

# Uloga polimorfizama gena KRAS na mjestima vezanja mikro RNA u tumorigenezi sporadičnih karcinoma debeloga crijeva

---

Poljak, Mirko

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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:217:148023>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-18**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Mirko Poljak

**ULOGA POLIMORFIZAMA GENA KRAS NA  
MJESTIMA VEZANJA MIKRO RNA U  
TUMORIGENEZI SPORADIČNIH  
KARCINOMA DEBELOGA CRIJEVA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Mirko Poljak

**THE ROLE OF KRAS POLYMORPHISMS  
IN MICRORNA BINDING SITES IN  
SPORADIC COLON CANCER  
TUMORIGENESIS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2021



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Mirko Poljak

**ULOGA POLIMORFIZAMA GENA KRAS NA  
MJESTIMA VEZANJA MIKRO RNA U  
TUMORIGENEZI SPORADIČNIH  
KARCINOMA DEBELOGA CRIJEVA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Prof. dr. sc. Sanja Kapitanović

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Mirko Poljak

**THE ROLE OF KRAS POLYMORPHISMS  
IN MICRORNA BINDING SITES IN  
SPORADIC COLON CANCER  
TUMORIGENESIS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Sanja Kapitanović, MD PhD, professor

Zagreb, 2021

## ŽIVOTOPIS MENTORA

Dr.sc. Sanja Kapitanović, dr.med., znanstvena savjetnica IRB rođena je u Šibeniku gdje je završila osnovno i srednjoškolsko obrazovanje. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala je 1988. godine. Tijekom 1989. godine obavila je obavezni liječnički pripravnički staž u Republičkom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu te položila stručni ispit za zdravstvene radnike. Od 1990. do 1993. godine radila je kao doktor medicine u Djelatnosti za transfuziologiju i imunohematologiju Medicinskog centra Šibenik. Od svibnja 1993. godine zaposlena je na Institutu Ruđer Bošković (IRB). Po završenom poslijediplomskom studiju iz Onkologije magistrirala je 1992. godine te doktorirala 1997. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U zvanje znanstvene suradnice izabrana je 1998. godine, zvanje više znanstvene suradnice 2002. godine te u zvanje znanstvene savjetnice 2004. godine. Od 2009. godine je voditeljica Laboratorija za personaliziranu medicinu Zavoda za molekularnu medicinu IRB, a od 2011. godine zaposlena je na radnom mjestu znanstvene savjetnice u trajnom zvanju IRB. Od 1998. godine do danas bila je voditeljica 3 znanstveno-istraživačka projekta Ministarstva znanosti u području molekularne onkologije. Trenutno je voditeljica znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost: "Mikrosatelitna nestabilnost (MSI i E-MAST) u molekularnom profiliranju sporadičnih karcinoma debelog crijeva". Dobitnica je nagrade Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti (HAZU) za Biomedicinu 1994. godine te Državne nagrade za znanost za Biomedicinu 2006. godine. Od 2009. godine član je Bioetičkog povjerenstva Instituta Ruđer Bošković. Od 2003. godine voditeljica je kolegija na Doktorskom studiju Biomedicine i zdravstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a od 2007. godine kolegija na Interdisciplinarnom doktorskom studiju Molekularnih bioznanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i Instituta Ruđer Bošković. U naslovno zvanje redovite profesorice u trajnom zvanju izabrana je 2017. godine na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Članica je Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR), Europskog društva za istraživanje raka (EACR), Hrvatskog društva za humanu genetiku (HDSG), Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatske liječničke komore te Odbora za genomiku i proteomiku u onkologiji HAZU. Do sada je bila mentor 8 diplomskih radova, 3 magistarska rada i 5 doktorskih disertacija te neposredni voditelj još 3 doktorske disertacije. Objavila je 92 znanstvena rada (75 CC, 27 Q1, 27 Q2), 8 poglavlja u knjizi, 2 popularna rada te 7 revijalnih radova u zbornicima skupova. Ukupna citiranost objavljenih znanstvenih radova iznosi 1569 citata (WoS), h-index 21 (WoS).

“Ovaj je doktorski rad izrađen u Zavodu za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Sanje Kapitanović, dr. med., znan. savjetnica IRB u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu“.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Sanji Kapitanović, dr.med., na svesrdnoj pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog doktorskog rada.*

*Zahvaljujem se i djelatnicima Zavoda za patologiju Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu na pomoći i podršci u prikupljanju, obradi i imunohistokemijskoj analizi uzoraka.*

*Također se zahvaljujem djelatnicima Laboratorija za personaliziranu medicinu Instituta Ruđer Bošković, posebice dr.sc. Sonji Marinović i gospođi Gordani Jurinić, na pomoći u molekularno-genetičkim analizama, statističkoj obradi podataka i pisanju doktorskog rada.*

*Zahvaljujem se i svim kolegama i suradnicima koji su mi pomogli u bilo kojoj fazi izrade doktorskog rada.*

*...velika zahvala mojoj obitelji na razumijevanju, potpori i strpljenju..*

*Ovaj rad posvećujem svojem ocu..*



## ULOGA POLIMORFIZAMA GENA KRAS NA MJESTIMA VEZANJA MIKRO RNA U TUMORIGENEZI SPORADIČNIH KARCINOMA DEBELOGA CRIJEVA

MIRKO POLJAK

Klinika za kirurgiju, Klinička bolnica «Mercur», Zagreb

### Sažetak

Mutacija gena *KRAS* jedna je od ključnih promjena u tumorigenezi karcinoma debelog crijeva, međutim i pojačana ekspresija proteina *KRAS* može imati sličan učinak na proliferaciju tumorskih stanica. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati ulogu *let-7a* i *miR-544* te polimorfizama gena *KRAS* na mjestima vezanja za mikro RNA u tumorigenezi sporadičnih karcinoma kolona bez mutacije gena *KRAS*. Od svih tumora bez mutacije gena *KRAS* 62,0 % je bilo pozitivno na protein *KRAS* te je dokazana značajna razlika u ekspresiji između središta tumora i invazivne fronte tumora kako u postotku pozitivnih stanica tako i u razini ekspresije proteina *KRAS*. Nije dokazana razlika u ekspresiji mRNA *KRAS* i *let-7a* između normalnog i tumorskog tkiva, međutim ekspresija *miR-544* je bila značajno niža u uzorcima invazivne fronte tumora. U korelaciji s ekspresijom proteina *KRAS* ekspresija *miR-544* bila je značajno snižena u uzorcima invazivne fronte tumora pozitivnih na protein *KRAS*. Dokazana je povezanost polimorfizma *let-7a*, ali ne i polimorfizma *miR-544* i ekspresije proteina *KRAS*. Naši rezultati sugeriraju povezanost polimorfizma *KRAS-LCS6* i ekspresije *miR-544* u regulaciji ekspresije proteina *KRAS* u sporadičnim tumorima debelog crijeva negativnim na mutaciju gena *KRAS*.

(83 stranice, 18 slika, 6 tablica, 215 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

**Ključne riječi:** sporadični karcinom debelog crijeva, *KRAS*, SNP, miRNA, *let-7a*, *miR-544*

Mentor: prof. dr. sc. Sanja Kapitanović, dr.med., znan. savjetnica IRB

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

izv. prof. dr. sc. Maja Sirotković Skerlev, dr.med

doc. dr. sc. Anita Škrtić, dr.med

**THE ROLE OF KRAS POLYMORPHISMS IN MICRORNA BINDING SITES IN  
SPORADIC COLON CANCER TUMORIGENESIS**

MIRKO POLJAK

Department of Surgery, Clinical Hospital Merkur, Zagreb,

**Summary**

KRAS is one of the key players in CRC tumorigenesis. Although it is known that *KRAS* mutations are a dominant event in CRC tumorigenesis, *KRAS* overexpression can have a similar effect on cell proliferation and can be regulated by miRNAs. The aim of this study was to examine the role of *let-7a* and *miR-544* and *KRAS* polymorphisms in microRNA binding sites in sporadic colon cancer negative to *KRAS* mutations. In tumors negative to *KRAS* mutations 62.0 % were positive for *KRAS* protein expression and there was a significant difference between tumor centre and invasive tumor front in the percentage of positive tumor cells as well as in the intensity of *KRAS* protein expression. Even though there was no difference in *KRAS* mRNA and *let-7a* expression between normal and tumor tissues, expression of *miR-544* was significantly decreased in invasive tumor front. When correlated with protein expression, *miR-544* was significantly lower in invasive tumor front, but only in tumors positive to *KRAS* protein. Association was found for *let-7a* polymorphism and *KRAS* protein expression but not for *miR-544* polymorphism. Our results suggest the role of *KRAS-LCS6* polymorphism and *miR-544* expression in regulation of *KRAS* protein expression in sporadic colon cancers negative to *KRAS* mutations.

(83 pages, 18 figures, 6 tables, 215 references, original in: Croatian)

**Keywords:** sporadic colon cancer, *KRAS*, SNP, miRNA, *let-7a*, *miR-544*

Supervisor: Prof. Sanja Kapitanović, M.D., PhD, senior scientist RBI

Reviewers: Maja Matulić, PhD, Associate Professor

Maja Sirotković Skerlev, M.D., PhD, Associate Professor

Ass. Prof. Anita Škrtić M.D., PhD

## Sadržaj

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.    | UVOD .....  | 1  |
| 2.    | LITERATURNI PREGLED .....   | 5  |
| 2.1   | Klasifikacija karcinoma debelog crijeva .....                           | 6  |
| 2.2   | Nasljedni karcinom debelog crijeva .....                                | 7  |
| 2.3   | Obiteljski karcinom debelog crijeva.....                                | 8  |
| 2.4   | Sporadični karcinom debelog crijeva .....                               | 8  |
| 2.4.1 | Genetske promjene u nastanku sporadičnog karcinoma debelog crijeva..... | 9  |
| 2.5   | Proteini RAS.....   | 13 |
| 2.5.1 | Struktura malih GTPaza .....  | 13 |
| 2.5.2 | Mutacije gena <i>KRAS</i> .....   | 15 |
| 2.6   | Mikro RNA.....  | 16 |
| 2.6.1 | <i>let-7</i> .....  | 19 |
| 2.6.2 | <i>miR-544</i> .....  | 20 |
| 2.7   | Polimorfizmi jedne baze .....   | 22 |
| 2.7.1 | Polimorfizmi miRNA.....   | 22 |
| 3     | MATERIJALI I METODE .....   | 24 |
| 3.1   | Uzorci .....  | 24 |
| 3.2   | Izolacija DNA.....  | 24 |
| 3.2.1 | Izolacija DNA iz tkiva fenol/kloroform metodom.....                     | 24 |
| 3.2.2 | Određivanje koncentracije DNA .....                                     | 25 |
| 3.3   | Analiza mutacija gena <i>KRAS</i> .....                                 | 26 |
| 3.4   | Analiza mutacija gena <i>KRAS</i> u veznom mjestu za miRNA .....        | 27 |
| 3.4.1 | PCR-RFLP SNP analiza.....   | 27 |
| 3.4.2 | SNP analiza metodom PCR u stvarnom vremenu.....                         | 28 |
| 3.5   | Izolacija RNA .....   | 30 |
| 3.5.1 | Određivanje koncentracije i provjera kvalitete izolirane RNA .....      | 30 |
| 3.6   | Analiza razine ekspresije specifičnih mRNA .....                        | 31 |
| 3.6.1 | Reverzna transkripcija.....   | 31 |
| 3.6.2 | Kvantitativni PCR .....   | 31 |
| 3.7   | Imunohistokemija .....  | 32 |
| 3.8   | Analiza razine ekspresije miRNA .....                                   | 33 |
| 3.8.1 | Reverzna transkripcija.....   | 33 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.8.2 | Kvantitativni PCR .....  | 34 |
| 3.9   | Statističke metode.....  | 35 |
| 4     | REZULTATI.....   | 36 |
| 4.1   | Analiza mutacija gena <i>KRAS</i> .....  | 36 |
| 4.2   | Analiza ekspresije proteina <i>KRAS</i> .....  | 39 |
| 4.3   | Analiza ekspresije mRNA i miRNA .....  | 43 |
| 4.4   | Korelacija mRNA <i>KRAS</i> te <i>let-7a</i> i <i>miR-544</i> s ekspresijom proteina <i>KRAS</i> ..... | 46 |
| 4.5   | SNP polimorfizmi unutar mjesta vezanja za miRNA na 3' UTR gena <i>KRAS</i> .....                       | 48 |
| 5     | RASPRAVA .....   | 51 |
| 6     | ZAKLJUČCI.....   | 58 |
| 7     | LITERATURA .....   | 60 |
| 8.    | POPIS SLIKA, TABLICA I KRATICA .....   | 80 |

## 1. UVOD

Karcinom debelog crijeva jedan je od najčešćih zloćudnih tumora i jedan od vodećih uzroka smrti od raka u zemljama razvijenog svijeta. Oko 80 % karcinoma debelog crijeva javlja se u sporadičnom obliku, a javlja se kao posljedica stupnjevitog procesa tijekom kojeg, kao posljedica nakupljanja mutacija u onkogenima, tumor supresorskim genima i genima za popravak DNA, iz dobroćudnog adenoma nastaje zloćudni invazivni karcinom (Vogelstein i sur., 1988, Kinzler and Vogelstein, 1996, Coppede i sur., 2014). Ukoliko se bolest dijagnosticira u ranoj fazi petogodišnje preživljenje iznosi oko 90 %, međutim pada na svega 10 % u oboljelih s metastazama. To nalaže potrebu pronalaženja biomarkera koji bi se koristili za što raniju dijagnostiku, postoperativnu molekularnu klasifikaciju kao i predikciju tijeka bolesti (Coppede i sur., 2014).

Gen *KRAS* smješten je na kratkom kraku kromosoma 12 i kodira protein veličine 21 kDa. Mutacija gena *KRAS* rani je događaj u nastanku karcinoma debelog crijeva, a može se dokazati i u patohistološki normalnoj sluznici pridruženoj karcinomu. Posljedica mutacije gena *KRAS* je konstitutivna aktivacija RAS/RAF/MAPK signalnog puta, pojačana proliferacija tumorskih stanica te rezistencija na anti-EGFR terapiju karcinoma. Oko 90 % mutacija gena *KRAS* dokazano je u kodonu 12 (82 - 87 %) i kodonu 13 (13 - 18 %), a daleko su manje učestale mutacije u kodonima 61, 63 i 146. Mutacije u kodonu 12 češće su u mucinoznim karcinomima, dok su mutacije u kodonu 13 povezane s agresivnijim tumorima visokog metastatskog potencijala (Coppede i sur., 2014, Calvert and Frucht, 2002, Bazan i sur., 2002).

Međutim, učinak gena/proteina *KRAS* tijekom tumorigeneze ne mora biti isključivo posljedica aktivirajuće mutacije. Pojačana ekspresija proteina *KRAS* dokazana u 76 % karcinoma debelog crijeva također za posljedicu ima pojačanu proliferaciju tumorskih stanica te korelira s napredovanjem tumorske bolesti (Akkiprik i sur., 2008). Korelacija pojačane ekspresije gena *KRAS* s napredovanjem tumorske bolesti dokazana je i u karcinomima gušterače (Peng i sur., 2013). Pojačana ekspresija proteina *KRAS* kao posljedica amplifikacije gena *KRAS* dokazana je u karcinomima želuca (Mita i sur., 2009), karcinomima pluća (Wagner i sur., 2009) te u karcinomima endometrija (Birkeland i sur., 2012). Amplifikacija gena *KRAS* kao i pojačana ekspresija proteina p21 u karcinoma su se endometrija pokazale boljim prognostičkim biljgom od mutacija gena *KRAS* (Birkeland i sur., 2012).

Amplifikacija gena samo je jedan od mehanizama pojačane ekspresije gena. Rezultati novijih istraživanja opisali su molekule mikro RNA (miRNA) kao nove regulatore ekspresije gena/proteina. miRNA su jednolančane molekule dužine 20-25 nukleotida. One ne kodiraju proteine, ali reguliraju sintezu kodirajućih proteina vezivanjem na glasničke RNA (mRNA) svojih ciljnih gena. miRNA se na mRNA ciljnih gena vezuju najčešće u 3' UTR regiji što za posljedicu ima degradaciju mRNA ili njezino utišavanje te u konačnici sniženu ekspresiju ciljnog proteina (Hutchison i sur., 2013). Jedna miRNA može utjecati na translaciju većeg broja mRNA simultano, a mogu djelovati kao onkogeni (onco-microRNAs) te pojačavati rast i proliferaciju stanica odnosno kao tumor supresori (TS-microRNAs) te suprimirati prethodno navedene mehanizme (Hutchison i sur., 2013, Kim, 2005, Aghdam i sur., 2019). Polimorfizmi u veznim mjestima za miRNA mogu onemogućiti vezanje miRNA na ciljnu molekulu mRNA te se time mijenja i njihov učinak na ekspresiju ciljnog proteina (Hutchison i sur., 2013).

Velik broj miRNA sudjeluje u tumorigenezi karcinoma debelog crijeva te je dokazana njihova povezanost s rezistencijom na terapiju (Song i sur., 2009), invazivnošću tumora i lošom prognozom u oboljelih (Asangani i sur., 2008). Jedna od najranije otkrivenih molekula miRNA je obitelj lethal-7 (*let-7*) miRNA te je promijenjena ekspresija ove molekule dokazana u različitim karcinoma u čovjeka uključujući i karcinome debelo crijeva. U stanicama karcinoma debelog crijeva ekspresija *let-7a* je značajno snižena u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu. miRNA *let-7a* regulira ekspresiju proteina KRAS vezivanjem na vezno mjesto u 3' UTR regiji molekule mRNA *KRAS*. Najnovija su istraživanja pokazala da polimorfizam rs61764370 T/G (*KRAS-LCS6*) u 3' UTR regiji *KRAS* utječe na ekspresiju ciljnog proteina tako da mijenja mogućnost vezanja zrele miRNA *let-7a* na ciljnu molekulu mRNA. U nosioca varijantnog G alela dokazane su povišene vrijednosti proteina KRAS te snižene vrijednosti *let-7a* u odnosu na nosioce alela T polimorfizma *KRAS-LCS6*. Rezultati dosadašnjih istraživanja o ulozi ovog polimorfizma u tumorigenezi različitih tumora u čovjeka poprilično se razlikuju. S jedne je strane dokazana povezanost varijantnog alela G sa sklonošću obolijevanju i lošom prognozom u oboljelih od karcinoma usne šupljine, karcinoma pluća, karcinoma ovarija i karcinoma dojke, te s dobrom prognozom u oboljelih od karcinoma debelog crijeva ako su dijagnosticirani u ranom stadiju bolesti (Chin i sur., 2008, Smits i sur., 2011b).

Mikro RNA *miR-544*, kao i *let-7*, može utjecati na ekspresiju proteina KRAS i to također vezivanjem na vezno mjesto u 3' UTR regiji mRNA *KRAS*. Ekspresija *miR-544* nije do sada ispitivana u karcinomima debelog crijeva, ali dokazana je njezina povezanost sa

zloćudnom preobrazbom u gliomima (Ma i sur., 2012b). U veznom mjestu za *miR-544* u 3' UTR regiji mRNA *KRAS* dokazan je polimorfizam rs10771184 T/A te je dokazana povezanost varijantnog alela A s boljom prognozom u oboljelih od karcinoma ovarija (Liang i sur., 2010b).

Analize miRNA kao i polimorfizama u njihovim veznim mjestima na ciljnim molekulama mRNA veliko su novo područje istraživanja u molekularnoj genetici raka. Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su da su miRNA važni regulatori sinteze ciljnih proteina kako u fiziološkim tako i u patološkim procesima uključujući i tumorigenezu u čovjeka. Analize ovih molekula mogle bi u budućnosti postati značajni pokazatelji napredovanja tumorske bolesti kao i prognoze u oboljelih.

Ovaj doktorski rad polazi od **hipoteze** da polimorfizmi *KRAS* i mikro RNA *let-7a* i *miR-544* imaju ulogu u regulaciji razine molekula mRNA te proteina *KRAS* u tkivu tumora te posljedično u napredovanju sporadičnog karcinoma debelog crijeva.

**Opći cilj ovog istraživanja** bio je analizirati polimorfizme *KRAS* u veznim mjestima za miRNA u uzorcima DNA oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva kako bi se ispitala njihova uloga u tumorigenezi ovih zloćudnih tumora.

Specifični ciljevi istraživanja bili su:

- I. **Identificirati ulogu miRNA molekula *let-7* i *miR-544*** u regulaciji ekspresije *KRAS* na razini mRNA i proteina
- II. **Karakterizirati ulogu polimorfizama *KRAS* rs61764370 i rs10771184** u veznim mjestima za miRNA na razinu mRNA i proteina

Koristeći uzorke periferne krvi te tkiva sporadičnog tumora debelog crijeva odredio sam mutacije u kodonu 12 i kodonu 13 gena *KRAS* kako bih napravio molekularnu subklasifikaciju prikupljenih tumora. Pomoću metode PCR-RFLP i PCR-a u stvarnom vremenu koristeći specifični genotipizacijski *Taqman*® *SNP Assay* analizirao sam polimorfizme jedne baze (SNP) rs61764370 i rs10771184 u veznim mjestima za miRNA *let-7a* i *miR-544* u 110 uzoraka oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva bez mutacije gena *KRAS*. Zatim sam odabrao 50 parova sporadičnog karcinoma i pripadajuće normalne sluznice debelog crijeva (15 cm udaljene od ruba tumora) kako bih ispitao ekspresiju gena

*KRAS* na razini mRNA te razinu ekspresije *miR-544* i *let-7a* pomoću metode PCR-a u stvarnom vremenu.

Ekspresiju proteina *KRAS* odredio sam metodom imunohistokemijskog bojanja koristeći specifična protutijela za *KRAS* u 15 uzoraka karcinoma s mutacijom gena *KRAS* te 50 uzoraka karcinoma bez mutacije gena *KRAS*. U uzorcima negativnim na mutaciju gena *KRAS* sam prethodno odredio genotipove polimorfizama u veznim mjestima za miRNA, razinu ekspresije mRNA *KRAS* kao i razinu ekspresije *miR-544*.

Svi dobiveni rezultati korelirani su s kliničko-patološkim pokazateljima oboljelih i njihovih tumora te su pružili uvid u ulogu divljeg tipa *KRAS* gena/proteina, *miR-544* te posebice polimorfizama u veznim mjestima za mikro RNA, u tumorigenezi sporadičnog karcinoma debelog crijeva.



## 2. LITERATURNI PREGLED

Karcinom debelog crijeva je česta zloćudna bolest, posebice u zapadnoj Europi, Sjevernoj Americi, Australiji i Novom Zelandu. Brojni epidemiološki podaci iz cijelog svijeta pokazuju velike zemljopisne razlike, sa značajno većim rizikom razvoja bolesti u razvijenim zemljama, a velike prospektivne studije povezuju karcinom kolona i rektuma s prehrambenim navikama i načinom života (Bingham i sur., 2003). Usprkos velikom napretku u području kirurgije, kemoterapije i dijagnostike, karcinom debelog crijeva još uvijek je na drugom mjestu uzroka smrti od karcinoma u razvijenim zemljama svijeta (Jemal i sur., 2009). Karcinom debelog crijeva je treći najčešći zloćudni tumor u svijetu, s približno 1,8 milijuna dijagnosticiranih slučajeva u 2018. godini (Ferlay i sur., 2019), bez razlike u učestalosti s obzirom na spol oboljelih (Siegel i sur., 2019). Većina karcinoma debelog crijeva (70 - 80 %) su sporadični tumori (Muller i sur., 2016) i ako se taj trend nastavi, procjenjuje se, da će do 2030. godine širom svijeta biti dijagnosticirano 2,2 milijuna novih slučajeva godišnje (Arnold i sur., 2017).

Prema Izvješću Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, po učestalosti se nalazi nakon bolesti kardiovaskularnog sustava, a po uzroku smrti, s udjelom od oko 27 %, karcinom debelog crijeva zauzima četvrto mjesto (Bray i sur., 2018).

Karcinom debelog crijeva nije bolest sama za sebe, nego obuhvaća heterogenu skupinu bolesti koju karakteriziraju brojne genetske i epigenetske promjene (Ogino i sur., 2011). Razvija se kao posljedica djelovanja unutrašnjih i vanjskih čimbenika (Potter, 1995). Od vanjskih čimbenika vodeću ulogu ima prehrana bogata masnoćama, crvenim mesom te s malim udjelom vlakana. Pušenje, konzumacija alkohola, povišena tjelesna težina i fizička neaktivnost također su rizični faktori za nastanak ove bolesti. Povećani rizik imaju i osobe s pozitivnom obiteljskom anamnezom na adenom, karcinom, kao i osobe s upalnom bolesti crijeva (Marshall, 2009, Ford i sur., 2013, Kunzmann i sur., 2015). U suprotnosti s prehrambenim i okolišnim čimbenicima, udio mehanizama povezanih s imunskim sustavom i upale još nije jasan, ali je potvrđena povezanost upale i karcinogeneze. Postoje dokazi da imunostanice, citokini i drugi imunostimulirajući medijatori kao i poremećaj u mutualizmu između domaćina i mikrobioma igraju važnu ulogu praktično u svim stadijima tumorigeneze kolona, uključujući nastanak, napredovanje i metastaziranje (Terzic i sur., 2010, Candela i sur., 2014).

## 2.1 Klasifikacija karcinoma debelog crijeva

Jedno od najboljih prognostičkih obilježja za karcinom debelog crijeva je klasifikacija prema Dukes'-u, koja ima četiri stadija (Akkoca i sur., 2014).

**Tablica 1.** *Klasifikacija karcinoma debelog crijeva prema Dukes'-u*

|          |  |
|----------|--|
| Stadij A | tumor je ograničen stijenkom crijeva                       |
| Stadij B | tumor se proširio na serozu, ali ne zahvaća limfne čvorove |
| Stadij C | tumor zahvaća regionalne limfne čvorove                    |
| Stadij D | postoje udaljene metastaze                                 |

Danas se u kliničkoj praksi najčešće koristi TNM klasifikacija, koja, u usporedbi s Dukes'-ovom, uzima u obzir više parametara, obzirom na primarni tumor, status limfnih čvorova i prisutnost metastaza (Akkoca i sur., 2014).

**Tablica 2.** *TNM klasifikacija tumora debelog crijeva*

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| <b>Primarni tumor</b>            |   |
| Tx                               | primarni tumor ne može se odrediti  |
| T0                               | primarni tumor nije pronađen  |
| Tis                              | karcinom <i>in situ</i>   |
| T1                               | tumor se proširio na submukozu  |
| T2                               | tumor se proširio na muscularis propriu   |
| T3                               | tumor se širi na perikolorektalno tkivo   |
| T4a                              | tumor se širi na serozu i okolno tkivo  |
| T4b                              | tumor se širi na okolne organe  |
| <b>Regionalni limfni čvorovi</b> |   |
| Nx                               | status regionalnih limfnih čvorova ne može se odrediti                                |
| NO                               | nema metastaza  |
| N1a                              | metastaze u 1 regionalnom limfnom čvoru   |
| N1b                              | metastaze u 2-3 regionalna limfna čvora   |
| N1c                              | zahvać. subseroza, mezenterij ili perikolorektalno tkivo, bez metastaza u reg. I. čv. |
| N2a                              | metastaze u 4-6 limfnih čvorova   |
| N2b                              | metastaze u 7 ili više regionalnih limfnih čvorova                                    |
| <b>Udaljene metastaze</b>        |   |
| M0                               | nema udaljenih metastaza  |
| M1a                              | metastaze prisutne u samo jednom udaljenom organu                                     |
| M1b                              | metastaze prisutne u više organa ili peritoneumu                                      |

Jedna od temeljnih postavki u nastanku karcinoma debelog crijeva je slijed adenom - karcinom, termin koji opisuje postupno napredovanje od normalne sluznice, preko displastičnog epitela do zloćudnog karcinoma, povezanu s nakupljanjem većeg broja promjena na razini gena i genoma (Leslie i sur., 2002). Adenomi su dobroćudne promjene stanica epitela debelog crijeva, a definiraju se veličinom, stupnjem displazije i histološkim tipom. Histološki se razlikuju tubularni, tubulovilozni i vilozni adenom, od kojih svaki ima drugačiji potencijal za nastanak karcinoma (Lynch and Hoops, 2002).

## 2.2 Nasljedni karcinom debelog crijeva

Obiteljska adenomatozna polipoza (engl. *Familial Adenomatous Polyposis* - FAP) je nasljedna bolest povezana s visokim rizikom obolijevanja od karcinoma kolona. Nasljeđuje se autosomno dominantno mutacijom gena *APC*. Bolesnici razvijaju na stotine i tisuće adenomatoznih polipa u kolonu i rektumu i to u drugom i trećem desetljeću života. Radi velikog broja adenomatoznih polipa, neizbježno se u njih razvija zloćudna bolest u dobi od 40-50 godina. Klinička dijagnoza postavlja se na temelju prisutnosti više od 100 polipa na sluznici debelog crijeva u oboljelog (Nieuwenhuis and Vasen, 2007). Oko 10 % oboljelih ima manje od 100 adenomatoznih polipa i kasniji početak bolesti, što se naziva blaga obiteljska adenomatozna polipoza, AFAP (engl. *Attenuated FAP*) (Knudsen i sur., 2003).

Pokazano je da se obiteljska adenomatozna polipoza nasljeđuje nasljednom mutacijom gena *APC* (5q21-22) (Groden i sur., 1991, Kinzler i sur., 1991, Nishisho i sur., 1991). Kodirajuće područje gena sastoji se od 15 eksona, a kodira protein od 2843 aminokiseline. Gen *APC* je tumor supresorski gen. Sadrži raznolike funkcionalne domene i uključen je u mnoge stanične procese, uključujući transkripciju, kontrolu staničnog ciklusa, migraciju, diferencijaciju i apoptozu (Goss and Groden, 2000, Sieber i sur., 2000).

Drugi tip je nasljedni nepolipozni karcinom debelog crijeva (engl. *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer* - HNPCC) ili sindrom Lynch, prvi puta opisan 1966. godine (Lynch i sur., 1966). To je najčešći oblik nasljednog karcinoma debelog crijeva. Oko 5 % od sveukupnog broja karcinoma debelog crijeva javlja se kao posljedica sindroma Lynch. Nastaje kao posljedica mutacije u jednom od gena za popravak DNA (MMR, od engl. *Mismatch Repair*). Oko 80 % slučajeva karcinoma debelog crijeva koji se dijagnosticiraju u sklopu sindroma Lynch nosi mutaciju u genima *MSH2* i *MLH1* (de la Chapelle, 2004) te se osim u kolonu i rektumu, tumori razvijaju i u endometriju, jajniku i urinarnom traktu, tankom

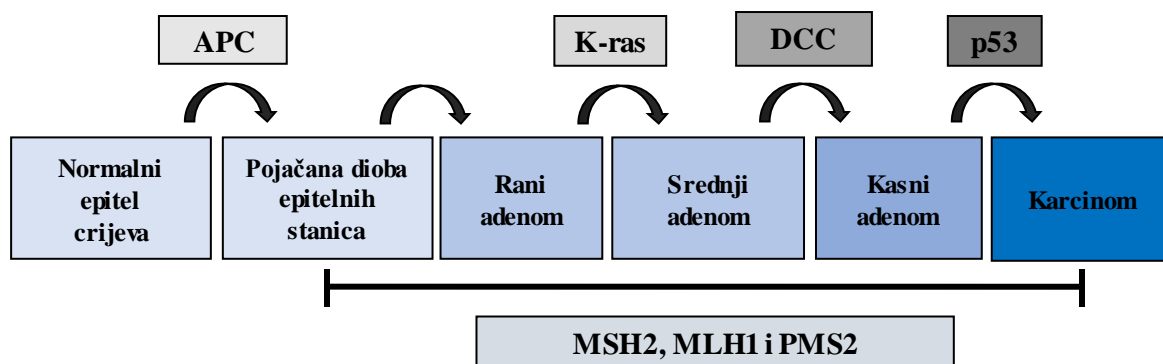
crijevu, mozgu i koži (Tiwari i sur., 2016). U sindromu Lynch u približno 50 % slučajeva tumora mutacija je dokazana u genu *MLH1*, u oko 4 % slučajeva u genu *MSH2*, u 7 - 20 % slučajeva u genu *MSH6*, a u manje od 5 % slučajeva radi se o mutaciji gena *PMS2* (Lagerstedt-Robinson i sur., 2016).

### 2.3 Obiteljski karcinom debelog crijeva

U 25 - 30 % svih karcinoma debelog crijeva bolest se pojavljuje u obiteljima bez jasnog dokaza o nekom od nasljednih sindroma. Ovaj tip karcinoma debelog crijeva predstavlja heterogeno stanje koje uključuje bolesnike s neprepoznatim nasljednim sindromom, kao i one s, naizgled sporadičnim oblikom, s većom učestalosti u obiteljima. Vjerojatno kombinacija okolišnih i nasljednih čimbenika, poput učestalih promjena gena niskog utjecaja, igra ulogu u razvoju karcinoma u tim obiteljima (Armelaio and de Pretis, 2014).

### 2.4 Sporadični karcinom debelog crijeva

Sporadični karcinom debelog crijeva je karakterističan za stariju životnu dob. Najveći utjecaj na njegov razvoj imaju vanjski čimbenici, posebno prehrana te proces razvoja karcinoma traje jako dugo. Taj proces je dugotrajan jer dolazi do nakupljanja promjena u brojnim genima što se događa postepeno (Slika 1.) (Weitz i sur., 2005, Cunningham i sur., 2010).



**Slika 1.** Stupnjeviti razvoj karcinoma debelog crijeva od normalnog epitela do adenokarcinoma. Mutacija u genima APC i K-ras su rani događaji u procesu tumorigeneze, a kasnije slijedi mutacija u tumor supresorskom genu p53 (prema Smith i sur., 2002)

### 2.4.1 Genetske promjene u nastanku sporadičnog karcinoma debelog crijeva

Geni u kojima se javljaju promjene koje mogu doprinijeti nastanku karcinoma debelog crijeva mogu se svrstati u tri skupine: onkogene, tumor- supresorske gene i gene za popravak DNA (Vogelstein i sur., 2000). U normalnim uvjetima, onkogeni potiču normalni stanični rast, no mutacija ili pojačana ekspresija onkogeni rezultira pojačanom funkcijom te dovodi do staničnog rasta. Tumor supresorski geni, normalno, koče stanični rast preko staničnog ciklusa ili potiču programiranu smrt stanice (apoptozu), ali u slučaju nedostatka njihove ekspresije, kao rezultat mutacije ili gubitka alela, postoji i gubitak njihove kontrolne funkcije. Konačno, geni za popravak DNA, uključeni su u kontrolu opsega mutacija drugih gena. Ako su mutirani, geni za popravak DNA nisu sposobni prepoznati i popraviti greške, te se mutacije onkogeni i tumor- supresorskih gena brže nakupljaju (Leslie i sur., 2002).

#### 2.4.1.1 p53

Gen *p53* najčešće je promijenjeni gen u karcinomima u čovjeka, a naziva se „čuvarom genoma“ radi svoje sposobnosti sprječavanja stanične proliferacije u prisutnosti oštećenja DNA, poticanja popravka DNA i poticanja apoptoze stanice, ukoliko ne uspije popravak DNA (Caron de Fromental and Soussi, 1992, Lane, 1992). Smješten je na kratkom kraku kromosoma 17, a shvaćanje njegove uloge u nastanku karcinoma kolona rezultat je učestalog manjka 17p u istraživanjima nedostatka alela, kao i u citogenetskim analizama (Vogelstein i sur., 2000, Baker i sur., 1989, Fearon i sur., 1987, Harima i sur., 1999, Muleris i sur., 1985, Meling i sur., 1993). Izostanak njegove funkcije doprinosi širenju oštećene DNA na stanice kćeri, pa sukladno tomu, njegova mutacija prethodi aneuploidnoj klonalnoj divergenciji (Carder i sur., 1995). Međutim, odnos između *p53* i aneuploidije nije jednostavan, jer je aneuploidija uočena i bez prekomjerne ekspresije *p53* (Ried i sur., 1996), a u slučaju karcinoma debelog crijeva, kromosomske aberacije javljaju se samo u divljem tipu gena *p53* (De Angelis i sur., 1999, Curtis i sur., 2000). Promijenjeni *p53* ili nedostatak alela 17p javlja se u 4 - 26 % adenoma, u približno 50 % invazivnih žarišta unutar adenomatoznih polipa i u 50 - 75 % adenokarcinoma. Takva distribucija rezultata istraživanja dovodi do spoznaje da je funkcionalna inaktivacija gena *p53* povezana s prijelazom adenoma u karcinom (Winawer i sur., 1993, Vogelstein i sur., 2000, Hardingham i sur., 1998, Scott i sur., 1993, Rashid i sur., 1999, De Benedetti i sur., 1993, Kaserer i sur., 2000).

#### 2.4.1.2. Nedostatak 18q

Dok je 17p najčešće područje gubitka alela p53 u karcinomu debelog crijeva, na drugom je mjestu područje 18q, čiji se gubitak može dokazati u približno 70 % slučajeva. Gubitak 18q nalazi se i u 10 - 30 % ranih adenoma, dok je u slučajevima kasnih adenoma prisutan u približno 60 % slučajeva (Vogelstein i sur., 2000, Boland i sur., 1995). Izvorno je tumor supresorski gen ovog područja nazvan gen „izbrisan u kolorektalnom karcinomu“ (DCC od engl. *Deleted in Colorectal Cancer*) (Fearon i sur., 1990).

U ovom području otkriveni su i drugi tumor supresorski geni, uključujući *SMAD2* i *SMAD4*. Potonji je izvorno nazvan *DPC4*, a njegov gubitak dokazan je u karcinomu gušterače (Hahn i sur., 1996.). Proteini koje proizvode ova dva gena su unutarstanični medijatori signalnog puta inhibirajućeg transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  (TGF  $\beta$ , engl. *Transforming Growth Factor  $\beta$* ), koji imaju širok spektar učinaka na stanicu, od regulacije rasta, diferencijacije, proizvodnje matriksa i apoptoze (Heldin i sur., 1997, Duff and Clarke, 1998). Mutacije gena *SMAD 2* i *SMAD4* nalaze se u više tipova zloćudnih tumora u ljudi, uključujući i tumore debelog crijeva (Riggins i sur., 1997, Thiagalingam i sur., 1996, Riggins i sur., 1996, Eppert i sur., 1996).

U suprotnosti sa široko prihvaćenim genetskim modelom razvoja zloćudnog tumora debelog crijeva, u jednoj studiji, samo u 7 (6,6 %) od 106 karcinoma debelog crijeva nađene su mutacije u više gena povezanih s tumorima, *APC*, *KRAS* i *p53*, a u 41 (38,7 %), utvrđene su mutacije u samo jednom od tih gena (Rodriguez-Viciano i sur., 2006). To govori o višestrukim, alternativnim genetskim putevima u razvoju zloćudnih tumora debelog crijeva.

#### 2.4.1.3. Metilacijski status

Tijekom tumorigeneze geni mogu biti i epigenetski promijenjeni procesom poznatim kao DNA metilacija. Ovaj mehanizam poznat je po svojoj ulozi u regulaciji prepisivanja gena i embrionalnog razvoja (Razin and Cedar, 1994, Bird, 1986), međutim, njegova uloga u tumorigenezi nije potpuno razjašnjena (Counts and Goodman, 1995, Jones i sur., 2005). U usporedbi s DNA iz susjednih zdravih tkiva, DNA iz benignih i malignih tumora kolona je, općenito hipometilirana (Goelz i sur., 1985, Feinberg i sur., 1988).

S druge strane, hipermetilacija promotorskih područja nekih tumor supresorskih gena pokazuje svoju povezanost s transkripcijskim utišavanjem. Od osobitog je interesa promotor

gena *APC*, čija se hipermetilacija nalazi u 18 % sporadičnih karcinoma i u 18 % sporadičnih adenoma, a sve slučajeve karakterizira gubitak ekspresije gena (Wheeler i sur., 2001).

#### 2.4.1.4. Mikrosatelitna nestabilnost

Molekularni mehanizmi genomske nestabilnosti nisu nužno neovisni i ne mogu se u potpunosti definirati samo kao putevi bilo mikrosatelitne nestabilnosti (MSI od engl. *MicroSatellite Instability*) ili kromosomske nestabilnosti (CIN od engl. *Chromosomal INstability*) (Goel i sur., 2003). Neki zloćudni tumori debelog crijeva s niskom učestalošću mikrosatelitne i kromosomske nestabilnosti, kao i oni s visokom učestalošću, nastaju različitim putevima, što sugerira da se međusobno ne isključuju (Jones i sur., 2005). Tumori koji pripadaju sindromu Lynch i neki sporadični tumori probavnog sustava te zloćudni tumori endometrija pripadaju putu MSI (Jass, 2006, Lagerstedt Robinson i sur., 2007).

Mikrosateliti su ponavljajući sljedovi nukleotida u DNA, obično jedne do pet parova baza. U genomu čovjeka postoji na stotine tisuća mikrosatelita koji su osobito izloženi greškama za vrijeme replikacije DNA. Takve greške obično se popravljaju proteinima za popravak krivo sparenih baza u DNA (MMR), no u slučaju neadekvatne funkcije MMR, dolazi do njihovog nakupljanja (Wheeler i sur., 2000).

Sporadični tumori s visokom učestalošću mikrosatelitne nestabilnosti (engl. MSI-H, *High-Frequency MSI*) pojavljuju se u približno 15 % tumora debelog crijeva, želuca i endometrija, a manje su česti u tumora drugih sijela (Woerner i sur., 2003). Tumori debelog crijeva koji pokazuju oslabljenu funkciju DNA MMR imaju brojna molekularna, patološka i klinička obilježja, uključujući MSI-H, poremećenu diferencijaciju, obilnu mucinoznu sekreciju, limfocitnu infiltraciju, pretežno su lokalizirani u gornjem dijelu debelog crijeva i imaju bolju prognozu (Jass, 2004). Sporadični tumori debelog crijeva s MSI-H i sindromom Lynch imaju slične morfološke karakteristike. Međutim, mucinozna sekrecija, slaba diferencijacija, heterogenost tumora te istovremena prisutnost sesilnih polipa, češći su u sporadičnih tumora debelog crijeva, dok je limfocitna infiltracija i prisutnost adenoma češća u sindromu Lynch (Jass, 2004).

Prisutnost i uloga mikrosatelitne nestabilnosti s niskom učestalošću (engl. MSI-L, *Low-Frequency*) i dalje je kontroverzna (Yamamoto i sur., 2002, Perucho, 2003, Oda i sur., 2005, Soreide i sur., 2006). Priroda MSI-L još nije razjašnjena temeljem ispitivanja promjena u genima uključenim u MMR ili koje druge greške. Ispitivanja mutacija ciljnih gena za MSI-H

pokazuju da ih nema u tumorima sa MSI-L. Slični rezultati nađeni su i kod tumorima želuca. Nije dokazana ni značajna razlika u kliničko- patološkim i molekularnim značajkama kod mikrosatelitnih stabilnih (engl. *Microsatellite Stable*, MSS) tumorima i onih tumorima debelog crijeva s MSI-L. Dakle, smatra se, da te izolirane mikrosatelitske promjene nisu pokazatelj genomske nestabilnosti, ali mogu biti korisni markeri klonalnosti ili mitotske aktivnosti (Perucho, 1999).

S druge strane, postoje istraživanja koja ukazuju na to da oblik tumorima s MSI-L čini poseban entitet. MSI-L povezan s gubitkom ekspresije O (6)- metilgvanin-DNA metiltransferaze. Nedostatak O (6)-metilgvanin-DNA metiltransferaze i djelomična metilacija, te nedostatak ekspresije MLH1, smatra se mehanizmom MSI-L. Pokazalo se da utišavanje O (6)- metilgvanin-DNA metiltransferaze onemogućuje ispravljanje pogreške nastale alkilacijom G, zbog čega nastaju točkaste mutacije (tranzicija iz G-C u A-T) te da taj mehanizam nadjačava sustav DNA MMR, te se višom učestalošću pojavljuje u kolorektalnom karcinomu sa mikrosatelitnom nestabilnošću niske učestalosti (Spring i sur., 2006, Whitehall i sur., 2001).



## 2.5 Proteini RAS

Proteini RAS kontroliraju stanične signalne puteve odgovorne za rast, migraciju, adheziju, citoskeletni integritet, preživljavanje i diferencijaciju. Proteini RAS pripadaju velikoj obitelji malih GTP-aza, koje se aktiviraju kao odgovor na različite izvanstanične podražaje. Npr. proteini RAS aktiviraju se kao odgovor na stimulaciju čimbenicima rasta i posljedično tomu, vežu na brojne efektorne proteine dovodeći do aktivacije više signalnih puteva unutar stanice (Rajalingam i sur., 2007). Kako greške u signaliziranju putem RAS mogu dovesti do zloćudne promjene, aktivacija proteina RAS u normalnoj stanici strogo je kontrolirana. Geni *RAS* izvorno su identificirani kao retrovirusni onkogeni u 1960.-1970.-ima iz genoma virusa Harvey i Kirstenova sarkoma (Malumbres and Barbacid, 2003).

### 2.5.1 Struktura malih GTPaza

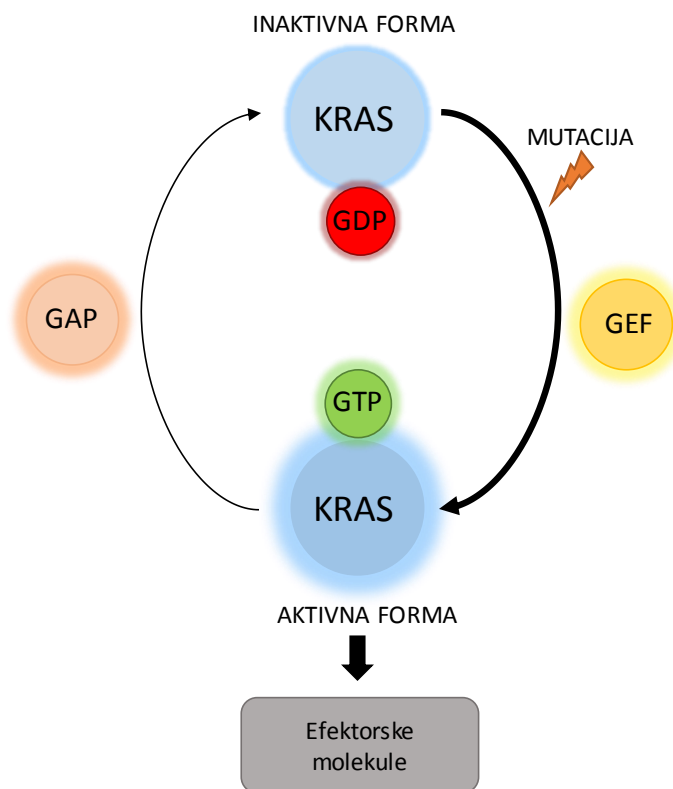
Radi njihove istaknute uloge u tumorigenezi, proteini RAS osnova su super obitelji malih GTPaza. Zajednička osobina proteina RAS je prijenos signala kroz membranu koji je potaknut faktorima rasta. Njihova primarna uloga je vezanje prijelaznih signalnih kompleksa na membrani koji aktiviraju signalne putove, koordinirajući transkripciju, razvoj stanice i migraciju, endocitozu, stanično preživljavanje, diferencijaciju i starenje (Rajalingam i sur., 2007).

Nameće se pitanje, koliko postoji članova RAS obitelji koji ispunjavaju sve ove funkcije? Glavni problem je definirati odgovarajuće kriterije za ulazak u ovu super obitelj, kao i njihova klasifikacija. Općenito, mali G- proteini su veličinom od 20-29 kDa, dijele istu homologiju sekvenci i imaju sličnu građu, koja se sastoji od šest  $\beta$  - nabranih ploča okruženih  $\alpha$  - uzvojnica. U genomu sisavaca otkriveno je više od 150 gena koji kodiraju proteine slične proteinu RAS. Cijela obitelj RAS podijeljena je u pet podobitelji: RAS, RHO, RAB, ARF i  $G_{\alpha}$  podjedinicu heterotrimeričnih G- proteina. Nasuprot tomu, Der i suradnici (2010.) ne uključuju  $G_{\alpha}$  podjedinicu u super obitelj, a RAN svrstavaju u posebnu RAS podobitelj (Cox and Der, 2010). Obje grupe uključuju RAP, RAL, RHEB i druge GTPaze u podobitelj RAS proteina, čije okidačke efektorske puteve primarno ne koristi RAS (Colicelli, 2004, Wennerberg i sur., 2005). Druge klasifikacije oslanjaju se na jednostavniji način, gdje postoje samo tri prava RAS proteina: H-, N-, i KRAS, a pribrajaju druge članove obitelji kao proteine slične proteinu RAS. Međutim, MRAS, RRAS i ERAS definitivno pripadaju u podobitelj RAS, kao što signaliziraju preko barem jednog od RAS efektorskih puteva, ponekad u

dogadajima ovisnim o tipu stanice (Rodriguez-Viciano i sur., 1996, Marte i sur., 1997, Takahashi i sur., 2003).

Molekularni procesi u podlozi funkcije RAS opisani kao binarni prekidač, model su za cijelu super obitelj malih G- proteina. Oni izmjenjuju oblik koji veže GTP ili GDP, gdje oblik koji veže GTP predstavlja „uključeno“, a oblik koji veže GDP predstavlja „isključeno“ stanje (stanje engl. „On“ i „Off“). Kad su vezani, dva područja RAS-a prolaze velike strukturne promjene, ovisno o tipu vezanog nukleotida. Zovu se engl. *Switch region I* (aa 30-38) i *Switch region II* (aa 59-67) i oblikuju površinu za interakciju za efektorne molekule u GTP - ovisnim događajima (Wittinghofer and Nassar, 1996). Efektorska petlja je kao otisak prsta malih GTPaza, određujući specifični vezujući efektor za danu bazu (Goody i sur., 1991, John i sur., 1989).

Ovo implicira činjenicu da je za prijelaz iz stanja „uključeno“ u stanje „isključeno“ potrebna dodatna pomoć posebnih proteina koji ubrzavaju hidrolizu GTP. Ti akceleratori GTPaza nazivaju se proteini aktivacije GTPaza (engl. *GTPase Activating Proteins*, GAPs), a pojačavaju hidrolizu GTP-a RAS-a za približno 100000 puta (Gideon i sur., 1992). Aktivacija RAS-a zahtijeva faktore za zamjenu nukleotide gvanina (engl. *Guanine Nucleotide Exchange Factors*- GEFs) koji stimuliraju disocijaciju i izmjenu vezanog GDP za GTP na proteinu RAS kao odgovor na uzlazne podražaje. Do danas su poznate četiri podobitelji GEF molekula: SOS, RASGRF, RASGRP i CNRaGEF, te PLC $\epsilon$ , koja također posjeduje domene karakteristične za izmjenu proteina RAS, ali nejasno je je li djeluje kao pravi GEF za RAS (Chubb and Insall, 2001) (Slika 2.).



**Slika 2.** Kod divljeg tipa molekule KRAS događa se izmjena stanja između oblika koji veže GTP (aktivnog stanja) i oblika koji veže GDP (inaktivnog stanja). Normalni KRAS se aktivira pomoću faktora RAS-GEF koji omogućuju vezanje GTP-a za KRAS i omogućuju aktivaciju nizvodnih efektorskih molekula. Ovaj signalni put je utišan pomoću proteina RAS-GAP koji potiču hidrolizu vezanog GTP-a u GDP i tako uzrokuju nastanak inaktivne KRAS-GDP molekule. Mutirani KRAS je cijelo vrijeme u obliku koji veže GTP, tj. u aktivnom stanju (prema Zeitouni i sur., 2016).

### 2.5.2 Mutacije gena KRAS

Protein KRAS, koji se još naziva i *p21*, član je *Ras* super obitelji proteina. U čovjeka je gen *KRAS* smješten na kromosomu 12, a kodira protein veličine 189 aminokiselina. Sadrži četiri kodirajuća eksona i 5' nekodirajući ekson (Malumbres and Barbacid, 2003).

U normalnim fiziološkim uvjetima, uzvodni signali aktiviraju divlji tip KRAS, pojačavajući izmjenu GDP za GTP. Ovaj proces je prolazan zbog hidrolize GTP koju posreduju proteini aktivacije GTPaza (GAPs). Međutim, ako postoji promjena u proteinu KRAS taj se proces mijenja te signalni put KRAS ostaje neprekidno aktivan (Tan and Du, 2012) (Slika 2.).

Mutacije gena *KRAS* nalaze se u oko 35 %- 45 % svih zloćudnih tumora debelog crijeva (Karapetis i sur., 2008, Amado i sur., 2008, Van Cutsem i sur., 2009, Van Cutsem i sur., 2011, Bokemeyer i sur., 2009, Peeters i sur., 2010, Douillard i sur., 2010), a kodoni 12 i 13 su mjesta u kojima se nalazi oko 95 % svih mutacija, s približnim postotkom pojavnosti od 80 % u kodonu 12, te oko 15 % u kodonu 13. Mutacije u kodonima 61, 146 i 154 pojavljuju se rjeđe, te čine oko 5 % svih mutacija gena *KRAS* (Forbes i sur., 2006).

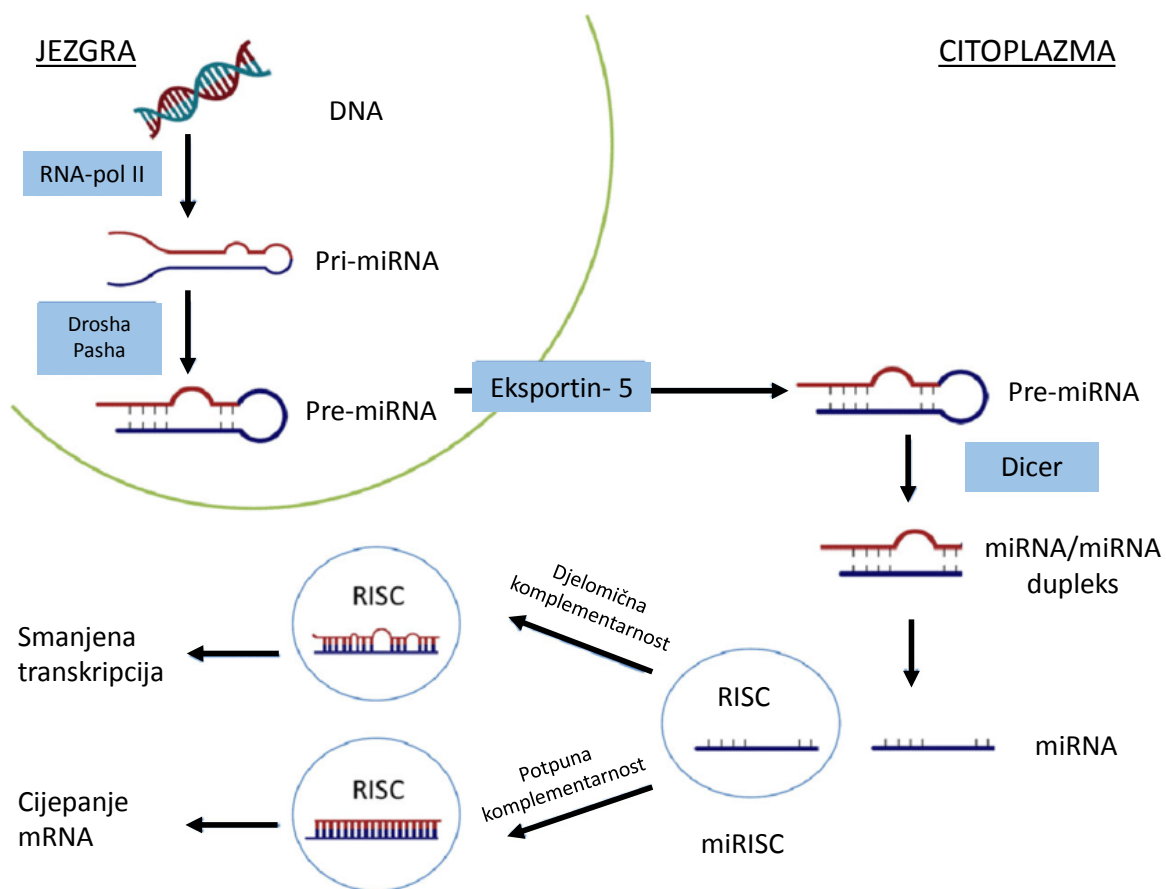
Gotovo sve mutacije gena *KRAS* zahvaćaju jednu bazu. Mutacije oštećuju GTPaznu aktivnost *KRAS*, sprječavajući hidrolizu GTP, što za posljedicu ima nakupljanje proteina *KRAS* u aktivnom, GTP obliku. U tom procesu, mutirani *KRAS* dovodi do aktivacije nizvodnih, proliferativnih signalnih puteva (Bos, 1989, Schubbert i sur., 2007). Stoga, mutacije gena *KRAS* imaju ključnu ulogu u tumorigenezi u čovjeka i najčešće su u zloćudnih tumora gušterače, štitnjače, debelog crijeva i pluća (Tan and Du, 2012).

## 2.6 Mikro RNA

miRNA su male, nekodirajuće RNA, dužine 18-25 nukleotida (Redova i sur., 2011) koje moduliraju ekspresiju ciljnih mRNA na posttranskripcijskoj razini (Bartel, 2004).

Biogeneza miRNA regulirana je različitim proteinskim kompleksima. RNA polimeraza II proizvodi primarni miRNA prijepis s 5' vrhom i 3' poli- (A) krajem s kodirajućeg genskog mjesta (Bracht i sur., 2004). Ta primarna miRNA dalje se obrađuje preko mikroprocesorskog kompleksa kojeg čine enzim RNaza III, Drosha i protein DGCR8 koji veže dvolančanu RNA (engl. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*), poznat i kao Pasha. Ovaj kompleks odcjepljuje strukturu oblika ukosnice tvoreći pre-miRNA, dužine 60-70 nukleotida (Landthaler i sur., 2004). Nakon toga, pre-miRNA se transportira iz jezgre u citoplazmu pomoću prijenosnika ovisnog o GTP, eksportina 5 (EXP5)(Lund i sur., 2004). Nakon prijenosa u citoplazmu, Dicer odcjepljuje petlju s pre-miRNA, tvoreći RNA dupleks s približno 22 sparane baze (Knight and Bass, 2001, Park i sur., 2011). Kratka RNA obrađena putem Dicera, veže se na protein AGO (Argonaut) gdje tzv. vodeći lanac iz dvolančane molekule ostaje vezan u RISC (engl. *RNA-Induced Silencing Complex*). On prepoznaje djelomično komplementaran slijed unutar ciljne mRNA molekule (Liu i sur., 2005) (Slika 3.).

Osim ovog, tzv. kanonskog puta, postoji i ne-kanonski put biogeneze male skupine miRNA, neovisan o Drosha-i i Dicer-u (Berezikov i sur., 2007).



**Slika 3.** Transkripcija primarne mikro RNA (pri-miRNA) iz miRNA gena se odvija pomoću RNA polimeraze II (RNA-Pol II). Drosha i njegov kofaktor Pasha, za tim procesuiraju pri-miRNA u 60-110 nt dugu pre-miRNA ukosnicu u jezgri. pri-miRNA pomoću eksportina-5 odlazi u jezgru gdje se dalje procesuira pomoću Dicer i RISC kompleksa. miRISC kompleks dovodi miRNA do ciljane mRNA molekule (prema Magri i sur., 2018)

miRNA su uključene u regulaciju širokog spektra staničnih procesa (Bentwich i sur., 2005) te mogu regulirati približno 30 % svih gena (Lewis i sur., 2005). Jedan od najranijih rezultata o povezanosti miRNA i karcinoma opisuje dvije miRNA: *miR-15* i *miR-16*, čija se ekspresija gubi u bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom (Calin i sur., 2002). U međuvremenu, pojavljuje se sve više publikacija koje pokazuju da miRNA mogu u tumorigenezi djelovati kao tumor supresori ili kao onkogeni (Esquela-Kerscher and Slack, 2006).

**Tablica 3.** *miRNA s ulogom u razvoju raka (prema (Zhang i sur., 2007)*

| <b>Tumor supresorske miRNA</b> | <b>Onkogene miRNA</b> |
|--------------------------------|-----------------------|
| obitelj <i>let- 7</i>          | <i>miR-17-5p</i>      |
| <i>miR-9</i>                   | <i>miR-20</i>         |
| <i>miR-16</i>                  | <i>miR-21</i>         |
| <i>miR-26b</i>                 | <i>miR-25</i>         |
| <i>miR-34b/c</i>               | <i>miR-31</i>         |
| <i>miR-137</i>                 | <i>miR-92-1</i>       |
| <i>miR-143</i>                 | <i>miR-92-5</i>       |
| <i>miR-145</i>                 | <i>miR-93-1</i>       |
| <i>miR-148a</i>                | <i>miR-106a</i>       |
| <i>miR-191</i>                 | <i>miR-135a</i>       |
| <i>miR-192</i>                 | <i>miR-133b</i>       |
| <i>miR-196a</i>                | <i>miR-141</i>        |
| <i>miR-200c</i>                | <i>miR-155</i>        |
| <i>miR-215</i>                 | <i>miR-183</i>        |
| <i>miR-342</i>                 | <i>miR-200b</i>       |
| <i>miR-941</i>                 | <i>miR-203</i>        |
| <i>miR-1247</i>                | <i>miR-221</i>        |
|                                | <i>miR-223</i>        |
|                                | <i>miR-320</i>        |
|                                | <i>miR-498</i>        |
|                                | <i>miR-622</i>        |
|                                | <i>miR-1238</i>       |

Kod tumora kolona veći broj miRNA pokazuje višu razinu ekspresije nego u normalnoj sluznici. Noviji pregled ekspresije miRNA u 23 studije pokazuje značajnu promjenu ekspresije 164 miRNA molekule u karcinomima debelog crijeva, gdje dvije trećine ima pojačanu, a trećina smanjenu ekspresiju (Luo i sur., 2011).

Michael i suradnici su prvi opisali promjenu ekspresije miRNA u karcinomu debelog crijeva. Navode da *miR-143* i *miR-145* u ovom zloćudnom tumoru imaju sniženu razinu ekspresije, te sugeriraju da te miRNA djeluju kao tumor supresori (Michael i sur., 2003). Druga, vrlo važna miRNA u kolorektalnom karcinomu je onkogeni *miRNA-21* koja je povišena kod tumora kolona, kao i u više drugih solidnih tumora, te ima važnu ulogu u nastanku, napredovanju i metastaziranju (Volinia i sur., 2006).

Spoznaja da miRNA izravno regulira ekspresiju RAS proteina miRNA, predstavlja noviji aspekt regulacije KRAS, ali i drugih proteina RAS (Chan i sur., 2008).

### 2.6.1 *let-7*

Gen *let-7* (lethal-7) otkriven je kao heterokroni gen u *Caenorhabditis elegans* (Reinhart i sur., 2000.). Heterokroni geni djeluju sekvencijski, regulirajući određene prijelaze u životnom ciklusu *C. elegans* (Moss, 2007.). Na primjer, *miRNA-48*, *miRNA-84* i *miRNA-241* reguliraju prijelaz iz drugog u treći stadij ličinke, dok *let-7* regulira prijelaz iz četvrtog u zreli oblik (Reinhart i sur., 2000.). U konačnom prijelazu u zreli, odrasli oblik, u svih stanica kćeri prestaje proliferacija, a počinje diferencijacija stanica. U onih stanica gdje postoji mutacija *let-7*, ne dolazi do zadnjeg prijelaza, te većina jedinki umire, po čemu je ta mutacija i dobila ime (Reinhart i sur., 2000).

*Let-7* miRNA prisutna je u mnogih životinja, kao i u čovjeka, te takvo očuvanje sugerira da *let-7* može djelovati kao regulator ekspresije gena u različitim vrstama (Hertel i sur., 2012).

Iako je slijed *let-7* dobro očuvan od nematode do čovjeka, postoje razlike među tijesno povezanim članovima te miRNA obitelji (Roush and Slack, 2008). Na primjer dok nematode i muha imaju samo jednu miRNA, viši organizmi (ribe i sisavci), imaju različite članove obitelji *let-7*, uključujući *let-7a-k* i *miR-98* (Landgraf i sur., 2007). Varijante *let-7a* miRNA čovjeka dolaze u tri oblika kao *let-7a-1*, *let-7a-2* i *let-7a-3* i nalaze se na kromosomima 9, 11 i 12, međutim, sve tri kodiraju istu *let-7a* miRNA koja ima sekvencu 'TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT' (Lee i sur., 2016).

Novije studije pokazuju da članovi obitelji *let-7* potiču diferencijaciju u razvoju, te djeluju kao tumor supresori u različitim tipovima tumora (Reinhart i sur., 2000, Takamizawa i sur., 2004, Grosshans i sur., 2005, Johnson i sur., 2005, Yu i sur., 2007, Kumar i sur., 2008). Njihova uloga u karcinogenezi ostvaruje se kroz regulaciju ciljnih gena pa tako tumor

supresorske miRNA utišavaju onkogene dok onkogene miRNA reguliraju tumor supresore (Bartel, 2004).

Jedan od najbolje istraženih ciljnih gena koje reguliraju *let-7* miRNA je KRAS. Pojačana aktivnost KRAS osnovni je korak za kojeg se smatra da doprinosi nastanku tumora debelog crijeva, pokrećući proliferaciju stanica i sprječavajući apoptozu. Iako je aktivacijska mutacija najbolje istražen mehanizam deregulacije aktivnosti KRAS, pojačana ekspresija *KRAS* uslijed poremećaja u utišavanju sinteze proteina djelovanjem miRNA moguć je pokretač zloćudnih promjena u stanicama.

### 2.6.2 *miR-544*

*miR-544* miRNA ima sekvencu 'ATTCTGCATTTTTAGCAAGTTC' pomoću koje se može vezati na različite ciljne molekule mRNA pa tako i ima različite uloge ovisno o staničnom kontekstu. Nema mnogo podataka o istraživanjima na *miRNA-544*, međutim, poznato je da je prisutna u različitim tkivima pa je nekoliko istraživanja pokušalo otkriti ima li ulogu u razvoju različitih oblika raka. Istraživanja su pokazala da može imati utjecaj na invaziju raka pluća na način da utječe na smanjen izražaj E-kadherina i povećan izražaj vimentina (Mo i sur., 2014a). Ista grupa je pokazala da *miRNA-544* može utjecati na sposobnost samo umnažanja matičnih stanica raka pluća na način da smanjuje ispoljavanje molekule GSK3 $\beta$  (Mo i sur., 2014b). Također, nekoliko istraživanja je pokazalo da *miR-544* može potaknuti epitelno-mezenhimalnu tranziciju kroz aktivaciju signalnog puta WNT u karcinoma želuca (Zhi i sur., 2013). Štoviše, pokazano je da *miR-544*, zajedno s *miR-127-5p* i *miR-655-3p*, ima ulogu ko-regulatora nekoliko metastatskih puteva kroz zajedničku represiju ciljanih mRNA (Wu i sur., 2016). Sva ova istraživanja sugeriraju da *miR-544* može imati bitnu ulogu u regulaciji metastaziranja.

Osim uloge u invaziji, istraživanja su pokazala da *miR-544* ima potencijalnu ulogu u razvoju raka jetre (Pan i sur., 2018), osteosarkoma (Chen i sur., 2018), karcinoma želuca, raka vrata maternice (Mao i sur., 2015), ali i karcinoma debelog crijeva (Yao i sur., 2018).

Uloga *miR-544* u tumorigenezi sporadičnog CRC i potencijalni mehanizmi djelovanja još uvijek nisu dobro istraženi. Pokazano je da je FOXO1 jedan od dokazanih ciljnih gena *miR-544* (Yao i sur., 2018), međutim s obzirom na mehanizam djelovanja miRNA, vjerojatno nije jedini.



Prema rezultatima bioinformatičkih analiza KRAS u svojoj 3' netranslatirajućoj regiji također ima vezni slijed za *miR-544* (Liang i sur., 2010a). Međutim, dosada nema još objavljenih istraživanja o tome utječe li *miR-544*, i kako, na razinu mRNA ili proteina KRAS.

## 2.7 Polimorfizmi jedne baze

Polimorfizmi jedne baze (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) karakteriziraju promjenu jedne baze u slijedu nukleotida DNA drugom, pri čemu se varijantne baze javljaju s učestalošću >1 % u populaciji. Nalazi se jedna u približno svakih 500 nukleotida, pri čemu se s većom učestalošću nalaze u nekodirajućim, nego u kodirajućim područjima. Većinom te promjene nemaju funkcionalnu ulogu u genomu (Abecasis i sur., 2012). Polimorfizmi mogu dovesti do promjena u regulaciji ekspresije gena, ako se pojave u regulatornim dijelovima gena, ili u slijedu aminokiselina, ako se nalaze u kodirajućem dijelu gena (Sur i sur., 2013).

Tehnološki napredak omogućava proučavanje povezanosti velikog broja polimorfizama s nastankom različitih bolesti. Posebno to dolazi do izražaja kod multigenских bolesti, obzirom da su one često složene etiologije, a promjene u velikom broju gena manjeg utjecaja mogu imati zbirni učinak (Engle i sur., 2006). Upravo zbog te složenosti postoji niz čimbenika koji mogu utjecati na nastanak i napredovanje bolesti, poput zloćudnog tumora, te je odabir terapije koja bi bila uspješna za sve bolesti, nemoguće. Boljim razumijevanjem uloge polimorfizama jedne baze u tumorigenezi i odgovora pojedinca na potencijalne terapeutike, otvara se mogućnost za korištenje analiza SNP u personaliziranom pristupu liječenju (Hertz and McLeod, 2014).

### 2.7.1 Polimorfizmi miRNA

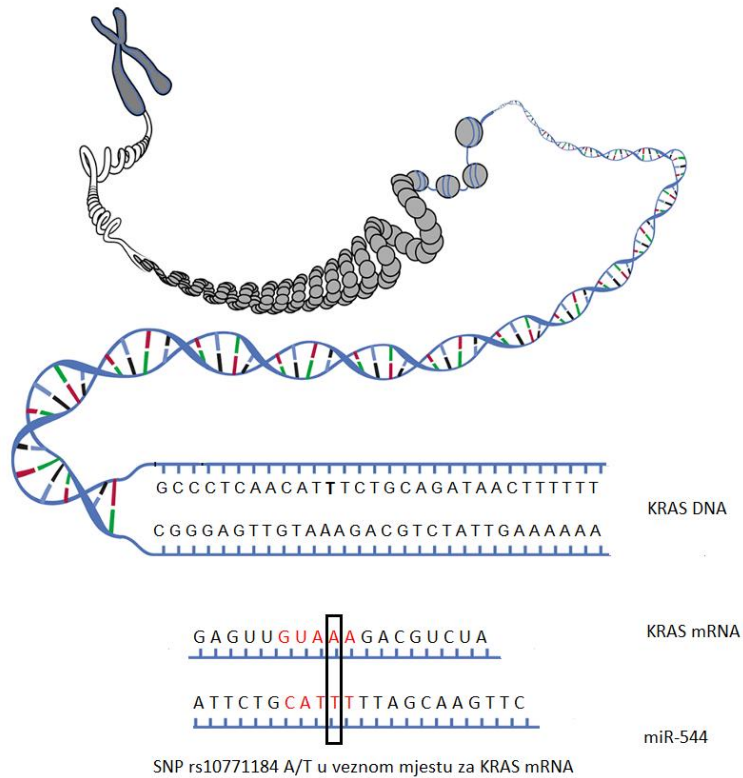
Ako se SNP nalazi u veznom mjestu za miRNA u ciljnoj mRNA, taj varijantni alel može izmijeniti način vezanja te tako narušiti fiziološku ulogu te miRNA (Smits i sur., 2011a).

3'-UTR molekule mRNA *KRAS* u čovjeka sadrži komplementarna mjesta za tumor supresorsku miRNA *let-7*. Polimorfizmi jedne baze u toj regiji mogu izmijeniti učinak miRNA *let-7a* na ekspresiju proteina KRAS. Polimorfizam *KRAS-LCS6* (rs61764370 T/G) može smanjiti učinkovitost vezanja miRNA *let-7* te tako omogućiti pojačanu ekspresiju onkogenih proteina KRAS, što dovodi do aktivacije signalnog puta RAF/MEK/MAPK i tumorigeneze karcinoma debelog crijeva (Karnoub and Weinberg, 2008, Smits i sur., 2011).

SNP rs10771184 (rs12245) A/T koji se nalazi u predviđenom veznom mjestu za *miR-544* u mRNA *KRAS* nije istražen u karcinomima debelog crijeva. Pronađena je povezanost tog

polimorfizma s karcinomima jajnika što ukazuje na mogući utjecaj tog polimorfizma na ekspresiju proteina KRAS (Liang i sur., 2010a).

Ukoliko taj polimorfizam mijenja učinkovitost vezanja *miR-544* na mRNA KRAS, to bi moglo imati utjecaj na nizvodne KRAS-ovisne signalne puteve u stanicama pa tako i na nastanak i napredovanje karcinoma debelog crijeva (Slika 4).



**Slika 4.** Shema SNP polimorfizma rs10771184 A/T u veznom mjestu za mikro RNA

## **3 MATERIJALI I METODE**

### **3.1 Uzorci**

U našem istraživanju koristili smo uzorke tkiva oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva prikupljene na Klinici za kirurgiju KB Merkur, Zagreb i pohranjenih u Hrvatskoj banci tumora i DNA za bazična istraživanja (Spaventi i sur., 1994).

Istraživanjem je obuhvaćeno 110 ispitanika, 44 žena (40 %) i 66 muškaraca (60 %), srednje životne dobi 64,8 godina. Uzorci tumorskog tkiva (T1 iz centralnog dijela tumora i T2 iz invazivnog ruba tumora) i pridruženog normalnog tkiva debelog crijeva (15 cm udaljenog od ruba tumora) prikupljeni su prilikom rutinskih operativnih zahvata. Dio svakog uzorka pohranjen je na -80 °C, a dio uzorka tkiva fiksiran je 4 %-tnim formalinom i uklopljen u parafin. Prije uključanja u istraživanje svaki je uzorak analiziran rutinskim hemalaun-eozin bojanjem te je patohistološka dijagnoza potvrđena od strane patologa. Također su prikupljeni podaci o dobi i spolu oboljelih, veličini tumora, stupnju diferencijacije, pupanju tumora (engl. *tumor budding*), stadiju po Dukes'-u te smještaju tumora.

Prikupljanje, pohrana te analiza uzoraka odobreni su dozvolom Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Etičkog povjerenstva KB Merkur, Zagreb za HRZZ projekt „Mikrosatelitna nestabilnost (MSI i EMAST) u molekularnom profiliranju sporadičnih karcinoma debelog crijeva“ (voditelj projekta: dr. sc. Sanja Kapitanović, znanstvena savjetnica IRB u trajnom zvanju). Ravnatelj KB Merkur dao je svoju privolu za prikupljanje osobnih i kliničkih podataka oboljelih.

### **3.2 Izolacija DNA**

#### **3.2.1 Izolacija DNA iz tkiva fenol/kloroform metodom**

Iz uzoraka tkiva prethodno pohranjenih na -80 °C izolirali smo DNA koristeći klasičnu fenol/kloroform metodu. Komadić smrznutog tkiva smo usitnili na ledu, stavili u epruvetu od 2 mL te dodali 750 µL pufera za digestiju (100mM TRIS-HCl, pH 8,0; 0,1M EDTA, pH 8,0; 0,5 % SDS; pH 8,2) i 20 µL proteinaze K (koncentracije 20 µg/µL; Macherey-Nagel). Uzorke smo inkubirali preko noći uz miješanje na termobloku pri temperaturi od 56 °C. Sljedeći dan smo uzorke ohladili na sobnu temperaturu. Dodali smo 750 µL fenola (Sigma, SAD), dobro promiješali na tresilici te odvojili faze centrifugiranjem 1 min na 16000 x g. Gornju fazu smo prenijeli u čistu epruvetu i dodali 750 µL smjese

fenol:kloroform:izoamilni alkohol u omjeru 25 : 24 : 1. Smjesu smo dobro promiješali na tresilici te odvojili faze centrifugiranjem 1 min na 16000 x g pri sobnoj temperaturi. Gornju fazu smo prenijeli u čistu epruvetu i dodali 750  $\mu$ L smjese kloroform:izoamilni alkohol u omjeru 24:1. Smjesu smo dobro promiješali na tresilici te odvojili faze centrifugiranjem 1 min na 16000 x g pri sobnoj temperaturi. Gornju fazu smo prenijeli u čistu epruvetu i dodali 100  $\mu$ L 5M NaCl (Kemika, Hrvatska) i 750  $\mu$ L izopropanola (Kemika, Hrvatska). Smjesu smo promiješali te centrifugirali 5 min na 16000 x g pri sobnoj temperaturi. Supernatant smo uklonili i talog isprali s 1 ml apsolutnog etanola (Kemika, Hrvatska) te centrifugirali 5 min na 16000 x g pri sobnoj temperaturi. Uklonili smo supernatant, a talog dobro osušili te otopili u TE puferu (10mM TRIS; 1mM EDTA; pH 7,6). Uzorke smo pohranili na +4 °C za daljnju upotrebu.

### 3.2.2 Određivanje koncentracije DNA

Koncentraciju izolirane DNA u uzorcima izmjerili smo pomoću spektrofotometra (Ceceil, CE 2040, SAD). Za izračunavanje koncentracije DNA, izmjerili smo optičku gustoću ispitivanih uzoraka pri valnoj duljini od 260 nm. Korištene su kvarene kivete u koje je otpipetirano 99  $\mu$ L QH<sub>2</sub>O te 1  $\mu$ L uzorka. Pomoću izmjerene optičke gustoće (OD) izračunata je masena koncentracija ( $\gamma$ ) DNA u uzorku prema formuli:

$$\gamma = OD \times R \times \varepsilon$$

Gdje je:  $\gamma$  = masena koncentracija  $\mu$ g/mL

OD = optička gustoća očitana pri valnoj duljini od 260 nm

R = razrjeđenje u kivetu

$\varepsilon$  = ekstinkcijski koeficijent za DNA (50  $\mu$ g/mL)

Čistoća DNA provjerena je mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm te izračunavanjem omjera A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> koji je trebao biti između 1,65 i 1,85. Kvaliteta izolirane DNA provjerena je horizontalnom elektroforezom u 1 %-tnom gelu agaroze (Sigma).

### 3.3 Analiza mutacija gena *KRAS*

Uzorke DNA izolirane iz tkiva tumora koristili smo za određivanje mutacija u kodonu 12 i 13 gena *KRAS*. U analizi je korištena metoda PCR-RFLP (od engl. *Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism*) u dva koraka (*semi nested PCR*) korištenjem 4 specifična primera:

KRAS 12 F: 5' ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT 3'

KRAS 13 F: 5' ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGCCCTGGT 3'

KRAS 12/13 R: 5' ACTCATGAAAATGGTCAGAGAAACCTTTAT 3'

KRAS 12/13 nested R: 5' TCAAAGAATGGTCCTGCACC 3'

Reakcijska smjesa se sastojala od 2,5 µL komercijalno dostupnog 10X PCR pufera II (Applied Biosystems), 50 mM smjese nukleotida (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP i dGTP) (Roche Diagnostics), početnih oligonukleotida u koncentraciji od 200 nM svaki, 100 ng DNA, 0,5 jedinica AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA polimeraze (Applied Biosystems) te QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena od 25 µL. Specifične odsječke umnožili smo metodom PCR u uređaju Thermal Cycler 2400 (Applied Biosystems). Reakciju su sačinjavale: početna denaturacija u trajanju od 10 min pri 95 °C; 30 ponavljajućih ciklusa koji su se sastojali od faze denaturacije u trajanju od 30 sek na 96 °C, faze sparivanja početnica i kalupa u trajanju od 30 sek pri 60 °C i faze produljivanja lanaca u trajanju od 45 sek pri 72 °C. U prvom koraku su korištene početnice KRAS 12 F ili KRAS 13 F te KRAS 12/13 R, dok su u drugom koraku korištene početnice KRAS 12 F ili KRAS 13 F te KRAS 12/13 nested R.

Uspješnost reakcije PCR provjerena je horizontalnom elektroforezom u gelu agaroze. Nanijali smo 5 µL svakog produkta reakcije PCR na 3 %-tni gel agaroze (Sigma) i razdvajali ih u puferu TAE (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) pri stalnom naponu od 100 V. Veličina umnoženog odsječka određena je prema DNA standardu IX (ϕx174/*Hae*III) (Roche Diagnostics). Produkti reakcije PCR prikazani su u gelu agaroze uz pomoć transiluminatora UVItec Alliance 4.7 (UVItec Limited). U svim uzorcima umnožio se samo jedan specifičan odsječak veličine 192 pb u prvom koraku odnosno 157 pb u drugom koraku te su uključeni u daljnji postupak.

Kako bi se odredilo prisustvo mutacije u kodonu 12 ili 13 gena *KRAS* specifični produkti reakcije PCR pocijepani su restrikcijским enzimom BstNI (New England BioLabs) za analizu kodona 12, te s restrikcijским enzimom BglI (New England BioLabs) za analizu kodona 13.

Na 5  $\mu$ L produkta reakcije PCR dodana je 1 jedinica enzima, 2,5  $\mu$ L pufera za BstNI NEB3 (New England BioLabs) odnosno pufera Cut za BglI (New England BioLabs) te  $\text{QH}_2\text{O}$  do volumena od 25  $\mu$ L. Reakcijska smjesa je inkubirana na termobloku na 60 °C odnosno na 37 °C preko noći.

Umnoženi odsječak od 157 pb (produkt druge reakcije PCR) koji ne sadrži mutaciju u kodonu 12 ili 13 gena *KRAS* ima specifičan slijed koji prepoznaje enzim BstNI odnosno BglI te se u reakciji RFLP pocijepa na odsječke veličine 128 pb odnosno 125 pb. Mutacije u kodonu 12 odnosno 13 ukidaju mjesto prepoznavanja restrikcijskog enzima te ne dolazi do cijepanja produkta reakcije PCR.

Produkte dobivene cijepanjem produkta reakcije PCR restrikcijским enzimima, analizirali smo horizontalnom elektroforezom u 3 %-tnom gelu agaroze (Sigma). Veličinu pocijepanih odsječaka odredili smo prema DNA standardu IX ( $\phi$ x174/*Hae*III) (Roche Diagnostics). Produkti reakcije PCR kao i produkti reakcije PCR-RFLP prikazani su u gelu agaroze uz pomoć transiluminatora UVitec Alliance 4.7 (UVitec Limited).

### **3.4 Analiza mutacija gena *KRAS* u veznom mjestu za miRNA**

Izolirane DNA koristili smo za određivanje učestalosti miRNA polimorfizama. U analizi polimorfizama korištene su dvije metode: PCR-RFLP i PCR u stvarnom vremenu koristeći specifični genotipizacijski *Taqman*® *Assay*.

#### **3.4.1 PCR-RFLP SNP analiza**

Polimorfizam *KRAS-LCS6* T/G (rs61764370, vezno mjesto za *let-7a*) analiziran je metodom PCR-RFLP.

Za umnažanje odsječka u 3' UTR regiji gena *KRAS* korišten je par specifičnih početnih oligonukleotida: LCS F 5' TTAGGAGAGACGGGGTTTCA 3', LCS R 5' AAATGAGTTCTGCAAAACAGG 3'. Reakcijska smjesa se sastojala od 2,5  $\mu$ L

komercijalno dostupnog 10X PCR pufera II (Applied Biosystems), 50 mM smjese nukleotida (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP i dGTP) (Roche Diagnostics), početnih oligonukleotida u koncentraciji od 200 nM svaki, 100 ng DNA, 0,5 jedinica AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA polimeraze (Applied Biosystems) te QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena od 25 µL. Specifične odsječke umnožili smo metodom PCR u uređaju 2400 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Reakciju su sačinjavale: početna denaturacija u trajanju od 10 min pri 95 °C; 30 ponavljajućih ciklusa koji su se sastojali od faze denaturacije u trajanju od 30 sek na 96 C, faze sparivanja početnica i kalupa u trajanju od 30 sek pri 55 °C faze produljivanja lanaca u trajanju od 45 sek pri 72°C; i završnog produljivanja lanaca u trajanju od 7 min pri 72 °C.

Produkti reakcije PCR provjereni su horizontalnom elektroforezom u gelu agaroze. Veličina umnoženog odsječka određena je prema DNA standardu IX (ϕx174/*Hae*III) (Roche Diagnostics). Produkti reakcije PCR prikazani su u gelu agaroze uz pomoć transiluminatora UVItec Alliance 4.7 (UVItec Limited). U svim uzorcima umnožio se samo jedan specifičan odsječak veličine 106 pb te su uključeni u daljnji postupak.

Kako bi se odredio status alela na poziciji *KRAS-LCS6* T/G, produkt reakcije PCR pocijepan je restrikcijskim enzimom TfiI (New England BioLabs). Na 10 µL svakog uzorka dodana je 1 jedinica enzima, 2,5 µL pufera Cut (New England BioLabs) te QH<sub>2</sub>O do volumena od 25 µL. Reakcijska smjesa je inkubirana na termobloku na 60 °C preko noći.

Umnoženi odsječak od 106 pb koji sadrži alel T ima specifičan slijed koji prepoznaje enzim TfiI te se u reakciji RFLP pocijepa na odsječke veličine 64 pb i 42 pb. Alel G ukida mjesto prepoznavanja restrikcijskog enzima te ne dolazi do cijepanja produkta reakcije PCR.

Produkte dobivene cijepanjem restrikcijskim enzimom TfiI analizirali smo horizontalnom elektroforezom u 10 % gelu poliakrilamida (Sigma). Veličina pocijepanih odsječaka određena je prema DNA standardu pBR322 DNA/BsuRI (*Hae*III) (Termofisher Scientific). Produkti reakcije PCR-RFLP prikazani su u gelu poliakrilamida bojanjem srebrom (UVItec Limited).

### **3.4.2 SNP analiza metodom PCR u stvarnom vremenu**

Za analizu polimorfizama *KRAS* (rs10771184) A/T (vezno mjesto za miR544) koristili smo metodu PCR-a u stvarnom vremenu i specifični genotipizacijski *Taqman*<sup>®</sup> *SNP Assay* naručen na temelju slijeda u 3' UTR regiji gena *KRAS* unutar kojeg se nalazi navedeni

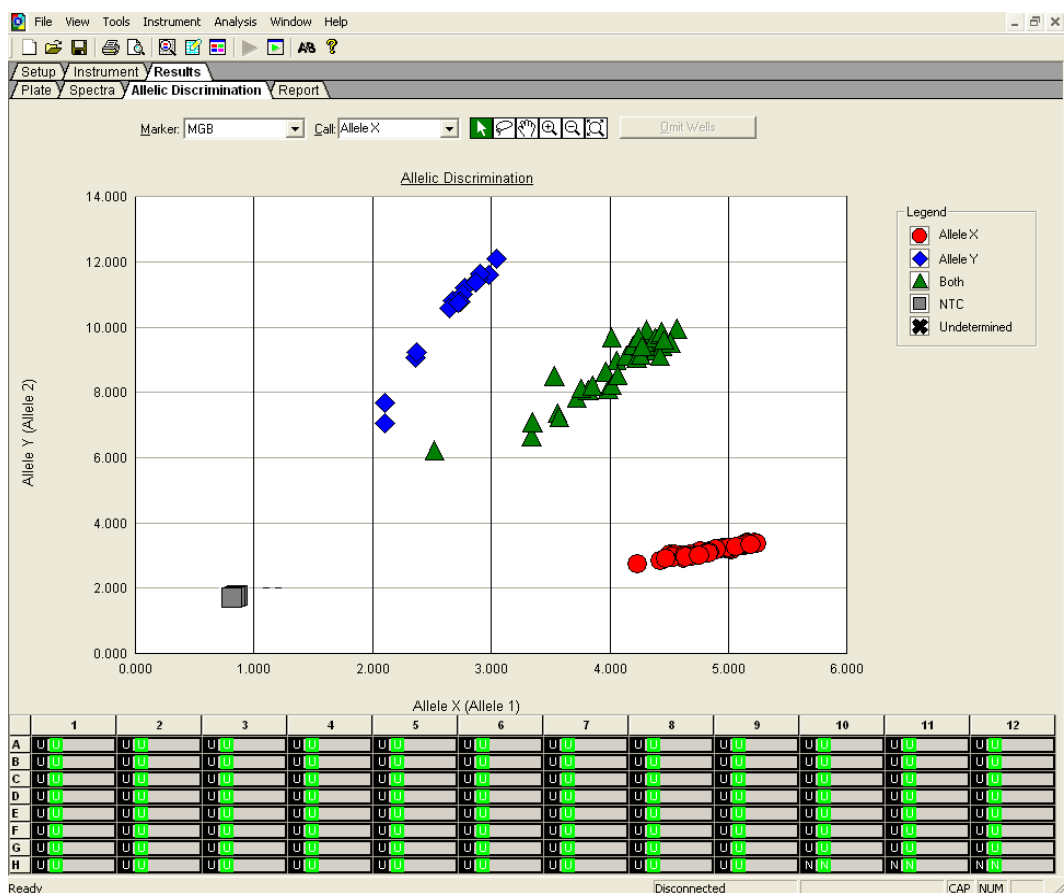


polimorfizam

(TCGGATAAAACACTGTAACCCAGTTAGCTCTGTGGGGGTGTGGGGGGAGAGATG  
GGCCCTCAACAT[A/T]TCTGCAGATAACTTTTTCCCCTAAATTCATCTAAATTACC  
TATCATTATCCCAAACAGGCACTTCAAACCTATTAACCTAAAACACAGATCTTAAT)  
(Applied Biosystems).

U optičkim epruvetama od 0,2 mL pripremili smo reakcijsku smjesu koja se sastojala od 100 ng DNA, 1,25  $\mu\text{L}$  *Taqman*<sup>®</sup> *SNP Assay* (Applied Biosystems), 12,5  $\mu\text{L}$  *TaqMan*<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) te  $\text{QH}_2\text{O}$  do ukupnog volumena od 25  $\mu\text{L}$ . Reakcija se odvijala u uređaju „7300 *Real-Time PCR System*“ (Applied Biosystems) pod sljedećim uvjetima: 50 °C kroz 2 min, 95 °C kroz 10 min te 40 ciklusa od 92°C 15 sek te 60 °C 1 min.

Produkti reakcije analizirani su na istom uređaju pomoću programa „7300 System SDS Software” za određivanje alela (Slika 5.).



Slika 5. Grafikon za određivanje alela.

### 3.5 Izolacija RNA

Iz uzoraka tkiva prethodno pohranjenih na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  izolirali smo RNA koristeći „EZ1 RNA Universal Tissue Kit“ (Qiagen). Komadić smrznutog tkiva usitnili smo na ledu i stavili u epruvetu od 2 mL te dodali 750  $\mu\text{L}$  QIAzol<sup>®</sup> Lysis Reagent (Qiagen) te nastavili postupak prema uputama proizvođača. Nakon odvajanja vodene faze koja je sadržavala RNA, uzorke smo pročistili pomoću uređaja „BioRobot<sup>®</sup> EZ1“ (Qiagen) uz dodatak integriranog koraka digestije DNazom (Qiagen), prema uputama proizvođača, kako bi se uklonila eventualna kontaminacija uzoraka s DNA.

#### 3.5.1 Određivanje koncentracije i provjera kvalitete izolirane RNA

Koncentraciju RNA u uzorcima izmjerili smo pomoću spektrofotometra (Ceceil, CE 2040). Za izračunavanje koncentracije RNA, izmjerili smo optičku gustoću ispitivanih uzoraka pri valnoj duljini od 260 nm. Korištene su kvarcne kivete u koje je otpipetirano 99  $\mu\text{L}$   $\text{QH}_2\text{O}$  te 1  $\mu\text{L}$  uzorka. Pomoću izmjerene optičke gustoće (OD) izračunata je masena koncentracija ( $\gamma$ ) RNA u uzorku prema formuli:

$$\gamma = \text{OD} \times R \times \varepsilon$$

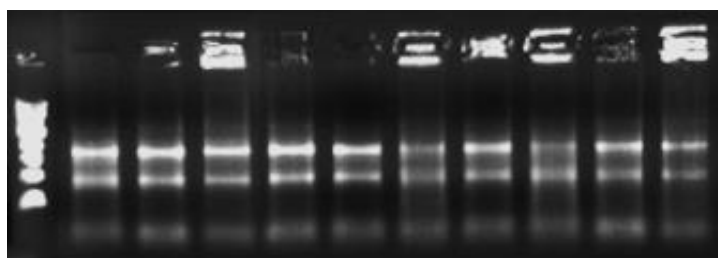
Gdje je:  $\gamma$  = masena koncentracija  $\mu\text{g/mL}$

OD = optička gustoća očitana pri valnoj duljini od 260 nm

R = razrjeđenje u kivetu

$\varepsilon$  = ekstinkcijski koeficijent za RNA (40  $\mu\text{g/mL}$ )

Čistoća RNA provjerena je mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm te izračunavanjem njihovog omjera koji je trebao biti  $>1,8$ . Kvaliteta izolirane RNA provjerena je horizontalnom elektroforezom u 1 %-tnom gelu agaroze i uz pomoć transiluminatora UVitec Alliance 4.7 (UVitec Limited) (Slika 6.).



**Slika 6.** *Provjera kvalitete izolirane RNA*

### 3.6 Analiza razine ekspresije specifičnih mRNA

Metodom kvantitativnog RT-PCR odredili smo razinu ekspresije specifične mRNA *KRAS* u 50 odabranih parova tumora (T1 i T2) i pripadajućih normalnih sluznica debelog crijeva (15 cm od ruba tumora).

Reakciju smo proveli u dva koraka. Prvo smo RNA preveli u cDNA pomoću nasumičnih početnica, a zatim smo dobivenu cDNA kvantificirali metodom kvantitativnog PCR-a.

#### 3.6.1 Reverzna transkripcija

Neposredno nakon izolacije RNA iz uzoraka tkiva tumora i njima pripadajuće normalne sluznice napravljena je reverzna transkripcija kojom je RNA prepisana u cDNA. U reakciji reverzne transkripcije 5 µg ukupne RNA prepisano je u cDNA pomoću „High Capacity Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems). Osim RNA, reakcijska smjesa je sadržavala 5 µL 10X pufera za reverznu transkripciju, 2 µL 25X smjese dNTPs (100 mM), 5 µL 10X nasumičnih početnica (100 nM), 2,5 µL enzima MultiScribe RT (50 U/µL) te QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena reakcijske smjese od 50 µL. Reakcija se odvijala u uređaju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) kroz 10 min na 25 °C, te 120 min na 37 °C. Sintetizirana cDNA pohranjena je na -20 °C.

#### 3.6.2 Kvantitativni PCR

U analizi razine ekspresije mRNA gena *KRAS* u uzorcima tumora i njima pripadajućoj normalnoj sluznici, koristili smo specifični ekspresijski *Taqman*<sup>®</sup> Assay Hs00364284\_g1 (Applied Biosystems) i metodu kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu. Kao kontrolni gen (endogena kontrola) korišten je β-aktin (ACTB) i specifični ekspresijski *Taqman*<sup>®</sup> Assay Hs99999903\_m1 (Applied Biosystems)

U optičkim epruветama od 0.2 mL pripremili smo reakcijsku smjesu koja se sastojala od 3 µL cDNA, 1 µL *Taqman*<sup>®</sup> Assay (Applied Biosystems), 10 µL *TaqMan*<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) te QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena od 20 µL. Reakcija se odvijala u uređaju „7300 Real-Time PCR System“ (Applied Biosystems) pod sljedećim uvjetima: 50°C kroz 2 min, 95°C kroz 10 min te 40 ciklusa od 95°C 15 sek te 60°C 1 min. Rezultati su očitani kao Ct (engl. Threshold cycle) vrijednosti pomoću programa „7300 System SDS Software“ (Applied Biosystems).

Kako bi se izbjegle greške zbog razlika u kvaliteti uzoraka, istovremeno uz određivanje Ct vrijednosti specifične za *KRAS*, odredili smo i Ct vrijednosti specifične za kontrolni gen *ACTB*.

Ekspresija gena *KRAS* normalizirana je prema ekspresiji endogene kontrole *ACTB*. Rezultati analize ekspresije ispitivanih gena prikazani su kao rezultat formule komparativne Ct metode (Livak i Schmittgen, 2001.):

$$FC_{\Delta Ct} = 2^{-\Delta Ct} \quad \text{ili} \quad FC_{\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Gdje je: FC = razlika ekspresije ispitivanih gena (engl. fold change)

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tumor}} - \Delta Ct_{\text{normalna sluznica}}$$

$$\Delta Ct = Ct_{\text{ciljni gen}} - Ct_{\text{ACTB}}$$

Ct = ciklus u kojem fluorescentni signal ispitivanog gena prijeđe prag detekcije

### 3.7 Imunohistokemija

Proteinska ekspresija određena je neizravnom imunohistokemijom na parafinskim rezovima koristeći specifična kuničja poliklonalna protutijela HPA049830 (Sigma) Ispitali smo 65 parova karcinoma i uzoraka normalnog tkiva debelog crijeva. Analizirano je 50 uzoraka tumora bez mutacije gena *KRAS* te 15 uzoraka tumora pozitivnih na mutaciju u kodonu 12 ili 13 gena *KRAS*.

Rezovi parafinskih kocki debljine 4  $\mu\text{m}$  fiksirani na predmetna stakalca, deparafinirani su u ksilenu (Kemika), rehidrirani u padajućim koncentracijama etanola (90 %, 70 %, 50 %) (Kemika), te isprani u fosfatnom puferu (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1,76 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4). Preparati su potom fiksirani u metanolu (Kemika) 15 min na sobnoj temperaturi. Kako bi se blokirala aktivnost endogenih peroksidaza, u metanol za fiksiranje dodan je 3 % vodikov peroksid (Kemika). Po završetku fiksacije stakalca su ponovno isprana u PBS-u. Demaskiranje antigena provedeno je kuhanjem preparata u citratnom puferu pH 6,2 (Dako Corporation) kroz 15 minuta u mikrovalnoj pećnici na 700 W. Potom su preparati ohlađeni na sobnu temperaturu te isprani u PBS-u. Nespecifično vezanje je blokirano s DAKO<sup>®</sup> Protein Block Serum-Free (DAKO Corporation) u vlažnoj komori kroz 10 min pri sobnoj temperaturi. Zatim je na preparate

dodano primarno protutijelo u koncentraciji 10 µg/mL. Preparati su inkubirani 60 minuta u vlažnoj komori pri sobnoj temperaturi. Zatim su isprani tri puta u PBS-u nakon čega je slijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelom EnVision™+System, HRP (DAKO Corporation) kroz 30 min. Preparati su isprani tri puta u PBS-u te inkubirani sa supstratom DAB za vizualizaciju Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (DAKO Corporation). Jezgre su bojane hematoksilinom kroz 30 sek (Fisher Diagnostics) te je boja razvijena u hladnoj vodovodnoj vodi. Preparati su potom dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola (50 %, 70 %, 90 %) i ksilenu te trajno uklopljeni u Entalan (Sigma).

Za otkrivanje eventualnog nespecifičnog bojanja, u svakoj reakciji imali smo negativnu kontrolu. To je bio parafinski rez obrađen na isti način kao i ispitivani rezovi, samo bez primarnog protutijela. Imunohistokemijski obrađeni rezovi, analizirani su svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX51) od strane patologa. Rezultati imunohistokemijske reakcije su očitani kao pozitivni ako je primijećeno smeđe obojenje na membrani i/ili u citoplazmi tumorskih stanica. Određen je postotak pozitivnih stanica kao i intenzitet obojenja (1-slabo, 2-srednje jako i 3-jako obojenje). Preparat je smatran pozitivnim ako je bilo pozitivno više od 10 % tumorskih stanica.

### **3.8 Analiza razine ekspresije miRNA**

Metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu odredili smo razinu ekspresije specifičnih miRNA, *let-7a* i *miR-544* u 50 odabranih parova tumora (T1 and T2) i pripadajućih normalnih sluznica debelog crijeva (15 cm od ruba tumora).

Reakciju smo proveli u dva koraka. Prvo smo RNA prepisali u specifičnu cDNA, a zatim smo dobivenu cDNA kvantificirali metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu.

#### **3.8.1 Reverzna transkripcija**

Neposredno nakon izolacije RNA iz uzoraka tkiva tumora i njima pripadajuće normalne sluznice napravljena je reverzna transkripcija kojom je RNA prepisana u cDNA specifičnu za ispitivane miRNA. U reakciji reverzne transkripcije 200 ng ukupne RNA prepisano je u cDNA pomoću „High Capacity Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems). Osim RNA, reakcijska smjesa je sadržavala po 1 µL svakih 5X specifičnih *TaqMan*<sup>®</sup> početnica za miR-141, miR-200a i RNU48, 1 µL 10X pufera za reverznu transkripciju, 0,1 µL 25X smjese

dNTPs (100 mM), 0,13  $\mu\text{L}$  inhibitora RNaza (20 U/ $\mu\text{L}$ ), 0,7  $\mu\text{L}$  enzima MultiScribe RT (50 U/ $\mu\text{L}$ ) te  $\text{QH}_2\text{O}$  do ukupnog volumena reakcijske smjese od 10  $\mu\text{L}$ . Reakcijsku smjesu smo inkubirali 5 min na ledu. Reakcija se odvijala u uređaju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) kroz 30 min na 16 °C, 30 min na 42 °C te 5 min na 85 °C. Sintetizirana cDNA pohranjena je na -20 °C.

### 3.8.2 Kvantitativni PCR

Razina ekspresije *let-7a* i *miR-544* u uzorcima tumora i njima pripadajućoj normalnoj sluznici analizirana je metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu koristeći *Taqman*<sup>®</sup> *miRNA Assay* 000377 (Applied Biosystems) za *let-7a* te *Taqman*<sup>®</sup> *miRNA Assay* 002265 (Applied Biosystems) za *miR-544*. Kao endogena kontrola reakcije PCR korišten je *Taqman*<sup>®</sup> *miRNA Assay* 001006 (Applied Biosystems) za ribosomsku RNA *RNU48*.

U optičkim epruvetama od 0,2 mL pripremili smo reakcijsku smjesu koja se sastojala od 1,33  $\mu\text{L}$  cDNA, 1  $\mu\text{L}$  *Taqman*<sup>®</sup> *miRNA Assay* (Applied Biosystems), 10  $\mu\text{L}$  *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) te  $\text{QH}_2\text{O}$  do ukupnog volumena od 20  $\mu\text{L}$ . Reakcija se odvijala u uređaju „7300 Real-Time PCR System“ (Applied Biosystems) pod sljedećim uvjetima: 50 °C kroz 2 min, 95 °C kroz 10 min te 40 ciklusa od 95 °C 15 sekundi te 60°C 1 min. Rezultati su očitani kao Ct (engl. treshold cycle) vrijednosti pomoću programa „7300 System SDS Software“ (Applied Biosystems).

Ekspresija analiziranih miRNA normalizirana je prema ekspresiji endogene kontrole RNU48. Rezultati analize ekspresije ispitivanih miRNA u tumorima i pripadajućoj normalnoj sluznici prikazani su kao rezultat formule komparativne Ct metode (Livak i Schmittgen, 2001.):

$$\text{FC}_{\Delta\text{Ct}} = 2^{-\Delta\text{Ct}} \quad \text{ili} \quad \text{FC}_{\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Gdje je: FC = razlika ekspresije ispitivanih gena (engl. *Fold Change*)

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{tumor}} - \Delta\text{Ct}_{\text{normalna sluznica}}$$

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{miRNA}} - \text{Ct}_{\text{RNU48}}$$

Ct = ciklus u kojem fluorescentni signal ispitivane miRNA prijeđe prag detekcije

### 3.9 Statističke metode

Svi dobiveni rezultati analizirani su odgovarajućim statističkim testovima i korelirani s kliničko-patološkim pokazateljima oboljelih i njihovih tumora. Rezultati istraživanja prikazani su uz pomoć tablica, slika i grafikona.

Za analizu kvalitativnih ordinalnih podataka korišteni su  $\chi^2$  i Fisher egzaktni testovi. Kvantitativni kontinuirani podaci analizirani su odgovarajućim parametrijskim odnosno neparametrijskim metodama ovisno o tome da li je raspodjela podataka odgovarala raspodjeli po Gaussu. Rezultati su testirani na normalnost razdiobe (engl. *Normality Test*) D'Agostino i Pearson omnibus testom normalnosti (Dagostino i sur., 1990). Za analizu preživljenja koristili smo Kaplan-Meier metodu. Uz svaki prikaz rezultata naznačen je test koji je korišten za analizu. U svim rezultatima  $p$ -vrijednost  $<0,05$  je smatrana značajnom.

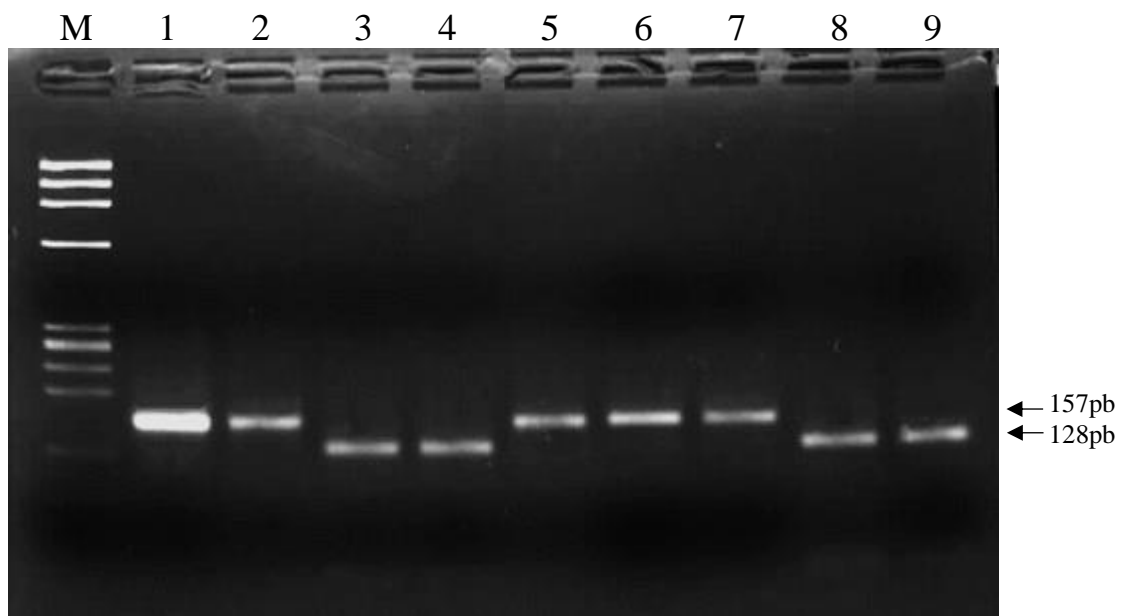
Statistički program korišten u ovom radu je GraphPad Prism (GraphPad Software, Graphpad Holdings, LLC).

## 4 REZULTATI

### 4.1 Analiza mutacija gena *KRAS*

Mutacije gena *KRAS* u kodonu 12 i kodonu 13 ispitali smo na 110 uzoraka tumora oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Analizirali smo po dva uzorka svakog tumora, jedan uzorak iz centra tumora (T1) te drugi iz područja invazivne fronte tumora (T2). Uzorci su odabrani i verificirani od strane patologa kao što je opisano u Materijalima i metodama.

Lančanom reakcijom polimeraze uz pomoć specifičnih početnih oligonukleotida umnožili smo specifične odsječke genomske DNA izolirane iz tkiva tumora. Kako bismo odredili prisustvo mutacije u kodonu 12 ili 13 gena *KRAS* specifične produkte reakcije PCR pocijepali smo restrikcijskim enzimom *Bst*NI za analizu kodona 12 (Slika 7.) te s restrikcijskim enzimom *Bgl*II za analizu kodona 13.



**Slika 7.** Analiza mutacije gena *KRAS* u kodonu 12 metodom PCR- *Bst*NI RFLP. M, DNA standard IX ( $\phi$ x174/*Hae*III); 1, produkt reakcije PCR 157pb; 2, pozitivna kontrola 157pb; 3, negativna kontrola 128pb; 2, 5, 6, 7 uzorci pozitivni na mutaciju gena *KRAS* u kodonu 12; 3, 4, 8, 9 uzorci negativni na mutaciju gena *KRAS* u kodonu 12.



Mutaciju gena *KRAS* dokazali smo u 43 (39,1 %) od 110 ispitanih uzoraka. Mutacija u kodonu 12 bila je prisutna u 39 (90,7 %) pozitivnih uzoraka, a mutaciju u kodonu 13 u svega 4 (9,3 %) pozitivna uzorka. Svi su tumori bili pozitivni ili negativni na ispitivanu mutaciju u oba ispitana uzorka (T1 i T2).

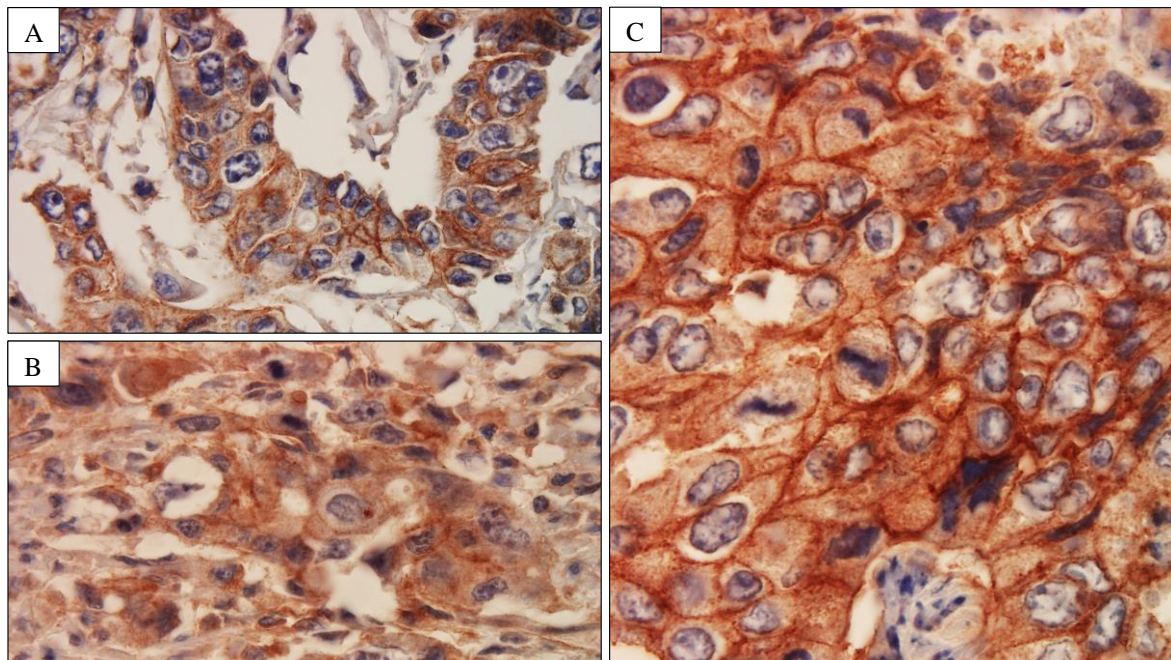
Rezultate dobivene analizom mutacija gena *KRAS* korelirali smo s kliničko-patološkim karakteristikama oboljelih i tumora (dobi, spolom, veličinom tumora, stupnjem diferencijacije, stupnjem pupanja tumora, stadijem po Dukes'-u i smještajem tumora. Mutacije gena *KRAS* bile su statistički značajno učestalije u tumorima s visokim stupnjem pupanja tumora ( $p=0.038$ ) (Tablica 4).

**Tablica 4.** Kliničko-patološke karakteristike oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva s obzirom na prisustvo mutacije gena KRAS u kodonu 12 ili 13

| Karakteristika          | KRAS kodon 12 ili 13 mutacija |                | p            |
|-------------------------|-------------------------------|----------------|--------------|
|                         | Negativni ( %)                | Pozitivni ( %) |              |
|                         | 67 (60,9)                     | 43 (39,1)      |              |
| Dob                     |                               |                |              |
| < 70 godina             | 47 (63,5)                     | 27 (36,5)      | 0,422        |
| ≥ 70 godina             | 20 (55,6)                     | 16 (44,4)      |              |
| Spol                    |                               |                |              |
| Muški                   | 38 (57,6)                     | 28 (42,4)      | 0,380        |
| Ženski                  | 29 (65,9)                     | 15 (34,1)      |              |
| Veličina tumora         |                               |                |              |
| ≤ 5 cm                  | 36 (55,4)                     | 29 (44,6)      | 0,153        |
| > 5 cm                  | 31 (68,9)                     | 14 (31,1)      |              |
| Stupanj diferencijacije |                               |                |              |
| Dobro (1)               | 24 (55,8)                     | 19 (44,1)      | 0,474        |
| Umjereno (2)            | 36 (66,7)                     | 18 (33,3)      |              |
| Slabo (3)               | 7 (53,8)                      | 6 (46,2)       |              |
| Stupanj pupanja tumora  |                               |                |              |
| Niski (1)               | 37 (68,5)                     | 17 (31,5)      | <b>0,038</b> |
| Srednji (2)             | 17 (68,0)                     | 8 (32,0)       |              |
| Visoki (3)              | 13 (41,9)                     | 18 (58,1)      |              |
| Stadij po Dukes'-u      |                               |                |              |
| A                       | 4 (57,1)                      | 3 (42,9)       | 0,332        |
| B                       | 20 (74,1)                     | 7 (25,9)       |              |
| C                       | 29 (60,4)                     | 19 (39,6)      |              |
| D                       | 14 (50,0)                     | 14 (50,0)      |              |
| Smještaj tumora         |                               |                |              |
| Desni kolon             | 18 (56,3)                     | 14 (43,7)      | 0,533        |
| Lijevi kolon            | 47 (72,3)                     | 28 (27,7)      |              |

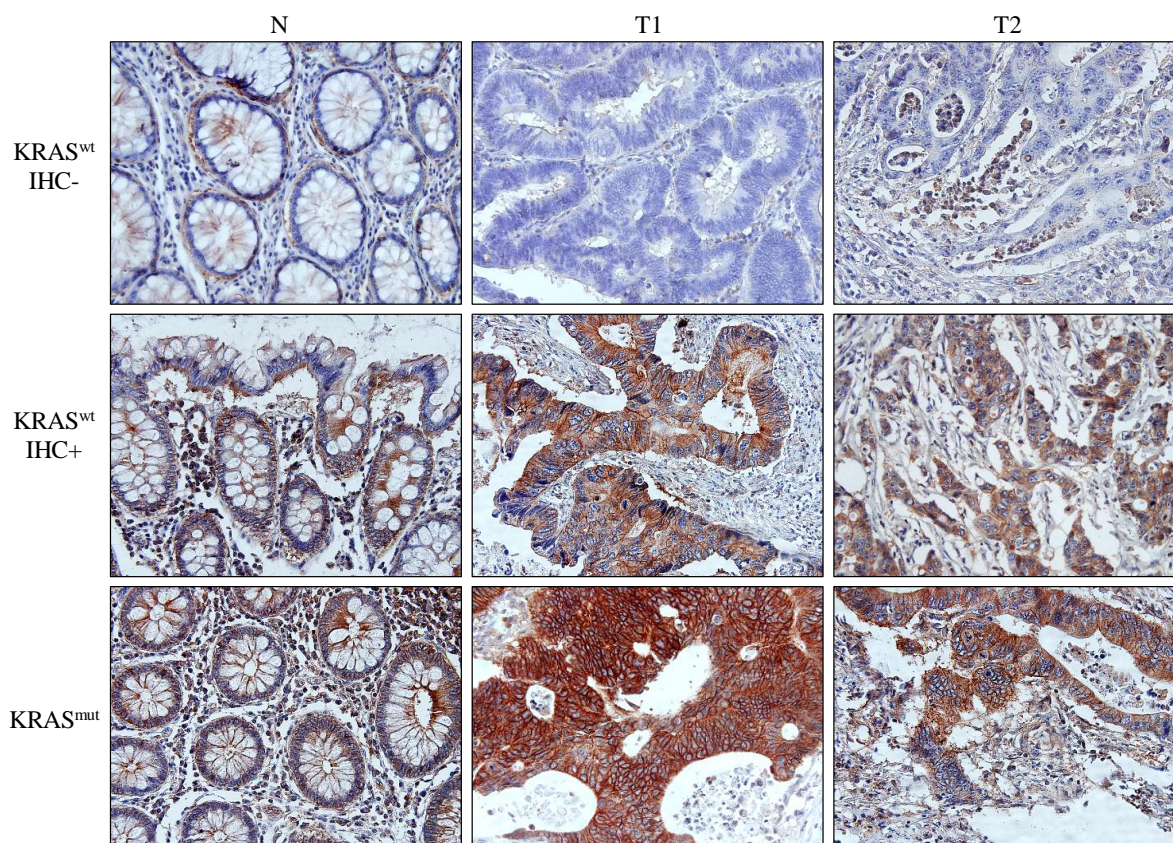
## 4.2 Analiza ekspresije proteina KRAS

U histološkim preparatima tkiva 65 sporadičnih tumora debelog crijeva odredili smo metodom imunohistokemije protein KRAS. Ispitali smo 50 uzoraka tumora bez mutacije gena *KRAS* te 15 uzoraka s mutacijom gena *KRAS*. Pozitivna imunohistokemijska reakcija bila je obilježena prisustvom produkta reakcije imunohistokemije (u vidu smeđeg obojenja) na membrani i/ili citoplazmi tumorskih stanica (Slika 8.). Svaki preparat je analiziran u cjelokupnom području tumora te su rezultati izraženi kao postotak pozitivnih stanica te intenzitet imunohistokemijskog obojenja. Svi tumori s više od 10 % pozitivnih tumorskih stanica smatrani su pozitivnim na prisustvo KRAS proteina.



**Slika 8.** Prikaz (A) membranskog, (B) citoplazmatskog te (C) kombinacije membranskog i citoplazmatskog smještaja proteina KRAS metodom imunohistokemije (povećanje 1000x); smeđe obojenje:protein KRAS, plavo obojenje: stanične jezgre

Devetnaest (38,0 %) tumora bez mutacije gena *KRAS* bilo je također negativno i na protein KRAS dok je 31 (62,0 %) tumor bio imunohistokemijski pozitivan na protein KRAS. Ekspresija proteina KRAS bila je značajno niža od ekspresije u tumorima s mutacijom gena *KRAS* ( $p < 0,001$ ) (Slika 9 i 10). Također, u ovim tumorima pridruženoj normalnoj sluznici dokazali smo negativnu ili slabo pozitivnu ekspresiju proteina KRAS (Slika 9 i 10.)

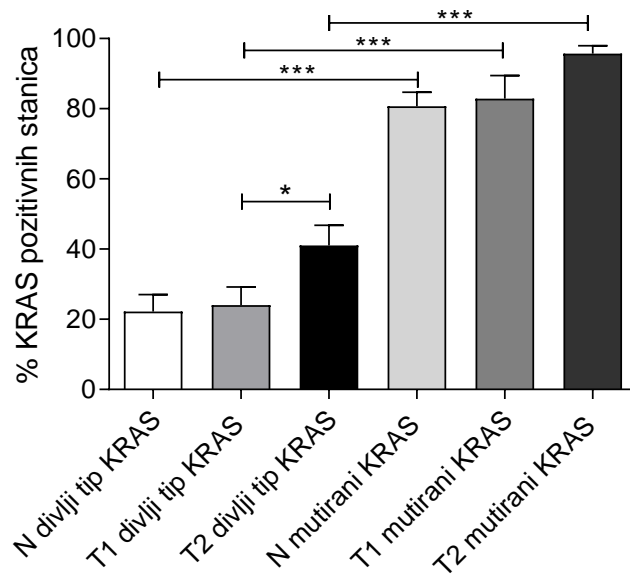


**Slika 9.** Analiza ekspresije proteina KRAS metodom imunohistokemije u normalnoj sluznici pridruženoj tumoru (N), središtu tumora (T1) te invazivnoj fronti tumora (T2) kod uzoraka bez mutacije gena KRAS i negativnih na ekspresiju proteina KRAS (KRAS<sup>wt</sup> IHC-), zatim uzoraka koji su bez mutacije gena KRAS, ali pozitivni na protein KRAS (KRAS<sup>wt</sup> IHC+) te uzoraka koji su bili pozitivni na mutaciju gena KRAS (KRAS<sup>mut</sup>) (povećanje 400x) smeđe obojenje: protein KRAS, plavo obojenje: stanične jezgre

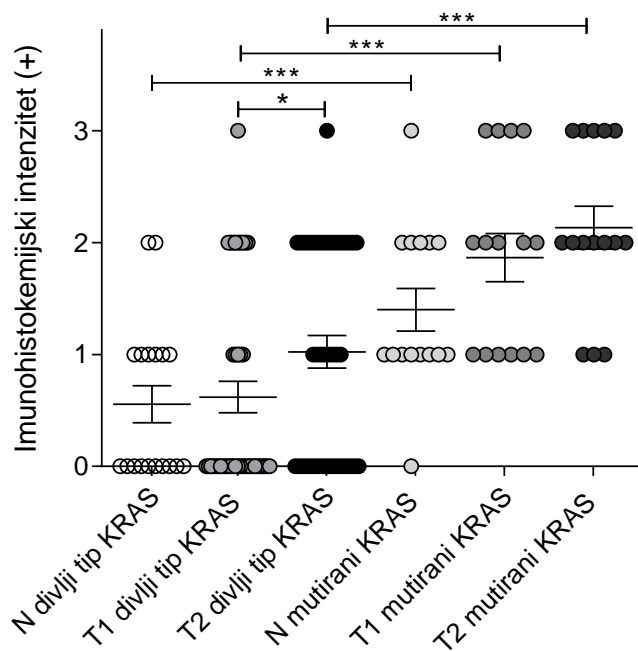
Svi tumori s mutacijom gena KRAS bili su imunohistokemijski pozitivni na protein KRAS i to u više od 40 % tumorskih stanica te s jačim intenzitetom imunohistokemijske reakcije u odnosu na tumore bez mutacije gena KRAS. Ekspresija proteina KRAS srednjeg intenziteta dokazana je i u normalnoj sluznici pridruženoj tumorima pozitivnim na mutaciju KRAS (Slika 9.).

Svaki smo tumor analizirali u dva segmenta, središnjem dijelu tumora (T1) te invazivnoj fronti tumora (T2). Pozitivna imunohistokemijska reakcija na protein KRAS bila je učestalija na invazivnoj fronti tumora u odnosu na središnji dio tumora u svim analiziranim tumorima neovisno o prisustvu mutacije gena KRAS. U tumorima bez mutacije gena KRAS dokazana je statistički značajna razlika između T1 i T2. U invazivnoj fronti tumora (T2) ekspresija proteina KRAS bila je značajno viša, kako s obzirom na postotak pozitivnih stanica ( $p=0,030$ ) (Slika 10A) tako i s obzirom na intenzitet imunohistokemijske reakcije na protein KRAS ( $p=0,040$ ) (Slika 10B).

A



B



**Slika 10.** (A) Postotak stanica pozitivnih na protein KRAS i (B) imunohistokemijski intenzitet ekspresiju proteina KRAS u uzorcima normalne sluznice pridružene tumoru (N), središtu tumora (T1) i invazivnoj fronti tumora (T2) u uzorcima koji imaju divilji tip ili mutirani oblik gena KRAS

Rezultati analize ekspresije proteina KRAS u tumorima bez mutacije gena *KRAS* prikazani su u Tablici 5. Statistička analiza nije pokazala povezanost intenziteta ekspresije proteina KRAS i kliničko-patoloških karakteristika oboljelih i tumora.

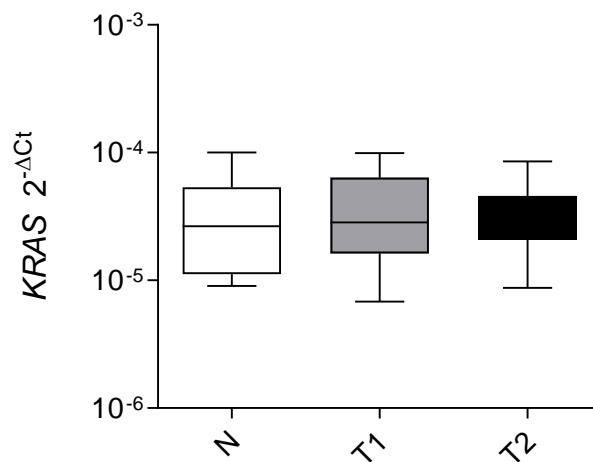
**Tablica 5.** *Kliničko-patološke karakteristike 50 oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva bez mutacije gena KRAS s obzirom na ekspresiju proteina KRAS*

| Karakteristika                  | Protein KRAS   |                | p     |
|---------------------------------|----------------|----------------|-------|
|                                 | Negativan ( %) | Pozitivan ( %) |       |
|                                 | 19 (38,0)      | 31 (62,0)      |       |
| Dob                             |                |                |       |
| < 70 godina                     | 15 (40,5)      | 22 (59,5)      | 0,532 |
| ≥ 70 godina                     | 4 (30,8)       | 9 (69,2)       |       |
| Spol                            |                |                |       |
| Muški                           | 10 (34,5)      | 19 (65,5)      | 0,546 |
| Ženski                          | 9 (42,9)       | 12 (57,1)      |       |
| Veličina tumora                 |                |                |       |
| ≤ 5 cm                          | 13 (43,3)      | 17 (56,7)      | 0,341 |
| > 5 cm                          | 6 (30,0)       | 14 (70,0)      |       |
| Stupanj diferencijacije         |                |                |       |
| Dobro (1)                       | 9 (45,0)       | 11 (55,0)      | 0,707 |
| Umjereno (2)                    | 9 (33,3)       | 18 (66,7)      |       |
| Slabo (3)                       | 1 (33,3)       | 2 (66,7)       |       |
| Stadij po Dukes <sup>2</sup> -u |                |                |       |
| A                               | 2 (50,0)       | 2 (50,0)       | 0,131 |
| B                               | 2 (13,3)       | 13 (86,7)      |       |
| C                               | 11 (50,0)      | 11 (50,0)      |       |
| D                               | 4 (44,4)       | 5 (55,6)       |       |
| Smještaj tumora                 |                |                |       |
| Desni kolon                     | 3 (37,5)       | 5 (62,5)       | 0,974 |
| Lijevi kolon                    | 16 (38,1)      | 26 (61,9)      |       |

### 4.3 Analiza ekspresije mRNA i miRNA

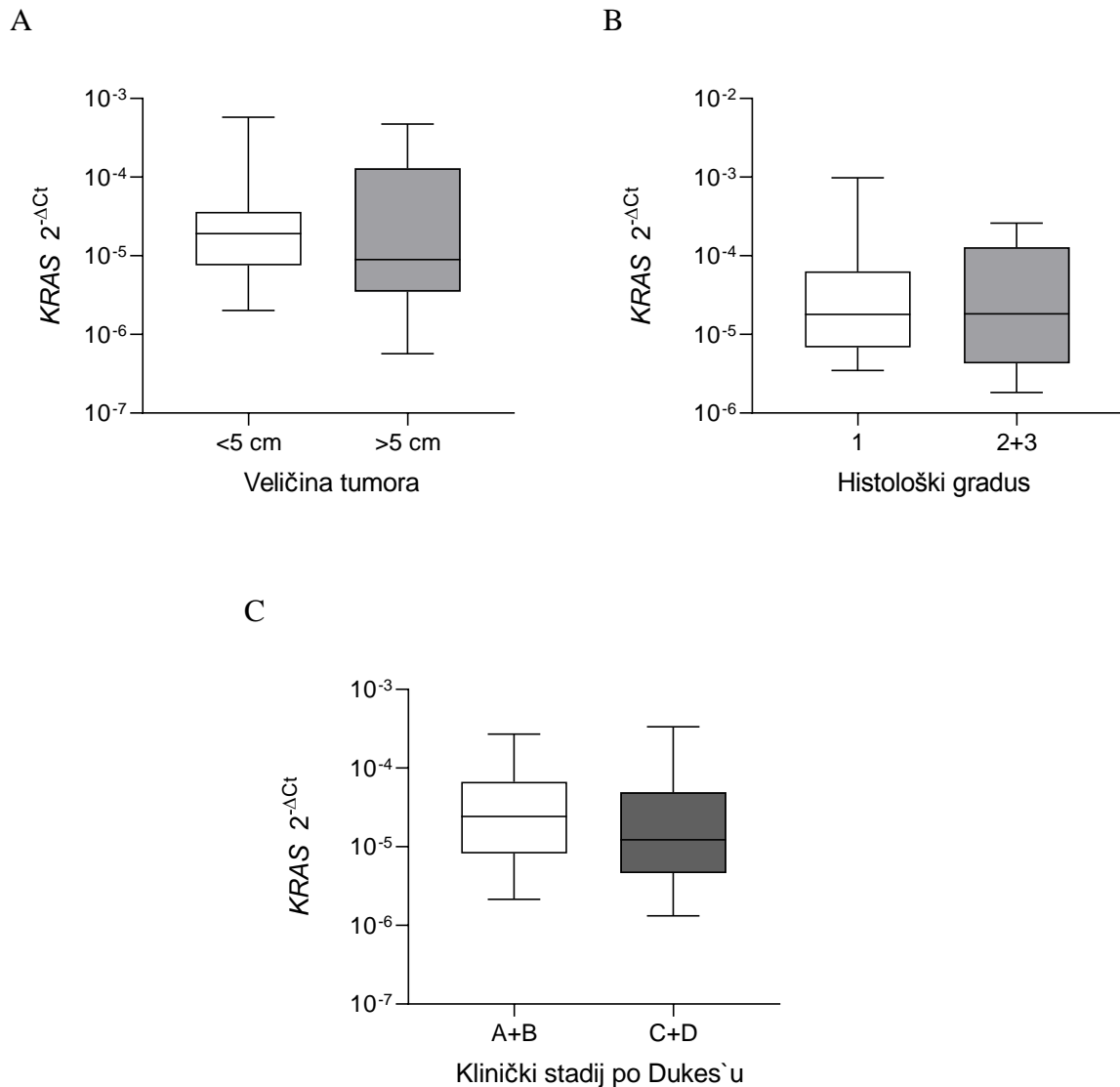
Razina ekspresije mRNA gena *KRAS* te *let-7a* i *miR-544* ispitana je metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu u 50 parova tumora bez mutacije gena *KRAS* i pripadajućih normalnih sluznica debelog crijeva. Odabrali smo i analizirali uzorke visoke kvalitete RNA. Analizirali smo dva uzorka svakog tumora, središte tumora (T1) i uzorak invazivne fronte tumora (T2) kao i pridruženu normalnu sluznicu.

Statistička je analiza pokazala da nema razlike u ekspresiji specifične mRNA gena *KRAS* između normalne sluznice i uzoraka tumorskog tkiva ( $p=0,982$ ) (Slika 11).



**Slika 11.** Razina ekspresije mRNA molekule gena *KRAS* određena metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu u normalnoj sluznici pridruženoj tumoru (N) te središtu (T1) i invazivnoj fronti sporadičnog tumora debelog crijeva tumora (T2). Prikazane su prosječne vrijednosti ekspresije za svaku grupu uzoraka (50 unutar grupe). Naznačena je srednja vrijednost i srednja vrijednost standardne pogreške svake grupe.  $2^{-\Delta Ct}$  označava ekspresiju ispitivanog gena normaliziranog prema ekspresiji endogene kontrole.

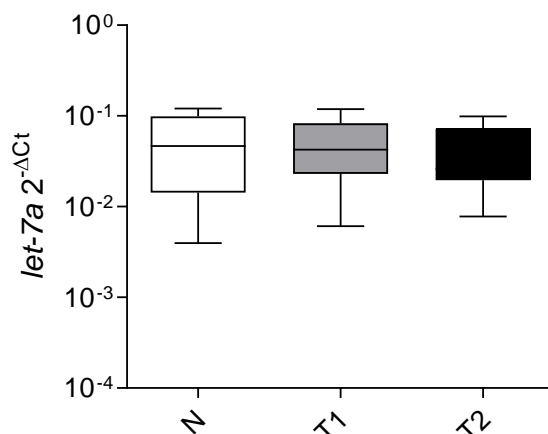
Također nije pokazana povezanost ekspresije specifične mRNA *KRAS* s veličinom tumora ( $p=0,490$ ) (Slika 12A), stupnjem diferencijacije ( $p=0,394$ ) (Slika 12B) i stadijem po Dukes'-u ( $p=0,726$ ) (Slika 12C).



**Slika 12.** Razina ekspresije mRNA molekule *KRAS* određena metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu u uzorcima sporadičnog tumora debelog crijeva u korelaciji s (A) veličinom tumora, (B) histološkim gradusom i (C) stadijem po Dukes`u. Prikazane su prosječne vrijednosti ekspresije za svaku grupu uzoraka (20 do 30 unutar grupe). Naznačena je srednja vrijednost i srednja vrijednost standardne pogreške svake grupe.  $2^{-\Delta C_t}$  označava ekspresiju ispitivanog gena normaliziranog prema ekspresiji endogene kontrole.

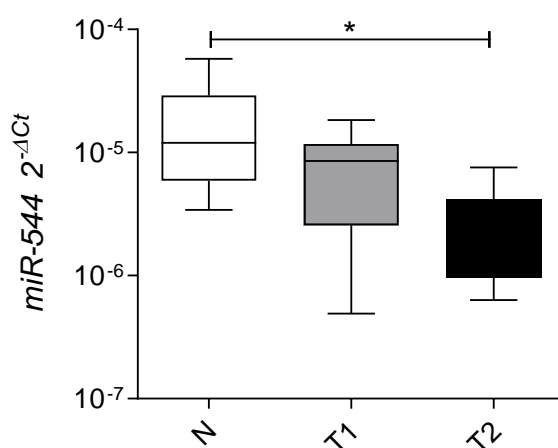


Analiza ekspresije miRNA *let-7a* nije pokazala razliku u ekspresiji u tumorskim tkivima u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu ( $p=0,527$ ) (Slika 13).



**Slika 13.** Razina ekspresije miRNA *let-7a* određena metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu u normalnoj sluznici pridruženoj tumoru (N), te središtu (T1) i invazivnoj fronti sporadičnog tumora debelog crijeva tumora (T2). Prikazane su prosječne vrijednosti ekspresije za svaku grupu uzoraka (50 unutar grupe). Naznačena je srednja vrijednost i srednja vrijednost standardne pogreške svake grupe.  $2^{-\Delta Ct}$  označava ekspresiju ispitivanog gena normaliziranog prema ekspresiji endogene kontrole.

Međutim, ekspresija *miR-544* bila je statistički značajno ( $p<0,001$ ) niža u uzorku tumora iz invazivne fronte tumora (T2) u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu (Slika 14).



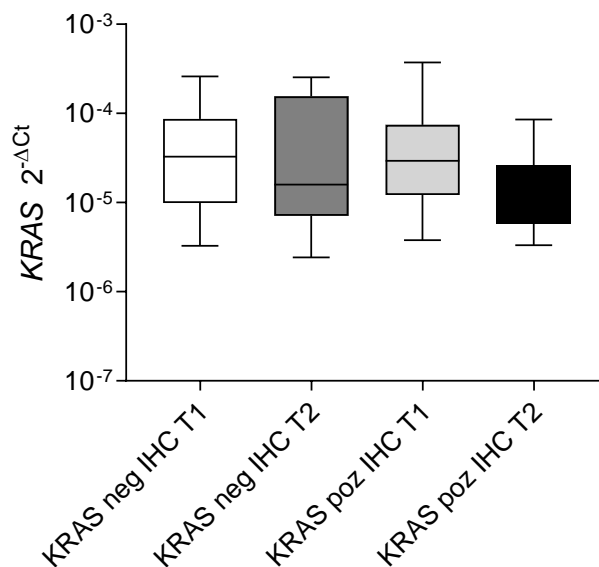
**Slika 14.** Razina ekspresije miRNA *miR-544* određena metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu u normalnoj sluznici pridruženoj tumoru (N), te središtu (T1) i invazivnoj fronti sporadičnog tumora debelog crijeva tumora (T2). Prikazane su prosječne vrijednosti ekspresije za svaku grupu uzoraka (50 unutar grupe). Naznačena je srednja vrijednost i srednja vrijednost standardne pogreške svake grupe.  $2^{-\Delta Ct}$  označava ekspresiju ispitivanog gena normaliziranog prema ekspresiji endogene kontrole. ( $p^*<0,001$ )

Nije pokazana povezanost ekspresije *let-7a* i *miR-544* s veličinom tumora, stupnjem diferencijacije i stadijem po Dukes'-u.

#### 4.4 Korelacija mRNA *KRAS* te *let-7a* i *miR-544* s ekspresijom proteina *KRAS*

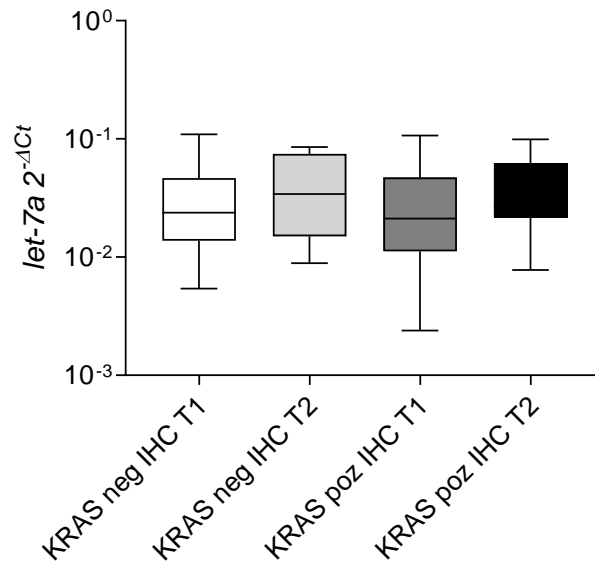
U ovom smo istraživanju također analizirali korelaciju između ekspresije molekula miRNA, *let-7a* i *miR-544*, i ekspresija proteina *KRAS* u tkivu tumora.

Statistička je analiza pokazala da ne postoji korelacija između ekspresije specifične *KRAS* mRNA i ekspresije proteina *KRAS* u uzorcima tumora (T1 i T2) ( $p=0,327$ ) (Slika 15.).



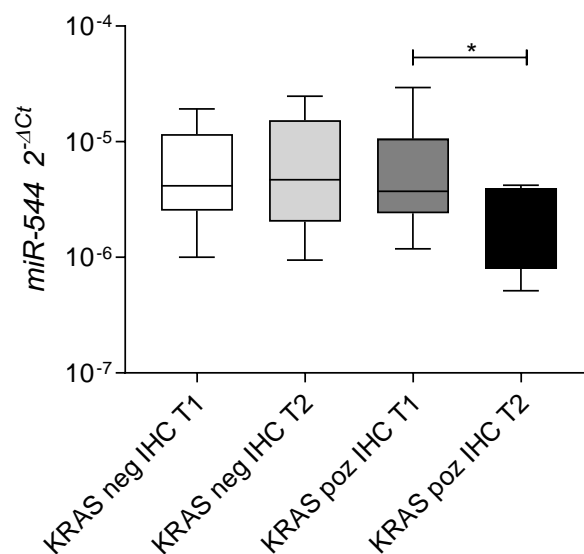
**Slika 15.** Analiza ekspresije *KRAS* mRNA određena metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu u središnjem dijelu (T1) i invazivnoj fronti sporadičnog tumora debelog crijeva tumora (T2) u odnosu na ekspresiju proteina *KRAS*. Prikazane su prosječne vrijednosti ekspresije za svaku grupu uzoraka (19 ili 31 unutar grupe). Naznačena je srednja vrijednost i srednja vrijednost standardne pogreške svake grupe.  $2^{-\Delta Ct}$  označava ekspresiju ispitivanog gena normaliziranog prema ekspresiji endogene kontrole.

Također, nije dokazana povezanost između ekspresije *let-7a* i ekspresija proteina KRAS u uzorcima tumora (T1 i T2) ( $p=0,929$ ) (Slika 16.).



**Slika 16.** Analiza ekspresije *let-7a* miRNA određena metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu u uzorcima sporadičnog tumora debelog crijeva, u središnjem dijelu tumora (T1) i invazivnoj fronti tumora (T2) u odnosu na ekspresiju proteina KRAS. Prikazane su prosječne vrijednosti ekspresije za svaku grupu uzoraka (19 ili 31 unutar grupe). Naznačena je srednja vrijednost i srednja vrijednost standardne pogreške svake grupe.  $2^{-\Delta Ct}$  označava ekspresiju ispitivanog gena normaliziranog prema ekspresiji endogene kontrole.

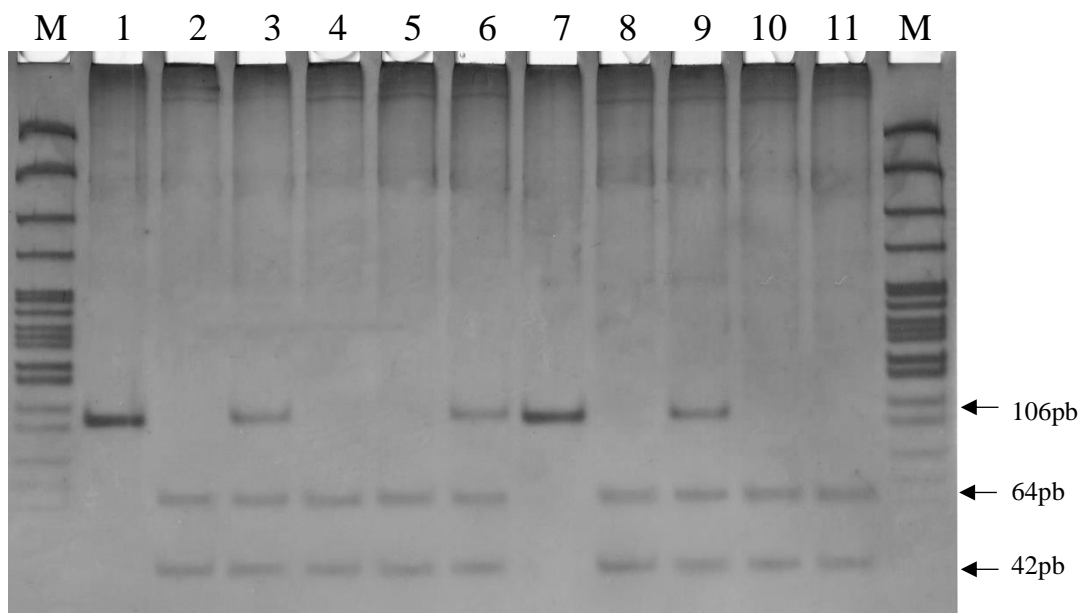
Utvrđena je razlika u ekspresiji *miR-544* između središnjeg dijela tumora (T1) i invazivne fronte tumora (T2) u tumorima imunohistokemijski pozitivnim na protein KRAS. Ekspresija *miR-544* u invazivnoj je fronti tumora (T2) bila statistički značajno niža ( $p=0,042$ ) (Slika 17.).



**Slika 17.** Analiza ekspresije miR-544 u uzorcima sporadičnog tumora debelog crijeva, u središnjem dijelu tumora (T1) i invazivnoj fronti tumora (T2) u odnosu na ekspresiju proteina KRAS. Prikazane su prosječne vrijednosti ekspresije za svaku grupu uzoraka (19 ili 31 unutar grupe). Naznačena je srednja vrijednost i srednja vrijednost standardne pogreške svake grupe.  $2^{-\Delta C_t}$  označava ekspresiju ispitivanog gena normaliziranog prema ekspresiji endogene kontrole.

#### 4.5 SNP polimorfizmi unutar mjesta vezanja za miRNA na 3' UTR gena KRAS

Svih 110 ispitanika genotipizirano je na dva SNP polimorfizma unutar 3'UTR gena KRAS. Polimorfizam KRAS-LCS6 T/G (rs61764370) u veznom mjestu za *let-7a* analiziran je metodom PCR- TflI RFLP (Slika 18.). Polimorfizam KRAS rs10771184 A/T u veznom mjestu za *miR-544* analiziran je metodom PCR-a u stvarnom vremenu koristeći specifični genotipizacijski Taqman® SNP Assay sa specifičnim početnicama naručenim na temelju slijeda u 3' UTR regiji gena KRAS unutar kojeg se nalazi navedeni polimorfizam.



**Slika 18.** Analiza SNP polimorfizma *KRAS-LCS6* (rs61764370 T/G) u uzorcima sporadičnog tumora debelog crijeva unutar 3'UTR gena *KRAS* metodom PCR- *TfII* RFLP. Linija M, DNA standard IX ( $\phi$ x174/*HaeIII*); 1, produkt reakcije PCR 106pb; 2, pozitivna kontrola homozigota TT 64pb i 42pb; 3, pozitivna kontrola heterozigota TG 106pb, 64pb i 42pb; 2, 4, 5, 8, 10, 11 uzorci su homozigoti TT; 3, 6, 9 uzorci su heterozigoti TG, uzorak 7 je homozigot GG.

Distribucija genotipova polimorfizma *KRAS-LCS6* T/G dokazanih u našem uzorku iznosila je: divlji tip homozigotnog genotipa TT dokazan je u 104 (94,5 %), heterozigotni genotip TG u 5 (4,5 %) te varijantni homozigotni genotip GG u 1 (1,0 %) uzorku. Distribucija genotipova polimorfizma *KRAS* rs10771184 A/T dokazanih u našem uzorku iznosila je: divlji tip homozigotnog genotipa AA dokazan je u 34 (30,9 %), heterozigotni genotip AT u 54 (49,1 %) te varijantni homozigotni genotip TT u 22 (20,0 %) uzorka.

Učestalost genotipova oba polimorfizma u korelaciji s ekspresijom proteina *KRAS* u 50 sporadičnih karcinoma debelog crijeva bez mutacije u genu *KRAS* prikazana je u Tablici 6.

U našem istraživanju nije dokazana povezanost polimorfizma *KRAS* rs10771184 A/T u veznom mjestu za *miR-544* s ekspresijom proteina *KRAS* u tkivu tumora. Međutim, dokazana je statistički značajna povezanost ekspresije proteina *KRAS* s polimorfizmom *KRAS-LCS6* T/G u veznom mjestu za *let-7a*. Tumori svih nosioca varijantnog alela (genotipa TG i GG) bili su pozitivni na protein *KRAS* ( $p=0,040$ ). Varijantni alel G bio je statistički značajno učestaliji u tumorima pozitivnim na protein *KRAS* ( $p=0,031$ ).

**Tablica 6.** Sporadični tumori debelog crijeva bez mutacije u genu *KRAS* stratificirani s obzirom na ekspresiju proteina *KRAS* i polimorfizme gena *KRAS* u veznim mjestima za miRNA

| <i>KRAS</i> polimorfizam (miRNA)                   | Protein <i>KRAS</i> |                | p            |
|--|---------------------|----------------|--------------|
|  | Negativan ( %)      | Pozitivan ( %) |              |
| Genotipovi/Aleli                                   | 19 (38,0)           | 31 (62,0)      |              |
| <i>KRAS-LCS6</i> rs61764370 T/G, ( <i>let-7a</i> ) |                     |                |              |
| TT   | 19 (100,0)          | 25 (80,6)      | 0,123        |
| TG   | 0 (0,0)             | 5 (16,1)       |              |
| GG   | 0 (0,0)             | 1 (3,3)        |              |
| TT   | 19 (100,0)          | 25 (80,6)      | <b>0,040</b> |
| TG + GG  | 0 (0,0)             | 6 (19,4)       |              |
| T  | 38 (100,0)          | 55 (88,7)      | <b>0,031</b> |
| G  | 0 (0,0)             | 7 (11,3)       |              |
| <i>KRAS</i> rs10771184 A/T ( <i>miR-544</i> )      |                     |                |              |
| AA   | 3 (15,8)            | 9 (29,0)       | 0,190        |
| AT   | 13 (68,4)           | 13 (42,0)      |              |
| TT   | 3 (15,8)            | 9 (29,0)       |              |
| AA   | 3 (15,8)            | 9 (29,0)       | 0,287        |
| AT + TT  | 16 (84,2)           | 22 (71,0)      |              |
| A  | 19 (50,0)           | 31 (50,0)      | 1,00         |
| T  | 19 (50,0)           | 31 (50,0)      |              |

## 5 RASPRAVA

Broj oboljelih od karcinoma debelog crijeva u stalnom je porastu te je danas jedan od najčešćih zloćudnih tumora u zemljama razvijenog svijeta i jedan od vodećih uzroka smrti od raka. Hrvatska također slijedi isti trend te se u zadnjih nekoliko desetljeća broj oboljelih i umrlih od ove bolesti udvostručio te je danas karcinom debelog crijeva vodeći uzrok smrti od zloćudnih tumora. Iako razvoj karcinoma može trajati i do deset godina, u Hrvatskoj samo 20% novo dijagnosticiranih pacijenata ima karcinom dijagnosticiran u ranoj fazi bolesti te se u većine oboljelih bolest dijagnosticira u uznapredovalom stadiju bolesti s metastazama u regionalnim limfnim čvorovima i/ili udaljenim organima (HZZJ, 2019). Najveći broj karcinoma debelog crijeva javlja se u sporadičnom obliku, a nastaje kao posljedica nakupljanja mutacija u onkogenima, tumor supresorskim genima i genima za popravak DNA koje uvjetuju napredovanje procesa od normalne sluznice kolona preko adenoma do zloćudnog invazivnog karcinom slijedom poznatim kao adenom-karcinom sekvenca prvi put opisanim još 1990. godine (Kinzler and Vogelstein, 1996, Fearon and Vogelstein, 1990, Carethers and Jung, 2015).

Jedna od ključnih promjena u nastanku i napredovanju karcinoma debelog crijeva je mutacija gena *KRAS* (12p12.1) koja dovodi do konstitutivne aktivacije proteina *KRAS* i nekontrolirane proliferacije epitelnih stanica adenoma. Osim točkastih mutacija, povećana ekspresija gena *KRAS* može biti rezultat amplifikacije gena, ali također može biti i rezultat promijenjene regulacije molekulama miRNA. Poznato je da različite mutacije u genu *KRAS* mogu imati različit učinak na ekspresiju proteina *KRAS* kao i na agresivnost fenotipa te su istraživanja na stanicama NIH3T3 pokazala da povećana ekspresija koja nije uzrokovana mutacijama može imati sličan učinak na proliferaciju tumorskih stanica i pojačanu ekspresiju proteina *KRAS* (Guerrero i sur., 2000). Međutim, treba također napomenuti da, iako imaju sličan onkogeni učinak, različite mutacije u genu *KRAS* i povećana ekspresija gena *KRAS* aktiviraju različite nizvodne signalne puteve koji su odgovorni za razlike u fenotipu bolesti (Horsch i sur., 2009).

S obzirom na to da su mutacije u genu *KRAS* i njihov utjecaj na razinu molekula mRNA i ekspresiju proteina *KRAS* dobro istražene, glavni cilj ovog istraživanja bio ispitati ulogu dviju molekula mikro RNA, *let-7a* i *miR-544*, za koje je pokazano da posjeduju vezna mjesta na mRNA *KRAS* te tako mogu regulirati sintezu proteina *KRAS*, u tumorigenezi sporadičnih

karcinoma kolona bez mutacije gena *KRAS*. Ispitali smo i povezanost polimorfizama koji se nalaze u veznim mjestima za *let-7a*

i *miR-544* s ekspresijom proteina *KRAS* u tkivu tumora.

Mutacija gena *KRAS* je prema rezultatima drugih autora prisutna u 30 do 50 % karcinoma debelog crijeva, a najčešće se može dokazati u kodonu 12 ili 13 gena *KRAS* i danas se koristi kao jedan od vodećih farmakogenetskih biljega u terapiji anti-EGFR terapijom (Barbacid, 1987, Herreros-Villanueva i sur., 2014, Liu i sur., 2019). U našem istraživanju mutaciju gena *KRAS* u kodonu 12 ili 13 dokazali smo u 39 % sporadičnih karcinoma debelog crijeva. Mutacija u kodonu 12 bila je učestalija 39 / 43 (90,7 %) dok smo mutaciju u kodonu 13 dokazali u svega 4 tumora (9,3 %) što odgovara i rezultatima drugih autora (Liu i sur., 2019). Za razliku od drugih autora (Wan i sur., 2019) u našem istraživanju nismo dokazali povezanost mutacije gena *KRAS* s nižim stupnjem diferencijacije tumora. Rezultati našeg istraživanja odgovaraju rezultatima drugih studija u kojima nisu pokazali povezanost mutacija *KRAS* s dobi ili spolom oboljelih (Inoue i sur., 2012). Opisana je veća učestalost mutacija gena *KRAS* u tumorima većim od pet centimetara (Yari i sur., 2020), međutim mi taj rezultat nismo potvrdili našim istraživanjem. Također nismo pokazali veću učestalost mutacije gena *KRAS* u višim stadija tumora po Dukes'-u što je također u skladu s drugim istraživanjima (Bleeker i sur., 2000).

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da je mutacija gena *KRAS* učestalija u tumorima s višim stupnjem pupanja tumora. Jang i suradnici (2017.) su također opisali povezanost višeg stupnja pupanja tumora s prisutnošću mutacije u genu *KRAS*, posebice mutacije G12D (Jang i sur., 2017). Pupanje tumora se smatra histološkim pokazateljem epitelno-mezenhimalne tranzicije i karakterizirano je odvajanjem pojedinačnih ili malenih skupina tumorskih stanica, najviše do četiri, od invazivne fronte tumora. Također, istraživanja su pokazala da je pupanje tumora neovisan prognostički marker udružen s metastaziranjem u limfne čvorove i kraćim preživljenjem u oboljelih od karcinoma debelog crijeva (van Wyk i sur., 2019, Lugli i sur., 2012, Ozer i sur., 2019, Dawson and Lugli, 2015).

Svi tumori u kojima smo dokazali mutaciju gena *KRAS* imali su srednje ili jako ekspresiran protein *KRAS*. Imunohistokemijski je *KRAS* protein bio smješten u citoplazmi i na staničnoj membrani tumorskih stanica. Naši su rezultati bili u suglasju s rezultatima drugih autora koji opisuju srednje jaku ili jaku ekspresiju proteina *KRAS* u 42,3 % (Elsabah and Adel, 2013) odnosno 34 % (Piton i sur., 2015) tumora debelog crijeva što bi odgovaralo



učestalosti mutacija gena *KRAS* u analiziranim tumorima. Obje su skupine autora predlagale da se molekularno testiranje na mutaciju gena *KRAS* zamijeni imunohistokemijskom analizom međutim, pokazalo se da tumori mogu biti pozitivni ili negativni na protein *KRAS* neovisno o mutaciji gena *KRAS*. U našem smo istraživanju po prvi puta ispitali ekspresiju proteina *KRAS* u tumorima negativnim na mutaciju gena *KRAS* te smo pozitivnu imunohistokemijsku reakciju dokazali u 62 % analiziranih tumora dok je 38 % tumora bilo negativno na *KRAS* protein. Ekspresija proteina *KRAS* u tumorima negativnim na mutaciju u genu *KRAS* bila je značajno niža u odnosu na ekspresiju u tumorima pozitivnim na mutaciju gena *KRAS*, kako u tkivu tumora tako i u normalnoj sluznici debelog crijeva pridruženoj karcinomu.

U ovom je istraživanju po prvi puta ispitana ekspresija proteina *KRAS* u uzorku središta tumora i uzorku invazivne fronte tumora. Naši su rezultati pokazali kako je ekspresija proteina *KRAS* značajno viša u uzorku invazivne fronte tumora, kako u postotku pozitivnih stanica tako i u intenzitetu imunohistokemijske reakcije. Razliku smo uočili u tumorima pozitivnim na mutaciju gena *KRAS*, a posebice u tumorima bez mutacije gena *KRAS* gdje je ta razlika bila statistički značajna. Ovakav je rezultat očekivan s obzirom na činjenicu da protein *KRAS* potiče proliferaciju stanica i napredovanje tumorske bolesti (Arrington i sur., 2012), kao i s obzirom na novija saznanja o invazivnoj fronti tumora i njezinoj ulozi u lokalnom napredovanju tumora pupanjem tumora te diseminacijom tumorskih stanica u regionalne krvne i limfne žile (Zlobec i sur., 2010).

Ekspresija specifične mRNA *KRAS* nije se značajno razlikovala u tumorskim tkivima, središtu tumora i invazivnoj fronti tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu tumora. Također nismo dokazali korelaciju između ekspresije *KRAS* mRNA i ekspresija proteina *KRAS* u tkivu tumora. Također nije dokazana povezanost ekspresije *KRAS* mRNA s veličinom tumora, stupnjem diferencijacije i stadijem po Dukes'-u tumora. Stoga smo ispitali povezanost ekspresije proteina *KRAS* s ekspresijom molekula miRNA za koje je poznato ili se pretpostavlja da utječu na sintezu proteina *KRAS* vezivanjem na vezna mjesta na molekuli *KRAS* mRNA.

Mikro RNA su post-transkripcijski regulatori onkogeni ili tumor-supresorskih gena, a njihova deregulacija povezana je s razvojem i napredovanjem raka (Markopoulos i sur., 2017). Zrele molekule miRNA sastoje se od 22 nukleotida, te kao negativni regulatori ekspresije gena, prepoznaju komplementarne sekvence u 3' UTR kraju ciljnih mRNA. Istraživanja su pokazala da molekule miRNA ne sudjeluju samo u fiziološkim biološkim procesima kao što je stanični ciklus već poput onkogeni i tumor-supresorskih gena mogu

sudjelovati u nastanku i napredovanju zloćudnih tumora (Vimalraj i sur., 2013, Ma i sur., 2012a, Haga and Phinney, 2012). U našem smo istraživanju analizirali dvije molekule miRNA, *let-7a* i *miR-544*.

miRNA *let-7* je jedna od prvih otkrivenih miRNA. U čovjeka je pronađeno 10 članova obitelji *let-7*, među kojima je i *let-7a*, koji u fiziološkim uvjetima sudjeluju u regulaciji ekspresije gena i staničnoj adheziji. Uloga *let-7a* u tumorigenezi je pokazana u nekoliko različitih vrsta zloćudnih tumora poput karcinoma ovarija, pluća, prostate, metastatskog kolorektalnog karcinoma (Zhang i sur., 2007b, Akao i sur., 2006, Dong i sur., 2010) i limfoma (Sampson i sur., 2007) gdje je pokazano da može imati utjecaj na apoptozu, proliferaciju ili invaziju tumorskih stanica. Uloga miRNA *let-7a* također je istražena u karcinomu debelog crijeva gdje je pokazano da su razine *let-7a* snižene u tumorskom tkivu u odnosu na normalnu sluznicu debelog crijeva te da gubitak ekspresije *let-7a* dovodi do epitelno-mezenhimalne tranzicije i napredovanja tumora (Cheng i sur., 2018). Također, poznato je da miRNA *let-7a* može regulirati ekspresija proteina KRAS tako što se veže na vezno mjesto u 3' UTR regiji mRNA KRAS. Naime, u istraživanjima na stanicama raka pluća je pokazano da je gubitak normalnog mjesta vezanja *let-7a* na mRNA KRAS povezan s povećanom transkripcijom i translacijom KRAS proteina. S obzirom na to da su proteini RAS ključni regulatori mitogenog i onkogenog djelovanja tirozin kinaza, njihova povećana ekspresija može utjecati na povećano preživljenje i proliferaciju stanica (Khosravi-Far & Der, 1994; Schubert i sur., 2007) koja može dovesti do metastaziranja.

Budući da je protein KRAS bitan za razvoj karcinoma debelog crijeva, a miRNA *let-7a* molekula može utjecati na njegovu ekspresiju, odlučili smo ispitati ulogu miRNA *let-7a* u regulaciji mRNA i proteina KRAS u sporadičnom karcinomu debelog crijeva i to u tumorima negativnim na mutaciju gena KRAS. S obzirom na to da smo u ovom istraživanju imali uzorke središta tumora, uzorke invazivne fronte tumora kao i uzorke normalne sluznice debelog crijeva pridružene tumoru, željeli smo ispitati razlike u ekspresiji *let-7a* u navedenim uzorcima. Razina ekspresije mikro RNA *let-7a* nije se značajno razlikovala u tumorskim tkivima središta tumora i invazivne fronte tumora u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu. Također, nije uočena razlika u razini mikro RNA *let-7a* između tumora koji ispoljavaju ili ne ispoljavaju protein KRAS, ali ne nose mutaciju u genu KRAS. Nadalje, nismo pronašli povezanost ekspresije *let-7a* s veličinom tumora, stupnjem diferencijacije i stadijem po Dukes'-u. Iako su neka istraživanja pokazala da *let-7a* može direktno utjecati na ekspresiju proteina KRAS (Johnson i sur., 2005, Akao i sur., 2006) u ovom istraživanju nismo dobili

rezultate u skladu s rezultatima prethodno objavljenih istraživanja. To se može donekle objasniti činjenicom da su neki rezultati dobiveni na staničnim linijama, a ne na tkivima, te da su i druge grupe pokazale da *let-7a* može utjecati samo na razinu mRNA *KRAS* (Kolenda i sur., 2014) ili samo na ekspresiju proteina *KRAS* (Akao i sur., 2006) kada je prisutna mutacija gena *KRAS*.

Poznato je da polimorfizam rs61764370 T/G (*KRAS-LCS6*) u 3' UTR regiji gena *KRAS* također može utjecati na ekspresiju proteina *KRAS* s obzirom na to da mijenja mogućnost vezanja zrele miRNA *let-7* na ciljnu molekulu mRNA. Naši rezultati pokazuju da je varijantni alel G bio statistički značajno učestaliji u tumorima pozitivnim na protein *KRAS* kao i to da su uzorci tumora svih nosioca varijantnog alela (genotipa TG i GG) bili pozitivni na protein *KRAS*. Iako nismo direktno pokazali da je varijantni alel povezan s većom ekspresijom proteina *KRAS* u karcinomima debelog crijeva, činjenica da je prisutan samo u tumorima koji su pozitivni na ekspresiju proteina *KRAS* podupire teoriju da može imati utjecaj na regulaciju proteina *KRAS* u tumorima negativnim na mutaciju gena *KRAS*. Velika meta-analiza koju su napravili Zhang i suradnici 2016. godine (Zhang and Shi, 2016) pokazala je da unatoč ranijim radovima, genotip GT i GG nije statistički značajno povezan s većim rizikom obolijevanja od karcinoma ovarija, dojke, ne-malih stanica pluća ili karcinoma glave i vrata. S obzirom na to da u ovom istraživanju nismo imali visoku prisutnost homozigota GG, valjalo bi proširiti ovo istraživanje i vidjeti bi li na većem broju uzoraka rezultat bio drugačiji. Također, ako se pokaže da ipak ima utjecaj na razvoj CRC, trebalo bi istražiti imaju li nositelji varijantnog alela G povećanu ekspresiju molekule mRNA *KRAS* i ekspresiju proteina *KRAS* sličnu kao i pacijenti u kojih je prisutna mutacija u genu *KRAS*.

S obzirom na to da put *KRAS* predstavlja potencijalnu terapijsku metu za liječenje karcinoma debelog crijeva, trebalo bi ispitati mogu li se male utišavajuće siRNA vezati na vezno mjesto za *let-7a* i tako smanjiti ekspresiju gena *KRAS*. Štoviše, pokazano je da *let-7a* može imati dodatne povoljne učinke jer kontrolira regulatore staničnog ciklusa (Dong i sur., 2010), razine molekula Myc (Sampson i sur., 2007), Bcl-2 (Shimizu i sur., 2010), STAT3 (Meng i sur., 2007) i integrine (Muller and Bosserhoff, 2008). S obzirom na to da je pokazano da se siRNA mogu koristiti kao terapija koja ima specifičan, a opet prolazan i reverzibilan učinak, bile bi idealan pristup u liječenju zloćudnih tumora (Shim & Kwon, 2010). Ove pretpostavke su i potvrđene na mišjem modelu raka pluća i prostate. Korištenjem nanočestica na kojima su vezane molekule koje oponašaju *let-7a* („*let-7a mimics*“) pokazan je terapijski učinak kroz smanjenu proliferaciju i povećanu apoptozu tumorskih stanica (Guo i sur., 2013).

Međutim, treba istaknuti da je sve još u fazi razvoja budući da postoje problemi s aktivacijom imunskog sustava, nespecifičnosti i toksičnosti (Jurj i sur., 2017).

Mikro RNA *miR-544* prisutna je u različitim tkivima čovjeka, a vezuje se na velik broj ciljnih molekula mRNA među kojima je i molekula mRNA *KRAS*. Dosadašnja su se istraživanja bavila ispitivanjem uloge *miR-544* u različitim tumorima u čovjeka. Promijenjena ekspresija *miR-544* je pronađena u različitim tipovima karcinoma, zbog čega se smatra da bi mogla imati ulogu u tumorigenezi ili napredovanju tumora (Haga i sur., 2015, Lu i sur., 2016, Mo i sur., 2014a, Zhi i sur., 2013). Nekoliko istraživanja pokazalo je da *miR-544* potiče proliferaciju stanica tumora na način na smanjuje ekspresiju mRNA tumor-supresorskih gena, odnosno povećava ekspresiju mRNA raznih onkogenih gena (Zhi i sur., 2013). Ovi rezultati ukazuju da se *miR-544* ponaša različito u različitim tkivima.

Ekspresija *miR-544* smanjena je u gliomima (Ma i sur., 2012a) i invazivnom karcinomu dojke (Haga and Phinney, 2012). Istraživanja su pokazala da *miR-544* u gliomima ima ulogu tumor supresora te da je značajno snižena ekspresija u anaplastičnim gliomima molekularni biljeg zloćudne preobrazbe glioma u glioblastome (Ma i sur., 2012a). U karcinomima želuca *miR-544* potiče stanični ciklus i proliferaciju tumorskih stanica na način da inhibira ekspresiju tumor-supresorskog gena *IRX1* (Zhi i sur., 2013). In vitro istraživanja su pokazala da *miR-544* potiče invaziju i metastaziranje stanica tumora ne-malih stanica pluća vezivanjem na ciljnu molekulu *CDH1* mRNA i posljedično smanjenu ekspresiju proteina E-kadherina kao i pojačanu ekspresiju vimentina (Mo i sur., 2014a). U karcinomima želuca je pokazano da *miR-544* potiče epitelno-mezenhimalnu tranziciju aktivacijom WNT signalnog puta. Kao što je već prije opisano *CDH1* mRNA je ciljna molekule *miR-544*. Smanjena ekspresija E-kadherina u tumorskim stanicama karcinoma želuca dovodi do translokacije i nakupljanja  $\beta$ -katenina u jezgri tumorskih stanica te posljedično do pojačane proliferacije stanica i epitelno-mezenhimalne tranzicije (Yanaka i sur., 2015).

Uloga *miR-544* u tumorigenezi karcinoma debelog crijeva još uvijek nije razjašnjena. In vitro istraživanja su pokazala da je ciljna molekula *miR-544* u stanicama karcinoma kolona FOXO1 te da pojačana ekspresija *miR-544* potiče proliferaciju stanica karcinoma kolona (Yao i sur., 2018). Naši su rezultati pokazali značajnu razliku u ekspresiji *miR-544* između uzorka iz središta tumora i uzorka invazivne fronte tumora. Ekspresija *miR-544* je u invazivnoj fronti tumora bila značajno niža i to u tumorima pozitivnim na protein *KRAS* te je bila u korelaciji s povišenom ekspresijom proteina *KRAS* u uzorcima invazivne fronte tumora. S obzirom na to da je ekspresija *miR-544* bila značajno niža samo u invazivnoj fronti tumora postoji

moгуćnost da bi smanjena ekspresija ove miRNA mogla imati ulogu u proliferaciji i lokalnoj invaziji u sporadičnim karcinomima debelog crijeva. Međutim, u našem uzorku nismo pronašli korelaciju razine ekspresije *miR-544* s veličinom tumora, stupnjem diferencijacije ili stadijem po Dukes'-u tumora.

Prema rezultatima bioinformatičkih analiza *KRAS* u svojoj 3' netranslatirajućoj regiji ima vezno mjesto za *miR-544* unutar kojeg se nalazi polimorfizam rs10771184 A/T te je pokazana povezanost ovog polimorfizma s povećanom sklonošću obolijevanju od karcinoma jajnika i kraćim preživljenjem u oboljelih (Liang i sur., 2010a). Za sada još nema objavljenih istraživanja o učinku polimorfizma u mjestu vezanja miR-544 na ekspresiju proteina KRAS. U našem istraživanju nismo dokazali povezanost polimorfizma *KRAS* rs10771184 A/T u veznom mjestu za *miR-544* s ekspresijom proteina KRAS u tkivu sporadičnih tumora debelog crijeva bez mutacije gena *KRAS*.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da obje miRNA *let-7a* i *miR-544* sudjeluju u tumorigenezi sporadičnih karcinoma debelog crijeva bez mutacije gena *KRAS*, ali različitim mehanizmima. Mikro RNA *let-7a* može se različito vezati na mRNA *KRAS* ovisno o polimorfizmu *KRAS-LCS6* T/G u sekvenci za koju se veže na mRNA *KRAS*. Prisustvo varijantnog alela G onemogućuje vezanje *let-7a* na mRNA *KRAS* što za posljedicu ima povišenu ekspresiju proteina KRAS. *miR-544* djeluje smanjenom ekspresijom u tkivu tumora i to posebice u invazivnoj fronti tumora što za posljedicu također ima pojačanu ekspresiju proteina KRAS te pojačanu proliferaciju tumora. Ovo istraživanje je značajno s obzirom na to da se razumijevanjem točne uloge miRNA povećava naše razumijevanje biologije sporadičnog karcinoma debelog crijeva kao i mogućnost za razvoj novih terapija u liječenju ove bolesti.

## 6 ZAKLJUČCI

U sklopu ovog doktorskog rada istraživao sam ulogu mikro RNA *let-7a* i *miR-544* te njihovih polimorfizama u tumorigenezi sporadičnih karcinoma debelog crijeva bez mutacije gena *KRAS*.

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

- Analizirano je 110 uzoraka tumorskog i normalnog tkiva oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Mutaciju gena *KRAS* u kodonu 12 ili 13 dokazali smo u 39 % sporadičnih karcinoma debelog crijeva, a učestalija je bila u tumorima s višim stupnjem pupanja tumora ( $p=0,038$ ). U svim tumorima koji posjeduju mutaciju gena *KRAS* dokazali smo visoku ekspresiju proteina *KRAS*.
- Tumori bez mutacije gena *KRAS* u 38 % uzoraka bili su imunohistokemijski negativni, a u 62 % pozitivni na protein *KRAS*. Ekspresija proteina *KRAS* bila je značajno niža od ekspresije u tumorima s mutacijom gena *KRAS* ( $p<0,001$ )
- U tumorima bez mutacije gena *KRAS* dokazali smo statistički značajnu razliku u ekspresiji proteina *KRAS* između središta tumora (T1) i invazivne fronte tumora (T2) u kojoj je ona bila značajno viša, kako u postotku pozitivnih stanica ( $p= 0,030$ ) tako i u intenzitetu imunohistokemijske reakcije ( $p= 0,040$ ).
- Ekspresija mRNA *KRAS* nije se značajno razlikovala u tumorskim tkivima (T1 i T2) u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu.
- Ekspresija miRNA *let-7a* nije se značajno razlikovala u tumorskim tkivima (T1 i T2) u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu.
- Ekspresija *miR-544* bila je statistički značajno niža u uzorku invazivne fronte tumora (T2) u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu ( $p<0,001$ ).
- Nije dokazana korelacija između ekspresije mRNA *KRAS* i ekspresije proteina *KRAS* u tkivu tumora ( $p=0,327$ ).
- Nije dokazana korelacija između ekspresije miRNA *let-7a* i ekspresije proteina *KRAS* u tkivu tumora ( $p=0,929$ ).
- Dokazali smo statistički značajnu razliku u ekspresiji *miR-544* između središta tumora (T1) i uzorka invazivne fronte tumora (T2) u tumorima imunohistokemijski pozitivnim na protein *KRAS*. Ekspresija *miR-544* je u invazivnoj fronti tumora bila statistički značajno niža ( $p=0,042$ ).

- Dokazana je statistički značajna povezanost ekspresije proteina KRAS s polimorfizmom *KRAS-LCS6* T/G u veznom mjestu za *let-7a*. Tumori svih nosioca varijantnog alela (genotipa TG i GG) bili su imunohistokemijski pozitivni na protein KRAS (p=0,040). Varijantni alel G bio je statistički značajno učestaliji u tumorima imunohistokemijski pozitivnim na protein KRAS (p=0,031).
- Nije dokazana povezanost polimorfizma *KRAS* rs10771184 A/T u veznom mjestu za *miR-544* s ekspresijom proteina KRAS u tkivu tumora.

U ovom smo radu dokazali da obje mikro RNA *let-7a* i *miR-544* sudjeluju u tumorigenezi sporadičnih karcinoma debelog crijeva bez mutacije gena *KRAS*, ali različitim mehanizmima. miRNA *let-7a* može se različito vezati na mRNA *KRAS* ovisno o polimorfizmu *KRAS-LCS6* T/G u sekvenci za koju se veže na mRNA *KRAS*. Prisustvo varijantnog alela G onemogućuje vezanje *let-7a* na mRNA *KRAS* što za posljedicu ima povišenu ekspresiju proteina KRAS. *miR-544* ima smanjenu ekspresiju u invazivnoj fronti tumora te tako utječe na povećanje ekspresije proteina KRAS i povećanje proliferacije tumora.

## 7 LITERATURA

- Abecasis, G. R., Auton, A., Brooks, L. D., Depristo, M. A., Durbin, R. M., Handsaker, R. E., Kang, H. M., Marth, G. T. & Mcvean, G. A. 2012. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, 491, 56-65.
- Aghdam, A. M., Amiri, A., Salarinia, R., Masoudifar, A., Ghasemi, F. & Mirzaei, H. 2019. MicroRNAs as Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Biomarkers in Prostate Cancer. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 29, 127-139.
- Akao, Y., Nakagawa, Y. & Naoe, T. 2006. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29, 903-6.
- Akkiprik, M., Celikel, C. A., Dusunceli, F., Sonmez, O., Gulluoglu, B. M., Sav, A. & Ozer, A. 2008. Relationship between overexpression of ras p21 oncoprotein and K-ras codon 12 and 13 mutations in Turkish colorectal cancer patients. *Turk J Gastroenterol*, 19, 22-7.
- Akkoca, A. N., Yanik, S., Ozdemir, Z. T., Cihan, F. G., Sayar, S., Cincin, T. G., Cam, A. & Ozer, C. 2014. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med*, 7, 2828-35.
- Amado, R. G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D. J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., Patterson, S. D. & Chang, D. D. 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26, 1626-34.
- Armelaio, F. & De Pretis, G. 2014. Familial colorectal cancer: a review. *World J Gastroenterol*, 20, 9292-8.
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66, 683-691.
- Arrington, A. K., Heinrich, E. L., Lee, W., Duldulao, M., Patel, S., Sanchez, J., Garcia-Aguilar, J. & Kim, J. 2012. Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*, 13, 12153-68.
- Asangani, I. A., Rasheed, S. a. K., Nikolova, D. A., Leupold, J. H., Colburn, N. H., Post, S. & Allgayer, H. 2008. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates



- tumor suppressor *Pcd4* and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 27, 2128-2136.
- Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Vantuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y., White, R. & Vogelstein, B. 1989. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, 244, 217-21.
- Barbacid, M. 1987. ras genes. *Annual Review of Biochemistry*, 56, 779-827.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-97.
- Bazan, V., Migliavacca, M., Zanna, I., Tubiolo, C., Grassi, N., Latteri, M. A., La Farina, M., Albanese, I., Dardanoni, G., Salerno, S., Tomasin, R. M., Labianca, R., Gebbia, N. & Russo, A. 2002. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. *Annals of Oncology*, 13, 1438-1446.
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., Sharon, E., Spector, Y. & Bentwich, Z. 2005. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*, 37, 766-70.
- Berezikov, E., Chung, W. J., Willis, J., Cuppen, E. & Lai, E. C. 2007. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell*, 28, 328-36.
- Bingham, S. A., Day, N. E., Luben, R., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T., Clavel-Chapelon, F., Kesse, E., Nieters, A., Boeing, H., Tjonneland, A., Overvad, K., Martinez, C., Dorronsoro, M., Gonzalez, C. A., Key, T. J., Trichopoulou, A., Naska, A., Vineis, P., Tumino, R., Krogh, V., Bueno-De-Mesquita, H. B., Peeters, P. H., Berglund, G., Hallmans, G., Lund, E., Skeie, G., Kaaks, R. & Riboli, E. 2003. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*, 361, 1496-501.
- Bird, A. P. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321, 209-13.
- Birkeland, E., Wik, E., Mjos, S., Hoivik, E. A., Trovik, J., Werner, H. M. J., Kusunmano, K., Petersen, K., Raeder, M. B., Holst, F., Oyan, A. M., Kalland, K. H., Akslen, L. A., Simon, R., Krakstad, C. & Salvesen, H. B. 2012. KRAS gene amplification and

- overexpression but not mutation associates with aggressive and metastatic endometrial cancer. *British Journal of Cancer*, 107, 1997-2004.
- Bleeker, W. A., Hayes, V. M., Karrenbeld, A., Hofstra, R. M., Hermans, J., Buys, C. C. & Plukker, J. T. 2000. Impact of KRAS and TP53 mutations on survival in patients with left- and right-sided Dukes' C colon cancer. *American Journal of Gastroenterology*, 95, 2953-7.
- Bokemeyer, C., Bondarenko, I., Makhson, A., Hartmann, J. T., Aparicio, J., De Braud, F., Donea, S., Ludwig, H., Schuch, G., Stroh, C., Loos, A. H., Zubel, A. & Koralewski, P. 2009. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 27, 663-71.
- Boland, C. R., Sato, J., Appelman, H. D., Bresalier, R. S. & Feinberg, A. P. 1995. Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumour suppressor gene loci during colorectal cancer progression. *Nat Med*, 1, 902-9.
- Bos, J. L. 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49, 4682-9.
- Bracht, J., Hunter, S., Eachus, R., Weeks, P. & Pasquinelli, A. E. 2004. Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *RNA*, 10, 1586-94.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. & Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68, 394-424.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. & Croce, C. M. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15524-9.
- Calvert, P. M. & Frucht, H. 2002. The genetics of colorectal cancer. *Annals of Internal Medicine*, 137, 603-612.
- Candela, M., Turrioni, S., Biagi, E., Carbonero, F., Rampelli, S., Fiorentini, C. & Brigidi, P. 2014. Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. *World J Gastroenterol*, 20, 908-22.
- Carder, P. J., Cripps, K. J., Morris, R., Collins, S., White, S., Bird, C. C. & Wyllie, A. H. 1995. Mutation of the p53 gene precedes aneuploid clonal divergence in colorectal carcinoma. *Br J Cancer*, 71, 215-8.

- Carethers, J. M. & Jung, B. H. 2015. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 149, 1177-1190 e3.
- Caron De Fromentel, C. & Soussi, T. 1992. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, 4, 1-15.
- Chan, S. P., Ramaswamy, G., Choi, E. Y. & Slack, F. J. 2008. Identification of specific let-7 microRNA binding complexes in *Caenorhabditis elegans*. *RNA*, 14, 2104-14.
- Chen, M., Liu, Y. Y., Zheng, M. Q., Wang, X. L., Gao, X. H., Chen, L. & Zhang, G. M. 2018. microRNA-544 promoted human osteosarcoma cell proliferation by downregulating AXIN2 expression. *Oncol Lett*, 15, 7076-7082.
- Cheng, L., Geng, L., Dai, B., Zheng, T., Fu, J., Qiao, L., Cai, W., Wang, Y. & Yang, J. 2018. Repression of let-7a cluster prevents adhesion of colorectal cancer cells by enforcing a mesenchymal phenotype in presence of liver inflammation. *Cell Death Dis*, 9, 489.
- Chin, L. J., Ratner, E., Leng, S. G., Zhai, R. H., Nallur, S., Babar, I., Muller, R. U., Straka, E., Su, L., Burki, E. A., Crowell, R. E., Patel, R., Kulkarni, T., Homer, R., Zelterman, D., Kidd, K. K., Zhu, Y., Christiani, D. C., Belinsky, S. A., Slack, F. J. & Weidhaas, J. B. 2008. A SNP in a let-7 microRNA Complementary Site in the KRAS 3' Untranslated Region Increases Non-Small Cell Lung Cancer Risk. *Cancer Research*, 68, 8535-8540.
- Chubb, J. R. & Insall, R. H. 2001. Dictyostelium: an ideal organism for genetic dissection of Ras signalling networks. *Biochim Biophys Acta*, 1525, 262-71.
- Colicelli, J. 2004. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE*, 2004, RE13.
- Coppede, F., Lopomo, A., Spisni, R. & Migliore, L. 2014. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 943-956.
- Counts, J. L. & Goodman, J. I. 1995. Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell*, 83, 13-5.
- Cox, A. D. & Der, C. J. 2010. Ras history: The saga continues. *Small GTPases*, 1, 2-27.
- Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H. J., Lynch, H. T., Minsky, B., Nordlinger, B. & Starling, N. 2010. Colorectal cancer. *Lancet*, 375, 1030-47.

- Curtis, L. J., Georgiades, I. B., White, S., Bird, C. C., Harrison, D. J. & Wyllie, A. H. 2000. Specific patterns of chromosomal abnormalities are associated with RER status in sporadic colorectal cancer. *J Pathol*, 192, 440-5.
- Dagostino, R. B., Belanger, A. & Dagostino, R. B. 1990. A Suggestion for Using Powerful and Informative Tests of Normality. *American Statistician*, 44, 316-321.
- Dawson, H. & Lugli, A. 2015. Molecular and pathogenetic aspects of tumor budding in colorectal cancer. *Front Med (Lausanne)*, 2, 11.
- De Angelis, P. M., Clausen, O. P., Schjolberg, A. & Stokke, T. 1999. Chromosomal gains and losses in primary colorectal carcinomas detected by CGH and their associations with tumour DNA ploidy, genotypes and phenotypes. *Br J Cancer*, 80, 526-35.
- De Benedetti, L., Varesco, L., Pellegata, N. S., Losi, L., Gismondi, V., Casarino, L., Sciallero, S., Bonelli, L., Biticchi, R., Bafico, A. & I sur. 1993. Genetic events in sporadic colorectal adenomas: K-ras and p53 heterozygous mutations are not sufficient for malignant progression. *Anticancer Res*, 13, 667-70.
- De La Chapelle, A. 2004. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 4, 769-80.
- Dong, Q., Meng, P., Wang, T., Qin, W., Wang, F., Yuan, J., Chen, Z., Yang, A. & Wang, H. 2010. MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells in vitro and in vivo by targeting E2F2 and CCND2. *PLoS One*, 5, e10147.
- Douillard, J. Y., Siena, S., Cassidy, J., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., Rivera, F., Kocakova, I., Ruff, P., Blasinska-Morawiec, M., Smakal, M., Canon, J. L., Rother, M., Oliner, K. S., Wolf, M. & Gansert, J. 2010. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol*, 28, 4697-705.
- Duff, E. K. & Clarke, A. R. 1998. Smad4 (DPC4)--a potent tumour suppressor? *Br J Cancer*, 78, 1615-9.
- Elsabah, M. T. & Adel, I. 2013. Immunohistochemical assay for detection of K-ras protein expression in metastatic colorectal cancer. *J Egypt Natl Canc Inst*, 25, 51-6.
- Engle, L. J., Simpson, C. L. & Landers, J. E. 2006. Using high-throughput SNP technologies to study cancer. *Oncogene*, 25, 1594-601.

- Eppert, K., Scherer, S. W., Ozcelik, H., Pirone, R., Hoodless, P., Kim, H., Tsui, L. C., Bapat, B., Gallinger, S., Andrulis, I. L., Thomsen, G. H., Wrana, J. L. & Attisano, L. 1996. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell*, 86, 543-52.
- Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 259-69.
- Fearon, E. R., Cho, K. R., Nigro, J. M., Kern, S. E., Simons, J. W., Ruppert, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Thomas, G., Kinzler, K. W. & I sur. 1990. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, 247, 49-56.
- Fearon, E. R., Hamilton, S. R. & Vogelstein, B. 1987. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science*, 238, 193-7.
- Fearon, E. R. & Vogelstein, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-67.
- Feinberg, A. P., Gehrke, C. W., Kuo, K. C. & Ehrlich, M. 1988. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res*, 48, 1159-61.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Pineros, M., Znaor, A. & Bray, F. 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*, 144, 1941-1953.
- Forbes, S., Clements, J., Dawson, E., Bamford, S., Webb, T., Dogan, A., Flanagan, A., Teague, J., Wooster, R., Futreal, P. A. & Stratton, M. R. 2006. Cosmic 2005. *Br J Cancer*, 94, 318-22.
- Ford, A. C., Moayyedi, P. & Hanauer, S. B. 2013. Ulcerative colitis. *BMJ*, 346, f432.
- Gideon, P., John, J., Frech, M., Lautwein, A., Clark, R., Scheffler, J. E. & Wittinghofer, A. 1992. Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol Cell Biol*, 12, 2050-6.
- Goel, A., Arnold, C. N., Niedzwiecki, D., Chang, D. K., Ricciardiello, L., Carethers, J. M., Dowell, J. M., Wasserman, L., Compton, C., Mayer, R. J., Bertagnolli, M. M. & Boland, C. R. 2003. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res*, 63, 1608-14.
- Goelz, S. E., Vogelstein, B., Hamilton, S. R. & Feinberg, A. P. 1985. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science*, 228, 187-90.

- Goody, R. S., Frech, M. & Wittinghofer, A. 1991. Affinity of guanine nucleotide binding proteins for their ligands: facts and artefacts. *Trends Biochem Sci*, 16, 327-8.
- Goss, K. H. & Groden, J. 2000. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol*, 18, 1967-79.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M. & I sur. 1991. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 66, 589-600.
- Grosshans, H., Johnson, T., Reinert, K. L., Gerstein, M. & Slack, F. J. 2005. The temporal patterning microRNA let-7 regulates several transcription factors at the larval to adult transition in *C. elegans*. *Dev Cell*, 8, 321-30.
- Guerrero, S., Casanova, I., Farre, L., Mazo, A., Capella, G. & Mangués, R. 2000. K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Research*, 60, 6750-6.
- Guo, W., Chen, W., Yu, W., Huang, W. & Deng, W. 2013. Small interfering RNA-based molecular therapy of cancers. *Chin J Cancer*, 32, 488-93.
- Haga, C. L. & Phinney, D. G. 2012. MicroRNAs in the imprinted DLK1-DIO3 region repress the epithelial-to-mesenchymal transition by targeting the TWIST1 protein signaling network. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 42695-707.
- Haga, C. L., Velagapudi, S. P., Strivelli, J. R., Yang, W. Y., Disney, M. D. & Phinney, D. G. 2015. Small Molecule Inhibition of miR-544 Biogenesis Disrupts Adaptive Responses to Hypoxia by Modulating ATM-mTOR Signaling. *ACS Chem Biol*, 10, 2267-76.
- Hardingham, J. E., Butler, W. J., Roder, D., Dobrovic, A., Dymock, R. B., Sage, R. E. & Roberts-Thomson, I. C. 1998. Somatic mutations, acetylator status, and prognosis in colorectal cancer. *Gut*, 42, 669-72.
- Harima, Y., Shirahama, S., Harima, K., Aoki, S., Ohnishi, T. & Tanaka, Y. 1999. Genetic alterations on chromosome 17p associated with response to radiotherapy in bulky cervical cancer. *Br J Cancer*, 81, 108-13.
- Heldin, C. H., Miyazono, K. & Ten Dijke, P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390, 465-71.
- Herreros-Villanueva, M., Chen, C. C., Yuan, S. S., Liu, T. C. & Er, T. K. 2014. KRAS mutations: analytical considerations. *Clinica Chimica Acta*, 431, 211-20.

- Hertel, J., Bartschat, S., Wintsche, A., Otto, C. & Stadler, P. F. 2012. Evolution of the let-7 microRNA family. *RNA Biol*, 9, 231-41.
- Hertz, D. L. & Mcleod, H. L. 2014. Using Pharmacogene Polymorphism Panels to Detect Germline Pharmacodynamic Markers in Oncology. *Clinical Cancer Research*, 20, 2530-2540.
- Horsch, M., Recktenwald, C. V., Schadler, S., Hrabec De Angelis, M., Seliger, B. & Beckers, J. 2009. Overexpressed vs mutated Kras in murine fibroblasts: a molecular phenotyping study. *British Journal of Cancer*, 100, 656-62.
- Hutchison, J., Cohen, Z., Onyeagucha, B. C., Funk, J. & Nelson, M. A. 2013. How microRNAs influence both hereditary and inflammatory-mediated colon cancers. *Cancer Genetics*, 206, 309-316.
- Inoue, Y., Saigusa, S., Iwata, T., Okugawa, Y., Toiyama, Y., Tanaka, K., Uchida, K., Mohri, Y. & Kusunoki, M. 2012. The prognostic value of KRAS mutations in patients with colorectal cancer. *Oncology Reports*, 28, 1579-84.
- Jang, S., Hong, M., Shin, M. K., Kim, B. C., Shin, H. S., Yu, E., Hong, S. M., Kim, J., Chun, S. M., Kim, T. I., Choi, K. C., Ko, Y. W. & Kim, J. W. 2017. KRAS and PIK3CA mutations in colorectal adenocarcinomas correlate with aggressive histological features and behavior. *Hum Pathol*, 65, 21-30.
- Jass, J. R. 2004. HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Fam Cancer*, 3, 93-100.
- Jass, J. R. 2006. Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term. *World J Gastroenterol*, 12, 4943-50.
- Jemal, A., Center, M. M., Ward, E. & Thun, M. J. 2009. Cancer occurrence. *Methods Mol Biol*, 471, 3-29.
- John, J., Schlichting, I., Schiltz, E., Rosch, P. & Wittinghofer, A. 1989. C-terminal truncation of p21H preserves crucial kinetic and structural properties. *J Biol Chem*, 264, 13086-92.
- Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D. & Slack, F. J. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120, 635-47.
- Jones, A. M., Douglas, E. J., Halford, S. E., Fiegler, H., Gorman, P. A., Roylance, R. R., Carter, N. P. & Tomlinson, I. P. 2005. Array-CGH analysis of microsatellite-stable,

- near-diploid bowel cancers and comparison with other types of colorectal carcinoma. *Oncogene*, 24, 118-29.
- Jurj, A., Braicu, C., Pop, L. A., Tomuleasa, C., Gherman, C. D. & Berindan-Neagoe, I. 2017. The new era of nanotechnology, an alternative to change cancer treatment. *Drug Des Devel Ther*, 11, 2871-2890.
- Karapetis, C. S., Khambata-Ford, S., Jonker, D. J., O'callaghan, C. J., Tu, D., Tebbutt, N. C., Simes, R. J., Chalchal, H., Shapiro, J. D., Robitaille, S., Price, T. J., Shepherd, L., Au, H. J., Langer, C., Moore, M. J. & Zalberg, J. R. 2008. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*, 359, 1757-65.
- Karnoub, A. E. & Weinberg, R. A. 2008. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 517-31.
- Kaserer, K., Schmaus, J., Bethge, U., Migschitz, B., Fasching, S., Walch, A., Herbst, F., Teleky, B. & Wrba, F. 2000. Staining patterns of p53 immunohistochemistry and their biological significance in colorectal cancer. *J Pathol*, 190, 450-6.
- Kim, V. N. 2005. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 376-385.
- Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Su, L. K., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, A. C., Hedge, P., Mckechnie, D. & I sur. 1991. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 253, 661-5.
- Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87, 159-70.
- Knight, S. W. & Bass, B. L. 2001. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 293, 2269-71.
- Knudsen, A. L., Bisgaard, M. L. & Bulow, S. 2003. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer*, 2, 43-55.
- Kolenda, T., Przybyla, W., Teresiak, A., Mackiewicz, A. & Lamperska, K. M. 2014. The mystery of let-7d - a small RNA with great power. *Contemp Oncol (Pozn)*, 18, 293-301.
- Kumar, M. S., Erkeland, S. J., Pester, R. E., Chen, C. Y., Ebert, M. S., Sharp, P. A. & Jacks, T. 2008. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 3903-8.



- Kunzmann, A. T., Coleman, H. G., Huang, W. Y., Kitahara, C. M., Cantwell, M. M. & Berndt, S. I. 2015. Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer and incident and recurrent adenoma in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Am J Clin Nutr*, 102, 881-90.
- Lagerstedt-Robinson, K., Rohlin, A., Aravidis, C., Melin, B., Nordling, M., Stenmark-Askmal, M., Lindblom, A. & Nilbert, M. 2016. Mismatch repair gene mutation spectrum in the Swedish Lynch syndrome population. *Oncol Rep*, 36, 2823-2835.
- Lagerstedt Robinson, K., Liu, T., Vandrovcova, J., Halvarsson, B., Clendenning, M., Frebourg, T., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Peltomaki, P., Kolodner, R. D., Nilbert, M. & Lindblom, A. 2007. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst*, 99, 291-9.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N. D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foa, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Muller, R. U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D. B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H. I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C. E., Nagle, J. W., Ju, J., Papavasiliou, F. N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M. J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J. J., Sander, C., Zavolan, M. & Tuschl, T. 2007. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 129, 1401-14.
- Landthaler, M., Yalcin, A. & Tuschl, T. 2004. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*, 14, 2162-7.
- Lane, D. P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-6.
- Lee, H., Han, S., Kwon, C. S. & Lee, D. 2016. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein Cell*, 7, 100-13.
- Leslie, A., Carey, F. A., Pratt, N. R. & Steele, R. J. 2002. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*, 89, 845-60.
- Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, 15-20.

- Liang, D., Meyer, L., Chang, D. W., Lin, J., Pu, X., Ye, Y., Gu, J., Wu, X. & Lu, K. 2010a. Genetic variants in MicroRNA biosynthesis pathways and binding sites modify ovarian cancer risk, survival, and treatment response. *Cancer Research*, 70, 9765-76.
- Liang, D., Meyer, L., Chang, D. W., Lin, J., Pu, X., Ye, Y. Q., Gu, J. A., Wu, X. F. & Lu, K. 2010b. Genetic Variants in MicroRNA Biosynthesis Pathways and Binding Sites Modify Ovarian Cancer Risk, Survival, and Treatment Response. *Cancer Research*, 70, 9765-9776.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J. & Parker, R. 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, 7, 719-23.
- Liu, P., Wang, Y. & Li, X. 2019. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*, 9, 871-879.
- Lu, P., Gu, Y., Li, L., Wang, F. & Qiu, X. 2016. miR-544a Promotes Breast Cancer Cell Migration and Invasion Reducing Cadherin 1 Expression. *Oncology Research*, 23, 165-70.
- Lugli, A., Karamitopoulou, E. & Zlobec, I. 2012. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 106, 1713-7.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303, 95-8.
- Luo, X., Burwinkel, B., Tao, S. & Brenner, H. 2011. MicroRNA signatures: novel biomarker for colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20, 1272-86.
- Lynch, H. T., Shaw, M. W., Magnuson, C. W., Larsen, A. L. & Krush, A. J. 1966. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med*, 117, 206-12.
- Lynch, J. P. & Hoops, T. C. 2002. The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 16, 775-810.
- Ma, D., Tao, X., Gao, F., Fan, C. & Wu, D. 2012a. miR-224 functions as an onco-miRNA in hepatocellular carcinoma cells by activating AKT signaling. *Oncol Lett*, 4, 483-488.
- Ma, R. M., Zhang, G. J., Wang, H. M., Lv, H., Fang, F. & Kang, X. X. 2012b. Downregulation of miR-544 in tissue, but not in serum, is a novel biomarker of malignant transformation in glioma. *Oncology Letters*, 4, 1321-1324.
- Magri, F., Vanoli, F. & Corti, S. 2018. miRNA in spinal muscular atrophy pathogenesis and therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22, 755-767.

- Malumbres, M. & Barbacid, M. 2003. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*, 3, 459-65.
- Mao, L., Zhang, Y., Deng, X., Mo, W., Yu, Y. & Lu, H. 2015. Transcription factor KLF4 regulates microRNA-544 that targets YWHAZ in cervical cancer. *Am J Cancer Res*, 5, 1939-53.
- Markopoulos, G. S., Roupakia, E., Tokamani, M., Chavdoula, E., Hatziapostolou, M., Polytarchou, C., Marcu, K. B., Papavassiliou, A. G., Sandaltzopoulos, R. & Kolettas, E. 2017. A step-by-step microRNA guide to cancer development and metastasis. *Cell Oncol (Dordr)*, 40, 303-339.
- Marshall, J. R. 2009. Nutrition and colon cancer prevention. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 12, 539-43.
- Marte, B. M., Rodriguez-Viciano, P., Wennstrom, S., Warne, P. H. & Downward, J. 1997. R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways. *Curr Biol*, 7, 63-70.
- Meling, G. I., Lothe, R. A., Borresen, A. L., Graue, C., Hauge, S., Clausen, O. P. & Rognum, T. O. 1993. The TP53 tumour suppressor gene in colorectal carcinomas. I. Genetic alterations on chromosome 17. *Br J Cancer*, 67, 88-92.
- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Smith, H., Ueno, Y. & Patel, T. 2007. The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 8256-64.
- Michael, M. Z., Sm, O. C., Van Holst Pellekaan, N. G., Young, G. P. & James, R. J. 2003. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, 1, 882-91.
- Mita, H., Toyota, M., Aoki, F., Akashi, H., Maruyama, R., Sasaki, Y., Suzuki, H., Idogawa, M., Kashima, L., Yanagihara, K., Fujita, M., Hosokawa, M., Kusano, M., Sabau, S. V., Tatsumi, H., Imai, K., Shinomura, Y. & Tokino, T. 2009. A novel method, digital genome scanning detects KRAS gene amplification in gastric cancers: involvement of overexpressed wild-type KRAS in downstream signaling and cancer cell growth. *Bmc Cancer*, 9.
- Mo, X., Zhang, F., Liang, H., Liu, M., Li, H. & Xia, H. 2014a. miR-544a promotes the invasion of lung cancer cells by targeting cadherina 1 in vitro. *Onco Targets Ther*, 7, 895-900.

- Mo, X. M., Li, H. H., Liu, M. & Li, Y. T. 2014b. Downregulation of GSK3beta by miR-544a to maintain self-renewal ability of lung cancer stem cells. *Oncol Lett*, 8, 1731-1734.
- Muleris, M., Salmon, R. J., Zafrani, B., Girodet, J. & Dutrillaux, B. 1985. Consistent deficiencies of chromosome 18 and of the short arm of chromosome 17 in eleven cases of human large bowel cancer: a possible recessive determinism. *Ann Genet*, 28, 206-13.
- Muller, D. W. & Bosserhoff, A. K. 2008. Integrin beta 3 expression is regulated by let-7a miRNA in malignant melanoma. *Oncogene*, 27, 6698-706.
- Muller, M. F., Ibrahim, A. E. & Arends, M. J. 2016. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*, 469, 125-34.
- Nieuwenhuis, M. H. & Vasen, H. F. 2007. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol*, 61, 153-61.
- Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S. & Hedge, P. 1991. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 253, 665-9.
- Oda, S., Zhao, Y. & Maehara, Y. 2005. Microsatellite instability in gastrointestinal tract cancers: a brief update. *Surg Today*, 35, 1005-15.
- 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.
- Ozer, S. P., Barut, S. G., Ozer, B., Catal, O. & Sit, M. 2019. The relationship between tumor budding and survival in colorectal carcinomas. *Rev Assoc Med Bras (1992)*, 65, 1442-1447.
- Pan, C., Xiang, L., Pan, Z., Wang, X., Li, J., Zhuge, L., Fang, P., Xie, Q. & Hu, X. 2018. MiR-544 promotes immune escape through downregulation of NCR1/NKp46 via targeting RUNX3 in liver cancer. *Cancer Cell Int*, 18, 52.
- Park, J. E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D. K., Chang, H., Jee, D., Patel, D. J. & Kim, V. N. 2011. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*, 475, 201-5.
- Peeters, M., Price, T. J., Cervantes, A., Sobrero, A. F., Ducreux, M., Hotko, Y., Andre, 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, 4706-13.
- Peng, J., Valeshabad, A. K., Li, Q. F. & Wang, Y. 2013. Differential expression of RBM5 and KRAS in pancreatic ductal adenocarcinoma and their association with clinicopathological features. *Oncology Letters*, 5, 1000-1004.
- Perucho, M. 1999. Correspondence re: C.R. Boland i sur., 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, 1998. *Cancer Res*, 59, 249-56.
- Perucho, M. 2003. Tumors with microsatellite instability: many mutations, targets and paradoxes. *Oncogene*, 22, 2223-5.
- Piton, N., Borrini, F., Bolognese, A., Lamy, A. & Sabourin, J. C. 2015. KRAS and BRAF Mutation Detection: Is Immunohistochemistry a Possible Alternative to Molecular Biology in Colorectal Cancer? *Gastroenterol Res Pract*, 2015, 753903.
- Potter, J. D. 1995. Risk factors for colon neoplasia--epidemiology and biology. *Eur J Cancer*, 31A, 1033-8.
- Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U. R. & Albert, S. 2007. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1177-95.
- Rashid, A., Zahurak, M., Goodman, S. N. & Hamilton, S. R. 1999. Genetic epidemiology of mutated K-ras proto-oncogene, altered suppressor genes, and microsatellite instability in colorectal adenomas. *Gut*, 44, 826-33.
- Razin, A. & Cedar, H. 1994. DNA methylation and genomic imprinting. *Cell*, 77, 473-6.
- Redova, M., Svoboda, M. & Slaby, O. 2011. MicroRNAs and their target gene networks in renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 405, 153-6.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R. & Ruvkun, G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403, 901-6.
- Ried, T., Knutzen, R., Steinbeck, R., Blegen, H., Schrock, E., Heselmeyer, K., Du Manoir, S. & Auer, G. 1996. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of

- chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 15, 234-45.
- Riggins, G. J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Thiagalingam, S. 1997. Frequency of Smad gene mutations in human cancers. *Cancer Res*, 57, 2578-80.
- Riggins, G. J., Thiagalingam, S., Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Kern, S. E., Hamilton, S. R., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1996. Mad-related genes in the human. *Nat Genet*, 13, 347-9.
- Rodriguez-Viciano, P., Oses-Prieto, J., Burlingame, A., Fried, M. & McCormick, F. 2006. A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity. *Mol Cell*, 22, 217-30.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D. & Downward, J. 1996. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J*, 15, 2442-51.
- Roush, S. & Slack, F. J. 2008. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol*, 18, 505-16.
- Sampson, V. B., Rong, N. H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N. J., Dunn, S. P. & Krueger, L. J. 2007. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Research*, 67, 9762-70.
- Schubert, S., Shannon, K. & Bollag, G. 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*, 7, 295-308.
- Scott, N., Bell, S. M., Sagar, P., Blair, G. E., Dixon, M. F. & Quirke, P. 1993. p53 expression and K-ras mutation in colorectal adenomas. *Gut*, 34, 621-4.
- Shimizu, S., Takehara, T., Hikita, H., Kodama, T., Miyagi, T., Hosui, A., Tatsumi, T., Ishida, H., Noda, T., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M. & Hayashi, N. 2010. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 52, 698-704.
- Sieber, O. M., Tomlinson, I. P. & Lamlum, H. 2000. The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor--genetics, function and disease. *Mol Med Today*, 6, 462-9.
- Siegel, R. L., Torre, L. A., Soerjomataram, I., Hayes, R. B., Bray, F., Weber, T. K. & Jemal, A. 2019. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence in young adults. *Gut*, 68, 2179-2185.

- Smith, G., Carey, F. A., Beattie, J., Wilkie, M. J. V., Lightfoot, T. J., Coxhead, J., Garner, R. C., Steele, R. J. C. & Wolf, C. R. 2002. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53 - alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 9433-9438.
- Smits, K. M., Paranjape, T., Nallur, S., Wouters, K. A., Weijenberg, M. P., Schouten, L. J., Van Den Brandt, P. A., Bosman, F. T., Weidhaas, J. B. & Van Engeland, M. 2011a. A let-7 microRNA SNP in the KRAS 3'UTR is prognostic in early-stage colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 17, 7723-31.
- Smits, K. M., Paranjape, T., Nallur, S., Wouters, K. a. D., Weijenberg, M. P., Schouten, L. J., Van Den Brandt, P. A., Bosman, F. T., Weidhaas, J. B. & Van Engeland, M. 2011b. A Let-7 MicroRNA SNP in the KRAS 3 ' UTR Is Prognostic in Early-Stage Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*, 17, 7723-7731.
- Song, B., Wang, Y., Xi, Y., Kudo, K., Bruheim, S., Botchkina, G. I., Gavin, E., Wan, Y., Formentini, A., Kornmann, M., Fodstad, O. & Ju, J. 2009. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene*, 28, 4065-4074.
- Soreide, K., Janssen, E. A., Soiland, H., Korner, H. & Baak, J. P. 2006. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg*, 93, 395-406.
- Spaventi, R., Pecur, L., Pavelic, K., Pavelic, Z. P., Spaventi, S. & Stambrook, P. J. 1994. Human tumour bank in Croatia: a possible model for a small bank as part of the future European tumour bank network. *Eur J Cancer*, 30A, 419.
- 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.
- Sur, I., Tuupanen, S., Whittington, T., Aaltonen, L. A. & Taipale, J. 2013. Lessons from functional analysis of genome-wide association studies. *Cancer Res*, 73, 4180-4.
- Takahashi, K., Mitsui, K. & Yamanaka, S. 2003. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 423, 541-5.
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T. & Takahashi, T. 2004. Reduced

- expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*, 64, 3753-6.
- Tan, C. & Du, X. 2012. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 18, 5171-80.
- Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E. & Karin, M. 2010. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138, 2101-2114 e5.
- Thiagalasingam, S., Lengauer, C., Leach, F. S., Schutte, M., Hahn, S. A., Overhauser, J., Willson, J. K., Markowitz, S., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1996. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet*, 13, 343-6.
- Tiwari, A. K., Roy, H. K. & Lynch, H. T. 2016. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. *QJM*, 109, 151-8.
- Van Cutsem, E., Kohne, C. H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C. R., Makhson, A., D'haens, G., Pinter, 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., Kohne, C. H., Lang, 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, 2011-9.
- Van Wyk, H. C., Roseweir, A., Alexander, P., Park, J. H., Horgan, P. G., Mcmillan, D. C. & Edwards, J. 2019. The Relationship Between Tumor Budding, Tumor Microenvironment, and Survival in Patients with Primary Operable Colorectal Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 26, 4397-4404.
- Vimalraj, S., Miranda, P. J., Ramyakrishna, B. & Selvamurugan, N. 2013. Regulation of breast cancer and bone metastasis by microRNAs. *Disease Markers*, 35, 369-87.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M. M. & Bos, J. L. 1988. Genetic Alterations



- during Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine*, 319, 525-532.
- Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408, 307-10.
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C. & Croce, C. M. 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2257-61.
- Wagner, P. L., Perner, S., Rickman, D. S., Lafargue, C. J., Kitabayashi, N., Johnstone, S. F., Weir, B. A., Meyerson, M., Altorki, N. K. & Rubin, M. A. 2009. In Situ Evidence of KRAS Amplification and Association With Increased p21 Levels in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 132, 500-505.
- Wan, X. B., Wang, A. Q., Cao, J., Dong, Z. C., Li, N., Yang, S., Sun, M. M., Li, Z. & Luo, S. X. 2019. Relationships among KRAS mutation status, expression of RAS pathway signaling molecules, and clinicopathological features and prognosis of patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 25, 808-823.
- Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Hohler, T., Galle, P. R. & Buchler, M. W. 2005. Colorectal cancer. *Lancet*, 365, 153-65.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L. & Der, C. J. 2005. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*, 118, 843-6.
- Wheeler, J. M., Bodmer, W. F. & Mortensen, N. J. 2000. DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. *Gut*, 47, 148-53.
- Wheeler, J. M., Kim, H. C., Efstathiou, J. A., Ilyas, M., Mortensen, N. J. & Bodmer, W. F. 2001. Hypermethylation of the promoter region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. *Gut*, 48, 367-71.
- 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.
- Winawer, S. J., Zauber, A. G., Ho, M. N., O'Brien, M. J., Gottlieb, L. S., Sternberg, S. S., Wayne, J. D., Schapiro, M., Bond, J. H., Panish, J. F. & I sur. 1993. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*, 329, 1977-81.

- Wittinghofer, A. & Nassar, N. 1996. How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem Sci*, 21, 488-91.
- Woerner, S. M., Benner, A., Sutter, C., Schiller, M., Yuan, Y. P., Keller, G., Bork, P., Doeberitz, M. & Gebert, J. F. 2003. Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes. *Oncogene*, 22, 2226-35.
- Wu, G., Zheng, K., Xia, S., Wang, Y., Meng, X., Qin, X. & Cheng, Y. 2016. MicroRNA-655-3p functions as a tumor suppressor by regulating ADAM10 and beta-catenin pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35, 89.
- Yamamoto, H., Imai, K. & Perucho, M. 2002. Gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype pathway. *J Gastroenterol*, 37, 153-63.
- Yanaka, Y., Muramatsu, T., Uetake, H., Kozaki, K. & Inazawa, J. 2015. miR-544a induces epithelial-mesenchymal transition through the activation of WNT signaling pathway in gastric cancer. *Carcinogenesis*, 36, 1363-71.
- Yao, G. D., Zhang, Y. F., Chen, P. & Ren, X. B. 2018. MicroRNA-544 promotes colorectal cancer progression by targeting forkhead box O1. *Oncol Lett*, 15, 991-997.
- Yari, A., Samoudi, A., Afzali, A., Karam, Z. M., Karimaldini, N. K., Abadi, M. F. S., Ziasistani, M., Zangouey, M. R. & Dabiri, S. 2020. Mutation Status and Prognostic Value of KRAS and BRAF in Southeast Iranian Colorectal Cancer Patients: First Report from Southeast of Iran. *J Gastrointest Cancer*.
- Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C., Huang, Y., Hu, X., Su, F., Lieberman, J. & Song, E. 2007. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, 131, 1109-23.
- Zeitouni, D., Pylayeva-Gupta, Y., Der, C. J. & Bryant, K. L. 2016. KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment. *Cancers*, 8.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. & Anderson, T. A. 2007a. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 302, 1-12.
- Zhang, H. H., Wang, X. J., Li, G. X., Yang, E. & Yang, N. M. 2007b. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*, 13, 2883-8.
- Zhang, S. Y. & Shi, J. 2016. rs61764370 polymorphism of Kras and risk of cancer in Caucasian population: A meta-analysis. *J Cancer Res Ther*, 12, 699-704.

- Zhi, Q., Guo, X., Guo, L., Zhang, R., Jiang, J., Ji, J., Zhang, J., Chen, X., Cai, Q., Li, J., Liu, B., Zhu, Z. & Yu, Y. 2013. Oncogenic miR-544 is an important molecular target in gastric cancer. *Anticancer Agents Med Chem*, 13, 270-5.
- Zlobec, I., Molinari, F., Martin, V., Mazzucchelli, L., Saletti, P., Trezzi, R., De Dosso, S., Vljajnic, T., Frattini, M. & Lugli, A. 2010. Tumor budding predicts response to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*, 16, 4823-31.

## 8. POPIS SLIKA, TABLICA I KRATICA

### Slike

|  |    |
|--|----|
| Slika 1. Stupnjevit razvoj karcinoma debelog crijeva.....  | 8  |
| Slika 2. Aktivacija molekule KRAS .....  | 15 |
| Slika 3. Sinteza molekule mikro RNA.....   | 17 |
| Slika 4. Shema SNP polimorfizma rs10771184 A/T u veznom mjestu za mikro RNA .....  | 23 |
| Slika 5. Grafikon za određivanje alela.....  | 29 |
| Slika 6. Provjera kvalitete izolirane RNA .....  | 30 |
| Slika 7. Analiza mutacije gena KRAS u kodonu 12 metodom PCR-RFLP .....   | 36 |
| Slika 8. Prikaz membranskog i citoplazmatskog smještaja proteina KRAS metodom imunohistokemije.....  | 39 |
| Slika 9. Prikaz analize proteina KRAS metodom imunohistokemije u podgrupama tumora...  | 40 |
| Slika 10. Analiza ekspresije proteina KRAS obzirom na prisustvo mutacije gena KRAS .....   | 41 |
| Slika 11. Razina ekspresije mRNA molekule gena KRAS .....  | 43 |
| Slika 12. Razina ekspresije mRNA molekule KRAS u korelaciji s veličinom tumora, histološkim gradusom i stadijem po Dukes`u.....  | 44 |
| Slika 13. Analiza ekspresije mikro RNA let-7a .....  | 45 |
| Slika 14. Analiza ekspresije mikro RNA miR-544 .....   | 45 |
| Slika 15. Analiza ekspresije KRAS mRNA u uzorcima sporadičnog tumora debelog crijeva, u središnjem dijelu tumora (T1) i invazivnoj fronti tumora (T2) u odnosu na ekspresiju proteina KRAS.....    | 46 |
| Slika 16. Analiza ekspresije let-7a miRNA u uzorcima sporadičnog tumora debelog crijeva, u središnjem dijelu tumora (T1) i invazivnoj fronti tumora (T2) u odnosu na ekspresiju proteina KRAS..... | 47 |
| Slika 17. Analiza ekspresije miR-544 u uzorcima sporadičnog tumora debelog crijeva, u središnjem dijelu tumora (T1) i invazivnoj fronti tumora (T2) u odnosu na ekspresiju proteina KRAS.....      | 48 |
| Slika 18. Analiza SNP polimorfizma u veznom mjestu za miRNA let-7a unutar 3'UTR gena KRAS metodom PCR- RFLP .....  | 49 |

## Tablice

|   |    |
|---|----|
| Tablica 1. <i>Klasifikacija karcinoma debelog crijeva prema Dukes'-u</i> .....  | 6  |
| Tablica 2. <i>TNM klasifikacija tumora debelog crijeva</i> .....  | 6  |
| Tablica 3. <i>miRNA s ulogom u razvoju raka (prema (Zhang i sur., 2007))</i> .....  | 18 |
| Tablica 4. <i>Kliničko-patološke karakteristike oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva s obzirom na prisustvo mutacije gena KRAS u kodonu 12 ili 13</i> .....                   | 38 |
| Tablica 5. <i>Kliničko-patološke karakteristike 50 oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva bez mutacije gena KRAS s obzirom na ekspresiju proteina KRAS</i> .....                | 42 |
| Tablica 6. <i>Sporadični tumori debelog crijeva bez mutacije u genu KRAS stratificirani s obzirom na ekspresiju proteina KRAS i polimorfizme gena KRAS u veznim mjestima za miRNA</i> ..... | 50 |

## Popis kratica

ACTB –  $\beta$ -aktin

DCC – engl. *Deleted In Colorectal Cancer*

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

FAP – obiteljska adenomatozna polipoza (engl. *Familial Adenomatous Polyposis*)

HNPCC – nasljedni nepolipozni rak debelog crijeva (engl. *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*)

KRAS – Kirsten-RAS

MAPK – mitogenom aktivirana proteinska kinaza (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

miRNA – mikro RNA (engl. *microRNA*)

MMR – popravak krivo sparenih baza (engl. *MisMatch Repair*)

mRNA – glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

MSI – mikrosatelitna nestabilnost (engl. *MicroSatellite Instability*)

OR – omjer izgleda (engl. *Odds Ratio*)

pb – parovi baza

PBS – fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffered Saline*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (od engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PCR-RFLP – lančana reakcija polimerazom - polimorfizam duljine restrikcijskih odsječaka (engl. *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*)

qPCR – kvantitativni PCR u stvarnom vremenu

RISC RNA – inducirani kompleks za utišavanje ekspresije (engl. *RNA-Induced Silencing Complex*)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *RiboNucleic acid*)

SNP – polimorfizam jedne baze (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*)

TRIS – tris (hidroksimetil) aminometan

## ŽIVOTOPIS

Mirko Poljak rođen je 26. travnja 1969. godine u Bednji gdje završava osnovnu školu. Srednju školu Završio je u Varaždinu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 1989. godine. Diplomski rad izradio je na Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom mentorice Danice Dadić, dr.med. Diplomirao je u siječnju 1995. godine. Od ožujka 1995. godine radi u Općoj bolnici Varaždin gdje završava pripravnički staž, te Specijalizaciju iz opće kirurgije. Od prosinca 2007. godine radi na Klinici za Kirurgiju Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu gdje završava užu specijalizaciju iz abdominalne kirurgije. Poslijediplomski doktorski studij biologije na Prirodoslovno- matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2012. godine.

Koautor je dva znanstvena rada objavljena u časopisima s međunarodnom recenzijom. Sudjelovao je na nekoliko međunarodnih znanstvenih skupova s usmenim i posterskim izlaganjima.