

Genetika karcinoma kolona

Brezak, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:390769>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

GENETIKA KARCINOMA KOLONA
GENETICS OF COLON CANCER

SEMINARSKI RAD

Matea Brezak
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Petra Korać

Zagreb, 2016.

Sadržaj:

1. UVOD.....	1
2. NASTANAK KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA.....	2
2.1. FAP - obiteljska adenomatozna polipoza.....	3
2.2. HNPCC - nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom.....	3
2.3. OSTALI SINDROMI.....	4
3. GENI POVEZANI S NASTANKOM KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA.....	5
3.1. TP53.....	6
3.2. KRAS.....	7
3.3. APC.....	7
3.4. GENI MMR.....	8
3.4.1. MLH1.....	8
3.4.2. MSH2.....	9
3.6. EPCAM.....	9
3.7. MUTYH.....	10
3.8. SMAD4.....	11
3.9. STK-11.....	11
4. DETEKCIJA MUTACIJA I PRIMJENA U MEDICINI.....	12
5. ZAKLJUČAK.....	14
6. LITERATURA.....	15
7. SAŽETAK.....	17
8. SUMMARY.....	17

1. UVOD

Karcinom debelog crijeva (KDC) ili kolorektalni karcinom je maligni tumor koji nastaje iz epitelnih stanica debelog crijeva. Jedan je od najčešćih oblika malignih novotvorevina u razvijenim zemljama te podjednako zahvaća oba spola. Kod muškaraca je treći po učestalosti nakon karcinoma pluća i prostate, a kod žena je drugi nakon raka dojke (Registar za rak Republike Hrvatske, n.d.). Iako se u posljednjih 10 godina incidencija ovog karcinoma smanjuje, stopa mortaliteta još je uvijek visoka te time KDC predstavlja veliki zdravstveni problem. Kao i većina tumora, KDC se često dijagnosticira u kasnijoj životnoj dobi od čega u 90% slučajeva tek nakon 55. godine života (Alberts *i sur.*, 2002). Upravo iz ovih razloga važno je razumjeti mehanizme razvitka i gene odgovorne za razvoj ovog karcinoma. Spoznaje o promjenama uslijed kojih dolazi do razvoja kolorektalnog karcinoma mogu dovesti do poboljšanja u dijagnozi i liječenju KDC-a.

Anatomski se debelo crijevo (*colon*) sastoji od nekoliko dijelova koji se nastavljaju na tanko crijevo (*ileum*). Na prijelazu iz tankog crijeva nalazi se slijepo crijevo (*caecum*) na koje se nastavlja uzlazno debelo crijevo (*colon ascendens*) koje često nazivamo desnim crijevom. Poprečno debelo crijevo (*colon transversum*) nalazi se između desnog i lijevog crijeva, tj. uzlaznog i silaznog (*colon descendens*), a zatim slijedi sigmoidno (*colon sigmoideum*) koje završava ravnim crijevom (*rectum*) i anusom (Jalšovec, 2013). Karcinom debelog crijeva najčešće zahvaća desno crijevo ili prvo lijevo crijevo pa se zatim proširi na cijelo područje. Područje zahvaćenosti se razlikuje u setu promijenjenih gena te u sindromima koji prethode karcinomu poput Lyncheva sindroma i FAP-a.

U značajnom broju slučajeva utvrđen je mehanizam karcinogeneze koji počinje adenomom, a zatim prijeđe u karcinom. Tijekom rutinskog pregleda kolonoskopom najčešće se otkrivaju mali benigni tumori, tzv. adenomi u obliku izbočenja epitela koje nazivamo polipi. Smatra se da su upravo ti adenomatozni polipi prekursori većine karcinoma debelog crijeva (Alberts *i sur.*, 2002). Polipi koji su promjerom manji od 1 cm uglavnom sadrže netumorske stanice, no u većih polipa često se mogu naći abnormalne, nediferencirane maligne stanice.

Pojava adenoma, a zatim i malignih stanica unutar tkiva, rezultat je akumulacije niza genskih promjena, tj. mutacija zbog čega dolazi do poremećaja u kontroli rasta i proliferacije epitelnih stanica. Tijekom ovog procesa, koji može trajati godinama, uočavaju se promjene u ekspresiji više onkogenih i tumor-supresorskih gena. Proučavanjem nasljednog karcinoma debelog crijeva, točnije sindroma koji mu prethode otkriveni su geni poput *TP53*, *KRAS*, *APC* te gena *MMR* koji imaju ulogu i u nastanku sporadičnog tipa KDC-a (Alberts *i sur.*, 2002).

2. NASTANAK KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA

Karcinom debelog crijeva učestaliji je u starijoj životnoj dobi. Danas se smatra da je za indukciju tumora potrebno dugotrajno izlaganje raznim kancerogenim tvarima (Boranić, 2000). Iako postoje mnogi vanjski uzročnici tumora poput zračenja, lijekova te virusnih infekcija, ono što najviše utječe na razvoj KDC-a je prehrana. Osim prehrane bogate zasićenim mastima i crvenim mesom te nedostatka biljnih vlakana, uzrok karcinoma su i genske promjene akumulirane tijekom života (Brkić i Grgić, 2006).

S obzirom na uzrok nastanka KDC-a razlikujemo tri tipa karcinoma:

- **sporadični KDC** definiran je kao onaj koji se javlja kod osoba u čijoj obitelji nisu zabilježeni slični slučajevi (Lanspa *i sur.*, 1992). Drugim riječima, sporadični KDC nastaje spontanom akumulacijom kritičnih mutacija u određenim genima.
- **obiteljski KDC** uključuje one osobe koje imaju rođake oboljele od KDC-a, ali nema dokaza o nasljednim karakteristikama (Lanspa *i sur.*, 1992). Smatra se da je pojava obiteljskog KDC-a većinom uzrokovana okolišnim faktorima. Iz ovog razloga kod oboljelih članova iste obitelji pronađene su mutacije u drugim genima ili su iste genski nepovezane.
- **nasljednim KDC-om** opisuju se slučajevi kada je vidljivo autosomno-dominantno nasljeđivanje nekog od gena koji se veže uz nastanak tumora unutar određene obitelji (Lanspa *i sur.*, 1992). U ovu skupinu ubrajamo osobe sa sindromima koji prethode nastanku karcinoma debelog crijeva. Prvi, najbolje proučeni sindromi su obiteljska adenomatozna polipoza - FAP (od eng. *familial adenomatous polyposis*) i nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom – HNPCC (od eng. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) poznat i pod nazivom Lynchov sindrom. Upravo analizom ovih sindroma otkriveni su neki od najvažnijih gena odgovornih za razvoj karcinoma debelog crijeva (Tablica 1.). Mutacije ovih gena otkrivene su i u velikom broju slučajeva sporadičnog KDC-a.

Za objašnjenje nastanka KDC-a važna je Knudsonova hipoteza dvostrukog udara (od eng. *two-hit hypothesis*). Prema ovoj hipotezi za tumorogenezu je potreban gubitak oba alela određenog tumor supresorskog gena. Jedna mutacija može biti nasljedna pa je takav heterozigotni gen još uvijek aktivan, tj. daje ispravni protein. Ovu mutaciju nose sve stanice organizma, a vrsta potencijalnog tumora ovisi samo o položaju stanice u kojoj će doći do druge mutacije. Ako osoba nema naslijeđenu mutaciju za tumorogenezu su potrebna dva udara. Određeni tumor supresorski gen neke stanice mora mutirati u oba alela da bi se potencijalno razvio tumor. Upravo ovako objašnjavamo nastanak sporadičnog tipa KDC-a, a ista hipoteza primjenjiva je i na druga dva tipa.

Tablica 1. Neki od gena uključenih u nastanak karcinoma debelog crijeva.

Prilagođeno na temelju (Alberts *i sur.*, 2002).

GEN	KLASA	ULOGA	UČESTALOST U KDC-u (%)
<i>K-RAS</i>	onkogen	receptor tirozin-kinaznog signalnog puta	40
<i>CTNNB1</i>	onkogen	signalni put WNT	5-10
<i>TP53</i>	tumorski supresor	odgovor na stres/oštećenje	60
<i>APC</i>	tumorski supresor	signalni put WNT	>60
<i>SMAD4</i>	tumorski supresor	signalni put TGF- β	30
<i>Receptor TGF-β II</i>	tumorski supresor	TGF β signalni put	10
<i>Geni MMR</i>	tumorski supresor	popravak pogrešnog sparivanja u DNA	15

2.1. Obiteljska adenomatozna polipoza

Obiteljska adenomatozna polipoza je autosomno i dominantno nasljedna bolest povezana s nastankom karcinoma debelog crijeva. Njena je glavna karakteristika pojava velikog broja polipa duž cijele unutarnje površine crijeva čime je povećan rizik za razvoj karcinoma (Zergollern, 1994). Polipi adenomatoznog karaktera pretežito se javljaju u lijevom crijevu unutar prvih 10 godina života, a kasnije se mogu proširiti na cijelo crijevo (Lanspa *i sur.*, 1992). Ako se FAP ne otkrije i ne tretira u ranom stadiju postoji gotovo 100%-tan rizik za razvoj KDC-a do 40-e godine, s tim da se karcinom javlja oko 10 godina nakon pojave polipa. FAP se nasljeđuje putem autosomalne mutacije gena *APC* (od eng. *Adenomatous polyposis coli*) koji se nalazi na petom kromosomu (Bogaert Prenen, 2014). Promjene u ovom genu, te u nizu ostalih, povezane su s kromosomskim aberacijama poput brojnih delecija, translokacija i aneuploidija. Te mutacije uzrokuju netipični kariotip, stanje koje se često naziva kromosomska nestabilnost – CIN (od eng. *chromosomal instability*)(Alberts *i sur.*, 2002)(Ewing *i sur.*, 2013). Većina pacijenata ima obiteljsku povijest bolesti, ali u približno 25% slučajeva mutacije nastaju *de novo* (Bogaert i Prenen, 2014). Iako se ovom sindromu može prepisati tek 1% svih slučajeva KDC-a, promjene u genu *APC* identificirane su u više od 85% sporadičnih slučajeva (Hisamuddin i Yang, 2006).

2.2. Nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom

Uz nasljedni sindrom uzrokovan mutacijama gena *APC*, postoji i drugi, zastupljeniji sindrom koji dovodi do razvoja karcinoma u desnom dijelu debelog crijeva. Kod ovog sindroma nazvanog nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom – HNPCC (od eng. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) vjerojatnost od obolijevanja od KDC-a povećava se neovisno o broju adenomatoznih polipa (Alberts *i sur.*, 2002). HNPCC je poznat i pod nazivom Lynchov

sindrom, a nasljeđuje se autosomalno dominantno te je najčešći nasljedni sindrom odgovoran za 5% slučajeva KDC-a (Ewing i *sur.*, 2013). Osim što povećava rizik od nastanka KDC-a, uz njega se vežu i pojave drugih oblika tumora poput tumora jajnika, želuca, mozga, kože itd. (Bogaert i Prenen, 2014).

Ustanovljeno je da se kod HNPCC-a javljaju alternacije u mikrosatelitnim regijama, tj. područjima u kojima se ponavljaju kratki motivi DNA od 2 do 5 parova baza. Ova pojava je nazvana mikrosatelitna nestabilnost – MSI (od eng. *microsatellite instability*), a alternacije ne izazivaju velike promjene u kariotipu (Fearon, 2011). Kasnije je uočena sličnost fenotipa MSI s fenotipom kvasca koji je imao promijenjene gene za popravak pogrešnog sparivanja u DNA, tzv. gene *MMR*. Ta sličnost dovela je do identifikacije pet gena *MMR* povezanih s HNPCC-om. Prvi otkriveni i najzastupljeniji bili su *MSH2* i *MLH1*, čije su mutacije zabilježene u oko 70% slučajeva HNPCC-a (Hisamuddin i Yang, 2006). Uz *MSH2* i *MLH1* uskoro su identificirani i opisani geni *PMS1*, *PMS2* te *MSH6* koji su također uključeni u karcinogenezu. Nedavno je uz HNPCC vezan i gen *EPCAM* čija mutacija na 3' kraju dovodi do utišavanja gena *MSH2* (Ewing i *sur.*, 2013). Iako sam HNPCC uzrokuje tek 5% KDC slučajeva, mutacije gena odgovornih za njegov nastanak povezane su s približno 15% sporadičnih slučajeva karcinoma debelog crijeva (Ewing i *sur.*, 2013).

2.3. OSTALI SINDROMI

Oslabljena adematozna polipoza (AFAP, od eng. *attenuated FAP*)

Sindrom oslabiljene adematozne polipoze kolona manje je agresivna varijanta FAP-a s manjom pojavnosti polipa u kasnijoj dobi te nižim rizikom od pojave KDC-a (Bogaert i Prenen, 2014). Polipi se kao i kod uobičajenog FAP-a javljaju u lijevom crijevu obično oko 40-e godine dok se KDC razvija oko 10 godina nakon pojave polipa. Nastanak ovog oblika FAP-a također je povezan sa mutacijama gena *APC*, točnije mutacijama u njegovoj 5' ili 3' regiji (Jasperson i *sur.*, n.d.).

MUTYH povezana polipoza (MAP, od eng. *MUTYH-associated polyposis*)

MAP često pokazuje kliničke značajke FAP-a, ali nije povezan s mutacijama na genu *APC*, već s genom *MUTYH*. Osobe sa ovim sindromom imaju 80%-tan rizik za razvoj KDC-a do 40-e godine života (Bogaert i Prenen, 2014).

Peutz-Jeghersov sindrom (PJS, od eng. *Peutz-Jeghers syndrome*)

PJS je jako rijedak autosomno dominantan poremećaj karakteriziran pojavom višestrukih polipa čak i u tankom crijevu. Ovaj sindrom povezan je sa visokim rizikom od

razvoja KDC-a, a kod žena i od karcinoma dojke. Uz pojavu PJS-a vezana je mutacija tumor-supresorskog gena *STK-11* (Bogaert i Prenen, 2014).

Sindrom juvenilne polipoze (JPS, od eng. *Juvenile polyposis syndrome*)

Iako ime može asociirati na pojavu simptoma ovog sindroma u mladim osobama, oni se ne javljaju isključivo u mladenačkoj dobi. U ovom slučaju izraz „juvenilni“ označava primitivnu strukturu vezivnog tkiva u polipu (Zergollern, 1994).

Oboljele dijelimo u tri skupine:

- 1.) osobe s malim nakupinama polipa
- 2.) osobe s polipima po cijelom debelom crijevu
- 3.) osobe s obiteljskom povijesti JPS-a.

Rizik od maligne transformacije ovih polipa je 40%, a uz pojavu sindroma vezani su geni *SMAD4*, *BMPRIA* i *PTEN* (Bogaert i Prenen, 2014).

Hiperplastična polipoza (HPP, od eng. *Hyperplastic polyposis*)

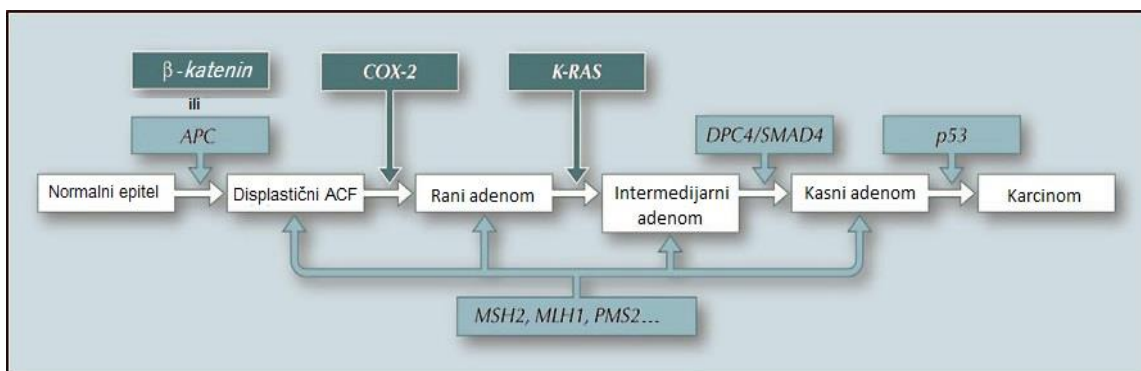
HPP je vrlo rijedak sindrom čiji je glavni simptom stvaranje višestrukih i velikih polipa u debelom crijevu. Kod osoba s ovim sindromom postoji velika vjerojatnost za razvoj KDC-a do 50-e godine iako su zabilježeni i slučajevi u ranijoj životnoj dobi. Iako postoje rijetki obiteljski slučajevi ovog sindroma, nasljednost još uvijek nije sa sigurnošću utvrđena. Određeni slučajevi pokazuju mutacije na genu *MUTYH*, ali ni ova povezanost još nije u potpunosti potvrđena (Jasperson *i sur.*, n.d.).

3. GENI POVEZANI S NASTANKOM KDC-a

Fearon i Voglestein još su 1990-e godine predložili genetički model (Slika 1.) koji objašnjava postupnu formaciju KDC-a. Naveli su tri važne karakteristike:

- 1.) KDC nastaje zbog mutacija onkogenih i tumor supresorskih gena
- 2.) za formaciju malignog tumora potrebno je barem 4 do 5 mutacija ključnih gena
- 3.) te se mutacije često pojavljuju u određenom slijedu, ali važnija je ukupna akumulacija promjena (Fearon, 1990).

U navedenom procesu sudjeluju dva tipa gena odgovornih za regulaciju staničnog ciklusa. Proto-onkogeni kontroliraju stanični rast i diferencijaciju, no prilikom mutacije zaobilaze kontrolne mehanizme i postaju visoko aktivni onkogeni. U normalnim okolnostima tumor-supresorski geni (TSG) zaustavljaju rast malignih stanica kontrolom stanične diobe, dok mutirani oblici gube funkciju što dovodi do nekontrolirane proliferacije stanica (Mirjana Pavlica, 2012).



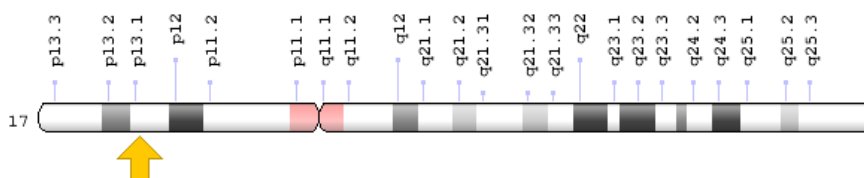
Slika 1. Genske promjene odgovorne za postupan prijelaz normalnih epitelnih stanica u maligne.

Prilagođeno na temelju (Hisamuddin i Yang, 2006).

3.2. TP53

Tumor-supresorski gen *TP53* nalazi se na kratkom kraku 17. kromosoma na poziciji 13.1 (17p13.1) (Slika 2.). On kodira protein p53 tzv. „čuvar genoma“ koji može aktivirati ekspresiju gena vezanih za popravak DNA ili apoptozu stanice pri regulaciji staničnog ciklusa (John K. Cowell, 2001). Stanični ciklus ima nekoliko faza, a glavna regulacijska točka (tzv. restriksijska točka) je na prijelazu iz G1 u S fazu. Osim klasičnih faktora za kontrolu staničnog ciklusa u ovoj kontrolnoj točki važan je i utjecaj proteina p53. Povišenje razine p53 uslijed oštećenja DNA dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa, a ovisno o razini oštećenja aktiviraju se geni za popravak ili se signalizira apoptoza.

Mutacije gena *TP53* izazivaju gubitak funkcije proteina p53 što može dovesti do replikacije oštećene DNA u S fazi. Ovim se procesom gomilaju mutacije pa mogu nastati tumorske stanice (Cooper and Hausman, 2004). Iako mutacije izazivaju promjenu tek u jednoj aminokiselini proteina p53, ta promjena može dovesti do pogreške u smatanju te samim time do gubitka funkcije. Upravo mutacije gena *TP53* nađene su u više od 50% svih tumora, a nalazimo ih i u velikom broju slučajeva karcinoma debelog crijeva (NIH, n.d.).



Slika 2. Položaj gena *TP53* na kromosomu 17, poziciji 13.1

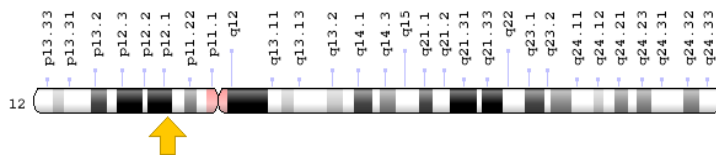
(od 7 668 402. do 7 687 550. pb)

(<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53#resources>)

3.3. KRAS

Gen *KRAS*, lokaliziran na 17p12.1 kromosomu, jedan je od najčešće aktiviranih onkogeni. Promjene u sekvenci ovoga gena detektirane su u 17-25% svih tumora, pa i u približno 50% slučajeva KDC-a. Ovaj gen kodira za istoimeni K-RAS protein koji vezanjem GTP-a i njegovim prevođenjem u GDP provodi samoinaktivaciju. U normalnim uvjetima vanjski signali potiču nakupljanje GTP-a koji se veže na signalni protein K-RAS čime ga aktivira. Protein se inaktivira hidrolizom GTP-a u GDP čime i prestaje provođenje signala.

U stanicama KDC-a gen *KRAS* najčešće nakuplja točkaste mutacije u egzonima 12, 13 i 61 zbog čega se jako reducira GTPazna aktivnost proteina. K-RAS je tako konstantno aktiviran što narušava kontrolu staničnog ciklusa. Osim promjena u signalizaciji proliferacije, apoptoze te metastaziranja, mutacije *KRAS* povezane su i s nastankom abnormalnog kariotipa, tj. stanja



Slika 3. Položaj gena *KRAS* na kromosomu 12, poziciji 12.1 (od 25 204 789. do 25 252 093. pb)

(<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/KRAS#resources>)

CIN. Pretpostavlja se da do CIN-a dolazi zbog promjena u organizaciji citoskeleta prilikom diobe stanice, koja je inače regulirana K-RAS-om. U posljednjih nekoliko godina primijećeno je da su stanice pacijenata s određenom mutacijom

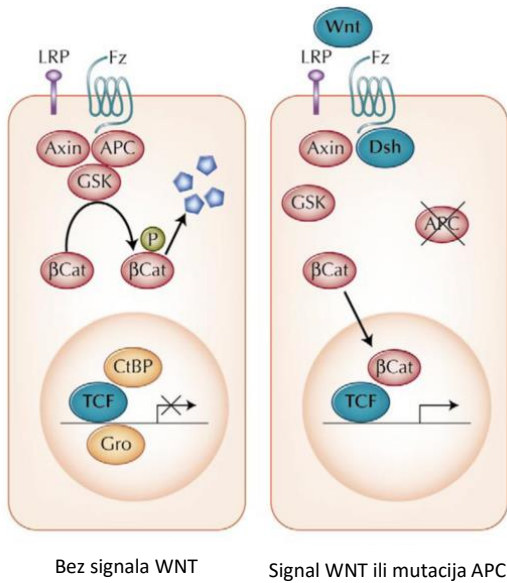
KRAS otporne na apoptozu koju bi trebala uzrokovati kemoterapija. Iako ovo saznanje ide u prilog istraživanjima koja predviđaju niske šanse za izlječenje pacijenata s mutacijom *KRAS*, ujedno predstavlja polazište za pronalazak novih metoda liječenja (Castagnola i Giaretti, 2005).

3.4. APC

Do danas je zabilježeno više od 700 mutacija gena *APC* kod osoba s FAP sindromom, uključujući različite delecije, mutacije pomaka okvira čitanja i točkaste mutacije. Iako većina osoba s nekom od mutacija ovog gena razvije KDC, broj polipa i životna dob u kojoj se javljaju određena je položajem mutacije u genu *APC* (NIH, n.d.). *APC* se nalazi na poziciji 22.2, dugog kraka kromosoma 5 (5q22.2) i kodira protein u postmitotskim epitelnim stanicama.

Poznato je da protein *APC* sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa, adhezije i migracije stanica te u segregaciji kromosoma. Jedna od uloga proteina *APC* je vezanje citoskeletnih elemenata, točnije mikrotubula pa time i stvaranje diobenog vretena. U genomu stanica KDC-a zabilježene kromosomske abnormalnosti povezane su s mutacijom ovog gena, a nastali fenotip nazivamo kromosomskom nestabilnošću (Fearon, 2011).

Osim ove, APC ima važnu ulogu u WNT/ β -katenin signalnom putu (Slika 4.) koji regulira staničnu proliferaciju. Kada je gen funkcionalan i nema vanjskog WNT signala proteinski



Slika 4. WNT/ β -katenin signalni put. Prilagođeno prema (Fearon, 2011)

kompleks koji uključuje APC veže β -katenin te ga fosforilira čime se signalizira razgradnja. U ovom slučaju transkripcijski faktori u jezgri zadržavaju svoju funkciju i položaj te se geni ne transkribiraju. Dolaskom signala kroz put WNT ili u slučaju nefunkcionalnog proteina APC, β -katenin se ne fosforilira i ulazi u jezgru gdje aktivira transkripciju gena za proliferaciju. U normalnim stanicama na ovaj proces utječe upravo vanjski signalni glikoprotein WNT, no prilikom mutacije gena *APC* dolazi do konstitutivne ekspresije gena za proliferaciju, a samim time i razvoja tumorske stanice. Osim mutacije *APC*-a, u malom broju

slučajeva, kod kojih nije detektirana ova mutacija, identificirane su mutacije gena *CTNNB1*, *AXIN1* i *AXIN2* koji također kodiraju za proteine navedenog signalnog puta (Fearon, 2011).

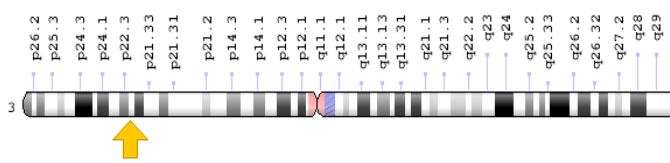
3.5. GENI MMR

Mutacije gena za popravak pogrešnog sparivanja u DNA glavni su uzrok nastanka sindroma HNPCC, no brojne mutacije ovih gena zabilježene su i kod sporadičnog KDC-a. U ukupno 6 gena *MMR* uključenih u ovu vrstu popravka DNA, mutacije ne pokazuju mjesta veće pojavnosti, već se ravnomjerno javljaju u sekvenci gena. Geni *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6* te *MSH3* kodiraju proteine koji prepoznaju pogrešno sparene baze u DNA tijekom replikacije i sudjeluju u njihovom popravku. U najvećem broju slučajeva KDC-a detektirane su mutacije gena *MSH2* i *MLH1*, dok su u samo nekoliko obitelji zabilježene mutacije ostalih gena (Papadopoulos i Lindblom, 1997).

3.5.1. MLH1

Gen *MLH1* lokaliziran je na kromosomu 3, točnije 3p21.3 (Slika 6.) te kodira protein koji stupa u interakciju s proteinom *PMS2* čime se stvara kompleks koji koordinira ostale proteine za popravak DNA tijekom replikacije. Popravak uključuje prepoznavanje pogrešno sparenih nukleotida, njihovo izrezivanje te zamjenu ispravnima. Tako se višestruko povećava točnost

replikacije, tj. sprječava se daljnja distribucija štetnih promjena DNA u stanice kćeri. Upravo

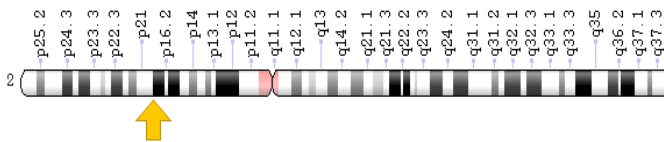


Slika 6. Položaj MLH1 gena na poziciji 21.3 kratkog kraka kromosoma 3 (od 36,993,350 do 37,050,846 pb). (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MLH1/location.png>)

su mutacije gena *MLH1* utvrđene u 50% svih slučajeva sindroma HNPCC, a ovisno o mjestu na genu nastaju i varijante sindroma poput Turcotovog sindroma, Muir-Torreovog sindroma i drugih (NIH, n.d.).

3.5.2. MSH2

Gen *MSH2* nalazimo na kratkom kraku kromosoma 2, na poziciji 21, a proteže se između 47 634 501. i 47 403 067. para baza (Slika 7.). Isto kao i *MLH1*, *MSH2* stvara kompleks sa proteinima *MSH6* ili *MSH3* koji potom identificira mjesto pogreške na DNA. Na to mjesto zatim se veže *MLH1-PMS2* kompleks koji tu grešku popravlja. Približno 40% slučajeva

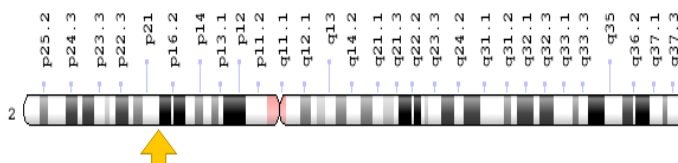


Slika 7. Položaj *MSH2* gena na poziciji 21 kratkog kraka kromosoma 2 (od 47 634 501 do 47 403 07 pb). (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSH2/location.png>)

sindroma HNPCC pripisuje se mutacijama gena *MSH2* koje također mogu sudjelovati u nastanku varijante već spomenutih sindroma i velikog broja različitih tumora kože (NIH, n.d.).

3.6. EPCAM

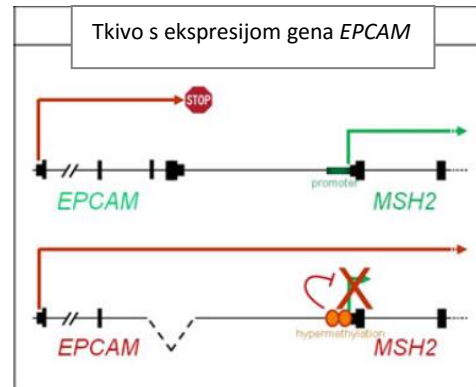
Gen *EPCAM* kodira za membranski protein EpCAM (od eng. *epithelial cellular adhesion molecule*) epitelnih stanica, koji pomaže u adheziji stanica jednih na druge. Također, može odcijepiti intracelularnu domenu (EplCD) koja pomaže u prijenosu signala do jezgrine membrane. EplCD putuje do jezgre i tamo stvara kompleks s drugim proteinima te regulira



Slika 8. Položaj gena *EPCAM* na poziciji 21 kratkog kraka kromosoma 2 (od 47 369 148 do 47 387 028 pb). (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/EPCAM/location.png>)

procesе vezane uz proliferaciju, diferencijaciju i migraciju stanica. Približno 6% slučajeva HNPCC-a povezano je s mutacijom gena *EPCAM*. Ovaj gen nalazi se na kromosomu 2 (Slika 8.) u neposrednoj blizini gena *MHS2*. Delecija na 3' kraju

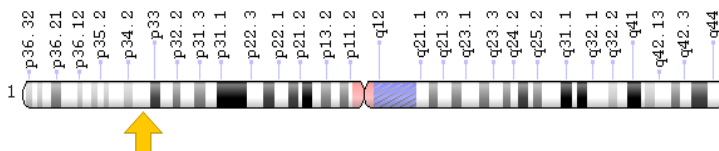
gena *EPCAM* uklanja njegovu terminacijsku regiju. Iz ovog razloga nastaje dugačka mRNA koja sadrži transkript gena *EPCAM* i *MSH2* i nije funkcionalna u eukariotskoj stanici (Slika 9.). Uz deleciju 3' kraja gena *EPCAM* često se javlja i hipermetilacija promotora gena *MSH2* što također uzrokuje prekid transkripcije. Na ovaj način ne nastaje funkcionalan protein MSH2 ili ga nastaje jako malo (Ligtenberg *i sur.*, 2013).



Slika 9. Mehanizam nastanka HNPCC-a koji uključuje gen *EPCAM*. (Ligtenberg *i sur.*, 2013)

3.7. MUTYH

Gen *MUTYH* se nalazi na 34.1 poziciji prvog kromosoma (Slika 10.), kodira za enzim glikozilazu MYH. Glikozilaza je uključena u specifični popravak DNA izrezivanjem baze. U određenim slučajevima dolazi do oksidativnog oštećenja gvanina, koji biva modificiran pa se krivo sparuje s adeninom umjesto sa citozinom. Na ovakvo mjesto dolazi glikozilaza MYH te izrezuje krivu bazu, a zatim ostali enzimi uklanjaju i fosfatnu okosnicu te se ugrađuje ispravni nukleotid.



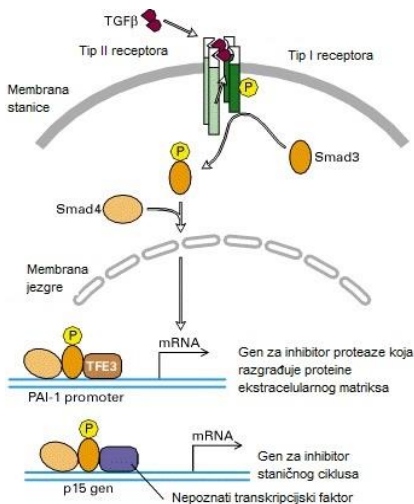
Slika 10. Položaj gena *MUTYH* na poziciji 34.1 kratkog kraka kromosoma 1 (od 45 329 242 do 45 340 925 pb). (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MUTYH#location>)

Mutacije gena *MUTYH* uzrokuju autosomalno recesivni oblik FAP-a nazvan MAP. Zbog mutacije enzim više ne izrezuje krivo ugrađene baze uslijed čega se gomilaju pogreške u DNA strukturi

koje se prenose na stanice kćeri. Budući da je MAP nasljedni sindrom, čak i jedan naslijeđeni mutirani alel gena *MUTYH* povećava rizik, jer se spontanom promjenom drugog alela ostvaruje puni potencijal za nastanak KDC-a. Ovim putem nastaje recesivni homozigot, tj. nefunkcionalna glikozilaza MYH. Najčešće mutacije promjene aminokiseline su zamjena tirozina s cisteinom na poziciji 179 (Tyr179Cys) i glicina s asparaginskom kiselinom na poziciji 396 (Gly396Asp). Ove dvije mutacije nosi približno 2% populacije, a mogu se naći u do 90% patogenih varijanti gena *MUTYH*, tj. 1% slučajeva KDC-a u osoba sjevernoeuropskog porijekla. Činjenica da nisu pronađene u Koreanaca, Japanaca te osoba srednjeeuropskog porijekla upućuje na etničku diferencijaciju bolesti (Nielsen *i sur.*, 1993).

3.8. SMAD4

Gen *SMAD4* nalazi se na 18. kromosomu, a njegove mutacije uzrokuju sindrom nazvan JPS. Gen kodira za protein SMAD4 koji sudjeluje u provođenju signala u TGF- β signalnom putu čime inhibira rast stanica, pa djeluje kao transkripcijski faktor i tumorski supresor. Protein TGF- β se veže na membranski receptor koji fosforilira ostale SMAD proteine zbog čega se vežu međusobno, a na kraju i sa proteinom SMAD4. Nastali kompleks SMAD ulazi u jezgru



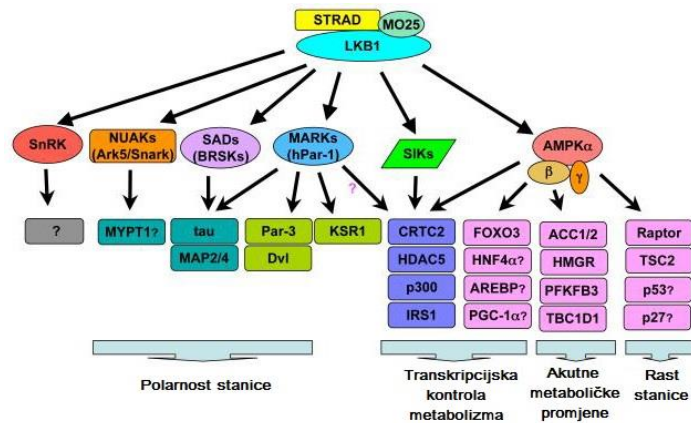
Slika 11. Signalni put TGF- β . Prilagođeno na temelju (Lodish *i sur.*, 2000).

gdje aktivira transkripciju mnogih gena (Slika 11.) uključujući i gen za protein p15. Protein p15 ključan je u inhibiciji ulaska stanice u S-fazu staničnog ciklusa. TGF- β , a time i SMAD4 pokretanjem ekspresije p15 posredno uzrokuju zastoj stanice u G1-fazi. Osim ovog poremećaja u rastu i proliferaciji stanica kod mutacija gena *SMAD4* uočen je i utjecaj na gene za proteine ekstracelularnog matriksa. TGF- β signalni put inducira ekspresiju ovih gena pa neispravnost proteina SMAD4 utječe na sintezu proteina ekstracelularnog matriksa. Nemogućnost sinteze tih proteina uvelike pridonosi metastazi jer promijenjeni okoliš više ne zadržava stanicu na mjestu (Lodish *i sur.*, 2000).

3.9. STK-11

Gen *STK-11*, poznat i pod nazivom *LKB1* nalazi se na poziciji 13.3 kratkog kraka kromosoma 19 te kodira za tumor-supresorski enzim Serinsku/treoninsku kinazu 11 (STK-11). STK-11 utječe na polarizaciju, tj. orijentaciju stanice u tkivu, pomaže odrediti količinu energije koju stanica koristi te potiče apoptozu. U kompleksu s drugim proteinima direktno fosforilira te aktivira druge kinaze koje isto čine s mnogim proteinima potrebnim za daljnji prijenos signala (Slika 12.). Promjene u ekspresiji gena *STK-11*, tj. inaktivirajuće mutacije dovode do poremećaja u već navedenim procesima (Shackelford i Shaw, 2009).

Nasljedne delecije, insercije, mutacije promjene smisla i mutacije bez smisla (od eng. *missense* i *nonsense*) ovog gena uzrokuju Peutz-Jegnarsov sindrom povezan s povećanim rizikom od pojave KDC-a. Kod osoba s PJS-om nađeno je više od 340 različitih mutacija širom gena. Većina uzrokuje prijevremeni prekid transkripcije pa nastaje kratak, nefunkcionalan protein. Ostale mutacije mijenjaju pojedine aminokiseline u sekvenci proteina što dovodi do promjene u smatanju te smanjenja ili potpunog gubitka aktivnosti enzima. Osim nasljednih mutacija, karcinogeneza nekih karcinoma debelog crijeva pa i drugih tumora uključuje i somatske mutacije ovog gena što potvrđuje ulogu u nastanku sporadičnog KDC-a (NIH, n.d.).



Slika 12. Djelovanje STK-11 na ostale enzime u stanici. Prilagođeno na temelju (Shackelford i Shaw, 2009).

4. DETEKCIJA MUTACIJA I PRIMJENA U MEDICINI

Razvoj tehnologije omogućio je detaljnije istraživanje raznih uzroka tumora i ostalih bolesti pa tako i karcinoma debelog crijeva. Utvrđeno je mnogo različitih mehanizama njegovog razvoja, a samim time i velik broj različitih gena. Upravo detekcija mutacija u tim genima ima centralnu ulogu u dijagnozi nasljednih, ali i sporadičnih oblika KDC-a. Danas su u upotrebi razne metode za detekciju promjena u genomu, no sve daju velik broj korisnih informacija.

Klasična kariotipizacija se koristi za detekciju većih kromosomskih abnormalnosti kakve su povezane s mutacijama gena *APC* kod FAP sindroma. Stanice se zaustave u metafazi te se boje s bojom Giemsa. Ovisno o prethodnom tretmanu stanica na kromosomima su nakon ovog bojenja vidljive karakteristične pruge. Obrazac pruga se uspoređuje s normalnim kariotipom te se detektiraju promjene.

Fluorescentnom hibridizacijom *in situ* (FISH) moguće je točno lokalizirati pojedini gen na kromosomu. Ovom metodom može se uočiti translokacija ili pak delecija određenog gena što dovodi do netipičnog fenotipa. Fluorescentno označena proba specifična za određeni gen hibridizira na DNA, točnije na metafazni kromosom. Položaj probe uspoređuje se s referentnim uzorkom DNA te se detektiraju nepravilnosti.

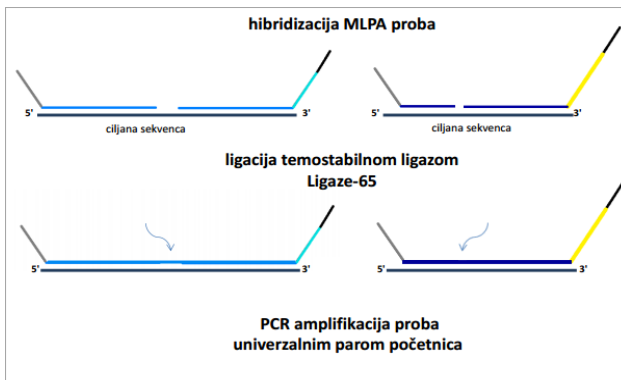
Metodom CGH (od eng. *comparative genomic hybridization*) uspoređuje se ukupna DNA tumorskih (testna DNA) i normalnih stanica (referentna DNA) čime se otkrivaju različite nepravilnosti. Testna i referentna DNA se obilježe različitim fluorescentnim bojama te se u omjeru 1:1 nanose na normalne metafazne kromosome. Obje DNA hibridiziraju na istim pozicijama metafaznog kromosoma u ovisnosti o količini istih sekvenci u uzorcima. Ovako se mogu detektirati mjesta različitih obojenja koja će predstavljati manjak ili višak određene sekvence u oba genoma. One sekvence koje su normalno prisutne biti će vidljive u obliku treće boje, tj. kombinacije prve dvije.

Lančana reakcija polimerazom - PCR (od eng. *polymerase chain reaction*) se koristi za umnažanje željenih sekvenci dok se neki njegovi podtipovi poput AS-PCR-a (od eng. *Allele-specific PCR*) koriste i za otkrivanje manjih delecija i točkastih mutacija (Mahdieh i Rabbani, 2013). AS-PCR koristi dva primera obilježena različitom fluorescentnim bojama od kojih je jedan specifičan za nemutirani lokus, a drugi za lokus koji sadrži određenu mutaciju. Nakon završetka reakcije detektira se fluorescentna boja čime se potvrđuje ili negira prisutnost određene mutacije.

Za testiranje višestrukih mutacija često se koristi metoda DNA-mikročip. Na nepomičnu pločicu ili membranu se nanese obilježeni fragmenti DNA koji sadrže sekvence karakteristične za određenu bolest, tj. tumor. Na tako obilježenu DNA nanosi se jednolančana DNA uzorka, točnije DNA u kojoj želimo detektirati specifičnu promjenu. Prilikom hibridizacije uzorka i fiksirane DNA javlja se signal u obliku obojenja te se ovisno o mjestu signala utvrđuje koja je mutacija prisutna u ispitivanom uzorku.

S obzirom na brz razvoj tehnologije, a time i pojeftinjenje provođenja testova za detekciju mutacija sve se češće koristi sekvenciranje DNA. Sekvencirati se mogu određeni segmenti za koje se sumnja da nose mutaciju, ali i cijeli genom točnije egzom budući da se većina mutacija koje uzrokuju tumore nalazi upravo u kodirajućim regijama gena, tzv. egzonomima (Mahdieh i Rabbani, 2013).

Metoda MLPA (od eng. *multiolex ligation-dependent probe amplification*) koristi se za istovremenu detekciju delecija i duplikacija do 60 parova baza, čak do 50 različitih sekvenci



Slika 13. Princip metode MLPA (Rinčić, 2014).

unutar jednog uzorka DNA. Metoda se zasniva na umnažanju probe dodane uzorku, a ne testne DNA. Proba MLPA sastoji se od dva odvojena dijela. Jedan sadrži kratki oligonukleotid sa sekvencom od interesa i fluorescentno obilježenom početnicom, dok drugi između ta dva dijela sadrži tzv. sekvencu Stuffer koja omogućuje

razlikovanje proba. Nakon što se obje probe u potpunosti vežu na testnu DNA dolazi do njihove međusobne ligacije i tek tada se probe mogu umnožiti (Slika 13.). Duplikacije prepoznajemo po jačem, a delecije po slabijem fluorescentnom signalu probe koje očitava računalo (Rinčić, 2014).

Osim navedenih, i mnoge druge metode omogućuju pravovremenu detekciju genskih bolesti koje uključuju i karcinom debelog crijeva. Brojne nasljedne mutacije gena koje dovode do razvitka FAP-a, HNPCC-a, MAP-a, JPS-a i ostalih sindroma ključne su u otkrivanju sporadičnih slučajeva KDC-a. Ciljana analiza promjena gena koji sudjeluju u putevima nastanka ovih sindroma kod osoba sa sporadičnim KDC-om značajno ubrzava proces kategorizacije te omogućava ciljano liječenje karcinoma.

5. ZAKLJUČAK

U posljednjih petnaestak godina postignut je veliki napredak u razumijevanju karcinogeneze karcinoma debelog crijeva. Od početne podjele na nasljedni, obiteljski i sporadični oblik, razvila se detaljnija kategorizacija podtipova prema mutacijama gena koje ga uzrokuju. Ipak za njegovo bolje razumijevanje potrebno je provesti još mnoga istraživanja kako na nepoznatim tako i na genima čije mutacije nisu potvrđene na adekvatnom broju oboljelih. Proučavanje nasljednih sindroma koji povećavaju rizik od nastanka KDC-a važno je za testiranje srodnika oboljelih, ali i potvrdu dijagnoze kod sporadičnog tipa. U ovom pogledu značajne su već dobro razvijene metode detekcije mutacija, koje se baziraju na otkrivanju promjena proučenih kod osoba oboljelih od sindroma poput FAP-a i HNPCC-a. Proučavanje poznatih i identifikacija novih gena odgovornih za karcinogenezu omogućava brže, efikasnije i preciznije liječenje svih tumora pa tako i karcinoma debelog crijeva.

6. LITERATURA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). The Molecular Basis of Cancer-Cell Behavior.
- Bogaert J, Prenen H (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol* **27**: 9–14.
- Boranić M (Medicinska naklada: 2000). *Karcinogeneza*.
- Brkić T, Grgić M (2006). Kolorektalni karcinom. *Medicus* **15**: 89–97.
- Castagnola P, Giaretti W (2005). Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* **1756**: 115–125.
- Cooper GM, Hausman RE (Medicinska naklada: 2004). *Stanica - Molekularni pristup*.
- Fearon ER (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759–767.
- Fearon ER (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* **6**: 479–507.
- Hisamuddin IM, Yang VW (2006). Molecular Genetics of Colorectal Cancer: An Overview. *Curr Color Cancer Rep* **2**: 53–59.
- Iain Ewing, Joanna J Hurley, Eleni Josephides AM (2013). The molecular genetics of colorectal cancer.
- Jalšovec D (ZT Zagrad: 2013). *Anatomija*.
- Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW Hereditary and Familial Colon Cancer. John K. Cowell (Gulf Professional Publishing: 2001). *Molecular Genetics of Cancer*.
dostupno na:
<https://books.google.hr/books?id=TBL3MT0KNSAC&hl=hr&source=gbs_navlinks_s>
- Lanspa S, Boman SBM, Vogelstein B (1992). Colon Cancer Genetics. *CANCER Suppl* **70**: 1300–1312.
- Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Geurts Van Kessel A, Hoogerbrugge N (2013). EPCAM deletion carriers constitute a unique subgroup of Lynch syndrome patients. *Fam Cancer* **12**: 169–174.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000). Mutations Causing Loss of Cell-Cycle Control.
- Mahdieh N, Rabbani B (2013). An overview of mutation detection methods in genetic disorders. *Iran J Pediatr* **23**: 375–388 dostupno na:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24427490>>.
- Mirjana Pavlica Mrežni udžbenik iz genetike, dostupno na:
<<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/>>.

Nielsen M, Lynch H, Infante E, Brand R (1993). *MUTYH-Associated Polyposis*.
GeneReviews(®) dostupno na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23035301>>.
NIH Genetics Home Reference. *US Natl Libr Med* dostupno na: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene>.
Papadopoulos N, Lindblom A (1997). Molecular basis of HNPCC: Mutations of MMR genes.
Hum Mutat **10**: 89–99.

Registar za rak Republike Hrvatske Incidencija raka u Hrvatskoj 2013. godine. dostupno na:
<http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2013_final.pdf>.

Rinčić M (2014). Molekularna citogenetika nekih neurorazvojnih poremećaja. dostupno na:
<http://medlib.mef.hr/2177/1/Rincic_M_disertacija_rep_2177.pdf>.

Shackelford DB, Shaw RJ (2009). The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **9**: 563–75. dostupno na:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19629071>>.

Zergollern L (Školska knjiga: 1994). *Medicinska genetika* 2.

7. SAŽETAK

Karcinom debelog crijeva maligni je epitelni tumor i jedan od najčešćih oblika malignih novotvorenina koje zahvaćaju oba spola. Unatoč još uvijek visokoj stopi mortaliteta, posljednjih desetak godina učestalost ovog karcinoma se smanjuje, ali još uvijek predstavlja veliki zdravstveni problem. Prema uzroku nastanka možemo ga podijeliti na obiteljski, nasljedni i sporadični oblik. Istraživanjem nasljednih sindroma poput obiteljske adenomatozne polipoze i nasljednog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma otkrivene su promjene gena *APC*, *MMR*, *KRAS* i *TP53* uključenih i u razvoj sporadičnog karcinoma. Razvitkom metoda istraživanja otkriveni su i neki manje učestali sindromi te geni koji se s njima povezuju. Istraživanjem gena *EPCAM*, *MUTYH*, *SMAD4* i *STK-11* koji sudjeluju u nastanku rijetkih sindroma i ranije otkrivenih primjera drugih gena otkriveni su mehanizmi karcinogeneze što je omogućilo razvitak preciznijih metoda liječenja. Unatoč značajnom broju novootkrivenih promjena u različitim genima potrebno je nastaviti istraživanja da bi se u potpunosti razumjeli priroda i značaj procesa razvoja karcinoma debelog crijeva.

8. SUMMARY

Colorectal cancer is a malignant epithelial tumor and one of the most common forms of malignancies that affect both man and women. Despite high rate of mortality, incidence of this cancer is decreasing, but still represents a major health issue. According to the origin, it can be divided into family, hereditary and sporadic form. By studying hereditary syndromes such as FAP and HNPCC, mutations in *APC*, *MMR*, *KRAS* and *p53* genes are found. Mutations of these genes are part of cancerogenesis in sporadic forms of colorectal cancer as well as in hereditary syndromes. With development of research methods some less common syndromes and mutations in associated genes have been discovered. Mechanisms of carcinogenesis were understood by studying *EpCAM*, *MUTYH*, *SMAD4* and *STK-11* genes that are included in development of rare syndromes and previously discovered mutations of different genes. Research of its carcinogenesis has contributed to development of more precise treatment methods. Despite the significant number of newly discovered mutated genes, it is necessary to continue research in this field to understand the nature and significance of the colon cancer cancerogenesis.