C, které by umožnily racionalizovat spotřebu biologického materiálu. Z tohoto důvodu jsme izolací bakteriálních plazmidů s inzertem a následným fluorescenčním značením (SpectrumOrange a SpectrumGreen) připravili duální DNA lokusově specifické sondy LSI DCC/ZNF516 a LSI PIGN/MEX3C. Na chromozomových preparátech byla verifikována vysoká specifita vazby v jejich očekávaných vazebných oblastech. Nebyly pozorovány žádné nespecifické signály, nedošlo tedy ke zkřížené hybridizaci. Zároveň, kvalita sond byla ověřena na FFPE vzorcích, které patří mezi nejobtížněji hybridizovatelný materiál. Takto připravené kity byly použity nejen pro vyšetření našeho souboru pacientů s CRC, ale operační postup výroby byl zároveň poskytnut pro jejich komercializaci.

Metodou FISH s použitím fluorescenčně značených sond byl vyšetřen soubor 54 pacientů s diagnózou kolorektálního karcinomu v různém stádiu nemoci. Pacienti se nacházeli

v průměrném věku 67 let a byli testováni na cytogenetické abnormality chromozomu 18q, respektive status genů DCC, ZNF516, PIGN a MEX3C, a celkové přežití s tím spojené.

Cytogenetické abnormality byly hodnoceny stanovením průměrného počtu kopií genů v jádře. Pro statistické vyhodnocení byl jako spojitá proměnná uvažován průměrný počet kopií jednotlivých genů v jádře u každého pacienta, tak zároveň jako kategoriální proměnná přítomnost/nepřítomnost delece genu. Za delecí byla považována hodnota $<1,8$. Statistická analýza dat byla zpracována softwarem STATISTICA, verze 12. Medián počtu kopií genů DCC, ZNF516, MEX3C a PIGN v jádře byl ve všech případech nižší než $<1,8$. V patientských vzorcích CRC docházelo k častým událostem delece všech sledovaných genů. Tímto byl potvrzen nejen frekventovaný výskyt delece chromozomu 18q v kolorektálním karcinomu, a s tím spojovaná delece genu DCC (Popat a kol., 2007), ale také častá delece CIN – supresorových genů v CRC (Burrell a kol., 2013). Gen MEX3C je lokalizován v lokusu 18q21.2, zatímco gen ZNF516 v telomerické oblasti 18q23 (GTR). Výsledky poukazují na to, že delece 18q v CRC zahrnují poměrně velkou část chromozomu. Pro bližší zhodnocení rozsahu delece 18q by bylo dobré zahrnout do testování geny lokalizované ještě blíže centroměře, například potenciální tumor supresorový gen SMAD4 (Tanaka a kol., 2006). Pro zhodnocení rozsahu delece 18q byl použit neparametrický test ANOVA pro opakovaná měření. Sledované geny jsou na chromozomu umístěny v pořadí MEX3C, DCC, PIGN a ZNF516 ve směru od centromery k telomeře. Výsledky značí, že průměrné počty kopií genů směrem k telomeře klesají ($p=0,01$). Tato data ukazují, že se delece chromozomu 18q nachází u CRC v různém rozsahu. Mohlo by se tedy jednat o možný mechanismus přispívající ke vzniku a vývoji kolorektálního karcinomu. Studie, zvažující význam delece 18q pro prognózu pacienta pak mohou být nekonzistentní právě z důvodu toho, že se nezaobírají rozsahem delece (Ogino a kol., 2009; Popat a kol., 2007; Tanaka a kol., 2006; Tanaka a kol., 2009). Potvrzení této myšlenky by mohlo znamenat nový pohled na léčbu nemoci.

Gen DCC je deletován ve zhruba 70 % nádorů tlustého střeva a konečníku. Již před 20 lety byl navržen jako tumor supresorový gen. I přes studie podporující roli DCC v CRC, jsou údaje nekonzistentní a prognostický význam DCC nebyl nikdy spolehlivě prokázán (Mehlen a Fearon, 2004, Popat a kol., 2007). Popat a Houlston (2005) hodnotili sedmáct studií vybraných dle přísných kritérií, která poskytují vhodná data pro meta – analýzu. V některých studiích je podpořen názor, že 18q delece/ztráta exprese DCC předpovídá kratší přežití

pacientů ve stádiu II/III. Špatná prognóza spojená s 18q fenotypem byla vyhodnocena jak ve studiích hodnotících DCC přímo či genotypizací zahrnující mikrosatelity, tak v těch, kde byly markery mapovány na genomové oblasti bez DCC. Tato data ukazují, že špatná prognóza nemusela být zcela zapříčiněná genem DCC, nicméně stále se jedná jen o malý počet realizovaných studií. Problémem ve vyslovení závěru zůstává heterogenita mezi studii. Přehled údajů naznačuje, že genomová oblast kolem a včetně DCC hraje významnou roli v prognóze CRC, avšak úloha samotného DCC v karcinogenezi může být poměrně malá. Významnost delece v oblasti 18q tak může být ve skutečnosti dána ztrátou jiného, přidruženého genu, prostřednictvím společné genomické ztráty (Popat a Houlston, 2005). Při hodnocení rozsahu delece byl zaznamenán významný počet delecí ($p=0,01$) genu ZNF516 (při hladině statistické významnosti 1 %). Vysoká úroveň delece ZNF516 pozorovaná u testovaných patientských vzorků CRC tak naznačuje, že by právě tento gen mohl determinovat delecii DCC, případně i ostatních genů zahrnutých v pozorování.

U testovaných pacientů s CRC byl sledován medián přežití. Testovaný soubor pacientů byl poměrně malý (jedná se o pilotní studii), ale i přesto byl nalezen trend ($p=0,049$) mezi delecí genu ZNF516 a celkovým přežitím pacientů, s 10% hladinou významnosti. Výsledky ukazují, že pacienti s hodnotami počtu kopií genů $>1,5$ přežívají lépe. Celkové přežití pacientů bylo vyhodnoceno nezávisle na pohlaví, přítomnosti metastáz, stádiu tumoru či terapii. Tímto se vymeziло hodnocení celkového přežití hlavně na rozsah delece 18q. Z předběžných výsledků se status genu ZNF516 jeví jako významný faktor přežití a jeho delece vede ke statisticky významnému zkrácení přežití pacientů s nádorem tlustého střeva a konečníku. Mohlo by se tedy jednat o vhodný marker pro prognózu onemocnění CRC. Na druhou stranu, ve zhodnocení přežití pacientů nebyl zohledněn možný vliv mikrosatelitové nestability, jejíž přítomnost v CRC je spojována s lepšími prognostickými výsledky (Ogino a kol., 2009). Pro potvrzení významu ZNF516 v CRC plánujeme prošetřit větší kohortu pacientů a zahrnout možný vliv mikrosatelitové nestability na celkové přežití. Nicméně, *Zinc finger* proteiny se obecně účastní buněčných dějů jako je proliferace, diferenciacie a apoptóza (GeneCards) a konkrétně ZNF516 je transkripční regulátor zapojený do diferenciacie hnědé tukové tkáně (Dempersmier a kol., 2015). Ačkoli se jedná o poměrně nedávno objevený gen a jeho mechanismus v CRC není znám (Burrell a kol., 2013), právě prostřednictvím této své aktivity by v jiných drahách mohl působit jako tumor supresorový gen. Další studie poukazuje na odlišnou metylaci promotoru ZNF516 v normálních buňkách v porovnání s buňkami rakoviny děložního čípku. Odlišný stav metylace promotoru jej představuje rovněž jako

vhodný marker pro detekci rakoviny děložního čípku (Brebi a kol., 2014). Tato studie přispívá k názoru, že by gen ZNF516 opravdu mohl být tumor supresorovým genem, a tím podporuje i jeho možnou úlohu v CRC.

7 Závěr

Delece chromozomu 18q je častou událostí v kolorektálním karcinomu a zůstává po dlouhou dobu velmi atraktivním tématem pro výzkum v rámci mechanismu vzniku tohoto onemocnění. Vliv delece 18q na prognózu pacientů s diagnózou rakoviny tlustého střeva a konečníku je však stále předmětem diskuzí. Doposud nebyl jednoznačně prokázán tumor supresorový gen, který by se v této oblasti nacházel a byl zodpovědný za negativní vliv delece na prognózu. Práce se zaměřila na prověření statusu potenciálních tumor supresorových genů DCC, MEX3C, PIGN a ZNF516 lokalizovaných v oblasti 18q u pacientů s kolorektálním karcinomem. Výsledky experimentu naznačují, že delece chromozomu 18q zahrnuje poměrně velkou část chromozomu a u pacientů ji nalézáme v různém rozsahu. Rozsah delece 18q (tj. zahrnutí všech či jen některých ze sledovaných genů) by mohl hrát důležitou roli v prognóze pacientů s CRC či posloužit při hledání potenciálního terapeutického cíle.

V rámci vyšetřování rozsahu delece chromozomu 18q u vzorků kolorektálního karcinomu docházelo ke ztrátám všech sledovaných genů. Nejčastěji byla zaznamenána delece genu ZNF516. Navíc, i přes malý soubor vyšetřených pacientů, byl nalezen trend mezi delecí ZNF516 a celkovým přežitím pacientů. Dle předběžných výsledků se gen ZNF516 jeví jako důležitý prognostický faktor nemoci a jeho delece vede ke statisticky významnému zkrácení přežití pacientů. Tyto závěry plánujeme ověřit na větší kohortě retrospektivně i prospektivně získaných pacientů, a pokud by se potvrdily, bylo by přínosné zařadit vyšetření genu ZNF516 do rutinní diagnostiky.

8 Literatura

Al-Sohaily, S., Biankin, A., Leong, R., Kohonen-Corish, M., Warusavitarne, J. (2012): Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 27(9), 1423-1431.

American Cancer Society (2014): *Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016*. Atlanta: American Cancer Society.

Aoki, K., Taketo, M. M. (2007): Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of cell science*, 120(19), 3327-3335.

Arrington, A. K., Heinrich, E. L., Lee, W., Duldulao, M., Patel, S., Sanchez, J., Garcia-Aguilar, J., Kim, J. (2012): Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*, 13(10), 12153-12168.

Arvelo, F., Sojo, F., & Cotte, C. (2015). *Biology of colorectal cancer*. *ecancermedicalscience*, 9.

Bakhoun, S. F., & Compton, D. A. (2012): Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential. *The Journal of clinical investigation*, 122(4), 1138-1143.

Ballester, V., Rashtak, S., Boardman, L. (2016): Clinical and molecular features of young-onset colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, 22(5), 1736.

Bracht, K., Nicholls, A. M., Liu, Y., Bodmer, W. F. (2010): 5-Fluorouracil response in a large panel of colorectal cancer cell lines is associated with mismatch repair deficiency. *British journal of cancer*, 103(3), 340-346.

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-Istura, 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(2), 308-317.

Brink, M., de Goeij, A. F., Weijnenberg, M. P., Roemen, G. M., Lentjes, M. H., Pachen, M. M., Smits, K.M., de Bruïne, A.P., Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A. (2003): K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis*, 24(4), 703-710.

Brooke, H. L., Talbäck, M., Martling, A., Feychting, M., Ljung, R. (2016): Socioeconomic position and incidence of colorectal cancer in the Swedish population. *Cancer epidemiology*, 40, 188-195.

- Buecher, B., Cacheux, W., Rouleau, E., Dieumegard, B., Mitry, E., Lièvre, A. (2013): Role of microsatellite instability in the management of colorectal cancers. *Digestive and Liver Disease*, 45(6), 441-449.
- Bujanda, L., Cosme, A., Gil, I., Arenas-Mirave, J. I. (2010): Malignant colorectal polyps. *World J Gastroenterol*, 16(25), 3103-3111.
- 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(7438), 492-496.
- Burt, R. (2008): Inheritance of colorectal cancer. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 4(4), 293-300.
- Butterworth, A. S., Higgins, J. P., Pharoah, P. (2006): Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *European journal of cancer*, 42(2), 216-227.
- 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(17), 3596-3606.
- Carrato, A. (2008): Adjuvant treatment of colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*, 2(4 Suppl), S42-S46.
- Center, M. M., Jemal, A., & Ward, E. (2009): International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(6), 1688-1694.
- 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(8), 16365-16385.
- Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H.J., Lynch, H.T., Minsky, B., Nordlinger, B., Starling, N. (2010): Colorectal cancer. *Lancet*, 375:1030–1047
- Deschoolmeester, V., Baay, M., Specenier, P., Lardon, F., Vermorken, J. B. (2010): A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy. *The oncologist*, 15(7), 699-731.
- Dempersmier, J., Sambeat, A., Gulyaeva, O., Paul, S. M., Hudak, C. 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(2), 235-246.
- Dušek, L., Hoch, J. (2012): Epidemiologie, prevence a léčba kolorektálního karcinomu dle dostupných českých a mezinárodních dat. *Fakultní nemocnice v Motole*.

Dušek, L., Pavlík, T., Májek, O., Mužík, J., Vyzula, R. (2012): Epidemiologie, prevence a léčba kolorektálního karcinomu dle dostupných českých a mezinárodních dat. Fakultní nemocnice v Motole.

Dušek, L., Mužík, J., Kubásek M., Koptíková, J., Žaloudík, J., Vyzula, R. (2005): Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [cit. 2016-4-25]. Dostupné z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.

Fazeli, A., Dickinson, S. L., Hermistonf, M. L., Tigne, R. V., Steen, I., Rayburnf, H. (1997): Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. PROBE, 1(1).

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

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. (2013): GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Dostupné z: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.GLOBOCAN www.globocan.com

Forcet, C., Ye, X., Granger, L., Corset, V., Shin, H., Bredesen, D. E., Mehlen, P. (2001): The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(6), 3416-3421.

Gala, M., Chung, D.C. (2011): Hereditary colon cancer syndromes. In: Seminars in oncology. WB Saunders, p. 490-499.

Galiatsatos, P., Foulkes, W. D. (2006): Familial adenomatous polyposis. The American journal of gastroenterology, 101(2), 385-398.

Gatenby, R. A., Vincent, T. L. (2003): An evolutionary model of carcinogenesis. Cancer Research, 63(19), 6212-6220.

George, B., Kopetz, S. (2011): Predictive and prognostic markers in colorectal cancer. Current oncology reports, 13(3), 206-215.

Grady, W. M., & Markowitz, S. (2000): Genomic instability and colorectal cancer. Current opinion in gastroenterology, 16(1), 62-67.

Green, S. E., Bradburn, D. M., Varma, J. S., Burn, J. (1998): Hereditary non-polyposis colorectal cancer. International journal of colorectal disease, 13(1), 3-12.

Hoff, P. M. (2005). Is there a role for routine p53 testing in colorectal cancer?. Journal of clinical oncology, 23(30), 7395-7396.

Hughes, L. A., Melotte, V., de Schrijver, J., de Maat, M., Smit, V. T., Bovée, J. V., French, P. J., van den Brandt, P. A., Schouten, L. J., de Meyer, T., van Criekinge, W., Ahuja, N., Herman, J. G., Weijnenberg, M. P., van Engeland, M. (2013): The CpG

island methylator phenotype: what's in a name?. *Cancer research*, 73(19), 5858-5868.

Human Gene Database (GeneCards, dostupné z: <http://www.genecards.org/>)

Chang, D.T., Pai, R.K., Rybicki, L.A., Dimaio, M.A., Limaye, M., Jayachandran, P., Koong, A.C., Kunz, P.A., Fisher, G.A., Ford, J.M., Welton, M., Shelton, A., Ma, L., Arber, D.A., Pai, R.K. (2012): Clinicopathologic and molecular features of sporadic early-onset colorectal adenocarcinoma: an adenocarcinoma with frequent signet ring cell differentiation, rectal and sigmoid involvement, and adverse morphologic features. *Modern Pathology*, 25(8), 1128-1139.

Chung, D.C., Rustgi, A.K. (2003): The Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Genetics and Clinical Implications [dhelix]. *Annals of internal medicine*, 138(7), 560-570.

Iacopetta, B. (2003): TP53 mutation in colorectal cancer. *Human mutation*, 21(3), 271-276.

Irahara, N., Baba, Y., Nosho, K., Shima, K., Yan, L., Dias-Santagata, D., Iafrate, A.J., Fuchs, C.S., Haigis, K.M., Ogino, S. (2010): NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagnostic molecular pathology: the American journal of surgical pathology, part B*, 19(3), 157.

Isaksson-Mettävainio, M., Palmqvist, R., Dahlin, A.M., Van Guelpen, B., Rutegard, J., Oberg, A., Henriksson, M.L. (2012): High SMAD4 levels appear in microsatellite instability and hypermethylated colon cancers, and indicate a better prognosis. *International Journal of Cancer*, 131(4), 779-788.

Issa, J.P. (2004): CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(12), 988-993.

Jasperson, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., Burt, R.W. (2010): Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044-2058.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011): Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90.

Jiao, Y., George, S.K., Zhao, Q., Hulver, M.W., Hutson, S.M., Bishop, C.E., Lu, B. (2012): Mex3c mutation reduces adiposity and increases energy expenditure. *Molecular and cellular biology*, 32(21), 4350-4362.

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(2), 175-185.

Khan, N.P., Pandith, A.A., Hussain, M.U.I., Yousuf, A., Khan, M.S., Siddiqi, M.A., Wani, K.A., Mudassar, S. (2011): Loss of heterozygosity (LOH) of deleted in colorectal cancer (DCC) gene and predisposition to colorectal cancer: Significant

association in colorectal cancer patients of Kashmir. *J Cancer Res Exp Oncol*, 3(8), 88-94.

Khayat, M., Tilghman, J.M., Chervinsky, I., Zalman, L., Chakravarti, A., Shalev, S.A. (2016): A PIGN mutation responsible for multiple congenital anomalies–hypotonia–seizures syndrome 1 (MCAHS1) in an Israeli–Arab family. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 170(1), 176-182.

Kirley, S.D., D’Apuzzo, M., Lauwers, G.Y., Graeme-Cook, F., Chung, D.C., Zukerberg, L.R. (2005): The Cables gene on chromosome 18Q regulates colon cancer progression in vivo. *Cancer biology & therapy*, 4(8), 861-863.

Kolodner, R. (1996): Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes & development*, 10(12), 1433-1442.

Krasinskas, A.M. (2011): EGFR signaling in colorectal carcinoma. *Pathology research international*, 2011.

Kruse, J.P., Gu, W. (2009): Modes of p53 regulation. *Cell*, 137(4), 609-622.

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*, 111(15), 5646-5651.

Lambrechts, D., Lenz, H.J., de Haas, S., Carmeliet, P., Scherer, S.J. (2013): Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab. *Journal of Clinical Oncology*, 31(9), 1219-1230.

Li, G.M. (2008): Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell research*, 18(1), 85-98.

Li, J., Yi, C.H., Hu, Y.T., Li, J.S., Yuan, Y., Zhang, S.Z., Zheng, S., Ding, K.F. (2016): et al. TNM Staging of Colorectal Cancer Should be Reconsidered According to Weighting of the T Stage: Verification Based on a 25-Year Follow-Up. *Medicine*, 95(6).

Lin, O.S. (2012): Colorectal cancer screening in patients at moderately increased risk due to family history. *World J Gastrointest Oncol*, 4(6), 125-30.

Liu, F. (2001): SMAD4/DPC4 and Pancreatic Cancer Survival Commentary re: M. Tascilar et al., The SMAD4 Protein and Prognosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 7: 4115–4121, 2001. *Clinical cancer research*, 7(12), 3853-3856.

Luo, H.Y., Xu, R.H. (2014): Predictive and prognostic biomarkers with therapeutic targets in advanced colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 20(14), 3858-3874.

MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X. (2009): Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell*, 17(1), 9-26.

Markman, B., Javier Ramos, F., Capdevila, J., Tabernero, J. (2010): EGFR and KRAS in colorectal cancer. *Advances in clinical chemistry*, 51, 72.

Mehlen, P., Bredesen, D. E. (2004): The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis*, 9(1), 37-49.

Mehlen, P., Fearon, E.R. (2004): Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *Journal of Clinical Oncology*, 22(16), 3420-3428.

Mehlen, P., Guenebeaud, C. (2010): Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy. *Current opinion in oncology*, 22(1), 46-54.

Mehlen, P., Llambi, F. (2005): Role of netrin-1 and netrin-1 dependence receptors in colorectal cancers. *British journal of cancer*, 93(1), 1-6.

Meropol, N.J. (2005): Epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: it's time to get back on target. *Journal of clinical oncology*, 23(9), 1791-1793.

Milano, G., Etienne-Grimaldi, M.C., Dahan, L., Francoual, M., Spano, J.P., Benchimol, D., Chazal, M., Letoublon, C., André, T., Gilly, F.N., Delpero, J.R., Formento, J.L. (2008): Epidermal growth factor receptor (EGFR) status and K-Ras mutations in colorectal cancer. *Annals of oncology*, 19(12), 2033-2038.

Miyaki, M., Iijima, T., Konishi, M., Sakai, K., Ishii, A., Yasuno, M., Hishima, T., Koike, M., Shitara, N., Iwama, T., Utsunomiya, J., Kuroki, T., Mori, T. (1999): Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene*, 18(20), 3098-3103.

Mojarad, E.N. Kuppen, P.J.K., Aghdaei, H.A., Zali, M.R. (2013): The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 6(3).

Moreno, V., Sanz-Pamplona, R. (2015): Altered pathways and colorectal cancer prognosis. *BMC medicine*, 13(1), 1.

Müller, A., Edmonston, T.B., Dietmaier, W., Büttner, R., Fishel, R., Rüschoff, J. (2004): MSI-testing in hereditary non-polyposis colorectal carcinoma (HNPCC). *Disease markers*, 20(4-5), 225-236.

Mundade, R., Imperiale, T.F., Prabhu, L., Loehrer, P.J., Lu, T. (2014): Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*, 1(6), 400.

Murphy, K.M., Zhang, S., Geiger, T., Hafez M.J., Bacher, J., Berg, K.D., Eshleman, J.R. (2006): Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 8(3), 305-311.

Nakagawa, T., Taniguchi-Ikeda, M., Murakami, Y., Nakamura, S., Motooka, D., Emoto, T., Satake, W., Nishiyama, M., Toyoshima, D., Morisada, N., Takada,

S., Tairaku, S., Okamoto, N., Morioka, I., Kurahashi, H., Toda, T., Kinoshita, T., Iijima, K. (2016): A novel PIGN mutation and prenatal diagnosis of inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 170(1), 183-188.

National Institutes of Health Genetic Testing Registry (GTR; dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/>)

National Library of Medicine (US). Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda (MD): The Library; 2013 Sep 16. DCC netrin 1 receptor; [reviewed 2015 April; published 2016 April], Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/DCC#location>

Neufeld, K.L., Zhang, F., Cullen, B.R., White, R.L. (2000): APC-mediated downregulation of β -catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. *EMBO reports*, 1(6), 519-523.

Ogino, S., Cantor, M., Kawasaki, T., Brahmandam, M., Kirkner, G.J., Weisenberger, D.J., Campan, M., Laird, P.W., Loda, M., Fuchs, C.S. (2006): CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut*, 55(7), 1000-1006.

Ogino, S., Nosho, K., Irahara, N., Shima, K., Baba, Y., Kirkner, G.J., Meyerhardt, J.A., Fuchs, C. (2009): Prognostic significance and molecular associations of 18q loss of heterozygosity: a cohort study of microsatellite stable colorectal cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 27(27), 4591-4598.

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(2), 85-92.

Ouakrim, D.A., Pizot, C., Boniol, M., Malvezzi, M., Boniol, M., Negri, E., Bota, M., Jenkins, M.A., Bleiberg, H., Autier, P. (2015): Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database.

Pino, M.S., Chung, D.C. (2010): The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 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(14), 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(1B), 627-633.

Ross, J.S., Torres-Mora, J., Wagle, N., Jennings, T.A., Jones, D.M. (2010): Biomarker-based prediction of response to therapy for colorectal cancer. *American journal of clinical pathology*, 134(3), 478-490.

Santarosa, M., Ashworth, A. (2004): Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1654(2), 105-122.

Sarasqueta, A.F., Forte, G., Corver, W.E., de Miranda, N.F., Ruano, D., van Eijk, R., Oosting, J., Tollenaar, R.A., van Wezel, T., Morreau, H. (2013): Integral analysis of p53 and its value as prognostic factor in sporadic colon cancer. *BMC cancer*, 13(1), 1.

Semrad, T.J., Kim, E.J. (2015): Molecular testing to optimize therapeutic decision making in advanced colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*.

Seow, H.F., Yip, W.K., Fifis, T. (2016): Advances in targeted and immunobased therapies for colorectal cancer in the genomic era. *OncoTargets and therapy*, 9, 1899.

Sjöström, O., Lindholm, L., Tavelin, B., Melin, B. (2016): Decentralized colonoscopic surveillance with high patient compliance prevents hereditary and familial colorectal cancer. *Familial cancer*, 1-9.

Spiegelman, V.S., Slaga, T.J., Pagano, M., Minamoto, T., Ronai, Z., Fuchs, S.Y. (2000): Wnt/ β -catenin signaling induces the expression and activity of β TrCP ubiquitin ligase receptor. *Molecular cell*, 5(5), 877-882.

Tan, C., Du, X. (2012): KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 18(37), 5171-5180.

Tanaka, T., Watanabe, T., Kazama, Y., Tanaka, J., Kanazawa, T., Kazama, S., Nagawa, H. (2006): Chromosome 18q deletion and Smad4 protein inactivation correlate with liver metastasis: A study matched for T-and N-classification. *British journal of cancer*, 95(11), 1562-1567.

Tanaka, T., Watanabe, T., Kitayama, J., Kanazawa, T., Kazama, Y., Tanaka, J., Kazama, S., Nagawa, H. (2009): Chromosome 18q deletion as a novel molecular predictor for colorectal cancer with simultaneous hepatic metastasis. *Diagnostic Molecular Pathology*, 18(4), 219-225.

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(3), 343-346.

Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A. (2015): Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.

Tusell, L., Pampalona, J., Soler, D., Frias, C., Genecsá, A. (2010): Different outcomes of telomere-dependent anaphase bridges. *Biochemical Society Transactions*, 38(6), 1698-1703.

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS, dostupné z <http://www.uzis.cz/cz/mkn/C15-C26.html#C18>)

Vilar, E., Gruber, S.B. (2010): Microsatellite instability in colorectal cancer the stable evidence. *Nature reviews Clinical oncology*, 7(3), 153-162.

Vokes, E.E., Chu, E. (2006): Anti-EGFR therapies: Clinical experience in colorectal, lung, and head and neck cancers. *Oncology (Williston Park, NY)*, 20(5 Suppl 2), 15-25.

Vyzula, R., Adámková-Krákorová, D., Arenberger, P., Babjuk, M., Belada, D., Dušek, L., Hajdúch, M., Halámková, J., Holánek, M., Jurečková, A., Kiss, I., Kleinová, J., Klimeš, D., Kocáková, I., Krásenská, M., Lakomý, R., Matoušková, M., Mechl, Z., Novotný, J., Obermannová, R., Palácová, M., Petráková, K., Poprach, A., Ryška, A., Sedláčková, E., Skříčková, J., Sláma, O., Svoboda, M., Tesařová, P., Tomancová, V., Trněný, M., Vorlíček, J., Zemanová, M., Zvaríková, M. (2016): *Modrá kniha České onkologické společnosti*. 22. vydání. Masarykův onkologický ústav.

Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., Kerr, D. (2009): Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9(7), 489-499.

Wheeler, J.M.D., Bodmer, W.F., Mortensen, N.J. (2000): DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. *Gut*, 47(1), 148-153.

Wilson, P.M., Ladner, R.D., Lenz, H.J. (2007): Predictive and prognostic markers in colorectal cancer. *Gastrointestinal cancer research: GCR*, 1(6), 237.

Woodford-Richens, K.L., Rowan, A.J., Gorman, P., Halford, S., Bicknell, D.C., Wasan, H.S., Roylance, R.R., Bodmer, W.F., Tomlinson, I.P. (2001): SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9719-9723.

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*, 28(4), 828-837.

Yiu, A. J., Yiu, C.Y. (2016): Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anticancer research*, 36(3), 1093-1102.

Yuen, K.W.Y. (2010): Chromosome Instability (CIN), Aneuploidy and Cancer. *eLS*.

Zakhari, S. (2013): Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res*, 35(1), 6-16.

Zhang, B., Chen, X., Bae, S., Singh, K., Washington, M. K., & Datta, P. K. (2014): Loss of Smad4 in colorectal cancer induces resistance to 5-fluorouracil through activating Akt pathway. *British journal of cancer*, 110(4), 946-957.

Zong, L., Abe, M., Ji, J., Zhu, W.G., Yu, D. (2016): Tracking the Correlation Between CpG Island Methylator Phenotype and Other Molecular Features and Clinicopathological Features in Human Colorectal Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical and translational gastroenterology*, 7(3), e151.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

17q – Krátké rameno chromozomu 17
18q – Dlouhé rameno chromozomu 18
ADD – *Addiction Dependence Domain*
AKT – Fosfatidylinositol – 3 kináza protein kinázová dráha
APC – *Adenomatous Polyposis Coli*
BMI – *Body mass index*
BRAF – B-Raf proto – onkogen
CIMP – *CpG island hypermethylator phenotype*
CIN – *Chromosomal instability* – chromozomální nestabilita
CK1 – Kasein kináza 1
CRC – Kolorektální karcinom
CtBP – *C-terminal Binding Protein*
DCC – *Deleted in Colorectal Carcinoma*
DNMT – DNA metyltransferázy
DNMT3B – *DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3 Beta*
EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*
FOLFIRI – FOL – folinová kyselina, F – 5-fluorouracil, IRI – irinotecan
FOLFOX – FOL – folinová kyselina, F – 5-fluorouracil, OX – oxaliplatina
GPI – Glykofosfatidylinositolová kotva
GSK3 – Glykogen syntáza kináza 3
GTP/GDP – Guanozin trifosfát/guanozin difosfát
HDAC1 – *Histone Deacetylase 1*
HNPCC – *Hereditary non – polyposis colorectal cancer*
HRAS – *Transforming Protein P21*
KRAS – *Kirsten Ras*
MAPK – Mitogenem aktivovaná protein kinázová dráha
MDM2 – *Mouse double minute 2* homolog
MDMX – *Mouse Double Minute 4* homolog
MEK – *Mitogen-activated Protein Kinase/Extra-cellular Signal-regulated Kinase*
MEX3C – *Mex-3 RNA Binding Family Member C*
MLH1 – Homolog MutL
MMR – *Mismatch repair* systém
MSH2 – MutS homolog 2
MSH6 – Homolog MutS α
NRAS – *Transforming Protein N-Ras*
p15 – P15 protein
p21 – *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1*
PCNA – *Proliferating Cellular Nuclear Antigen*
PI3K – Fosfatidylinositol 3 – kináza
PIGN – *Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class N*
PMS2 – Homolog MutL
RBMS3 – *RNA Binding Motif, Single Stranded Interacting Protein 3*
RIG-1 – *Retinoic Acid Inducible Gene-1*
SAC – *Spindle assembly checkpoint*
SMAD2 – *SMAD Family Member 2*
SMAD3 – *SMAD Family Member 3*

SMAD4 – *SMAD Family Member 4*
TCF – *T-cell factor*
TGF- β – *Transforming Growth Factor β*
TLE-1 – *Transducin-like Enhancer Protein 1*
TNM – *Tumor, node, metastases*
TP53 – *Tumor Protein p53*
UPC1 – *Uncoupling Protein 1*
VEGF – *Vaskulární endoteliální růstový faktor*
WHO – *Světová zdravotnická organizace*
ZNF516 – *Zinc-finger Protein 516*
 β TrCP – *β -transducing Repeat-containing Protein*