

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI



Autoreferát dizertační práce

VZTAH NÁDOROVÉHO GENOTYPU A FENOTYPU K DIAGNOSTICE,
PROGNÓZE A PREDIKCI KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Mgr. Pavel Pitule

Školitel: Doc. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D.



Plzeň 2014

Dizertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu na **Ústavu Histologie a embryologie LF UK v Plzni**

Uchazeč: **Mgr. Pavel Pitule**

Školitel: **Doc. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D.**

Oponenti: **Doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.**

Masarykova Univerzita, Středoevropský technologický institut
Kamenice 753/5, 625 00 Brno

Doc. MUDr. František Vožeh, CSc.

Ústav patologické fyziologie, LF UK v Plzni
Lidická 1, 301 66 Plzeň

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu dizertačních prací studijního programu **Anatomie, histologie a embryologie** se koná dne: 30.9.2014

Místo obhajoby: Karlovarská 48, Plzeň, prostory Ústavu histologie a embryologie

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

Doc. MUDr. Jitka Kočová, CSc.

předsedkyně komise pro obhajobu dizertačních prací v oboru Anatomie, histologie a embryologie
pracoviště: Ústav histologie a embryologie

1 SEZNAM ZKRATEK	4
2 TEORETICKÝ ÚVOD PRÁCE	5
2.1 KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM.....	5
2.2 MOLEKULÁRNÍ PODTYPY KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU.....	6
2.3 <i>Nádorové kmenové buňky ve vývoji KRCA</i>	7
2.4 PROGNOTICKÉ ZNAKY U KRCA.....	9
3 CÍLE A HYPOTÉZY DIZERTAČNÍ PRÁCE	11
4 SOUHRN MATERIÁLU A METOD	13
4.1 IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCE CD44 A CD133	13
4.1.1 <i>Soubor pacientů</i>	13
4.1.2 <i>Imunohistochemické zpracování vzorků</i>	14
4.1.3 <i>Semikvantitativní analýza preparátů</i>	14
4.1.4 <i>Statistická analýza</i>	14
4.2 EXPRESNÍ PROFIL VYBRANÝCH GENŮ U KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU	16
4.2.1 <i>Výběr kandidátních genů</i>	16
4.2.2 <i>Soubor pacientů</i>	17
4.2.3 <i>Izolace RNA</i>	17
4.2.4 <i>Reverzní transkripce</i>	17
4.2.5 <i>Kvantitativní real-time PCR</i>	18
4.2.6 <i>Statistická analýza</i>	20
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	21
5.1 IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCE PROTEINŮ CD44 A CD133	21
5.1.1 <i>Výsledky</i>	21
5.1.2 <i>Diskuze</i>	24
5.2 EXPRESNÍ PROFIL VYBRANÝCH GENŮ U KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU	25
5.2.1 <i>Výsledky</i>	25
5.2.2 <i>Diskuze</i>	28
6 ZÁVĚRY PRÁCE	34
7 SEZNAM LITERATURY.....	36
8 PODĚKOVÁNÍ.....	41

1 Seznam zkratek

a.l.	délka amplikonu
ACSL5	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5
ALDH1	aldehyde dehydrogenase 1
APC	adenomatous polyposis coli
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
CAPN10	calpain 10
CD133	cluster of differentiation 113
cDNA	komplementární DNA
CLDN23	claudin 23
CpG	cytosin-fosfát-guanin
CSC	nádorové kmenové buňky
CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1
DCC	deleted in colorectal carcinoma
DFI	bezpříznakové přežití
DSTN	destrin (actin depolymerizing factor)
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
FANCG	Fanconi anemia, complementation group G
G	grading
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRCa	kolorektální karcinom
LGR5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1/ERK
MIER3	mesoderm induction early response 1, family member 3
MLH1	mutL homolog 1
mRNA	messenger RNA
MSH2	mutS homolog 2
n.t.	nádorová tkáň
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OS	celkové přežití
PCR	polymerázová řetězová reakce
POLR2A	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A
RNA	ribonukleová kyselina
S100	S100 calcium binding protein
SAMD3	sterile alpha motif domain containing 3
SLC26A2	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2
tm	teplota nasedání oligonukleotidů
TNM	velikost tumoru-lymfatické uzliny-vzdálená metastáza
TP53	tumor protein p53
VCAN	versican
VSNL1	visinin-like 1
z.t.	zdravá tkáň

2 Teoretický úvod práce

2.1 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (KRCa) je celosvětově jedním z nejčastějších maligních onemocnění s více než 1,2 milionem nových případů ročně (téměř 10% všech nádorových onemocnění) a 600 tisíci úmrtími (8,1% s nádory spojených úmrtí). Celoživotní riziko vzniku kolorektálního karcinomu se odhaduje na 5-6% (Grady, 2003a) a incidence i mortalita KRCa je obecně vyšší ve vyspělých zemích než v zemích třetího světa. Česká republika se v incidenci i mortalitě spojené s KRCa pohybuje na předních příčkách (Zavoral, 2009). V absolutních hodnotách se v roce 2010 jednalo o 8265 nově diagnostikovaných případů KRCa a 3991 úmrtí s KRCa spojených.

KRCa je dle původu možné rozdělit na dědičné a sporadické. Dědičné formy jsou zodpovědné za přibližně 20-30% případů KRCa. U většiny dědičných případů KRCa je zatím konkrétní mutace neznámá, dobře definované syndromy tvoří 5% všech případů KRCa (Grady, 2003b). Sporadické formy KRCa jsou zodpovědné za zbývajících 70-80% případů (Lichtenstein et al., 2000; Migliore et al., 2011) a na jejich vývoji se podílí kombinace environmentálních faktorů a somatických mutací.

Nejčastějšími hereditárními typy KRCa jsou Lynchův syndrom (1-3% pacientů s KRCa) a familiární adenomatózní polypóza (1% pacientů s KRCa) (Hampel et al., 2008; Patel and Ahnen, 2012). Genetickou příčinou Lynchova syndromu jsou zárodečné mutace v genech zodpovědných za opravu DNA, nejčastěji mutace *MLH1* (mutL homolog 1) a *MSH2* (mutS homolog 2), u familiární adenomatózní polypózy se jedná o zárodečnou mutaci genu *APC* (adenomatous polyposis coli).

V etiologii sporadického KRCa hraje roli velké množství faktorů, od genetického pozadí přes somatické mutace a epigenetické regulace až po vliv vnějšího prostředí. Vývoj sporadického karcinomu popisuje například Vogelsteinův model kancerogeneze, dle něhož dochází postupným hromaděním mutací k přeměně zdravého střevního epitelu na dysplastické léze, které se dále vyvíjejí přes časný a pozdní adenom až do stádia karcinomu (Fearon and

Vogelstein, 1990). Tato sekvence je spojena s výskytem typických mutací, například mutace v genu *APC* je detekovatelná již v dysplastických lézích (Powell et al., 1992), mutace v genu *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) je dle některých studií přítomna ve více než 50% KRCa (Haigis et al., 2008), časté jsou delece na dlouhém raménku chromozomu 18 zasahující kondicionální tumor supresor/proto-onkogen *DCC* (deleted in colorectal carcinoma) (Lea et al., 2009). Posledním krokem při přechodu od adenomu ke karcinomu jsou mutace v tumor supresorovém genu *TP53* (tumor protein p53), které se vyskytují až u 75% KRCa (Houlston, 2001).

Kromě geneticky podmíněných rizikových faktorů hrají významnou roli v etiologii sporadického karcinomu i environmentální a další negenetické faktory. Za nejvýznamnější lze považovat vyšší věk, dále byly jako rizikové faktory popsány nízká fyzická aktivita, nízká konzumace ovoce a zeleniny, nízký příjem vlákniny a dieta bohatá na tuky, vysoká hmotnost až obezita, kouření a nadměrná konzumace alkoholu (Benito et al., 1991; Wu et al., 1987).

2.2 Molekulární podtypy kolorektálního karcinomu

Z molekulárního hlediska je kolorektální karcinom vysoce heterogenní onemocnění. V současnosti rozeznáváme tři hlavní podtypy kolorektálního karcinomu, které se kromě mechanismů vývoje liší i klinickým průběhem a odpovědí na určité typy léčby. Z genetického pohledu odlišujeme KRCa s chromozomální nestabilitou, s mikrosatelitní nestabilitou a posledním typem jsou epigeneticky definované KRCa s vysoce metylovanými CpG (cytosin-fosfát-guanin) ostrůvky (Bogaert and Prenen, 2014; Markowitz and Bertagnolli, 2009).

Chromosomální nestabilita stojí za vývojem největší části sporadických KRCa, u 80-85% případů je možné detekovat přestavby chromozomů na různé úrovni (Grady and Carethers, 2008). S chromosomální nestabilitou jsou spojeny i ztráty heterozygosity v určitých oblastech genomu, což je velice efektivní mechanismus fyzického odstranění oblastí často spojených s tumor supresorovými geny. Z klinického pohledu jsou chromosomálně nestabilní

KRCa spojeny s horší prognózou než v případě KRCa s mikrosatelitní nestabilitou (Popat et al., 2005; Walther et al., 2008).

Mikrosatelitní nestabilita stojí za vznikem 15% případů sporadického KRCa. Mikrosatelity jsou opakující se 1 až 6 bázové sekvence a jednotlivé alely genů se od sebe mohou lišit počtem opakování dané krátké oligonukleotidové sekvence. U sporadického kolorektálního karcinomu je vznik MSI spojen s inaktivací DNA opravných mechanismů (Søreide et al., 2006), nejčastěji s mutací *MLH1* nebo *MSH2* a epigenetickou inaktivací *MLH1* promotoru (Wheeler et al., 1999). Výsledkem je hromadění somatických mutací v mikrosatelitních oblastech ovlivňujících především jejich délku, což může vést k posunu čtecího rámce a tvorbě zkrácených či nefunkčních proteinů. Z klinického pohledu mají pacienti s MSI pozitivními KRCa ve stadiu II a III příznivější prognózu oproti pacientům s chromozomálně nestabilními či mikrosatelitně stabilními nádory (Popat et al., 2005).

Třetí hlavní podtyp KRCa je spojen s aberantní metylací cytosin a guanin bohatých oblastí v promotorech a prvních exonech zhruba 70% genů (Issa, 2004; Saxonov et al., 2006; Toyota et al., 1999). Změna metylace ovlivňuje hladinu transkripce genů a KRCa s vysoce methylovanými CpG ostrůvky jsou často spojeny s mikrosatelitní nestabilitou z důvodu metylace promotorové oblasti u *MLH1*.

2.3 Nádorové kmenové buňky ve vývoji KRCa

V současnosti byla u většiny solidních i hematologických nádorů identifikována minoritní buněčná populace nazvaná nádorové kmenové buňky (CSC, cancer stem cells). Tyto buňky jsou na začátku hierarchického uspořádání nádorové tkáně, která byla poprvé pozorována u akutní myeloidní leukemie v roce 1997 (Bonnet and Dick, 1997). Později byly podobné populace nalezeny například i u karcinomu prsu (Al-Hajj et al., 2003), prostaty (Collins et al., 2005), tlustého střeva (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007) či slinivky (Li et al., 2007).

Nádorové kmenové buňky sdílejí velké množství svých znaků s fyziologickými kmenovými buňkami. Oba typy se dělí asymetricky, jsou schopny sebeobnovy,

diferenciace v další buňky dané tkáně či nádoru, dlouhého přežívání i za nepříznivých podmínek a mají relativně dlouhý buněčný cyklus (Aguilar-Gallardo and Simón, 2013). Další podobností je zvýšená odolnost proti chemo- a radioterapii, což z nich činí velice obtížné cíle pro běžné léčebné režimy. Tímto jsou CSC potenciálními zdroji pozdějších relapsů onemocnění či půdou pro selekci rezistentních klonů pomocí suboptimálních dávek onkologických terapeutik (Ishii et al., 2008). S rozvojem poznání o CSC se vytvářejí i speciální terapie založené na prvotní indukci diferenciace CSC a následnému použití chemoterapie či cílené biologické léčby k usmrcení kompletní masy nádorových buněk (Friedman et al., 2013).

Pro identifikaci CSC byly využity různé, většinou povrchové znaky. U kolorektálního karcinomu byla jako první použita pozitivita značení protilátkou proti proteinu CD133 (cluster of differentiation 133), kdy CD133 pozitivní buňky vykazovaly vyšší schopnost tvořit nádory než buňky CD133 negativní (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). V dalších studiích byly mezi znaky přidány například CD44 a CD166 (Dalerba et al., 2007), CD29, CD24 a LGR5 (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5) (Vermeulen et al., 2008) či ALDH1 (aldehyde dehydrogenase 1) (Huang et al., 2009). Řada těchto znaků se ale nachází i na normálních kmenových buňkách tlustého střeva, což komplikuje oddělení těchto populací, navíc ani jeden z těchto znaků neurčuje CSC s absolutní jistotou – například i mezi CD133 negativními buňkami existují kmenové buňky schopné tvořit nádory se stejnou frekvencí jako buňky CD133 pozitivní (Shmelkov et al., 2008).

Spojení mezi fyziologickými a nádorovými kmenovými buňkami je pro vývoj nádoru podstatné. Jelikož většina střevních epiteliálních buněk má rychlý životní cyklus a k nahromadění dostatečného počtu mutací je zapotřebí déle žijících buněk, jsou cílem mutací pravděpodobně fyziologické kmenové buňky střevního epitelu, ze kterých se nádorové kmenové buňky vyvíjejí a dále zajišťují zachování a růst nádoru (Vermeulen and Snippert, 2014). Na základě studia nádorových kmenových buněk by bylo možné připravit efektivnější léčebná schémata s cílem eliminovat vývoj KRCa.

2.4 Prognostické znaky u KRCa

U kolorektálního karcinomu podobně jako u dalších malignit a nemocí obecně nalézáme znaky, které nás mohou informovat o průběhu nemoci či efektivitě použité léčby. První kategorii nazýváme prognostické znaky – ty napovídají o dalším průběhu choroby, její agresivitě a o rizicích pro pacienta. Prediktivní znaky pak dokáží předpovědět efektivitu léčby daným přípravkem. Obě kategorie jsou důležité pro klinickou praxi, jelikož prognostické znaky mohou napovědět o nutnosti léčby a prediktivní o jejím typu, což v kombinaci přináší benefit pro pacienta, který může být ušetřen organismus zatěžující a potenciálně nefunkční léčby. V předkládané práci jsme se zaměřili především na prognostické znaky využitelné u KRCa.

Znaky pro prognózu onemocnění jsou podstatné především pro ty pacienty, u kterých je obtížné zhodnotit benefit terapie (chemoterapie i biologické léčby) oproti zhoršení kvality života a případným komplikacím (například toxicitě léčby). U KRCa se jedná především o indikaci adjuvantní chemoterapie u pacientů s nádorem ve stadiu UICC II (Gray et al., 2007).

Vztah k prognóze byl studován u genů typicky mutovaných u kolorektálního karcinomu, například *TP53*, u kterého je vliv na prognózu prokazatelný jen u pokročilých stádií onemocnění (Iacopetta et al., 2006). Podobným případem jsou i další typické změny u KRCa, mutace genu *APC* a ztráta části chromozomu 18, kde je jejich prognostický efekt nejistý. Z prognostického hlediska byly zkoumány i mutace genů podstatných pro predikci odpovědi na léčbu monoklonálními protilátkami, ale v případě nadměrné exprese *EGFR* (receptor epidermálního růstového faktoru) ani mutace genu *KRAS* nebyl pozorován výrazný vztah k prognóze (Walther et al., 2009).

S prognózou onemocnění mohou být spojovány i celé podtypy KRCa, kde lepší prognózu pozorujeme u pacientů s vysokým stupněm mikrosatelitní nestability (Popat et al., 2005). Pokud se u pacientů vyskytne kombinace mikrosatelitní nestability a mutace genu *BRAF* (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B) vedoucí k záměně aminokyseliny V600E, znamená to pro pacienta vysoce negativní prognózu onemocnění (French et al., 2008). Podobně pacienti

s přítomností aberantní metylace CpG ostrůvků jakékoli úrovně vykazují zkrácení celkového přežití (OS) (Juo et al., 2014).

Průběh onemocnění se v klinické praxi může sledovat pomocí hladin nádorových znaků karcinoembryonálního antigenu a nádorového antigenu 19-9, které jsou stanovovány ze séra či plazmy. Vypovídací hodnota těchto znaků není příliš vysoká, ale v hrubých rysech může informovat o rozvoji onemocnění či ztrátě odpovědi na používanou léčbu (Byström et al., 2012; Duffy et al., 2014).

K prognóze onemocnění lze použít i kombinace znaků, které mohou dohromady přinést vyšší senzitivitu i specificitu testu a lépe stratifikovat pacienty. V současnosti existují testy MammaPrint a OncoTypeDX založené na genové expresi pro lepší stratifikaci pacientek po operaci nádoru prsu. Podobné snahy existují i v případě kolorektálního karcinomu (Jorissen et al., 2009; O'Connell et al., 2010; Wang et al., 2004; Yothers et al., 2013), ale z navržených panelů se zatím žádný v klinické praxi rutinně nepoužívá. Příkladem komerčně dostupných panelů mohou být OncoPrint a OncoTypeDX Colorectal Cancer (Kelley and Venook, 2011).

Z prognostického pohledu jsou sledovány i imunitní buňky infiltrující nádorovou tkáň. Jejich detekce se obvykle provádí imunohistochemicky a studované leukocyty jsou identifikovány podle přítomnosti typických, nejčastěji povrchových znaků. Například infiltrace nádoru CD57 a CD68 pozitivními buňkami je pro pacienta pozitivní informace (Chaput et al., 2013). U metastatického KRCa byla popsána lepší prognóza u pacientů s vysokou infiltrací CD45RO pozitivními buňkami (Lee et al., 2013). V naší předchozí studii jsme jako pozitivní prognostický faktor popsali i infiltraci nádoru S100 (S100 calcium binding protein) pozitivními imunitními buňkami (Liska et al., 2012).

U kolorektálního karcinomu se studuje řada dalších znaků s potenciálem přispět k prognóze onemocnění. Z recentní literatury se jedná například o expresi CD26 proteinu, jehož zvýšená hladina detekovaná imunohistochemicky v nádorové tkáni je spojena se zhoršenou prognózou (Lam et al., 2014), či zvýšené množství inhibitoru buněčné smrti survivinu, které je spojeno se zhoršenou prognózou a metastatickým fenotypem (Krieg et al., 2013).

3 Cíle a hypotézy dizertační práce

Základním cílem předkládané dizertační práce bylo získat nové poznatky o biologickém chování kolorektálního karcinomu, jednoho z nejčastějších typů nádorových onemocnění. Především se jednalo o identifikaci znaků, které mají potenciál přinést nové informace k prognóze pacientů v různých stádiích vývoje KRCa.

V této práci jsou soustředěny výsledky dvou projektů, které přistupovaly k identifikaci prognostických znaků odlišným a částečně komplementárním přístupem. Experimentálně získaná data byla vztažena ke klinickým a patologickým údajům a statisticky analyzována.

Cílem první studie bylo využití rutinně dostupné metodiky, jakou je imunohistochemické vyšetření nádorové tkáně, ke studiu vztahu přítomnosti znaků nádorových kmenových buněk a prognózy pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem. Imunohistochemie jako hlavní metodika byla vybrána z důvodu její dostupnosti v patologických laboratořích, v případě pozitivních výsledků by tedy jejímu uplatnění v klinické praxi nebránila dostupnost specializovaných přístrojů.

Druhá studie jako hlavní metodický princip využívala kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci pro detekci rozdílné expresní hladiny studované skupiny genů mezi vzorkem zdravé a nádorové tkáně u pacientů s KRCa. Díky tomuto přístupu bylo možné sledovat více znaků během jednoho experimentu. Nevýhodou tohoto přístupu je specializovaná příprava a zpracování vzorku, proto tato práce spíše než na rychlé zavedení výstupů ke klinické praxi směřovala k získání nových informací o nádorové biologii, o které bychom se mohli opřít v dalších navazujících studiích.

Hypotézy:

- I. Při imunohistochemickém stanovení přítomnosti CD44 a CD133 proteinu v nádorové tkáni budou identifikovány vztahy mezi expresní hladinou v primárním a sekundárním nádoru z téhož pacienta.

- II. Intenzita značení proteinů CD44 a CD133 bude souviset s celkovým a bezpříznakovým přežitím pacienta – na základě převažujících literárních údajů předpokládáme snížení obou ukazatelů se vzrůstající intenzitou značení.
- III. Analýza relativní expresní hladiny u genů zařazených do druhé studie ukáže rozdíly mezi zdravou a nádorovou tkání.
- IV. Expresní hladina studovaných genů bude korelovat se sledovanými klinickými parametry a expresní rozdíl bude použitelný pro stanovení prognózy u pacientů s KRCa.

4 Souhrn materiálu a metod

4.1 Imunohistochemická detekce CD44 a CD133

4.1.1 Soubor pacientů

Do studie byli zařazeni pacienti operovaní mezi lety 1996 až 2010 pro primární kolorektální karcinom a následně metastázu kolorektálního karcinomu do jater, u kterých byly k dispozici parafinové bločky tkání a kompletní klinické údaje. Popis studovaného souboru v čase diagnózy KRCa je k dispozici v Tabulce 1.

Tabulka 1 - Popis souboru pacientů vstupujících do studie.

parametr	počet
celkový počet	94
pohlaví (muži / ženy)	57/37
věk v čase primární operace (roky)	
medián	61,9
mezikvartilový rozsah	12,4
věk v čase operace jater (roky)	
medián	63,2
mezikvartilový rozsah	11,9
Velikost tumoru (T)	
T1	3
T2	3
T3	73
T4	9
neznámá	6
Lymfatické uzliny (N)	
N0	27
N1	37
N2	16
neznámé	14
Vzdálená metastáza (M)	
M0	45
M1	49
Grading (G)	
G1	19
G2	53
G3	13
neznámý	9

4.1.2 Imunohistochemické zpracování vzorků

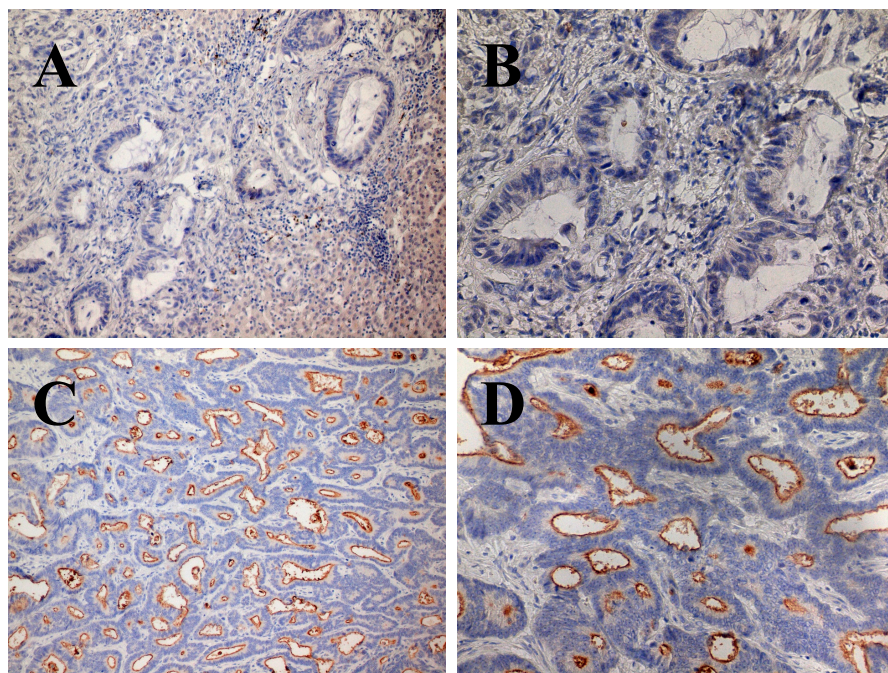
Parafínové bločky byly připraveny podle standardního protokolu fixací 8% formaldehydem a následným zalitím do parafínu. Tloušťka použitých řezů byla 5 μm a jako přehledné barvení preparátů byla zvolena kombinace hematoxylinu a eozinu. Pro imunohistochemickou analýzu byly použity protilátky CD44 (DF1485, 1:100, Dako, Glostrup, Dánsko) a CD133/1 (AC133, 1:100, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Německo). Vzorky nebyly vystaveny žádné speciální aktivaci antigenů. Primární protilátky byly vizualizovány pomocí senzitivního komplexu streptavidin – biotin – peroxidáza (Biogenex, San Ramon, Kalifornie, USA). Specifita barvení byla ověřena potřebnými pozitivními a negativními kontrolami.

4.1.3 Semikvantitativní analýza preparátů

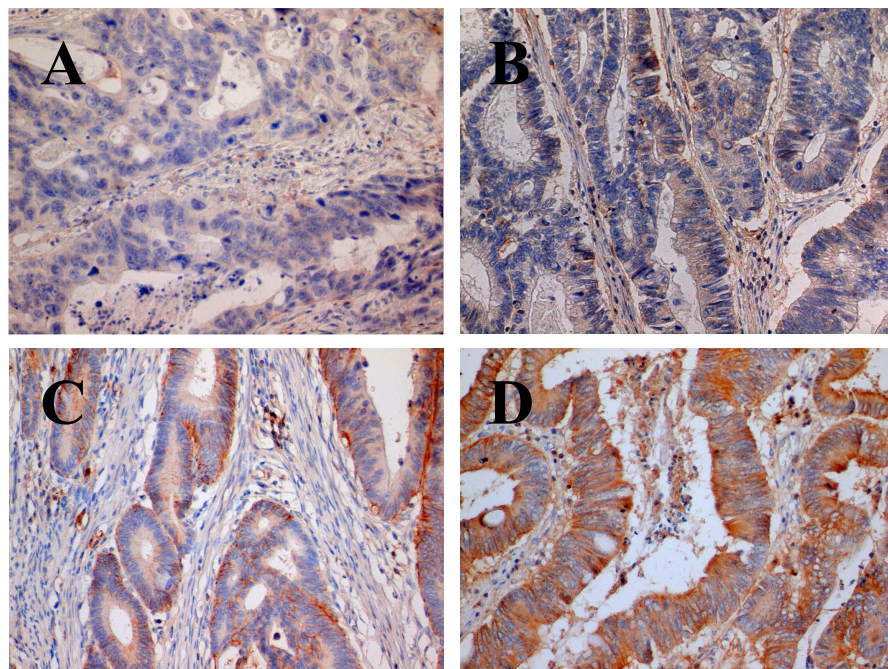
Intenzita značení CD44 protilátkou byla stanovena v oblasti nádorové tkáně pomocí 10x objektivu na škále 0 (negativní) až 3 (silně pozitivní). Semikvantitativní měřítko bylo založeno na intenzitě signálu pozorovatelného v buňkách nádoru, nikoli v nádorovém stromatu. Pro hodnocení CD133 bylo v pěti mikroskopických polích s objektivem 40x spočítáno množství pozitivních nádorových žlázek a množství všech nádorových žlázek v daném poli. Příklady hodnocení intenzity značení jsou na obrázcích 1 a 2.

4.1.4 Statistická analýza

Odečtené hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 0 do 3 v případě CD44 a od 0 do 1 v případě CD133. Skupiny pacientů pro porovnání byly definovány nezávisle pro každou hodnocenou proměnou rozdělením souboru dle mediánu této proměnné. Analýzy přežití byly provedeny pomocí Kaplan-Meier křivek s Cox-Mantel testem. Pozitivní výsledky ($p < 0,05$) byly validovány Coxovým modelem proporcionálních rizik s následným chí-kvadrát testem. Vztahy mezi kategoriemi TNM či gradingu tumoru a CD44 či CD133 pozitivitou byly hodnoceny Mann-Whitney U testem. Korelace mezi intenzitou značení oběma protilátkami v KRCa a jaterní metastáze byly testovány pomocí Spearmanova koeficientu pořadové korelace. Všechny statistické analýzy byly provedeny v softwaru STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK, USA).



Obrázek 1 – Značení tkáně protilátkou proti CD133. Nádor negativní na přítomnost CD133 (A,B) a nádor pozitivní na přítomnost CD133 proteinu (C,D). Zvětšení 200x (A,C), detaily ve zvětšení 400x (B,D).



Obrázek 2 - Značení tkáně protilátkou proti CD44. Ukázky intenzity značení 0 (A), intenzita 1 (B), intenzita 2 (C) a intenzita 3 (D). Všechny příklady jsou ve zvětšení 400x.

4.2 Expresní profil vybraných genů u kolorektálního karcinomu

4.2.1 Výběr kandidátních genů

Geny pro studii byly vybrány na základě prací věnovaných kolorektálnímu karcinomu a využívajících mikročipové metodiky k určení rozdílné abundance mRNA (messenger RNA) ve sledovaných vzorcích (Kleivi et al., 2007; Kwong et al., 2005) a následného studia literatury. Seznam genů vstupujících do studie shrnuje Tabulka 2.

Referenční geny *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) a *POLR2A* (polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A) byly vybrány na základě dat získaných ve společném projektu s našimi spolupracovníky (Hlavata et al., 2012) a na základě vlastních výsledků.

Tabulka 2 - Seznam genů vstupujících do studie. GeneID je unikátní identifikátor genu z databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information), stejně jako mRNA kód.

GeneID	zkratka	název genu	mRNA kód
7447	VSNL1	visinin-like 1	NM_003385.4
11132	CAPN10	calpain 10	NM_023083.3
1462	VCAN	versican	NM_004385.4
137075	CLDN23	claudin 23	NM_194284.2
11034	DSTN	destrin (actin depolymerizing factor)	NM_006870.3
154075	SAMD3	sterile alpha motif domain containing 3	NM_001017373.2
5594	MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1/ERK	NM_002745.4
115908	CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1	NM_138455.2
166968	MIER3	mesoderm induction early response 1, family member 3	NM_152622.3
51703	ACSL5	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	NM_016234.3
1836	SLC26A2	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	NM_000112.3
8549	LGR5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	NM_003667.2

4.2.2 Soubor pacientů

Do studie bylo zařazeno 53 pacientů operovaných na Chirurgické klinice Fakultní nemocnice v Plzni mezi lety 2008 až 2010. Soubor byl rozdělen do dvou skupin na pacienty paliativně operované, u kterých se v době primární operace nacházela vzdálená metastáza nejčastěji v játrech (N=25), a radikálně operované, u kterých nebylo patrné metastatické ložisko ve vzdálených orgánech (N=28). Popis souboru je shrnut v Tabulce 3.

4.2.3 Izolace RNA

RNA (ribonukleová kyselina) z tkáňových vzorků byla získána pomocí TRI REAGENT[®]RT (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) s použitím standardního protokolu výrobce. Množství RNA bylo stanoveno měřením absorbance na přístroji Infinite M200 (Tecan, Männendorf, Švýcarsko). Kvalita RNA byla určena pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. Pouze RNA s poměrem absorbance 230nm/260nm > 1,7 a bez degradace viditelné na elektroforetickém gelu byla použita pro další analýzu. U části vzorků bylo navíc stanoveno „RNA integrity number“ pomocí přístroje 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

4.2.4 Reverzní transkripce

K syntéze komplementární DNA (cDNA) byl využit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Waltham, MA, USA). Do každé reakce o objemu 20 μ l vstupovalo 500 ng celkové RNA. Před samotnou reverzní transkripcí byla RNA inkubována s DNázou I (Top-Bio, Vestec, Česká republika) po dobu 5 minut při pokojové teplotě kvůli odstranění potenciální kontaminace genomickou DNA. Pro priming reverzní transkripce byla využita směs oligo(dT)18 a náhodných hexamerů s finální koncentrací každého z nich 2,5 μ M. V dalších krocích se pokračovalo dle protokolu výrobce.

Kvalita získané cDNA byla otestována pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce) amplifikací genu GAPDH a výsledný produkt byl detekován v agarózovém gelu pomocí barvy SYBR Safe (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Díky využití příslušných kontrol bylo možné odhalit případnou

kontaminaci izolované RNA genomickou DNA či kontaminaci chemikálií externím zdrojem nukleových kyselin.

Tabulka 3 - Klinické parametry studovaného souboru, uvedeny jsou vždy počty pacientů zařazených do dané kategorie.

	Skupina A (paliativní)	Skupina B (radikální)	p	test
Pohlaví (muži/ženy)	17/8	19/9	1	Fisherův exaktní
Věk v době diagnózy (roky)				
Medián	65	63,5	0,485	Mann- Whitney U
Mezikvartilový rozsah	7	12		
Velikost tumoru (T)				
T2	1	1	0,989	Pearsonův Chi- kvadrát
T3	19	21		
T4	5	6		
Lymfatické uzliny (N)				
N0	7	11	0,681	Pearsonův Chi- kvadrát
N1	11	10		
N2	7	7		
Vzdálená metastáza (M)				
M0	0	28	<0.001	Fisherův exaktní
M1	25	0		
Grading (G)				
G1	4	3	0,101	Pearsonův Chi- kvadrát
G2	20	18		
G3	1	7		
Lokalizace primárního nádoru				
Tlusté střevo	9	19	0,025	Fisherův exaktní
Rektosigmoideum nebo konečník	16	8		

4.2.5 Kvantitativní real-time PCR

K designu oligonukleotidů pro detekci množství mRNA jednotlivých genů byl využit software Primer-3, navržené oligonukleotidy byly syntetizovány společností Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Seznam sekvencí je shrnut v Tabulce 4. Pro detekci produktů byl zvolen Power SYBR Green PCR master mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) kompatibilní s použitým přístrojem

7500 Fast (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Geny byly rozděleny do dvou skupin podle nasedací teploty (58°C pro *CLDN23*, *SLC26A2*, *VSNL1*, *CAPN10*, *VCAN*, *MAPK1* a 60°C pro *LGR5*, *DSTN*, *MIER3*, *ACSL5*, *CTHRC1*, *SAMD3*). Parametry reakcí byly následovné: počáteční zahřátí 50°C po 20 s, počáteční denaturace 95°C po 10 min a následně 42 cyklů složených z denaturace 95°C po 15 s, přisednutí a polymerizace při 58°C (60°C) po 1 min. Po skončení amplifikace následovalo stanovení křivky tání v jednotlivých jamkách s cílem určit případné kontaminace či nespecifické amplifikace. Výsledky byly zpracovány v softwaru dodávanému k přístroji 7500 Fast a základní statistická analýza provedena softwarem REST2009 (Qiagen, Hildesheim, Německo).

Tabulka 4 - Seznam sekvencí oligonukleotidů použitých pro qPCR. *t_m* – teplota nasedání oligonukleotidů ve stupních Celsia vypočtená při jejich návrhu, a.l. – délka amplikonu syntetizovaného při použití dané dvojice oligonukleotidů.

název	sekvence 5' - 3'	<i>t_m</i>	a.l.
F_hVSNL1	agaactgttgagttttatcattttcg	59	90
R_hVSNL1	caggggccagtttgctatt	60	
F_hDSTN	cctggcatcttggaatcat	59	99
R_hDSTN	aaagcagattacaatgtagccctaa	59	
F_hSAMD3	catgcaaacagaagcagctc	59	96
R_hSAMD3	ttttcagctggatagaaagatgg	59	
F_hLGR5	aatcccctgcccagtctc	60	74
R_hLGR5	ccctgggaatgtatgtcaga	59	
F_hVCAN	gcacctgtgtccaggata	60	70
R_hVCAN	cagggattagagtgacattcatca	60	
F_hMIER3	ttgaggaaggaaataatgattggt	60	113
R_hMIER3	caccaaagtaactggctctcgtt	59	
F_hMAPK1	ccgtgacctcaagccttc	59	72
R_hMAPK1	gccaggccaaagtcacag	60	
F_hSLC26A2	ggttggcagcactgtaacct	60	64
R_hSLC26A2	cacttgaaagaagcccatcg	60	
F_hCLDN23	ttgcatcaatataattattgggtttt	59	66
R_hCLDN23	agtttgcatggcaaggagtt	59	
F_hCAPN10	tgccagagggaggatgtg	60	73
R_hCAPN10	gctcgtaggacctggac	60	
F_hACSL5	ttcctgtctcttgcataaagggt	59	95
R_hACSL5	ccaattcggagatgatccac	60	
F_hCTHRC1	ccaaggggaagcaaaagg	60	74
R_hCTHRC1	cccttgaagcacattccatta	59	

4.2.6 Statistická analýza

Ke všem statistickým testům byl použit software STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Statistická významnost rozdílu mezi expresí sledovaných genů v nádorové a zdravé tkáni byla testována pomocí Wilcoxonova párového testu. Dalším krokem byla analýza přežití s cílem identifikovat vztahy mezi expresními daty a celkovým a bezpříznakovým přežitím. Vztah mezi expresní hladinou každého genu a OS byl hodnocen pro celý soubor pacientů i zvlášť pro radikální a paliativní skupinu. U radikální skupiny pacientů byl navíc hodnocen vztah expresních dat a DFI (bepříznakové přežití) po operaci primárního nádoru. Pro každý sledovaný gen byly skupiny pacientů rozděleny na základě mediánu expresních hodnot daného genu a následně došlo k porovnání jednotlivých vzniklých podskupin. Pro každou analýzu byly vytvořeny Kaplan-Meier křivky a rozdíl byl testován Gehan-Wilcoxon, Cox-Mantel a log-rank testem.

Vztah lokalizace tumoru a genové exprese byl stanoven pomocí Mann-Whitney U testu poté, co byli pacienti rozděleni do dvou skupin dle lokalizace nádoru v tlustém střevě či v rektosigmoideu a rektu.

Korelace mezi jednotlivými expresními změnami byly testovány pomocí Spearmanova korelačního koeficientu.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Imunohistochemická detekce proteinů CD44 a CD133

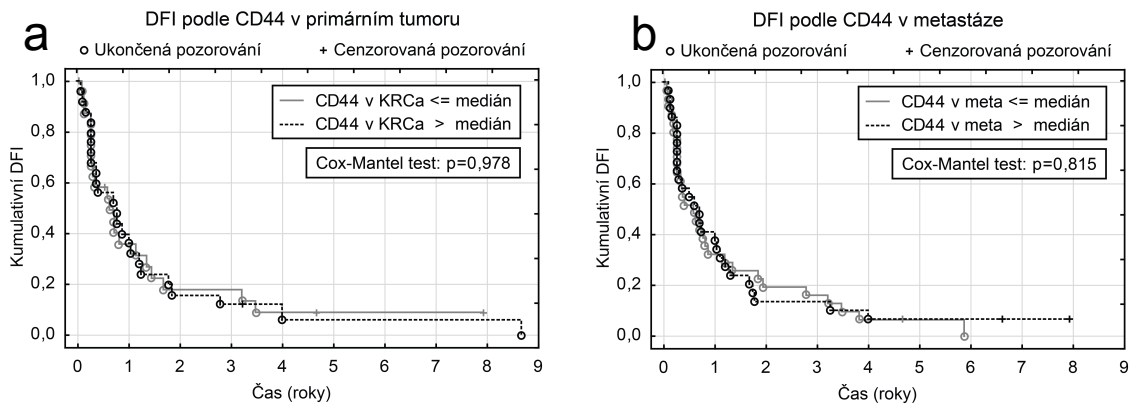
5.1.1 Výsledky

Celkově bylo do studie zahrnuto 94 pacientů s primárním KRCa a sekundárním ložiskem v jaterní tkáni. Vzorky s nízkou kvalitou obarvení byly z dalšího výzkumu vyřazeny. Ve sledovaném souboru dosahovalo celkové přežití v 1, 3 a 5 roce po operaci jaterní metastázy 88%, 65% a 35%, u bezpříznakového přežití byl podíl pacientů ve stejných časových okamžicích 38%, 16% a 8%.

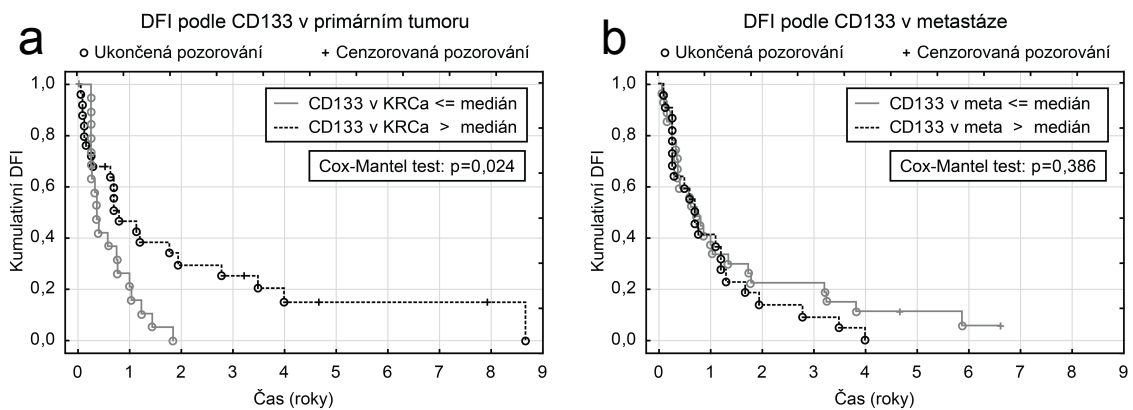
U CD44 intenzity nebyl pozorován žádný vztah mezi OS nebo DFI ani u jednoho typu vzorku (Kaplan-Meier křivky pro DFI jsou znázorněny v obrázku 3a a 3b). U CD133 značení v KRCa bylo pozorováno delší DFI u pacientů s pozitivitou nad medián studovaného souboru (Cox-Mantel $p = 0,0244$) (obrázek 4a), u jaterní metastázy žádný vztah značení k OS ani DFI pozorován nebyl (Kaplan-Meier graf pro DFI je na obrázku 4b). CD133 intenzita v KRCa se tak v našem souboru pacientů chovala jako pozitivní prognostický faktor. Toto pozorování bylo potvrzeno i Coxovým modelem proporcionálních rizik s použitím hodnoty CD133 positivity jako jediné nezávislé proměnné (chí-kvadrát $p = 0,0137$).

Poměr CD133 pozitivních a negativních žlázek se lišil v závislosti na gradingu nádoru, kdy v KRCa byla nižší pozitivita u nádoru stádia G1 oproti stádiu G2 (Mann-Whitney U test $p = 0,0248$) (obrázek 5a) a u CD133 v jaterní metastáze byla nižší pozitivita u pacientů stádia G1 v porovnání s pacienty stádia G2 nebo G3 (Mann-Whitney U test $p = 0,0470$) (obrázek 5b). Porovnání s TNM klasifikací ukázalo rozdíly v CD44 intenzitě, kdy vyšší intenzita byla u stádia N0 v porovnání se stádii N1 a N2 (Mann-Whitney U test $p = 0,0287$) (obrázek 6a) a rovněž při porovnání N0 pouze se skupinou N2 (Mann-Whitney U test $p = 0,0212$) (obrázek 6b).

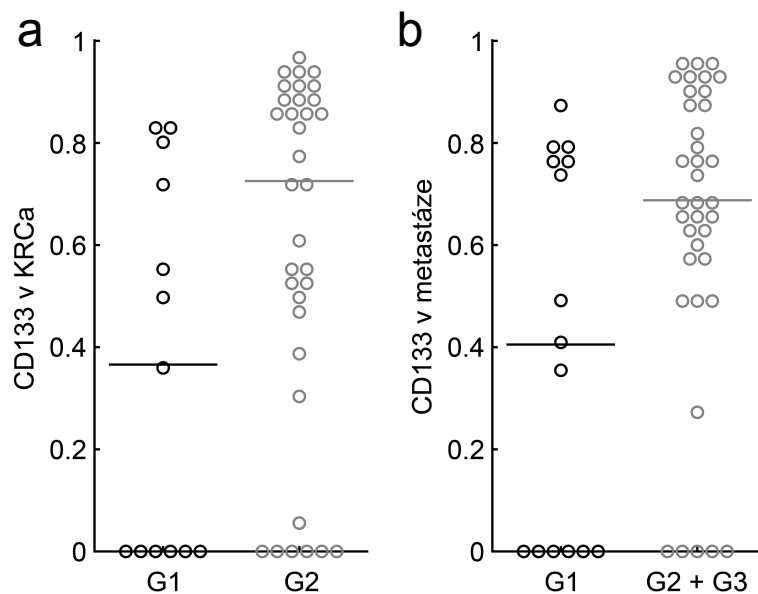
Spearmanova korelace odhalila vztah mezi CD133 pozitivitou u KRCa a jaterní metastázy (Spearman $R = 0,5466$, $p = 0,00068$).



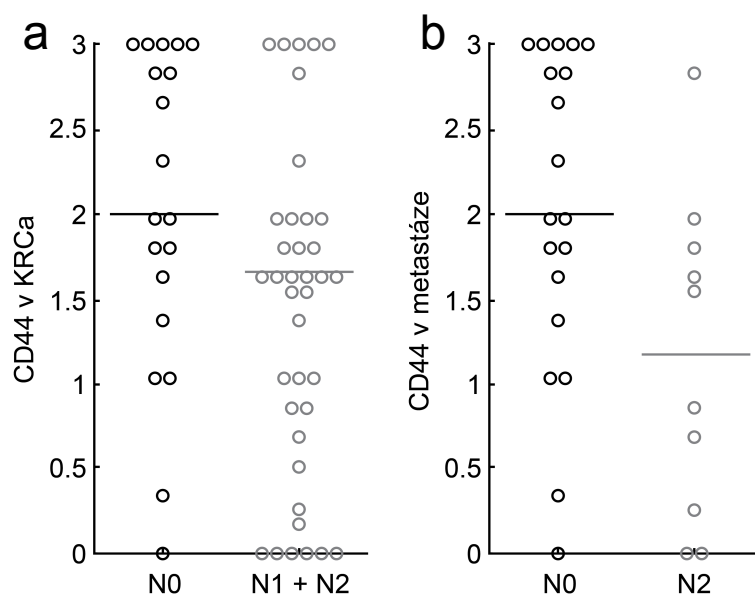
Obrázek 3 - Kaplan-Meier křivky porovnávající DFI u skupin pacientů ze studovaného souboru rozdělených dle mediánu intenzity značení proti CD44 v KRCA (a) a v jaterní metastáze (b). V obou případech se porovnávané skupiny mezi sebou signifikantně nelišily.



Obrázek 4 - Kaplan-Meier křivky porovnávající DFI u skupin pacientů ze studovaného souboru rozdělených dle mediánu intenzity značení proti CD133 v KRCA (a) a v jaterní metastáze (b). Vyšší procento CD133 pozitivních žlázek v KRCA bylo spojeno s prodloužením DFI.



Obrázek 5 - Korelace klinických dat s procentem CD133 pozitivních žlázek. (a) rozdílné hodnoty CD133 positivity v KRCa dle odlišného gradingu primárního tumoru, (b) rozdílné hodnoty CD133 positivity v jaterní metastáze na základě gradingu odpovídajícího primárního nádoru.



Obrázek 6 - Korelace klinických dat s intenzitou CD44 značení. (a) rozdílné hodnoty CD44 intenzity u KRCa dle odlišné invaze nádoru do lymfatických uzlin, (b) rozdílné hodnoty CD44 intenzity u jaterní metastázy na základě odlišné infiltrace uzlin odpovídajícího primárního nádoru.

5.1.2 Diskuze

Koncept nádorových kmenových buněk a jejich významu pro vývoj nádoru je široce přijímaný, nicméně spojení jednotlivých znaků CSC s klinickými údaji je stále velmi obtížné (Ren et al., 2013). U CD44 je problémem velké množství sestřihových variant s odlišnou funkcí a studie vlivu CD44 na klinické chování nádoru většinou neuspěly v nalezení vztahu k OS či DFI (Galizia et al., 2012; Langan et al., 2012; Li et al., 2013). Ke stejnému výsledku došla i předložená studie. CD44 tedy není možné použít jako jediného znaku ke zpřesnění prognózy pacientů. Nicméně byl v naší studii pozorován pokles intenzity barvení v primárním nádoru v sekvenci N0 – N1 – N2, tedy pacienti s nejvyšším postižením lymfatických uzlin (N2) vykazovali nejnižší pozitivitu na CD44. Tento jev by mohl být vysvětlován snadnější invazí nádorových buněk díky snížení CD44 – dependentní vazby na extracelulární hmotu (Galizia et al., 2012).

CD133 byl první znak používaný k identifikaci CSC u kolorektálního karcinomu (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). Problémem při imunohistochemické detekci CD133 může být maskování epitopu pro protilátku AC133/1 posttranslační modifikací během diferenciaci CSC, což může vést ke snížení vazby protilátky k cílové molekule (Kemper et al., 2010). Některé studie ukazují, že nikoliv pouhá pozitivita či negativita, ale že množství CD133 proteinu může odlišit buňky s odlišnou růstovou kapacitou (Liao et al., 2010). Rozsáhlá meta-analýza CD133 exprese v KRCa ukázala, že zvýšené množství CD133 proteinu koreluje s některými klinicko-patologickými faktory a že je možné zvýšené množství CD133 považovat za negativní prognostický znak (Chen et al., 2013). V našem úzce vymezeném souboru pacientů byl CD133 expresi přiřazen opačný vliv, kdy pacienti s větším množstvím CD133 pozitivních žlázek měli delší bezpříznakové přežití. Již dříve byla exprese CD133 spojena spíše s dobře a středně diferencovanými nádory v porovnání s nediferencovanými KRCa, které jsou spíše CD133 negativní (Horst et al., 2008). U metastatického KRCa bylo zjištěno, že CD133 jsou častěji v G1/G0 fázi buněčného cyklu než v S či G2/M fázi (Gharagozloo et al., 2012). Na základě těchto informací můžeme soudit, že CD133 je produkováno především v pomaleji se dělících

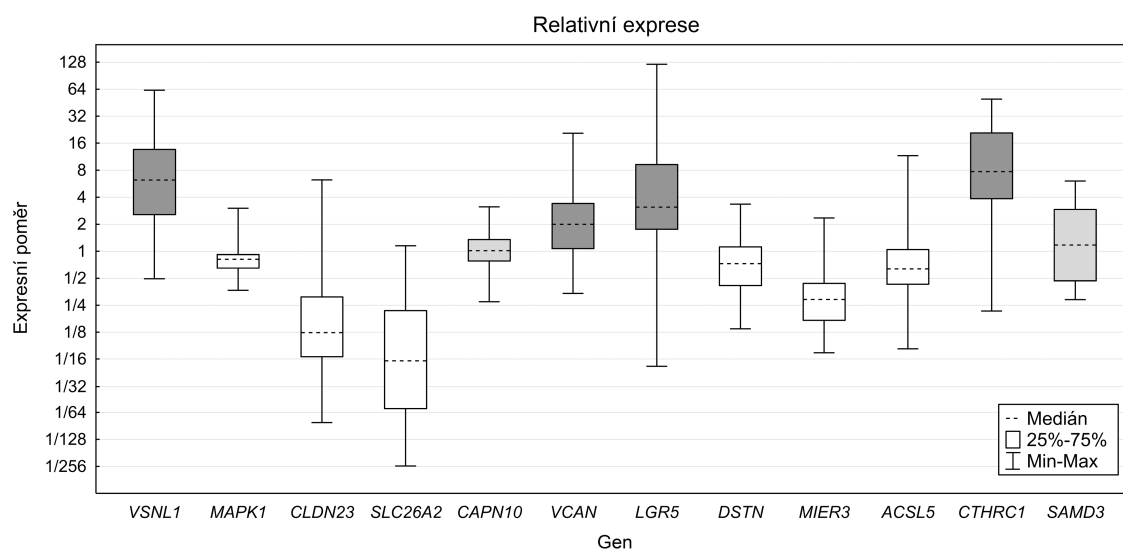
buňkách a také že je spojováno spíše s nádory s lepší prognózou. Tato data mohou osvětlit pozitivní prognostický efekt CD133 pozorovaný v naší studii.

Na základě pozorované asociace mezi prodloužením DFI a CD133 v KRCa a nikoliv v jaterní metastáze je možné spekulovat, že vlastnosti primárního nádoru mohou být pro recidivu onemocnění podstatnější než charakter jaterních metastáz.

5.2 Expresní profil vybraných genů u kolorektálního karcinomu

5.2.1 Výsledky

Deset genů vykazovalo rozdílnou expresní hladinu mezi zdravou a nádorovou tkání v celkovém souboru 53 pacientů. U čtyř genů byla detekována vyšší exprese v nádorové tkáni (*LGR5*, *CTHRC1*, *VSNL1* a *VCAN*), u šesti genů byla exprese v nádoru snížena (*DSTN*, *MIER3*, *ACSL5*, *MAPK1*, *CLDN23* a *SLC26A2*) (obrázek 7).



Obrázek 7 - Expresní změna studovaných genů při porovnání zdravé a nádorové tkáně. Bílé obdélníky znázorňují geny se sníženou expresí ve zdravé tkáni, tmavě šedé obdélníky geny se zvýšenou expresní hladinou v nádorové tkáni a světle šedé obdélníky geny, u nichž nebyla detekována statisticky významná změna expresní hladiny.

Ve studovaném souboru pacientů byl pozorovatelný rozdíl v celkovém přežití u pacientů zařazených do paliativní skupiny v porovnání s pacienty v radikální skupině (Cox-Mantel $p = 0,016$, Wilcoxon $p = 0,041$ a log-rank $p = 0,019$).

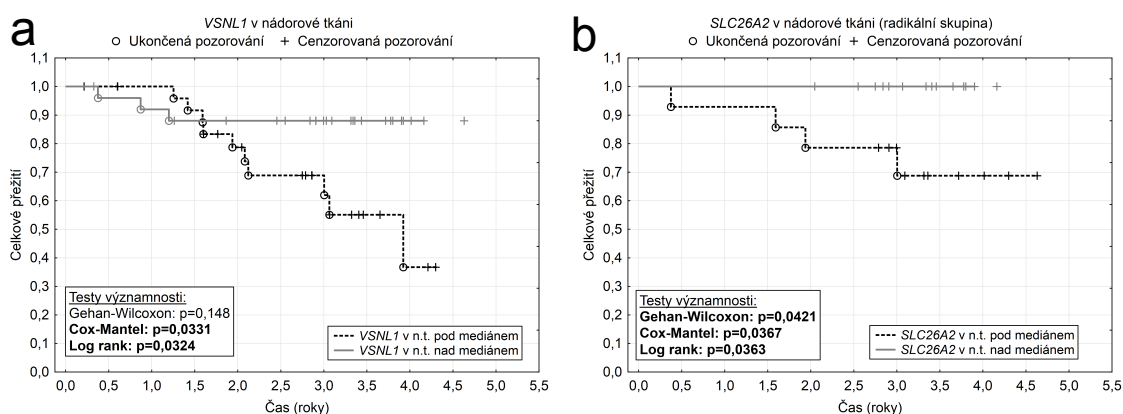
Při korelaci relativních expresních hladin s klinickými daty nebyl u žádného genu prokázán vztah s věkem, parametry TNM klasifikace ani s gradingem tumoru.

Celkové a bezpříznakové přežití bylo hodnoceno z pohledu exprese sledovaných genů v jednotlivých tkáních v porovnání s referenčními geny a rovněž z pohledu expresního rozdílu mezi zdravou a nádorovou tkání. V prvním případě byl na hladině významnosti $p = 0,05$ objeven vliv exprese *VSNL1* v nádorové tkáni na OS v kompletním souboru pacientů, kdy exprese *VNSL1* nad medián znamenala prodloužení OS (Cox-Mantel $p = 0,033$ a log-rank $p = 0,032$) (obrázek 8a). Při rozdělení pacientů do jednotlivých sledovaných podskupin byl u radikální skupiny pozorován vztah mezi expresí *SLC26A2* v nádorové tkáni nad medián souboru a delším OS (Cox-Mantel $p = 0,036$) (obrázek 8b). V případě DFI bylo v radikální skupině pacientů pozorováno prodloužení DFI při expresi *VSNL1* ve zdravé tkáni pod medián sledované populace (Cox-Mantel $p = 0,022$ a log-rank $p = 0,020$) (obrázek 9a) a při expresi *SLC26A2* ve zdravé tkáni nad medián sledované populace (Cox-Mantel $p = 0,012$, Wilcoxon $p = 0,014$ a log-rank $p = 0,011$) (obrázek 9b).

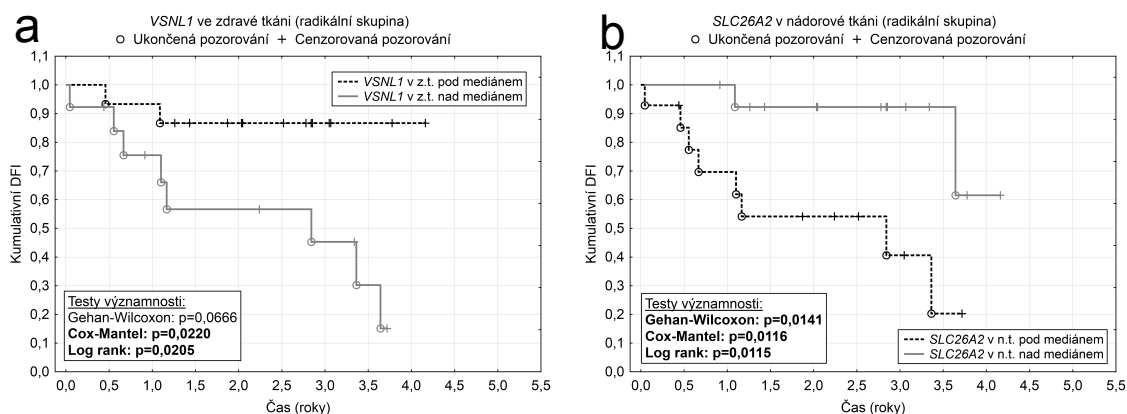
Hodnocení vztahu relativní exprese mezi zdravou a nádorovou tkání a OS a DFI přineslo celkem čtyři statisticky významné výsledky. V kompletním souboru pacientů znamenalo výrazné snížení expresní hladiny *CLDN23* zkrácení OS (Wilcoxon $p = 0,045$) (obrázek 10a). Další tři výsledky se týkaly pouze pacientů v radikální skupině, kdy méně výrazné snížení expresní hladiny *SLC26A2* a *ACSL5* značilo delší DFI (Wilcoxon $p = 0,046$, Cox-Mantel $p = 0,045$ a log-rank $p = 0,041$ pro *SLC26A2*, Wilcoxon $p = 0,040$ pro *ACSL5*) (obrázek 10b a 11a). U *LGR5* bylo prokázáno prodloužení DFI u pacientů s vyšším nárůstem expresní hladiny (Wilcoxon $p = 0,046$, Cox-Mantel $p = 0,028$ a log-rank $p = 0,026$) (obrázek 11b).

U lokalizace tumoru bylo porovnání expresních hladin všech 12 studovaných genů pomocí Man-Whitney U testu v nádorové tkáni nesignifikantní. U zdravé

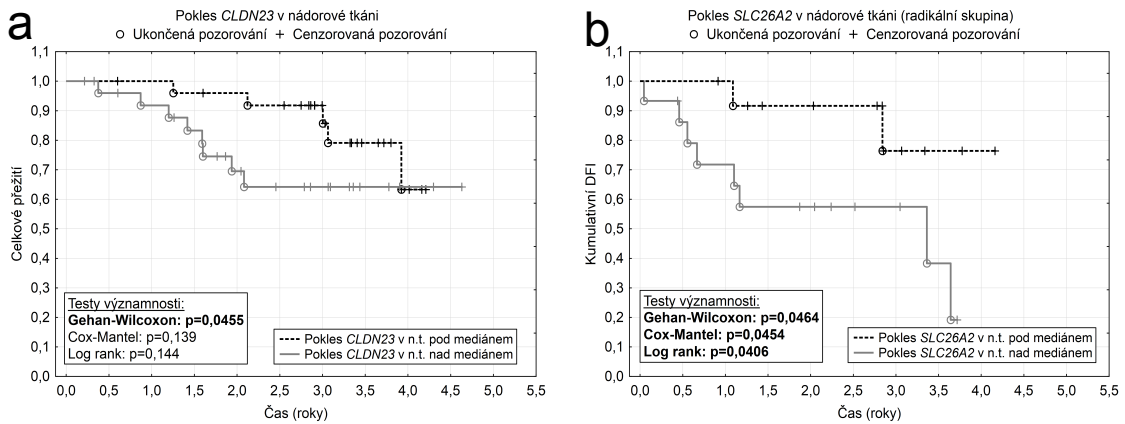
střevní sliznice byly popsány rozdíly v hladině *MAPK1* ($p = 0,032$), *LGR5* ($p = 0,003$), *MIER3* ($p = 0,026$) a *CTHRC1* ($p = 0,042$), kdy pacienti s tumorem lokalizovaným v tlustém střevě vykazovali vyšší hladinu těchto genů v porovnání s geny referenčními. Z pohledu relativní expresní změny byl pozorován rozdíl u genu *VCAN*, kdy pacienti s tumorem v tlustém střevě vykazovali menší nárůst exprese v nádorové tkáni oproti pacientů s tumorem v rektosigmoideu/rektu, kde byla expresní změna vyšší ($p = 0,031$).



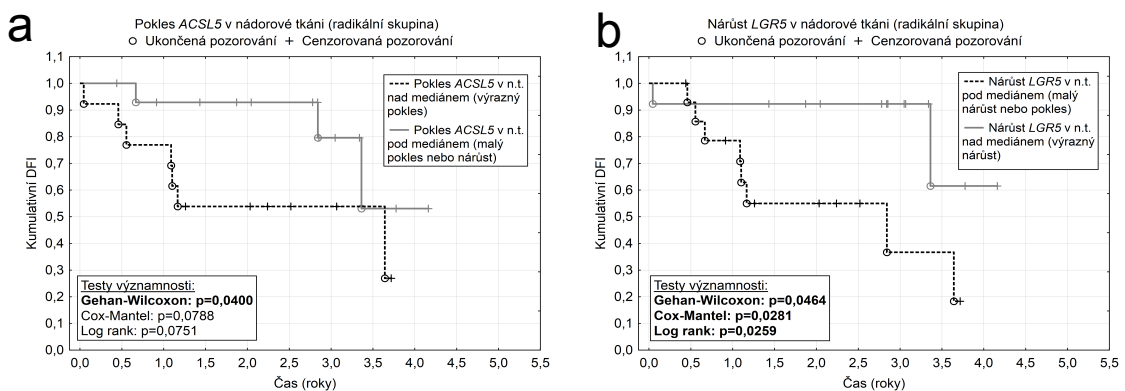
Obrázek 8 – (a) vliv *VSNL1* exprese v nádorové tkáni (n.t.) na OS v kompletním studovaném souboru; (b) vliv exprese *SLC26A2* v nádorové tkáni na OS u radikální skupiny.



Obrázek 9 – (a) vliv exprese *VSNL1* ve zdravé tkáni (z.t.) na DFI u radikální skupiny; (b) vliv exprese *SLC26A2* v nádorové tkáni na DFI u radikální skupiny.



Obrázek 10 – (a) vliv expresní změny *CLDN23* na OS v kompletním studovaném souboru; (b) vliv expresní změny *SLC26A2* na DFI u radikální skupiny.



Obrázek 11 – (a) vliv expresní změny *ACSL5* na DFI u radikální skupiny; (b) vliv expresní změny *LGR5* na DFI u radikální skupiny.

5.2.2 Diskuze

VSNL1

Tento gen kóduje protein pro neuronální vápníkový kanál a jeho funkcí je modulace aktivity adenylát cyklázy (Braunewell et al., 1997). V souvislosti s nádorovým onemocněním byl *VSNL1* popsán jako inhibitor proliferace u buněk odvozených od neuroblastomu, zároveň zvyšoval jejich migrační kapacitu (Xie et al., 2007). U epitelálních nádorů byl popsán jako supresor nemalobuněčného karcinomu plic (Fu et al., 2008) a inhibitor epitelu-mezenchymálního přechodu u

buněk skvamózního karcinomu (Schönrath et al., 2011). V případě kolorektálního karcinomu vykazoval *VSNL1* sníženou expresní hladinu u buněčné kultury HCT116 po zastavení buněčného cyklu pomocí selenomethioninu (Goulet et al., 2007) a byl zkoumán jako potenciální znak pro identifikaci cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi (Findeisen et al., 2008). V předchozích studiích byla popsána korelace mezi *VSNL1* expresí a infiltrací lymfatických uzlin nádorovými buňkami (Akagi et al., 2012), v námi studovaném souboru pacientů vztah pozorován nebyl. Přínosem studie byl popis vztahu mezi vyšší expresní hladinou *VSNL1* v nádorové tkáni a prodloužením OS, čímž by bylo možné ukázat na jeho potenciální roli jako nádorového supresoru i u kolorektálního karcinomu a doplnit tak data dostupná z jiných typů nádorů (Fu et al., 2008, 2010). Opačný efekt na zkrácení DFI u pacientů s vyšší expresí *VSNL1* ve zdravé tkáni je otázkou k dalšímu výzkumu.

VCAN

Protein kódovaný genem *VCAN* je jednou z hlavních složek extracelulární hmoty a hraje podstatnou roli v regulaci buněčné migrace (Zhang et al., 2012), proliferace (Miquel-Serra et al., 2006) a adheze (Evanko et al., 2012). V minulosti byl *VCAN* spojen s různými maligními onemocněními, například s karcinomem žaludku (Zhang et al., 2012), pankreatu (Skandalis et al., 2006) a kolorekta (Tsara et al., 2002). U námi zkoumaného souboru pacientů jsme prokázali zvýšení exprese genu *VCAN* v nádorové tkáni, což je v souladu se změnami na proteinové úrovni popsanými v literatuře (Theocharis, 2002; Tsara et al., 2002). Rozdíl ve změně exprese byl odlišný v závislosti na lokalizaci tumoru (rektum/sigmoideum oproti tlustému střevu). V naší studii změna exprese nekorelovala se žádným ze studovaných klinických parametrů.

LGR5

LGR5 protein je považován za jeden ze znaků fyziologických intestinálních a jaterních kmenových buněk (Becker et al., 2008; Huch et al., 2013). Předchozí studie ukazují na nárůst exprese *LGR5* v nádorové tkáni spojený s produkcí *LGR5* v takzvaných nádorových kmenových buňkách (Kleist et al., 2011; Uchida et al., 2010). U souboru pacientů studovaného v předkládané

studii bylo pozorováno zvýšení expresní hladiny v nádorové tkáni a statistická analýza ukázala na vztah mezi prodloužením DFI a vyšší expresí *LGR5*. Důvodem by mohl být vztah mezi expresí *LGR5* a buněčnou adhezí, kdy jsou potenciální nádorové kmenové buňky s vysokou hladinou *LGR5* pevněji vázány ve struktuře nádoru a buňky se sníženou produkcí *LGR5* jsou více schopné migrovat (Walker et al., 2011), což by vysvětlovalo kratší DFI u pacientů s nižším množstvím *LGR5* z důvodu snazšího rozsevu nádoru. Oproti tomu řada předchozích publikací popsala negativní efekt nárůstu exprese *LGR5* u pacientů s různými typy nádorů (Nakata et al., 2013; Simon et al., 2012; Wu et al., 2012). Vzhledem k rozporům ohledně efektu *LGR5* na prognózu KRCa připravujeme ověření výsledků na nezávislém souboru pacientů.

CTHRC1

Tento gen kóduje protein s popsanou rolí při remodelaci cévního řečiště (Pyagay et al., 2005) a jeho expresní změna byla pozorována v řadě typů solidních nádorů včetně nádoru tlustého střeva (Palma et al., 2012; Tang et al., 2006). Nedávno byl *CTHRC1* popsán jako prediktor sníženého přežívání u KRCa (Tan et al., 2013). V námi studovaném souboru tento gen vykázal nejvyšší nárůst exprese v nádorové tkáni, ale jeho vztah k prognóze potvrzen nebyl, přestože byl dobře pozorovatelný trend zkrácení OS u pacientů se zvýšenou hladinou *CTHRC1* v nádoru.

SLC26A2

Tento gen patří do rodiny aniontových výměníků a kanálů a jeho hlavní funkcí je přenos SO_4^{2-} aniontů. Změna v jeho funkci je příčinou části chondrodysplastických poruch (Alper and Sharma, 2013). In vitro byla nižší exprese *SLC26A2* spojena s vyšší proliferací buněčné linie odvozené od kolorektálního karcinomu (Yusa et al., 2010) a snížení exprese bylo pozorováno i u bioptických vzorků (Galamb et al., 2008). V našem souboru pacientů bylo detekováno výrazné snížení expresní hladiny *SLC26A2* v nádorové tkáni, které znamenalo snížení OS i DFI ve skupině radikálně léčených pacientů. Možnou příčinou vedoucí ke zkrácení OS i DFI může být nepřesné uspořádání extracelulární hmoty z důvodu aberantní sulfatace proteinů kvůli snížení

množství SLC26A2 proteinu, což může usnadnit migraci nádorových buněk skrze tkáň.

CLDN23

Tento gen je členem rodiny klaudinů, která u člověka čítá 24 zástupců kódujících proteiny se čtyřmi transmembránovými doménami s rolí ve tvorbě těsných spojů mezi sousedícími buňkami (Lal-Nag and Morin, 2009). *CLDN23* byl popsán jako gen se sníženou expresí u intestinálního typu nádoru žaludku (Katoh and Katoh, 2003). Naše studie odhalila snížení expresní hladiny i u kolorektálního karcinomu. Úroveň změny korelovala s prognózou celkového přežití. Pacienti s méně výrazným snížením expresní hladiny měli delší OS v porovnání s těmi, u nichž došlo k výraznému poklesu přepisu genu *CLDN23*. Protein *CLDN23*, stejně jako další členové rodiny klaudinů, hraje roli ve tvorbě těsných spojů mezi buňkami. Deregulace produkce klaudinů byla v poslední době spojena nejen s vyšší migrační schopností nádorových buněk, ale i s epitelo-mesenchymálním přechodem a nádorovými kmenovými buňkami, a jejich role v nádorové biologii je tedy pravděpodobně komplexnější, než se tušilo (Kwon, 2013).

ACSL5

Proteinový produkt tohoto genu je enzym s rolí v biosyntéze lipidů a degradaci mastných kyselin. Snížení exprese *ACSL5* bylo spojeno s karcinomem tenkého střeva (Gassler et al., 2003). U gliomů je exprese *ACSL5* považována za faktor zlepšující přežití pacientů (Mashima et al., 2009). Role *ACSL5* proteinu v buněčné apoptóze je spojena s proteinem mortalinem a aktivací p53 (Klaus et al., 2014). V předchozí studii věnované KRCa bylo pomocí microarray dat zjištěno zvýšení exprese v nádorové tkáni (Yeh et al., 2006), v naší studii bylo množství *ACSL5* mRNA nižší v nádorové tkáni oproti zdravé tkáni, navíc jsme pozorovali vztah mezi snížením exprese a zkrácením DFI, kdy nejkratší DFI měli pacienti s nejvýraznějším poklesem *ACSL5*. Tyto závěry ukazují na pravděpodobnou protektivní funkci proteinu *ASCL5* u KRCa, v souladu s údaji dostupnými z jiných typů nádorových onemocnění. U analýzy *ACSL5* exprese a rovněž funkce jsou problematické odlišné efekty jednotlivých

sestřihových variant, kdy například *ACSL5* o plné délce má pro-apoptotickou funkci (Gassler et al., 2007).

DSTN

DSTN gen kóduje aktin vazebný protein destrin, který hraje podstatnou roli v dynamice polymerizace aktinu jako aktin depolymerizační faktor (Bamburg and Wiggan, 2002). V souvislosti s nádorovým onemocněním byla role proteinu *DSTN* popsána během apoptózy indukované membránovým androgenovým receptorem u buněk nádoru prostaty (Papadopoulou et al., 2008) a jeho pozitivní efekt na migrační kapacitu neuroblastomových buněk (Lefranc et al., 2009). Snížení exprese *DSTN* bylo jedním z mechanismů vedoucích k zablokování migrace a invazivní schopnosti nádoru žaludku (Yu et al., 2013). V naší studii bylo pozorováno snížení mírné expresní hladiny *DSTN* v nádorové tkáni bez vztahu ke klinickým parametrům

MIER3

MIER3 je velice málo studovaným genem, až v roce 2012 byl asociován s nádorovými onemocněními jako kandidátní gen u nádorů prsu (denDekker et al., 2012) a zároveň se zařadil mezi nejčastěji mutované geny u vysoce mutovaných podtypů kolorektálního karcinomu (The Cancer Genome Atlas, 2012). Naše data ukázala sníženou expresi u KRCA bez pozorování silných vztahů ke klinickým datům.

MAPK1

Mitogen-aktivována proteinová kináza 1 je finální kinázou MAPK dráhy, která má mnoho různých rolí v buněčném životě včetně regulace proliferace, diferenciace či genové exprese (Zassadowski et al., 2012). V kolorektálním karcinomu bylo pozorováno snížení exprese v nádorové tkáni v předchozích studiích (Wang et al., 2000), stejně tomu bylo i v našich vzorcích, vztah ke klinickým parametrům pozorován nebyl.

SAMD3

Funkce *SAMD3* je neznámá, tento gen byl vybrán na základě možného zvýšení expresní hladiny během vývoje KRCA (Kleivi et al., 2007) a popsané interakci proteinu *SAMD3* s proteinem FANCG (Fanconi anemia, complementation group

G) (Rual et al., 2005), který hraje roli v udržování genomické integrity (Fei et al., 2005). Tato interakce by mohla mít podstatnou roli během vývoje KRCa. Díky absenci expresní změny *SAMD3* jsme nemohli hodnotit jeho vztah ke klinickým parametrům.

CAPN10

U genu *CAPN10*, vápníkem aktivované cysteinová proteázy (Ono and Sorimachi, 2012), byl dříve popsán jednonukleotidový polymorfismus spojený se susceptibilitou ke vzniku KRCa (Frances et al., 2007). V naší studii jsme se pokusili porovnat vztah mezi hladinou transkripce a klinickými parametry pacientů s KRCa, změna množství jeho mRNA mezi zdravou a nádorovou tkání ale nebyla detekována, a proto nebylo možné tento vztah hodnotit.

6 Závěry práce

V naší studii bylo prokázáno, že i často studované znaky spojované s nádorovými kmenovými buňkami, jako CD44 a CD133, mohou nést i jiný význam pro chování nádoru, než je v současnosti obecně přijímáno. Například u CD133 je možné pozorovat pozitivní i negativní prognostický význam. Naše studie byla od přechozích prací odlišná tím, že nehodnotila počet nádorových kmenových buněk či intenzitu značení CD133 protilátkou v jednotlivých buňkách, ale celkové množství CD133 pozitivních žlázek v poměru ke žlázkám negativním na CD133 barvení. Tento přístup, pokud by byl prognostický význam ověřen na validační skupině pacientů, by byl jednoduše hodnotitelný patologi při rutinním vyšetření nádorové tkáně, což by mohlo přinést nové znaky podstatné pro prognózu.

Zároveň je potřeba studovat roli jednotlivých proteinů, používaných jako znaky nádorových kmenových buněk, v biologii nádoru. Pochopení jejich funkce může pomoci s vysvětlením pozorovaných protichůdných vlastností při korelaci s klinickými daty, a usnadnit tak použití těchto znaků pro zpřesnění prognózy u pacientů s kolorektálním karcinomem.

V části věnované expresní hladině vybraných genů byla na studovaném souboru pacientů identifikována expresní změna mezi zdravou a nádorovou tkání u 10 genů. Nejdůležitějšími výsledky práce je spojení expresní změny *CLDN23* a celkového přežití pacientů a spojení expresních změn *SLC26A2*, *ACSL5* a *LGR5* s bezpříznakovým přežitím u pacientů, kteří v době primární operace neměli vzdálenou metastázu. I přes poměrně malý soubor studovaných pacientů jsou výsledky studie zajímavé, jelikož ukazují nové spojitosti mezi jednotlivými geny a prognózou u pacientů s kolorektálním karcinomem.

Kromě role jako prognostického faktoru mohou objevené vztahy mezi expresí genů a DFI či OS přinést nové informace i o biologii kolorektálního karcinomu. Například vliv expresní změny *ACSL5* svědčí o metabolické změně v nádorové tkáni, u *SLC26A2* zase o změně v transportu iontů přes membránu, přičemž

o přesném mechanismu a vlivu těchto změn na nádorové buňky je v současnosti možné pouze spekulovat.

Geny, jejichž expresní změna byla spojena s klinickými parametry, budou dále prozkoumány na rozšířeném souboru pacientů s cílem získat robustnější sadu dat. Zároveň byl vliv expresních změn použit pro konstrukci matematického modelu, který dokáže předpovídat prognózu pacientů na základě diferenciální exprese čtyř ze setu dvanácti studovaných genů s vyšší přesností, než jakou má prognóza založená pouze na jednom genu. Tento skórovací systém je v současnosti podrobován další analýze na novém souboru pacientů.

Z hlediska původních hypotéz se nám podařilo částečně potvrdit hypotézu I, kdy korelace mezi primárním nádorem a jeho metastázou byla nalezena u CD133. Hypotéza číslo II byla vyvrácena, vztah ke klinickým datům byl nalezen pouze u CD133 a to opačný, než bylo předpokládáno. Hypotéza číslo III byla potvrzena, když z dvanácti studovaných genů deset vykazovalo rozdílnou hladinu transkripce mezi zdravou a nádorovou tkání. I pro hypotézu číslo IV bylo pozorováno několik pozitivních spojení, které jsou rozebrány v předchozím textu.

Identifikace nových prognostických znaků je podstatná z pohledu zpřesnění odhadu dalšího rozvoje KRCa u jednotlivých pacientů. Prognostické znaky mají potenciál pomoci s rozdělením pacientů nejen dle patologického vyšetření, ale i dle molekulárních znaků. Cílem je rozlišit pacienty, u kterých je nezbytné použití onkologické léčby od těch, jejichž prognóza by podáním této léčby nebyla ovlivněna. Tato práce ukazuje nové znaky využitelné v prognóze KRCa, které by po jejich validaci bylo možné zařadit do prospektivních klinických studií.

7 Seznam literatury

- Aguilar-Gallardo, C., and Simón, C. (2013). Cells, stem cells, and cancer stem cells. *Semin. Reprod. Med.* 31, 5–13.
- Akagi, T., Hijiyama, N., Inomata, M., Shiraiishi, N., Moriyama, M., and Kitano, S. (2012). Visinin-like protein-1 overexpression is an indicator of lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* 131, 1307–1317.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3983–3988.
- Alper, S.L., and Sharma, A.K. (2013). The SLC26 gene family of anion transporters and channels. *Mol. Aspects Med.* 34, 494–515.
- Bamburg, J.R., and Wiggan, O.P. (2002). ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol.* 12, 598–605.
- Becker, L., Huang, Q., and Mashimo, H. (2008). Immunostaining of Lgr5, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue. *ScientificWorldJournal.* 8, 1168–1176.
- Benito, E., Stiggelbout, A., Bosch, F.X., Obrador, A., Kaldor, J., Mulet, M., and Muñoz, N. (1991). Nutritional factors in colorectal cancer risk: a case-control study in Majorca. *Int. J. Cancer* 49, 161–167.
- Bogaert, J., and Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann. Gastroenterol. Q. Publ. Hell. Soc. Gastroenterol.* 27, 9–14.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730–737.
- Braunewell, K.H., Spilker, C., Behnisch, T., and Gundelfinger, E.D. (1997). The neuronal calcium-sensor protein VILIP modulates cyclic AMP accumulation in stably transfected C6 glioma cells: amino-terminal myristoylation determines functional activity. *J. Neurochem.* 68, 2129–2139.
- Byström, P., Berglund, Å., Nygren, P., Wernroth, L., Johansson, B., Larsson, A., and Glimelius, B. (2012). Evaluation of predictive markers for patients with advanced colorectal cancer. *Acta Oncol.* 51, 849–859.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 65, 10946–10951.
- Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.-K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., et al. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10158–10163.
- denDekker, A.D., Xu, X., Vaughn, M.D., Puckett, A.H., Gardner, L.L., Lambring, C.J., Deschenes, L., and Samuelson, D.J. (2012). Rat Mcs1b is concordant to the genome-wide association-identified breast cancer risk locus at human 5q11.2 and MIER3 is a candidate cancer susceptibility gene. *Cancer Res.* 72, 6002–6012.
- Duffy, M.J., Lamerz, R., Haglund, C., Nicolini, A., Kalousová, M., Holubec, L., and Sturgeon, C. (2014). Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update. *Int. J. Cancer* 134, 2513–2522.
- Evanko, S.P., Potter-Perigo, S., Bolyky, P.L., Nepom, G.T., and Wight, T.N. (2012). Hyaluronan and versican in the control of human T-lymphocyte adhesion and migration. *Matrix Biol.* 31, 90–100.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.
- Fei, P., Yin, J., and Wang, W. (2005). New advances in the DNA damage response network of Fanconi anemia and BRCA proteins. FAAP95 replaces BRCA2 as the true FANCB protein. *Cell Cycle* 4, 80–86.
- Findeisen, P., Röckel, M., Nees, M., Röder, C., Kienle, P., Von Knebel Doeberitz, M., Kalthoff, H., and Neumaier, M. (2008). Systematic identification and validation of candidate genes for detection of circulating tumor cells in peripheral blood specimens of colorectal cancer patients. *Int. J. Oncol.* 33, 1001–1010.
- Frances, C.P., Conde, M.C., Saez, M.E., Diez, S.F., Rey, C.M., Ramírez-Armengol, J.A., Pascual, M.H., Gonzalez-Perez, A., Torres, P.P., Real, L.M., et al. (2007). Identification of a protective haplogenotype within CAPN10 gene influencing colorectal cancer susceptibility. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22, 2298–2302.
- French, A.J., Sargent, D.J., Burgart, L.J., Foster, N.R., Kabat, B.F., Goldberg, R., Shepherd, L., Windschitl, H.E., and Thibodeau, S.N. (2008). Prognostic significance of defective mismatch repair and BRAF V600E in patients with colon cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 3408–3415.
- Friedman, M.D., Jeevan, D.S., Tobias, M., Murali, R., and Jhanwar-Uniyal, M. (2013). Targeting cancer stem cells in glioblastoma multiforme using mTOR inhibitors and the differentiating agent all-trans retinoic acid. *Oncol. Rep.* 30, 1645–1650.
- Fu, J., Fong, K., Bellacosa, A., Ross, E., Apostolou, S., Bassi, D.E., Jin, F., Zhang, J., Cairns, P., Ibañez de Caceres, I., et al. (2008). VILIP-1 downregulation in non-small cell lung carcinomas: mechanisms and prediction of survival. *PLoS One* 3, e1698.

- Fu, J., Jin, F., Zhang, J., Fong, K., Bassi, D.E., Lopez De Cicco, R., Ramaraju, D., Braunewell, K.-H., Conti, C., Benavides, F., et al. (2010). VILIP-1 expression in vivo results in decreased mouse skin keratinocyte proliferation and tumor development. *PLoS One* 5, e10196.
- Galamb, O., Sipos, F., Solymosi, N., Spisák, S., Krenács, T., Tóth, K., Tulassay, Z., and Molnár, B. (2008). Diagnostic mRNA expression patterns of inflamed, benign, and malignant colorectal biopsy specimen and their correlation with peripheral blood results. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17, 2835–2845.
- Galizia, G., Gemei, M., Del Vecchio, L., Zamboli, A., Di Noto, R., Mirabelli, P., Salvatore, F., Castellano, P., Orditura, M., De Vita, F., et al. (2012). Combined CD133/CD44 expression as a prognostic indicator of disease-free survival in patients with colorectal cancer. *Arch. Surg.* 147, 18–24.
- Gassler, N., Schneider, A., Kopitz, J., Schnölzer, M., Obermüller, N., Kartenbeck, J., Otto, H.F., and Autschbach, F. (2003). Impaired expression of Acyl-CoA-synthetase 5 in epithelial tumors of the small intestine. *Hum. Pathol.* 34, 1048–1052.
- Gassler, N., Roth, W., Funke, B., Schneider, A., Herzog, F., Tischendorf, J.J.W., Grund, K., Penzel, R., Bravo, I.G., Mariadason, J., et al. (2007). Regulation of enterocyte apoptosis by acyl-CoA synthetase 5 splicing. *Gastroenterology* 133, 587–598.
- Gharagozloo, M., Mirzaei, H.R., Bagherpour, B., Rezaei, A., Kalantari, H., Sanei, M.H., Hosseini, M., Mohajeri, G., Tabatabai, A., and Hashemi, M. (2012). Cell cycle analysis of the CD133(+) and CD133(-) cells isolated from human colorectal cancer. *J. Cancer Res. Ther.* 8, 399–403.
- Goulet, A.-C., Watts, G., Lord, J.L., and Nelson, M.A. (2007). Profiling of selenomethionine responsive genes in colon cancer by microarray analysis. *Cancer Biol. Ther.* 6, 494–503.
- Grady, W.M. (2003a). Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology* 124, 1574–1594.
- Grady, W.M. (2003b). Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology* 124, 1574–1594.
- Grady, W.M., and Carethers, J.M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 135, 1079–1099.
- Gray, R., Barnwell, J., McConkey, C., Hills, R.K., Williams, N.S., and Kerr, D.J. (2007). Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 370, 2020–2029.
- Haigis, K.M., Kendall, K.R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M.C., Glickman, J.N., Niwa-Kawakita, M., Sweet-Cordero, A., Sebolt-Leopold, J., Shannon, K.M., et al. (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat. Genet.* 40, 600–608.
- Hampel, H., Frankel, W.L., Martin, E., Arnold, M., Khanduja, K., Kuebler, P., Clendenning, M., Sotamaa, K., Prior, T., Westman, J.A., et al. (2008). Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 5783–5788.
- Hlavata, I., Mohelnikova-Duchonova, B., Vaclavikova, R., Liska, V., Pitule, P., Novak, P., Bruha, J., Vycital, O., Holubec, L., Treska, V., et al. (2012). The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* 27, 187–196.
- Horst, D., Kriegl, L., Engel, J., Kirchner, T., and Jung, A. (2008). CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 99, 1285–1289.
- Houlston, R.S. (2001). What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol. Pathol.* 54, 206–214.
- Huang, E.H., Hynes, M.J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J.Z., Wicha, M.S., and Boman, B.M. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* 69, 3382–3389.
- Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., van Es, J.H., Li, V.S.W., van de Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., et al. (2013). In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494, 247–250.
- Chaput, N., Svrcek, M., Aupérin, A., Locher, C., Drusch, F., Malka, D., Taïeb, J., Goéré, D., Ducreux, M., and Boige, V. (2013). Tumour-infiltrating CD68+ and CD57+ cells predict patient outcome in stage II-III colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 109, 1013–1022.
- Chen, S., Song, X., Chen, Z., Li, X., Li, M., Liu, H., and Li, J. (2013). CD133 expression and the prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 8, e56380.
- Iacopetta, B., Russo, A., Bazan, V., Dardanoni, G., Gebbia, N., Soussi, T., Kerr, D., Elsaleh, H., Soong, R., Kandioler, D., et al. (2006). Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Study. *Ann. Oncol.* 17, 842–847.
- Ishii, H., Iwatsuki, M., Ieta, K., Ohta, D., Haraguchi, N., Mimori, K., and Mori, M. (2008). Cancer stem cells and chemoradiation resistance. *Cancer Sci.* 99, 1871–1877.
- Issa, J.-P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 988–993.
- Jorissen, R.N., Gibbs, P., Christie, M., Prakash, S., Lipton, L., Desai, J., Kerr, D., Aaltonen, L.A., Arango, D., Kruhøffer, M., et al. (2009). Metastasis-Associated Gene Expression Changes Predict Poor Outcomes in Patients with Dukes Stage B and C Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* 15, 7642–7651.

Juo, Y.Y., Johnston, F.M., Zhang, D.Y., Juo, H.H., Wang, H., Pappou, E.P., Yu, T., Easwaran, H., Baylin, S., van Engeland, M., et al. (2014). Prognostic value of CpG island methylator phenotype among colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Oncol.*

Katoh, M., and Katoh, M. (2003). CLDN23 gene, frequently down-regulated in intestinal-type gastric cancer, is a novel member of CLAUDIN gene family. *Int. J. Mol. Med.* *11*, 683–689.

Kelley, R.K., and Venook, A.P. (2011). Prognostic and predictive markers in stage II colon cancer: is there a role for gene expression profiling? *Clin. Colorectal Cancer* *10*, 73–80.

Kemper, K., Sprick, M.R., de Bree, M., Scopelliti, A., Vermeulen, L., Hoek, M., Zeilstra, J., Pals, S.T., Mehmet, H., Stassi, G., et al. (2010). The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res.* *70*, 719–729.

Klaus, C., Kaemmerer, E., Reinartz, A., Schneider, U., Plum, P., Jeon, M.K., Hose, J., Hartmann, F., Schnölzer, M., Wagner, N., et al. (2014). TP53 status regulates ACSL5-induced expression of mitochondrial mortalin in enterocytes and colorectal adenocarcinomas. *Cell Tissue Res.* *357*, 267–278.

Kleist, B., Xu, L., Li, G., and Kersten, C. (2011). Expression of the adult intestinal stem cell marker Lgr5 in the metastatic cascade of colorectal cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *4*, 327–335.

Kleivi, K., Lind, G.E., Diep, C.B., Meling, G.I., Brandal, L.T., Nesland, J.M., Myklebost, O., Rognum, T.O., Giercksky, K.-E., Skotheim, R.I., et al. (2007). Gene expression profiles of primary colorectal carcinomas, liver metastases, and carcinomatoses. *Mol. Cancer* *6*, 2.

Krieg, A., Werner, T.A., Verde, P.E., Stoecklein, N.H., and Knoefel, W.T. (2013). Prognostic and clinicopathological significance of survivin in colorectal cancer: a meta-analysis. *PLoS One* *8*, e65338.

Kwon, M.J. (2013). Emerging roles of claudins in human cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 18148–18180.

Kwong, K.Y., Bloom, G.C., Yang, I., Boulware, D., Coppola, D., Haseman, J., Chen, E., McGrath, A., Makusky, A.J., Taylor, J., et al. (2005). Synchronous global assessment of gene and protein expression in colorectal cancer progression. *Genomics* *86*, 142–158.

Lal-Nag, M., and Morin, P.J. (2009). The claudins. *Genome Biol.* *10*, 235.

Lam, C.S.-C., Cheung, A.H.-K., Wong, S.K.-M., Wan, T.M.-H., Ng, L., Chow, A.K.-M., Cheng, N.S.-M., Pak, R.C.-H., Li, H.-S., Man, J.H.-W., et al. (2014). Prognostic significance of CD26 in patients with colorectal cancer. *PLoS One* *9*, e98582.

Langan, R.C., Mullinax, J.E., Ray, S., Raiji, M.T., Schaub, N., Xin, H.-W., Koizumi, T., Steinberg, S.M., Anderson, A., Wiegand, G., et al. (2012). A Pilot Study Assessing the Potential Role of non-CD133 Colorectal Cancer Stem Cells as Biomarkers. *J. Cancer* *3*, 231–240.

Lea, I.A., Jackson, M.A., and Dunnick, J.K. (2009). Genetic pathways to colorectal cancer. *Mutat. Res.* *670*, 96–98.

Lee, W.-S., Kang, M., Baek, J.-H., Lee, J.-I., and Ha, S.Y. (2013). Clinical impact of tumor-infiltrating lymphocytes for survival in curatively resected stage IV colon cancer with isolated liver or lung metastasis. *Ann. Surg. Oncol.* *20*, 697–702.

Lefranc, F., Sauvage, S., Van Goietsenoven, G., Mégalizzi, V., Lamoral-Theys, D., Debeir, O., Spiegl-Kreinecker, S., Berger, W., Mathieu, V., Decaestecker, C., et al. (2009). Narciclasine, a plant growth modulator, activates Rho and stress fibers in glioblastoma cells. *Mol. Cancer Ther.* *8*, 1739–1750.

Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* *67*, 1030–1037.

Li, X.-D., Ji, M., Wu, J., Jiang, J.-T., and Wu, C.-P. (2013). Clinical significance of CD44 variants expression in colorectal cancer. *Tumori* *99*, 88–92.

Liao, Y., Hu, X., Huang, X., and He, C. (2010). Quantitative analyses of CD133 expression facilitate researches on tumor stem cells. *Biol. Pharm. Bull.* *33*, 738–742.

Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., and Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.* *343*, 78–85.

Liska, V., Vycital, O., Daum, O., Novak, P., Treska, V., Bruha, J., Pitule, P., and Holubec, L. (2012). Infiltration of colorectal carcinoma by S100+ dendritic cells and CD57+ lymphocytes as independent prognostic factors after radical surgical treatment. *Anticancer Res.* *32*, 2129–2132.

Markowitz, S.D., and Bertagnolli, M.M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *361*, 2449–2460.

Mashima, T., Sato, S., Okabe, S., Miyata, S., Matsuura, M., Sugimoto, Y., Tsuruo, T., and Seimiya, H. (2009). Acyl-CoA synthetase as a cancer survival factor: its inhibition enhances the efficacy of etoposide. *Cancer Sci.* *100*, 1556–1562.

Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., and Coppedè, F. (2011). Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* *2011*, article ID 792362.

Miquel-Serra, L., Serra, M., Hernández, D., Domenzain, C., Docampo, M.J., Rabanal, R.M., de Torres, I., Wight, T.N., Fabra, A., and Bassols, A. (2006). V3 versican isoform expression has a dual role in human melanoma tumor growth and metastasis. *Lab. Invest.* *86*, 889–901.

Nakata, S., Campos, B., Bageritz, J., Bermejo, J.L., Becker, N., Engel, F., Acker, T., Momma, S., Herold-Mende, C., Lichter, P., et al. (2013). LGR5 is a marker of poor prognosis in glioblastoma and is required for survival of brain cancer stem-like cells. *Brain Pathol.* *23*, 60–72.

O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* *445*, 106–110.

- O'Connell, M.J., Lavery, I., Yothers, G., Paik, S., Clark-Langone, K.M., Lopatin, M., Watson, D., Baehner, F.L., Shak, S., Baker, J., et al. (2010). Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3937–3944.
- Ono, Y., and Sorimachi, H. (2012). Calpains: an elaborate proteolytic system. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**, 224–236.
- Palma, M., Lopez, L., García, M., de Roja, N., Ruiz, T., García, J., Rosell, E., Vela, C., Rueda, P., and Rodriguez, M.-J. (2012). Detection of collagen triple helix repeat containing-1 and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3 in colorectal cancer. *BMC Clin. Pathol.* **12**, 2.
- Papadopoulos, N., Charalampopoulos, I., Alevizopoulos, K., Gravanis, A., and Stournaras, C. (2008). Rho/ROCK/actin signaling regulates membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells. *Exp. Cell Res.* **314**, 3162–3174.
- Patel, S.G., and Ahnen, D.J. (2012). Familial colon cancer syndromes: an update of a rapidly evolving field. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **14**, 428–438.
- Popat, S., Hubner, R., and Houlston, R.S. (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J. Clin. Oncol.* **23**, 609–618.
- Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* **359**, 235–237.
- Pygay, P., Heroult, M., Wang, Q., Lehnert, W., Belden, J., Liaw, L., Friesel, R.E., and Lindner, V. (2005). Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration. *Circ. Res.* **96**, 261–268.
- Ren, F., Sheng, W.-Q., and Du, X. (2013). CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. *World J. Gastroenterol.* **19**, 2603–2611.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111–115.
- Rual, J.-F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G.F., Gibbons, F.D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., et al. (2005). Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* **437**, 1173–1178.
- Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 1412–1417.
- Shmelkov, S. V., Butler, J.M., Hooper, A.T., Hormigo, A., Kushner, J., Milde, T., St Clair, R., Baljevic, M., White, I., Jin, D.K., et al. (2008). CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J. Clin. Invest.* **118**, 2111–2120.
- Schönrath, K., Pan, W., Klein-Szanto, A.J., and Braunewell, K.-H. (2011). Involvement of VILIP-1 (visinin-like protein) and opposite roles of cyclic AMP and GMP signaling in *in vitro* cell migration of murine skin squamous cell carcinoma. *Mol. Carcinog.* **50**, 319–333.
- Simon, E., Petke, D., Böger, C., Behrens, H.-M., Warneke, V., Ebert, M., and Röcken, C. (2012). The spatial distribution of LGR5+ cells correlates with gastric cancer progression. *PLoS One* **7**, e35486.
- Skandalis, S.S., Kletsas, D., Kyriakopoulou, D., Stavropoulos, M., and Theocharis, D.A. (2006). The greatly increased amounts of accumulated versican and decorin with specific post-translational modifications may be closely associated with the malignant phenotype of pancreatic cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**, 1217–1225.
- Söreide, K., Janssen, E.A.M., Söiland, H., Körner, H., and Baak, J.P.A. (2006). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br. J. Surg.* **93**, 395–406.
- Tan, F., Liu, F., Liu, H., Hu, Y., Liu, D., and Li, G. (2013). CTHRC1 is associated with peritoneal carcinomatosis in colorectal cancer: a new predictor for prognosis. *Med. Oncol.* **30**, 473.
- Tang, L., Dai, D.L., Su, M., Martinka, M., Li, G., and Zhou, Y. (2006). Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid cancers. *Clin. Cancer Res.* **12**, 3716–3722.
- The Cancer Genome Atlas (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330–337.
- Theocharis, A.D. (2002). Human colon adenocarcinoma is associated with specific post-translational modifications of versican and decorin. *Biochim. Biophys. Acta* **1588**, 165–172.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B., and Issa, J.P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8681–8686.
- Tsara, M.E., Theocharis, A.D., and Theocharis, D.A. (2002). Compositional and structural alterations of proteoglycans in human rectum carcinoma with special reference to versican and decorin. *Anticancer Res.* **22**, 2893–2898.
- Uchida, H., Yamazaki, K., Fukuma, M., Yamada, T., Hayashida, T., Hasegawa, H., Kitajima, M., Kitagawa, Y., and Sakamoto, M. (2010). Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer. *Cancer Sci.* **101**, 1731–1737.
- Vermeulen, L., and Snippert, H.J. (2014). Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 468–480.

- Vermeulen, L., Todaro, M., de Sousa Mello, F., Sprick, M.R., Kemper, K., Perez Alea, M., Richel, D.J., Stassi, G., and Medema, J.P. (2008). Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 13427–13432.
- Walker, F., Zhang, H.-H., Odorizzi, A., and Burgess, A.W. (2011). LGR5 is a negative regulator of tumorigenicity, antagonizes Wnt signalling and regulates cell adhesion in colorectal cancer cell lines. *PLoS One* *6*, e22733.
- Walther, A., Houlston, R., and Tomlinson, I. (2008). Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* *57*, 941–950.
- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., and Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 489–499.
- Wang, Q., Ding, Q., Dong, Z., Ehlers, R.A., and Evers, B.M. (2000). Downregulation of mitogen-activated protein kinases in human colon cancers. *Anticancer Res.* *20*, 75–83.
- Wang, Y., Jatko, T., Zhang, Y., Mutch, M.G., Talantov, D., Jiang, J., McLeod, H.L., and Atkins, D. (2004). Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J. Clin. Oncol.* *22*, 1564–1571.
- Wheeler, J.M., Beck, N.E., Kim, H.C., Tomlinson, I.P., Mortensen, N.J., and Bodmer, W.F. (1999). Mechanisms of inactivation of mismatch repair genes in human colorectal cancer cell lines: the predominant role of hMLH1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 10296–10301.
- Wu, A.H., Paganini-Hill, A., Ross, R.K., and Henderson, B.E. (1987). Alcohol, physical activity and other risk factors for colorectal cancer: a prospective study. *Br. J. Cancer* *55*, 687–694.
- Wu, X.-S., Xi, H.-Q., and Chen, L. (2012). Lgr5 is a potential marker of colorectal carcinoma stem cells that correlates with patient survival. *World J. Surg. Oncol.* *10*, 244.
- Xie, Y., Chan, H., Fan, J., Chen, Y., Young, J., Li, W., Miao, X., Yuan, Z., Wang, H., Tam, P.K.H., et al. (2007). Involvement of visinin-like protein-1 (VSNL-1) in regulating proliferative and invasive properties of neuroblastoma. *Carcinogenesis* *28*, 2122–2130.
- Yeh, C.-S., Wang, J.-Y., Cheng, T.-L., Juan, C.-H., Wu, C.-H., and Lin, S.-R. (2006). Fatty acid metabolism pathway play an important role in carcinogenesis of human colorectal cancers by Microarray-Bioinformatics analysis. *Cancer Lett.* *233*, 297–308.
- Yothers, G., O'Connell, M.J., Lee, M., Lopatin, M., Clark-Langone, K.M., Millward, C., Paik, S., Sharif, S., Shak, S., and Wolmark, N. (2013). Validation of the 12-gene colon cancer recurrence score in NSABP C-07 as a predictor of recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with fluorouracil and leucovorin (FU/LV) and FU/LV plus oxaliplatin. *J. Clin. Oncol.* *31*, 4512–4519.
- Yu, J., Liang, Q.Y., Wang, J., Cheng, Y., Wang, S., Poon, T.C.W., Go, M.Y.Y., Tao, Q., Chang, Z., and Sung, J.J.Y. (2013). Zinc-finger protein 331, a novel putative tumor suppressor, suppresses growth and invasiveness of gastric cancer. *Oncogene* *32*, 307–317.
- Yusa, A., Miyazaki, K., Kimura, N., Izawa, M., and Kannagi, R. (2010). Epigenetic silencing of the sulfate transporter gene DTDST induces sialyl Lewisx expression and accelerates proliferation of colon cancer cells. *Cancer Res.* *70*, 4064–4073.
- Zassadowski, F., Rochette-Egly, C., Chomienne, C., and Cassinat, B. (2012). Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cell. Signal.* *24*, 2369–2377.
- Zavoral, M. (2009). Colorectal cancer screening in Europe. *World J. Gastroenterol.* *15*, 5907.
- Zhang, Z., Zhang, J., Miao, L., Liu, K., Yang, S., Pan, C., and Jiao, B. (2012). Interleukin-11 promotes the progress of gastric carcinoma via abnormally expressed versican. *Int. J. Biol. Sci.* *8*, 383–393.

8 Poděkování

Závěrem bych rád poděkoval všem svým blízkým, rodině i spolupracovníkům, bez nichž by příprava a tvorba této práce nebyla možná.

Rád bych poděkoval mé vedoucí, Doc. MUDr. Mileně Králíčkové, PhD., za vždy vlídné jednání, zajištění skvělých podmínek pro práci a možnost vyučovat studenty Lékařské fakulty, což mi přineslo řadu neocenitelných zkušeností. Chtěl bych poděkovat MUDr. Václavu Liškovi, PhD. za zapojení do jeho projektů, cenné rady a organizaci sběru vzorků, bez nichž by moje práce nebyla možná.

Na závěr děkuji finanční podpoře mého výzkumu, která přišla z mnoha zdrojů –, IGA MZ CR 12025 a 14329, GAUK 1268213, projekt ED2.1.00/03.0076 Evropského fondu regionálního rozvoje a řada Specifických vysokoškolských výzkumů hlavní řešitelky Doc. MUDr. Milena Králíčkové, PhD.