

UNIVERZITA KARLOVA

Lékařská fakulta v Plzni

Studijní program: Anatomie, histologie a embryologie



Autoreferát disertační práce

**Studium chromozomálního poškození a zkracování délky telomer
u pacientů s nádorovým onemocněním a u zdravých osob**

**Chromosomal damage and shortening of telomeres
in cancer patients and healthy subjects**

Mgr. Michal Kroupa

Plzeň, 2019

Abstract

Impaired chromosome segregation during mitosis, inaccurate DNA damage response and excessive telomere shortening may all modulate the frequency of chromosomal aberrations (CAs) in peripheral blood lymphocytes (PBL). There is evidence that increased frequency of structural CAs in PBL may be considered as a marker of enhanced cancer risk. In the present Thesis, an effect of variants in genes involved in mitotic checkpoint and DNA damage response on the inter-individual differences in CAs frequency in PBL was investigated. Considering the importance of disrupted telomere structure and its function in cancer biology, a link between telomere length and clinicopathological and molecular features of cancer patients was analysed. Furthermore, the relevance of telomere length and CAs frequency as markers of patients' survival was examined.

The major outcomes of the Thesis, fully reported in detail in seven attached Manuscripts, are: I) Increased frequency of structural CAs and/or disrupted telomere length in PBL may be considered as risk factors for the different types of solid cancer; II) Telomere shortening in PBL of healthy subjects increased the frequency of structural CAs; III) Binary interactions of gene variants in mitotic checkpoint and DNA repair pathways may modulate the frequency of structural CAs in PBL of healthy subjects; IV) The application of genome-wide association study revealed novel loci associated with genes important for mitosis and linked to the frequency of CAs in PBL; V) Telomere shortening in PBL of breast and colorectal cancer (CRC) patients was associated with decreased capacity to repair mutagen-induced DNA double-strand breaks; VI) Telomere length in tumor tissue was modulated by clinicopathological features (e.g. tumor-site origin, stage of tumor development, microsatellite instability) of CRC patients and finally, it was demonstrated that VII) CRC patients with more pronounced telomere shortening in tumor tissue compared to the adjacent mucosa evinced prolonged survival.

The results may be utilized in the future, when inter-individual differences in terms of identified gene variants and disrupted telomere length maintenance may provide a prediction tool for cancer risk assessment. Furthermore, as telomerase inhibitors are currently being applied in clinical practice, it is important to understand tumor telomere length variability and its link to clinicopathological and molecular features of cancer patients.

Abstrakt

Mezi základní procesy, které mohou ovlivnit míru chromozomálních aberací (CAs) v lymfocytech periferní krve (PBL), patří chybná segregace chromozomů v průběhu mitózy, nepřesná odpověď na poškození DNA a nadměrné zkracování délky telomer. Akumulaci CAs v PBL lze považovat za ukazatel zvýšeného rizika rozvoje maligního onemocnění. Tato disertační práce je zaměřena na studium vlivu jednonukleotidových polymorfismů v genech účastnících se mitotického checkpointu a odpovědi na poškození DNA na inter-individuální rozdíly ve výskytu CAs v PBL. Dále byl zjišťován možný vliv klinicko-patologických a molekulárních charakteristik pacientů s karcinomem tlustého střeva a konečníku (CRC) na délku telomer v nádorové tkáni, jelikož narušená funkce těchto protektivních struktur chromozomů hraje klíčovou úlohu v procesu maligní transformace. Bylo také studováno, zda lze délku telomer a frekvenci CAs považovat za ukazatel celkového přežití pacientů s nádorovým onemocněním.

Hlavní poznatky této práce, založené na sedmi příložených rukopisech, jsou: I) Zvýšený výskyt strukturních CAs a/nebo narušená regulace délky telomer v PBL mohou být považovány za rizikový faktor rozvoje nádorového onemocnění; II) Kratší délka telomer v PBL zdravých osob zvyšuje výskyt strukturních CAs; III) Binární interakce genových variant účastnících se mitotického checkpointu a opravy poškození DNA mohou ovlivňovat míru výskytu strukturních CAs v PBL zdravých osob; IV) Pomocí využití celogenomové asociační studie byly odhaleny nové genové varianty spojené s vyšší mírou CAs v PBL; V) Zkracování telomer v PBL u pacientů s karcinomem prsu a CRC bylo spojeno se sníženou kapacitou opravy dvouvláknových zlomů DNA; VI) Délka telomer v nádorové tkáni byla ovlivněna klinicko-patologickými charakteristikami pacientů s CRC (např. oblast výskytu nádoru, mikrosatelitová nestabilita a stádium rozvoje zhoubného novotvaru); VII) Kratší délka telomer v nádorové tkáni v porovnání s přilehlou mukózou u pacientů s CRC byla spojena s lepším celkovým přežitím.

Výše popsané poznatky mohou být uplatněny zejména v budoucnu, kdy informace o rizikových genových variantách a narušené regulaci délky telomer mohou být využity jako nástroj pro predikci zvýšené pravděpodobnosti rozvoje rakoviny. Vzhledem k tomu, že inhibitory telomerázy se začínají používat v klinické praxi, je také velice důležité porozumět mechanismům regulace délky telomer v nádorové tkáni.

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod | 6 |
| 2. Cíle | 8 |
| 3. Materiál a metody | 9 |
| 3.1. Studované populace | 9 |
| 3.2. Cytogenetická analýza | 9 |
| 3.3. Měření citlivosti k působení mutagenu | 10 |
| 3.4. Měření délky telomer | 10 |
| 3.5. Měření mikrosatelitové nestability | 11 |
| 3.6. Genotypizace | 11 |
| 4. Výsledky a diskuze | 12 |
| Publikace I | 12 |
| Publikace II | 12 |
| Publikace III | 14 |
| Publikace IV | 15 |
| Publikace V | 15 |
| Publikace VI | 17 |
| Publikace VII | 19 |
| 5. Závěr | 20 |
| 6. Seznam použité literatury | 22 |
| Životopis | 25 |
| Seznam publikací | 26 |

1. Úvod

Nespecifické strukturní chromozomální poškození (chromosomal aberrations, CAs) lze detekovat pomocí cytogenetických metod v malém procentu lymfocytů periferní krve (peripheral blood lymphocytes, PBL) u zdravých osob. Tento typ CAs je slučitelný s viabilitou buněk a na základě četných studií bylo prokázáno, že vyšší frekvence CAs v PBL souvisí se zvýšeným rizikem vzniku maligního onemocnění. Mezi jedinci panuje značná inter-individuální variabilita ve frekvenci CAs a ačkoli jsou v současné době známy mechanismy, které vedou ke vzniku CAs, nejsou zcela objasněny genetické faktory, které přispívají k jejich vyšší frekvenci.

Mezi základní procesy vedoucí ke vzniku CAs patří narušení segregace chromozomů v průběhu mitotického dělení, chybná oprava poškození DNA a narušení fyziologické délky telomer.

Segregace chromozomů a přechod mezi metafází a anafází buněčného cyklu je regulován pomocí mitotického checkpointu, který v případě chybného připojení mikrotubulů ke kinetochorům aktivuje kaskádu inhibičních komplexů s cílem zabránit proteinu APC degradovat protein PTTG1 (Securin). V případě správného napojení dělicího vřeténka je APC aktivován, Securin je degradován v proteazomu, aktivní ESPL1 (Separase) štěpí Cohesin a chromozomy se mohou rozejít do nově vznikajících dceřiných buněk. Jednonukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphisms, SNPs) v genech zahrnutých v mitotickém checkpointu mohou ovlivnit segregaci chromozomů a nositelé těchto genových variant mohou vykazovat zvýšenou frekvenci nespecifických strukturních CAs v PBL. Tato problematika byla předmětem *Publikace I*.

Odpověď na poškození DNA (DNA damage response, DDR) zahrnuje komplexní síť opravných drah, které jsou specificky spouštěny na základě typu poškození DNA. Jednořetězcové zlomy DNA (Single-strand breaks, SSBs) jsou výsledkem chybné opravy poškození indukovaného nejčastěji volnými kyslíkovými radikály, alkylačními látkami, ultrafialovým zářením nebo působením xenobiotik. Naopak dvouřetězcové zlomy DNA (Double-strand breaks, DSBs), které pro buňku představují letální riziko, jsou výsledkem působení ionizujícího záření nebo chyb v průběhu replikace. V závislosti na fázi buněčného cyklu mohou DSBs i SSBs indukovat vznik strukturních aberací

chromatidového typu (Chromatid-type aberrations, CTAs), které postihují jednu chromatidu v rámci celého chromozomu, nebo aberací chromozomového typu (Chromosome-type aberrations, CSAs), které postihují obě dvě chromatidy. Výše popsané příklady poukazují na zásadní význam opravy poškození DNA pro zachování integrity genomu. Předmětem *Publikace II a V* bylo studium SNPs v opravných drahách nebo kapacity opravy DNA (DNA repair capacity, DRC) ve vztahu k CAs.

Telomery reprezentují protektivní nukleoproteinové struktury na koncích lineárních eukaryotických chromozomů. Ačkoli je délka telomer u novorozenců v různých tkáních podobná, v průběhu života jedince dochází v jednotlivých orgánech k postupnému zkracování telomer odlišnou rychlostí. Pokud délka telomer dosáhne kritické hodnoty, jsou nechráněné struktury konců chromozomů rozpoznány jako DSBs. Pomocí opravných mechanismů poškození DNA následně dojde k chybnému spojení chromozomů, které může v průběhu mitotického dělení vyústit v četné strukturní chromozomální přestavby. Narušení fyziologické délky telomer představuje jeden ze základních znaků vzniku maligní transformace. Studie zabývající se vztahem mezi frekvencí CAs a narušením fyziologické délky telomer nejsou v současné době četné. Také není zcela objasněno, jaké faktory přispívají k narušení délky telomer u pacientů s nádorovým onemocněním a jakou úlohu hraje délka telomer v nádorové tkáni v prognóze pacientů. Tato problematika byla předmětem *Publikace V a VI*.

2. Cíle

V rámci této disertační práce byly řešeny následující otázky:

- Mají funkční SNPs v genech důležitých pro mitotický checkpoint a opravu poškození DNA vliv na frekvenci CAs v PBL zdravých osob?
- Umožní použití celogenomové asociační studie (GWAS) popis nových SNPs, které mají vztah k frekvenci CAs v PBL?
- Je zvýšená frekvence nespecifických strukturních CAs v PBL zdravých osob a pacientů s nádorovým onemocněním asociována s narušením fyziologické délky telomer?
- Ovlivňuje frekvence nespecifických strukturních CAs a/nebo narušení fyziologické délky telomer v PBL riziko vzniku maligního onemocnění nebo celkové přežívání pacientů s nádorovým onemocněním?
- Jsou pacienti s rakovinou prsu (breast cancer, BC) a kolorektálním karcinomem (colorectal cancer, CRC) citlivější k působení radiomimetické látky (bleomycinu) v PBL? Je délka telomer v PBL asociována s DSBs DRC?
- Je délka telomer v nádorové tkáni, přilehlé mukóze, metastatické tkáni a krvi asociována s klinicko-patologickými nebo molekulárními charakteristikami pacientů s CRC?
- Je délka telomer v nádorové tkáni asociována s celkovým přežitím pacientů s CRC?

3. Materiál a metody

3.1. Studované populace

Publikace I: 729 osob původem z České nebo Slovenské republiky. U všech jedinců byl odebrán vzorek periferní krve.

Publikace II: 2196 osob původem z České nebo Slovenské republiky s profesní expozicí genotoxickým látkám. U všech jedinců byl odebrán vzorek periferní krve.

Publikace III: Tři jednotlivé skupiny osob původem z České nebo Slovenské republiky byly zařazeny do této studie. Pět set sedmdesát šest jedinců bylo zařazeno do GWAS. Výsledky této analýzy byly replikovány na dvou souborech 482 a 1288 jedinců. První replikační soubor zahrnoval ze 46% nově diagnostikované pacienty s BC, CRC a s rakovinou plic (lung cancer, LC). Osoby s profesní expozicí genotoxickým látkám tvořily 57% souboru GWAS a 23% druhého replikačního setu. U všech jedinců byl odebrán vzorek periferní krve.

Publikace IV: U 337 nově diagnostikových a neléčených pacientů s nádorovým onemocněním (151 BC, 96 CRC, 90 LC) a 335 zdravých osob původem z České republiky byl odebrán vzorek periferní krve.

Publikace V: U 91 nově diagnostikovaných a neléčených pacientů s BC (n=47) nebo CRC (n=44) a 90 zdravých jedinců původem z České republiky byl odebrán vzorek periferní krve.

Publikace VI: Dvě odlišné skupiny pacientů s CRC byly zařazeny do této studie. Párové vzorky nádorové tkáně a přilehlé nenádorové mukózy byly dostupné u 661 pacientů. U 164 jedinců byl odebrán také vzorek periferní krve a u 12 osob vzorek metastatické jaterní tkáně a primárního tumoru. Druhá skupina pacientů byla tvořena 122 jedinci s CRC, od kterých byl odebrán vzorek metastatické jaterní tkáně a nenádorové jaterní tkáně.

Publikace VII: zahrnovala osoby studované v rámci *Publikací I, II, III a V*.

3.2. Cytogenetická analýza

Frekvence CAs v PBL v rámci *Publikace I-IV* byla stanovena pomocí cytogenetické analýzy [1]. Metoda je založena na detekci získaných nespecifických

strukturních CAs v PBL stimulovaných fytohemaglutininem a kultivovaných po dobu 48 hodin. Pro zastavení buněčného cyklu v metafázi byl použit kolchicin. Od každého jedince bylo cytogeneticky hodnoceno 100 metafází a byla zjišťována frekvence CAs.

3.3. Měření citlivosti k působení mutagenu

Pro posouzení inter-individuálních rozdílů v citlivosti PBL k působení mutagenní látky v rámci *Publikaci V* byla použita původní metodika [2]. Od každého jedince byly stimulovány dvě kultury s buňkami periferní krve pomocí antigenu, fytohemaglutininu. Následně byly PBL kultivovány po dobu 72 hodin v kompletním médiu. Jedna z buněčných kultur sloužila jako kontrolní pro stanovení základní hladiny CAs, přičemž druhá kultura byla v 67. hodině ovlivněna radiomimetickou látkou, bleomycinem. Počáteční frekvence bleomycinem-indukovaného poškození DNA byla zjištěna pomocí chemiluminiscenčního měření hladiny γ -H2AX, indikátoru DSBs. V 70. hodině byly buňky zastaveny v metafázi a následně byly vytvořeny cytogenetické preparáty. Od každého jedince bylo cytogeneticky hodnoceno 100 metafází a byla specificky detekována frekvence CTAs.

3.4. Měření délky telomer

Délka telomer v nádorové tkáni, přilehlé nenádorové mukóze, metastatické jaterní tkáni, nenádorové jaterní tkáni (*Publikace VI*) a v PBL (*Publikace V* a *VI*) byla měřena jako relativní délka telomer (RTL) pomocí metodiky Multiplex Monochrome real-time PCR (MMQPCR) [3, 4]. Pro detekci hladiny signálu ze dvou amplikonů (v našem případě telomer a albuminu) byla použita fluorescenční barva SYTO 9. Všechny reakce probíhaly triplicitně na 384-jamkové destičce MicroAmp Optical Reaction Plate. Fluorescenční signál byl detekován pomocí Viia 7 Real-time PCR (Applied Biosystems). DNA izolovaná od 30 zdravých jedinců rozdílného věku a pohlaví byla použita pro vytvoření kalibrační křivky, na jejímž základě byla vypočítána délka telomer jako druhá záporná mocnina rozdílu mezi změnou hodnot Ct (cycle threshold) vzorku a standardu.

3.5. Měření mikrosatelitové nestability

Pro stanovení mikrosatelitové nestability (Microsatellite instability, MSI) u pacientů s CRC v rámci *Publikace VI* byla použita metoda MMQPCR. Mikrosatelitové oblasti BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, NR-27 byly amplifikovány pomocí značených primerů. Produkt PCR byl analyzován pomocí kapilární elektroforézy (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer). Nádorová tkáň neshodující se v mikrosatelitových oblastech ve více lokusech při porovnání s nenádorovou mukózou byla označena jako MSI [5].

3.6. Genotypizace

Alelická diskriminace TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, California) byla použita pro detekci SNPs ve studovaných genech.

Genotypizace SNPs v rámci *Publikace I*: BUB1 rs1801376, BUB3 rs3808960, MAD2L1 rs903147, CENPF rs438034, ESPL1 rs6580941, NEK2 rs701928, PTTG1 rs1862392, ZWILCH rs3087660, ZWINT rs2241666. Všechny SNPs byly na základě *in silico* analýzy predikovány ve vazebném místě pro transkripční faktor.

Následující SNPs v genech zahrnutých při opravě poškození DNA byly genotypizovány v rámci *Publikace II*: XPD rs13181, XPG rs17655, XPC rs2228001, XPA rs1800975, XRCC1 rs1799782, rs25489, rs25487, OGG1 rs1052133, APE1 rs1130409, XRCC2 rs3218536, RAD54L rs1048771, XRCC3 rs861539, NBS1 rs1805794.

Následující SNPs v genech kódující podjednotky shelterinového komplexu a telomerázy byly genotypizovány v rámci *Publikace VI*: RTEL1 rs2297440, rs2738780, rs7261546, rs755017, FEN1 rs174538, POT1 rs7784168, rs10250202, TERF1 rs2306494, rs3863242, TRF2 rs251796, rs3785074, TERT rs10936599, rs2736118, rs2736098, rs2736100, rs2242652, rs2736108, rs7705526, rs10069690, rs2736109, rs2853691, rs2853677, rs2853676, rs33954691, rs3816659, rs4246742, TERC rs3772190, rs12696304.

4. Výsledky a diskuze

Publikace I: Publikace s názvem “*Genetic variation in the major mitotic checkpoint genes associated with chromosomal aberrations in healthy humans*” byla zaměřena na studium vztahu mezi frekvencí strukturních CAs v PBL 729 zdravých osob a SNPs v genech kódujících proteiny důležité v průběhu mitotického checkpointu a přechodu mezi metafází a anafází buněčného cyklu (geny *BUB1*, *BUB3*, *MAD2L1*, *ESPL1*, *PTTG1*, *CENPF*, *NEK2*, *ZWILCH*, a *ZWINT*). Jedinci s frekvencí CAs >2% byli zařazeni do rizikové skupiny a naopak ti, kteří měli nižší hladinu strukturních CAs v PBL, byli zahrnuti do kontrolní skupiny.

Výsledky naší analýzy prokázaly vliv homozygotní varianty AA v genu *ZWINT* (rs2241666) na zvýšenou frekvenci CSAs v PBL ($P=0.03$). Homozygotní varianta GG v genu *BUB1* (rs1801376) byla asociována s vyšší frekvencí CTAs v PBL ($P=0.03$). Při analýze binárních interakcí studovaných genových variant bylo odhaleno 21 statisticky významných asociací, které měly dopad na vyšší frekvenci CAs v PBL zdravých osob. Mezi nejčastěji zastoupené partnery binárních interakcí patřily varianty genů *PTTG1-ZWILCH* a *PTTG1-ZWINT*. Funkce *PTTG1* a *ZWILCH/ZWINT* je v průběhu mitotického checkpointu velmi rozdílná. Onkogen *PTTG1* je nezbytný pro inhibici Separasy a následné destrukci Cohesinu, který spojuje sesterské chromatidy a brání tak chybnému rozchodu chromozomů [6]. Naopak proteiny *ZWILCH/ZWINT* jsou důležité pro aktivaci mitotického checkpointu a fungují na úrovni kinetochoru [7]. V předchozí studii bylo prokázáno, že indukované bodové mutace v genu *PTTG1* vedou ke vzniku CAs [8]. SNPs v genu *PTTG1* byly popsány v asociaci se zvýšeným rizikem vzniku BC ve studii zahrnující 1492 zdravých jedinců a 698 pacientů [9], což prokazuje důležitost tohoto proteinu v průběhu maligní transformace.

Na základě našich výsledků byl prokázán vliv binárních interakcí genových variant kódujících proteiny s důležitou funkcí na úrovni kinetochoru (*ZWINT/ZWILCH*) a Cohesinu (*PTTG1*) na frekvenci CAs v PBL zdravých jedinců.

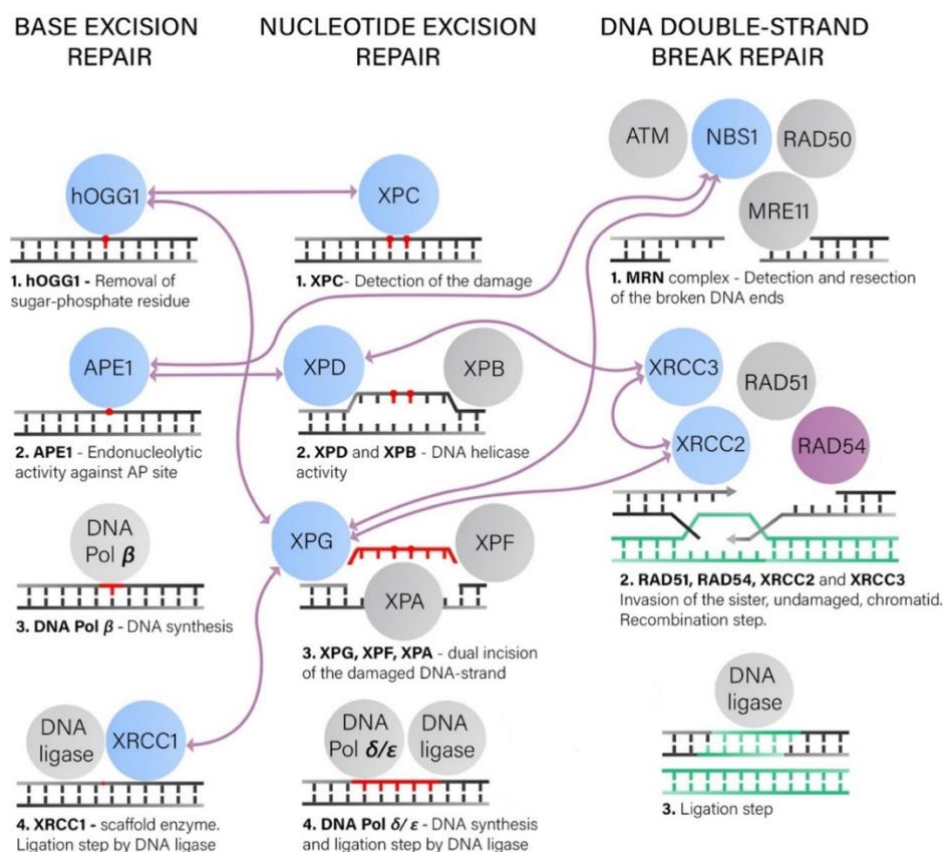
Publikace II: Cílem publikace s názvem “*Interactions of DNA repair gene variants modulate chromosomal aberrations in healthy subjects*” bylo objasnit vliv SNPs v klíčových genech kódujících proteiny zahrnuté v jednotlivých opravných drahách poškození DNA na frekvenci nespecifických strukturních CAs v PBL 2196 zdravých

jedinců. Genotypizace SNPs byla provedena v následujících genech: (*XRCC1*, *OGG1*, *APEX1*, *XPA*, *XPD*, *XPG*, *XPC*, *XRCC2*, *XRCC3*, *NBN*, *RAD54L*).

Na základě naší analýzy byla potvrzena protektivní úloha homozygotní varianty *XPD* Lys751Gln [10]. Byl také zjištěn statisticky významný vliv heterozygotní varianty *RAD54L* Ala730= na vyšší frekvenci CSAs (P=0.03). Synonymní SNPs mohou mít vliv na sestřih mRNA, stabilitu daného transkriptu, strukturu a funkci výsledného proteinu [11]. Úlohou RAD54 je stabilizovat rekombinázu RAD51 v průběhu opravy DSBs [12]. V předchozí studii bylo prokázáno, že delece RAD54 je asociována s indukcí CSAs [13].

Při studiu vlivu binárních interakcí genových variant na frekvenci CSAs bylo popsáno 14 statisticky významných interakcí. Je zajímavé, že většina z interakcí zahrnovala geny z různých opravných drah poškození DNA (shrnutí v Obr. I).

Na základě našich výsledků lze říci, že vliv jednotlivých SNPs na frekvenci CSAs byl pouze marginální, což je v souladu s *Publikací I* a také s výsledky studie prováděné v naší spolupracující laboratoři (German Cancer Research Center, Heidelberg), kde byl zkoumán vliv SNPs v genech kódujících enzymy metabolismu xenobiotik na frekvenci CSAs v PBL [14]. Zároveň lze usuzovat, že akumulace CSAs v PBL zdravých jedinců vyžaduje komplexní narušení na úrovni více opravných drah poškození DNA.



Obr. I: Statisticky významné interakce genových variant s relevancí k *Publikaci II*.

Publikace III: Cílem publikace “*Genetic variation associated with chromosomal aberration frequency: A genome-wide association study*” bylo identifikovat pomocí GWAS varianty genů, které souvisejí s vyšší frekvencí CAs v PBL. Tento projekt byl založen na výsledcích dosažených v *Publikaci I, II* a dalších studiích, které jsou shrnuty v *Publikaci VII*.

V *Publikaci III* byla potvrzena asociace mezi zvýšenou frekvencí CAs a expozicí genotoxickým látkám [14-16] a rizikem vzniku maligního onemocnění [17]. Na základě GWAS bylo identifikováno 11 lokusů, které byly replikovány v nezávislých souborech osob. Na základě výsledků validace byla prokázána asociace mezi SNPs rs1383997, rs2824215, rs983889 a vyšší frekvencí CAs v PBL. Funkce těchto SNPs byla charakterizována pomocí analýzy *in silico*. Rs1383997 SNP je lokalizován v oblasti kódující *Natural Antisense Transcript (NAT)* s komplementaritou k *Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily A Member 1 (TRPA1)*. *NAT* inhibuje *TRPA1* [18]. Narušená regulace *TRPA1* byla v předchozí studii popsána u nádorového onemocnění ledvin [19]. Deregulace kanálů *Transient Receptor Potential (TRP)* může souviset s narušením signalizace prostřednictvím hladiny intracelulárního vápníku a se vznikem nádorového onemocnění [20]. Rs2824215, druhý SNP asociovaný se statisticky významně vyšší frekvencí CAs v námi studovaných skupinách jedinců, je lokalizován v oblasti pro dlouhou nekódující RNA. Delece této oblasti genomu byla v předchozí studii popsána v souvislosti s chromozomálními přestavbami [21]. Rs983889 byl také asociován se statisticky významně vyšší frekvencí CAs (specificky CTAs) v námi studovaných skupinách jedinců. Tento SNP se nachází v intronové oblasti genu kódující protein *F-box and Leucine-Rich Repeat Protein 7 (FBXL7)*, který je zapojen v regulaci kinázy Aurora A [22]. *FBXL7* je tak zahrnut v regulaci mitózy, což může vysvětlit spojitost specificky s CTAs, které vznikají v průběhu S nebo G2 fáze buněčného cyklu [23].

Na základě použití GWAS byly identifikovány lokusy, které souvisejí s vyšší frekvencí CAs. V době odevzdání disertační práce byly k recenznímu řízení odeslány výsledky navazujícího projektu s názvem “*Disparity in genetic variants associated with chromosomal aberration frequency between exposed and unexposed cohorts. Niazi Y et al., Manuscript in preparation*”, ve kterém se podařilo pomocí GWAS popsat SNPs v genech zahrnutých při opravě poškození DNA ve vztahu k vyšší frekvenci CAs v PBL.

Publikace IV: V publikaci “*Chromosomal damage and telomere length in peripheral blood lymphocytes: cancer risk and patients’ long-term survival*” byla studována úloha CAs a délky telomer v PBL jako ukazatelů predikce nebo prognózy pacientů s BC, LC a CRC.

Zvýšená frekvence CAs byla asociována s vyšším rizikem vzniku BC a LC. Byly tak potvrzeny výsledky několika prospektivních studií (shrnuje [24]). V případě CRC bylo riziko vzniku této malignity asociováno s vyšší frekvencí CAs jen marginálně. Pomocí využití vícerozměrné analýzy byla prokázána asociace mezi vyšší frekvencí CTAs a horším celkovým přežíváním pacientů s BC a CRC. Jedná se tak o první studii popisující souvislost mezi celkovým přežíváním u pacientů s nádorovým onemocněním a frekvencí CAs v PBL.

Ačkoli větší délka telomer v PBL souvisela s vyšším rizikem vzniku BC, nepodařilo se prokázat vliv délky telomer v PBL na prognózu pacientů s nádorovým onemocněním, což je v rozporu s výsledky předchozí studie [25]. Další studie jsou proto nezbytné. V rámci *Publikace VI* byla studována prognostická úloha délky telomer v nádorové tkáni.

Byla potvrzena negativní korelace mezi frekvencí CAs a délkou telomer u skupiny zdravých osob [26]. Tento výstup lze vysvětlit fúzí kriticky zkrácených konců chromozómů a následným vznikem strukturních CAs v průběhu mitotického dělení [27]. Vztah mezi délkou telomer a frekvencí CAs nebyl prokázán u skupiny pacientů s nádorovým onemocněním. Tento fenomén nebyl dosud popsán a proto se lze jen domnívat, že ke vzniku CAs v PBL u pacientů s nádorovým onemocněním přispívá více faktorů.

Naše výsledky prokázaly vliv vyšší frekvence CTAs v PBL na horší přežívání pacientů s BC a CRC. Byla také popsána negativní korelace mezi frekvencí CAs a délkou telomer u skupiny zdravých osob. Jedinci s větší délkou telomer v PBL měli statisticky významně vyšší riziko vzniku BC.

Publikace V: Studie s názvem “*Bleomycin-induced chromosomal damage and shortening of telomeres in peripheral blood lymphocytes of incident cancer patients*” byla založena na detekci inter-individuálních rozdílů v DSBs DRC měřené v PBL zdravých osob a pacientů s BC a CRC. Výsledky naší analýzy byly porovnány s měřením délky telomer v PBL studovaných skupin osob s cílem zjistit vztah mezi DSBs DRC a narušením fyziologické délky telomer.

V PBL pacientů s CRC byla detekována statisticky významně vyšší frekvence CTAs ($P=0.03$) indukovaná pomocí radiomimetické látky (bleomycinu), což poukazuje na nižší DSBs DRC v PBL. Tento výsledek je v souladu s předchozími pracemi [2, 28, 29]. Ankathil *et al.*, popsal statisticky významně vyšší frekvenci CTAs po působení bleomycinu u familiální a sporadické formy CRC ve srovnání s rodinnými příslušníky a dalšími zdravými jedinci a prokázal tak, že měření hypersenzitivity k bleomycinu může být využito k identifikaci osob s predispozicí k CRC [29]. Hsu *et al.*, prokázal, že pacienti s nádory orgánů, které jsou v přímém kontaktu s vnějším prostředím (zahrnující dýchací a trávicí soustavu) vykazují zvýšenou sensitivitu k působení bleomycinu [2]. Také bylo zjištěno, že pacienti s CRC, kteří mají distálně lokalizované tumory jsou hypersenzitivní k bleomycinu v PBL ve srovnání s pravostrannými karcinomy kolonu, což potvrzuje hypotézu, že působení genotoxických látek z vnějšího prostředí hraje důležitější roli v etiologii levostranných karcinomů kolonu [28].

Skupina pacientů s BC nevykazovala statisticky významně vyšší frekvenci bleomycinem-indukovaných CTAs v PBL ve srovnání se zdravými jedinci, což je v souladu s předchozí studií [2]. Další publikované práce však popisují hypersenzitivitu k působení bleomycinu v PBL u pacientek s BC [30, 31]. Z důvodu nekonzistentních výsledků ostatních publikovaných prací a také vzhledem k relativně malé skupině námi studovaných jedinců s BC jsou další studie nutné.

Pacienti s CRC a BC s délkou telomer v PBL menší nebo rovnou mediánu vykazovali statisticky významně vyšší frekvenci bleomycinem-indukovaných CTAs v PBL ($P=0.02$), což poukazuje na korelaci mezi sníženou DSBs DRC a kratší délkou telomer. Telomery inhibují indukci DDR a chrání tak konce chromozomů před chybným propojením a vznikem chromozomální instability. Paradoxně je však zároveň funkce proteinů nezbytných pro DDR využívána telomerovými strukturami k replikaci a ochraně těchto protektivních konců chromozomů [32, 33]. Např. Ku70, protein důležitý v průběhu opravy DSBs, stimuluje fúzi kriticky zkrácených telomer a přispívá tak ke vzniku chromozomální instability. Zároveň však chrání konce chromozomů před homologní rekombinací [34]. Také 53BP1 inhibuje resekci nechráněných konců chromozomů zprostředkovanou proteinem BRCA1 a tudíž blokuje iniciaci homologní rekombinace a narušení struktury a délky telomer [35]. Lze říci, že všechny opravné dráhy zahrnuté v DDR jsou důležité pro správnou funkci telomer. Narušení funkce excizní opravy poškození DNA vede ke zkracování telomer [36], avšak podobné studie nejsou příliš časté [37].

Naše výsledky podpořily hypotézu, že narušení délky telomer je asociováno s defekty v DDR [38]. Ačkoli je v současné době popsáno více než 400 proteinů zahrnutých v průběhu DDR, vztah většiny z nich ke správnému fungování telomer není dosud objasněn. Tato oblast molekulární biologie tak zasluhuje větší pozornost.

Publikace VI: V publikaci *“Relationship of telomere length in colorectal cancer patients with cancer phenotype and patient prognosis”* byla měřena délka telomer v nádorové tkáni, přilehlé nenádorové mukóze, PBL, jaterní metastatické tkáni a nenádorové jaterní tkáni u pacientů s CRC. Cílem této studie bylo objasnit vliv klinicko-patologických a molekulárních charakteristik pacientů s CRC na délku telomer v jednotlivých uvedených tkáních. Byla také studována možnost využití délky telomer jako ukazatele celkového přežití u pacientů s CRC.

Kratší délka telomer v nádorové tkáni ve srovnání s přilehlou nenádorovou mukózou byla pozorována u 74% pacientů, což je v souladu s předchozími studiemi [39-41]. Tento výsledek lze vysvětlit zvýšenou proliferací nádorové tkáně. Kratší délka telomer byla identifikována u 83% jaterních metastáz ve srovnání s primárními tumory a 64% jaterních metastáz mělo kratší délku telomer ve srovnání s nenádorovou jaterní tkání. Všichni pacienti zahrnuti do této studie s přítomností jaterních metastáz podstoupili chemoterapeutickou léčbu, což může být příčinou kratší délky telomer v metastatické tkáni. Vliv chemoterapie na délku telomer byl v době odevzdání disertační práce studován v našem navazujícím projektu.

Délka telomer v nádorové tkáni byla statisticky významně kratší u pacientů s počátečním stádiem CRC (TNM I; $P=0.001$). Tento výsledek je v souladu s předchozími studiemi, která zahrnovala 125 pacientů s CRC [42]. TNM klasifikace představuje robustní prognostický ukazatel a jelikož délka telomer pozitivně korelovala s jednotlivými stádii CRC, prognostická úloha telomer v nádorové tkáni byla předmětem další části naší studie. Bylo tak prokázáno, že pacienti s poměrem délky telomer v nádorové tkáni ve srovnání s přilehlou nenádorovou mukózou menším než medián (<0.7) vykazovali lepší celkové přežití ($P=0.02$). Delší telomery v nádorové tkáni byly již dříve popsány jako ukazatel horšího celkového přežití u pacientů s CRC (shrnuto v metaanalýze zahrnující 956 pacientů [43]). Na základě našich výsledků lze říci, že poměr délky telomer v nádorové tkáni a přilehlé nenádorové mukóze může sloužit jako prognostický ukazatel u pacientů s CRC.

Dále byla prokázána statisticky významně kratší délka telomer v proximálně lokalizovaných karcinomech tlustého střeva ve srovnání s distálně lokalizovanými tumory ($P=0.006$) a rektum ($P<0.0001$). Tento výsledek je v souladu s předchozími studii [40, 41, 44], ačkoli jiné publikace nepotvrdily kratší délku telomer u pravostranných karcinomů kolonu [39, 42]. Odlišná délka telomer v jednotlivých částech tlustého střeva může souviset se specifickým složením střevní mikrobioty. Ta ovlivňuje mimo jiné buněčnou proliferaci a zánětlivé prostředí [45], což může mít negativní vliv na délku telomer.

Dalším důležitým zjištěním naší studie bylo, že pacienti s karcinomem charakterizovaným MSI měli statisticky významně kratší délku telomer v nádorové tkáni ve srovnání s mikrosatelitově stabilními tumory. V současné době existuje pouze velmi omezený počet studií, které potvrzují podobnou asociaci [41, 44] a výsledky dalších studií toto zjištění nepotvrdily [42, 46]. Jelikož telomery představují repetitivní sekvence složené z hexanukleotidů, lze je klasifikovat jako mikrosatelitové oblasti. Pacienti s fenotypem MSI mohou mít vyšší frekvenci inserčně-delečních mutací v koncových oblastech chromozomů z důvodu narušené opravy chybného párování bazí. Ačkoli nebyla tato hypotéza experimentálně potvrzena, lze předpokládat, že akumulace mutací v oblasti telomer může souviset s poklesem koncentrace proteinů shelterinového komplexu, které specificky rozpoznávají telomerové hexanukleotidové repetice TTAGGG. Proteiny shelterinu jsou nezbytné pro zachování protektivní funkce telomer. Jakmile dojde k narušení homeostázy shelterinového komplexu, dojde k narušení fyziologické délky telomer [47]. Naší další otázkou bylo, zda SNPs v genech kódujících podjednotky shelterinového komplexu mají vztah k délce telomer. Na základě genotypizace byl popsán negativní vliv homozygotní varianty *TERT* rs3816659 na délku telomer v nenádorové mukóze. Tato genová varianta byla v předchozí studii popsána ve vztahu ke zvýšenému riziku vzniku BC [48]. Výsledky naší analýzy lze ale považovat pouze za předběžné, jelikož genotypizace byla provedena u 232 jedinců.

Naše výsledky prokázaly efekt klinicko-patologických a molekulárních charakteristik na délku telomer v odlišných tkáních pacientů s CRC. Byl také prokázán vliv délky telomer na celkové přežívání pacientů s CRC. V současné době jsou však poznatky v této oblasti stále nedostatečné a jelikož se začínají v klinické praxi aplikovat inhibitory telomerázy, je nezbytné porozumět biologii telomer v nádorové tkáni pacientů s CRC a zároveň identifikovat pacienty, kteří by mohli profitovat z cílené terapie.

Publikace VII: Souhrnné sdělení “*Genetic variation of acquired structural chromosomal aberrations*” kriticky hodnotí výsledky dosažené v *Publikacích I, II, III a V* a naznačuje další směr výzkumu.

5. Závěr

- *Mají funkční SNPs v genech důležitých pro mitotický checkpoint a opravu poškození DNA vliv na frekvenci CAs v PBL zdravých osob?*

Ačkoli jednotlivé SNPs (v genech *XPD*, *RAD54L*, *BUB1* a *ZWINT*) ovlivňovaly frekvenci nespecifických strukturních CAs pouze marginálně, binární interakce SNPs v genech zahrnutých v mitotickém checkpointu nebo při opravě poškození DNA měly statisticky významný vliv na frekvenci nespecifických strukturních CAs v PBL zdravých osob. Celkově bylo popsáno 35 statisticky významných binární interakcí, které téměř vždy zahrnovaly geny kódující proteiny ze dvou opravných drah poškození DNA nebo geny hrající odlišnou úlohu na úrovni mitotického checkpointu. Na základě našich výsledků lze říci, že akumulace nespecifických strukturních CAs v PBL vyžaduje komplexní narušení těchto molekulárních drah.

- *Umožní použití GWAS popis nových SNPs, které mají vztah k frekvenci CAs v PBL?*

Pomocí GWAS byly identifikovány oblasti (rs1383997, rs2824215 and rs983889), které souvisely se zvýšenou frekvencí nespecifických strukturních CAs v PBL. Všechny tyto SNPs byly dříve popsány v přímé nebo nepřímé souvislosti se vznikem nádorového onemocnění.

- *Je zvýšená frekvence nespecifických strukturních CAs v PBL zdravých osob a pacientů s nádorovým onemocněním asociována s narušením fyziologické délky telomer?*

Byla potvrzena negativní korelace mezi frekvencí získaných nespecifických strukturních CAs a délkou telomer v PBL zdravých jedinců. Podobný výsledek nebyl pozorován v PBL pacientů s nádorovým onemocněním.

- *Ovlivňuje frekvence nespecifických strukturních CAs a/nebo narušení fyziologické délky telomer v PBL riziko vzniku maligního onemocnění nebo celkové přežívání pacientů s nádorovým onemocněním?*

Byla potvrzena zvýšená frekvence nespecifických strukturních CAs v PBL zdravých jedinců v souvislosti s rizikem rozvoje BC a LC. Zvýšené riziko vzniku BC bylo asociováno s delšími telomerami v PBL. Celkové přežívání pacientů s nádorovým onemocněním nebylo ovlivněno délkou telomer v PBL. Zvýšená frekvence CTAs v PBL byla asociována s horším celkovým přežitím pacientů s BC a CRC při použití vícerozměrné analýzy.

- *Jsou pacienti s BC a CRC citlivější k působení radiomimetické látky (bleomycinu) v PBL? Je délka telomer v PBL asociována s DSBs DRC?*

Byla popsána statisticky významně vyšší frekvence CTAs indukovaných bleomycinem v PBL pacientů s CRC ve srovnání se zdravými jedinci podobného věku a pohlaví. Měření citlivosti k působení bleomycinu tak lze využít pro detekci jedinců s CRC. Délka telomer v PBL pacientů s maligním onemocněním korelovala se zvýšenou frekvencí CTAs, a tudíž se sníženou opravou bleomycinem-indukovaných DSBs.

- *Je délka telomer v nádorové tkáni, přilehlé mukóze, metastatické tkáni a krvi asociována s klinicko-patologickými nebo molekulárními charakteristikami pacientů s CRC?*

Statisticky významně kratší délka telomer byla u 74% nádorových tkání ve srovnání s nenádorovou mukózou. Délka telomer byla také kratší u 83% jaterních metastáz při porovnání s primární nádorovou tkání a 64% jaterních metastáz vykazovalo kratší délku telomer ve srovnání s nenádorovou jaterní tkání. Délka telomer v nádorové tkáni byla statisticky významně kratší v proximální části tlustého střeva ve srovnání s distální částí a rektum. Dále byla popsána kratší délka telomer v počátečním stádiu nádorů klasifikovaných jako TNM I. Pacienti s tumory charakterizovanými MSI měli statisticky významně kratší délku telomer v nádorové tkáni.

- *Je délka telomer v nádorové tkáni asociována s celkovým přežitím pacientů s CRC?*

Pacienti s poměrem délky telomer menším než medián v nádorové tkáni ve srovnání s přilehlou nenádorovou mukózou vykazovali statisticky významně lepší celkové přežití.

6. Seznam použité literatury

1. Vodicka, P., et al., *Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of newly diagnosed cancer patients and healthy controls*. Carcinogenesis, 2010. **31**(7): p. 1238-41.
2. Hsu, T.C., et al., *Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis*. Int J Cancer, 1989. **43**(3): p. 403-9.
3. Cawthon, R.M., *Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(3): p. e21.
4. Rachakonda, S., et al., *Telomere length and survival in primary cutaneous melanoma patients*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 10947.
5. Berg, K.D., et al., *Detection of microsatellite instability by fluorescence multiplex polymerase chain reaction*. J Mol Diagn, 2000. **2**(1): p. 20-8.
6. Ren, Q. and B. Jin, *The clinical value and biological function of PTTG1 in colorectal cancer*. Biomed Pharmacother, 2017. **89**: p. 108-115.
7. Liu, S.T. and H. Zhang, *The mitotic checkpoint complex (MCC): looking back and forth after 15 years*. AIMS Mol Sci, 2016. **3**(4): p. 597-634.
8. Mora-Santos, M., et al., *A single mutation in Securin induces chromosomal instability and enhances cell invasion*. Eur J Cancer, 2013. **49**(2): p. 500-10.
9. Lo, Y.L., et al., *Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the mitotic checkpoint genes: a multigenic study on cancer susceptibility*. Carcinogenesis, 2007. **28**(5): p. 1079-86.
10. Vodicka, P., et al., *Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA*. Carcinogenesis, 2004. **25**(5): p. 757-63.
11. Hunt, R., et al., *Silent (synonymous) SNPs: should we care about them?* Methods Mol Biol, 2009. **578**: p. 23-39.
12. Symington, L.S., *Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair*. Microbiol Mol Biol Rev, 2002. **66**(4): p. 630-70, table of contents.
13. Russo, A., et al., *Rad54/Rad54B deficiency is associated to increased chromosome breakage in mouse spermatocytes*. Mutagenesis, 2018. **33**(4): p. 323-332.
14. Hemminki, K., et al., *Metabolic gene variants associated with chromosomal aberrations in healthy humans*. Genes Chromosomes Cancer, 2015. **54**(4): p. 260-6.
15. Vodicka, P., et al., *Cytogenetic markers, DNA single-strand breaks, urinary metabolites, and DNA repair rates in styrene-exposed lamination workers*. Environ Health Perspect, 2004. **112**(8): p. 867-71.
16. Musak, L., et al., *Chromosomal damage among medical staff occupationally exposed to volatile anesthetics, antineoplastic drugs, and formaldehyde*. Scand J Work Environ Health, 2013. **39**(6): p. 618-30.
17. Vodenkova, S., et al., *Structural chromosomal aberrations as potential risk markers in incident cancer patients*. Mutagenesis, 2015. **30**(4): p. 557-63.
18. Wight, M. and A. Werner, *The functions of natural antisense transcripts*. Essays Biochem, 2013. **54**: p. 91-101.
19. Park, Y.R., et al., *Data-driven Analysis of TRP Channels in Cancer: Linking Variation in Gene Expression to Clinical Significance*. Cancer Genomics Proteomics, 2016. **13**(1): p. 83-90.
20. Shapovalov, G., et al., *Role of TRP ion channels in cancer and tumorigenesis*. Semin Immunopathol, 2016. **38**(3): p. 357-69.

21. Haldeman-Englert, C.R., et al., *A de novo 8.8-Mb deletion of 21q21.1-q21.3 in an autistic male with a complex rearrangement involving chromosomes 6, 10, and 21*. Am J Med Genet A, 2010. **152a**(1): p. 196-202.
22. Kamran, M., et al., *Aurora kinase A regulates Survivin stability through targeting FBXL7 in gastric cancer drug resistance and prognosis*. Oncogenesis, 2017. **6**(2): p. e298.
23. Durante, M., et al., *From DNA damage to chromosome aberrations: joining the break*. Mutat Res, 2013. **756**(1-2): p. 5-13.
24. Bonassi, S., et al., *Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries*. Carcinogenesis, 2008. **29**(6): p. 1178-83.
25. Xu, X., et al., *Association between telomere length and survival in cancer patients: a meta-analysis and review of literature*. Front Med, 2016. **10**(2): p. 191-203.
26. Hemminki, K., et al., *Telomere length in circulating lymphocytes: Association with chromosomal aberrations*. Genes Chromosomes Cancer, 2015. **54**(3): p. 194-6.
27. de Lange, T., *How telomeres solve the end-protection problem*. Science, 2009. **326**(5955): p. 948-52.
28. Shao, L., M. Lai, and Q. Huang, *Mutagen sensitivity and p53 expression in colorectal cancer in China*. Postgrad Med J, 2001. **77**(913): p. 713-6.
29. Ankathil, R., et al., *Deficient DNA repair capacity: a predisposing factor and high risk predictive marker in familial colorectal cancer*. J Exp Clin Cancer Res, 1999. **18**(1): p. 33-7.
30. Hu, M., et al., *Bleomycin-induced mutagen sensitivity, passive smoking, and risk of breast cancer in Chinese women: a case-control study*. Cancer Causes Control, 2013. **24**(4): p. 629-36.
31. Kosti, O., et al., *Mutagen sensitivity, tobacco smoking and breast cancer risk: a case-control study*. Carcinogenesis, 2010. **31**(4): p. 654-9.
32. Arnoult, N. and J. Karlseder, *Complex interactions between the DNA-damage response and mammalian telomeres*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(11): p. 859-66.
33. Dokhani, Y. and T. de Lange, *The role of double-strand break repair pathways at functional and dysfunctional telomeres*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(12): p. a016576.
34. Celli, G.B., E.L. Denchi, and T. de Lange, *Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(8): p. 885-90.
35. Chapman, J.R., et al., *RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection*. Mol Cell, 2013. **49**(5): p. 858-71.
36. Madlener, S., et al., *Essential role for mammalian apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease Ape1/Ref-1 in telomere maintenance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(44): p. 17844-9.
37. Jia, P., C. Her, and W. Chai, *DNA excision repair at telomeres*. DNA Repair (Amst), 2015. **36**: p. 137-45.
38. Reilly, N.M., et al., *Exploiting DNA repair defects in colorectal cancer*. Mol Oncol, 2019.
39. Gertler, R., et al., *Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma*. J Clin Oncol, 2004. **22**(10): p. 1807-14.
40. Garcia-Aranda, C., et al., *Correlations of telomere length, telomerase activity, and telomeric-repeat binding factor 1 expression in colorectal carcinoma*. Cancer, 2006. **106**(3): p. 541-51.
41. Rampazzo, E., et al., *Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers*. Br J Cancer, 2010. **102**(8): p. 1300-5.

42. Balci, E.L., et al., *Measurement of Telomere Length in Colorectal Cancers for Improved Molecular Diagnosis*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(9).
43. Jia, H. and Z. Wang, *Telomere Length as a Prognostic Factor for Overall Survival in Colorectal Cancer Patients*. Cell Physiol Biochem, 2016. **38**(1): p. 122-8.
44. Takagi, S., et al., *Relationship between microsatellite instability and telomere shortening in colorectal cancer*. Dis Colon Rectum, 2000. **43**(10 Suppl): p. S12-7.
45. Dejea, C.M., et al., *Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(51): p. 18321-6.
46. Suraweera, N., et al., *Relative telomere lengths in tumor and normal mucosa are related to disease progression and chromosome instability profiles in colorectal cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(24): p. 36474-36488.
47. Loayza, D. and T. De Lange, *POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control*. Nature, 2003. **423**(6943): p. 1013-8.
48. Shen, J., et al., *Multiple genetic variants in telomere pathway genes and breast cancer risk*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(1): p. 219-28.

Mgr. Michal Kroupa

Datum a místo narození: 8. 4. 1988, Slaný

Adresa: Čechova 869, Kralupy nad Vltavou 278 01, ČR

Telefonní číslo: +420 723 446 458

E-mail: michal.kroupa@iem.cas.cz

Vzdělání

2013 – současnost

Postgraduální studium, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova

Obor: Anatomie, histologie a embryologie

Školící pracoviště: Oddělení molekulární biologie nádorů, UEM AV ČR, v.v.i.

Školitel: MUDr. Pavel Vodička, CSc.

2011 - 2013

Magisterské studium, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova

Obor: Buněčná a vývojová biologie

Školitel: MUDr. Pavel Vodička, CSc.

2010 - 2011

Bakalářské studium, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova

Obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

Školitel: MUDr. Zdeněk Hodný, Ph.D.

Zahraniční stáže

2016: obdržena finanční podpora COST-Short-Term Scientific Mission

Místo: German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Německo

Název projektu: The determination of telomere length in relation to *TERC* and *TERT* gene variants in breast and colorectal cancer patients

Hostitel: Prof. Rajiv Kumar

2016: obdržena finanční podpora COST-Action BM1206

Místo: University Pablo de Olavide, Sevilla, Španělsko

kurz: Introduction to Genetic Models: from *C.elegans* to mouse

Konference s aktivní prezentací výsledků formou posteru nebo přednášky

2018: American Association for Cancer Research Annual Meeting, Chicago, USA.

Název projektu: Relative telomere length in tumor tissue and adjacent mucosa of colorectal cancer patients

2018: Genetická toxikologie a prevence rakoviny, ČR

Název projektu: Relationship of relative telomere length in tumor tissue and adjacent mucosa of colorectal cancer patients with molecular features, cancer progression and patient prognosis

2016: Genetická toxikologie a prevence rakoviny, ČR

Název projektu: Studium opravné kapacity dvouřetězcových zlomů DNA v periferních lymfocytech u zdravé populace a u pacientů s malignitami prsu a gastrointestinálního traktu

2016: 49. výroční cytogenetická konference, ČR

Název projektu: Bleomycin-induced chromatid breaks as a risk marker for colorectal and breast cancer: a case-control study

Kurzy v rámci postgraduálního studia

Zdravotnická informatika, Transfer znalostí a technologií, Úvod do vědeckovýzkumné práce a publikační činnosti, Lékařská statistika, příprava NGS knihovny 22G Hereditary Cancer Panel

Seznam publikací v rámci disertační práce

Publikace I

Genetic variation in the major mitotic checkpoint genes associated with chromosomal aberrations in healthy humans. Försti A, Frank C, Smolkova B, Kazimirova A, Barancokova M, Vymetalkova V, **Kroupa M**, Naccarati A, Vodickova L, Buchancova J, Dusinska M, Musak L, Vodicka P, Hemminki K. *Cancer Lett.* 2016 Oct 1;380(2):442-6. **IF: 6.491**

Publikace II

Interactions of DNA repair gene variants modulate chromosomal aberrations in healthy subjects. Vodicka P, Musak L, Frank C, Kazimirova A, Vymetalkova V, Barancokova M, Smolkova B, Dzupinkova Z, Jiraskova K, Vodenkova S, **Kroupa M**, Osina O, Naccarati A, Palitti F, Försti A, Dusinska M, Vodickova L, Hemminki K. *Carcinogenesis.* 2015 Nov;36(11):1299-306. **IF: 5.072**

Publikace III

Genetic variation associated with chromosomal aberration frequency: A genome-wide association study. Niazi Y, Thomsen H, Smolkova B, Vodickova L, Vodenkova S, **Kroupa M**, Vymetalkova V, Kazimirova A, Barancokova M, Volkovova K, Staruchova M, Hoffmann P, Nöthen MM, Dušinská M, Musak L, Vodicka P, Hemminki K, Försti A. *Environ Mol Mutagen.* 2019 Jan;60(1):17-28. **IF: 3.254**

Publikace IV

Chromosomal damage and telomere length in peripheral blood lymphocytes: cancer risk and patients' long-term survival. Vodenkova S, **Kroupa M**, Polivkova Z, Musak L, Ambrus M, Schneiderova M, Kozevnikovova R, Vodickova L, Rachakonda S, Hemminki K, Kumar R, Vodicka P. **Manuscript in preparation**

Publikace V

Bleomycin-induced chromosomal damage and shortening of telomeres in peripheral blood lymphocytes of incident cancer patients. **Kroupa M**, Polivkova Z, Rachakonda S, Schneiderova M, Vodenkova S, Buchler T, Jiraskova K, Urbanova M, Vodickova L, Hemminki K, Kumar R, Vodicka P. *Genes Chromosomes Cancer*. 2018 Feb;57(2):61-69. **IF: 3.362**

Publikace VI

Relationship of telomere length in colorectal cancer patients with cancer phenotype and patient prognosis. **Kroupa M**, Rachakonda S, Srinivas N, Liska V, Urbanova M, Jiraskova K, Schneiderova M, Vycital O, Vymetalkova V, Vodickova L, Kumar R, Vodicka P. **Manuscript in preparation**

Publikace VII

Genetic variation of acquired structural chromosomal aberrations. Vodicka P, Musak L, Vodickova L, Vodenkova S, Catalano C, **Kroupa M**, Naccarati A, Polivkova Z, Vymetalkova V, Försti A, Hemminki K. *Mutat Res*. 2018 Dec;836(Pt A):13-21. **IF: 1.996**

Ostatní publikace

Publikace VIII

Base excision repair capacity as a determinant of prognosis and therapy response in colon cancer patients. Vodenkova S, Jiraskova K, Urbanova M, **Kroupa M**, Slysokova J, Schneiderova M, Levy M, Buchler T, Liska V, Vodickova L, Vymetalkova V, Collins A, Opattova A, Vodicka P. *DNA Repair (Amst)*. 2018 Dec;72:77-85. **IF: 4.461**

Publikace IX

Disparity in genetic variants associated with chromosomal aberration frequency between exposed and unexposed cohorts. Niazi Y, Thomsen H, Smolkova B, Vodickova L, Vodenkova S, **Kroupa M**, Vymetalkova V, Kazimirova A, Barancokova M, Volkovova K, Staruchova M, Hoffmann P, Nöthen M, Dusinska M, Musak L, Vodicka P, Hemminki K, Försti A. **Manuscript in preparation**