

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2015**

**Natálie Havranová**

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



**Změny v genomu při vzniku  
kolorektálního karcinomu**

**Bakalářská práce**

**Natálie Havranová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2014**

**Vedoucí práce: Ing. Arpád Bóday**

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením Ing. Arpáda Bódaye a uvedla veškerou literaturu, ze které jsem čerpala.

V Novém Jičíně, dne 23. 4. 2015

.....

## Souhrn

Bakalářská práce se věnuje rešerši literatury, ve které byly shrnuty ustálené i nové poznatky o vzniku kolorektálního karcinomu. V prvních kapitolách byly krátce rozebrány údaje o epidemiologické situaci kolorektálního karcinomu ve světě i Evropě a byla popsána jeho histologie a patologie. Stěžejní částí teoretické části bakalářské práce bylo sjednocení poznatků o klasifikaci kolorektálních karcinomů, která je nezbytná k prevenci tohoto onemocnění a je na ní nahlíženo z různých pohledů. Největší pozornost byla věnována molekulárně biologickému rozdělení vzniku kolorektálního karcinomu, které zahrnuje cestu chromozomální nestability, mikrosatelitové nestability a metylace CpG ostrůvků. Podrobněji jsou také popsány geny *BRAF* a *PIK3CA*, které jsou předmětem druhé, experimentální části práce.

V experimentální části byla provedena mutační analýza genů *BRAF* a *PIK3CA* na souboru 88. vzorků pacientů s kolorektálním karcinomem. V tomto souboru byla nalezena aktivační mutace V600E v genu *BRAF* u pěti vzorků, což představuje 5,68 %. V genu *PIK3CA* byly detekovány 4 substituce, což odpovídá 4,55 %. 3 mutace byly nalezeny v kodonu 545. Ve dvou případech byla odhalena mutace c.1634 A>G (p.Glu545Gly) a mutace c.1633 G>A (p.Glu545Lys) byla nalezena v jednom vzorku. Čtvrtá mutace c.3140 A>G (p.His1047Arg) byla detekována v kodonu 1047. Frekvence nalezené aktivační mutace V600E v genu *BRAF* se shoduje s výsledky publikovanými v odborných časopisech. Četnost nalezených *PIK3CA* mutací je nižší než udávají publikace. Tuto diskrepanci připisujeme velikosti analyzovaného souboru vzorků a počtu testovaných mutací.

## Summary

The theoretical part of the thesis is focused on a literature search in which I summarized settled and new findings of colorectal cancer formation. In the first chapters I approached the issue of colorectal cancer, then I briefly summarized the epidemiological data in the world and Europe and described its histology and pathology. The main part of the theoretical part of the thesis was to unify knowledge of the classification colorectal carcinomas, which is necessary to prevent this disease and it is viewed with different perspectives. I specially focused on molecular biological division of colorectal cancer formation, which involves a chromosomal instability, microsatellite instability, and methylation of CpG islands. More detailed I described *BRAF* and *PIK3CA* genes that were subject of the second part of this theses.

In the experimental part was performed mutational analysis of the genes *BRAF* and *PIK3CA* on a set of 88 samples of patients with colorectal cancer. In the total number of 88 samples were found activating mutation V600E in *BRAF* gene in 5 samples, which represents 5,68 %. In the *PIK3CA* gene were detected four substitutions corresponding to 4.55%. 3 mutations were found at codon 545. In two cases was revealed mutation c.1634 A>G (p.Glu545Gly) and the mutation c.1633 G>A (p.Glu545Lys) was found in one sample. The fourth mutation c.3140 A> G (p.His1047Arg) was detected at codon 1047. The frequency of activating mutations found in the *BRAF* V600E is consistent with results published in scientific articles. The frequency of found *PIK3CA* mutations is lower than publication indicate. We attribute this discrepancy to size of the analyzed sample set and to number of observed mutations.

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce, Ing. Arpádu Bódayovi, za cenné rady při zpracovávání práce, odbornou pomoc a poskytnutou literaturu. Dále také děkuji RNDr. Radmile Richterové, za umožnění zpracování experimentální části práce v Laboratoři lékařské genetiky - Úsek molekulární biologie, Laboratoře Agel a.s. v Novém Jičíně. Dík patří i ostatním zaměstnancům těchto laboratoří, kteří mi ochotně pomáhali: Mgr. Pavla Vaničková, Mgr. Spiros Tavandzis.

# Obsah

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Úvod</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>2 Současný stav řešené problematiky</b> .....                      | <b>3</b>  |
| 2.1 Epidemiologie kolorektálního karcinomu.....                       | 3         |
| 2.2 Etiologie CRC.....  | 3         |
| 2.3 Histologie tlustého střeva.....                                   | 4         |
| 2.3.1 Klasifikace polypů .....  | 4         |
| 2.4 Patologie nádorů .....  | 5         |
| 2.4.1 Patologie a vznik CRC .....                                     | 5         |
| 2.5 Klasifikace kolorektálního karcinomu.....                         | 8         |
| 2.6 Hereditární formy CRC .....                                       | 8         |
| 2.6.1 Lynchův syndrom (LS) .....                                      | 8         |
| 2.6.2 Familiární adenomatózní polypóza .....                          | 9         |
| 2.7 Molekulární cesty vzniku sporadického CRC .....                   | 10        |
| 2.7.1 Cesta chromozomální nestability - CIN.....                      | 12        |
| 2.7.1.1 Supresorová cesta / adenoma – carcinoma pathway .....         | 13        |
| 2.7.1.2 Geny zapojené v supresorové cestě .....                       | 14        |
| 2.7.1.3 BRAF .....  | 16        |
| 2.7.1.4 PI3K signální dráha a role PIK3CA v průběhu karcinogeneze CRC | 17        |
| 2.7.2 MSI.....  | 19        |
| 2.7.2.1 MSI-H .....   | 20        |
| 2.7.2.2 MSI-L.....  | 21        |
| 2.7.3 CIPM (CpG island methylator phenotype) metylační fenotyp .....  | 22        |
| <b>3 Cíle práce</b> .....   | <b>25</b> |
| <b>4 Materiál a metodika</b> .....                                    | <b>26</b> |
| 4.1 Materiál.....   | 26        |
| 4.1.1 Biologický materiál.....  | 26        |
| 4.1.2 Přístroje .....   | 26        |
| 4.1.3 Spotřební materiál .....  | 26        |
| 4.1.4 Chemikálie a použité roztoky .....                              | 27        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.2      | Metodika .....   | 27        |
| 4.2.1    | Izolace DNA z řezů z nativní tkáně .....                                       | 27        |
| 4.2.2    | Detekce <i>BRAF</i> mutace pomocí eQ-PCR.....                                  | 28        |
| 4.2.3    | Detekce mutací v <i>PIK3CA</i> .....   | 30        |
| <b>5</b> | <b>Výsledky .....</b>  | <b>35</b> |
| 5.1      | Výsledky výskytu V600E v genu <i>BRAF</i> v souboru vyšetřených vzorků .....   | 35        |
| 5.2      | Výsledky hledání mutací v genu <i>PIK3CA</i> v souboru vyšetřených vzorků..... | 38        |
| <b>6</b> | <b>Diskuze .....</b>   | <b>40</b> |
| <b>7</b> | <b>Závěr.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>8</b> | <b>Seznam použité literatury .....</b>   | <b>44</b> |
| 8.1      | Použité internetové zdroje.....  | 60        |
| <b>9</b> | <b>Seznam použitých zkratek.....</b>   | <b>61</b> |



## 1 Úvod

Kolorektální karcinom (CRC) je celosvětově závažným, zdravotním a sociálně - ekonomickým problémem ve všech ekonomicky vyspělých zemích, neboť do jisté míry souvisí s tzv. „západním“ stylem života. Česká Republika v celosvětových statistikách incidence a mortality CRC zaujímá dlouhodobě jedno z prvních míst v přepočtu na počet obyvatel.

Karcinom tlustého střeva je genetické onemocnění trávicího ústrojí, které vzniká postupnou akumulací změn, po kterých dochází k nekontrolovatelnému buněčnému růstu a vzniku nádoru. Většinu CRC tvoří sporadická forma, která vzniká následkem ztráty funkce obou alel důležitého genu, ale navíc také vyžaduje další dvě somatické mutace. Pravděpodobnost vzniku CRC touto cestou je tedy malá a dochází k ní až ve vyšším věku. Další formou jsou hereditární CRC. V tomto případě je zárodečná mutace prezentována ve všech buňkách jedince. Druhá alela genu má normální funkci a nádorová progresse se projeví až po vyřazení druhé alely somatickou mutací.

Genetický model, mapující postupnou molekulární cestu vzniku CRC zahrnuje genetické změny (mutace) v onkogenech a tumor supresorových genech, které vznikají následkem exogenních i endogenních faktorů. Protoonkogeny jsou normální geny, které se aktivují následkem mutace jedné alely. Po této změně z nich vznikají onkogeny, které narušují buněčný růst a diferenciaci. Dalším typem genů jsou tumor supresorové geny, které kontrolují normální buněčnou proliferaci a diferenciaci. Pokud dojde k inaktivaci obou kopií těchto genů, kontrolní systém selže a dochází k nádorové transformaci.

Karcinogeneze CRC představuje dlouhodobý proces, proto je důležitá a zásadní detekce premaligních lézí pomocí screeningových metod, mezi které patří testy na okultní krvácení a kolonoskopie, která má v současnosti největší diagnostický význam. Přírozenou snahou je odhalit onemocnění co nejdříve v jeho časných formách, kdy je ještě vyléčitelné. Léčba CRC se za poslední dobu radikálně změnila. Původní podávání 5-fluoroacilu (5-FU) k léčbě metastazujícího karcinomu postupně nahrazuje např. jeho kombinace se systémovými léčivými a zavedení monoklonálních protilátek, které zvyšují až čtyřnásobně přežití. Biologická léčba je nyní významnou součástí komplexní onkologické léčby CRC. Překážkou déletrvajícího úspěchu léčby je však neselektivita cytotoxických látek a postupný rozvoj rezistence nádorových buněk.

Na samotnou klasifikaci sporadického CRC můžeme nahlížet ze dvou pohledů, prvním je „patologická klasifikace“, která popisuje vznik kolorektálního karcinomu na základě histologických pozorování s přihlédnutím na molekulární změny v nádoru. Toto rozdělení CRC zahrnuje tradiční (Fearon - Vogelstein model) cestu vzniku, alternativní cestu a vznik karcinomu přes pilovité léze. Druhou možností je „molekulárně biologické rozdělení“, které charakterizuje CRC na základě chromozomální nestability (CIN), mikrosatelitové nestability (MSI) a metylace CpG ostrůvků (CIMP).

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Epidemiologie kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom – nádor tlustého střeva a konečníku je třetím nejčastěji diagnostikovaným zhoubným nádorem ve světě, kterému následně podlehnou 8,5 % pacientů. Incidence vzniku je všeobecně četnější u mužů než u žen. Největší hrozbu představuje toto onemocnění v Evropě, kde patří mezi nejčastější maligní onemocnění s vysokou mortalitou ([www.globocan.iarc.fr](http://www.globocan.iarc.fr)). V evropské populaci činí riziko vzniku nádoru u mužů přibližně 4,48 % a u žen 2,73 % (Ferlay *et al.*, 2013). Česká republika se řadí velmi významně mezi země s nejvyšší incidencí tohoto onemocnění. Zaujímá tak páté místo za Slovenskem, Maďarskem, Dánskem a Nizozemím ([www.globocan.iarc.fr](http://www.globocan.iarc.fr)). Nádorem tlustého střeva u nás trpí hlavně muži, kterým ve světě náleží 4. příčka, ženy jsou na tom o něco lépe. Diagnostikovány u nás bývají nádory tlustého střeva a konečníku nejčastěji u pacientů mezi 65 – 79 rokem věku (<http://www.svod.cz/prehled.php>). S ohledem na význam tohoto onemocnění v České republice již od roku 2000 mužům a ženám od 50 let nabízen národní screeningový program (Zavoral *et al.*, 2014). I přes rozvoj diagnostiky a organizovanost preventivních programů je však méně než polovina diagnostikovaných malignit v časnějších stádiích, což výrazně ovlivňuje úspěšnost léčby (Suchánek *et al.*, 2011).

Přestože jsou konkrétní příčiny vzniku CRC většinou neznámé, existuje řada rizikových faktorů, které negativně ovlivňují vznik nádoru. Ohroženi jsou především lidé nad 50 let, avšak známy jsou i případy CRC u mladších pacientů ([www.uzis.cz/registry-nzis/nor](http://www.uzis.cz/registry-nzis/nor)). Riziko vzniku CRC dále ovlivňují chronická zánětlivá onemocnění (Crohnova nemoc, ulcerózní kolitida). Jedním z hlavních rizikových faktorů je však složení potravy a životní styl. Pozitivně při rozvoji CRC působí zvýšená hladina tuku ve stravě, konzumace červeného masa, uzenin, pití piva, zpracování potravy smažením a současný nízký příjem vlákniny. Důležitá je také pohybová aktivita (Chan *et* Giovannucci, 2010).

### 2.2 Etiologie CRC

CRC je genetické onemocnění vycházející z epitelových buněk tlustého střeva. Na vzniku nádoru se podílí faktory hereditární (adematózní polypóza aj.) a exogenní (tuky v potravě, kouření, alkohol aj.). Vývoj kolorektálních nádorů je iniciován postupnou akumulací genetických a epigenetických změn, které se společně podílejí na vytvoření maligního fenotypu. V současné době jsou známy tři hlavní cesty, které vedou ke vzniku nádoru a to je

chromozomální nestabilita (CIN), mikrosatelitová nestabilita (MSI) a metylace CpG ostrůvků (CIMP) (Suchánek *et al.*, 2011).

## 2.3 Histologie tlustého střeva

Tlusté střevo (*intestinum crassum*) je poslední částí trávicí soustavy. Dochází zde k zahušťování střevního obsahu, vstřebávání vody a minerálních látek a následně ke vzniku stolice. Svou nejširší částí – slepým střevem (*intestinum caecum*) je tlusté střevo napojeno na *ileum* tenkého střeva. Součástí slepého střeva je červovitý výběžek (*appendix vermiformis*), který je důležitou součástí imunitního systému díky obsahu lymfatické tkáně. Dále následuje tračník vzestupný (*colon ascendens*), tračník přímý (*colon transversum*), tračník sestupný (*colon descendens*) a esovitá klička (*colon sigmoideum*). Posledními částmi tlustého střeva jsou konečník (*rectum*) a řiť (*anus*). Délka tlustého střeva je přibližně 150 cm a šířka 5 – 7 cm. Po celé délce tlustého střeva se táhnou tři bílé pruhy ztlustělé podélné svaloviny (*Taniet coli*).

Vnitřní výstelka tlustého střeva je složena ze sliznice (*tunica mucosa*), která má hladký povrch s malým množstvím záhybů. Na sliznici mezi klky vyúsťují tubulózní střevní žlázy (*Lieberkühnovy krypty*). Intestinální epitel (na povrchu sliznice i v kryptách) je tvořen různými druhy buněk, mezi které patří např. buňky cylindrické, absorpční, pohárkové a také neuroendokrinní buňky, které jsou součástí neuroendokrinního difuzního systému. Jedná se o enterochromafinní buňky produkující serotonin a buňky vytvářející peptidické hormony (gastrin, glukagon). Části tračníku obsahují také *Panethovy* buňky, které mají díky obsahu lysozymu antibakteriální účinky. Sliznice je oddělena od podsliznice pruhem slizniční svaloviny z lymfatické tkáně, která tvoří lymfatické folikuly. V podsliznici je vytvořen submukózní neurální plexus Meissnerův. Na podsliznici navazuje zevní svalovina. Zde jsou lokalizovány intersticiální Cajalovy buňky, coby peacemarkery autonomního nervového systému a regulátory intestinální motility. Tyto buňky jsou charakteristické expresí povrchového tyrozin kinázového c-kit receptoru, který je produktem onkogenu. Jsou proto považovány za prekursor gastrointestinálních stromálních tumorů (GIST). Poslední vrstvou střevní stěny je Tunica serosa bohatá na lymfatické a krevní cévy (Holubec *et al.*, 2004).

### 2.3.1 Klasifikace polypů

Polypy mohou mít dle své lokalizace různý původ. Slizniční léze dělíme na nádorové – adenomy, karcinomy a nenádorové – hyperplastické, juvenilní, zánětlivé aj. Polypy, které mají původ v submukóze nazýváme lipomy (Zavoral *et al.*, 2013).

Dle histologické stavby dále rozeznáváme adenomy tubulární, tubulovilózní a vilózní, které dle zmíněné posloupnosti informují o zvyšujícím se riziku maligního zvratu. Mezi adenomy dále rozeznáváme pilovité léze, mezi které patří tradiční pilovitý adenom (Traditional serrated adenoma – TSA), hyperplastický polyp (Hyperplastic polyp) a sesilní pilovitá léze (Sessile serrated adenoma – SSA). Smíšené polypy, které vznikají spojením více typů pilovitých lézí nebo minimálně jednoho typu pilovité léze s adenomem (Mansoor *et al.*, 2013).

## **2.4 Patologie nádorů**

Progrese rakoviny má formu somatického vývoje, v němž některé mutace dávají buňkám selektivní proliferační výhodu (Cahill *et al.*, 1998). Mutace je tedy jedním z dominantních faktorů limitujících rychlost přechodu mezi jednotlivými stupni nádorové progrese (Frank *et Nowak*, 2004). Předpokládá se, že k počátku tumorogeneze v jedné buněčné linii předchází 4-6 náhodných limitních mutací (Armitage *et Doll*, 1954; Nowell, 1976; Renan, 1993). Hanahanan *et Weinberg* (2000) naznačují, že přítomnost šesti buněčných změn či znaků, dohromady řídí populaci normálních buněk k tomu, aby se staly rakovinnými. Těmito znaky jsou: soběstačnost v produkci růstových signálů, necitlivost k signálům potlačujícím růst, únik apoptóze, neomezený replikační potenciál, nepřetržitá angiogeneze, tkáňová invaze a metastazování. Genetická nestabilita může být definována jako „opravňující vlastnost“, která umožňuje buňkám získat další mutace způsobené vadou oprav DNA. Všechny tyto znaky představují jakousi pomyslnou sadu pravidel, která jsou základem pro transformaci normální tkáně na rakovinnou. Pokud nádorové buňky nemají schopnost invazivního růstu a metastazování, vede klonální proliferace primárně transformovaných buněk ke vzniku benigního nádoru. Vznik zhoubného nádoru nastává až po vzniku genetických a fenotypových změn, které mění vlastnosti již existujících a množících se nádorových buněk tak, že jsou schopny prorůst do okolní tkáně nebo cévního řečiště (Holubec *et al.*, 2004).

### **2.4.1 Patologie a vznik CRC**

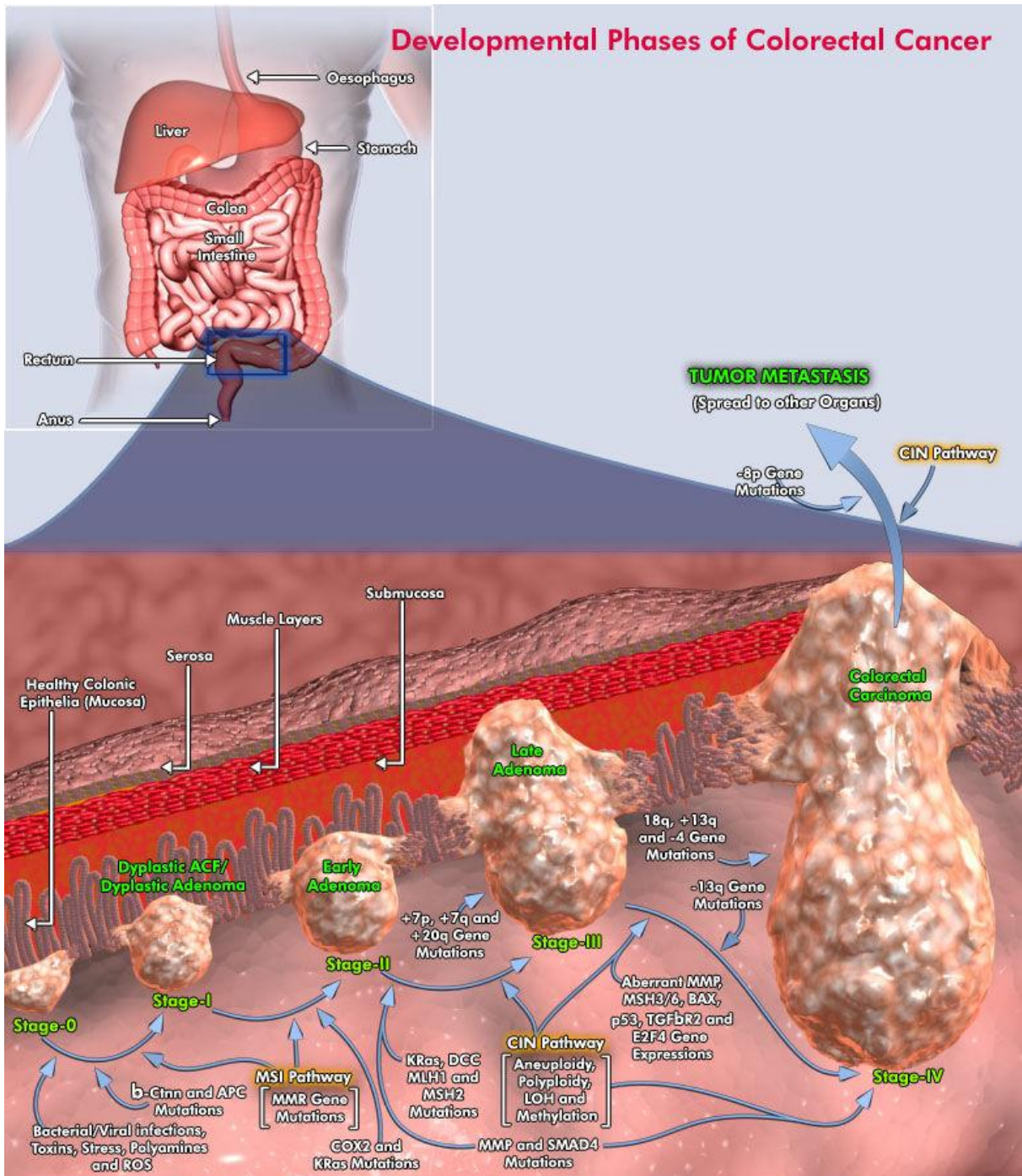
Vývoj CRC můžeme označit za vícestupňový proces, který zahrnuje 3 fáze - iniciaci, propagaci a progresi (Weinberg, 1989). Zahajující událostí tumorogeneze jsou stabilní změny ve struktuře nebo sekvenci DNA (mutace). Dále následuje nekontrolovatelná expanze neoplastických klonů, které charakterizují růst tumoru (Ponz de Leon, 1996). Kolorektální karcinom je výsledkem řady genetických změn, které vedou k postupné nevratné ztrátě kontroly buněčného růstu a diferenciaci. Tyto změny způsobují mutace v onkogenech a

tumorsupresorech, následuje kumulace těchto mutací a narušení epigenetické rovnováhy (Hussain *et Harris* 1988; Peltomaki, 1944). Tyto fakta jsou v souladu s existencí několika molekulárních drah uskutečňujících přechod normální sliznice v karcinom. Různé molekulární dráhy vysvětlují existenci střevních nádorů s různou biologickou povahou. Patrně stejné fenotypové projevy mohou vznikat důsledkem rozdílných molekulárních změn a pravděpodobně také různých interakcí genů a prostředí (Vogelstein *et al.*, 1988).

Většina kolorektálních malignit se vyvíjí z již existujících adenomů (Kalus, 1972), což jsou jasně ohraničené shluky dysplastického epitelu, které lze rozdělit do různých histologických typů: malý adenom – velký adenom - karcinom. Existují klinické, epidemiologické a experimentální důkazy, které jasně naznačují, že adenomatózní polypy představují přirozený prekursor karcinomu. To však neznamená, že se všechny polypy vyvíjejí v rakovinu a zároveň se také nevylučuje možnost vzniku „de novo“ karcinogeneze (Rembacken *et al.*, 2000). Přechodu normální sliznice v adenom se můžou účastnit také nádorové prekuzory adenomatózních lézí a karcinomů - „abberant crypt foci“ (ACF) (Roncucci *et al.*, 1991). Mezinárodní klasifikace nemocí pro onkologii rozlišuje novotvary na střevní a rektální. Novější pohled však naznačuje, že se jedná spíše o tři různé typy kolorektálních malignit a to rakovinu pravého kolon, rakovinu levého kolon a rakovinu konečníku (Takayama *et al.*, 1998).

Postupná morfologická progrese nádorového vývoje a přístupnost lézí v každé fázi jejího postupu usnadňuje získávání molekulárních dat o kolorektálním karcinomu. Přímá genetická analýza umožňuje určit, které z tumor-supresorových genů a onkogenů jsou zapojeny v klonálním vývoji CRC a také studovat relativní načasování genetických změn během tohoto procesu. Na základě velikosti, poměru vilózní složky a závažnosti dysplazie můžeme adenomy klasifikovat jako časný (stádium I), střední (stádium II) a pozdní (stádium III). Každá fáze morfologické progrese je spojena se zvýšeným počtem mutací (Vogelstein *et al.*, 1988) (**viz Obr. 1**).

Obrázek 1: Přechod normální sliznice v adenom



Převzato z:

<https://www.qiagen.com/cz/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details/?pwid=>

133

## 2.5 Klasifikace kolorektálního karcinomu

Klasifikace CRC je nezbytná pro primární a sekundární prevenci tohoto onemocnění. Dle endogenních rizikových faktorů můžeme kolorektální karcinomy rozdělit na sporadický, hereditární a familiární. Dané rozřazení objasňuje způsoby dědičnosti a vztah k rozvoji karcinomu (Suchánek *et al.*, 2011).

Sporadický kolorektální karcinom tvoří 80-85% všech CRC. Nádor vzniká spontánně bez dědičné predispozice pouze na základě působení vnějších vlivů. Největším rizikovým faktorem je v tomto případě věk. Nárůst incidence stoupá od 50 let (Suchánek *et al.*, 2011). Současný biomedicínský výzkum nádorových onemocnění je zaměřen na jednotlivá stadia zrodu a vývoje nádoru ve snaze porozumět základním molekulárním procesům a jejich možnému ovlivnění či úplnému zastavení (Minárik *et Mináriková*, 2005).

Hereditární formy CRC tvoří skupinu dobře definovaných genetických syndromů. Pacienti s touto diagnostikou vyžadují radikální, nákladnou specifickou léčbu, do které je třeba zapojit také vyšetření a pravidelné preventivní sledování příbuzných 1. stupně.

## 2.6 Hereditární formy CRC

### 2.6.1 Lynchův syndrom (LS)

Lynchův syndrom byl poprvé popsán roku 1913 prof. Warthinem jako případ „karcinomové rodiny G“, později pak Lynch po doplnění údajů o této familiární formě kolorektálního karcinomu s absencí polypózy přejmenoval onemocnění na „syndrom karcinomové rodiny“ a posléze na hereditární nepolypózní kolorektální karcinom. Nyní se jako synonymum užívá výraz Lynchův syndrom (Daum *et al.*, 2014).

LS je autozomálně dominantní onemocnění, jehož příčinou je geminální mutace v tzv. „*mismatch repair*“ genech (MMR). Tyto tumor supresorové geny: *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* a *MSH6* (Quirke *et al.* 2010) produkují enzymy opravující replikační chyby v DNA. V důsledku poškození MMR systému v mikrosatelitech vznikají početné změny zejména mono-, di-, tri- nukleotidů, hovoříme tedy o mikrosatelitové instabilitě (MSI). MMR geny kódují MMR proteiny, které se spojují do funkčních heterodimerních komplexů. Typické je spojení *MSH2* – *MSH6*, které rozpoznává chyby v DNA a signalizuje její poškození a *MLH1* – *PMS2*, které nalezené chyby opravuje, zastavuje buněčný cyklus a indukuje apoptózu v reakci na poškozenou DNA.

LS podmiňuje vznik mnohačetných zhoubných nádoru. U pacientů s diagnózou LS se v současné době předpokládá až 5% pravděpodobnost vzniku CRC a poté 16%



pravděpodobnost onemocnění dalším nádorem tlustého střeva. Zároveň u pacientů s touto diagnózou vzniká zvýšené riziko vzniku karcinomů endometria, žaludku, tenkého střeva, ovaria, ledvinné pánvičky a močovodu, nádorů mozku a kůže. Charakteristickým znakem Lynchova syndromu je „absence premorbidního fenotypu“ - nádor lze diagnostikovat až po nálezů maligního tumoru, jelikož nedochází k benigním změnám před jeho propuknutím (Daum *et al.*, 2014).

Lynchův syndrom I (Hereditary site specific colon cancer), je charakteristický zvýšenou incidencí rakoviny tlustého střeva. Lynchův syndrom II (The cancer family syndrome), je s ohledem na vznik rakoviny tlustého střeva stejný, ale je spojen se zvýšeným rizikem vzniku extrakolonických adenokarcinomů vyskytujících se zejména v žaludku, děložní sliznici a pankreatu, které se vyvíjí v relativně mladém věku a dědí se integrálně (na stejný gen) (Fitzgibbons *et al.*, 1987).

Muir-Torreho syndrom (MTS) je fenotypickou variantou Lynchova syndromu. Jde o sebaceózní kožní nádory s interními malignitami. Syndrom je zapříčiněn mutací v genech MLH1 a MSH2 (Zavoral *et al.* 2013).

### **2.6.2 Familiární adenomatózní polypóza**

*Familiární adenomatózní polypóza* (FAP) je po LS druhou nejčastější příčinou geneticky podmíněného CRC a tvoří 1 % všech diagnostikovaných kolorektálních karcinomů. FAP je autozomálně dominantní onemocnění způsobené zárodečnou mutací tumorsupresorového genu APC (adenomatous polyposis coli) (Zavoral *et al.*, 2013), diagnostice předchází genetické vyšetření mutací v tomto genu. Gen APC je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 5 (Bodmer *et al.* 1987). Bylo popsáno více než 700 zárodečných mutací v genu APC, většina z nich má za následek vznik abnormálně krátkého, nefunkčního proteinu (Powell *et al.*, 1992). Typ a lokalizace mutací v genu mají vliv na klinické projevy onemocnění FAP. Závažné polypózy charakteristické nálezem více než 1000 adenomů jsou způsobeny mutacemi v centrální oblasti genu mezi kodony 1250 a 1464. Nejzávažnější fenotyp vzniká sledkem mutace v oblasti kodonu 1300 (Nugent *et al.*, 1994). Jedná se o nejčastější mutaci genu APC, která společně s delecí pěti bází v oblasti kodonu 1061 tvoří asi 15–20 % mutací identifikovaných u pacientů s FAP (Olschwang *et al.*, 1993)

Mnohočetné karcinomy vznikají ve velmi mladém věku. K diagnostikování FAP je nutný nález 100 a více adenomových polypů v tlustém střevě či rektu. Penetrace onemocnění je 100% do 50 let věku (Plevová *et al.* 2009). Polypy se začínají tvořit v první dekádě života ve věku 15 let. Dohled v podobě endoskopického vyšetření konečníku a tlustého střeva

(sigmoidoskopie) proto začíná již v deseti letech, poté je pacientům nabízena preventivní a totální kolektomie.

*Attenuovaná FAP* (AFAP) je klinicky diagnostikovaná menším počtem polypů (10 - 100) v pozdějším věku je zapříčiněna mutacemi v exonech 1-4 (kodony 1-158) (Spirio *et al.*, 1993). Jedná se o méně závažnou variantu FAP, které je připisováno průměrně 70% celoživotní riziko zisku CRC (Zavoral *et al.*, 2013). Jedna pětina všech klinicky diagnostikovaných pacientů s AFAP nenesou žádné *APC* mutace (Hamilton *et al.*, 2000).

*MYH asociovaná polypóza* je autozomálně recesivní polypóza podmíněna bíalelickou zárodečnou mutací v genu *MYH*, který leží na krátkém raménku chromozómu 1 a plní funkci odstraňování oxidativně způsobených chyb DNA (Plevová *et al.*, 2009). Špatná funkce tohoto proteinu způsobuje časté transverze G:C na T:A (Al-Tassan *et al.*, 2002). Dvojitě mutace *MYH* byly nalezeny u 7 % pacientů s klinickou diagnózou klasické adenomatózní polypózy, avšak bez *APC* zárodečné mutace (Sieber a kol. 2003).

*Turcotův syndrom* je charakterizován výskytem mozkových tumorů (především gliomů) sdružených s adenomatózní polypózou tlustého střeva. Příčinou je mutace genů *APC* a *hMSH2*.

*Peutz-Jeghersův syndrom (PJS)*, autozomálně dominantní onemocnění, je charakterizován asociací gastrointestinálních polypů s mukokutánními pigmentacemi (Puchmajerová *et al.*, 2009). PJS přednostně postihuje tenké sřevo, ale objevuje se také v žaludku a tlustém střevě. Riziko vzniku dalšího nádoru gastrointestinálního traktu (GIT) činí 66%. U mužů je následkem této diagnózy zvýšené riziko nádorů varlat, u žen pak karcinomu mammy, ovarií a cervixu. Příčinou je mutace genu *STK11* (Tomlinson *et al.* Houston, 1997).

## 2.7 Molekulární cesty vzniku sporadického CRC

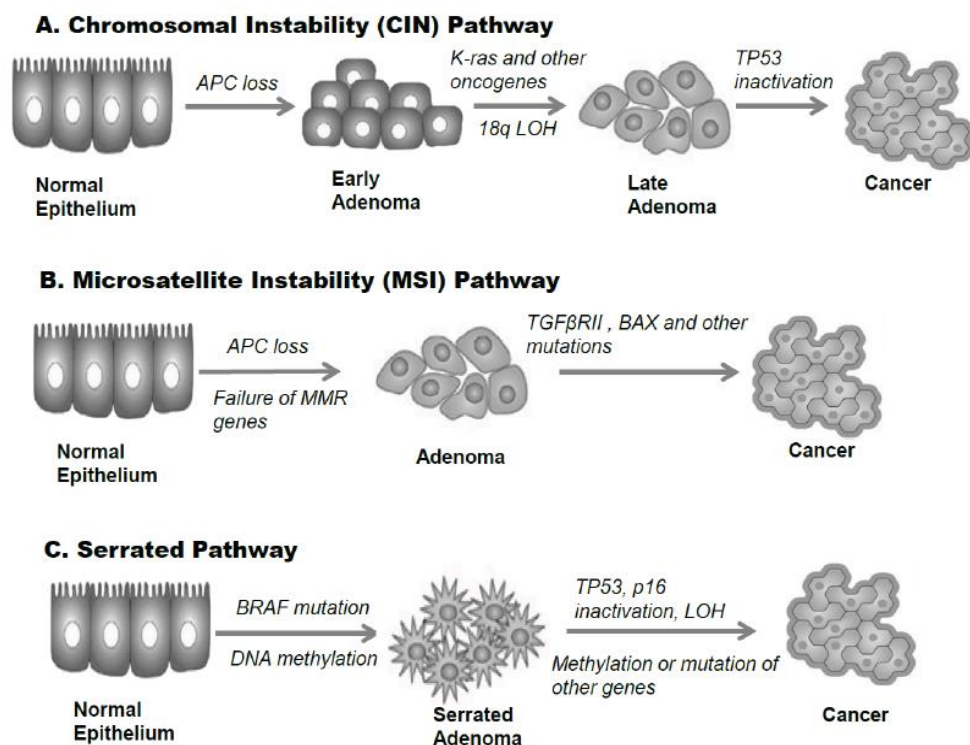
Sporadické formy CRC mohou vznikat z minimálně dvou různých karcinogenních drah. Tradiční cesta karcinogeneze nazývána jako supresorová (adenoma-carcinoma pathway) vyplývá z Fearon Vogelsteinova modelu a souvisí s mutacemi onkogenů a tumorsupresorových genů, jako je např. *K-RAS*, *APC*, *TP53*, *DCC* (Fearon *et al.* Vogelstein 1990). Tato cesta je také součástí chromozomální nestability (CIN).

Druhou hlavní cestou karcinogeneze je mutátorová dráha (MSI), která je přítomna v 15% všech případů sporadického kolorektálního karcinomu. Je charakterizována hromaděním mutací v mikrosatelitových sekvencích způsobených vadou MMR genů, nejčastěji *hMLH1*

nebo hMSH2. Zmíněné dvě cesty mají jasné molekulární rozdíly. Všeobecně, mutátorové nádory nejsou tak závažné jako supresorové. (Morán *et al.*, 2010).

Kolorektální karcinom vzniká v důsledku hromadění získaných genetických a epigenetických změn, které přeměňují žlázné epitelové buňky do invazních adenokarcinomů. Kroky, které přeměňují normální epitel na benigní neoplazie (adenomy), invazivní karcinom a případně dále v metastatický karcinom jsou popsány v klasickém progresním nádorovém modelu navrženém pány Fearonem Vogelsteinem (Vogelstein *et al.*, 1988) Od dob, kdy byl tento model navržen, naše chápání molekulární patogeneze značně pokročilo, což vedlo k jeho častým revizím. Původní model například navrhuje, že pouze benigní a tubulovilózní adenomy mají potenciál pokročit v invazivní adenokarcinom. V současné době je známo, že polypy, jako jsou přisedlé pilovité adenomy (sessile serrated adenomas - SSA) a tradiční pilovité adenomy (traditional serrated adenomas - TSA), mají také potenciál maligní transformace (Goldstein, 2006; Jass, 2004). Zmíněné polypy jsou „alternativní cestou“ vzniku malignity, přičemž podmnožina hyperplastických polypů se vyvíjí v pilovité nádory (SSA nebo TSA) a část těchto nádorů postupuje dále k vzniku rakoviny. Premaligní pilovité polypy častěji vznikají v proximální části tlustého střeva (Baker *et al.*, 2004) a jsou spojeny s mikrosatelitovou nestabilitou a DNA methylací v oblasti CpG ostrovů, zatímco konvenční benigní adenomy vznikají prostřednictvím bilaterální inaktivace tumor-supresorového genu APC a odráží chromozální nestabilitu CIN. Další molekulární postižení (léze), jako je například mutace genu *BRAF* V600E, je častěji identifikováno v nádorech vznikajících prostřednictvím "serrated neoplasia pathway" (Noffsinger, 2009). Tato cesta vzniká následkem hypermethylací genů, což má za následek zvýšenou MAPK / ERK signalizaci a tím i zvýšenou proliferaci buněk. Následná metylace jiných genů a ztráta tumor supresorových genů, jako je TP53, p16 aj. vede k dalšímu rozvoji CRC (**viz Obr. 2**).

**Obrázek 2:** Cesty vzniku kolorektálního karcinomu



Převzato z: [www.impactjournals.com/oncoscience/](http://www.impactjournals.com/oncoscience/)

### 2.7.1 Cesta chromozomální nestability - CIN

Chromozomální nestabilita je definována jako přítomnost numerické chromozomální změny nebo mnohonásobné strukturální aberace způsobené především poruchami mitózy (Walther *et al.*, 2008). V CRC je CIN nejčastější formou genomové nestability (Grady *et al.* Carethers 2008). 65-70 % sporadických CRC vykazuje zvýšenou úroveň zisku/ztráty celého chromozomu nebo jeho velké části, což vede ke karyotypové variabilitě mezi buňkami. Předpokládá se, že CIN fenotyp má dominantní charakter (Lengauer *et al.*, 1997, 1998), jelikož k jeho projevu stačí ztráta jedné funkční alely. Důsledkem CIN dochází k častým aneuploidiím, subchromozomálním genomovým amplifikacím a mnohdy také ke ztrátě heterozygoty (LOH) (Pino *et al.* Chung, 2010). Právě LOH odlišuje tumory vznikající následkem CIN od tumorů, které mají původ v MSI.

Jedním z mechanismů vedoucím k CIN jsou např. chyby v segregaci chromozómů v průběhu mitózy následkem mutací genů, které kódují proteiny plnící funkci regulátorů mitotického kontrolního bodu (MAD1L1, MAD2L1, BUB1, KIF11). Hypotéza vzniku aneuploidií podle Boveri, (2008) zahrnuje dva kroky. První Iniciující událostí (např. špatná

formace dělicího vřeténka) je nesprávný rozchod chromozómů. V druhém kroku pak aneuploidie destabilizují genom, dávají vznik klonálním mutacím a výsledkem je heterogenní fenotyp. Aneuploidie tedy stimulují tumorigenezi buďto zvýšením šance vzniku LOH tumorsupresorů nebo amplifikací onkogenů díky chromozomálním amplifikacím.

CIN fenotyp může vzniknout také následkem nestandardního počtu či funkce centromery nebo dysfunkcí telomery (Duesberg et al., 2004; Castillo et al., 2007). Rozsáhlé metaanalýzy dokázaly, že z klinického hlediska je CIN markerem špatné prognózy kolorektálního karcinomu. (Popat *et al.*, 2005; Walther *et al.*, 2008). Yan *et al.* (2002) a Kinzler *et Vogelstein* (2002), uvádí, že chromozomální nestabilita způsobuje ztátu wild type alely supresorových genů jako jsou *APC*, *P53* a *SMAD 4*, které za normálních okolností zabraňují vzniku maligního fenotypu. Burrell *et al.* (2013) však tvrdí, že CIN může nastat prostřednictvím DNA replikačního stresu. To znamená, že rozdíl mezi CIN a MSI nemusí být tak výrazný, jak se předpokládalo dříve.

#### **2.7.1.1 Supresorová cesta / adenoma – carcinoma pathway**

Ve většině případů vznikají karcinomy z již existujících adenomů. Fearon *et Vogelstein* (1990) navrhli model kolorektální karcinogeneze, který vzájemně propojuje specifické genetické změny s vyvíjející se tkáňovou morfologií. Z modelu je evidentní, že každý krok od normální sliznice ke karcinomu zahrnuje konkrétní genetické změny.

V ranném vývojovém stádiu CRC se po inaktivaci nádorového supresoru Adenomatous polyposis coli (*APC*) začínají tvořit banální nádory. Inaktivující mutace v *APC* genu zahajují proces vzniku nádoru, jelikož způsobují vznik abnormální tkáně ve střevním epitelu, ze které se později mohou vyvíjet rané adenomy (Snustad *et al.*, 2009). Aktivace protoonkogenů *K-ras* je spojena s přechodem raného adenomu ve střední adenom. Genomové změny jako je ztráta chromozomu 18, spolu se ztrátou *DCC* genu (deleted in colon cancer), způsobí přechod středního adenomu v pozdní adenom. Následná ztráta nádorového supresoru *p53* (*TP53*) a zisk chromozomu 8q jsou spojeny s transformací adenomu v karcinom. Schopnost nádoru metastazovat vyžaduje ztrátu chromozomu 8p, která je spojena s přechodem karcinomu v metastatický karcinom (Fearon *et Vogelstein*, 1990; Kinzler *et Vogelstein* 1996; Grady, 2004).

Tento lineární model se později vyvinul v komplexnější, složitý, mechanický přístup (Gatenby *et Vincent*, 2003), který zahrnuje 3 základní principy cesty Adenoma-carcinoma – k zahájení tumorigeneze je potřeba více genetických zásahů (Pino *et Chung* 2010; Haigis *et*

*al.*, 2008), progresse CRC se účastní několik diskretních poslů a adenomy vznikají z ACF v epitelu tlustého střeva (Takayama *et al.*, 1998).

### **2.7.1.2 Geny zapojené v supresorové cestě**

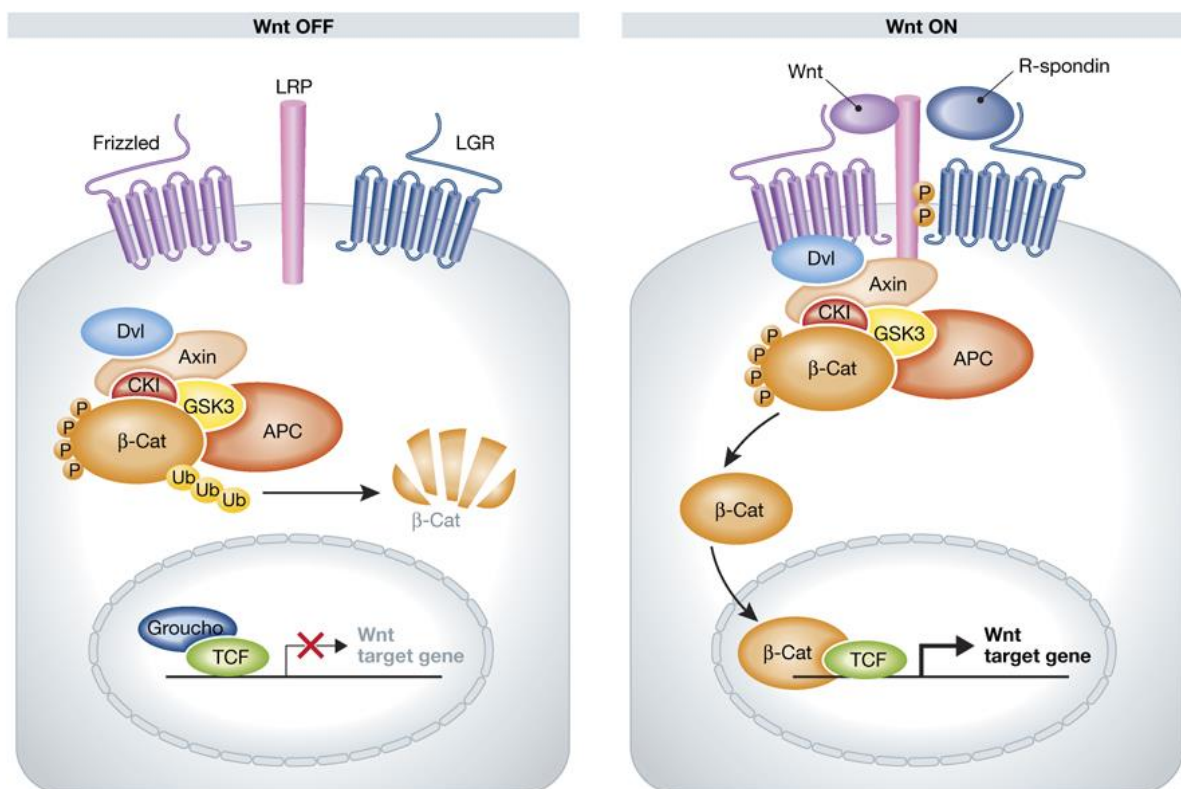
V exonech CRC bylo nalezeno přes 80 somatických mutací, z nichž přibližně 15 iniciuje nádorovou progresi a/nebo udržování nádoru (Wood *et al.*, 2007). Mezi nejvýznamnější geny (onkogeny a tumorsupresory) somaticky mutovanáné v CRC patří např. *APC*, *KRAS* a *P53* o kterých se zmiňují v následujících odstavcích.

*APC* gen tvoří 15 exonů a je mutovaný v 82 % případech rakoviny tlustého střeva a konečníku (Jess, 2002). Protein *APC* má nejvýznamnější roli ve Wnt signální dráze, kde je součástí multiproteinového komplexu. K přenosu signálu tato dráha využívá signální molekulu  $\beta$ -katenin. Pokud nedojde k navázání ligandu na receptor, vzniká destrukční komplex, který je tvořen proteinem axinem na který se váže *APC*, glykogen syntáza kináza 3 $\beta$  (GSK - 3 $\beta$ ), a kasein kináza 1 (CK1). Tento komplex fosforyluje a následně ubikvitinuje  $\beta$ -katenin, který je následně degradován v proteasomu (Polakins, 2000). Jednou z hlavních příčin narušení multiproteinového komplexu je mutace v *APC*. Ztráta *APC* způsobuje nedostatečné odbourávání a akumulaci  $\beta$ -kateninu v cytoplazmě, který poté tvoří komplex s DNA vazebnými proteiny TCF/LEF a vstupuje do jádra, kde řídí transkripci tumorsupresorových genů (Barker, 2008). Cílové geny Wnt dráhy mohou být např. geny regulující buněčný cyklus (cyklin D, c-Myc), některé geny související s progresí nádorů a gastrin (Wong *et Pignatelli*, 2002) (**viz Obr. 3**).

Ztráta *APC* může ovlivňovat správnou regulaci mitózy a přispět k chromozomální nestabilitě (Worthley *et a.*, 2007). *APC* tedy souvisí s karcinogenezí na různých úrovních: zaujímá významnou roli ve Wnt dráze, ovlivňuje cytoskelet, buněčnou polaritu segregaci chromozomů, ztrátu buněčné adheze a apoptózu.

Alternativním mechanismem inaktivace *APC* genu může být hypermetylace jeho promotoru, která je přítomna u 18 % CRC (Esteller *et al.*, 2000).

**Obrázek 3:** APC a Wnt dráha



Převzato z: <http://emboj.emboress.org/content/embojnl/31/12/2685/F5.large.jpg>

Proto-onkogen K-ras je člen rodiny malých RAS G-proteinů, kterou tvoří K-RAS4A, K-RAS4B, H-RAS a N-RAS. Protein Ras je součástí mnoha buněčných procesů, je zapojen do drah správné proliferace a diferenciaci a zprostředkovává signalizaci z receptorů růstových faktorů, jako je např. receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) (Malumbres *et* Barbacid 2003), na transdukční signální dráhy. Jednou z významných drah, které je K-ras součástí může být např. mitogen aktivovaná protein kinázová dráha (MAPK). K-ras je aktivní pouze ve vazbě s GTP. Jednonukleotidové bodové mutace uzamknou enzym v GTP vazbě, což vede k jeho konstitutivní aktivaci a následné aktivaci transkripčních faktorů regulujících např. cyklin D1, který je zapojen do kontroly buněčného cyklu. K-ras mutace se často nacházejí v ACF, ale jejich přítomnost k iniciaci vzniku adenomu není nutná (Pretlow *et* Pretlow 2005). Následkem získané mutace v K-ras mohou buňky během vývoje CRC ztratit svou polaritu a dochází pak k oslabení buněčných adhezích (Smakman *et al.*, 2005). Mutantní K-ras podporuje hyperplastický růst epitelu tlustého střeva (Vogelstein *et al.*, 1988, Leslie *et al.*, 2002), což potvrzuje nález K-ras mutací u 35 – 42% velkých adenomů kolorektálního karcinomu.

TP53 je umístěn na chromozomu 17 a kóduje transkripční faktor, který je tumorsupresorem a zároveň hlavním regulátorem DNA metabolismu, apoptózy, fagocytózy, stárnutí, angiogeneze, imunitní odpovědi, diferenciaci buněk aj. dysfunkce p53 je v humánních nádorech téměř univerzální. V CRC se TP53 účastní přechodu adenomu v karcinom (Leslie *et al.* 2002). Změny v TP53 byly uvedeny u 4-26 % adenomů a 50 – 75% adenokarcinomů. Protein p53 blokuje buněčný cyklus a spouští G1 fázi buněčného cyklu, což umožňuje opravovat chyby DNA vzniklé během replikace následkem stresu. Pokud je poškození DNA tak závažné, že jej nelze opravit, je schopen indukovat apoptózu (Pietsch *et al.*, 2008).

DCC (Deleted in colon cancer) je tumor-supresorový gen, lokalizovaný na chromozomu 18, jehož alelickou ztrátu vykazuje asi 70% CRC (Takayama *et al.*, 2006). Exprese tohoto genu je v CRC často snižena (Mehlen *et al.*, 2004). DCC protein je transmembránový receptor superrodiny Ig pro netriny, což jsou faktory zapojené v axonálním vedení nervového systému. Mimo jiné má DCC také význam v intracelulární signalizaci (Chen *et al.*, 1999).

TGF- $\beta$  je jedním z nejsilnějších přirozeně se vyskytujících inhibitorů buněčného růstu. Signální dráha působí přes transmembránový receptor typu I (TGFBR1) a membránový receptor typu II (TGFBR2). Intracelulární signalizace se aktivuje po vytvoření heterodimerického komplexu TGFBR1-TGFBR2, které indukují TGF- $\beta$  (Shi *et al.*, 2003). Mutace v TGF- $\beta$  ovlivňují transkripci genů zapojených do buněčného růstu, diferenciaci, produkce matrix, imunitního dohledu a apoptózy (Massague, 1996). TGF- $\beta$  signalizace může být narušena delecemi nebo mutacemi v tumorsupresorových genech pro SMAD proteiny lokalizovaných na chromozomu 18 což je běžně deletovaná oblast adenokarcinomů střev. Mutace TGFBR2 se vyskytují u mnoha typů kolorektálních karcinomů (Markowitz *et al.*, 1995, Lu *et al.*, 1998) a korelují s progresí adenomu v karcinom (Grady *et al.*, 1998).

### **2.7.1.3 BRAF**

Gen *BRAF* je člen rodiny RAF kináz, který na molekulární úrovni působí prostřednictvím vazby na RAS geny (Deschoolmeester *et al.*, 2010). *BRAF* kóduje *BRAF* protein, který pomáhá přenášet chemické signály z vnějšího prostředí buňky do buněčného jádra. Mutace tohoto genu hrají důležitou roli ve vývojovém modelu CRC, dříve popsáném jako „serrated neoplastic pathway“ neboli cestě mikrosatelitové nestability. Tato cesta vzniku



CRC zahrnuje mutace v signální kaskádě RAS / RAF / MEK / ERK, která reguluje růst, proliferaci, diferenciaci, pohyb a apoptózu buněk (Mason *et al.*, 1999).

Nejčastější mutací genu *BRAF* v humánních nádorech, je V600E (Cantwell-Dorris *et al.*, 2011). Tato mutace v genu *BRAF* vyústí v substituci valinu za kyselinu glutamovou v poloze 600 (V600E) v *BRAF* proteinu. *BRAF* V600E vyvolává strukturní změny, které způsobí zvýšenou aktivitu *BRAF* proteinu (Loupakis *et al.*, 2009) i v nepřítomnosti jakéhokoli extracelulárního podnětu, což umožňuje buňce, aby se stala soběstačnou ve vlastní regulaci růstových signálů (podpora růstu nádorových buněk). *BRAF* V600E tak může získat až 500x vyšší aktivitu. (Wan *et al.*, 2004). Přítomnost mutace *BRAF* V600E je významným prognostickým faktorem pro celkové přežití pacientů s CRC ve II/III stádiu, zejména pak u nádorů s MSI-L nebo MSS Roth *et al.*, 2010).

Davies *et al.* (2002) identifikovali aktivující mutace v *BRAF*, které zahrnovaly z 80 % mutaci *BRAF* V600E. Mutace způsobuje buněčný růst i v nepřítomnosti funkčních RAS genů, čím se odlišuje od ostatních *BRAF* mutací (Davies *et al.*, 2002). U pacientů s CRC se *BRAF* V600E nevyskytuje v přítomnosti KRAS mutace, k přežití buněk tedy musí zůstat alespoň jedna z těchto drah neporušena. (Deschoolmester *et al.*, 2010; Nagasaka *et al.*, 2008). Nádory s mutacemi onkogenu RAS jsou rezistentní vůči léčbě EGFR inhibitory, proto mohou mutace v proto-onkogenu RAS předpovědět úspěšnost zvolené léčby (Roth *et al.*, 2010; Peeters *et al.*, 2010). U pacientů s kolorektálním karcinomem KRAS wild type se významně zlepšila prognóza po zavedení cílených molekulárních léků jako je anti-EGFR (anti-epidermal growth factor) (Van Cutsem *et al.*, 2011). Nádory s mutací KRAS nebo *BRAF* mají odlišná specifika (Davies *et al.*, 2002; Fansén *et al.*, 2004; Rajagopalan *et al.*, 2002). KRAS mutací disponují nádory s agresivnějším fenotypem a méně příznivými klinickými výsledky (Benhattar *et al.*, 1993; Kikuchi *et al.*, 2009).

#### **2.7.1.4 PI3K signální dráha a role PIK3CA v průběhu karcinogeneze CRC**

PI3K (fosfatidyl-inositol-3-kináza) – intracelulární lipidová kináza a její zásadní role v buněčných funkcích důležitých v progresi rakoviny a onkogenezi, byla objevena před více než dvaceti lety. (Whitman *et al.*, 1985; Engelman *et al.* 2006) Změny, které vedou ke zvýšené signalizaci PI3K, patří k nejčastějším změnám nalezených v humánních nádorech. Tato dráha má důležitou roli v brzkých a pozdních stádiích CRC (Samuels *et al.*, 2004). Známe 3 třídy PI3 kináz, které se liší strukturou a funkcí. Třída Ia, s nejčastějším výskytem v humánních nádorech, se skládá z regulační (p85) a katalytické (p110) podjednotky (Yuan *et al.*, 2008). Geny PIK3R1, PIK3R2 a PIK3R3 kódují různé izoformy regulační

podjednotky p85, zatímco katalytické podjednotky p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  a p110 $\gamma$  kódují geny *PIK3CA*, *PIK3CB* a *PIK3CD*. (Engelman *et al.* 2006; Katso *et al.*, 2001). PI3K běžně aktivují somatické mutace, které se nejčastěji nachází na *PIK3CA* a *PIK3CB* v nádorových buňkách (Samuels et Velculescu, 2004).

Vzhledem k současnému efektivnímu screeningu a diagnostice CRC je mnoho pacientů diagnostikováno již v časných stádiích tohoto onemocnění (Maringe *et al.*, 2013). Použití adjuvantní (pomocné) chemoterapie je považováno za standard stabilizovaných pacientů nacházejících se ve III stádiu onemocnění. U pacientů ve II stádiu nejsou tyto výhody systémové terapie doloženy (Labianca *et al.*, 2010). Dle několika histopatologických a molekulárních charakteristik klasifikujeme pacienty ve II stádiu jako případy s nízkým či vysokým rizikem recidivy, což pomáhá při rozhodování, zda nasadit chemoterapii či ne. Nově se nyní diskutuje o tom, zda těmto pacientům podávat monoterapii či kombinaci chemoterapie Proto jsou zapotřebí nové prognostické a prediktivní biomarkery, k zlepšení výběru těchto pacientů a data naznačují, že *PIK3CA* může být významným faktorem tohoto rozdělení (Labianca *et al.*, 2010; Tournigand *et al.*, 2012).

Analýzy tkání polypů a kolorektálních karcinomů prokázaly přítomnost mutací v genu *PIK3CA* v 6 % nemaligních lézích, což naznačuje, že k těmto genetickým změnám dochází v časných fázích (primárních událostech) tumorigeneze CRC (Velho *et al.*, 2008). Počet vzorků nemaligních lézí však byl nedostačující, proto je požadováno potvrzení těchto výsledků. V jiném článku jsou *PIK3CA* mutace popsány jako pozdní události v „adenomacarcinoma“ sekvenci (Samuels *et al.*, 2004).

Mutace v *PIK3CA* jsou přítomny v přibližně 15 až 20% z tlustého střeva a konečníku (Whitman *et al.*, 1985; Samuels et Velculescu, 2004). Zvýšená exprese PI3K zvyšuje aktivitu PTGS2 a syntézu prostaglandinu E2, což vede k inhibici apoptózy u nádorových buněk tlustého střeva. Aspirin může potlačit růst rakovinných buněk a vyvolat jejich apoptózu zablokováním PI3K dráhy (Uddin *et al.*, 2010) K průzkumu potencionálního využití aspirinu jako adjuvantní léčby u vybraných pacientů s CRC Liao *et al.*, 2012 analyzovali 964 pacientů, kteří podstoupili resekci CRC na přítomnost mutace *PIK3CA*. Autoři prokázali, že pravidelné užívání aspirinu u pacientů s nádory s mutací v genu *PIK3CA* celkově zvyšuje přežití. U pacientů s wild type *PIK3CA* užívání aspirinu přežití neovlivňuje (Liao *et al.*, 2012). Ochrannou roli aspirinu u pacientů s mutací v genu *PIK3CA* následně potvrdili Domingo *et al.*, 2013, kteří podrobili analýze 896 vzorků v rozsáhlé randomizované klinické studii a

prokázali, že pravidelné užívání aspirinu po diagnóze CRC je spojeno se sníženou mírou recidivy u *PIK3CA* mutantních pacientů.

### 2.7.2 MSI

Mikrosatelity jsou krátké repetitivní sekvence DNA opakující se tandemově v celém genomu. Délka mikrosatelitů se v rámci jednoho jedince nemění, mezi různými jedinci se však lišit může. Pokud délka mikrosatelitových sekvencí v rámci jedince kolísá, označuje se tento stav jako nestabilita mikrosatelitů (MSI). Stupeň MSI se stanovuje dle mezinárodních kodifikovaných markerů. Rozlišují se stavy se stabilními mikrosatelity (microsatellite stable, MSS), s nízkým stupněm nestability (microsatellite instability – low, MSI-L) a s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů (microsatellite instability – high, MSI-H) ( Boland *et al.*, 1998).

MSI nádory, které vznikají touto cestou (také nazývané jako Replication Error, RER +), jsou charakterizovány Obrovským hromaděním mutací v mikrosatelitových sekvencích. Výskyt mutací v MSI nádorových buňkách je 100 až 1000 krát častější ve srovnání s normálními buňkami (Pawlik *et al.*, 2004). Tyto posunové mutace (frameshift mutations) jsou způsobeny prvotním defektem MMR genů a přítomnost MSI je již fenotypický důkaz o tom, že MMR systém nepracuje správně (Geiersbach *et Samowitz*, 2011). MMR systém představuje minimálně sedm tumor supresorových genů, mezi které patří *hMLH1*, *hMLH3*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* a *hPMS2* (Hoeijmakers, 2001). MMR proteiny tvoří komplex, který se váže do chybné oblasti DNA, identifikuje její správný řetězec a poté chybu vystříhne a opraví (Geiersbach *et Samowitz*, 2011). Pokud jsou MMR proteiny funkční, opraví chyby vzniklé „sklouznutím“ DNA polymerázy v mikrosatelitových sekvencích během replikace. Nejčasnější událostí v MSI progresi CRC je stejně jako u CIN ztráta funkce APC proteinu (Armaghany *et al.*, 2012).

MSI (mutátorová) dráha byla navržena jako alternativní karcinogenní mechanismus CIN dráhy (Thibodeau *et al.*, 1993) a je přítomna v přibližně 15% - 20% sporadických CRC.

MSI-H vzniká inaktivací obou alel jednoho genu. (velké zastoupení tandemových repetitivních). Nárůst tisíců mutací charakteristických pro MSI-H fenotyp vyžaduje inaktivaci MMR genů. Zárodečné mutace nebo epigenetické změny v *hMLH1* (převážně umlčováním způsobeným metylací) a *hMSH2* jsou nejčastější příčinou MSI-H u sporadického CRC (a také v HNPCC). Mutace *hMSH6* jsou méně časté a změny ostatních MMR genů jsou jen velmi vzácné (Imai *et Yamamoto*, 2008). Tyto údaje podporují myšlenku, že ztráta exprese proteinů

*hMLH1* a *hMSH2* je spojena s úplnou inaktivací MMR systému, zatímco vady v jiných proteinech způsobují pouze částečnou deficienci MMR (Hoeijmakers, 2001).

### 2.7.2.1 MSI-H

Mezinárodní kritéria pro klasifikaci nádorů jako MSI-H byla zavedena v roce 1998 (Boland *et al.*, 1998). Pro definování nádorové skupiny MSI-H byla navržena skupina pěti mikrosatelitových sekvencí která se skládá ze dvou mononukleotidových opakování (BAT26 a A4725) a tři dinukleotidových opakování (D5S346, D2S123, a D17S250). MSI-H nádory jsou definovány nestabilitou ve dvou nebo více markerech a MSI-L nádory jsou definovány nestabilitou v jednom markeru. Mikrosatelitovou stabilitu (MSS) definuje nepřítomnost jakékoliv nestability v těchto pěti lokusech. Ve srovnání s normální tkání je nestabilita definována jako změna libovolné délky v důsledku buď to inserce nebo delece repetitivních jednotek, v rámci mikrosatelitu uvnitř nádoru.

Pacienti s MSI-H nádory mají odlišné klinické a histopatologické projevy. Je proto důležité určit pacientovu individuální cestu karcinogeneze. Samowitz *et al.* (2001) uvádějí, že MSI-H je častější u jedinců s kolorektálním karcinomem diagnostikovaným před dosažením věku 55 let, nebo ve věku nad 70 let, než u pacientů ve věku mezi 55 – 70 lety. Nicméně, tyto údaje nebyly potvrzeny jinými autory (Ribic *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2003). MSI-H nádory jsou umístěny převážně na pravé straně tlustého střeva (Jeong *et al.*, 2003; Raut *et al.*, 2004) a obecně byla četnost nádorů vyšší u žen (Samowitz *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2001). MSI-H CRC jsou obvykle charakteristické větší hloubkou invaze, ale nižším celkovým vývojovým stupněm nádoru (Gryfe *et al.*, 2000; Greenson *et al.*, 2003; Raut *et al.*, 2004).

MSI je také spojováno s přítomností bohaté lymfocytální infiltrace a méně častým výskytem metastáz (Jeong *et al.*, 2003; Greenson *et al.*, 2003; Buckowitz *et al.*, 2005). Další studie ukázaly, že MSI-H nádory se vyskytují častěji v tumorech mukózního typu (Ward *et al.*, 2001; Leopoldo *et al.*, 2008; Yearsley *et al.*, 2006).

MSI-H sporadické kolorektální karcinomy nevykazují velké cytogenetické abnormality a obvykle nejsou aneuploidní (Eshleman *et al.*, 1998) Tento typ nádorů se projevuje sníženou četností mutace (až její absencí nebo alelickou ztrátou) genů APC, K-ras a p53, obvykle pozmeněných v "supresorové" cestě, a ztrátou heterozygoty na 5q, 17p a 18q (Jass *et al.*, 2002). Místo toho jsou mutace popsány v mikrosatelitních sekvencích přítomných v genech zapojených do kolorektální karcinogeneze, jako *TGFβRII* (Markowitz *et al.*, 1995) *IGF2R* (Souza *et al.*, 1996), *BAX* (Rampino *et al.*, 1997), *MSH3* (Yamamoto *et al.*, 1997), *MSH6* (Yamamoto *et al.*, 1997), *caspase 5* (Schwartz *et al.*, 1999), *APC* (Fang *et al.*, 2002),

*β-catenin* (Kitaeva *et al.*, 1997), *BCL-10* (Simms *et al.*, 2000). Řada normálně fungujících genů je navíc umlčena metylací. Většina sporadických nádorů MSI-H vykazuje CpG metylovaný fenotyp, charakterizovaný rozšířenou DNA hypermethylací (Jass *et al.*, 2002).

Mnoho autorů uvádí, že pacienti s MSI-H karcinomy mají lepší prognózu, než ti s MSI-L nebo MSS (Samowitz *et al.* 2001; Ribic *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2001; Benatti *et al.*, 2005), ačkoli někteří mají jiný názor (Ko *et al.*, 1999; Salahsor *et al.*, 1999). Prognostické zvýhodnění, dané přítomností MSI-H bylo nejvíce zřejmé ve II a III stádiu onemocnění CRC (Benatti *et al.*, 2005). Jedinci se vzdálenými metastázemi (IV stádium), kteří disponovali MSI-H v genu TGF-βR II měli lepší výsledky ve srovnání s těmi s nativním (wild type) TGF-β II (Samowitz *et al.* 2001). MSI status se považuje jako předpověď pozitivního výsledku nezávisle na stádiu nádoru a léčbě pacientů (Gryfe *et al.*, 2000). Z tohoto důvodu je MSI-H fenotyp spojován s dobrou prognózou nezávisle na molekulární biologii (zárodečné mutace nebo transkripční umlčování přes hypermethylace) (Raut *et al.*, 2004). S ohledem k této rozdílné prognóze u pacientů s nádory MSI-H a MSI-L nebo MSS by mohlo být přijato terapeutické rozhodnutí, které by limitovalo podstupování 5-FU chemoterapie u pacientů s MSI-H, která jim kromě škodlivých vedlejších účinků nepřináší žádné výhody.

Jak tedy navrhl Banerjea *et al.*, (2009), klasifikace kolorektálního karcinomu podle MSI statusu by mohla mít také prognostický význam u pacientů podstupujících běžnou léčebnou terapii.

### **2.7.2.2 MSI-L**

Jak již bylo uvedeno, MSI-L nádory (nazývané také jako nádory mírného mutátorového fenotypu), jsou definovány nestabilitou v jednom markeru v pěti dohodnutých (daných) mikrosatelitových sekvencích (Boland *et al.*, 1998). Existence a role MSI-L zůstává sporná. Někteří autoři považovali MSI-L nádory za mezistupeň mezi MSI-H a MSS. Yearsley *et al.* (2006) nenalezli žádný rozdíl mezi MSI-L a MSS. Proto tyto izolované mikrosatelitní změny nemohou představovat indikátory genomové nestability, ale mohou být užitečnými markery klonality nebo mitotické aktivity. Mutace v MSI-L nádorech mohou představovat pozadí genetické nestability přítomné ve všech nádorech. (Perucho *et al.*, 1999). Podle kritérií pro klasifikaci dle *National cancer Institute workshop* by po analýze dostatečného počtu markerů, všechny ostatní nádory, kromě těch s MSI-H vykazovali MSI-L. Avšak Halford *et al.* (2002) našli změnu na úrovni MSI v „non-MSI-H“ CRC a navrhli, že tyto rozdíly jsou kvantitativní a

pravděpodobně odráží spíše evoluční historii nádorů než kvalitativní rozdíly genetických drah zastoupených v procesu tumorogeneze.

Molekulární charakteristiky MSI-L se více podobají nádorům s MSS než MSI-H. Jako příklad můžeme uvést K-ras mutaci, která se vyskytuje častěji u MSI-L než u MSI-H kolorektálních karcinomů (Jass *et al.*, 1999). Analýza mutací vyskytujících se v MSI-H cílových genech ukázala, že nejsou přítomny v MSI-L nádorech. (Imai *et Yamamoto*, 2008) tvrdil, že MSI-L nádory mohou být uznány jako odlišná molekulární fenotypická kategorie, dle toho, jaké molekulární změny, odlišné od MSI-H a MSS představují. Někteří autoři již prokázali existenci specifických markerů pro MSI-L jako je MYCL a D2S123, které jsou mutované ve vyšší míře mimo MSI-H (Laiho *et al.*, 2002).

Další články naznačují, že MSI-L nádory představují jedinečnou entitu. MSI-L je spojeno se ztrátou exprese proteinu *O (6)-methylguanin-DNA metyltransferázy*. Jako pravděpodobný mechanismus MSI-L byla navržena ztráta této methyltransferázy a ztráta exprese *MLH1* (Spring *et al.*, 2006; Whitehall *et al.*, 2001). Whitehall *et al.*, (2001) tvrdí, že umlčení *O (6)-methylguanin-DNA metyltransferázy* předurčuje geny k mutacím a nastává nejčastěji v MSI-L CRC. MSI-L je spojena s častou nestabilitou v trinukleotidové oblasti RAS-indukované senescence 1 (Iglesias *et al.*, 2006) a je nezávislým prognostickým faktorem CRC ve třetím stádiu (Kohonen – Corish *et al.*, 2005). Mori *et al.* (2003) potvrdili existenci MSI-L nádorů jako odlišnou molekulární fenotypovou kategorii.

### **2.7.3 CIPM (CpG island methylator phenotype) metylační fenotyp**

DNA metylace spočívá v navázání metylové skupiny na cytosin v páté pozici (C5) pyrimidinového kruhu uvnitř CpG dinukleotidů, čímž vzniká 5-metylcytosin (5mC), který je daleko méně stabilní. Deaminací 5mC vzniká thymin, deaminací nemetylovaného cytosinu vzniká uracil. Úseky bohaté na CpG se nazývají CpG ostrovy, kde C označuje cytozin, G guanin a p mezi nimi značí jejich fosfodiesterovou vazbu (Snustad *et Simmons*, 2009). Nemetylované CpG ostrůvky se vyskytují v lidských genových promotorech, v oblastech repetitivních a transpozonů (Sharma *et Jones*, 2010; Markowitz *et Bertagnolli*, 2009; Van Engeland *et al.*, 2011), ojediněle jsou však CpG dinukleotidy ve zbytku genomu methylované (chromozóm X, embryonální buňky) (Jones *et Liang*, 2009). K hypermethylaci CpG ostrůvků dochází v průběhu stárnutí či karcinogeneze (následek Obrácení profilu metylace).

Metylační fenotyp je typický pro CRC. V kolorektálním karcinomu dochází k poklesu cytosinové metylace a neobvykle vysoké methylaci CpG ostrůvků v promotorech tumor supresorových genů, čímž je potlačena transkripce daného genu (methylace znemožní navázání

transkripčních faktorů do cílového místa a iniciovat transkripci). Somaticky epigenetická inaktivace blokuje expresi MLH 1 ve sporadickém kolorektálním karcinomu s mikrosatelitovou nestabilitou. Molekulární mechanismus zůstává neznámý, ale jev byl opakovaně pozorován u 15 % pacientů s kolorektálním karcinomem a je přítomen v téměř všech nádorech s aberantní metylací MLH 1 (Weisenberger *et al.*, 2006).

DNA hypermethylace v CpG-bohatých oblastech promotorů jsou běžným znakem humánních nádorů (Issa, 2004). Karcinomy se liší v závislosti nárůstu metylace. Nádory s velkým nárůstem methylace označované jako CIMP představují klinicky a etiologicky zvláštní skupinu (Issa, 2004; Toyota *et al.*, 1999). Sporadické nádory s MSI-H jsou spojeny s hypermethylací v promotorové oblasti *hMLH1* (Thibodeau *et al.*, 1998). Bialelická promotorová methylace *hMLH1* je převládající příčinou MSI-H u sporadických nádorů. Tyto nádory pouze zřídka vykazují LOH nebo somatické mutace (Tuupanen *et al.*, 2007). MSI-H CRC s metylovaným *hMLH1* jsou odlišné od ostatních nádorů svým pozdním propuknutím a asociací s ženským pohlavím (Malkhosyan *et al.*, 2000).

Mezi CIMP a MSI-H existuje značný přesah. CIMP metylační fenotyp byl předpokládaným vysvětlením umlčování genu *hMLH1* u karcinomů s MSI-H (Leung *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2005). Nicméně, přítomnost a role CIMP byla sporná (Yamashita *et al.*, 2003; Issa *et al.*, 2005). Využitím velkého souboru vzorků vzorků pacientůs CRC (864), byl stanoven biologický význam CIMP (Samowitz *et al.*, 2005). Jako CIMP-high (CIMP-H) byly definovány nádory s metylací více než tří z pěti molekulárních markerů *CDKN2A*, *MINT1*, *MINT2*, *MINT31* a *MLH1*. CIMP-H byla významně spojena s *BRAF* a *KRAS* mutací, starším věkem a lokalizací v proximální části tlustého střeva. Ve srovnání s MSS/CIMP-H nádory, MSI-H/CIMP-H nádory měly podstatně vyšší pravděpodobnost zisku B-raf mutace, wild type K-ras a p53.

MSS/CIMP-H nádory měly méně intenzivní methylace a K-ras mutace. Samowitz *et al.*, (2005) dospěli k závěru, že MSI-H má velký vliv na expresi CIMP. Podle postupného systematického screeningu 195 CpG ostrovních methylačních markerů pomocí MethyLight, Weisenberger *et al.* (2006) zjistil, že CIMP + nádory reprezentují zřetelnou část, která zahrnuje téměř všechny případy nádorů s *BRAF* mutací. Mutace *BRAF* pravděpodobně kosegreguje s CIMP-H a může být použita jako náhrada za CIMP-H (Jass *et al.*, 2006). Sporadické CRC s MSI-H se vznikají téměř výhradně jako následek CIMP-asociované methylace *hMLH1*. Při použití expresního profilování v kombinaci s epigenetickým skenováním, Mori *et al.*, (2004) identifikovali unikátně metylované geny *RAB32* a *PTPRO* v

CRC s MSI-H a určili je jako „MSI-H karcinom specifické hypermetylace“. Největším problémem při zjišťování, zda mohou genetické faktory vysvětlit CIMP je absence dohodnuté definice CIMP (Jass *et al.*, 2006). Byla navržena nová skupina markerů (*CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3* a *SOCS1*) ke klasifikaci CIMP+ nádorů (Weisenberger *et al.*, 2006).

CRC s méně rozsáhlou methylací promotoru, označené jako "CIMP low (CIMP-L) ", jsou spojovány s mužským pohlavím a Kras Mutací (Ogino *et al.*, 2006). Hypotézu, že CIMP-L nádory jsou odlišné od CIMP-H a CIMP je třeba potvrdit.



### 3 Cíle práce

1. Vytvořit literární přehled o vzniku kolorektálního karcinomu
2. Podrobněji popsat geny *BRAF* a *PIK3CA* na které se zaměřuje praktická část
3. Cíleně vyhledat aktivační mutace v genech *BRAF* a *PIK3CA*
4. Sumarizovat výsledky a porovnat jejich výskyt v analyzovaném souboru s publikovanými výsledky v odborných časopisech.

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Biologický materiál

Pro experimentální část bakalářské práce byly použity zamražené vzorky kolorektálního karcinomu z Laboratoře Agel a.s., NSP Nový Jičín a.s. a Komplexního onkologického centra Nový Jičín. Biologický materiál byl skladován v hluboko mrazicím boxu při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro detekci *BRAF* V600E mutace a aktivační mutace v genu *PIK3CA* bylo použito 88 vzorků.

#### 4.1.2 Přístroje

SpeedMill P12 (AnalytikJena, Německo)

QuickGene-Mini80 (Fuji, Japonsko)

Spektrofotometr *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific, UK)

Chlazená stolní centrifuga *Centrifuge 5424* (Eppendorf, Německo)

Stolní centrifuga *Multi-Spin* (Biosan, Litva)

Chlazená centrifuga *Centrifuge 5840* (Eppendorf, Německo)

Termocycler *Multigene* (LabNet, USA)

*Light cycler 480 II* (Roche, Švýcarsko)

*ABI 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA)

Vortex *BIO Vortex VI* (Biosan, Litva)

Lednice *UR 400* ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  - Nordline, Česká republika)

Mrazicí box *BioMidi RF 625* ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  – Bioline, UK)

#### 4.1.3 Spotřební materiál

Mikropipety (10  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 1000  $\mu\text{l}$  – Eppendorf, Německo)

Jednorázové špičky s filtrem (10  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 1000  $\mu\text{l}$  – Bioplastics, Nizozemí)

Mikrozkumavky (1,5 a 0,2 ml – Bioplastics, Nizozemí)

Stojan na mikrozkumavky (Bioplastics, Nizozemí)

Mikrotitrační destičky pro PCR (Bioplastics, Nizozemí)

Fólie na mikrotitrační destičky (Bioplastics, Nizozemí)

Jednorázové rukavice *SensiPlus* (Vulkan-medicals, Česká republika)

#### 4.1.4 Chemikálie a použité roztoky

PCR water (Bioline, UK)

QuickGene DNA tissue kit, *Quick gene* (Kurabo, Japonsko)

eQ-PCR™ *BRAF* V600E Detection Kit (TrimGen, USA)

*PIK3CA* Mutation Analysis Reagents *Mutector™ Mutation detection kit* – (TrimGen, USA)

Human genomic DNA (koncentrace 200 ng/μl – Bioline, UK)

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Izolace DNA z řezů z nativní tkáně

Izolace DNA byla provedena ze zmražené nádorové tkáně od pacientů s kolorektálním karcinomem na přístroji QuickGene – Mini80. Přístroj využívá ultra tenké polymerní membrány umístěné ve specifické mikrozkuhavce pro efektivní zachycení nukleových kyselin pomocí tlaku. Na izolaci DNA byl použit modifikovaný protokol QuickGene DNA tissue kit – Kurabo .

#### Postup izolace:

Tkáň nakrájená sterilním skalpelem byla nejprve přenesena do sterilní mikrozkuhavky a homogenizována v homogenizátoru SpeedMill P12 (AnalytikJena, Německo) za použití ocelových kuliček. Poté bylo do mikrozkuhavky přidáno 180 μl MDT a 20 μl EDT a vše bylo důkladně zvortexováno. Následovala inkubace přes noc při 59 °C. Po inkubaci bylo přidáno 180 μl LDT a vše bylo opět důkladně zvortexováno. Další inkubace trvala 10 min při 70 °C. Poté bylo přidáno 240 μl 96% etanolu. Roztok byl zvortexován a pulzně centrifugován.

Takto připravený lyzát byl zpracován na přístroji pro izolaci DNA QuickGene – Mini80. Lyzát byl přenesen do cartridge a protlačen pod tlakem přes filtr. Poté bylo do cartridge přidáno 750 μl WDT a protlačeno pod tlakem přes filtr. Tento proces promývání 750μl WDT byl následně zopakován dvakrát. Posledním krokem byla eluce, kdy se cartridge-holder přesunul do pozice „eluce“. Po tomto nastavení bylo do cartridge přidáno 50 μl CDT, který byl protlačen přes filtr. Takto získaná genomická DNA byl skladována krátkodobě při +4°C v lednici a dlouhodobě při -20 °C v mrazáku .

#### 4.2.2 Detekce *BRAF* mutace pomocí eQ-PCR

Detekce *BRAF* V 600E mutace ve vzorcích DNA byla prováděna patentovanou technologií eQ-PCR (enhanced Quantitative-PCR) pomocí eQ-PCR™ *BRAF* V600E Detection kitu (TrimGen). Test je založen na systému Real-time PCR za použití speciální chemii, která zesiluje fluorescenční signály.

#### Pracovní postup :

Součástí eQ-PCR™ *BRAF* V600E Detection kitu (TrimGen) byly tyto reagencie: PCR Mix 4 obsahující reakční činidla k DNA amplifikaci, *BRAF*-TP obsahující mix primerů a sond k detekci mutace *BRAF* V 600E, *BRAF*-WT CTL obsahující kontrolní DNA pro *BRAF* wild type, *BRAF*-Mut CTL obsahující kontrolní DNA k identifikaci *BRAF* V600E mutanta a dále NF Water (nuclease-free).

K přípravě standardů byla použita kontrolní DNA k identifikaci *BRAF* V600E mutanta (*BRAF*-Mut CTL - součást kitu) o koncentraci 20 ng/μl. Ředěním této DNA byly připraveny jednotlivé standardy (viz Tab. 1).

**Tabulka 1:** Standardy

| zkumavka   | množství <i>BRAF</i> -Mut CTL [ng] |
|------------|------------------------------------|
| Standard 1 | 20                                 |
| Standard 2 | 10                                 |
| Standard 3 | 5                                  |
| Standard 4 | 1                                  |

K přípravě kontrol byla použita kontrolní humánní DNA o koncentraci 200 ng/μl (Bioline, UK). K úspěšnému provedení reakce dle manuálu se však musí koncentrace DNA pohybovat v rozmezí 10 - 80 ng/μl. Pro výsledný objem 100 μl bylo použito 10 μl humánní DNA a 90 μl vody. Takto naředěná DNA o výsledné koncentraci 20 ng/μl byla použita k přípravě kontrol (viz Tab. 2).

**Tabulka 2:** Kontroly

| zkumavka   | koncentrace <i>BRAF</i> -Mut CTL v celkové koncentraci 20 ng DNA [%] | množství humánní DNA [ng] | množství do plazmidu vloženého standardu [ng] |
|------------|--|---------------------------|---|
| Kontrola 1 | 30   | 14                        | 6   |
| Kontrola 2 | 20   | 16                        | 4   |
| Kontrola 3 | 10   | 18                        | 2   |
| Kontrola 4 | 5  | 19                        | 1   |
| Kontrola 5 | 4  | 19,2                      | 0,8   |
| Kontrola 6 | 3  | 19,4                      | 0,6   |
| Kontrola 7 | 2  | 19,6                      | 0,4   |
| Kontrola 8 | 1  | 19,8                      | 0,2   |

Příprava master mixu (MM) pro polymerázovou řetězovou reakci byla provedena podle manuálu (**viz Tab. 3**) na jeden vzorek. Celkový objem MM byl vždy vypočítán podle počtu vzorků, standardů, kontrol, pozitivního a negativního vzorku a blanku. Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky byl MM rozpipetován po 11,5  $\mu$ l. Poté byly do jednotlivých jamek destičky nanášeny pozitivní a negativní kontroly, standardy, kontroly o různé koncentraci V600E DNA (**viz Tab. 2**), vzorky pacientů a sterilní voda do blanku po 1  $\mu$ l podle aktuálního protokolu. Konkrétní příklad jednoho vyšetření je uveden v **Tab. 4**. Po důkladném zalepení průhlednou fólií byla mikrotitrační destička vortexována a centrifugována po dobu 5 s při 3000 rpm.

**Tabulka 3:** Složení master mixu

| chemikálie          | objem pro 1 reakci |
|---------------------|--------------------|
| NF water            | 4,75 $\mu$ l       |
| PCR Mix 4           | 6,25 $\mu$ l       |
| <i>BRAF</i> -TP     | 0,5 $\mu$ l        |
| Vzorek DNA          | 1 $\mu$ l          |
| <b>Objem reakce</b> | <b>12,5</b>        |

**Tabulka 4:** Schéma pipetování jedné konkrétní sady vzorků na mikrotitrační destičku

|          | 1                     | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9                    | 10     |
|----------|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------------|--------|
| <b>A</b> | <i>BRAF</i> – Mut CTL | S1     | S2     | S3     | S4     | K1     | K2     | K3     | <i>BRAF</i> – WT CTL | DNA 20 |
| <b>B</b> | SM 652                | SM 647 | SM 646 | SM 645 | SM 644 | SM 506 | SM 642 | SM 637 | SM 635               | SM 633 |
| <b>C</b> | SM 629                | SM 628 | SM 626 | SM 625 | BL     |        |        |        |                      |        |

Legenda:*BRAF*-Mut CTL – Mutant

K1- kontrola (10 % V600E)

S1 – standard (c = 20 ng/μl V600E)

K2 - kontrola (5 % V600E)

S2 – standard (c = 10 ng/μl V600E)

K3 - kontrola (2 % V600E)

S3 - standard (c = 5 ng/μl V600E)

*BRAF* – WT CTL – wild type DNA

S4- standard (c = 1 ng/μl V600E)

DNA 20 – Human DNA (20 ng/100μl)

Pzn.: koncentrace (c) je uvedena vždy pro

SM 652 – 625 - jednotlivé vzorky DNA

*BRAF*-Mut CTL

Po krátké centrifugaci byla destička vložena do Light cycleru 480 II s předem navoleným teplotním profilem (**viz Tab. 5**)

**Tabulka 5:** Teplotní profil PCR reakce

| krok | čas    | teplota | cykly |
|------|--------|---------|-------|
| 1    | 15 min | 95 °C   | 1     |
| 2    | 15 s   | 95 °C   | 40    |
| 3    | 30 s   | 62 °C   |       |
| 4    | 35 s   | 72 °C*  |       |

\* sběr fluorescenčního signálu

Používaný kit detekuje mutaci V600E s FAM značenou sondou a wild type próba je značena barvičkou VIC.

**4.2.3 Detekce mutací v *PIK3CA***

Mutector™ II PI3K Mutation Analysis Reagents (TrimGen) využívá vlastní technologii Shifted Termination assay (STA) k detekci těchto mutací: E542K (G1624A, exon 9), E545K (G1633A, exon 9), E545G (A1634G, exon 9), H1047R (A3140G, exon 20), H1047L (A3140T, exon 20).

Shifted termination assay (STA) je „multi-base primer extension“ metoda. Mutační analýza založená na STA technologii využívá Mutector<sup>TM</sup> činidla obsahující speciální chemii a modifikovanou směs enzymů, která zesiluje mutační signál až dvacetkrát, což umožňuje detekovat i přítomnost 1% mutací ve wild type pozadí, na rozdíl od Sangerova sekvenování, které obvykle vyžaduje 10 – 20 % mutací k jasné detekci. Mutace je rozpoznána specifickými primery, vysoce senzitivními enzymy a speciálními nukleotidy. STA reakce rozpoznává cílovou sekvenci (mutantní nebo WT) a selektivně rozšiřuje detekční primer o 1 – 20 různě fluorescenčně značených nukleotidů pro zesílení signálu. Reakce se opakuje dvacetkrát k dalšímu zesílení mutačního signálu. Tímto způsobem mohou být detekovány i nízkostupňové mutace, které často nejsou registrovatelné běžným sekvenováním.

Prodloužené STA fragmenty jsou separovány kapilární elektroforézou na přístroji ABI 3130 Genetic Analyzer a následuje analýza dat pomocí GeneMapper softwareu. Mutace jsou potvrzeny jak barvou „píku“, tak i jeho velikostí.

Mutector<sup>TM</sup> II Assay zahrnuje 4 základní kroky – PCR amplifikaci, purifikaci PCR produktu, ST (shifted termination) reakce a separaci vzorku.

### **Provedení:**

Detekce mutací v *PIK3CA* byla prováděna patentovanou technologií Shifted Termination Assay pomocí kitu Mutector<sup>TM</sup> II PI3K Mutation Analysis Reagents. Součástí kitu byly tyto reagenty: Master mix obsahující reagenty k DNA amplifikaci, PCR-P 08 obsahující PCR primery k amplifikaci genu *PIK3CA*, C-UP1 obsahující mix enzymů k purifikaci PCR produktů, C-UP1 Buffer obsahující pufr pro C-UP1, ST-D obsahující předem namíchané ST reagenty k detekci mutace, DP-08 obsahující detekční primery pro gen *PIK3CA*, M-08 obsahující mutantní a wild type kontrolu DNA pro gen *PIK3CA* a Loading bfx obsahující nanášecí pufr pro kapilární elektroforézu v sekvenátoru ABI a speciální fluorescenčně značený velikostní standard. Doporučená koncentrace DNA pro úspěšné provedení reakce byla v rozmezí 20-80 ng/μl.

### **Krok 1 - PCR amplifikace**

Příprava MM pro polymerázovou řetězovou reakci byla provedena podle manuálu (**viz tab. 6**) na jeden vzorek. Celkový objem MM byl vždy vypočítán podle počtu vzorků, pozitivní a negativní kontroly. Do 1,5 ml mikrozkušavky byl nejprve připraven MM, který byl následně rozpipetován po 19μl do 0,2 ml mikrozkušavek. Poté byl přidán 1 μl negativní kontroly do mikrozkušavky označené „NEG“ a 1 μl pozitivní kontroly do mikrozkušavky

označené „POS“, do zbývajících mikrozkuvek byl přidán 1  $\mu$ l vzorku DNA. Mikrozkuvky byly vloženy do termocykléru s předem nastaveným teplotním profilem PCR reakce (**viz Tab. 7**).

**Tabulka 6:** Složení master mixu

| chemikálie          | objem pro 1 reakci          |
|---------------------|-----------------------------|
| Master mix          | 18 $\mu$ l                  |
| PCR-P O8            | 1 $\mu$ l                   |
| Vzorek DNA          | 1 $\mu$ l                   |
| <b>Objem reakce</b> | <b>20 <math>\mu</math>l</b> |

**Tabulka 7:** Teplotní profil PCR

| krok             | čas   | teplota | cykly |
|------------------|-------|---------|-------|
| 1                | 5 min | 94 °C   | 1     |
| 2                | 30 s  | 94 °C   | 35    |
| 3                | 30 s  | 52 °C   |       |
| 4                | 30 s  | 72 °C   |       |
| 5                | 5 min | 72 °C   | 1     |
| Zastavení reakce | 4 °C  |         |       |

### **Krok 2 - Purifikace PCR produktů**

Přenesením a smícháním C-UP1 pufru do mikrozkuvky s C-UP byl připraven C-UP1 mix. Následně byly připraveny mikrozkuvky (odpovídající počtu vzorků). Do každé mikrozkuvky označené číslem vzorku bylo napipetováno 11  $\mu$ l C-UP1 mixu a 4  $\mu$ l PCR produktu do příslušných mikrozkuvek. Poté byly mikrozkuvky zvortexovány, zcentrifugovány a inkubovány v termocykléru s předem nastaveným programem (**viz Tab. 8**).



**Tabulka 8:** Teplotní profil inkubace – (C-UP treatment)

| krok             | čas    | teplota | cykly |
|------------------|--------|---------|-------|
| 1                | 25 min | 37 °C   | 1     |
| 2                | 5 min  | 95 °C   | 1     |
| Zastavení reakce | 4 °C   |         |       |

**Krok 3 - Detekce mutací**

Do 1,5 ml mikrozkušavky byl připraven ST mix dle **Tab. 9**. Pro každý přečištěný vzorek byla připravena jedna mikrozkušavka a jedna mikrozkušavka navíc pro M-08 mutantní kontrolu, která byla popsána jako „CTL“. Do každé mikrozkušavky bylo rozpipetováno 13 µl ST mixu a následně 2 µl purifikovaného PCR produktu do příslušné mikrozkušavky. Poté byly přidány 2 µl M-08 do mikrozkušavky označené jako CTL. Vzorky byly zvortexovány, zcentrifugovány a vloženy do termocykléru s předem nastaveným programem (**viz Tab. 10**), kde proběhla ST reakce.

**Tabulka 9:** Příprava ST mixu

| chemikálie               | objem pro 1 reakci |
|--------------------------|--------------------|
| ST-D                     | 11 µl              |
| DP-08                    | 2 µl               |
| Vzorek DNA (PCR produkt) | 13 µl              |
| <b>Objem reakce</b>      | <b>15 µl</b>       |

**Tabulka 10:** Teplotní profil ST reakce

| krok             | čas   | teplota | cykly |
|------------------|-------|---------|-------|
| 1                | 4 min | 95 °C   | 1     |
| 2                | 20 s  | 95 °C   | 20    |
| 3                | 30 s  | 62 °C   |       |
| 4                | 20 s  | 72 °C   |       |
| Zastavení reakce | 4 °C  |         |       |

#### **Krok 4 - Fragmentační analýza**

Fragmentační analýza byla provedena pomocí přístroje ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Do každé jamičky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 15  $\mu$ l nanášecího pufru. Poté bylo do každé jamky přidáno 5  $\mu$ l produktu ST reakce. Připravená destička byla vložena do přístroje a výsledná data byla hodnocena programem GeneMapper/GeneScan.

## 5 Výsledky

V experimentální části bakalářské práce byly cíleně analyzovány aktivační mutace ve dvou genech *BRAF* a *PIK3CA*.

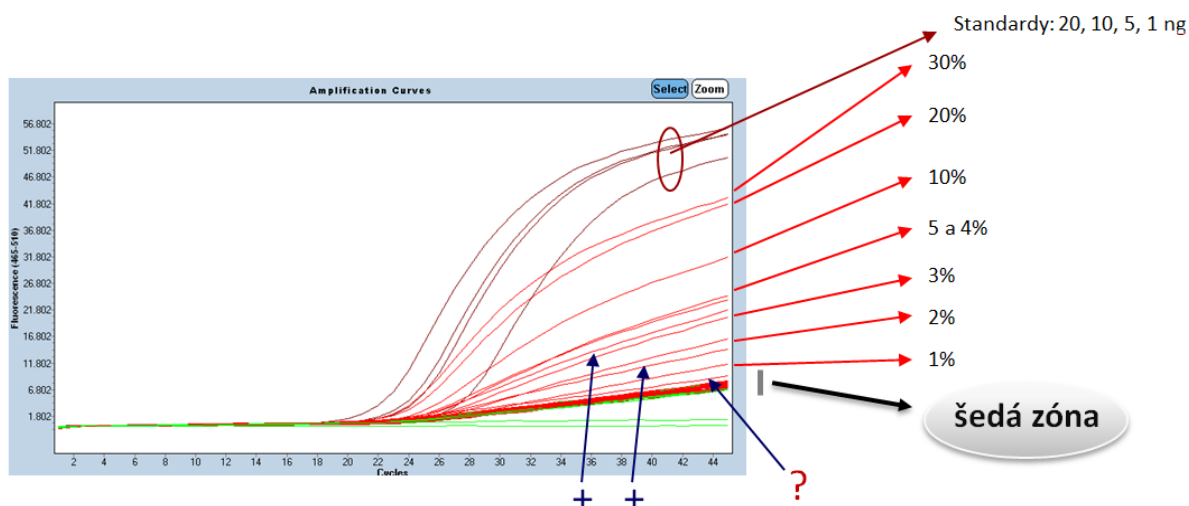
Vyšetřeno bylo celkem 88 vzorků pacientů s kolorektálním karcinomem. V genu *BRAF* byla hledána mutace V600E, v genu *PIK3CA* byly hledány mutace: c.1624 G>A (p.Glu542Lys), c.1633 G>A (p.Glu545Lys), c.1634 A>G (p.Glu545Gly) a c.3140 A>G (p.His1047Arg), c.3140 A>T (p.His1047Leu).

Nalezeno bylo celkem 5 *BRAF* pozitivních vzorků, což představuje 5,68 % a 3 *PIK3CA* pozitivních vzorků, což představuje 4,55 %.

### 5.1 Výsledky výskytu V600E v genu *BRAF* v souboru vyšetřených vzorků

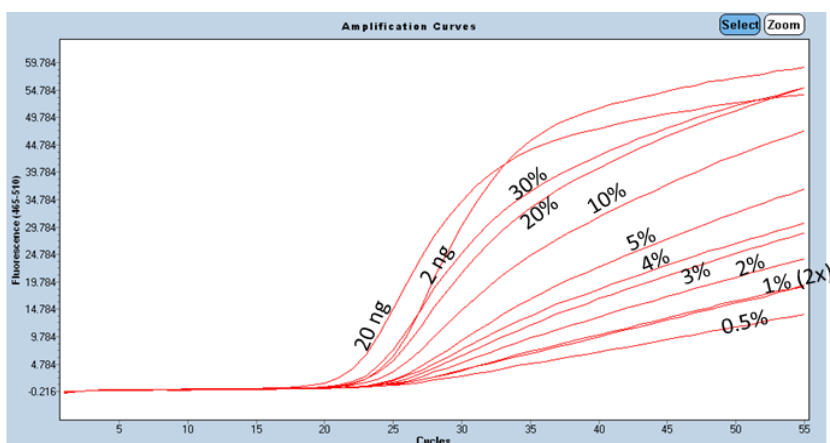
V první fázi experimentu byly vytvořeny standardy (viz Tab. 1) a kontroly (viz Tab. 2) k správnému hodnocení výsledků. Na Obr. 4a jsou zobrazeny standardy, kontroly a také dva pozitivní vzorky označeny jako „+“, které byly nalezeny v jedné konkrétní sadě vyšetřovaných vzorků. Negativní vzorky představují všechny amplifikační křivky, které dosáhly svého maxima pod hranicí 1% kontroly.

Obr. 4a: Výsledky amplifikace standardů a kontrol



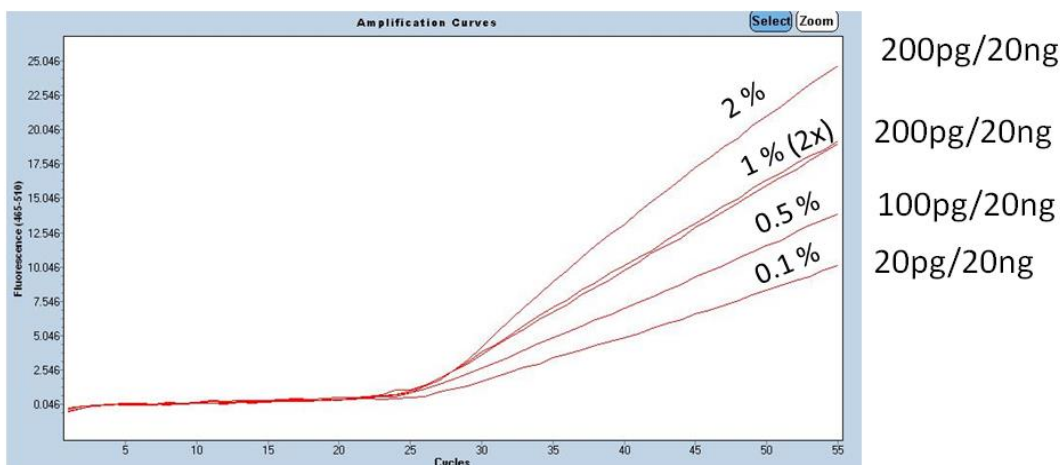
Na Obr. 4b sledujeme amplifikaci jednotlivých kontrol s daným zastoupením mutované DNA paralelně se dvěma standardy o koncentraci 20 ng a 2 ng. Při experimentu s nízkou koncentrací V600E mutace byl sledován tvar amplifikační křivky.

**Obr. 4b:** Vytváření kontrol



Jak je vidět na **Obr. 4c** od 2 až po 0,1% zastoupení V600E je exponenciální fáze nevyrazná ve srovnání vyššími koncentracemi. Při 2% zastoupení mutací v celkovém množství DNA 20 ng je obsah mutované DNA 400 pg, při 1% zastoupení 200 pg, při 0,5% zastoupení – 100 pg a při 0,1% zastoupení 20 pg.

**Obr. 4c** Přiblížení amplifikačních křivek jednotlivých kontrol



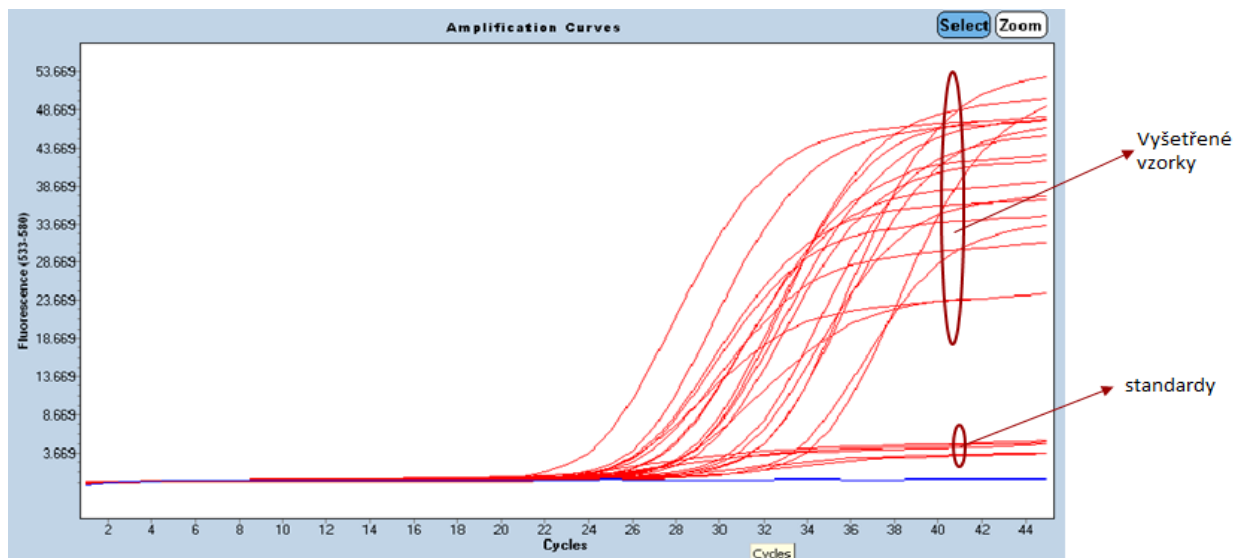
V další fázi experimentu bylo analyzováno 88 vzorků pacientů s CRC. V tomto souboru bylo nalezeno celkem 5 V600E pozitivních nádorů, což představuje 5,68 %.

Konstrukce kitu, jak je popisována v kapitole „Materiál a metodika“, vylučuje falešnou negativitu použitím dvou sond: FAM - „mutovaná sonda“ a VIC - „wt sonda“.

**Obr. 5a** demonstruje správnou amplifikaci všech vzorků v kanálu pro detekci VIC (533 - 580 nm) a na **Obr. 5b** můžeme vidět v kanálu FAM (465 -510 nm) záchyt dvou

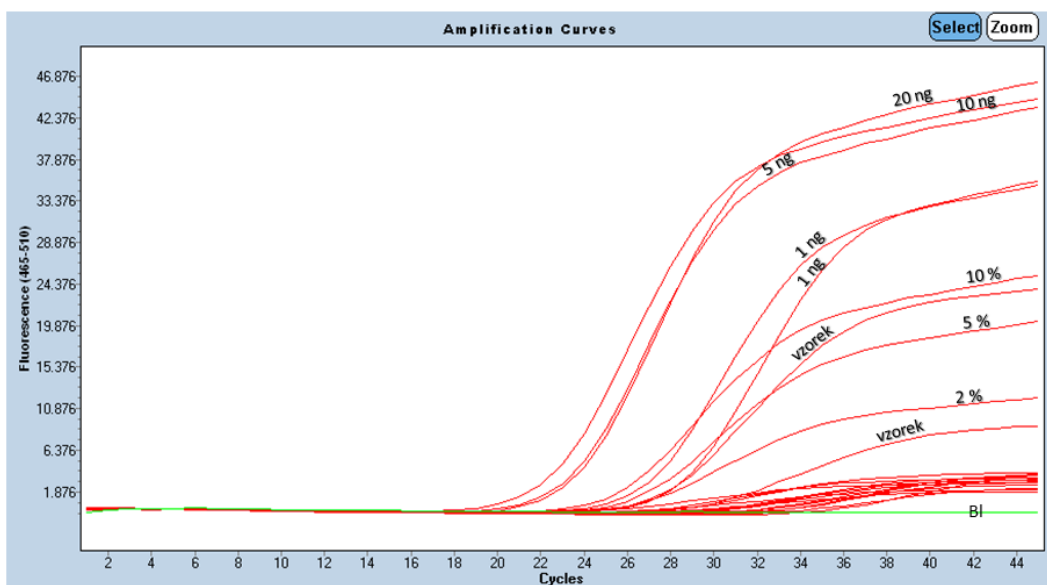
pozitivních vzorků (v Obrázku vyznačeno popisem „vzorek“ u konkrétní amplifikační křivky).

**Obr. 5a:** Sledování VIC signálu při amplifikaci WT DNA.



Legenda: analyzované vzorky pacientů CRC (vyšetřené vzorky); plazmidové standardy obsahující mutace (20 ng, 10 ng, 5 ng, 1ng)

**Obr. 5b:** Sledování FAM signálu při amplifikaci mutovaných vzorků



Legenda: analyzované vzorky s pozitivním záchytem mutace (vzorek); plazmidové standardy obsahující mutace (20 ng, 10 ng, 5 ng, 1ng); Blank (Bl); kontroly s humánní DNA (10 %, 5 %, 2 %).

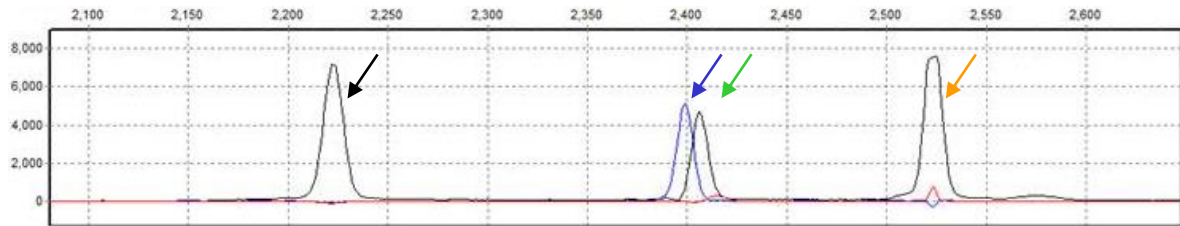
### 5.1 Výsledky hledání mutací v genu *PIK3CA* v souboru vyšetřených vzorků

Při hledání mutací v genu *PIK3CA* byly nalezeny 4 mutace v souboru 88 vzorků pacientů s CRC (4,55 %). Tři mutace byly detekovány v kodonu 545: c.1634 A>G (p.Glu545Gly) ve dvou případech a c.1633 G>A (p.Glu545Lys) v jednom vzorku. Čtvrtá mutace byla lokalizována v kodonu 1047: c.3140 A>G (p.His1047Arg).

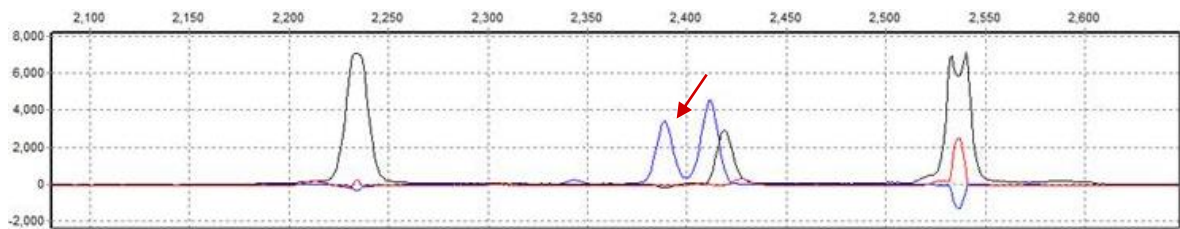
Nalezené mutace jsou vidět na **Obr. 6**. Při negativním výsledku (**Obr. 6a**) je vidět pouze wild type pro mutaci Glu542Lys (černá šipka), wild type pro mutaci Glu545Gly (modrá šipka), wild type pro mutaci Glu545Lys (zelená šipka) a wild type pro mutace His1047Arg a His1047Leu (žlutá šipka). Nalezené mutace v souboru jsou označeny červenými šipkami: c.1634A>G (p.Glu545Gly) – **Obr. 6b**, c.1633G>A (p.Glu545Lys) na **Obr. 6c** a c.3140A>G (p.His1047Arg) - **Obr. 6d**.

**Obr. 6:** Nalezené mutace v genu *PIK3CA*

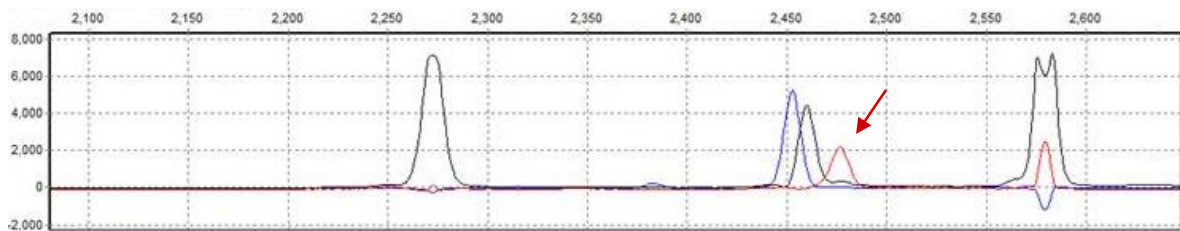
a) wt



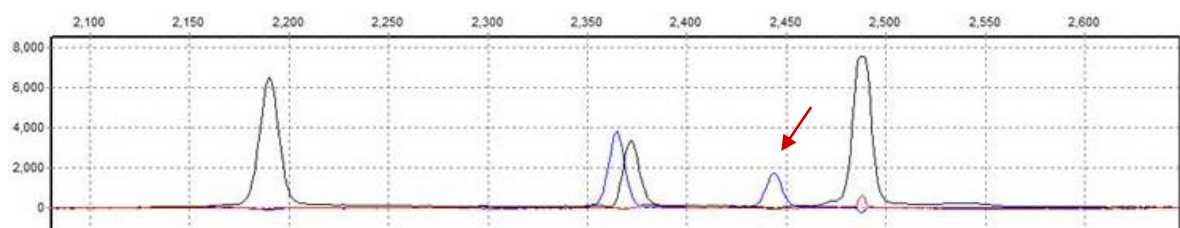
b) c.1634A>G (p.Glu545Gly)



c) c.1633G>A (p.Glu545Lys)



d) c.3140A>G (p.His1047Arg)



Legenda: různobarevné špičky ukazují mutace nebo jejich wild type formy (viz text).

## 6 Diskuze

V této bakalářské práci byla provedena rešerše o vzniku CRC, který patří mezi nejrozšířenější nádorová onemocnění. Vznik CRC je vícestupňový vývojový proces, který zahrnuje mnoho genetických a epigenetických změn na různých úrovních. Tyto změny mají za následek narušení správné funkce signálních drah kontrolujících důležité buněčné funkce.

V současné době se v léčbě CRC využívá různých režimů chemoterapie a několika léků ze skupiny cílené biologické terapie. Cílená léčba se zaměřuje právě na signální dráhy a buněčné procesy probíhající charakteristicky v nádorových buňkách (Tomášek *et* Halámková, 2013). Vyžadována je identifikace genetických změn, které mají prediktivní funkci, za účelem výběru pacientů, kterým tato léčba může pomoci. Cílem léčby mohou být efekторы růstových faktorů (EGF), přenašeče vázané na membránu (*KRAS*, *HRAS*), cytoplazmatické přenašeče signálů aj. V progresi kolorektálního karcinomu mají největší význam patologické aktivace signálních drah spojených s EGFR, ke kterým mohou vést aktivující mutace genů *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* či inaktivace tumor supresorového genu *PTEN* (Fabián *et* Berkovcová, 2011). Pro cílenou léčbu metastatického CRC (mCRC) monoklonálními protilátkami proti EGFR je vyžadováno vyšetření genu *KRAS* (Šimová *et al.*, 2011), který je důležitým prediktorem rezistence k terapii cetuximabem a panitumumabem. Mutace *KRAS* se vyskytuje u 35 – 45 % CRC. Z hlediska předpovědi odpovědi na anti EGFR jsou v současnosti jediným validovaným markerem k testování mCRC somatické mutace genu *KRAS* (Van Cutsem *et al.* 2009). V nádorech, které nemají mutovaný gen *KRAS*, může být rezistence k anti-EGFR cílené terapii spojena s mutacemi v genech *BRAF*, *PIK3CA* či se ztrátou exprese proteinu PTEN (Fabián *et* Berkovcová, 2011).

Jedním z prediktivních faktorů rezistence k anti-EGFR je s největší pravděpodobností mutace V600E v genu *BRAF*, která má současně negativní prognostický význam a předpovídá horší průběh onemocnění bez ohledu na použitou léčbu. Přesto však V600E není prediktivní k zahájení léčby běžnými chemoterapeutiky ani pro fluorouracilovou terapii. Cílená léčba proti *BRAF* není možná díky vrozené rezistenci CRC proti léčbě cílené výhradně na *BRAF*. Východiskem k překonání rezistence může být kombinovaná terapie zahrnující současnou inhibici více signálních drah, např. *BRAF* a MEK a PI3K / mTOR (Thiel *et* Ristimäki, 2013).

Procesu karcinogeneze se účastní také PI3K signální dráha (Samuelset *al.*, 2004). Mutace genu *PIK3CA* jsou přítomny v 10 – 20 % CRC. Více než 80 % mutací se nachází ve dvou „hot spot“ místech, kterými jsou helikázová doména v exonu 9 (kodon 542 a 545) a kinázová doména v exonu 20 (kodon 1047) (Cathomas, 2014). Současné mutace *PIK3CA* v



exonu 9 a 20 naznačují agresivní chování nádoru (Liao *et al.*, 2012). Zvýšená exprese PI3K posiluje aktivitu PTGS (prostaglandin-endoperoxid syntáza 2) a syntézu prostaglandinu E2, což vede k inhibici apoptózy v nádorových buňkách (Kaur *et Sanyal*, 2010). Studie prokázaly, že pravidelné užívání aspirinu po stanovení diagnózy CRC s přítomností mutace v *PIK3CA* je spojeno s lepšími klinickými výsledky a omezenou úmrtností těchto pacientů (Liao *et al.*, 2012). Aspirin může potlačit růst nádorových buněk tím, že inhibuje PTGS2, což vede ke snížení signalizační aktivity PI3K dráhy (Uddin *et al.*, 2010). Uvažuje se také využití aspirinu jako adjuvantního léčiva a také možnost, že mutační status *PIK3CA* může sloužit jako nádorový biomarker, který předpovídá kladnou odpověď na adjuvantní léčbu aspirinem (Liao *et al.*, 2012).

*PIK3CA* mutace však mají pouze minoritní význam jako samostatné prognostické markery lepší prognózy CRC (Cathomas, 2014). Vzhledem k tomu, že CRC představuje heterogenní skupinu komplexních onemocnění (Ogino *et al.*, 2011), není možné vysvětlit chování nádoru na základě jednoho nebo několika biomarkerů (Chan *et Ogino*, 2009; Chan *et al.*, 2007). Kladná odpověď na léčbu aspirinem také významně souvisí se stádiem nádoru, jelikož k mutacím v *PIK3CA* dochází až v pozdějších fázích tumorogeneze (Liao *et al.*, 2012). Pacienti s mutovaným *PIK3CA* vykazují také velkou odolnost vůči EGFR terapii (Cathomas, 2014). *PIK3CA* mutace může mít také mírně nepříznivý vliv na přežití u pacientů s *BRAF* wild type nádory.

V experimentální části bakalářské práce byla provedena cílená mutační analýza v genech *BRAF* a *PIK3CA*, za účelem stanovení jejich zastoupení v CRC.

V analyzovaném souboru 88 vzorků byla mutace V600E v genu *BRAF* nalezena s frekvencí 5,68% (5/88). Substitute c.1799T>A způsobuje záměnu valinu na kyselinu glutamovou (p.Val600Glu). Valin v pozici 600 se nachází v aktivačním segmentu kinázové domény. Mutace v tomto kodonu zvyšují kinázovou aktivitu a transformační potenciál *in vitro* (<http://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/BRAF/54/>).

Odborná literatura uvádí zastoupení této mutace v rozmezí 3 – 15 % (Laurent-Puig *et al.*, 2009; Qi Li *et al.*, 2006; Faris *et al.*, 2012), což odpovídá našemu výsledku. Přesnější informace lze získat analýzou většího souboru.

V analyzovaném souboru vzorků byly dále nalezeny 4 mutace v genu *PIK3CA*, což odpovídá 4,54 % (4/88). Tři mutace byly detekovány v kodonu 545: c.1634 A>G (p.Glu545Gly) dvakrát a c.1633 G>A (p.Glu545Lys). Čtvrtá mutace byla lokalizována v kodonu 1047: c.3140 A>G (p.His1047Arg). Kyselina glutamová v pozici 545 se nachází v helikální doméně *PIK3CA*. Mutace způsobující záměnu na glycin nebo lysin zvyšují

katalytickou aktivitu proteinu, čímž akcelerují přenos signálu na efekторы a následně onkogenní transformaci. Záměna histidinu v pozici 1047 v kinázové doméně na arginin rovněž zvyšuje katalytickou aktivitu (<http://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/PIK3CA/11/>).

V odborné literatuře se uvádí výskyt mutací *PIK3CA* v kolorektálním karcinomu se zastoupením 7 – 20 % (Šimová *et al.*, 2011; Rosty *et al.*, 2013; Cathomas, 2014). Námi nalezaná frekvence mutací je nižší, což je s největší pravděpodobností zapříčiněno analýzou malého souboru vzorků také tím, že jsme sledovali výskyt pouze 4 mutací.

## 7 Závěr

Tato práce se zabývá problematikou karcinomu tlustého střeva a konečníku. V teoretické části se zaměřuje na biologické základy vzniku tohoto onemocnění. Praktická část se soustředí na vyhledávání vybraných aktivačních mutací ve genech *BRAF* a *PIK3CA* v nádorových tkání.

Po provedené cílené mutační analýze celkového souboru 88 vzorků pacientů s kolorektálním karcinomem byly v genech *BRAF* a *PIK3CA* nalezeny následující mutace: V600E v genu *BRAF* byla detekována u 5 vzorků s frekvencí 5,68% (5/88) a mutace v genu *PIK3CA* u 5 vzorků což odpovídá 4,55 % (4/88). 3 mutace *PIK3CA* byly nalezeny v kodonu 545. Ve dvou případech byla odhalena mutace c.1634 A>G (p.Glu545Gly) a mutace c.1633 G>A (p.Glu545Lys) byla nalezena v jednom vzorku. Čtvrtá mutace c.3140 A>G (p.His1047Arg) byla detekována v kodonu 1047.

Frekvence nalezené aktivační mutace V600E v genu *BRAF* se shoduje s výsledky publikovanými v odborných časopisech. Četnost nalezených *PIK3CA* mutací je nižší než udávají publikace, což je s největší pravděpodobností zapříčiněno analýzou malého souboru vzorků také sledováním výskytu pouze čtyř mutací.

## 8 Seznam použité literatury

- Al-Tassan, N., Chmiel, N. H., Maynard, J., Fleming, N., Livingston, A. L., Williams, G. T., Hodges, A. K., Davies, D. R., David, S. S., Sampson, J. R., Cheadle, J. P. (2002): Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nature Genetics*, 30: 227.
- Armitage, P., Doll, R. (1957): A Two-stage Theory of Carcinogenesis in Relation to the Age Distribution of Human Cancer. *Br J Cancer* 11: 161–169.
- Bae, J. M., Kim, M. J., Kim, J. H., Koh, J. M., Cho, N. Y., Kim, T. Y., Kang, G. H. (2011): Differential clinicopathological features in microsatellite instability-positive colorectal cancers depending on CIMP status. *Virchows Arch* 459: 55-63.
- Baker, K., Zhang, Y., Jin, C., Jass, J. R. (2004): Proximal versus distal hyperplastic polyps of the colorectum: different lesions or a biological spectrum? *Journal of Clinical Pathology* 57: 1089–1093.
- Banerjea, A., Hands, R. E., Powar, M. P., Bustin, S. A., Dorudi, S. (2009): Microsatellite and chromosomal stable colorectal cancers demonstrate poor immunogenicity and early disease recurrence. *Colorectal Dis* 11:601–608.
- Barker, N. (2008): The canonical Wnt/beta-catenin signalling pathway. *Methods in Molecular Biology* 468: 5–15.
- Benatti, P., Gafà, R., Barana, D., Marino, M., Scarselli, A., Pedroni, M., Maestri, I., Guerzoni, L., Roncucci, L., Menigatti, M., Roncari, B., Maffei, S., Rossi, G., Ponti, G., Santini, A., Losi, L., Di Gregorio, C., Oliani, C., Ponz de Leon, M., Lanza, G. (2005): Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 11:8332–8340.
- Benhattar, J., Losi, L., Chaubert, P., Givel, J., Costa, J. (1993): Prognostic significance of K-ras mutations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 104:1044–8.
- Bodmer, W. F., Bailey, C. J., Bodmer, J., Bussey, H. J. R., Ellis, A., Gorman, P., Lucibello, F. C., Murday, V. A., Rider, S. H., Scambler, P., Sheer, D., Solomon, E., Spurr, N. K. (1987): Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328: 614–616.
- Bogaert, J., Prenen, H. (2014): Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of Gastroenterology* 27: 9.
- Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sudrasky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., Meltzer, S. J., Rodrigues-Bigas, M. A., Fodde, R., Ranzani, G. N., Srivastava, S.

- (1998): A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Research* 58: 5248-57.
- Boveri, T (2008): Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. *Journal of Cell Science* 121: 1–84.
- Buckowitz, A., Knaebel, H. P., Benner, A., Bläker, H., Gebert, J., Kienle, P., von Knebel, D. M., Kloor, M. (2005): Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *British Journal of Cancer*. 92:1746–1753.
- Burrell, R. A., McClelland, S. E., Endesfelder, D., Groth, P., Weller, M. Ch., Shaikh, N., Domingo, E., Kanu, N., Dewhurst, S. M., Gronroos, E., Chew, S. K., Rowan, Andrew J., Schenk, A, Sheffer M., Howell M., Kschischo M., Behrens A., Helleday T., Bartek J., Tomlinson, I. P., Swanton, Ch. (2013): Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* 494: 492–496.
- Cahill, D. P., Lengauer, Ch., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K.V., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1998): Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392: 300 -303.
- Cantwell-Dorris, E. R., O'Leary, J. J., & Sheils, O. M. (2011): *BRAF*V600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Molecular cancer therapeutics* 10: 385-394.
- Castillo, A., Morse, H. C. III., Godfrey, V. L., Naeem, R., Justice, M. J. (2007): Overexpression of Eg5 causes genomic instability and tumor formation in mice. *Cancer Res* 67:10138–10147.
- Cathomas, G. (2014): *PIK3CA* in colorectal cancer. *Frontiers in onkology* 4: 35.
- Daum, O., Beneš, Z., Hadravský, L., Stehlík, J., Černá, K., Dušek, M., Kokošková, B., Michal, M. (2014): Lynchův syndrom v rukách patologa. *Cesk Patol* 50: 18-24.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F., Darrow, T. L.,

- Paterson, H., Marais, R., Marshall, C. J., Wooster, R., Stratton, M. R., Futreal, P. A. (2002): Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* 417: 949-54.
- 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. *Oncologist* 15: 699-731.
- Domingo, E., Church, D. N., Sieber, O., Ramamoorthy, R., Yanagisawa, Y., Johnstone, E., Davidson, B., Kerr, D. J., Ian, P. M., Midgley, R. (2013): Evaluation of *PIK3CA* mutation as a predictor of benefit from nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, JCO-2013.
- Duesberg, P., Fabarius, A., Hehlmann, R. (2004): Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *IUBMB Life* 56: 65–81.
- Engelman, J. A., Luo, J., Cantley, L. C. (2006): The evolution of phosphatidylinositol 3 kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7: 606–19.
- Eshleman, J. R., Casey, G., Kochera, M. E., Sedwick, W. D., Swinler, S. E., Veigl, M. L., Willson, J. K., Schwartz, S., Markowitz, S. D. (1998): Chromosome number and structure both are markedly stable in RER colorectal cancers and are not destabilized by mutation of p53. *Oncogene* 17:719–725.
- Esteller, M., Sparks, A., Toyota, M., Sanchez-Cespedes, M., Capella, G., Peinado, A. M., Gonzalez, S., Tarafa, G., Sidransky, D., Meltzer, S. J., Baylin S. B., Herman J. G. (2000): Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer research*, 60: 4366-4371.
- Fabian, P., Berkovcová, J. (2011): Molecular predictive markers of EGFR-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *Československá patologie*, 47: 154-158.
- Fang, D. C., Luo, Y. H., Yang, S. M., Li, X. A., Ling, X. L., Fang, L. (2002): Mutation analysis of APC gene in gastric cancer with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 8:787–791.
- Faris, J. E., Ryan, D. P. (2012): Trees, forests, and other implications of a *BRAF* mutant gene signature in patients with *BRAF* wild-type disease. *J Clin Oncol* 30: 1255-7.
- Fearon, E. R., Vogelstein, B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. (2013): Cancer Incidence and Mortality Worldwide. Dostupný z WWW: <http://globocan.iarc.fr>.

- Fitzgibbons, R. J., Lynch, H. T., Stanislav, G. V., Watson, P. A., Lanspa, S. J., Marcus, J. N., Smyrk, T., Krieglger, M. D., Lynch, J. F. (1987): Recognition and treatment of patients with hereditary nonpolyposis colon cancer (Lynch syndromes I and II). *Annals of surgery* 206: 289.
- Frank, S. A., Nowak, M. A. (2004): Problems of somatic mutation and cancer. *BioEssays* 26: 291-299.
- Fransén, K., Klintenäs, M., Osterström, A., Dimberg, J., Monstein, H., Söderkvist, P. (2004): Mutation analysis of the *BRAF*, *ARAF* and *RAF-1* genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 25: 527–33.
- Gatenby, R. A., Vincent, T. L. (2003): An evolutionary model of carcinogenesis. *Cancer Research* 63: 6212–6220.
- Geiersbach, K. B., Samowitz, W. S. (2011): Microsatellite instability and colorectal cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 135: 1269-77.
- Goldstein, N. S. (2006): Serrated pathway and APC (conventional)-type colorectal polyps: molecular morphologic correlations, genetic pathways, and implications for classification. *American Journal of Clinical Pathology* 125:146–153.
- Grady, W. M. (2004): Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Reviews* 23:11–27.
- Grady, W. M., Carethers, J. M. (2008): Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 135:1079–1099.
- Grady, W. M., Rajput, A., Myeroff, L., Liu, D. F., Kwon, K., Willis, J., Markowitz, S. (1998): Mutation of the type II transforming growth factor beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Research* 58: 3101-4.
- Greenon, J. K., Bonner, J. D., Ben-Yzhak, O., Cohen, H. I., Miselevich, I., Resnick, M. B., Trougouboff, P., Tomsho, L. D., Kim, E., Low, M., Almog, R., Rennert, G., Gruber, S. B. (2003): Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *The American Journal of Surgical Pathology* 27:563–570.
- Gryfe, R., Kim, H., Hsieh, E. T., Aronson, M. D., Holowaty, E. J., Bull, S. B., Redston, M., Gallinger, S. (2000): Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*. 342:69–77.

- Haigis, K. M., Kendall, K. R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M. C., Glickman, J. N., Niwa-Kawakita, M., Sweet-Cordero, A., Sebolt-Leopold, J., Shannon, K. M., Settleman J., Giovannini, M., Jacks T. (2008): Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature Genetics* 40: 600–608.
- Halford, S., Sasieni, P., Rowan, A., Wasan, H., Bodmer, W., Talbot, I., Hawkins, N., Ward, R., Tomlinson, I. (2002): Low-level microsatellite instability occurs in most colorectal cancers and is a nonrandomly distributed quantitative trait. *Cancer Res* 62: 53-7.
- Hamilton, S. R., Rubio, C. A., Vogelstein, B., Kudo, S., Riboli, E., Nakamura, S., Hainaut, P., Jass, J. R. (2000): Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton, S. R., Aaltonen, L. A., (ed.): *Health Organization classification of tumours. Tumours of the digestive system*, pp. 101–119, IARC Press.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000): The hallmarks of cancer. *cell* 100: 57-70.
- Hoeijmakers, J. H. (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366–734.
- Holubec, L., (2004): *Kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby*. pp 13-58 Grada, Praha.
- Hussain, S. P., Harris, C. C. (1998): Molecular epidemiology of human cancer: Contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* 58: 4023-37.
- Chan, A. T., Ogino, S., Fuchs, C. S. (2007): Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Engl J Med* 356: 2131-42.
- Chan, A. T., Ogino, S., Fuchs, C. S. (2009): Aspirin use and survival after diagnosis of colorectal cancer. *JAMA* 302:649-58.
- Chan, A., Giovannucci, E (2010): Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*; 138: 2029–2043.
- Chen, Y. Q., Hsieh, J. T., Yao, F., Fang, B., Pong, R. C., Cipriano, S. C., Krepulat, F. (1999) Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene* 18: 2747–2754.
- Iglesias, D., Fernández-Peralta, A. M, Nejsa, N., Daimiel, L., Azcoita, M. M., Oliart, S., González-Aguilera, J. J. (2006): RIS1, a gene with trinucleotide repeats, is a target in the mutator pathway of colorectal carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 16: 138-44.
- Imai, K., Yamamoto, H. (2008): Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 29: 673–680.
- Imai, K., Yamamoto, H. (2008): Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 29:673–680.



- Issa, J. P. (2004): CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4: 988-993.
- Issa, J. P. J., Shen, L., & Toyota, M. (2005): CIMP, at last. *Gastroenterology* 129: 1121-1124.
- Jass, J. R. (2004): Hyperplastic polyps and colorectal cancer: is there a link? *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2:1-8.
- Jass, J. R. (2006): Hereditary non-polyposis colorectal cancer: the rise and fall of a confusing term. *World J. Gastroenterol* 12: 4943-4950.
- Jass, J. R. (2007): Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50: 113-130.
- Jass, J. R., Biden, K. G., Cummings, M. C., Simms, L. A., Walsh, M., Schoch, E., Meltzer, S. J., Wright, C., Searle, J., Young, J., Leggett, B. A. (1999): Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol* 52:455-60.
- Jass, J. R., Walsh, M. D., Barker, M., Simms, L. A., Young, J., Leggett, B. A. (2002): Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. *European Journal of Cancer*. 38: 858-866.
- Jeong, S. Y., Shin, K. H., Shin, J. H., Ku, J. L., Shin, Y. K., Park, S. Y., Kim, W. H., Park, J. G. (2003) Microsatellite instability and mutations in DNA mismatch repair genes in sporadic colorectal cancers. *Diseases of the Colon & Rectum* 46: 1069-1077.
- Jones, P. A., Liang, G. (2009): Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature Reviews Genetics*, 10: 805-811.
- Kalus, M. (1972): Carcinoma and adenomatous polyps of the colon and rectum in biopsy and organ tissue culture. *Cancer* 30: 972-82.
- Kang G. H. (2011): Four molecular subtypes of colorectal cancer and their precursor lesions. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 135: 698-703.
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., Waterfield, M. D. (2001): Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:615-75.
- Kaur, J., Sanyal, S. N. (2010): PI3-kinase/Wnt association mediates COX-2/PGE2 pathway to inhibit apoptosis in early stages of colon carcinogenesis: chemoprevention by diclofenac. *Tumor Biology* 31: 623-631.
- Kikuchi, H., Pino, M., Zeng, M., Shirasawa, S., Chung, D. (2009): Oncogenic KRAS and BRAF differentially regulate hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in colon cancer. *Cancer Res* 69: 8499-506.

- Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1996): Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87: 159-170.
- Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (2002): Colorectal tumors. In: Vogelstein, B., Kinzler, K. W., (ed.): *The genetic basis of human cancer*, pp. 583–612, McGraw-Hill.
- Kitaeva, M. N., Grogan, L., Williams, J. P., Dimond, E., Nakahara, K., Hausner, P., DeNobile, J. W., Soballe, P. W., Kirsch, I. R. (1997): Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res* 57:4478–4481.
- Kohonen-Corish, M. R., Daniel, J. J., Chan, C., Lin, B. P., Kwun, S. Y., Dent, O. F., Dhillon, V. S., Trent, R. J., Chapuis, P. H., Bokey, E. L. (2005): Low microsatellite instability is associated with poor prognosis in stage C colon cancer. *J Clin Oncol* 23:2318-24.
- Labianca, R., Nordlinger, B., Beretta, G. D., Brouquet, A., Cervantes, A. (2010): Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann Oncol* 5: 70-77.
- Laiho, P., Launonen, V., Lahermo, P., Esteller, M., Guo, M., Herman, J. G., Mecklin, J. P., Järvinen, H., Sistonen, P., Kim, K. M., Shibata, D., Houlston, R. S., Aaltonen, L. A. (2002): Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. *Cancer Res* 62: 1166–1170.
- Laurent-Puig, P., Cayre, A., Manceau, G., Buc, E., Bachet, J. B., Lecomte, T., Rougier, P., Lievre, A., Landi, B., Boige, V., Ducreux, M., Ychou, M., Bibeau, F., Bouché, O., Reid, J., Stone, S., Penault-Llorca, F. (2009): Analysis of PTEN, *BRAF*, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 27: 5924-30.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1997): Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, 386: 623-627.
- Leopoldo, S., Lorena, B., Cinzia, A., Gabriella, D. C., Angela L. B., Renato, C., Antonio, M., Carlo, S., Cristina, P., Stefano, C., Maurizio, T., Luigi, R., Cesare, B. (2008): Two subtypes of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: clinicopathological and genetic features. *Ann Surg Oncol* 15:1429–1439.
- Leslie, A., Carey, F. A., Pratt, N. R. (2002): The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *British Journal of Surgery* 89: 845-60.
- Leung, S. Y., Chan, T. L., Yuen, S. T. (2007): Reply to “Heritable germline epimutation is not the same as transgenerational epigenetic inheritance”. *Nature Genetics* 39: 576-576.

- Liao, X., Lochhead, P., Nishihara, R., Morikawa, T., Kuchiba, A., Yamauchi, M., Imamura, Y., Qian, Z. R., Baba, Y., Shima, K., Sun, R., Nosho, K., Meyerhardt, J. A., Giovannucci, E., Fuchs, Ch. S., Chan, A. T., Ogino, S. (2012): Aspirin use, tumor *PIK3CA* mutation, and colorectal-cancer survival. *New England Journal of Medicine* 367: 1596-1606.
- Loupakis, F., Ruzzo, A., Cremolini, C., Vincenzi, B., Salvatore, L., Santini, D., Masi, G., Stasi, I., Canestrari, E., Rulli, E., Floriani, I., Bencardino, K., Galluccio, N., Catalano, V., Tonini, G., Magnani, M., Fontanini, G., Basolo, F., Falcone, A., Graziano, F. (2009): KRAS codon 61, 146 and *BRAF* mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 101: 715-21.
- Lu, S-L., Kawabata, M., Imamura, T., Akiyama, Y., Nomizu, T., Miyazono, K., Yuasa, Y. (1998): HNPCC associated with germline mutation in the TGF-beta type II receptor gene. *Nature Genetics* 19: 17-8.
- Malkhosyan, S. R., Yamamoto, H., Piao, Z., Perucho, M. (2000): Late onset and high incidence of colon cancer of the mutator phenotype with hypermethylated *hMLH1* gene in women. *Gastroenterology* 119: 598.
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2003): RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews Cancer* 3 :459–465.
- Maringe, C., Walters, S., Rachet, B., Butler, J., Fields, T., Finan, P., Maxwell, R., Nedrebø, B., Pählman, L., Sjövall, A., Spigelman, A., Engholm, G., Gavin, A., Gjerstorff, M. L., Hatcher, J., Johannesen, T. B., Morris, E., McGahan, C. E., Tracey, E., Turner, D., Richards, M. A., Coleman, M. P. (2013): Stage at diagnosis and colorectal cancer survival in six high-income countries: a population-based study of patients diagnosed during 2000-2007. *Acta Oncol* 52: 919-32.
- Markowitz, S. D., Bertagnolli, M. M. (2009): Molecular basis of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine* 361: 2449-2460.
- Markowitz, S., Wang, J., Myerhoff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Vogelstein, B., Brattain, M., Willson, J. K. V. (1995): Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268: 1336-8.
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1995): Inactivation of the type II TGF-

- beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268:1336–1338.
- Marsoor, S., Dolkar, T., El-Fanek, H. (2013): Polyps and polypoid lesions of the colon. *Surgical Pathology* 21:215-23.
- Mason, C. S., Springer, C. J., Cooper, R. G., Superti-Furga, G., Marshall, C. J., Marais, R. (1999): Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J* 18: 2137–2148.
- Massague, J. (1996): TGF - signaling:receptors, transducers, and mad proteins. *Cell* 85: 947-50.
- Mehlen, P., Fearon, E. R. (2004): Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *Journal of Clinical Oncology*. 22: 3420–3428.
- Minárik, M., & Mináriková, P. (2005). *Genetika a biologie kolorektálního karcinomu*. Česká společnost HPB chirurgie 13: 45-47.
- Morán, A., Ortega, P., de Juan, C., Fernández-Marcelo, T., Frías, C., Sánchez-Pernaute, A., José Torres, A., Díaz-Rubio, E., Iniesta, P., Benito, M. (2010): Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol* 15; 2: 151–158.
- Mori, Y., Selaru, F. M., Sato, F., Yin, J., Simms, L. A., Xu, Y., Oлару, A., Deacu, E., Wang, S., Taylor, J. M., Young, J., Leggett, B., Jass, J. R., Abraham, J. M., Shibata, D., Meltzer, S. J. (2003): The impact of microsatellite instability on the molecular phenotype of colorectal tumors. *Cancer Res* 63:4577-82.
- Mori, Y., Yin, J., Sato, F., Sterian, A., Simms, L. A., Selaru, F. M., Schulmann, K., Xu, Y., Oлару, A., Wang, S., Deacu, E., Abraham, J. M., Young, J., Leggett, B. A., Meltzer, S. J. (2004): Identification of genes uniquely involved in frequent microsatellite instability colon carcinogenesis by expression profiling combined with epigenetic scanning. *Cancer Res* 64: 2434-8.
- Nagasaka, T., Koi, M., Kloor, M., Gebert, J., Vilkin, A., Nishida, N., Shin, S. K., Sasamoto, H., Tanaka, N., Matsubara, N., Boland, C. R., Goel, A. (2008): Mutations in both *KRAS* and *BRAF* may contribute to the methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 134: 1950-1960.
- Noffsinger, A. E. (2009): Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annual Review of Pathology* 4: 343–364.
- Nowell, P. C. (1976): The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28.

- Nugent, K. P., Spigelman, A. D., Williams, C. B., Talbot, I. C., Phillips, R. K. (1994): Surveillance of duodenal polyps in familial adenomatous polyposis: progress report. *J R Soc Med* 87: 704-6.
- 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 *55*: 1000-6.
- Ogino, S., Goel, A. (2008): Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J. Mol. Diagnostics* 10: 13-27.
- Ogino, S., Chan, A. T., Fuchs, C. S., Giovannucci, E. (2011): Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: an emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. *Gut* 60:397-411.
- Olschwang, S., Laurent-Puig, P., Groden, J., White, R., Thomas, G. (1993): Germ-line mutations in the first 14 exons of the adenomatous polyposis coli (APC) gene. *American journal of human genetics* 52: 273.
- Pawlik, T. M., Raut, C. P., Rodriguez-Bigas, M. A. (2004): Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Disease Markers* 20: 199–206.
- Peeters, M., Price, T. J., Cervantes, A., SObrero, A. F., Ducreux, M., Hotko, Y., André, T., Chan, E., Lordick, F., Punt, C. J., Strickland, A. H., Wilson, G., Ciuleanu, T. E., Roman, L., Van Cutsem, E., Tzekova, V., Collins, S., Oliner, K. S., Rong, A., Gansert, J. (2010): Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 28 :4706-4713.
- Peltomaki, P. (1994): Genetic basis of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC). *Ann Med* 26: 215-9.
- Perucho, M. (1999): Correspondence re. Boland CR et al. (1998): A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 5248–5257; *Cancer Res* 59: 249–253.
- Pietsch, E. C., Sykes, S. M., McMahon, S. B., Murphy, M. E. (2008) The p53 family and programmed cell death. *Oncogene*. 27:6507–6521.
- Pino, M. S., Chung, D. C. (2010): The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 138: 2059-2072.

- Plevová, P., Novotný, J., Šachlová, M., Křepelová, A., Foretová, L. (2008): Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPPC, Lynchův syndrom). *Klinická onkologie* 22: 12-15.
- Polakis, P. (2000): Wnt signaling and cancer. *Genes and development* 14: 1837-1851.
- Ponz De Leon, M. (1996): Genetic basis of tumour development. *Gastroenterol* 28: 232-45.
- Popat, S., Hubner, R., Houlston, R. S. (2005): Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Journal of Clinical Oncology* 23: 609–618.
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1992): APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359: 235-237.
- Pretlow, T. P., Pretlow, T. G. (2005): Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? *Biochimica et Biophysica Acta* 1756 :83–96.
- Puchmajerová A., Vasovčák, P., Křepelová A. (2009): Peutz – Jeghersův syndrom. *Klin Onkol* 22: 36-37.
- Qi Li, W., Kawakami, K., Ruzkiewicz, A., Bennett, G., Moore, J., & Iacopetta, B. (2006): *BRAF* mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Molecular Cancer* 5: 2.
- Quirke, P., Riso, M., Lambert, R., Von Karsa, L., Vieth, M. (2010): Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis. In: Segnan, N., Patnick, J., Von Karsa, L., (ed.): *European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis*, pp. 206–232, European Union.
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K., Vogelstein, B., Velculescu, V. (2002): Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418:934.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C., Perucho, M. (1997): Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275:967–969.
- Raut, C. P., Pawlik, T. M., Rodriguez-Bigas, M. A. (2004): Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutation Research* 568: 275–282.
- Rembacken, B. J., Fujii, T., Cairns, A. (2000): Flat and depressed colonic neoplasms: a prospective study of 1000 colonoscopies in the UK. *The Lancet* 355: 1211-4.

- Renan, M. J. (1993): How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Molecular carcinogenesis* 7: 139.
- Ribic, C. M., Sargent, D. J., Moore, M. J., Thibodeau, S. N., French, A. J., Goldberg, R. M., Hamilton, S. R., Laurent-Puig, P., Gryfe, R., Shepherd, L. E., Tu, D., Redston, M., Gallinger, S. (2003) Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *The New England Journal of Medicine* 349: 247-57.
- Roncucci, L., Stamp, D., Medline, A. (1991): Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol* 22: 287-94.
- Rosty, C., Young, J. P., Walsh, M. D., Clendenning, M., Sanderson, K., Walters, R. J., Parry, S., Jenkins, M. A., Win, A. K., Southey, M. C., Hopper, J. L., Giles, G. G., Williamson, E. J., English, D. R., Buchanan, D. D. (2013): *PIK3CA* activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PLoS One* 8:e65479.
- Roth, A. D., Tejpar, S., Delorenzi, M., Yan, P., Fiocca, R., Klingbiel, D., Dietrich, D., Biesmans, B., Bodoky, G., Barone, C., Aranda, E., Nordlinger, B., Cisar, L., Labianca, R., Cunningham, D., Van Cutsem, E., Bosman, F. (2010): Prognostic role of *KRAS* and *BRAF* in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 28 :466-74.
- Samowitz, W. S., Albertsen, H., Herrick, J., Levin, T. R., Sweeney, C., Murtaugh, M. A., Wolf, R. K., Slattery, M. L. (2005): Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 129: 837–845.
- Samowitz, W. S., Curtin, K., Ma, K. N., Schaffer, D., Coleman, L. W., Leppert, M., Slattery, M. L. (2001): Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 10:917–923.
- Samowitz, W. S., Powers, M. D., Spirio, L. N., Nollet, F., van Roy, F., Slattery, M. L. (1999): Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer Research* 59: 1442–4.
- Samuels, Y., Velculescu, V. E. (2004): Oncogenic mutations of *PIK3CA* in human cancers. *Cell Cycle* 3:1221–4.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S., Kinzler, K. W.,

- Vogelstein, B., Velculescu, V. E. (2004): High frequency of mutations of the *PIK3CA* gene in human cancers. *Science* 304:554.
- Sharma, S., Kelly, T. K., Jones, P. A. (2010): Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31: 27-36.
- Shi, Y., Massagué, J. (2003): Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113: 685-700.
- Sieber, O. M., Lipton, L., Crabtree, M., Heinemann, K., Fidalgo, P., Phillips, R. K., Bisgaard, M. L., Orntoft, T. F., Aaltonen, L. A., Hodgson, S. V., Thomas, H. J., Tomlinson, I. P. (2003): Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 348: 791-9.
- Simms, L. A., Young, J., Wicking, C., Meltzer, S. J., Jass, J. R., Leggett, B. A. (2000): The apoptotic regulatory gene, *BCL10*, is mutated in sporadic mismatch repair deficient colorectal cancers. *Cell Death Differ* 7:236-237.
- Smakman, N., Borel, R. I. H., Voest, E. E., Kranenburg, O. (2005): Control of colorectal metastasis formation by K-Ras. *Biochimica et Biophysica Acta* 1756: 103-114.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J., Relichová, J., Doškař, J., Fajkus, J., Hořín, P., Knoll, A., Kuglík, P., Šmarda, J., Šmardová, J., Veselská, R., Boris Vyskot, B. (2009): *Genetika*. pp. 668-684 Masarykova univerzita, Brno.
- Souza, R. F., Appel, R., Yin, J., Wang, S., Smolinski, K. N., Abraham, J. M., Zou, T. T., Shi, Y. Q., Lei, J., Cottrell, J., Cymes, K., Biden, K., Simms, L., Leggett, B., Lynch, P. M., Frazier, M., Powell, S. M., Harpaz, N., Sugimura, H., Young, J., Meltzer, S. J. (1996): Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat Genet* 14:255-257.
- Spirio, L., Olschwang, S., Groden, J., Robertson, M., Samowitz, W., Joslyn, G., Gelbert, L., Thliveris, A., Carlson, M., Otterud, B., Lynch, H., Watson, P., Lynch, P., Laurent-Puig, P., Burt, R., Hughes, J. P., Thomas, G., Leppert M., White, R. (1993): Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 75: 951-957.
- Spring, K. J., Zhao, Z. Z., Karamatic, R., Walsh, M. D., Whitehall, V. L., Pike, T., Simms, L. A., Young, J., James, M., Montgomery, G. W., Appleyard, M., Hewett, D., Togashi, K., Jass, J. R., Leggett, B. A. (2006): High prevalence of sessile serrated adenomas with *BRAF* mutations: a prospective study of patients undergoing colonoscopy. *Gastroenterology* 131:1400-7.



- Suchánek, Š., Vepřeková G., Májek, O., Dušek, L., Zavoral, M. (2011): Epidemiologie, etiologie, screening a diagnostika kolorektálního karcinomu, včetně diagnosticko-terapeutických zákroků na tlustém střevě. *Onkologie* 2011; 5: 261–265.
- Šimová, J., Kubová, B., Uvírová, M., Urbanovská, I., Jalůvková, M., Konvalinka, D., Žebráková, I., Dvořáčková J. (2011): Mutace v *KRAS*, *BRAF* a *PIK3CA* genu u pacientů s kolorektálním karcinomem. *Chybí časopis a číslo*
- Takayama, T., Katsuki, S., Takahashi, Y. (1998): Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med* 339: 1277-84.
- Takayama, T., Katsuki, S., Takahashi, Y., Ohi, M., Nojiri, S., Sakamaki, S., Kato J., Kogawa K., Miyake H., Niitsu Y. (1998): Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *New England Journal of Medicine*, 339: 1277-1284.
- Takayama, T., Miyanishi, K., Hayashi, T., Sato, Y., Niitsu, Y. (2006): Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *Journal of Gastroenterology* 41:185–192.
- Thibodeau, S. N., Bren, G., Schaid, D. (1993): Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Scienc* 260: 816–819.
- Thibodeau, S. N., French, A. J., Cunningham, J. M., Tester, D., Burgart, L. J., Roche, P. C., McDonnell, S. K., Schaid, D. J., Vockley, C. W., Michels, V. V., Farr, G. H. Jr., O'Connell MJ. (1988): Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of *hMLH1*. *Cancer Res* 58:1713-8.
- Thiel, A., Ristimäki, A. (2013): Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of *BRAF*. *Front Oncol* 3: 281.
- Tomášek, J., Halámková, J. (2013): Systémová protinádorová léčba kolorektálního karcinomu. *Onkologie* 7: 188–189.
- Tomlinson, I. P. M., Houston, R. S. (1997): Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet* 34: 1007–1011.
- Tournigand, C., André, T., Bonnetain, F., Chibaudel, B., Lledo, G., Hickish, T., Tabernero, J., Boni, C., Bachet, J.B., Teixeira. L., de Gramont, A. (2012): Adjuvant therapy with fluorouracil and oxaliplatin in stage II and elderly patients (between ages 70 and 75 years) with colon cancer: subgroup analyses of the Multicenter International Study of Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer trial. *J Clin Oncol* 30: 3353-60.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., Issa, J. P. J. (1999): CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 8681-8686.

- Tuupanen, S., Karhu, A., Järvinen, H., Mecklin, J. P., Launonen, V., Aaltonen, L. A. (2007): No evidence for dual role of loss of heterozygosity in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Oncogene* 26: 2513-2517.
- Uddin, S., Ahmed, M., Hussain, A., Assad, L., Al-Dayel, F., Bavi, P., Al-Kuraya, K. S., Munkarah, A. (2010): Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits PI3K/AKT kinase activity in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 126: 382-94.
- Van Cutsem, E., Köhne, C. H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C. R., Makhson, A., D'Haens, G., Pintér, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J. K., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, S., Schlichting, M., Nippgen, J., Rougier, P. (2009): Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360: 1408-17.
- Van Cutsem, E., Köhne, C. H., Láng, I., Folprecht, G., Nowacki, M. P., Cascinu, S., Shchepotin, I., Maurel, J., Cunningham, D., Tejpar, S., Schlichting, M., Zubel, A., Celik, I., Rougier, P., Ciardiello, F. (2011): Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 29: 2011-3009.
- Van Engeland, M., Derks, S., Smits, K. M., Meijer, G. A., Herman, J. G. (2011): Colorectal Cancer Epigenetics: Complex Simplicity. *J Clin Oncol* 29: 1382-1391.
- Velho, S., Moutinho, C., Cirnes, L., Albuquerque, C., Hamelin, R., Schmitt, F., Carneiro, F., Oliveira, C., Seruca, R. (2008): BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? *BMC Cancer* 8:255.
- Vogelstein, B., Fearon E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert M., Smits, A. M. M., Bos J. L. (1988): Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *N Engl J Med* 319: 525-532.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-32.
- Walther, A., Houlston, R., Tomlinson, I. (2008): Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* 57: 941–950.
- Wan, P. T., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Jones, C. M., Marshall, C. J., Springer, C. J., Barford, D., Marais, R. (2004): Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116: 855-67.

- Ward, R., Meagher, A., Tomlinson, I., O'Connor, T., Norrie, M., Wu, R., Hawkins, N. (2001): Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 48:821–829.
- Watanabe, T., Wu, T. T., Catalano, P. J., Ueki, T., Satriano, R., Haller, D. G., Benson, A. B., Hamilton, S. R. (2001): Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 344:1196–1206.
- Weinberg, R. A. (1989): Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 49: 3713-21.
- Weisenberger, D. J., Siegmund, K. D., Campan, M., Young, J., Long, T. I., Faasse, M. A., Kang, G. H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., Koh, H., Simms, L., Barker, M., Leggett, B., Levine, J., Kim, M., French, A. J., Thibodeau, S. N., Jass, J., Haile, R., Laird, P. W. (2006): CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with *BRAF* mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 38:787–93.
- Whitehall, V. L., Walsh, M. D., Young, J., Leggett, B. A., Jass, J. R. (2001): Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res* 61:827-30.
- Whitman, M., Kaplan, D. R., Schaffhausen, B., Cantley, L., T. M. Roberts (1985): Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature* 315: 239-242.
- Wong, N. A., Pignatelli, M. (2002): B-catenin-A linchpin in colorectal carcinogenesis. *American Journal of Pathology* 160: 389-401.
- Wood, L. D., Parsons, D. W., Jones, S., Lin, J., Sjöblom, T., Leary, R. J., Shen, D., Boca, S. M., Barber, T., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Dezso, Z., Ustyanksky, V., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Karchin, R., Wilson, P. A., Kaminker, J. S., Zhang, Z., Croshaw, R., Willis, J., Dawson, D., Shipitsin, M., Willson, J. K. V., Sukumar, S., Polyak, K., Park, B. H., Pethiyagoda, Ch. L., Pant, P. V. K., Ballinger, D. G., Sparks, A. B., Hartigan, J., Smith, D. R., Suh, E., Papadopoulos, N., Buckhaults, P., Markowitz, S., Parmigiani, G., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B. (2007): The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318: 1108–1113
- Worthley, D. L., Whitehall, V. L., Spring, K. J., Leggett, B. A. (2007): Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World Journal of Gastroenterology* 13:3784–3791

- Yamashita, K., Dai, T., Dai, Y., Yamamoto, F., Perucho, M. (2003): Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer cell* 4: 121-131.
- Yearsley, M., Hampel, H., Lehman, A., Nakagawa, H., de la Chapelle, A., Frankel, W. L. (2006): Histologic features distinguish microsatellite-high from microsatellite-low and microsatellite-stable colorectal carcinomas, but do not differentiate germline mutations from methylation of the MLH1 promoter. *Hum Pathol* 37:831–838.
- Young, J., Barker, M. A., Simms, L. A., Walsh, M. D., Biden, K. G., Buchanan, D., Buttenshaw, R., Whitehall, V. L., Arnold, S., Jackson, L., Kambara, T., Spring, K. J., Jenkins, M. A., Walker, G. J., Hopper, J. L., Leggett, B. A., Jass, J. R. (2005): Evidence for *BRAF* mutation and variable levels of microsatellite instability in a syndrome of familial colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3:254-63.
- Yuan, T. L., Cantley, L. C. (2008): PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27: 5497–510.
- Zavoral, M., Suchánek, S., Májek, O., Frič, P., Mináriková, P., Minárik, M., Seifert, B., Dušek, L. (2014): Colorectal cancer screening: 20 years of development and recent progress. *World Journal of Gastroenterology* 20: 3825–3834.
- Zavoral, M., Vojtěchová, G., Suchánek, Š. (2013): Klasifikace kolorektálního karcinomu. *Onkologie* 7: 172–175.

### 8.1 Použité internetové zdroje

[www.globocan.iarc.fr](http://www.globocan.iarc.fr)

<http://www.svod.cz/prehled.php>

[www.uzis.cz/registry-nzis/nor](http://www.uzis.cz/registry-nzis/nor)

<http://emboj.embopress.org/content/embojnl/31/12/2685/F5.large.jpg>

[www.impactjournals.com/oncoscience/](http://www.impactjournals.com/oncoscience/)

<http://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/BRAF/54/>

<http://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/PIK3CA/11/>

<https://www.qiagen.com/cz/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details/?pwid=133>

## 9 Seznam použitých zkratek

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>5-FU</b>      | 5-fluoroacil   |
| <b>5mC</b>       | 5-metylcytosin   |
| <b>ACF</b>       | <i>Aberrant crypt foci</i>   |
| <b>AFAP</b>      | Attenuovaná familiární adenomatózní polypóza                         |
| <b>anti-EGFR</b> | <i>Anti-epidermal growth factor</i>                                  |
| <b>APC</b>       | <i>Adenomatous polypopis coli</i>                                    |
| <b>Arg</b>       | Arginin  |
| <b>BAX</b>       | <i>BCL2-associated X protein</i>                                     |
| <b>BCL-10</b>    | <i>B-cell CLL/lymphoma 10</i>  |
| <b>BRAF</b>      | <i>Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>                   |
| <b>BRAF</b>      | <i>Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>                   |
| <b>BUB1</b>      | <i>Mitotic checkpoint serine/threonine kinase</i>                    |
| <b>CDKN2A</b>    | <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>                          |
| <b>CIMP</b>      | Metylační fenotyp - <i>CpG island methylator phenotype</i>           |
| <b>CIN</b>       | Chromozomální nestabilita - <i>Chromosomal instability</i>           |
| <b>CK 1</b>      | <i>Casein kinase 1</i>   |
| <i>c-Myc</i>     | <i>c-mycproto-oncogene</i>   |
| <b>CpG</b>       | Metylační fenotyp  |
| <b>CRC</b>       | Kolorektální karcinom - <i>Colorectal cancer</i>                     |
| <b>CTL</b>       | <i>Chitinase-Like</i>  |
| <b>DCC</b>       | <i>Deleted in colon cancer</i>                                       |
| <b>DNA</b>       | Deoxyribonukleotidová kyselina                                       |
| <b>EGFR</b>      | Epidermální růstový faktor - <i>Epidermal growth factor receptor</i> |
| <b>eQ-PCR</b>    | <i>enhanced Quantitative-PCR</i>                                     |
| <b>FAP</b>       | Familiární adenomatozní polypóza                                     |
| <b>GIST</b>      | gastrointestinální stromální tumor                                   |
| <b>GIT</b>       | gastrointestinální trakt   |
| <b>Glu</b>       | kyselina glutamová   |
| <b>Gly</b>       | Glycin   |
| <b>GSK</b>       | <i>Glycogen synthase kinase</i>                                      |
| <b>GTP</b>       | Guanosintrifosfát  |

|                              |  |
|------------------------------|--|
| <b>His</b>                   | Histidin   |
| <b><i>hMLH</i> (1, 3, 6)</b> | <i>human mutL homolog</i> (1, 3, 6)  |
| <b>HNPCC</b>                 | Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom                                  |
| <b><i>hPMS</i> (1, 2)</b>    | <i>human postmeiotic segregation</i> (1, 2)                                    |
| <b><i>HRAS</i></b>           | <i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>                               |
| <b><i>IGF</i></b>            | <i>Insulin-like growth factor</i>  |
| <b><i>KRAS</i></b>           | <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>                              |
| <b>Leu</b>                   | Leucin   |
| <b>LOH</b>                   | ztráta heterozygosity - <i>loss of heterozygosity</i>                          |
| <b>LS</b>                    | Lynchův syndrom  |
| <b>Lys</b>                   | Lysin  |
| <b>MAD</b>                   | <i>Mitotic arrest deficient-like</i>   |
| <b>MAPK</b>                  | <i>Mitogen-activated protein kinase</i>  |
| <b>mCRC</b>                  | Metastatický kolorektální karcinom   |
| <b>MEK</b>                   | <i>Mitogen activated protein kinase</i>  |
| <b>MLH1</b>                  | <i>MutL homolog 1</i>  |
| <b>MM</b>                    | <i>Master Mix</i>  |
| <b>MMR</b>                   | <i>Mismatch-repair</i>   |
| <b>MSH (2, 3, 6)</b>         | <i>MutS protein homolog</i> (2,3,6)  |
| <b>MSI</b>                   | Mikrosatelitová nestabilita - <i>Microsatellite instability</i>                |
| <b>MSI-H</b>                 | Vysoký stupeň nestability - <i>Microsatellite instability – high</i>           |
| <b>MSI-L</b>                 | Nízký stupeň nestability - <i>Microsatellite instability – low</i>             |
| <b>MSS</b>                   | Mikrosatelitová stabilita - <i>Microsatellite stable</i>                       |
| <b>mTOR</b>                  | <i>The mechanistic target of rapamycin</i>                                     |
| <b>MTS</b>                   | Muir-Torreho syndrom   |
| <b><i>NRAS</i></b>           | <i>Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>                        |
| <b>PCR</b>                   | Polymerázová řetězová reakce - <i>Polymerase Chain Reaction</i>                |
| <b>PI3K</b>                  | Fosfatidyl-inositol-3-kinaza - <i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>            |
| <b><i>PIK3CA</i></b>         | <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha</i> |
| <b>PJS</b>                   | Peutz-Jeghesův syndrom   |
| <b><i>PTEN</i></b>           | <i>Phosphatase and tensin homolog</i>  |
| <b>PTGS</b>                  | <i>Prostaglandin-endoperoxide synthase</i>                                     |
| <b>PTPRO</b>                 | <i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type, O</i>                          |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>RAB32</b>                  | <i>Ras-related gtp-binding protein</i>                          |
| <b>Ras</b>                    | <i>Small G-protein Ras</i>                                      |
| <b>SMAD 4</b>                 | <i>SMAD family member 4</i>                                     |
| <b>SSA</b>                    | Sesilní pilovitá léze - <i>Sessile serrated adenoma</i>         |
| <b>STA</b>                    | <i>Shifted Termination assay</i>                                |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b> | <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>            |
| <b>TP53</b>                   | <i>Tumor protein p53</i>  |
| <b>TSA</b>                    | Tradiční pilovitý adenom - <i>Traditional serrated adenomas</i> |
| <b>Wnt</b>                    | <i>Wingless protein</i>   |
| <b>WT</b>                     | <i>Wild type</i>  |