

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Kristina Vuković Đerfi

**POVEZANOST MIKROSATELITNIH NESTABILNOSTI
MSI I EMAS S RECEPTOROM TLR4 U TUMORIGENEZI
SPORADIČNOG KARCINOMA KOLONA**

Doktorski rad

Osijek, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: biologija, temeljne medicinske znanosti

Povezanost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMASST s receptorom TLR4 u tumorigenezi sporadičnog karcinoma kolona

Kristina Vuković Đerfi

Rad je izrađen u: Laboratoriju za personaliziranu medicinu, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Mentor/i: Prof. dr. sc. Sanja Kapitanović, dr. med., znanstvena savjetnica u trajnom zvanju IRB; dr. sc. Sonja Marinović

Kratki sažetak doktorskog rada:

Većina sporadičnih karcinoma debelog crijeva (CRC) pokazuje gubitak funkcije sustava za popravak DNA koji se očituje mikrosatelitnom nestabilnosti (MSI i/ili EMASST). U ovom radu ispitali smo ulogu receptora TLR4 u podskupinama sporadičnih CRC s obzirom na prisutnost MSI i/ili EMASST. U stabilnim tumorima ekspresija mRNA/proteina TLR4 bila je značajno viša u središtu tumora u odnosu na invazivnu frontu tumora. U odnosu na stabilne tumore, ekspresija proteina TLR4 bila je značajno niža u središtu visokonestabilnih tumora (MSI-H/EMASST-H), dok je visoka ekspresija mRNA i proteina TLR4 dokazana u stromi invazivne fronte ovih tumora. Rezultati ovog istraživanja doprinijet će razumijevanju uloge TLR4 u tumorigenezi podskupina sporadičnih karcinoma debelog crijeva.

Broj stranica: 154

Broj slika: 31

Broj tablica: 11

Broj literaturnih navoda: 333

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: sporadični karcinom debelog crijeva, mikrosatelitna nestabilnost, receptor TLR4

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Doc. dr. sc. Tanja Matijević Glavan
2. Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić
3. Prof. dr. sc. Vera Cesar, redoviti profesor u trajnom zvanju

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruder Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary area of science

Scientific Fields: biology, basic medical sciences

The association of TLR4 and MSI/EMAST microsatellite instability in sporadic colorectal cancer tumorigenesis

Kristina Vuković Đerfi

Thesis performed at: Laboratory for personalized medicine, Division of molecular medicine, Ruder Bošković Institute (RBI), Zagreb

Supervisor/s: Prof. Sanja Kapitanović, M.D., PhD, Senior scientist at RBI; Sonja Marinović, PhD

Short abstract:

Majority of sporadic colorectal cancers (CRCs) shows defective mismatch repair system reflected by microsatellite instability (MSI and/or EMMET). Due to tight association of MSI and EMMET with inflammation, our study aimed to investigate the role of TLR4 receptor in sporadic CRC subtypes stratified by the presence of MSI and EMMET. Results showed that stable tumors have higher TLR4 mRNA/protein expression in tumor center than in the invasive front. In comparison to stable tumors, highly unstable tumors (MSI-H/EMMET-H) had significantly lower expression of TLR4 protein in tumor center, while showing increased expression of TLR4 mRNA and protein in stroma of the invasive tumor front. Our results will improve current knowledge on the role of TLR4 in tumorigenesis of CRC subtypes.

Number of pages: 154

Number of figures: 31

Number of tables: 11

Number of references: 333

Original in: croatian

Key words: sporadic colorectal cancer, microsatellite instability, TLR4 receptor

Date of the thesis defense:

Reviewers:

1. Tanja Matijević Glavan, PhD
2. Maja Matulić, PhD, associate professor
3. Vera Cesar, PhD, full professor, tenured

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za personaliziranu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, u okviru istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Mikrosatelitna nestabilnost (MSI i EMAST) u molekularnom profiliranju sporadičnih karcinoma debelog crijeva“ (HRZZ-IP-2016-06-1430), pod vodstvom prof. dr. sc. Sanje Kapitanović, dr. med., znanstvene savjetnice u trajnom zvanju IRB-a.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Sanji Kapitanović koja je omogućila izvedbu ovog rada na stručnoj pomoći, savjetima, strpljenju i vremenu posvećenom tijekom izrade i pisanja ovog doktorskog rada, kao i na svesrdnoj podršci i savjetima tijekom cijelog boravka u Laboratoriju za personaliziranu medicinu.

Zahvaljujem se i mentorici dr. sc. Sonji Marinović na pomoći, podršci i savjetima pri izradi i pisanju ovog doktorskog rada, te na prijateljstvu, ohrabrivanju, poticanju i usmjeravanju tijekom cjelokupne naše suradnje.

Hvala članovima Povjerenstva na vremenu posvećenom čitanju doktorskog rada, savjetima i sugestijama.

Hvala kolegicama Laboratorija za personaliziranu medicinu na ugodnom okruženju tijekom zajedničkog rada, a posebno Gogi na tehničkoj pomoći te svakoj riječi utjehe i podrške.

Zahvaljujem se i djelatnicima KBMercur i KB Dubrava na suradnji koja je uvelike doprinijela izvedbi ovog doktorskog rada.

Neizmjereno hvala mojoj obitelji, a osobito mojim roditeljima Matiji i Josipu na svim odricanjima te bezuvjetnoj potpori, razumijevanju i ljubavi koju mi pružaju cijeli život. Hvala i mojoj teti Anici koja od malih nogu prati svaki moj korak i uvijek je podrška.

Veliko hvala mojim prijateljima koji su izravno ili neizravno pomogli u ostvarenju ovog cilja te svima koji su se našli sa mnom na ovom izazovnom ali lijepom putovanju.

I za kraj, posebno i veliko hvala mojem suprugu Draganu koji je nepresušan izvor ljubavi, podrške, inspiracije i razumijevanja i uz kojeg je izrada ovog doktorskog rada bila neizmjereno lakša.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1 Karcinom debelog crijeva	1
1.1.1 Nasljedni i obiteljski karcinom debelog crijeva.....	3
1.1.2 Sporadični karcinom debelog crijeva.....	5
1.1.3 Klasifikacija karcinoma debelog crijeva.....	6
1.2 Molekularna patogeneza sporadičnog karcinoma debelog crijeva	8
1.3. Mikrosatelitna nestabilnost u karcinomu debelog crijeva	11
1.3.1 Sustav za popravak krivo sparenih baza DNA (MMR).....	12
1.3.2 Mikrosatelitna nestabilnost tip MSI.....	14
1.3.3 Mikrosatelitna nestabilnost tip EMASST	16
1.4. Uloga upale u tumorigenezi karcinoma debelog crijeva	19
1.4.1 Receptori <i>Toll-like</i> u homeostazi i tumorigenezi u debelom crijevu	22
1.5 Receptor TLR4.....	24
1.5.1 Prijenos signala putem receptora TLR4.....	24
1.5.2 Uloga receptora TLR4 u homeostazi	27
1.5.3 Uloga receptora TLR4 u tumorigenezi	30
1.6 Polimorfizmi jedne baze	32
1.6.1 Polimorfizmi jedne baze u genu <i>TLR4</i>	33
1.7 MikroRNA	36
1.7.1 Uloga miRNA u tumorigenezi	37
1.7.2 <i>miR-375-3p</i>	38
2. Cilj istraživanja.....	40
3. Materijali i metode.....	41
3.1 Ispitanici.....	41
3.2 Uzorci	41

3.3 Izolacija DNA	42
3.3.1 Izolacija DNA iz tkiva metodom fenol/kloroform.....	42
3.3.2 Izolacija DNA metodom mikrodisekcije iz rezova tkiva uklopljenih u parafin	43
3.3.3 Određivanje koncentracije i čistoće DNA	43
3.4 Analiza mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST	44
3.4.1 Umnažanje specifičnih mikrosatelitnih biljega reakcijom PCR	45
3.4.2 Provjera uspješnosti reakcije PCR u gelu agaroze.....	47
3.4.3 Analiza produkata reakcije PCR u gelu poliakrilamida uz bojenje srebrom	47
3.4.4 Analiza produkata reakcije PCR metodom analize fragmenata na uređaju za sekvencioniranje	47
3.5 Izolacija RNA	48
3.5.1 Određivanje koncentracije i provjera kvalitete izolirane RNA.....	48
3.6 Analiza razine ekspresije mRNA gena TLR4	49
3.6.1 Reverzna transkripcija	49
3.6.2 Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu	49
3.7 Analiza ekspresije proteina metodom imunohistokemije	50
3.8 Analiza ekspresije proteina metodom imunocitokemije	53
3.9 Analiza polimorfizma jedne baze	54
3.9.1 Analiza polimorfizma <i>Asp299Gly (+896A/G)</i> metodom PCR u stvarnom vremenu	54
3.10 Izolacija miRNA.....	54
3.10.1 Određivanje koncentracije i čistoće izolirane miRNA	55
3.11 Analiza razine ekspresije miRNA.....	55
3.11.1 Reverzna transkripcija	55
3.11.2 Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu	57
3.12 Statističke metode	58
4. Rezultati.....	59
4.1 Analiza mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST u sporadičnim karcinomima debelog crijeva.....	59

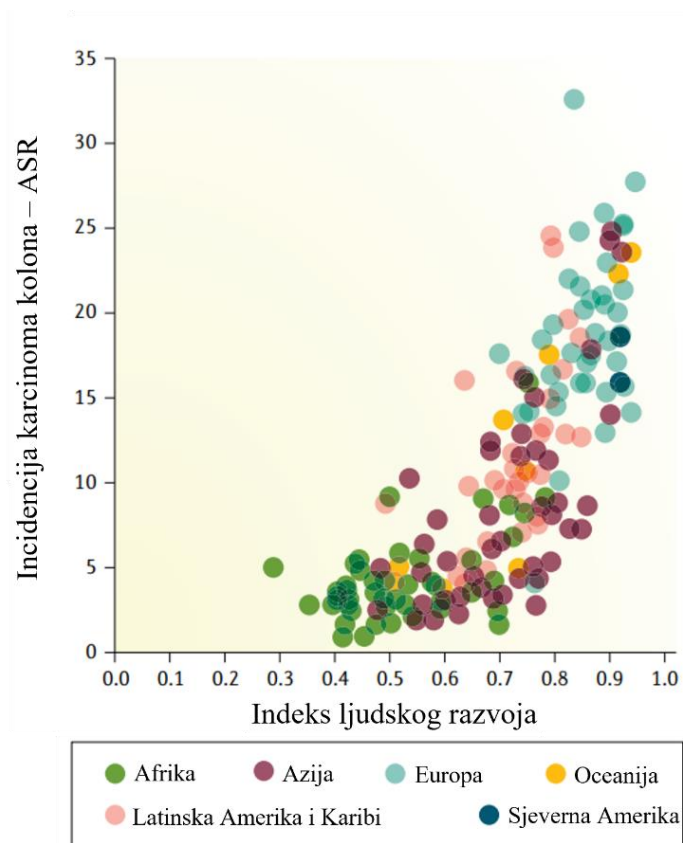
4.2 Analiza mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST u različitim segmentima tumora i tumoru pridružene normalne sluznice.....	67
4.3 Analiza ekspresije mRNA gena <i>TLR4</i>.....	73
4.4 Analiza ekspresije proteina <i>TLR4</i>.....	76
4.4.1 Analiza ekspresije proteina <i>TLR4</i> u tumorskim stanicama sporadičnih karcinoma debelog crijeva.....	76
4.4.2 Analiza ekspresije proteina <i>TLR4</i> u mucinoznim adenokarcinomima debelog crijeva	86
4.4.3 Analiza smještaja proteina <i>TLR4</i> u tumorskim stanicama karcinoma debelog crijeva.....	87
4.4.4 Analiza ekspresije proteina <i>TLR4</i> u stromi tumora sporadičnih karcinoma debelog crijeva	88
4.5. Analiza polimorfizma gena <i>TLR4</i> u sporadičnim karcinomima debelog crijeva	90
4.6 Analiza ekspresije <i>miR-375-3p</i> u sporadičnim karcinomima debelog crijeva	95
5. Rasprava	97
6. Zaključci	109
7. Literatura.....	111
8. Sažetak	149
9. Summary.....	151
10. Životopis i popis publikacija	153

1. UVOD

1.1 Karcinom debelog crijeva

Karcinom debelog crijeva (engl. *colorectal cancer*, CRC) jedan je od najčešćih zloćudnih tumora u svijetu te jedan od vodećih uzroka smrti od raka u razvijenim zemljama. S incidencijom od približno 1,9 milijuna oboljelih te gotovo milijun umrlih u 2020. godini predstavlja treći najčešći uzrok smrti od raka u svijetu [1]. Prema epidemiološkim podacima, učestalost karcinoma debelog crijeva značajno varira na globalnoj razini pri čemu porast u broju slučajeva i smrtnosti prati napredak u socio-ekonomskom razvoju. U posljednjih deset godina najveći porast u incidenciji i smrtnosti zabilježen je u zemljama srednjeg do visokog indeksa ljudskog razvoja poput zemalja istočne Europe, Azije i Južne Amerike te se pripisuje sjedilačkom načinu života i uvođenju prehrambenih navika nalik zapadnim zemljama (Slika 1.) [1, 2]. Suprotno tomu, trend stabilizacije ili opadanja incidencije i smrtnosti, prisutan u posljednjih nekoliko desetljeća u visokorazvijenim zemljama poput Australije, Novog Zelanda i Sjedinjenih Američkih Država (SAD), povezuje se s napretkom u ranoj dijagnostici i terapiji te smanjenju utjecaja čimbenika rizika [1, 2]. Prema trenutnom stanju i demografskim projekcijama, procjenjuje se da će u sljedećih deset godina globalna incidencija karcinoma debelog crijeva porasti za gotovo 60 % sa smrtnošću većom od 1.1 milijun slučajeva godišnje [2].

Podaci Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo također ukazuju na stalni porast broja oboljelih i umrlih od ovog tipa karcinoma u posljednjih nekoliko desetljeća u Republici Hrvatskoj. Rak debelog crijeva najučestalija je zloćudna bolest u Hrvatskoj te je drugi po učestalosti uzrok smrti od raka, nakon raka pluća [3]. S obzirom na spol, rizik za razvoj karcinoma debelog crijeva veći je oko 1.5 puta u muškaraca u odnosu na žene te je prisutan kontinuirani trend porasta incidencije i smrtnosti u muškoj populaciji [1, 3]. Prema posljednjim podacima Registra za rak, tijekom 2019. godine u Hrvatskoj je karcinom debelog crijeva dijagnosticiran u 3660 osoba, a prosječna dob u trenutku dijagnosticiranja bolesti bila je 69 godina. S obzirom na visoku učestalost, u Hrvatskoj se od 2007. godine provodi Nacionalni program prevencije i ranog otkrivanja raka debelog crijeva [1, 3].



Slika 1. Korelacija između incidencije karcinoma debelog crijeva i indeksa ljudskog razvoja u 2018. godini. Indeks ljudskog razvoja je statistička mjera za procjenu društvene i ekonomske razvijenosti neke zemlje koja u obzir uzima očekivano trajanje života, obrazovanje i dohodak po stanovniku. Dobno standardizirana stopa (engl. age-standardized rate, ASR) incidencije na 100.000 stanovnika godišnje. Preuzeto i prilagođeno prema Keum i Giovannucci, 2019 [2].

Razvoj karcinoma debelog crijeva vrlo je kompleksan proces koji nastaje kao posljedica međudjelovanja unutrašnjih (genetskih) i vanjskih (okolišnih) čimbenika rizika. Budući da životna dob predstavlja ključni čimbenik rizika u nastanku raka, rizik od razvoja ove bolesti značajno raste nakon 50. godine života [2]. Od vanjskih čimbenika rizika, vodeću ulogu imaju prehrana s malim udjelom vlakana te bogata crvenim mesom i masnoćama, sjedilački način života, povećana tjelesna težina, pušenje i konzumacija alkohola [2, 4]. Osim toga, pozitivna obiteljska anamneza adenoma i karcinoma kao i kronični upalni procesi u crijevima predstavljaju značajan rizik za razvoj karcinoma kolona [4, 5]. Danas je prihvaćeno stajalište da kronična upala ima značajnu ulogu, ne

samo u zloćudnoj transformaciji stanica, nego i u svim stadijima tumorigeneze [6, 7]. Međutim, upalni mehanizmi povezanih s karcinogenezom još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni.

Ono što prethodi nastanku karcinoma debelog crijeva je prisutnost adenoma, benignih promjena na sluznici debelog crijeva [8]. Tubularni adenom i plosnati adenom (engl. *sessile serrated adenoma*) dva su najčešća podtipa premalignih promjena u većini karcinoma debelog crijeva, pri čemu gotovo 90 % svih karcinoma debelog crijeva nastaje iz tubularnog adenoma koji prelazi u zloćudni adenokarcinom [9]. U rijetkim se slučajevima karcinom debelog crijeva javlja u obliku nediferenciranog, neuroendokrinog, adenoskvamoznog i tumora vretenastih stanica (engl. *spindle cell carcinoma*) [10]. Kako napredovanje adenoma u karcinom obično traje najmanje 10 godina, postoje velike mogućnosti za prevenciju nastanka karcinoma debelog crijeva.

Približno 70 % karcinoma debelog crijeva javlja se u sporadičnom obliku, nakupljanjem mutacija u genima *de novo*, te se on primarno javlja u osoba starije životne dobi. Manji udio karcinoma debelog crijeva nastaje kao posljedica nasljednih promjena i povezan je s pozitivnom obiteljskom anamnezom te tada govorimo o nasljednom obliku raka koji se javlja u ranijoj životnoj dobi [10].

1.1.1 Nasljedni i obiteljski karcinom debelog crijeva

U približno 30 % slučajeva karcinom debelog crijeva javlja se nasljednom obliku [11]. Pri tome, 2-5 % karcinoma potječe iz nasljednih sindroma kao posljedica mutacija naslijeđenih od roditelja. Nasljedni nepolipozni karcinom debelog crijeva (engl. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, HNPCC) ili sindrom Lynch jedan je najčešćih oblika nasljednog karcinoma debelog crijeva [11]. Posljedica je autosomno dominantno naslijeđene mutacije u jednom od gena sustava za popravak krivo sparenih baza te manjih insercija i delecija u molekuli DNA (engl. *mismatch repair*, MMR) [12]. U tom slučaju, prisutnost jednog mutiranog alela u nekom od gena za MMR značajno povećava rizik za razvoj tumora, dok inaktivacija alela divljeg tipa uslijed mutacije, delecije ili metilacije promotora dovodi do neoplastičnih promjena stanica i razvoja tumora. Smatra se da mutacije u svih pet MMR gena mogu biti uključene u patogenezu ove bolesti, no u velikom broju slučajeva radi se o mutaciji gena *MLH1* (od engl. *MutL homolog 1*) ili *MSH2* (od engl. *MutS homolog 2*) [12]. Sindrom Lynch, za koji su karakteristične naslijeđene mutacije u

genima *MLH1* ili *MSH2*, obično se javlja u ranijoj dobi (oko 40 godina) u odnosu na bolest koja nastaje kao posljedica mutacija u *MSH6* ili *PMS2* koja se često javlja u dobi između 50 i 60 godina [12-15]. Karakteriziran je ranim razvojem tumora, koji se, osim u kolonu i rektumu, javljaju i u želucu, endometriju, jajniku, tankom crijevu i urinarnom traktu [12]. S obzirom na vrlo heterogenu prirodu bolesti i potrebu za ranim prepoznavanjem osoba izloženih riziku, smjernice za otkrivanje i praćenje nosioca mutacija i oboljelih kontinuirano se mijenjaju u skladu s razumijevanjem i karakterizacijom ove bolesti [16, 17].

Obiteljska adenomatozna polipoza (engl. *familial adenomatous polyposis*, FAP) je autosomno dominantna bolest koja se razvija zbog nasljeđenih mutacija u genu *APC* (engl. *adenomatous polyposis coli*) [18]. *APC* je smješten na dužem kraku kromosoma 5, a kodira za tumor supresor koji ima ulogu u brojnim staničnim procesima uključujući kontrolu staničnog ciklusa, migraciju, diferencijaciju i apoptozu. Inaktivacija gena *APC* rezultira nakupljanjem proteina β -katenina u jezgri i aktivacijom Wnt signalnog puta što dovodi do nekontroliranog rasta stanica i doprinosi razvoju tumora [19]. Bolest je karakterizirana razvojem velikog broja adenoma u kolonu i rektumu tijekom drugog i trećeg desetljeća života. Ukoliko se bolest ne dijagnosticira na vrijeme i ne liječi u ranoj životnoj dobi, najčešće u trećem ili četvrtom desetljeću života, dolazi do razvoja karcinoma debelog crijeva [18, 20]. Klinička dijagnoza obiteljske adenomatozne polipoze postavlja se na temelju veličine i broja adenoma koji s vremenom raste i može dosegnuti od 100 do 5000 adenoma na sluznici debelog crijeva [18].

Uz nasljedne sindrome, gotovo trećina karcinoma debelog crijeva javlja se u obiteljima s većom učestalosti zloćudnih tumora, a bez jasnog dokaza o povezanosti s nasljednim sindromima. Iako molekularni mehanizam obiteljskog karcinoma još uvijek nije jasan, smatra se da je rezultat kombinacije okolišnih i nasljednih genetskih čimbenika. Istraživanja populacije te analize GWAS (od engl. *genome wide association studies*) doprinijele su razumijevanju i identifikaciji genetskih čimbenika povećanog rizika koji uključuju gene slabijeg utjecaja (engl. *low-penetrance genes*) te specifične genske polimorfizme [21, 22]. Tako je utvrđeno da su geni slabijeg utjecaja ti koji najčešće imaju aditivni učinak na rizik za razvoj obiteljskog karcinoma, dok je utjecaj polimorfizama na rizik za obolijevanje povezan s međugenskim i okolišnim međudjelovanjem [23].

1.1.2 Sporadični karcinom debelog crijeva

Sporadični karcinom debelog crijeva nastaje bez prisutnosti nasljedne komponente ili pozitivne obiteljske anamneze te upalnih bolesti crijeva, a rezultat je stečenih somatskih genetskih i epigenetskih promjena koje posljedično mijenjaju histološku sliku epitela sluznice debelog crijeva [24]. Nastanak sporadičnog karcinoma debelog crijeva obuhvaća nakupljanje spontanih i promjena potaknutih okolišem u genima uključenim u regulaciju staničnog rasta što rezultira preobrazbom normalnog epitela crijeva u hiperproliferativni. Nadalje, za zloćudnu staničnu preobrazbu potrebno je više genetskih oštećenja kao što su mutacije, delecije ili poremećaji ekspresije tumor supresora [24]. S obzirom da ove promjene nastaju tijekom više godina, sporadični karcinom debelog crijeva se u većini slučajeva javlja kod starije populacije u dobi od 65 do 80 godina [24]. Kako simptomi često izostaju u početnim stadijima, u većine oboljelih bolest se dijagnosticira u uznapredovalom stadiju što značajno utječe na kraće preživljenje oboljelih. U 70 % slučajeva silazni ili lijevi kolon je primarno mjesto nastanka sporadičnog karcinoma debelog crijeva [25].

Praćenje opće populacije u dobi iznad 50 godina u sklopu nacionalnih programa ranog otkrivanja raka pokazalo se učinkovitim u ranom dijagnosticiranju i liječenju karcinoma debelog crijeva te smanjenju pojavnosti i smrtnosti od ovog zloćudnog tumora u razvijenim zemljama [26, 27]. Međutim, u posljednjih dvadeset godina svjedočimo rastućoj incidenciji karcinoma debelog crijeva koji se javlja u ranijoj dobi (ispod 50 godina starosti), tzv. „*early-onset*“ karcinom debelog crijeva [28]. Iako razlozi za globalni trend porasta ovih karcinoma još uvijek nisu dovoljno poznati, pokazano je da rizični faktori poput kroničnih upalnih procesa u kolonu, te okolišnih i prehrambenih čimbenika koji narušavaju ravnotežu mikrobioma crijeva, značajno doprinose razvoju karcinoma debelog crijeva u mlađoj dobi [28]. U odnosu na sporadični karcinom debelog crijeva koji se javlja u starijoj dobi, karcinomi debelog crijeva mladih odraslih osoba pokazuju specifična klinička i molekularna svojstva. Većina ovih karcinoma smještena je u distalnom ili rektalnom dijelu debelog crijeva, a u trenutku dijagnosticiranja bolest je najčešće u uznapredovalom stadiju te pokazuje nepovoljna histološka obilježja [28]. Stoga se, s ciljem što ranijeg otkrivanja karcinoma debelog crijeva, intenzivno istražuju prognostički markeri pomoću kojih bi se neinvazivnim metodama mogli identificirati osobe visokog rizika [29].

1.1.3 Klasifikacija karcinoma debelog crijeva

Histološki, većina zloćudnih tumora debelog crijeva su adenokarcinomi koji prema stupnju diferencijacije mogu biti dobro, umjereno i slabo diferencirani. Kod slabije diferenciranih adenokarcinoma, tumorske stanice imaju slabije izraženu žljezdanu strukturu, a samim time i veći maligni potencijal [30]. Tumorske stanice mogu, kao i normalne stanice sluznice debelog crijeva, izlučivati mucin. Produkcija mucina može biti unutarstanična, kada nailazimo na stanice u obliku prstena pečatnjaka kod kojih velika vakuola mucina potiskuje jezgru na periferiju dajući tipičan mikroskopski izgled stanicama, ili izvanstanična pri čemu velika količina mucina razmiče slojeve stijenke crijeva omogućavajući širenje tumora [31]. Obilno izvanstanično lučenje mucina koje zahvaća više od 50 % volumena tumora karakterizira posebnu patohistološku varijantu karcinoma debelog crijeva, tzv. mucinozne adenokarcinome. Ovi adenokarcinomi se javljaju u oko 10 % slučajeva karcinoma debelog crijeva, a iako ih pojedine studije povezuju s lošijom prognozom, njihov prognostički značaj je i dalje kontroverzan [32, 33].

Sluznica debelog crijeva predstavlja mjesto početka rasta i ishodište širenja zloćudnih tumora debelog crijeva, otkuda napreduju kroz sve slojeve debelog crijeva dajući regionalne metastaze u okolne limfne čvorove, kao i udaljene, hematogene metastaze jetre, pluća, mozga i sl. Na temelju spoznaja o većoj učestalosti metastaza proporcionalno sa zahvaćenošću dubljih slojeva stijenke crijeva tumorskim procesom, predložena je klasifikacija prema Dukes'-u koja ima četiri stadija: stadij A – tumor je ograničen stijenkom crijeva, stadij B – tumor se proširio na serozu, ali ne zahvaća limfne čvorove, stadij C – tumor zahvaća regionalne limfne čvorove i stadij D – postoje udaljene metastaze [34].

Danas se u kliničkoj praksi često koristi klasifikacija TNM (engl. *tumor, nodes, metastasis*) koja, u usporedbi s klasifikacijom prema Dukes'-u, za procjenu proširenosti tumora uključuje procjenu primarnog tumora (T), stanje regionalnih limfnih čvorova (N) i prisutnost udaljenih metastaza (M). U okviru ove klasifikacije svakom slovu se pridodaje broj koji u slučaju primarnog tumora označava veličinu ili proširenost primarnog tumora, a u slučaju regionalnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza broj označava njihovu prisutnost ili odsutnost [34].

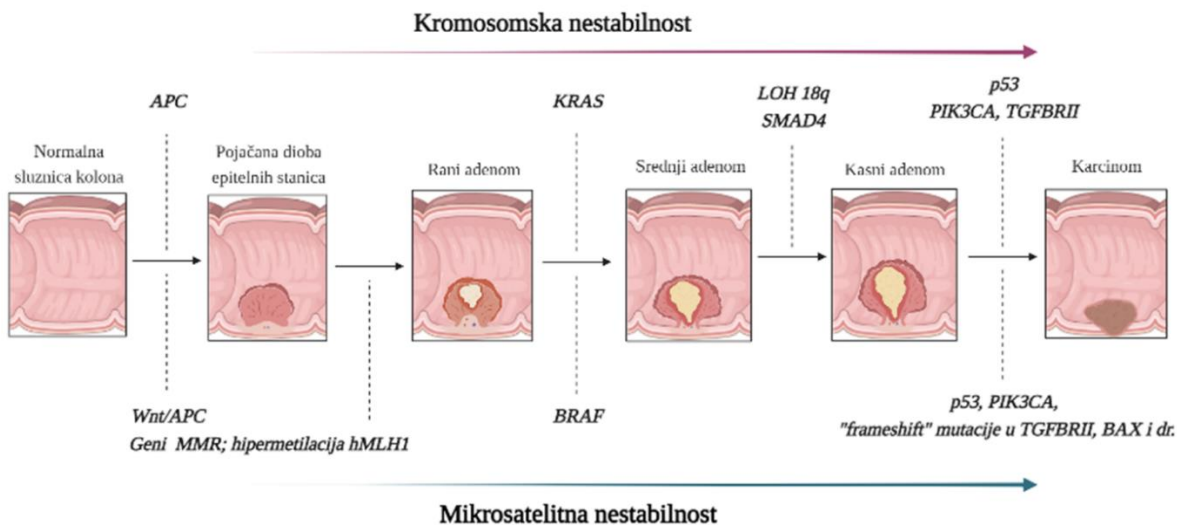
Iako klasifikacija TNM predstavlja „zlatni standard“ u prognostičkoj stratifikaciji osoba oboljelih od kolorektalnog karcinoma, posljednjih godina se sve veći klinički značaj pridaje stupnju pupanja tumora. Pupanje tumora se definira kao nalaz dediferenciranih, pojedinačnih ili u

nakupinama do 4, tumorskih stanica adenokarcinoma u području invazivnog ruba tumora [35]. Smatra se morfološkom manifestacijom procesa epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) kada dio tumorskih stanica poprima svojstva mezenhimskih stanica i dovodi do napredovanja i širenja tumora te stvaranja metastaza [36]. Do danas su u literaturi predložene brojne metode za određivanje stupnja pupanja tumora, no s ciljem postavljanja jasnih kriterija Lugli i suradnici su 2017. objavili opsežan pregled do sada objavljenih članaka o tumorskom pupanju te predložili detaljnu metodologiju određivanja tumorskog pupanja [37]. Prema ovim autorima definirana su tri stupnja pupanja tumora pri čemu je stupanj 1 - nalaz 0-4 pupa, stupanj 2 – nalaz 5-9 pupova i stupanj 3 – nalaz 10 i više pupova [37]. Smatra se da bi određivanje tumorskog pupanja u budućnosti moglo imati veliku ulogu u multidisciplinarnom pristupu liječenju oboljelih od karcinoma debelog crijeva, osobito ukoliko se određuje zajedno s gustoćom unutartumorske limfocitne infiltracije.

1.2 Molekularna patogeneza sporadičnog karcinoma debelog crijeva

Zloćudna preobrazba epitelnih stanica sluznice debelog crijeva započinje stupnjevitim nakupljanjem genetskih i epigenetskih promjena u genima uključenim u regulaciju staničnog rasta, diferencijacije i apoptoze [38, 39]. Ključne promjene u procesu preobrazbe normalnih stanica epitela preko adenoma do zloćudnog karcinoma, poznate kao adenom-karcinom slijed, opisali su još 1990. godine Fearon i Vogelstein [40]. One uključuju gubitak funkcije određenih tumor supresorskih gena i gena za popravak DNA te pojačanu funkciju određenih onkogeno [39, 40]. Somatski poremećaji koji nastaju ovim putem osiguravaju stanicama tumora selektivnu prednost brzog rasta stvarajući osnovu za klonalnu ekspanziju i napredovanje.

Iako karcinom pojedinog oboljelog predstavlja genetski jedinstvenu bolest, zajedničko svojstvo svih karcinoma debelog crijeva je nestabilnost genoma. Dva glavna oblika genomske nestabilnosti opisana u tumorigenezi sporadičnih karcinoma debelog crijeva su kromosomska nestabilnost (engl. *chromosomal instability*, CIN) i mikrosatelitna nestabilnost (engl. *microsatellite instability*, MSI) [41] (Slika 2.).



Slika 2. Stupnjeviti razvoj karcinoma kolona od normalnog epitela do adenokarcinoma. Mutacija u APC/Wnt signalnom putu je rani događaj u procesu tumorigeneze koja potiče daljnju genomsku nestabilnost. Hiperproliferacija i zloćudna preobrazba stanica rezultat je nakupljanja novih mutacija u onkogenima i tumor-supresorskim genima nastalim uslijed kromosomske ili mikrosatelitne nestabilnosti. Ilustrirano pomoću programa BioRender.com.

Približno 85 % sporadičnih karcinoma debelog crijeva nastaje putem kromosomske nestabilnosti, a karakterizira ih povećana stopa somatskih promjena u broju i strukturi kromosoma koja dovodi do neprekidne proliferacije stanica [42]. Poremećaj u funkcioniranju signalnog puta Wnt smatra se ključnim ranim događajem u tumorigenezi ovih karcinoma [43]. U više od 80 % slučajeva, aktivacija Wnt je posljedica inaktivirajućih mutacija u genu *APC*, dok u manjem postotku karcinoma koji ne pokazuju mutacije u genu *APC* može biti posljedica mutacija u genu *CTNNB1* koji kodira za protein β -katenin [44, 45]. U normalnim uvjetima, protein APC je važan negativni regulator signalnog puta Wnt koji, formirajući kompleks Axin-APC, kontrolira proteasomalnu razgradnju Wnt efekorskog proteina, β -katenina. Međutim, u slučaju gubitka funkcije proteina APC, suvišak β -katenina se nakuplja u citoplazmi što rezultira njegovim premještanjem u jezgru gdje potiče transkripciju brojnih gena uključujući i onkogen *MYC* [44].

Jednom pokrenuta pojačana aktivacija signalnog puta Wnt dovodi do promjena u proliferaciji i diferencijaciji epitelnih stanica, potičući displaziju epitela kriptе sluznice debelog crijeva i nastanak adenoma. Ove promjene obično su praćene nakupljanjem mutacija i gubitkom funkcije drugih gena, poput proto-onkogen *KRAS* (od engl. *Kirsten rat sarcoma virus*) [41]. Gen *KRAS* kodira za mali GTP-azni protein koji sudjeluje u prijenosu izvanstaničnog signala te potiče aktivaciju čitavog niza signalnih molekula uključenih u diobu i rast stanice, diferencijaciju i apoptozu [46]. Mutacije u genu *KRAS* rezultiraju ekspresijom konstitutivno aktivnog oblika proteina, a javljaju se u oko 40 % CRC [47]. Oko 85 % mutacija u genu *KRAS* javlja se u kodonu 12, a najčešće su povezane s pojačanom proliferacijom stanica i napredovanjem tumora [47, 48].

Daljnje napredovanje obuhvaća zloćudnu preobrazbu adenoma u karcinom, a obično uključuje mutaciju i/ili gubitak funkcije tumor-supresorskih gena. Gen *p53* najčešće je promijenjeni tumor-supresorski gen u zloćudnoj preobrazbi [41]. Protein p53 ima ulogu u zaustavljanju staničnog ciklusa u prisutnosti oštećenja DNA te poticanju apoptoze stanice ukoliko je onemogućen popravak DNA [49]. S obzirom na navedeno, mutacije u genu *p53* predstavljaju ključni korak u zloćudnom napredovanju tumora debelog crijeva. Gubitak funkcije proteina p53 rezultira smanjenjem regulacije staničnog ciklusa i apoptoze, što potiče proliferaciju stanica i klonalnu ekspanziju stanica s pogreškama u genomu [49]. Promijenjeni protein p53 javlja se u 50 do 75 % adenokarcinoma debelog crijeva [50].

Osim gena *p53*, promjenama su zahvaćeni i drugi tumor supresorski geni poput *SMAD2* (engl. *Sma- and Mad-related protein 2*) i *SMAD4* (engl. *Sma- and Mad-related protein 4*) [51]. Produkti ova dva gena su unutarstanični medijatori signalnog puta transformirajućeg faktora rasta β (engl. *transforming growth factor β* , TGF β), koji je uključen u širok spektar staničnih procesa, od regulacije rasta, diferencijacije, proizvodnje matriksa i apoptoze[51]. Mutacije u *SMAD2* i *SMAD4* zabilježene su u više tipova zloćudnih tumora u ljudi, uključujući tumore gušterače kao i tumore debelog crijeva [52, 53]. Štoviše, gubitak funkcije *SMAD4* povezan je s napredovanjem i metastaziranjem karcinoma debelog crijeva [54, 55].

Drugi put nastanka karcinoma kolona, koji uključuje gubitak funkcije sustava MMR, odgovoran je za 10 do 15 % sporadičnih karcinoma debelog crijeva. Za razliku od kromosomske nestabilnosti, dMMR (od engl. *defective MMR*), za posljedicu ima razvoj hipermutabilnog fenotipa, odnosno povećanu stopu mutacija s više od 12 mutacija na milijun baza koja se očituje mikrosatelitnom nestabilnosti [56, 57]. Rastuća stopa mutacija u genomu povećava vjerojatnost za nastanak mutacija u ključnim onkogenima i tumor-supresorskim genima, a smatra se da može skratiti tipičan period preobrazbe adenoma u karcinom sa 10 do 20 godina na 1 do 2 godine [58, 59]. U većini sporadičnih karcinoma debelog crijeva s mikrosatelitnom nestabilnosti gubitak funkcije sustava MMR najčešće je rezultat epigenetskog utišavanja gena *MLH1*, odnosno hipermetilacije njegova promotora[59]. Hipermetilacija promotora gena *MLH1* često je povezana s fenomenom globalne hipermetilacije CpG promotorskih regija duž genoma (engl. *CpG island methylator phenotype*, CIMP). CIMP je, uz dva glavna puta genomske nestabilnosti, prepoznat kao još jedan molekularni mehanizam nastanka sporadičnih karcinoma debelog crijeva [60].

Karcinom debelog crijeva predstavlja vrlo heterogenu skupinu bolesti sa značajnim razlikama u etiologiji, molekularnim i histološkim značajkama te kliničkom ishodu. Nerijetko tumori debelog crijeva mogu pokazivati svojstva više različitih puteva razvoja [61].

1.3. Mikrosatelitna nestabilnost u karcinomu debelog crijeva

Mikrosateliti su ponavljajući sljedovi nukleotida u DNA, obično veličine od jedne do šest parova baza. Na tisuće mikrosatelita rasprostranjeno je duž genoma te čine oko 3 % genoma čovjeka. S obzirom na široku distribuciju u genomu, mogu biti smješteni u blizini kodirajućih regija gena, promotora i terminalnih regija, no njihova pozicija češća je u intronima i nekodirajućim regijama DNA [62, 63]. Tako smješteni, mikrosateliti mogu utjecati i na gensku ekspresiju putem regulacije transkripcije i prekrajanja gena. Primjerice, istraživanja na različitim tipovima tumora, uključujući i karcinom debelog crijeva, ukazuju na to da promjene u dinukleotidnom ponavljanju CA u intronu 1 gena za receptor epidermalnog čimbenika rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) mogu putem modulacije transkripcije utjecati na ekspresiju gena *EGFR* [64-66].

Polimorfna priroda mikrosatelita očituje se u dužini njihova slijeda koja može varirati od 15 do 65 tandemskih ponavljajućih jedinica. Upravo zbog svoje ponavljajuće strukture, mikrosateliti su osobito podložni nakupljanju pogrešaka. Pogreške u molekulama DNA uglavnom nastaju tijekom procesa replikacije, a najčešće su posljedica proklizavanja DNA polimeraze, pogrešnog sparivanja skliznutog lanca DNA ili nejednake rekombinacije. Stoga post-replikacijski mehanizmi popravka igraju ključnu ulogu u očuvanju vjernosti replikacije te genomske stabilnosti stanice [67]. Za prepoznavanje i popravak replikacijskih pogrešaka zadužen je sustav za popravak krivo sparenih baza u DNA. Međutim, u slučaju disfunkcije sustava popravka MMR, nastale pogreške se u sljedećim ciklusima replikacije prepisuju, trajno se zadržavajući u genomu. Gubitak funkcije MMR najbolje se očituje produljenjem ili skraćivanjem mikrosatelitnih sljedova, odnosno promjenom u broju ponavljajućih jedinica, tzv. mikrosatelitnom nestabilnosti. Promjene koje se dogode u mikrosatelitnim ponavljanjima smještenim u regulatornim ili kodirajućim regijama mogu rezultirati disfunkcijom brojnih gena važnih za regulaciju staničnog ciklusa što predstavlja dodatni korak u tumorigenezi brojnih karcinoma [68]. Jedan od primjera je inaktivirajuća mutacija receptora 2 za transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *transforming growth factor beta receptor 2*, TGFβR2), utvrđena u više od 90 % MSI-H (engl. *microsatellite instability high*, MSI-H) karcinoma debelog crijeva [69]. Ova mutacija uzrokovana je promjenama u mikrosatelitnom ponavljanju od 10 adenina (A₁₀) unutar kodirajuće regije gena *TGFβR2*. Budući da je povezana sa smanjenom ekspresijom receptora te gubitkom njegove funkcije u inhibiciji staničnog rasta, smatra

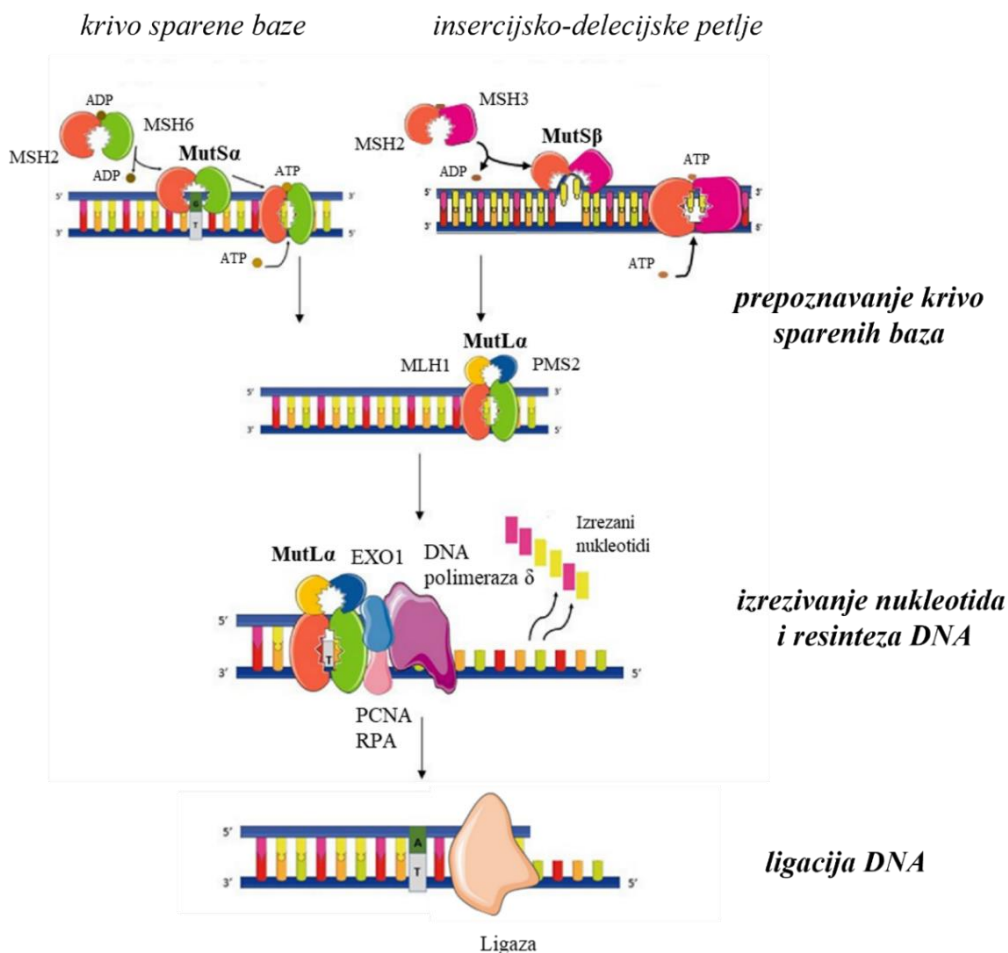
se da pogoduje tumorigenezi karcinoma debelog crijeva s mikrosatelitnom nestabilnosti [69-72]. Osim toga, u MSI-nestabilnim tumorima pokazana je i povećana učestalost mutacija u mononukleotidnim ponavljanjima brojnih drugih gena poput *BAX*, *IGF2R* te *BRAF* [73-75].

1.3.1 Sustav za popravak krivo sparenih baza DNA (MMR)

Do krivog sparivanja baza najčešće dolazi uslijed dodavanja pogrešne baze tijekom procesa replikacije ili zbog nastanka modificiranih baza koje odstupaju od uobičajenog Watson-Crickovog sparivanja [76]. Kako bi se očuvao genomski integritet, sustav popravka MMR je visoko konzerviran u gotovo svim organizmima, od bakterija do čovjeka [77]. U prokariota, sustav MMR građen je od homodimernih MutS i MutL proteina, dok eukariotski MMR kompleks čine homolozi MutS (MSHx) i MutL (MLHx i PMSx) građeni od različitih proteina koji se međusobno povezuju čineći funkcionalne heterodimere. Homolog MutS je u čovjeka građen od proteina MSH2, MSH3 i MSH6, dok MLH1, MLH3, PMS1 (od engl. *post-meiotic segregation increased 1 protein*) i PMS2 (od engl. *post-meiotic segregation increased 2 protein*) čine homolog MutL [78].

Popravak MMR započinje formiranjem proteinskih kompleksa MutS α i MutS β koji prepoznaju pogrešku i pokreću nizvodni mehanizam popravka DNA. MutS α kompleks nastaje heterodimerizacijom proteina MSH2 i MSH6, a prepoznaje krivo sparene baze te manje mono- i dinukleotidne insercije i delecije [79, 80]. Heterodimer MutS β nastaje interakcijom proteina MSH2 i MSH3 te je uključen u prepoznavanje i popravak većih insercijsko-delecijskih petlji do 13 nukleotida. Vezanje heterodimera MutS na mjesto pogreške specifično prepoznaje proteinski kompleks MutL α kojeg čine proteini MLH1 i PMS2 [79, 81]. Nakon toga replikacijski faktor C (engl. *replicating factor C*, RFC) omogućava vezanje proliferirajućeg staničnog jezgrinog antigena (engl. *proliferating cellular nuclear antigen*, PCNA), „DNA hvataljke“, koja ima ključnu ulogu u interakciji MutS i MutL α , te aktivaciji endonukleaze PMS2 [82]. Endonukleazna aktivnost PMS2 potom uvodi ureze u nosintetiziranom nemetiliranom lancu distalno od pogreške u odnosu na postojeći urez [83]. Endonukleazna aktivnost MutL α nužna je za 3'-usmjereni popravak, a predstavlja signal za aktivaciju 5'-3' egzonukleaze 1 (engl. *exonuclease 1*, EXO1) te nizvodnog procesa popravka [84, 85]. EXO1 prepoznaje i razgrađuje nastali fragment, dok replikacijski protein A (engl. *replication protein A*, RPA) stabilizira nastalu jednolančanu DNA te potiče

sintezu DNA [86]. Smatra se da kompleks MLH1-PMS2 fizički stupa u interakciju s DNA polimerazom δ (Pol δ), privlačeći enzim na mjesto popravka, nakon čega Pol δ uz ligazu vrši resintezu i ligaciju DNA [80] (Slika 3.).



Slika 3. Ilustracija mehanizma popravka DNA djelovanjem sustava MMR. Popravak MMR započinje prepoznavanjem pogreške u DNA od strane kompleksa MutSa (dimer MSH2-MSH6) ili MutSβ (dimer MSH2-MSH3) koji pripadaju obitelji ATP-aza te koriste ATP za regulaciju aktivnosti. Vežanje kompleksa MutS omogućava vežanje kompleksa MutLa (dimer MLH1-PMS2). Različiti enzimi (EXO1, PCNA, DNA polimeraza δ , ligaza) potom pokreću proces izrezivanja pogrešno sparenog segmenta i resinteze novog lanca DNA. ADP (od engl. adenosine diphosphate), ATP (od engl. adenosine triphosphate). Preuzeto i prilagođeno iz Randrian i sur., 2021. [87].

1.3.2 Mikrosatelitna nestabilnost tip MSI

Mikrosatelitna nestabilnost tip MSI (od engl. *microsatellite instability*) prvi put je otkrivena u nasljednim karcinomima debelog crijeva koji se javljaju u sklopu sindroma Lynch. Tada je pokazano da prisutnost nasljednih mutacija u jednom od gena za proteine sustava MMR (*MLH1*, *MSH2*, *PMS2* i *MSH6*) stvara predispoziciju za razvoj karcinoma debelog crijeva te se smatralo da je mikrosatelitna nestabilnosti specifična promjena u karcinomima debelog crijeva koji se javljaju u sklopu ovog sindroma [88, 89]. Međutim, kasnije je pokazano da se MSI javlja i u 10-15 % sporadičnih karcinoma kolona. Nestabilnost tipa MSI također je dokazana u nasljednim i sporadičnim karcinomima želuca i endometrija, a s nešto manjom učestalošću zabilježena je i u drugim karcinomima poput glioblastoma i limfoma [87, 90].

Više od 80 % sporadičnih karcinoma debelog crijeva s nestabilnosti tipa MSI-H nastaje kao posljedica bialelne hipermetilacije promotora gena *MLH1* uslijed čega dolazi do gubitka ekspresije i funkcije proteina MLH1, kao i gubitka funkcije s njim povezanog proteina PMS2[91]. U manjem postotku sporadičnih karcinoma debelog crijeva, gubitak funkcije sustava MMR rezultat je bialelnih somatskih mutacija u drugim genima za MMR [92, 93].

Utvrđivanje nestabilnosti tipa MSI u karcinomima kolona dogovoreno je 1998. godine uspostavljanjem usuglašenih kriterija od strane američkog Nacionalnog instituta za rak, koji uključuje tzv. Bethesda panel mikrosatelitnih biljega odgovarajuće osjetljivosti i specifičnosti [17]. Ovaj panel obuhvaća dva mononukleotidna (BAT25 i BAT26) i tri dinukleotidna mikrosatelitna biljega (D5S346, D17S250, D2S123). Na temelju ovih kriterija, tumori se klasificiraju kao mikrosatelitski viskonestabilni (MSI-H) ukoliko je nestabilnost prisutna u dva ili više biljega; mikrosatelitski niskonestabilni (engl. *microsatellite instability low*, MSI-L) ukoliko je nestabilnost prisutna u samo jednom biljegu; te stabilni (engl. *microsatellite stable*, MSS) ukoliko nestabilnost nije utvrđena niti u jednom od ispitivanih biljega [17]. Metode temeljene na lančanoj reakciji polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) smatraju se „zlatnim standardom“ u analizi mikrosatelitne nestabilnosti. Osim toga, u patohistološkim laboratorijima se primjenjuje i metoda imunohistokemije kojom se utvrđuje gubitak ekspresije pojedinih proteina sustava MMR. Imunohistokemijska detekcija ekspresije proteina MLH1, MSH2, PMS2 i MSH6 danas je uključena i u kliničku dijagnostiku karcinoma debelog crijeva nestabilnih na MSI [90].

Fenotip MSI-H u tumorima debelog crijeva povezan je sa specifičnim kliničkim, histološkim i molekularnim svojstvima te se s većom učestalošću javljaju u ženskih osoba, a najčešće su smješteni u proksimalnom dijelu debelog crijeva [94, 95]. U većini slučajeva radi se o slabo diferenciranim tumorima s mucinoznom komponentom te povećanom infiltracijom limfocitima uz karakterističnu prisutnost subepitelnih limfoidnih agregata poznatu kao limfoidna reakcija nalik na Chron (engl. *Chron's-like lymphoid reaction*) [96, 97]. Unatoč tendenciji lokalnog rasta, ovi tumori su povezani sa smanjenom učestalošću udaljenih metastaza te duljim preživljenjem u oboljelih [98]. U odnosu na sindrom Lynch, sporadični slučajevi MSI-H tumora javljaju se u starijoj životnoj dobi te su u 30 – 50 % slučajeva pozitivni na mutaciju u genu *BRAF* (*BRAFV600E*) [99, 100]. Budući da su mutacije gena *BRAF* prisutne isključivo u sporadičnim karcinomima, njihova odsutnost doprinosi kliničkoj identifikaciji MSI-nestabilnih karcinoma kolona s nasljednom komponentom [75, 101, 102].

Glavni pokretač tumorigeneze s mikrosatelitnom nestabilnosti tipa MSI je oštećena funkcija sustava MMR koja dovodi do insercijsko-delecijskih (indel) mutacija u kodirajućim mikrosatelitnim ponavljanjima te supstitucija i translacijskih pomaka okvira čitanja (engl. *frameshift*) u genomskim regijama koje kodiraju tumor-supresorske gene. Analiza MSI-H tumora pokazala je, osim oštećenog sustava MMR, promjene u još nekoliko puteva popravka DNA, uključujući BER (od engl. *base-excision repair*), HR (od engl. *homologous recombination*) i NHEJ (od engl. *non-homologous end joining*) koje dodatno utječu na povećani razvoj mutacija i pojavu hipermutacijskog fenotipa [56].

Osim što utječu na zloćudnu preobrazbu stanica, translacijski pomaci okvira čitanja stvaraju jedinstvene peptide koji doprinose visokoj imunogeničnosti tumorskih stanica s disfunkcijom sustava MMR [103, 104]. Budući da su takvi peptidi strani imunskom sustavu, potiču snažan imunski odgovor koji je u tumorima debelog crijeva s MSI-H često povezan s pojačanom infiltracijom limfocitima te većim brojem citotoksičnih CD8⁺ limfocita T [105-108]. Upravo pojačana infiltracija citotoksičnim limfocitima igra važnu ulogu u kontroli bolesti te se smatra odgovornom za povoljniju prognozu u oboljelih s MSI-H tumorima u odnosu na stabilne tumore [109, 110].

Terapijski pristupi tumorima visokonestabilnim na MSI značajno se razlikuju u odnosu na stabilne tumore. Budući da stanice s disfunkcijom MMR posjeduju određenu razinu otpornosti na

kemoterapiju 5-fluorouracilom (5-FU) te je kod oboljelih s MSI-H tumorima uočena slabija učinkovitost 5-FU, primarni izbor u adjuvantnoj terapiji je cis-platina [111, 112]. Međutim, istraživanja su pokazala da tumori visokonestabilni na MSI eksprimiraju povećanu razinu negativnih regulatora citotoksičnih limfocita, poput liganda proteina programirane smrti 1 (engl. *programmed cell death ligand 1*, PD-L1) [113, 114]. S obzirom na to, ovi tumori su se pokazali dobrim kandidatima za imunoterapiju temeljenu na inhibiciji receptora za proteine programirane smrti 1 (engl. *programmed cell death 1*, PD-1) na CD8⁺ limfocitima T, što dovodi do reaktivacije citotoksičnog učinka limfocita T te može rezultirati regresijom bolesti [115, 116]. Najnovije istraživanje pokazalo je da imunoterapija blokadom receptora PD-1 rezultira potpunim povlačenjem bolesti u oboljelih od MSI-H karcinoma rektuma te može zamijeniti standardne metode liječenja koji uključuju kemoterapiju, radioterapiju i kirurško odstranjivanje zahvaćenog tkiva [117].

Priroda i patohistološki značaj niske učestalosti mikrosatelitne nestabilnosti (MSI-L) i dalje su kontroverzni. Istraživanje iz 2005. godine pokazalo je da MSI-L tumori uglavnom manifestiraju promjenu u nekom od dinukleotidnih ponavljanja [118]. Mori i suradnici pronašli su jedinstveni profil genske ekspresije u karcinomima s nestabilnosti MSI-L [119], a smatra se da bi razumijevanjem molekularne podloge ovih karcinoma, ovaj tip nestabilnosti mogao biti novi prognostički parametar u karcinomima debelog crijeva [118, 120, 121]. Međutim, istraživanja su pokazala da mutacije gena koje su prisutne u MSI-H tumorima izostaju u tumorima s MSI-L. Također, s obzirom na kliničko-patološke značajke, MSI-L tumori se ne razlikuju značajno od stabilnih tumora [122]. Zbog toga neka istraživanja smatraju da su genetske promjene uključene u MSI-L pokazatelj spontane mutageneze u onim mikrosatelitnim ponavljanjima koja, zbog svoje kompozicije, pokazuju veću sklonost ka spontanim mutacijama [120].

1.3.3 Mikrosatelitna nestabilnost tip EMAS

Izražena nestabilnost u specifičnim tetranukleotidnim ponavljanjima, nazvana EMAS (od engl. *elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats*), drugi je tip mikrosatelitne nestabilnosti koji obuhvaća promjene u dužim mikrosatelitnim sljedovima, sa ili bez promjena u mononukleotidnim ponavljanjima. EMAS je do danas utvrđen u brojnim

tumorima poput karcinoma glave i vrata [123], endometrija [124], jajnika [125], prostate [126] i pluća [127, 128], a u karcinomima kolona je prvi put opisan 2008. godine [129].

Podaci o učestalosti nestabilnosti tipa EMAS^T u karcinomima poprilično variraju [130]. Međutim, utvrđeno je da se karcinomi debelog crijeva s nestabilnosti tipa EMAS^T javljaju znatno učestalije u odnosu na MSI-H te su povezani s drugačijim kliničko-patološkim svojstvima kao što su brže napredovanje tumora i kraće preživljenje u oboljelih [131, 132]. Fenotip EMAS^T zabilježen je u 30-60 % sporadičnih karcinoma debelog crijeva, a većinom se radi o slabo diferenciranim i uznapredovalim tumorima [130, 133, 134]. Naime, pokazano je da se učestalost nestabilnosti tipa EMAS^T povećava duž adenom-karcinom slijeda pri čemu je EMAS^T češće prisutan u srednje i slabo diferenciranim adenokarcinomima u odnosu na adenome i dobro diferencirane adenokarcinome [134]. Uz to, rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju na učestaliju prisutnost udaljenih metastaza te lošiju prognozu u oboljelih od EMAS^T-nestabilnih karcinoma debelog crijeva, u odnosu na oboljele s MSI-H i EMAS^T-stabilnim karcinomima [131, 132, 135, 136]. Također, dosadašnja istraživanja pokazala su da je u EMAS^T-nestabilnim karcinomima nemalih stanica pluća, kože te mokraćnog mjehura učestalost mutacija gena *p53*, jednog od ključnih pokazatelja zloćudnog napredovanja tumora, znatno veća [137, 138]. Iako ovaj rezultat nije potvrđen u karcinomima kolona, postoji trend povezanosti između gubitka heterozigotnosti u genu *p53* i nestabilnosti tipa EMAS^T u ovim tumorima [139, 140].

Fenomen nestabilnosti tipa EMAS^T prepoznat je paralelno s otkrićem mikrosatelitne nestabilnosti MSI u karcinomima [141], no njegova etiologija kao i klinički značaj još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Poznato je da inaktivacija proteina MLH1 ili MSH2, te posljedični potpuni gubitak funkcije sustava MMR, rezultiraju globalnom destabilizacijom mikrosatelitnih sljedova, uključujući i tetranukleotidne. Međutim, pokazano je da mutacije i epigenetske promjene u genima *MLH1* i *MSH2*, koji su ključni za razvoj nestabilnosti tipa MSI-H, ne dovode do izoliranih promjena u tetranukleotidnim ponavljanjima [39, 94]. Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da bi razvoju takvih promjena mogao prethoditi izolirani gubitak funkcije proteina MSH3 [131]. Povezanost između disfunkcije MSH3 i nestabilnosti tipa EMAS^T prvi su opisali Haugen i suradnici [129]. U *in vitro* uvjetima pokazali su da izolirani gubitak funkcije gena i proteina MSH3 (bez gubitka funkcije ostalih proteina sustava MMR) u linijama stanica karcinoma kolona rezultira visokom razinom nestabilnosti u tetranukleotidnim te niskom razinom nestabilnosti u dinukleotidnim ponavljanjima, no bez utjecaja na stabilnost mononukleotidnih

ponavljanja. Budući da MSI-L tumori uglavnom manifestiraju promjene u dinukleotidnim sljedovima, Haugen i suradnici, te Yamada i suradnici u svojim istraživanjima sugeriraju da bi disfunkcija MSH3 mogla biti zajednički mehanizam u nastanku MSI-L i E-MSI nestabilnih tumora [129, 142]. Također, nekoliko istraživanja je pokazalo da se sporadičan gubitak ekspresije MSH3 u jezgri javlja i u tumorskim stanicama E-MSI nestabilnih karcinoma debelog crijeva [129] te korelira s brojem ispitivanih nestabilnih tetranukleotidnih biljega [134].

Važan koncept u razjašnjavanju nestabilnosti tipa E-MSI postavili su Campregher i suradnici, kada su utvrdili da izolirani gubitak funkcije proteina MSH3 ne potiče zloćudnu preobrazbu zdravih stanica debelog crijeva, unatoč tome što uzrokuje E-MSI i opsežne promjene na razini proteina uključenih u stanične procese poput metabolizma i apoptoze [143]. Uz to, rezultati nedavnog istraživanja pokazuju da nestabilnost tipa E-MSI u karcinomima debelog crijeva korelira s povećanom ekspresijom transkripcijskog čimbenika *Snail1*, odgovornog za epitelno-mezenhimalnu tranziciju i povećan invazivni kapacitet tumorskih stanica [144]. Prema tome, smatra se da gubitak ekspresije MSH3, te s njime povezani E-MSI, nisu uključeni u pokretanje tumorskog procesa, već se čini da utječu na tijek tumorigeneze poticanjem invazivnosti i metastatskog kapaciteta tumorskih stanica [143].

Tumorigeneza u kolonu često je udružena s kroničnom upalom, a prema dosadašnjim istraživanjima upala također igra važnu ulogu u poticanju nestabilnosti tipa E-MSI. E-MSI je dokazan u prekanceroznim upalnim bolestima poput ulceroznog kolitisa, pri čemu se učestalost nestabilnosti tipa E-MSI povećava s dugotrajnošću upalnog procesa i napredovanjem neoplastičnih promjena [145, 146].

Pojačano lučenje proupalnih citokina dovodi do lokaliziranog razvoja oksidacijskog stresa za koji je pokazano da može rezultirati smanjenom aktivacijom proteina sustava MMR [147-149]. Stoga su Tseng-Rogenski i suradnici detaljnije analizirali što se događa s proteinom MSH3 u liniji stanica karcinoma kolona nakon tretmana različitim upalnim medijatorima, pri čemu su pokazali da proupalni citokin interleukin-6 (IL-6), putem proizvodnje ROS-a te aktivacije signalnog puta JAK/STAT3 (od engl. *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*), predstavlja glavni pokretački signal za promjenu smještaja proteina MSH3 iz jezgre u citoplazmu [150]. Osim toga, visoka ekspresija IL-6 snažno korelira s nestabilnosti tipa E-MSI u karcinomima debelog crijeva [150]. Sva ova istraživanja upućuju na to da unutartumorska upala,

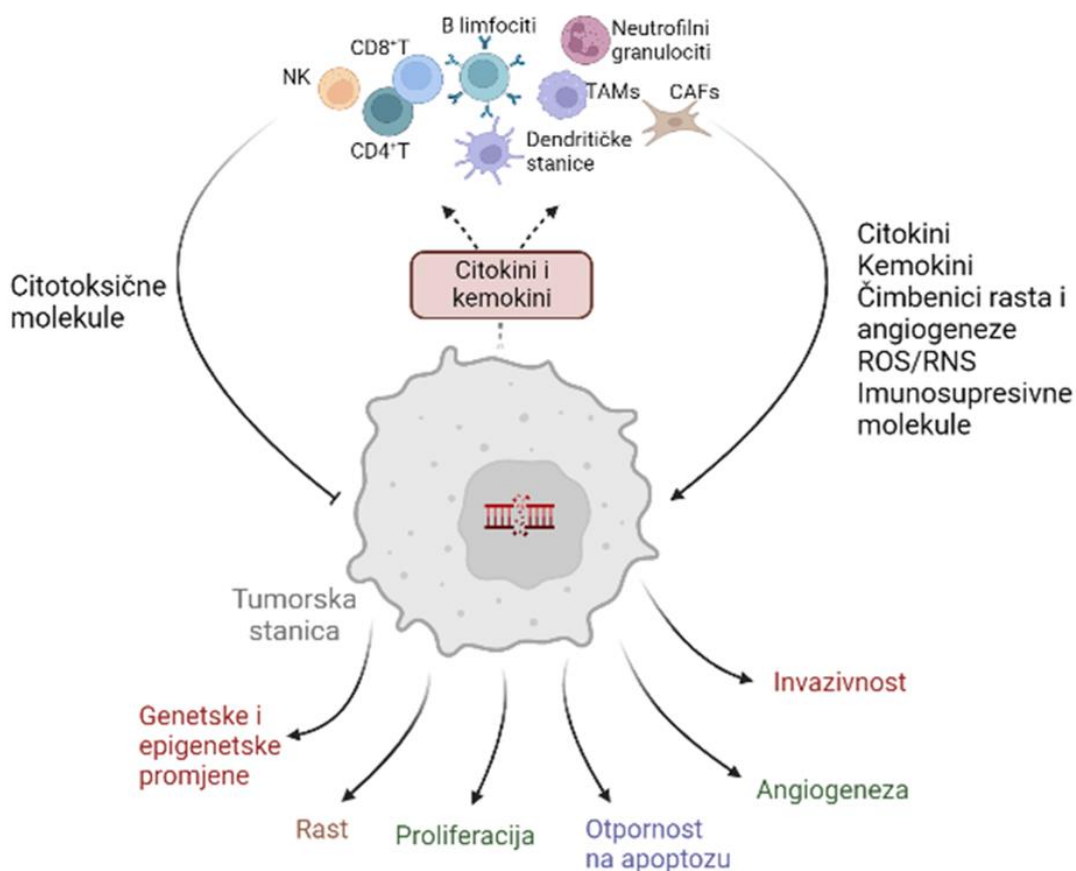
nastala kao odgovor na zloćudnu preobrazbu zdravih stanica epitela, putem produkcije IL-6 može dovesti do promjene smještaja MSH3 te potaknuti razvoj EMASST-a.

1.4. Uloga upale u tumorigenezi karcinoma debelog crijeva

Upala čini jednu od glavnih sastavnica imunskog odgovora koja osim esencijalne uloge u obrani organizma od infekcije ili stranih tijela, ima jednaku važnost i u procesima popravka i regeneracije oštećenog tkiva. Ponekad imunski sustav ne uspije otkloniti antigen ili oštećenje zbog čega upala prelazi u kronični oblik povezan s visokim rizikom za razvoj brojnih bolesti uključujući i tumore [151]. U posljednjih nekoliko desetljeća povezanost upale i razvoja tumora našla se pod povećalom znanosti pri čemu je kronična upala prepoznata kao jedan od ključnih sudionika u gotovo svim stadijima tumorigeneze, uključujući nastanak, napredovanje i metastaziranje [152].

Karcinom debelog crijeva predstavlja jedan od najboljih primjera zloćudnog tumora čiji nastanak i napredovanje, osim o prisutnosti nekoliko ključnih mutacija, u velikoj mjeri ovisi i o interakciji mutiranih stanica sa stanicama tumorskog mikrookoliša (engl. *tumor microenvironment*, TME) (Slika 4.). TME je kompleksan sustav koji uz tumorske stanice čine stanice strome, koje uključuju tumoru pridružene fibroblaste (engl. *cancer-associated fibroblasts*, CAFs) i vaskularne stanice te različite populacije stanica urođenog i adaptivnog imunskog sustava poput tumoru pridruženih makrofaga (engl. *tumor-associated macrophages*, TAMs), prirodno ubilačkih stanica NK (engl. *natural killer cells*, NK), neutrofilnih granulocita, dendritičkih stanica te limfocita B i T [153]. Sve ove stanice su u međusobnom recipročnom odnosu unutar TME, te ovisno o ekspresiji imunskih medijatora, aktivacijskom stanju i broju različitih tipova stanica, mogu postati imunosupresivne, odnosno tumor-promovirajuće. Upalne stanice u TME luče brojne proupalne citokine kao što su IL-6, IL-8, TNF- α i TGF- β , koji u mikrookoliš privlače druge upalne stanice čiji citokini doprinose razvoju oksidacijskog stresa što u konačnici potiče daljnje oštećenje DNA [153]. Dosadašnja istraživanja u ovom području pokazala su da određena svojstva TME kao što su kvalitativne i kvantitativne razlike u infiltraciji imunskim stanicama mogu imati značajan utjecaj na klinički ishod oboljelih [154]. Jedan od primjera je ranije spomenuta prisutnost povećanog broja CD8⁺ limfocita T u karcinomima kolona

s MSI-H koja korelira s boljom prognozom u oboljelih i značajno boljim odgovorom na imunoterapiju u odnosu na MSI-L i MSS karcinome [155, 156]. S druge strane, u mnogim tumorima povećana infiltracija mijeloidnim stanicama poput makrofaga povezana je s napredovanjem bolesti i rezistencijom na terapiju [157-159].



Slika 4. Međudnos stanica unutar tumorskog mikrookoliša. Tumorske stanice imaju sposobnost stvaranja i lučenja citokina i kemokina koji privlače okolne imunosne stanice i stvaraju upalni mikrookoliš oko tumora. Imunosne stanice mogu blokirati rast tumora (stanice NK, CD8⁺ i CD4⁺ limfociti T) ili djelovati tumor-promovirajuće i imunosupresivno (TAM, CAF) lučenjem brojnih citokina, kemokina, čimbenika rasta i angiogeneze. Preuzeto i prilagođeno prema Terzić i sur., 2010.[7].

U određenim se slučajevima kronična upala javlja puno prije razvoja samog tumora, najčešće kao posljedica dugotrajne i nekontrolirane upalne bolesti crijeva (ulcerozni kolitis i Crohnova bolest), infekcije patogenima ili autoimunih bolesti, što u konačnici povećava rizik za razvoj karcinoma debelog crijeva [160, 161]. Osim toga, kronična upala u kolonu može biti potaknuta i brojnim vanjskim čimbenicima poput neadekvatne prehrane, prekomjerne upotrebe antibiotika te promjena u sastavu i funkciji mikrobiote tzv. disbioze, rezultirajući kroničnom upalom niskog intenziteta. Takva kontinuirana upala stvara podlogu za razvoj brojnih mutacija i epigenetskih promjena koje dovode do inaktivacije tumor supresora ili pojačane aktivacije onkogenom omogućavajući zloćudnu preobrazbu epitelnih stanica [151, 162, 163]. Iako u većini slučajeva sporadični karcinomi kolona nastaju kao posljedica dugogodišnjeg nakupljanja mutacija bez prethodne prisutnosti dugotrajne kronične upale, oni sami mogu potaknuti intrinzičnu kroničnu upalu niskog intenziteta koja može pogodovati lokalnom rastu, ali i napredovanju tumora [151]. Primjerice, aktivacija onkogenom i gubitak funkcije tumor supresora utječe na rast tumora, ne samo izravnim djelovanjem na same tumorske stanice, nego i promoviranjem upale u tumoru. Tako je aktivacija onkogenom *KRAS* povezana s pojačanom produkcijom citokina i kemokina kao što su interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , CCL2 (od engl. *C-C motif chemokine ligand 2*), CXCL1 (od engl. *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*) i CXCL3 koji pospješuju infiltraciju mijeloidnim stanicama i potiču rast tumora [157, 164].

Bilo da prethodi tumorskom procesu ili je potaknuta razvojem samog tumora, upala u kolonu je povezana s narušenom zaštitnom funkcijom epitelne barijere. Gubitak stanične polarnosti i čvrstih međustaničnih spojeva, koji nastaju uslijed zloćudne preobrazbe epitelnih stanica, smatraju se jednim od ranih događaja u nastanku sporadičnih tumora kolona. Kao posljedica toga, matične stanice epitela postaju izloženije utjecaju okolišnih mutagena i potencijalno onkogenih bakterija koje poticanjem proupalnog okoliša ili direktnim utjecajem na epitelne stanice mogu doprinijeti tumorigenezi [153]. Primjerice, uočeno je da su tumori kolona i feces oboljelih kolonizirani specifičnim patogenim bakterijama poput *Fusobacterium nucleatum* koja može, putem izravne interakcije s receptorima TLR i poticanjem kronične upale, utjecati na nastanak i napredovanje karcinoma debelog crijeva [165]. Osim infekcije patogenim bakterijama, translokacija komenzalnih bakterija i njihovih produkata kroz oštećenu epitelnu barijeru također može aktivirati kaskadu proupalnog imunskog odgovora te doprinijeti zloćudnoj preobrazbi stanica [166].

1.4.1 Receptori *Toll-like* u homeostazi i tumorigenezi u debelom crijevu

Gastrointestinalni trakt predstavlja glavno stanište mikroorganizama u čovjeku sa značajnim utjecajem na metabolizam, razvoj i homeostazu organizma. Koevolucija čovjeka s različitim mikroorganizmima rezultirala je simbiotskim odnosom temeljenim na pružanju hranjivih tvari komenzalnim mikroorganizmima koji su, s druge strane, esencijalni za probavu hrane, proizvodnju vitamina B12 i K te sazrijevanje i pravilno funkcioniranje imunskog sustava čovjeka [167]. S obzirom na tako kompleksan odnos vrlo je važno razlikovati povoljne komenzalne mikroorganizme od štetnih patogena. Glavnu ulogu pri tome ima jednoslojna epitelna sluznica crijeva koja, putem brojnih konstitutivnih i inducibilnih mehanizama, regulira interakcije imunskih stanica s mikroorganizmima u lumenu crijeva s ciljem održavanja imunostolerancije prema komenzalnim mikroorganizmima uz istovremeno uklanjanje patogena.

Konstitutivni mehanizmi, poput čvrstih spojeva između susjednih stanica i sluzi na površini epitela, omogućavaju fizičku zaštitu od prodora mikroorganizama koji koloniziraju lumen crijeva [168]. Inducibilni mehanizmi obuhvaćaju različite imunostimulirane i stromalne stanice čija aktivacija iziskuje prepoznavanje evolucijski očuvanih molekularnih obrazaca mikroorganizama (engl. *microbial associated molecular patterns*, MAMP) i patogena (engl. *pathogen associated molecular patterns*, PAMP)[169] putem receptora urođene imunosti PRR (od engl. *pattern recognition receptors*) [169].

Receptori *Toll-like* (engl. *Toll-like receptors*, TLR) jedni su od najranije opisanih predstavnika obitelji receptora PRR u čovjeka. Poput ostalih članova ove obitelji, eksprimirani su u najvećoj mjeri na stanicama urođenog imunskog sustava, prvenstveno makrofagima, monocitima, dendritičkim stanicama i neutrofilnim granulocitima, no nalaze se i na stanicama adaptivne imunosti. Iako se prvotno smatralo da je ekspresija TLR svojstvena samo hematopoetskim stanicama, kasnijim istraživanjima dokazno je da se nalaze i na fibroblastima, endotelnim te epitelnim stanicama kao i stanicama tumora [169, 170]. U ljudi je do danas opisano 10 od ukupno 13 receptora TLR pronađenih u sisavaca, a razlikuju se prema ligandima koje prepoznaju te smještaju u stanici. S obzirom na smještaj mogu se ugrubo podijeliti u dvije podskupine: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, i TLR10 koji su smješteni na površini stanice, te TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 koji su smješteni uglavnom u endosomima i endoplazmatskom retikulumu. Površinski TLR većinom prepoznaju različite komponente membrane mikroorganizama kao što su

lipoproteini, peptidoglikani, zimosan i manan (TLR1, TLR2, TLR6), flagelin (TLR5) te lipopolisaharid (TLR4), dok TLR10 u suradnji s TLR2 prepoznaje ligande bakterije listerije te virusa *Influenza A* [170-172]. Endosomski TLR prepoznaju dvolančane (TLR3) i jednolančane RNA (TLR7/8) te nemetilirane CpG otoke u DNA (TLR9). Osim toga, molekularni obrasci povezani s oštećenjem (engl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP) koji nastaju kao produkti oštećenja i nekroze stanica te izvanstaničnog matriksa također mogu aktivirati receptore TLR [173].

Receptori TLR se, osim na imunskim stanicama u stromi sluznice crijeva, nalaze i na različitim linijama epitelnih stanica, uključujući matične stanice kriptne, apsorptivne enterocite, vrčaste, Panethove i enteroendokrine stanice [174]. Ključna funkcija receptora TLR na epitelnim stanicama je selektivno prepoznavanje komenzalnih i patogenih mikroorganizama, pri čemu reguliraju brojne homeostatske mehanizme poput jačanja strukture i funkcije epitelne barijere, aktivacije tolerogenog imunskog odgovora prema komenzalnim mikroorganizmima ili aktivacije upalnog imunskog odgovora usmjerenog na uklanjanje patogena [174]. Upala posredovana aktivacijom receptora TLR na epitelnim stanicama debelog crijeva primarno je povezana s aktivacijom transkripcijskog faktora NF- κ B (od engl. *nuclear factor- κ B*) koji, osim što potiče lučenje raznih kemokina i citokina koji na mjesto infekcije ili oštećenja privlače lokalne imunske stanice, djeluje i na čitav niz unutarstaničnih procesa poput proliferacije, preživljenja te inhibicije apoptoze [175-178].

Iako su, u normalnim uvjetima, ovi procesi neophodni za popravak oštećenog epitela i obnovu homeostaze u sluznici crijeva, pokazano je da u uvjetima dugotrajne aktivacije receptora TLR mogu potaknuti razvoj kronične upale te nastanak i razvoj tumora [179]. Dokaz da receptori TLR imaju ključnu ulogu u tumorigenezi karcinoma debelog crijeva dali su Rakoff-Nahoum i Medzhitov, kada su pokazali da uklanjanje ključne adaptorske molekule nizvodnog prijenosa signala putem TLR, MyD88 (od engl. *myeloid differentiation primary response 88*), dovodi do smanjene ekspresije čimbenika upale kao što su IL-1 β , IL-6, ciklooksigenaza 2 (COX-2), IGF1 (od engl. *insulin-like growth factor 1*), rezultirajući pojačanom apoptozom tumorskih stanica i manjim brojem tumora u miševa s mutacijom u genu *Apc* [179]. Osim toga, pokazano je da konstitutivna aktivacija NF- κ B, i u odsutnosti zamjetne upale, može dovesti do pojačanog oštećenja DNA i ubrzanog razvoja tumora u debelog crijevu [180].

1.5 RECEPTOR TLR4

Toll-like receptor 4 (TLR4) otkriven je 1997. godine te je ujedno i prvi opisani član obitelji receptora TLR u ljudi [181]. Najviša ekspresija ovog receptora prisutna je na stanicama urođene imunosti, i to na tzv. profesionalnim fagocitima poput makrofaga, dendritičkih stanica i neutrofilnih granulocita, te njihovim mijeloidnim pretečama [182]. Stanice limfoidnog porijekla uglavnom pokazuju vrlo nisku razinu TLR4, no pokazano je da limfociti B pojačano ekspimiraju TLR4 nakon aktivacije B-staničnog receptora (engl. *B cell receptor*, BCR) te kostimulacije pomoću CD40, kao i stimulacije citokinom IL-4 [183, 184]. Među nehematopoetskim stanicama, TLR4 se nalazi na stanicama endotela, fibroblastima i stanicama epitela većine organa, uključujući i crijevo.

1.5.1 Prijenos signala putem receptora TLR4

Kao i ostali članovi obitelji TLR, TLR4 je transmembranski glikoprotein građen od izvanstanične domene bogate leucinom koja veže ligand, transmembranske domene te s njom povezane citoplazmatske domene zadužene za nizvodni prijenos signala [182].

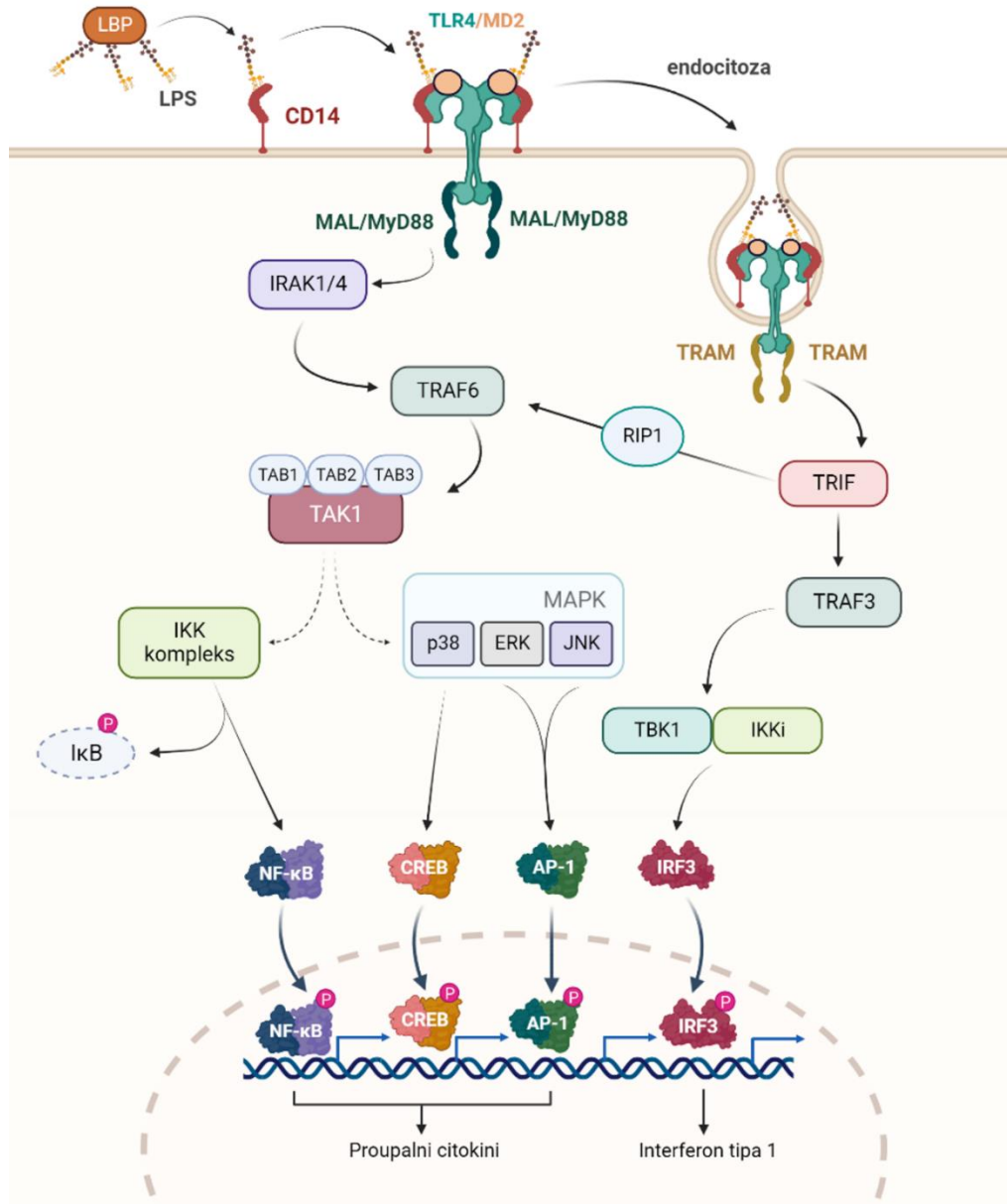
Odgovor putem receptora TLR4 uvjetovan je prepoznavanjem molekula MAMP ili PAMP koje su najčešće lipidni produkti mikroorganizama. Jedna od najbolje istraženih molekula koje aktiviraju TLR4 je endotoksin lipopolisaharid (LPS), no postoje dokazi da još neki mikrobnih produkti poput lipoteihoične kiseline također mogu aktivirati TLR4 [185, 186]. LPS je glavna komponenta vanjske membrane Gram-negativnih bakterija koji se oslobađa otpuštanjem s membrane ili litičkom razgradnjom bakterija [187].

Kompleksan mehanizam vezanja LPS-a započinje u izvanstaničnom prostoru gdje protein LBP (od engl. *LPS binding protein*) katalizira prijenos LPS monomera iz agregata LPS-a porijeklom od bakterijskih membrana i vezikula, te ih prenosi na koreceptor CD14 (Slika 5.). Primarna uloga koreceptora CD14 je prenošenje monomera LPS-a na kompleks receptora TLR4/MD-2 (od engl. *myeloid differentiation protein-2*) što je ključno za dimerizaciju s drugim kompleksom TLR4/MD2 [187, 188]. Konformacijske promjene koje pri tome nastaju omogućavaju unutarstaničnu interakciju homolognih domena TIR (od engl. *Toll/IL-1 receptor*), prisutnih u receptoru TLR4 i adaptorskoj molekuli TIRAP. Nakon što je pokrenuta dimerizacija

TLR4/MD-2 na površini stanice, unutarstanična signalna kaskada može ići ovisno i neovisno o proteinu MyD88 [189] (Slika 4.). Signalni put ovisan o proteinu MyD88 pokreće se prilikom aktivacije svih TLR, izuzev TLR3, a za prijenos signala putem TLR4 potreban je i adaptor MAL (od engl. *MyD88 adapter-like protein*) koji omogućuje aktivaciju MyD88 [190]. Aktivirani MyD88 potom pokreće kaskadu prijenosa signala preko kinaza IRAK (od engl. *interleukin-1 receptor-associated kinase*), ubikvitin-ligaze TRAF6 (od engl. *TNF receptor-associated factor 6*), kompleksa TAK1-TAB (od engl. *TGF- β activated kinase – TAK1 binding proteins*) te kompleksa kinaza IKK (od engl. *IkappaB kinase*), što u konačnici kulminira aktivacijom NF- κ B te kinaza MAPK (od engl. *mitogen-activated protein kinase*) [191]. Aktivirani NF- κ B odlazi u jezgru gdje potiče transkripciju proupalnih citokina poput IL-6, TNF- α te neaktivne pro-forme IL-1 β , dok aktivacija MAPK, poput ERK1/2 (od engl. *extracellular-signal regulated kinases*), p38 i JNK (od engl. *c-Jun N-terminal kinase*), posreduje u aktivaciji AP-1 (od engl. *activating protein-1*), CREB (od engl. *cAMP response element-binding protein*) te stabilizaciji mRNA uključenih u regulaciju upalnog odgovora [189].

Nakon aktivacije MyD88-ovisnog puta, odgovornog za prvi val aktivacije NF- κ B, cijeli kompleks receptora se internalizira u stanicu. Internalizacija, odnosno ulazak LPS-a u endosom, jedan je od glavnih preduvjeta za neutralizaciju LPS-a, a uključuje prijenos signala putem adaptora TRIF (od engl. *TIR-domain-containing adapter-inducing IFN β*) [192]. Ovaj put predstavlja alternativni put aktivacije NF- κ B, MAPK i IRF3 (od engl. *interferon-regulatory factor 3*) koji potiču transkripciju proupalnih citokina, interferona tipa 1 te sazrijevanje mijeloidnih dendritičkih stanica [193]. S jedne strane, TRIF aktivira TRAF6 koji interakcijom s RIP-1 (engl. *receptor-interacting protein-1*) dovodi do aktivacije kompleksa TAK1, rezultirajući aktivacijom NF- κ B i MAPK. S druge strane, aktivacijom TRAF3 i IKK-srodnih kinaza, može dovesti do aktivacije transkripcijskog faktora IRF3 (od engl. *interferon-regulatory factor 3*) koji potom odlazi u jezgru gdje potiče ekspresiju interferona tipa I.

Iako aktivacija TLR4 dovodi do aktivacije istih signalnih puteva u različitim vrstama stanica, njihov nizvodni učinak varira, osobito kada se radi o mijeloidnim i epitelnim stanicama. Primjerice, pokazano je da pojačana aktivacija NF- κ B u mijeloidnim stanicama primarno potiče ekspresiju proupalnih medijatora, dok u enterocitima djeluje na aktivaciju Bcl- χ L (od engl. *B-cell lymphoma-extra large*) te supresiju apoptoze [194].



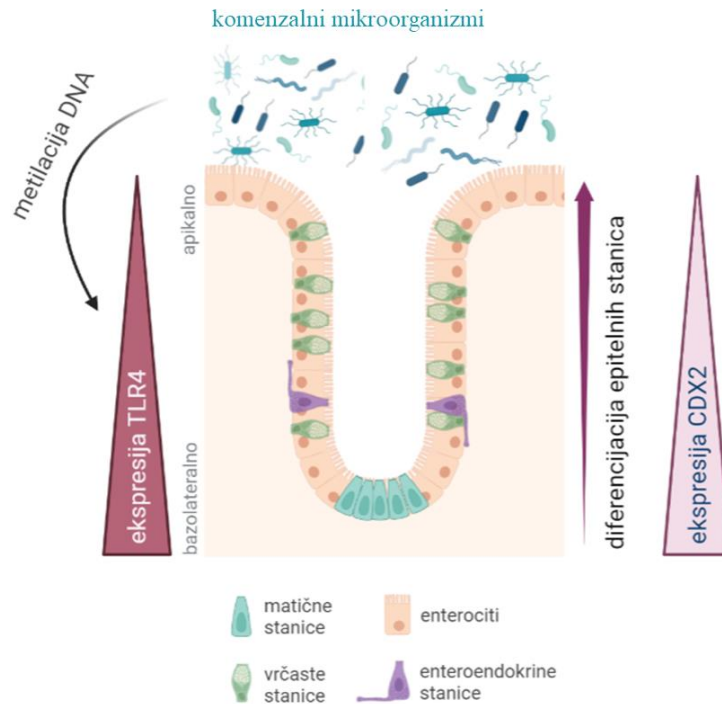
Slika 5. Prijenos signala putem receptora TLR4. Prepoznavanje LPS-a dovodi do dimerizacije TLR4 na plazma membrani stanica te aktivira nizvodni prijenos signala ovisan o adaptorima MyD88/MAL. Endocitoza kompleksa TLR4/MD2/LPS posredovana koreceptorom CD14 potiče prijenos signala ovisan o adaptorima TRIF/TRAM. Prijenos signala putem TLR4 potiče proizvodnju raznih proupalnih citokina i interferona tipa 1. Ilustrirano pomoću programa BioRender.com.

1.5.2 Uloga receptora TLR4 u homeostazi

S obzirom na visoku razinu endogenog LPS-a u probavnom sustavu, tolerancija LPS-a jedan je od ključnih mehanizama u sprječavanju pretjerane aktivacije imunskog sustava. Jedan od načina koji doprinosi toleranciji LPS-a je stroga regulacija ekspresije i aktivacije TLR4 na epitelnim i imunskim stanicama sluznice crijeva. U normalnim uvjetima, stanice sluznice crijeva, uključujući epitelne stanice, ali i imunske stanice u lamini propriji, eksprimiraju nisku razinu TLR4 [195, 196]. Prema istraživanju Takahashi i suradnika, smanjena ekspresija TLR4 na epitelnim stanicama debelog crijeva rezultat je povećane razine metilacije 5' regije gena *TLR4* [197] (Slika 6.). Štoviše, isti autori su pokazali da je razina metilacije *TLR4* u kolonu pod značajnim utjecajem komenzalnih mikroorganizama te ovisi o ekspresiji transkripcijskog faktora *CDX2* (od engl. *Caudal-type homeobox 2*), odnosno stupnju diferencijacije epitelnih stanica [198]. Osim polarizacije ekspresije duž kripte, TLR4 je također polarizirano eksprimirano na membrani epitelnih stanica debelog crijeva pri čemu je dominantno smješten na bazolateralnoj površini [199].

Osim snižene razine TLR4, normalnim stanicama crijevnog epitela nedostaje protein MD-2 ili je u kompleksu TLR4-MD-2 prisutan samo na imunskim stanicama u lamini propriji te na epitelnim stanicama bazalnog dijela kripte [200, 201]. Smatra se da svi ovi mehanizmi regulacije TLR4 rezultiraju time da se upalna, i potencijalno štetna imunska reakcija odvija samo u uvjetima prodora bakterija i njihovih produkata kroz epitel. Na taj način sprječava se neželjena upalna reakcija na komenzalne mikroorganizme koji putem interakcije s epitelnim stanicama doprinose očuvanju homeostaze.

Primarna funkcija TLR4 na normalnom crijevnom epitelu je obnova homeostaze narušene infekcijom ili oštećenjem tkiva. Prepoznavanje LPS-a putem TLR4 na epitelnim stanicama inicijalni je signal za aktivaciju imunskog odgovora u lamini propriji. Poticanjem ekspresije raznih citokina i kemokina TLR4 dovodi do sazrijevanja profesionalnih antigen-predočnih stanica, njihove migracije na mjesto infekcije te aktivacije i diferencijacije limfocita T koji su nužni za potpuno uklanjanje infekcije [202].



Slika 6. Mehanizmi regulacije ekspresije TLR4 na epitelnim stanicama sluznice crijeva. Smanjena ekspresija gena TLR4 rezultat je epigenetskih mehanizama u diferenciranim stanicama crijevnog epitela kako bi se spriječila prekomjerna upalna reakcija prema komezalnim mikroorganizmima. Ukoliko mikroorganizmi dosegnu dublje slojeve kripe, visoka ekspresija TLR4 na nediferenciranim stanicama epitela može potaknuti brz odgovor i spriječiti prodor mikroorganizama kroz epitelnu barijeru. Ilustrirano pomoću programa BioRender.com.

Lokalna upalna reakcija koja nastaje kao odgovor na infekciju patogenom mora biti okončana kako bi se spriječilo oštećenje epitela i pokrenuo proces oporavka crijevne barijere. Pri tome vrlo važnu ulogu ima aktivacija TLR4 putem molekula DAMP. Sposobnost prepoznavanja ovih molekula ima izrazito bitnu ulogu, ne samo u stvaranju i sazrijevanju imunskih stanica, nego i u popravku oštećenog tkiva [203]. S druge strane, pokazano je da nedostatak aktivacije signalnog puta TLR4 prilikom upalne reakcije rezultira znatnim oštećenjem sluznice što obuhvaća poremećaj u proliferaciji stanica epitela, smanjen imunski odgovor te pojačan prodor bakterija u sluznicu [204].

Široki spektar molekula DAMP koje aktiviraju TLR4, između ostalog, uključuje molekule HMGB1 (od engl. *high-mobility group protein B1*), HSP60 (od engl. *heat shock protein 60*) te proteine iz obitelji S100 [205]. Prepoznavanjem endogenih liganada TLR4 potiče aktivaciju i diferencijaciju niza stanica u koštanoj srži i samom oštećenom tkivu, uključujući matične stanice mijeloidne i limfoidne loze, mezenhimske matične stanice, matične stanice endotelnih stanica kao i lokalne epitelne matične stanice čime potiče uspostavljanje homeostaze na mjestu oštećenja i obnovu tkiva [203, 206]. Aktivacija TLR4 na epitelnim stanicama istovremeno rezultira lučenjem kemokina koji privlače imunosne stanice poput makrofaga, koji potom lučenjem prostaglandina E2 (PGE2) i faktora rasta potiču preživljenje i proliferaciju matičnih stanica na mjestu oštećenja [207]. Nadalje, aktivacija TLR4 na endotelnim stanicama krvnih žila omogućava povećanu vaskularnu propusnost te pojačanu ekspresiju adhezijskih molekula čime se olakšava migracija imunskih stanica iz cirkulacije na mjesto oštećenja [208]. Makrofagi koji ekspimiraju TLR4, nastali diferencijacijom matičnih stanica mijeloidne loze iz koštane srži, imaju dominantnu ulogu u kasnijim stadijima zacjeljivanja na način da potiču angiogenezu, diobu endotelnih stanica te sintezu sastavnih komponenti izvanstaničnog matriksa [209].

Aktivacija plazma stanica putem interakcije komenzalnih mikroorganizama i receptora TLR4 čini važnu komponentu crijevne homeostaze. IgA ima važnu ulogu u neutralizaciji komenzalnih i invazivnih mikroorganizama čime sprječava njihov izravan kontakt s imunskim stanicama. Aktivacija TLR4 potiče ekspresiju polimernog imunoglobulinskog receptora na epitelnim stanicama čime omogućava prijenos IgA iz lamine proprije u lumen crijeva [210]. Osim toga, pokazalo se da epitelni receptor TLR4, aktivacijom čimbenika odgovornih za sazrijevanje limfocita B u plazma stanice, može potaknuti prekapčanje imunoglobulinskih razreda u limfocitima B neovisno o aktivaciji limfocita T te doprinijeti preživljenju plazma stanica [211].

1.5.3 Uloga receptora TLR4 u tumorigenezi

S obzirom na važnost TLR4 u regulaciji homeostaze i procesa popravka tkiva, nije iznenađujuće da nekontrolirana aktivacija ovog receptora može, putem sličnih procesa, djelovati na onkogeni potencijal stanica. Mnoga istraživanja ukazuju na to da zloćudna preobrazba stanica pojačava ekspresiju proteina TLR4 koji potom djeluje stimulirajuće na rast i napredovanje tumora. Različite trajne stanične linije tumora epitelnog porijekla, uključujući i stanice karcinoma kolona poput HT29, SW480 i Caco2, pokazuju znatno višu ekspresiju i aktivnost TLR4 u odnosu na normalne epitelne stanice istog organa [206]. Osim na staničnim linijama, promijenjena ekspresija ovog receptora dokazana je i u kliničkim uzorcima različitih tipova karcinoma poput karcinoma jajnika [212], želuca [213], gušterače [214], a pokazala se osobito važnom u patogenezi upalnih bolesti crijeva i karcinoma kolona [215-217]. Visoka razina TLR4 na stanicama karcinoma kolona čovjeka većinom korelira s lošom prognozom povezanom s metastaziranjem, rezistencijom na terapiju te kraćim preživljenjem u oboljelih [218-222].

Značajan doprinos u razumijevanju povezanosti TLR4 s razvojem karcinoma debelog crijeva dolazi od istraživanja provedenih na životinjskim modelima. Jedan od najčešće korištenih modela je mišji model ljudskog karcinoma kolona potaknutog kolitisom, u kojemu kombinacija tretmana prokarcinogenom AOM (od engl. *azoxymethan*) dovodi do nakupljanja brojnih mutacija i poticanja tumorigeneze u uvjetima kronične upale inducirane iritansom DSS (od engl. *dextran sodium sulfate*). Na ovom modelu pokazano je da uklanjanje gena *TLR4* ili primjena specifičnog inhibitora receptora TLR4 značajno smanjuje intenzitet upale te rast i veličinu tumora [217, 223]. S druge strane, transgenični miševi s konstitutivnom aktivacijom signalnog puta receptora TLR4 na epitelnim stanicama sluznice kolona pokazuju veću osjetljivost na nastanak kronične upale i razvoj karcinoma kolona [216, 224].

Protumorigeni učinak TLR4 u najvećoj je mjeri uvjetovan njegovom aktivacijom na tumorskim stanicama pri čemu se poticanje upale smatra jednim od primarnih mehanizama putem kojih TLR4 djeluje na nastanak i napredovanje tumora. Aktivacijom signalnog puta NF- κ B TLR4 potiče ekspresiju čitavog niza proupalnih citokina, kemokina i faktora rasta poput IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α , COX-2, TGF- β te vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) [176, 225, 226]. Na ovaj način protein TLR4 utječe na brojne signalne puteve koji dovode do aktivacije ključnih staničnih procesa poput proliferacije, preživljenja,

migracije, supresije imunskog odgovora te privlačenja imunskih stanica koje dodatno potiču imunosupresiju i daljnju invaziju tumora [225, 227, 228]. Primjerice, aktivacija TLR4 na makrofazima i epitelnim stanicama debelog crijeva neophodna je za poticanje jednog od glavnih aktivatora upale, COX-2 [176]. U fiziološkim uvjetima, COX-2 putem pojačane produkcije PGE2 regulira popravak oštećene epitelne sluznice, no u uvjetima kronične upale i neoplastičnih procesa može imati široki spektar protumorskog djelovanja uključujući i pojačanu aktivaciju signalnog puta putem receptora za EGFR [176].

Još jedan od mehanizama koji značajno doprinose protumorigenom učinku TLR4 je aktivacija puta Wnt- β -katenin, jednog od glavnih proliferativnih puteva čija je pojačana aktivacija prisutna u većini karcinoma kolona [224]. Santaollala i suradnici pokazali su da aktivacija TLR4 na mišjim epitelnim stanicama crijeva može dovesti do fosforilacije i inhibicije GSK3 β (od engl. *glycogen synthase kinase 3 β*), rezultirajući stabilizacijom β -katenina i poticanjem njegove funkcije u proliferaciji matičnih stanica debelog crijeva [224].

Jedna od glavnih odlika tumorskih stanica jesu poremećaji procesa apoptoze. Iako antiapoptotski učinak TLR4 ima važnu ulogu u procesu popravka oštećene epitelne sluznice kolona, u kontekstu pojačane upale može pogodovati evoluciji i rastu tumorskih stanica [176]. Chung i suradnici su pokazali da LPS učinkovito inhibira apoptozu u stanicama karcinoma kolona potaknutu tretmanom oksaliplatinom i 5-FU [219]. Pored toga, u istom istraživanju je otkriveno da aktivacija signalnih puteva povezanih s aktivacijom TLR4 rezultira pojačanom ekspresijom proteina MDR1 (od engl. *multidrug resistance protein 1*) i MRP (engl. *multidrug resistance-associated proteins*) te doprinosi otpornosti stanica na terapiju [219].

Kao posljedica zloćudne preobrazbe epitelnih stanica te upale, zaštitna funkcija epitelne barijere postupno slabi. Gubitak čvrstih međustaničnih spojeva jedan je od kritičnih događaja koji uvjetuje povećanu propusnost sluznice za bakterije i njihove produkte, dodatno potičući upalu i rast tumora [229, 230]. Aktivacija TLR4 signalnog puta ima negativan učinak na propusnost epitelne barijere što je pokazano na životinjskim modelima i trajnim staničnim linijama epitela sluznice debelog crijeva [185, 231]. Naime, aktivacija signalnog puta TLR4/MyD88 dovodi do pojačane ekspresije proteina MLCK (od engl. *myosin light chain kinase*) koji poticanjem kontrakcija aktinskih i miozinskih filamenata utječe na otvaranje čvrstih spojeva među stanicama [185]. Procesu prolaska bakterija kroz epitelnu barijeru, osim samog oštećenja, uvelike doprinosi

i invazivnost bakterijskih populacija. Tako je pokazano da ranije spomenuta invazivna vrsta *F. nucleatum* može putem aktivacije TLR4 na tumorskim stanicama utjecati na različite aspekte razvoja karcinoma kolona, poput pojačane produkcije proupalnih citokina te poticanja proliferacije i invazije tumorskih stanica [232-234].

1.6 Polimorfizmi jedne baze

Polimorfizmi predstavljaju normalne varijacije u slijedu nukleotida u DNA koje se često javljaju u općoj populaciji. Polimorfizmi jedne baze (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNP) najrasprostranjeniji su izvor genetske varijabilnosti u genomu čovjeka, a označavaju promjenu jedne baze u slijedu nukleotida u DNA, gdje varijantne baze imaju učestalost veću od 1 % u populaciji. Od završetka projekta humanog genoma do danas identificirano je više od 17 milijuna različitih SNP-ova koji predstavljaju osnovu različitosti među pojedincima [235]. Pri tome je pokazano da su raspoređeni po cijelom genomu, a s većom se učestalosti javljaju u nekodirajućim, nego u kodirajućim regijama. U prosjeku se javljaju na svakih ~ 500 baza. Većinom nemaju funkcionalnu ulogu u genomu, no ukoliko se nalaze u kodirajućim regijama gena mogu dovesti do promjena u ekspresiji gena te građi i funkciji proteina [236].

Dostignuća u razvoju metoda molekularne genetike omogućila su istraživanje velikog broja SNP-ova s ciljem utvrđivanja njihova utjecaja na funkciju proteina te povezanost s određenim fenotipovima, uključujući i sklonost obolijevanju od različitih bolesti. Takav pristup osobito je značajan u istraživanju multigenih bolesti koje su često kompleksne etiologije te obuhvaćaju promjene u većem broju gena manjeg utjecaja koji, u međudjelovanju s okolišnim čimbenicima, mogu utjecati na sklonost obolijevanju, ali i na tijek te krajnji ishod bolesti. Zloćudni tumori jedan su od primjera kompleksnih bolesti. Posljednjih nekoliko godina sve veći broj istraživanja ukazuje na to da polimorfizmi u genima za receptore TLR utječu na intenzitet imunskog odgovora pri čemu su neki od njih povezani s povećanom osjetljivošću na infekcije, autoimune bolesti kao i obolijevanjem od karcinoma [237]. Upravo boljim razumijevanjem uloge SNP-ova u patogenezi bolesti i tumorigenezi te odgovora pojedinca na potencijalne lijekove, otvara se mogućnost za korištenje analiza SNP u personaliziranom pristupu liječenju.

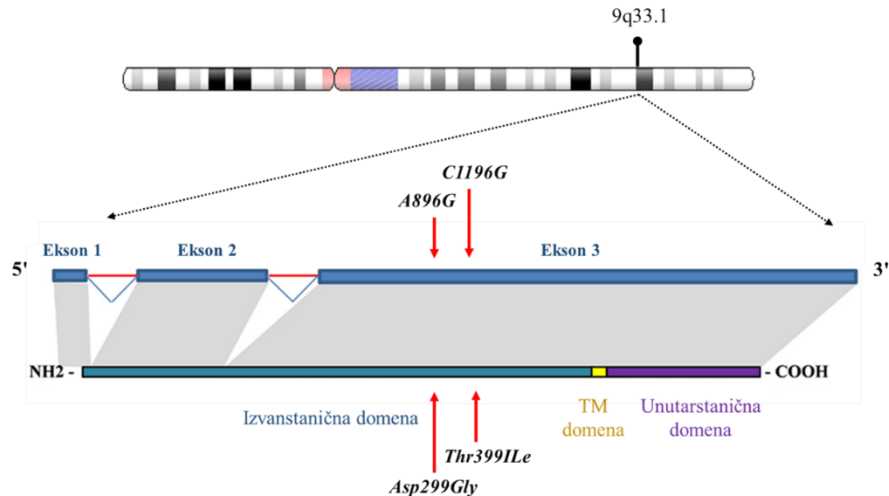
1.6.1 Polimorfizmi jedne baze u genu *TLR4*

U čovjeka, gen *TLR4* se nalazi na dugom kraku kromosoma 9 na poziciji 33.1 te kodira za protein koji se sastoji od 835 aminokiselina [238]. Izvanstanična domena proteina TLR4 sadrži 624 aminokiseline od kojih 22 ponavljajuća leucinska ostatka (engl. *leucine rich repeats*, LRR) čine regiju odgovornu za interakciju receptora i liganda. Transmembranska domena receptora građena je od 33 aminokiseline, a citoplazmatska od 178 aminokiselina [238].

Gen *TLR4* čovjeka sadrži nekoliko nesinonimnih SNP lokusa uglavnom smještenih u eksonu 3 [239]. Iako se većina ovih polimorfizama javlja s vrlo niskom učestalosti u općoj populaciji (manje od 1 %), dva polimorfizma, *A896G* i *C1196T*, javljaju se s učestalosti od 10 do 18 % među različitim populacijama te su postala predmetom velikog broja istraživanja [239, 240]. Ferwerda i suradnici pokazali su da se zemljopisna rasprostranjenost haplotipova *A896G/C1196T* značajno razlikuje među populacijama. Dok se u europskoj populaciji ovi polimorfizmi najčešće zajedno nasljeđuju, u afričkoj i azijskoj populaciji to nije zabilježeno [241]. Oba polimorfizma nalaze se unutar kodirajuće regije za izvanstaničnu domenu proteina TLR4, pri čemu supstitucija adenin-gvanin na poziciji +896 nizvodno od start kodona (*A896G*) rezultira zamjenom konzervirane asparaginske kiseline glicinom na poziciji 299 (Asp299Gly), dok supstitucija citozin-timin na poziciji +1196 nizvodno od start kodona (*C1196G*) dovodi do zamjene treonina izoleucinom na poziciji 399 (Thr399Ile) (Slika 7.) [241].

Arbour i suradnici prvi su detaljnije opisali ove polimorfizme pri čemu su otkrili da nosioci varijantnih alela *896G* i *1196T* pokazuju značajno slabiji imunski odgovor na inhalirani LPS u odnosu na kontrolnu populaciju [240]. Isti autori su u uvjetima *in vitro* otkrili da je slabija aktivacija TLR4 u najvećoj mjeri uvjetovana supstitucijom *A896G*, sugerirajući značajniji funkcionalni utjecaj *A896G* u odnosu na *1196T* [240].

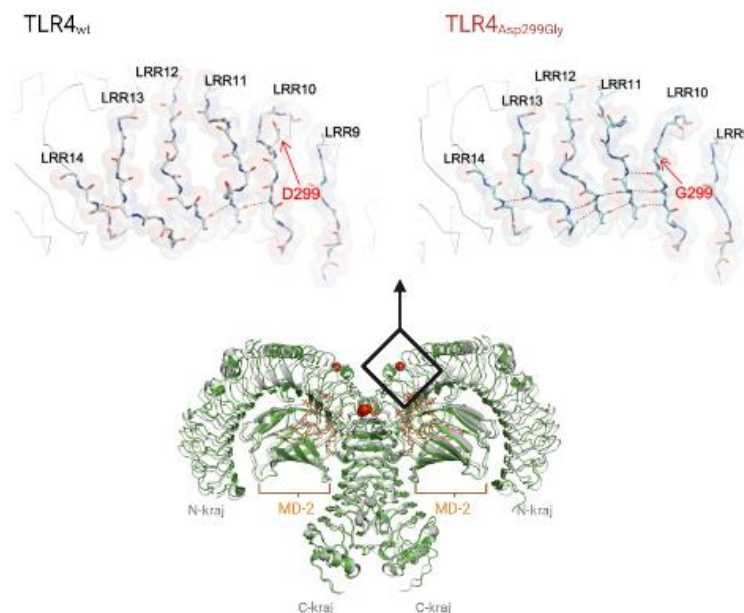
Međutim, mehanizam kojim *A896G* i *C1196T* utječu na funkciju TLR4 i odgovor na LPS i dalje nije u potpunosti razjašnjen. Dok nekoliko istraživanja smatra da je slabiji odgovor na LPS uvjetovan smanjenom ekspresijom varijantnog tipa proteina TLR4 na stanicama epitela i makrofazima [240, 242], rezultati drugih istraživanja ne pokazuju razlike u ekspresiji između varijantnog i divljeg tipa gena/proteina TLR4 [238, 243, 244].



Slika 7. Smještaj polimorfizama *A896G* (*Asp299Gly*) i *C1196T* (*Thr399Ile*) u genu i proteinu *TLR4*. Polimorfizmi *A896G* i *C1196T* smješteni su u eksonu 3, unutar kodirajuće regije za izvanstaničnu domenu proteina *TLR4*. TM, transmembranska domena. Preuzeto i prilagođeno prema Vaure i Liu, 2014. [245].

Analizom kristalne strukture proteina *TLR4* u kompleksu s proteinom MD-2 i LPS-om, Ohto i suradnici su utvrdili značajne promjene u strukturi varijantnog tipa proteina *TLR4*, za koje se pokazalo da ne utječu na konformaciju kompleksa *TLR4/MD-2* niti su izravno uključene u prepoznavanje LPS-a [238]. Za razliku od *C1196T* SNP-a, strukturne promjene su značajnije izražene prilikom supstitucije *A896G*. Tako je utvrđeno da supstitucija *Asp299Gly* potiče promjene u regiji LRR10-13, u blizini veznog mjesta za LPS, mijenjajući svojstva izvanstanične domene *TLR4* koja mogu utjecati na učinkovitost i optimalno vezanje liganda, kao i stabilnost receptora (Slika 8.) [238].

Nadalje, funkcionalne analize su pokazale da polimorfizam *A896G* može narušiti dimerizaciju receptora potaknutu vezanjem LPS-a, pri čemu interferira s aktivacijom nizvodnih signalnih molekula MyD88 i TRIF. Posljedica toga je smanjena aktivacija NF- κ B, a time i ekspresija i lučenje proupalnih citokina [244, 246].



Slika 8. Prikaz razlika u strukturi izvanstanične domene TLR4 nastalih uslijed polimorfizma Asp299Gly. Polimorfizam A896G dovodi do supstitucije asparaginske kiseline (D) glicinom (G) na poziciji 299 u izvanstaničnoj domeni proteina TLR4. Asp299Gly uzrokuje promjene u regiji LRR10-13, u blizini veznog mjesta za LPS. Preuzeto i prilagođeno prema Ohto i sur., 2012. [238].

Prethodna istraživanja povezuju varijantne alele 896G i 1196T s povećanom osjetljivošću na bakterijske i virusne infekcije [247], ali i povećanim rizikom za razvoj kompleksnih bolesti poput upalnih bolesti crijeva i karcinoma [248, 249]. Pronađeno je da se varijantni alel G polimorfizma A896G učestalije javlja u oboljelih od karcinoma dojke [250], želuca [251-253] i kolona [254, 255]. Suprotno tomu, nekoliko istraživanja nije pronašlo dokaz o povezanosti ovih polimorfizama s rizikom za obolijevanje od karcinoma želuca [256], dojke [257] i kolona [258, 259]. Stoga je, s ciljem postizanja konsenzusa o utjecaju ovih polimorfizama na rizik za razvoj karcinoma, objavljeno i nekoliko meta-analiza. U jednoj od njih potvrđeno je da su varijantni aleli (896G i 1196T) oba TLR4 polimorfizma povezani s povećanim rizikom za obolijevanje od karcinoma, pri čemu varijantni alel G polimorfizma A896G značajno povećava rizik za obolijevanje od karcinoma želuca [249].

1.7 MikroRNA

MikroRNA (miRNA) su male nekodirajuće molekule RNA koje djeluju kao posttranskripcijski regulatori ekspresije gena [260]. Vezanje miRNA s ciljnom mRNA najčešće rezultira utišavanjem ciljnog gena razgradnjom, cijepanjem ili translacijskom represijom mRNA molekule. Uz to, u nekim slučajevima miRNA mogu poboljšati stabilnost mRNA, ali i potaknuti transkripciju i translaciju ciljnih gena [261]. Dužine su 20 do 23 nukleotida, no sparivanje komplementarnih baza u ciljnoj mRNA primarno ovisi o svega 5 do 7 nukleotida na 5' kraju miRNA, odnosno o regiji „seed“. Upravo stoga jedna miRNA može imati nekoliko ciljnih mRNA, a svaka mRNA može biti regulirana putem više različitih miRNA [260].

Biogeneza miRNA započinje djelovanjem enzima RNA polimeraze II koja prepisuje primarni miRNA transkript (pri-miRNA) s 5' vrhom i 3' poli – (A) krajem s kodirajućeg genskog mjesta u DNA. Približno polovica do danas poznatih miRNA nastaje intragenskim prepisivanjem, najčešće iz introna, dok se ostale prepisuju intergenski i regulirane su vlastitim promotorom. Primarna miRNA se dalje obrađuje u pre-miRNA preko mikroprocesorskog kompleksa kojeg čine enzim ribonukleaza tip 3 (RNaza III), Drosha i protein DGCR8 (od engl. *DiGeorge syndrome critical region gene 8*, Pasha) koji veže dvolančanu RNA. Djelovanjem ovog kompleksa odcjepljuje se ključna struktura oblika ukosnice dužine 60-70 nukleotida koja tvori pre-miRNA. pre-miRNA se potom transportira iz jezgre u citoplazmu pomoću eksportina 5 (EXP5), gdje se dalje obrađuje djelovanjem RNaze III i riboendonukleaze Dicer. Ovaj proces uključuje uklanjanje završne petlje što rezultira stvaranjem zrelog miRNA dupleksa s približno 22 sparane baze. Nastala miRNA veže se na protein iz porodice Argonaut 2 (AGO2) koji stabilizira kompleks miRNA i Dicera te, uz druge članove porodice Argonaut, postaje dio ribonukleinskog kompleksa RISC (od engl. *RNA Induced Silencing Complex*). Vodeći lanac iz dvolančane molekule miRNA pri tome ostaje vezan unutar kompleksa RISC, a specifičnost RISC-a je interakcija s komplementarnim slijedom unutar ciljne mRNA molekule, tzv. MRE (od engl. *miRNA response elements*). Ovisno o stupnju komplementarnosti MRE, ciljna mRNA se usmjerava prema cijepanju ovisnom o endonukleaznoj aktivnosti AGO2 ili prema represiji translacije i razgradnji posredovanoj kompleksom RISC. Osim prethodno opisanog kanonskog puta, postoji i alternativni put biogeneze male skupine miRNA koji je neovisan o Droshi i Diceru [262].

Do danas je metodom sekvenciranja otkriveno više od 1000 različitih miRNA. Pojedine miRNA, poput obitelji *let-7* i *miR-21*, visoko su eksprimirane u gotovo svim vrstama stanica, dok druge pokazuju vremensku i tkivno-specifičnu ekspresiju [263-265]. miRNA imaju važnu ulogu u regulaciji širokog spektra staničnih procesa uključujući homeostazu, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu stanica, a brojna istraživanja ukazuju i na njihovu funkciju u finom podešavanju imunološkog odgovora [266].

1.7.1 Uloga miRNA u tumorigenezi

Promjene u ekspresiji miRNA povezane su s različitim bolestima u ljudi, uključujući i zloćudne tumore. Kod različitih tipova tumora obrazac ekspresije miRNA razlikuje se u odnosu na zdravo tkivo čijom je zloćudnom preobrazbom tumor nastao. Uz to, primjećen je i specifičan obrazac ekspresije miRNA ovisno o tipu tumora zbog čega se intenzivno istražuju kao potencijalni biljezi u dijagnostici tumorskih bolesti kao i procjeni učinka protutumorske terapije [267].

Dosadašnja istraživanja pokazuju da miRNA mogu biti uključene u tumorigenezu kao onkogeni, djelujući na negativne regulatore onkogenih puteva, ili kao tumor-supresori, mijenjajući ekspresiju onkoproteina [268]. Jedan od primjera onkogene miRNA je *miR-21* koja je pojačano eksprimirana u različitim tipovima zloćudnih tumora, uključujući i karcinome kolona [269]. Djelovanjem na ciljane tumor supresore, poput *PTEN* (od engl. *phosphatase and tensin homolog*) i *PDCD4* (od engl. *programmed Cell Death 4*), *miR-21* potiče aktivaciju signalnog puta PI3K/Akt te blokira aktivnost kaspaza i apoptozu, promovirajući migraciju, invaziju i metastaziranje stanica karcinoma kolona [264]. S druge strane, povišena razina miRNA *let-7a* može imati tumor-supresorski učinak te negativno regulirati ključne procese povezane s proliferacijom i metastaziranjem tumora [265].

Zadnjih godina sve više istraživanja ukazuje na to da promijenjena ekspresija nekih miRNA može utjecati na tumorigenezu putem regulacije upalnog odgovora u tumoru. Među njima su najznačajnije *miR-146a* i *miR-155*. MiRNA *miR-155* putem negativne regulacije SHIP1 (od engl. *Src Homology-2 domain-containing inositol-5'-phosphatase 1*) pojačava aktivaciju signalnog puta NF- κ B, dok *miR-146* inhibira ekspresiju transkripcijskih faktora *IRAK1/2* i *TRAF*, djelujući kao negativni regulator signalnog puta NF- κ B te na taj način reguliraju intenzitet i trajanje upalnog

odgovora [270, 271]. Osim toga, pokazano je da miRNA sudjeluju u regulaciji funkcije epitelnih stanica, ekspresiji raznih citokina i kemokina te poticanju ili spriječavanju upale [272].

Istraživanja pokazuju da visoka ekspresija *miR-146a* korelira sa značajno duljim ukupnim preživljenjem u oboljelih od karcinoma kolona, sugerirajući inhibitorni učinak ove miRNA na napredovanje i metastaziranje tumora [273]. Osim kao negativni regulator signalnog puta NF- κ B, pokazano je da *miR-146a* može djelovati i na regulaciju sinteze proteina PGE2 u tumorskim stanicama te produkciju IL-17A u mijeloidnim stanicama, što se pokazalo ključnim u smanjenju protumorigene upale u karcinomu kolona [274]. S druge strane, *miR-155* ima pozitivan učinak na poticanje aktivacije signalnog puta NF- κ B i kronične upale, čime može doprinijeti rastu i napredovanju tumora. Uz to, pokazano je da ova miRNA može pospješiti infiltraciju imunosupresivnih stanica mijeloidnog porijekla (engl. *myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs) u tumorski mikrookoliš ciljnom represijom mRNA gena *SOCS1* (engl. *suppressor of cytokine signaling 1*) i smanjenom funkcijom regulatornih limfocita T, promovirajući invaziju i metastaziranje tumora [275].

1.7.2 *miR-375-3p*

miR-375 čovjeka prvi put je otkrivena i klonirana u endokrinim stanicama gušterače zbog čega se neko vrijeme smatrala kao miRNA specifična za beta-stanice [276]. Međutim, ubrzo nakon toga pokazana je njena funkcija u različitim tkivima i regulatornim putevima kao što su razvoj i funkcija gušterače, razvoj neurona, diferencijacija i funkcija adipocita te poticanje osteogeneze [277]. Istraživanjem učinka *miR-375* na ciljne gene imunskog sustava pokazano je da ima bitnu ulogu u upalnom odgovoru te je vezana uz regulaciju ekspresije citokina uključenih u imunski odgovor Th1 i Th2 tipa stanica [278]. Osim toga, pokazano je da može potaknuti lučenje citokina u makrofazima te da ima ulogu u njihovoj polarizaciji, migraciji i apoptozi [279]. S obzirom na gore navedene podatke, ne iznenađuje rastući broj istraživanja koja ukazuju na ulogu *miR-375* u patologiji raznih upalnih bolesti poput dijabetesa tipa 1, kroničnih upalnih bolesti crijeva i karcinoma [277].

miR-375 uglavnom djeluje kao tumor-supresor, regulirajući ekspresiju važnih onkogeni u različitim tipovima zloćudnih tumora uključujući karcinom prostate, želuca, hepatocelularni karcinom i karcinom kolona [280]. Istraživanja pokazuju da snižena ekspresija *miR-375* pospješuje

preživljenje stanica hepatocelularnog karcinoma, dok povišena ekspresija ove miRNA negativno djeluje na proliferaciju, klonalnost te invazivni kapacitet stanica karcinoma jetre izravnom regulacijom transkripcije i translacije onkogeno *AEI-1* (od engl. *astrocyte elevated gene-1*) [281]. Također, povišena ekspresija *miR-375* može suprimirati nastanak, napredovanje i metastaziranje karcinoma želuca blokiranjem signalnih puteva poput JAK2-STAT3, Hippo i YWHAZ/ β -katenin [282].

Karcinomi kolona najčešće pokazuju sniženu ekspresiju *miR-375* [283]. Štoviše, nekoliko istraživača smatra *miR-375* pogodnim minimalno invazivnim biljekom u prognozi ove bolesti [284]. Potencijalni mehanizmi djelovanja *miR-375* u tumorigenezi sporadičnog karcinoma kolona još uvijek nisu dovoljno istraženi, no pokazano je da može suprimirati proliferaciju, napredovanje i preživljenje stanica karcinoma kolona negativnom regulacijom gena *KLF4* i *Bcl-2* [285, 286]. Slična istraživanja pokazuju da regulacijom ekspresije *SPI* (od engl. *specificity protein 1*), *miR-375* dovodi do prekida u staničnom ciklusu i na taj način inhibira invaziju i migraciju stanica karcinoma kolona [287]. Osim u karcinogenezi kolona, novije istraživanje koje su proveli Wu i suradnici pokazuje da je *miR-375* je jedan od ključnih posrednika u patogenezi upalnih bolesti crijeva. Prema njihovim rezultatima, *miR-375* izravnom regulacijom ekspresije gena *TLR4* utječe na aktivaciju NF- κ B i upalnih čimbenika poput IL-6, IL-1 β , IL-8 i TNF α , promovirajući upalu i napredovanje bolesti (Slika 9.) [288].



Slika 9. Shematski prikaz interakcije *miR-375-3p* s ciljnom mRNA gena *TLR4*. Slijed nukleotida u „seed“ regiji *miR-375-3p* i komplementarnoj regiji mRNA gena *TLR4* označene su crvenim slovima.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Prvi cilj ovog istraživanja bio je ispitati učestalost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST u sporadičnim karcinomima debelog crijeva te na temelju dobivenih rezultata definirati podskupine tumora s obzirom na učestalost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i/ili EMAST.

Drugi cilj istraživanja bio je ispitati ulogu jednog od glavnih regulatora upalnog odgovora u sluznici debelog crijeva, receptora TLR4, u podskupinama sporadičnog karcinoma debelog crijeva dobivenih analizom mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST.

Uz to, u ovom smo istraživanju željeli ispitati regulaciju receptora TLR4 u podskupinama sporadičnih karcinoma debelog crijeva te smo u tu svrhu ispitati učestalost polimorfizma *A896G* u genu *TLR4* te razinu negativnog regulatora ekspresije *TLR4*, *miR-375-3p*.

Pretpostavka ovog istraživanja je da pojačana ekspresija i aktivacija receptora TLR4 različito utječe na tumorigenezu podskupina sporadičnih karcinoma debelog crijeva stratificiranih s obzirom na prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i/ili EMAST.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici

Istraživanjem je obuhvaćeno 250 ispitanika oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva te 250 nesrodnih zdravih osoba, usporedivih po dobi i spolu. Skupina oboljelih obuhvaća 152 (60,8 %) muškarca i 98 (39,2 %) žena u rasponu od 27 do 93 godine starosti (srednja životna dob 65 godina), dok skupina kontrola obuhvaća 136 (54,4 %) muškaraca i 114 (45,6 %) žena u rasponu od 22 do 101 godine starosti (srednja životna dob 64 godine).

3.2 Uzorci

U istraživanju smo koristili uzorke krvi, tumorskog tkiva i tkiva pridružene normalne sluznice debelog crijeva oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Od svakog oboljelog uzorkovan je dio tkiva pridružene normalne sluznice debelog crijeva na udaljenosti 15 cm od ruba tumora i tkivo iz centralnog dijela tumora (T1). Ukoliko je bilo moguće, uzorkovano je tkivo iz invazivnog ruba tumora (T2) te pridružena normalna sluznica na udaljenostima od 10 i 5 cm od ruba tumora. Uzorci su prikupljeni tijekom rutinskih operativnih zahvata na Klinici za kirurgiju KB Merkur, Zagreb, te pohranjeni u Hrvatskoj banci DNA i tumora za bazična istraživanja pri Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković [289]. Od svakog je uzorka, dio tkiva zamrznut u tekućem dušiku te pohranjen na -80 °C, a dio tkiva fiksiran 4 %-tnim formalinom i uklopljen u parafin. Prije uključanja u istraživanje svaki je uzorak analiziran rutinskim hematoksilin-eozin (H&E) bojenjem te je dijagnoza potvrđena od strane patologa. Također su prikupljeni podaci o veličini i smještaju tumora, stupnju diferencijacije, histološkom tipu tumora, pupanju tumora te gustoći unutartumorskog limfocitnog infiltrata.

Iz uzoraka krvi oboljelih od sporadičnog karcinoma kolona DNA je prethodno izolirana i pohranjena u Hrvatskoj banci DNA i tumora za bazična istraživanja pri Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković [289]. Uz uzorke oboljelih, kao kontrole koristili smo uzorke DNA izolirane iz krvi nesrodnih zdravih osoba, također pohranjene u Hrvatskoj banci DNA i tumora za bazična istraživanja pri Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković [289].

Prikupljanje, pohrana te analiza uzoraka odobreni su dozvolom Etičkog povjerenstva KB Merkur, Zagreb, u svrhu realizacije HRZZ projekta „Mikrosatelitna nestabilnost (MSI i EMAST) u molekularnom profiliranju sporadičnih karcinoma debelog crijeva“ (voditelj projekta: dr. sc. Sanja Kapitanović).

3.3 Izolacija DNA

3.3.1 Izolacija DNA iz tkiva metodom fenol/kloroform

Za izolaciju genomske DNA iz uzoraka tkiva prethodno pohranjenih na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ koristili smo klasičnu metodu fenol/kloroform. Komadić smrznutog tkiva usitnili smo na ledu te prenijeli u Eppendorf epruvetu od 2 mL koja je sadržavala 750 μL pufera za digestiju (100 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl, pH 8,0; 25 mM EDTA, pH 8,0; 0,5% SDS; pH 8,2) i 20 μL proteinaze K (koncentracije 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Macherey-Nagel). Inkubaciju uzoraka smo proveli preko noći na termobloku pri temperaturi od $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz miješanje. Nakon inkubacije uzorke smo ohladili na sobnu temperaturu. Uzorcima smo potom dodali 750 μL fenola (Sigma, SAD), dobro promiješali na rotirajućoj miješalici te centrifugirali 1 minutu na 16000 x g kako bismo odvojili faze. Gornju fazu smo precizno pipetiranjem prenijeli u čistu epruvetu i dodali 750 μL smjese fenol:kloroform:izoamilni alkohol u omjeru 25:24:1. Potom smo smjesu dobro promiješali na rotirajućoj miješalici te odvojili faze centrifugiranjem 1 minutu na 16000 x g pri sobnoj temperaturi. Gornju fazu prenijeli smo u čistu epruvetu te dodali 750 μL smjese kloroform:izoamilni alkohol u omjeru 24:1. Nakon što smo smjesu dobro promiješali, odvojili smo faze centrifugiranjem 1 minutu na 16000 x g pri sobnoj temperaturi. Zatim smo gornju fazu prenijeli u čistu epruvetu i dodali 100 μL 5M NaCl (Kemika, Hrvatska) i 750 μL izopropanola (Kemika, Hrvatska). Smjesu smo dobro promiješali te centrifugirali 5 minuta na 16000 x g pri sobnoj temperaturi. Dobiveni supernatant smo uklonili, a DNA talog isprali s 1 mL 70 %-tnog etanola (Kemika, Hrvatska) te centrifugirali 5 min na 16000 x g pri sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, supernatant smo uklonili, a talog, nakon što je ispario preostali etanol, otopili u puferu TE (10 mM TRIS; 1 mM EDTA; pH 8,0) na termobloku pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uzorke smo pohranili na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do konačnog korištenja.

3.3.2 Izolacija DNA metodom mikrodisekcije iz rezova tkiva uklopljenih u parafin

Kako bismo analizirali pojedine segmente tumora te pridruženu normalnu sluznicu neposredno uz tumor, genomsku DNA smo izolirali metodom mikrodisekcije iz rezova tkiva uklopljenih u parafin. Za izolaciju DNA izdvojili smo nekoliko segmenata tumora: uzorke pridružene normalne sluznice kolona na maksimalnoj udaljenosti od 1 cm od ruba tumora (N_c, N_b, N_a), uzorke pridružene normalne sluznice neposredno uz rub tumora (R1_N, R2_N) i tumorsko tkivo ruba tumora (R1_T, R2_T), uzorak iz središta tumora (T1) te uzorak invazivnog ruba tumora (T2). Osim toga, iz rezova tkiva adenokarcinoma s mucinoznom komponentom izdvojili smo uzorak mucinozne (T_M) i uzorak adenokarcinomske komponente tumora (T_A).

Prije postupka mikrodisekcije, pojedine segmente tumora smo označili na preparatima obojenim H&E bojenjem koristeći se povećalom. Rezovi parafinskih kocki debljine 10 µm deparafinizirani su u ksilenu (Kemika) te rehidrirani u seriji etanola padajućih koncentracija (90%, 70%, 50%) (Kemika). Koristeći se povećalom, sterilnom iglom pokupili smo tkivo iz pojedinih regija tumora te prenijeli u epruvetu od 1,5 mL koja je sadržavala 1 mL 50%-tnog etanola. Uzorke smo potom centrifugirali 5 minuta na 11000 x g kako bismo uklonili etanol te smo izolaciju DNA nastavili koristeći komplet za izolaciju „*NucleoSpin*[®] DNA FFPE XS“ (Macherey-Nagel). Nakon uklanjanja etanola, na tkivo smo dodali 100 µL pufera FL za lizu stanica te 10 µL proteinaze K. Uzorke smo potom dobro promiješali na tresilici te inkubirali preko noći uz miješanje na termobloku pri 56 °C. Daljnji postupak izolacije nastavili smo prema uputama proizvođača. Uzorke smo pohranili na +4 °C do konačnog korištenja.

3.3.3 Određivanje koncentracije i čistoće DNA

Koncentraciju izolirane DNA u ispitivanim uzorcima izmjerili smo pomoću nanofotometra (Implen). Kako bi izračunali koncentraciju DNA, mjerili smo optičku gustoću uzoraka pri valnoj duljini od 260 nm u volumenu uzorka od 1 µl. Čistoću DNA provjerili smo mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm te izračunavanjem omjera A₂₆₀/A₂₈₀ čiji raspon treba biti između 1,65 i 1,85.

3.4 Analiza mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST

Istraživanje je uključivalo analizu dva tipa mikrosatelitne nestabilnosti, MSI i EMAST, koju smo proveli na DNA izoliranoj iz 250 parova tumorskog tkiva i pridružene normalne sluznice debelog crijeva udaljene 15 cm od ruba tumora. Ukoliko je bilo moguće u analizu je uključena i DNA izolirana iz tkiva pridružene normalne sluznice debelog crijeva udaljene 10 i 5 cm od ruba tumora. U analizi mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST koristili smo DNA izoliranu iz tkiva središnjeg dijela tumora (T1) i invazivnog ruba tumora (T2) (ukoliko je uzorak T2 bio dostupan). Analizom mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST obuhvaćeni su također i uzorci DNA pojedinih segmenata tumora izolirani iz mikrodisekcija parafinskih rezova.

Analizu mikrosatelitne nestabilnosti MSI proveli smo prema smjernicama američkog Nacionalnog instituta za rak, korištenjem Bethesda panela polimorfnih biljega koji uključuje tri dinukleotidna (D2S123, D5S346, D17S250) i dva mononukleotidna biljega (BAT25 i BAT26) [17]. Mikrosatelitna nestabilnost tip EMAST analizirana je pomoću pet tetranukleotidnih polimorfnih biljega (MYCL1, D20S82, D20S85, D8S321, D9S242) do sada najčešće korištenih u analizi ovog tipa nestabilnosti [134].

Analiza mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST sastojala se od sljedećih koraka:

1. Umnažanje specifičnih mikrosatelitnih biljega lančanom reakcijom polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR)
2. Provjeru uspješnosti reakcije PCR u agaroznom gelu odgovarajuće gustoće
3. Analizu produkata reakcije PCR analizom VNTR (od engl. *Variable Number Tandem Repeats*), tj. elektroforezom u gelu poliakrilamida odgovarajuće gustoće uz bojenje srebrom
4. Analizu produkata reakcije PCR metodom analize fragmenata na uređaju za sekvencioniranje

3.4.1 Umnažanje specifičnih mikrosatelitnih biljega reakcijom PCR

Za umnažanje svih deset navedenih mikrosatelitnih biljega korišteni su parovi specifičnih početnih oligonukleotida (Tablica 1). Reakcija PCR odvijala se u ukupnom volumenu od 25 μL , a sastojala se od 5 μL komercijalno dostupnog pufera 5X *GoTaq*[®] (Promega), 2,5 μL MgCl_2 (Promega), 50 mM smjese nukleotida (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (Roche Diagnostics), početnih oligonukleotida u koncentraciji 200 nM svaki (Roche Diagnostics), 200 ng DNA, 0,125 μL DNA polimeraze *GoTaq*[®] (Promega) te QH_2O . Reakcija je uključivala 35 ponavljajućih ciklusa koji su se sastojali od faze denaturacije u trajanju od 30 sekundi pri 95°C, faze sparivanja početnica i kalupa u trajanju od 30 sekundi pri 55°C, faze produljivanja lanaca u trajanju od 30 sekundi pri 72°C i završnog produljivanja lanaca u trajanju od 15 minuta pri 72°C. Za biljege BAT25 i BAT26 reakcija PCR je uključivala 25 ponavljajućih ciklusa koji su se sastojali od prethodno navedenih faza.

Tablica 1. Slijed početnih oligonukleotida korištenih za analizu MSI i EMAST.

Biljeg	Početni oligonukleotidi	Veličini produkta reakcije PCR (pb)
MSI		
D2S123	5'-AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA-3' 5'-GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC-3'	197 - 227
D5S346	5'-ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG-3' 5'-AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3'	96 – 122
D17S250	5'-GGAAGAATCAAATAGACAAT -3' 5'-GCTGGCCATATATATATTTAAACC-3	150 – 169
BAT25	5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3' 5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'	123
BAT26	5'-CTGCGGTAATCAAGTTTTTAG-3' 5'-AACCATTCAACATTTTAAACCC-3'	181
EMAST		
MYCL1	5'-TGG CGA GAC TCC ATC AAA G-3' 5'-CCT TTT AAG CTG CAA CAA TTT C-3'	181
D20S82	5'-GCC TTG ATC ACA CCA CTA CA-3' 5'-GTG GTC ACT AAA GTT TCT GCT-3'	249
D20S85	5'-GAG TAT CCA GAG AGC TAT TA-3' 5'-ATT ACA GTG TGA GAC CCT G-3'	146
D8S321	5'-GAT GAA AGA ATG ATA GAT TAC AG-3' 5'-ATC TTC TCA TGC CAT ATC TGC-3	237
D9S242	5'-GTG AGA GTT CCT TCT GGC-3' 5'-ACT CCA GTA CAA GAC TCT G-3'	173

3.4.2 Provjera uspješnosti reakcije PCR u gelu agaroze

Uzorci dobiveni umnažanjem reakcijom PCR provjereni su metodom horizontalne elektroforeze u 2,5%-tnom gelu agaroze (Sigma). Veličina umnoženih odsječaka određena je prema standardu DNA IX (ϕ x174/HaeIII) (Roche Diagnostics). Produkti reakcije PCR vizualizirani su u gelu agaroze pomoću transiluminatora UVItec Alliance 4.7 (UVItec Limited). U svim uzorcima veličina umnoženog produkta reakcije PCR za pojedini mikrosatelitni biljeg odgovarala je veličini produkta navedenoj u literaturi (Tablica 1).

3.4.3 Analiza produkata reakcije PCR u gelu poliakrilamida uz bojenje srebrom

Produkte reakcije PCR za dinukleotidne i tetranukleotidne biljege analizirali smo u nadenaturirajućem gelu poliakrilamida odgovarajuće gustoće (10 ili 12 % ovisno o veličini produkta reakcije PCR) koji se sastojao od mješavine akrilamid (Sigma): bisakrilamid (Sigma) u omjeru 29 : 1, pufera TBE (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8.0), TEMED-a (Sigma) i amonij persulfata (Sigma). Volumen od 8 μ L produkta reakcije PCR pomiješali smo s 2 μ L obojenog pufera za uzorke i nanosili na gel veličine 35 x 30 cm. Produkte smo u gelu razdvajali preko noći pri stalnom naponu od 300 V. Veličina umnoženih odsječaka određena je prema DNA standardu pBR322 DNA/MspI (New England BioLabs). Rezultat razdvajanja produkata reakcije PCR prikazali smo bojenjem gela srebrom koje se sastojalo od sljedećih koraka: fiksacija u 10%-tnom etanolu tijekom 20 minuta, oksidacija u 1 %-tnoj HNO₃ u trajanju od 10 minuta, redukcija kationa srebra u 0,2 %-tnoj otopini AgNO₃ u trajanju od 30 minuta, postupno razvijanje u mješavini 3 %-tne otopine Na₂CO₃ i 37 %-tnog formaldehida te zaustavljanje reakcije u 5 %-tnoj otopini octene kiseline.

3.4.4 Analiza produkata reakcije PCR metodom analize fragmenata na uređaju za sekvencioniranje

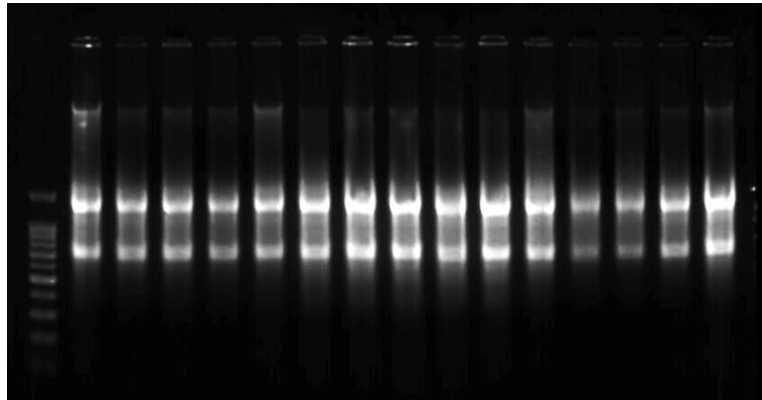
Po 1 μ l produkata reakcije PCR mononukleotidnih biljega BAT25 i BAT26 pomiješan je s 12 μ l Hi-Di formamida (Applied Biosystems) i 0,35 μ l molekularnog markera LIZ-500 (Applied Biosystems) te denaturiran 2 minute pri 95°C. Uzorci su zatim analizirani na jednokapilarnom uređaju za sekvencioniranje *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), a dobiveni rezultati su analizirani programom *GeneMapper v. 3.0* (Applied Biosystems).

3.5 Izolacija RNA

Iz uzoraka tkiva tumora i pridružene normalne sluznice debelog crijeva (udaljene 15 cm od ruba tumora), prethodno pohranjenih na -80°C , izolirali smo RNA koristeći komplet „*Nucleospin RNA Plus*“ (Macherey-Nagel). Komadić smrznutog tkiva smo usitnili na ledu i prenijeli u epruvetu od 2 mL koja je sadržavala 350 μL LBP pufera (Macherey-Nagel) za lizu tkiva. Postupak smo nastavili prema uputama proizvođača.

3.5.1 Određivanje koncentracije i provjera kvalitete izolirane RNA

Koncentraciju RNA u uzorcima izmjerili smo pomoću nanofotometra (Implen). Za izračunavanje koncentracije RNA izmjerili smo optičku gustoću u 1 μL ispitivanog uzorka pri valnoj duljini od 260 nm. Čistoća RNA provjerena je izračunavanjem omjera između apsorbancija pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm pri čemu je omjer trebao biti $>1,8$. Kvaliteta izolirane RNA provjerena je horizontalnom elektroforezom u 1%-tnom gelu agaroze te vizualizirana pomoću transiluminatora UVItec Alliance 4.7 (UVItec Limited) (Slika 10).



Slika 10. *Provjera kvalitete izolirane RNA.*

3.6 Analiza razine ekspresije mRNA gena TLR4

Metodom kvantitativnog RT-PCR odredili smo razinu ekspresije specifične mRNA *TLR4* u uzorcima tkiva 90 odabranih parova tumora i pridruženih normalnih sluznica debelog crijeva (udaljena 15 cm od ruba tumora). Reakcija je uključivala dva koraka. Prvo smo izoliranu RNA prepisali u cDNA metodom reverzne transkripcije pomoću nasumičnih početnih oligonukleotida, a potom smo relativnu kvantifikaciju dobivene cDNA proveli metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu pomoću komercijalno dostupnih ekspresijskih kompleta „*Taqman*® *Assay*“ (Applied Biosystems).

3.6.1 Reverzna transkripcija

RNA izoliranu iz tkiva parova tumora i pridružene normalne sluznice prepisali smo u cDNA metodom reverzne transkripcije. U reakciji reverzne transkripcije 5 µg ukupne RNA prepisano je u cDNA uz pomoć kompleta „*High capacity Reverse Transcription Kit*“ (Applied Biosystems). Uz RNA, reakcijska smjesa se sastojala od 5 µL 10X pufera za reverznu transkripciju, 2 µL 25X smjese nukleotida dNTP (100 mM), 5 µL 10X nasumičnih početnih oligonukleotida (100nM), 2,5 µL enzima MultiScribe RT (50 U/µL), 2,5 µL inhibitora RNaze te QH₂O do ukupnog volumena od 50 µL. Reakcija se odvijala u uređaju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) tijekom 10 minuta na 25 °C te 120 minuta na 37 °C.

3.6.2 Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu

Dobivenu cDNA koristili smo za analizu razine ekspresije mRNA gena *TLR4* upotrebom metode kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu uz pomoć specifičnog ekspresijskog kompleta *Taqman*® *Assay* Hs00152939_m1 (Applied Biosystems). Kao kontrolni gen u analizi ekspresije mRNA *TLR4* korištena je endogena kontrola *β-aktin* (*ACTB*) i specifični ekspresijski *Taqman*® *Assay* Hs99999903_m1 (Applied Biosystems).

Reakcijsku smjesu smo pripremili u optičkim epruvetama od 0,2 mL a sastojala se od 3 µL cDNA, 1 µL *Taqman*® *Assay* (Applied Biosystems), 10 µL smjese „*TaqMan*® *Gene Expression Master Mix*“ (Applied Biosystems) te QH₂O do ukupnog volumena od 20 µL.

Reakcija se odvijala u uređaju „7300 Real-Time PCR System“ (Applied Biosystems) pod sljedećim uvjetima: 50 °C kroz 2 minute, 95 °C kroz 10 minuta te 40 ciklusa od 95 °C 15 sekundi te 60 °C 1 minutu. Rezultati su očitani kao Ct vrijednosti (engl. *Threshold cycle*) pomoću programa „7300 System SDS Software“ (Applied Biosystems).

Kako bismo izbjegli greške zbog razlika u kvaliteti uzoraka, uz određivanje Ct vrijednosti specifične za *TLR4*, istovremeno smo odredili i Ct vrijednosti specifične za kontrolni gen *ACTB*. Ekspresija mRNA gena *TLR4* normalizirana je prema ekspresiji endogene kontrole *ACTB*. Rezultati analize ekspresije ispitivanih gena prikazani su kao rezultat formule komparativne Ct metode [290]:

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

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

3.7 Analiza ekspresije proteina metodom imunohistokemije

Ekspresiju proteina ispitali smo metodom neizravne imunohistokemije na uzorcima tkiva 90 sporadičnih tumora debelog crijeva odabranih s obzirom na podgrupe tumora dobivene analizom mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAS. Za analizu ekspresije proteina koristili smo primarno mišje monoklonsko protutijelo specifično za proteine TLR4 (klon 25, 1:100, sc-293072, Santa Cruz Biotechnology) i CD138 (klon MI15, 1:50, M7228, Agilent Dako) te kunićja monoklonska protutijela specifična za CD206 (E2L9N, 1:400, #91992, Cell Signaling Biotechnology) i CD86 (E2G8P, 1:100, #91882, Cell Signaling Biotechnology).

Tumorska tkiva uklopljena u parafinske blokove rezana su pomoću aparata mikrotom (Leica Biosystems) na rezove debljine 2 μm . Parafinski rezovi premješteni su na silanizirana predmetna stakalca VitroGnost Plus Ultra (Biognost) te sušeni preko noći na 37 °C. Rezovi su inkubirani 30 minuta pri 60 °C nakon čega su deparafinirani u ksilenu (Kemika) te rehidrirani u seriji etanola padajućih koncentracija (100%, 90%, 70%, 50%) (Kemika). Takvi preparati potom su isprani u destiliranoj vodi i fosfatnom puferu (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4).

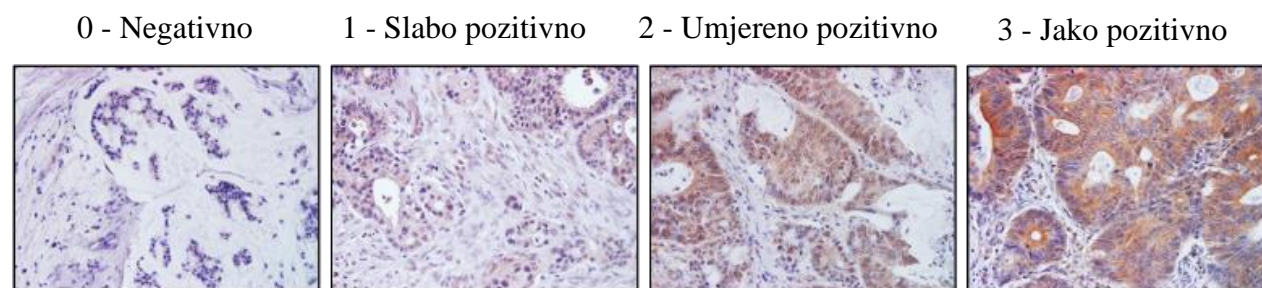
U imunohistokemijskoj analizi proteina TLR4, CD206 i CD86 daljnji protokol je uključivao fiksaciju i blokiranje aktivnosti endogenih peroksidaza u otopini koja se sastojala od jednakih udjela metanola i PBS-a te 3% vodikova peroksida (Kemika) tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Preparati su nakon toga isprani u PBS-u te je provedeno demaskiranje antigena u citratnom puferu pH 6,0 (Agilent Dako) zagrijavanjem preparata mikrovalnoj pećnici 5 minuta pri 500 W te 10 minuta pri 70 W. Stakalca su potom ohlađena na sobnu temperaturu tijekom 30 minuta te isprana u PBS-u. Nespecifično vezanje blokirano je pomoću reagensa „*Protein Block Serum-Free*“ (X0909, Agilent Dako) u vlažnoj komori tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Potom je na preparate dodano primarno protutijelo anti-TLR4 (klon 25, 1:100, sc-293072, Santa Cruz Biotechnology) te su preparati inkubirani preko noći na 4 °C u vlažnoj komori. Nakon inkubacije u primarnom protutijelu, preparati su tri puta isprani u PBS-u nakon čega je slijedila inkubacija u sekundarnom mišjem monoklonalnom protutijelu anti-IgG κ BP-HRP (1:100, sc-516102, Santa Cruz Biotechnology) pri sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Nakon što su preparati isprani tri puta u PBS-u, slijedila je inkubacija sa supstratom za vizualizaciju DAB pomoću „*DAKO[®] Liquid DAB+ Substrate Chromogen System*“ (Agilent Dako).

Priprema preparata za imunohistokemijsku analizu proteina CD138 uključivala je demaskiranje antigena u EDTA puferu pH 9,0 (Agilent Dako) zagrijavanjem preparata mikrovalnoj pećnici 5 minuta pri 500 W te 15 minuta pri 70 W. Stakalca su potom ohlađena na sobnu temperaturu tijekom 30 minuta te isprana u PBS-u, nakon čega je provedeno blokiranje aktivnosti endogenih peroksidaza pomoću komercijalno dostupnog reagensa „*Peroxidase-blocking reagent*“ (Agilent Dako) tijekom 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, preparati su isprani u PBS-u te je provedeno blokiranje nespecifičnog vezanja pomoću reagensa „*Protein Block Serum-Free*“ (Agilent Dako) u vlažnoj komori tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Potom je na preparate dodano primarno protutijelo anti-CD138 (klon MI15, 1:50, M7228, Agilent

Dako) te je inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u primarnom protutijelu, preparati su tri puta isprani u PBS-u nakon čega je slijedila inkubacija u sekundarnom mišjem monoklonskom protutijelu „*Envision detection systems mouse/rabbit*“ (Agilent Dako) pri sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Nakon što su preparati isprani tri puta u PBS-u, slijedila je inkubacija sa supstratom za vizualizaciju DAB pomoću sustava „*DAKO[®] Liquid DAB+ Substrate Chromogen System*“ (Agilent Dako).

Preparate smo potom kontrastirali bojenjem jezgara hematoksilinom tijekom 40 sekundi (Biognost). Daljnji postupak uključivao je ispiranje preparata u vodovodnoj vodi tijekom 10 minuta, ispiranje u destiliranoj vodi tijekom 5 minuta te dehidraciju u seriji rastućih koncentracija etanola (50%, 70%, 90%, 100%) i ksilenu. Preparati su potom uklopljeni u medij za trajno čuvanje Entellan (Sigma).

Kako bismo otkrili prisutnost eventualnog nespecifičnog bojenja, u svaku reakciju uključili smo jedan preparat obrađen na isti način kao i ispitivani preparati, ali uz izostanak primarnog protutijela. Obojeni uzorci analizirani su svjetlosnim mikroskopom. Pozitivna imunohistokemijska reakcija bila je obilježena prisustvom produkta reakcije imunohistokemije (u vidu smeđeg obojenja) u citoplazmi i jezgri stanica. Rezultati imunohistokemijske reakcije izraženi su semikvantitativno prema intenzitetu imunohistokemijskog obojenja, pri čemu su tumori označeni kao negativni (0), slabo pozitivni (1), umjereno pozitivni (2) i jako pozitivni (3) (Slika 11). Uz intenzitet, odredili smo i smještaj pozitivnog obojenja.



Slika 11. Intenzitet imunohistokemijske reakcije na protein TLR4. Reprezentativne slike predstavljaju intenzitet imunohistokemijske obojenosti tumorskih stanica kako slijedi 0-negativno, 1-slabo pozitivno, 2-umjereno pozitivno i 3-jako pozitivnog. Povećanje 200x.

3.8 Analiza ekspresije proteina metodom imunocitokemije

Utjecaj LPS-a na intenzitet ekspresije i smještaj proteina TLR4 u tumorskim stanicama karcinoma kolona ispitali smo na trajnoj staničnoj liniji karcinoma kolona čovjeka SW480. Navedenu staničnu liniju uzgajali smo u mediju „*Dulbecco modified Eagle*“ (Sigma-Aldrich) uz dodatak 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich) te 10% seruma fetusa goveda (engl. *fetal calf serum*) (Sigma-Aldrich) u inkubatoru za uzgoj stanica u vlažnoj atmosferi pri 37 °C uz 5% CO₂. Dan prije tretmana LPS-om nasadili smo 7x10⁴ stanica SW480 u sterilnu plastičnu posudu s 4 komorice „*Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ system*“ (Thermo Fisher Scientific). U dvije komorice sa stanicama proveli smo tretman dodatkom LPS-a u koncentraciji od 10 µg/mL tijekom 12 sati. Preostale dvije komorice koristili smo kao netretiranu kontrolu. Nakon tretmana, stanice smo nekoliko puta isprali PBS-om te fiksirali otopinom metanola i PBS-a u omjeru 1:1 tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Kako bismo blokirali aktivnost endogenih peroksidaza u otopinu metanola i PBS-a dodali smo 3% vodikovog peroksida. Komorice sa stanicama smo potom nekoliko puta isprali PBS-om te proveli postupak blokiranja nespecifičnog vezanja pomoću „*DAKO® Protein Block Serum-Free*“ (Agilent Dako) u vlažnoj komori tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Zatim smo na stanice dodali primarno protutijelo anti-TLR4 (razrjeđenje 1:100, sc-293072, Santa Cruz Biotechnology) te inkubaciju proveli preko noći pri 4 °C u vlažnoj komori. Komorice sa stanicama smo nekoliko puta isprali PBS-om nakon čega je uslijedila inkubacija sa sekundarnim mišjim monoklonalnim protutijelom anti-IgGκ BP-HRP (razrjeđenje 1:100, sc-516102, Santa Cruz Biotechnology) pri sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta u vlažnoj komori. Nakon što smo komorice sa stanicama isprali u PBS-u i odvojili od stakalca sa stanicama, slijedila je inkubacija stanica sa supstratom za vizualizaciju DAB pomoću sustava „*DAKO® Liquid DAB+ Substrate Chromogen System*“ (Agilent Dako). Preparate smo potom kontrastirali bojenjem jezgara hematoksilinom tijekom 40 sekundi (Biognost). Daljnji postupak uključivao je ispiranje preparata sa stanicama u vodovodnoj vodi tijekom 10 minuta, ispiranje u destiliranoj vodi tijekom 5 minuta te dehidraciju u seriji rastućih koncentracija etanola (50%, 70%, 90%, 100%) i ksilenu. Preparati su potom uklopljeni u medij za trajno čuvanje Entellan (Sigma) te analizirani svjetlosnim mikroskopom.

3.9 Analiza polimorfizma jedne baze

Izolirane DNA koristili smo za određivanje učestalosti SNP u regiji gena *TLR4* koja kodira vanjsku domenu receptora. U analizi ovog polimorfizma korištena je metoda PCR-a u stvarnom vremenu (eng. *real-time PCR*, RT-PCR) pomoću komercijalno dostupnog SNP genotipizacijskog eseja.

3.9.1 Analiza polimorfizma *Asp299Gly* (+896A/G) metodom PCR u stvarnom vremenu

Analizu polimorfizma *Asp299Gly* (rs4986790) gena *TLR4* proveli smo metodom RT-PCR-a pomoću specifičnog genotipizacijskog kompleta *Taqman*[®] *SNP* *c_11722238_20* (Applied Biosystems). U optičkim epruветama od 0,2 mL pripremili smo reakcijsku smjesu koja se sastojala od 100 ng DNA, 1.25 μ L *Taqman*[®] *SNP Assay* (Applied Biosystems), 12.5 μ L *Taqman*[®] *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) te QH₂O do ukupnog volumena od 25 μ L. Reakcija se odvijala u uređaju „7300 *Real-Time PCR System*“ (Applied Biosystems) pod sljedećim uvjetima: 2 minute pri 50°C, 10 minuta pri 95°C, 40 ciklusa od 95°C kroz 15 sekundi te 60°C kroz 1 minutu. Produkti reakcije analizirani su na istom uređaju pomoću programa „7300 *System SDS Software*“ za određivanje alela.

3.10 Izolacija miRNA

Uzorke tkiva prethodno pohranjene na -80 °C koristili smo za izolaciju miRNA koristeći komplet „*mirVana miRNA Isolation Kit*“ (Thermo Fisher Scientific). Komadić smrznutog tkiva usitnili smo na ledu i prenijeli u epruветu koja je sadržavala 300 μ L pufera „*Lysis/Binding buffer*“ (Thermo Fisher Scientific) te promiješali na tresilici. Potom smo u homogenat dodali 30 μ L pufera „*miRNA Homogenate Additive*“ (Thermo Fisher Scientific) te postupak izolacije miRNA nastavili prema uputama proizvođača. Izolirana miRNA pohranjena je na -20 °C do konačnog korištenja.

3.10.1 Određivanje koncentracije i čistoće izolirane miRNA

Za izračunavanje koncentracije miRNA izmjerili smo optičku gustoću ispitivanih uzoraka u 1 μ L uzorka pri valnoj duljini od 260 nm uz pomoć nanofotometra (Implen). Čistoća izoliranih miRNA provjerena je mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm te izračunavanjem njihovog omjera koji je trebao biti $> 1,8$.

3.11 Analiza razine ekspresije miRNA

Izolirane miRNA iz 90 odabranih parova tumora i pridružene normalne sluznice debelog crijeva (udaljene 15 cm od ruba tumora) koristili smo za određivanje razine ekspresije specifične miRNA *miR-375-3p* metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu. Reakcija se sastojala od dva koraka. Prvo smo izoliranu RNA prepisali u specifičnu cDNA metodom reverzne transkripcije, a zatim smo relativnu kvantifikaciju dobivene cDNA proveli metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu.

3.11.1 Reverzna transkripcija

Neposredno nakon izolacije, dobivene miRNA smo preveli u cDNA metodom reverzne transkripcije. U reakciji reverzne transkripcije 10 ng izolirane miRNA prevedeno je u cDNA uz pomoć kompleta „*TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit*“ (Thermo Fisher Scientific). Reakcija se sastojala od 4 koraka: produljivanja 3'-kraja zrelih miRNA dodavanjem repa poli-A, produljivanja 5'-kraja zrelih miRNA ligacijom adaptora, prepisivanja modificiranih miRNA u cDNA metodom reverzne transkripcije i umnažanja cDNA dobivene prevođenjem zrelih miRNA.

3.11.1.1 Produljivanje 3'-kraja zrelih miRNA dodavanjem poli-A-repa

Reakcija dodavanja repa poli-A odvijala se u ukupnom volumenu od 5 μL , a smjesa se sastojala od 2 μL uzorka miRNA, 0,5 μL 10X pufera za poliadenilaciju, 0,5 μL ATP, 0,3 μL enzima za poliadenilaciju Poly(A) te 1,7 μL QH_2O . Reakciju poliadenilacije proveli smo inkubacijom reakcijske smjese 45 minuta pri 37 $^\circ\text{C}$, nakon čega se zaustavljanje reakcije odvijalo kroz 10 minuta pri 65 $^\circ\text{C}$.

3.11.1.2 Produljivanje 5'-kraja zrelih miRNA ligacijom adaptoru

Reakcijska smjesa za ligaciju adaptoru sastojala se od 5 μL produkta reakcije poliadenilacije, 3 μL 5X pufera za DNA ligazu, 4,5 μL PEG 8000, 0,6 μL 25X adaptoru za ligaciju, 1,5 μL RNA ligaze te QH_2O do ukupnog volumena od 10 μL . Reakcija ligacije odvijala se 60 minuta pri 16 $^\circ\text{C}$.

3.11.1.3 Prepisivanje modificiranih miRNA u cDNA metodom reverzne transkripcije

Nakon ligacije adaptoru, produkt reakcije preveli smo u cDNA reakcijom reverzne transkripcije. Reakcijska smjesa se sastojala od 6 μL 5X pufera za reverznu transkripciju, 1,2 μL smjese nukleotida dNTP, 1,5 μL 20X univerzalnih početnih oligonukleotida za reverznu transkripciju, 3 μL enzima RT, QH_2O do ukupnog volumena od 15 μL te 15 μL produkta ligacije adaptoru. Reakciju reverzne transkripcije proveli smo inkubacijom reakcijske smjese 15 minuta pri 42 $^\circ\text{C}$, nakon čega je reakcija zaustavljena pri 85 $^\circ\text{C}$ kroz 5 minuta.

3.11.1.4 Umnažanje cDNA

U zadnjem koraku dobivenu cDNA smo umnožili u ukupnom volumenu od 50 μL . Reakcijska smjesa se sastojala od 25 μL 2X miR-Amp Master Mix, 20X miR-Amp smjese početnih oligonukleotida, 17,5 μL QH_2O te 5 μL produkta reverzne transkripcije. Reakcija umnažanja cDNA sastojala se od aktivacije enzima 5 minuta pri 95 $^\circ\text{C}$ te 14 ponavljajućih ciklusa koji su uključivali denaturaciju 3 sekunde pri 95 $^\circ\text{C}$, vezanje početnica i produživanje lanca 30 sekundi pri 60 $^\circ\text{C}$. Reakcija je zaustavljena pri 99 $^\circ\text{C}$ tijekom 10 minuta.

3.11.2 Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu

Razina ekspresije *miR-375-3p* analizirana je metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu koristeći komplet *Taqman® Advanced miRNA Assay 478074_mir* (Thermo Fisher Scientific) za *miR-375-3p*. Kao endogena kontrola reakcije PCR korišten je *Taqman® Advanced miRNA Assay 477860_mir* (Thermo Fisher Scientific) za *miR-16-5p*.

Reakcija se odvijala u optičkim epruветama volumena 0,2 mL, a cDNA je prethodno pomiješana s 0,1X puferom TE te razrijeđena u koncentraciji 1:10. Reakcijska smjesa se sastojala od 5 µL razrijeđene cDNA, 10 µL 2X *Taqman® Fast Advanced Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), 1 µL 20X *Taqman® Advanced miRNA* eseja (Thermo Fisher Scientific) te QH₂O do ukupnog volumena od 20 µL. Reakcija se odvijala u uređaju QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System pod sljedećim uvjetima: 20 sekundi pri 95 °C te 40 ponavljajućih ciklusa od 1 sekundu pri 95 °C i 20 sekundi pri 60 °C. Rezultati su očitani kao Ct (engl. *threshold cycle*) vrijednosti pomoću programa „*Touchscreen Instrument Operating Software*“ (Thermo Fisher Scientific).

Ekspresija *miR-375-3p* normalizirana je prema ekspresiji endogene kontrole *miR-16-5p*. Rezultati analize ekspresije ispitivane miRNA prikazani su kao rezultat formule komparativne Ct metode [290]:

$$\Delta Ct = \Delta Ct_{miRNA} - \Delta Ct_{miR-16-5p}$$

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

3.12 Statističke metode

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

Za analizu kvalitativnih ordinalnih podataka korišteni su χ^2 ili Fisher egzaktni testovi ako je broj vrijednosti u jednoj od kategorija bio manji ili jednak pet. Kvantitativni kontinuirani podaci analizirani su odgovarajućim parametrijskim odnosno neparametrijskim metodama ovisno o tome je li raspodjela podataka odgovarala raspodjeli po Gaussu. Normalnost raspodjele podataka analizirana je D'Agostino i Pearson omnibus testom normalnosti (D'Agostino i sur., 1990.). U svim rezultatima p-vrijednost $<0,05$ je smatrana značajnom. Statistički program korišten u ovom radu je GraphPad Prism (GraphPad Software).

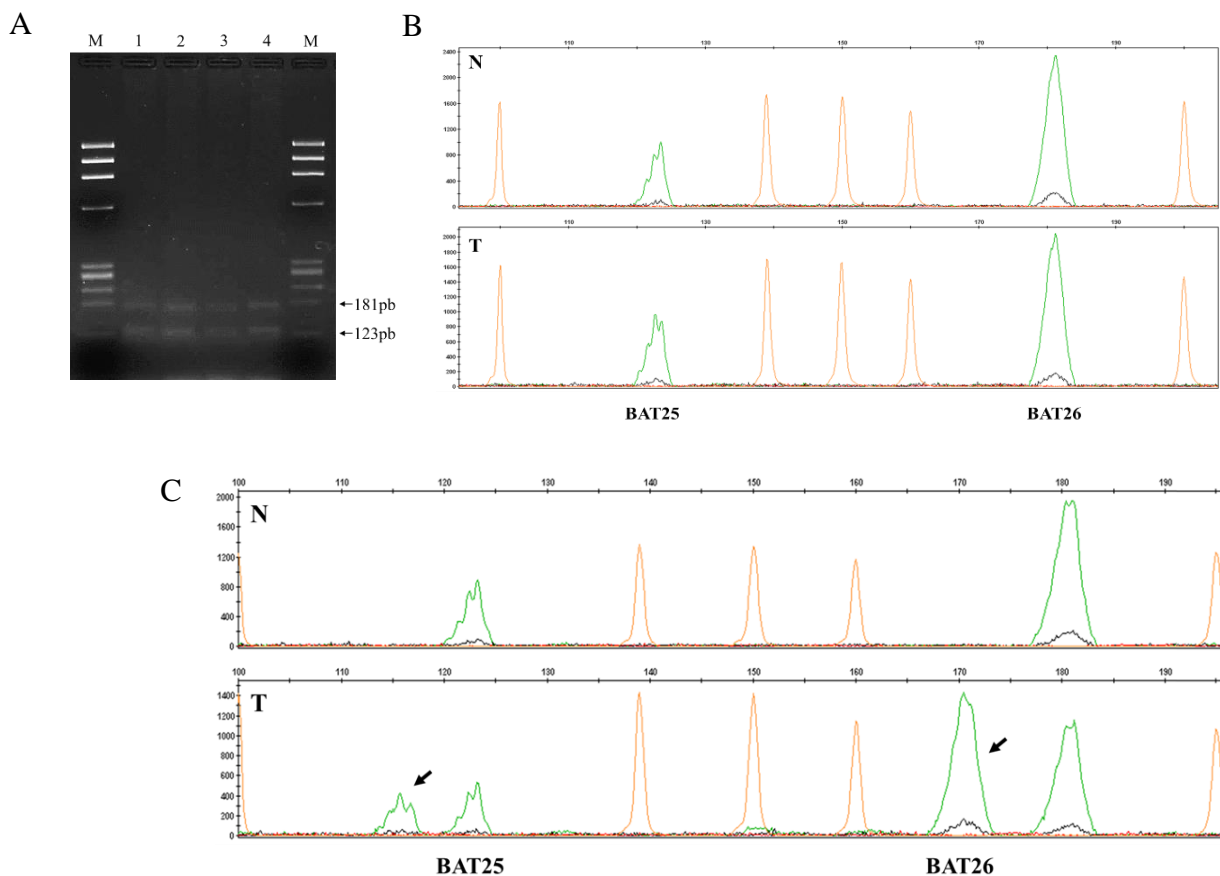
4. REZULTATI

4.1 Analiza mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EFAST u sporadičnim karcinomima debelog crijeva

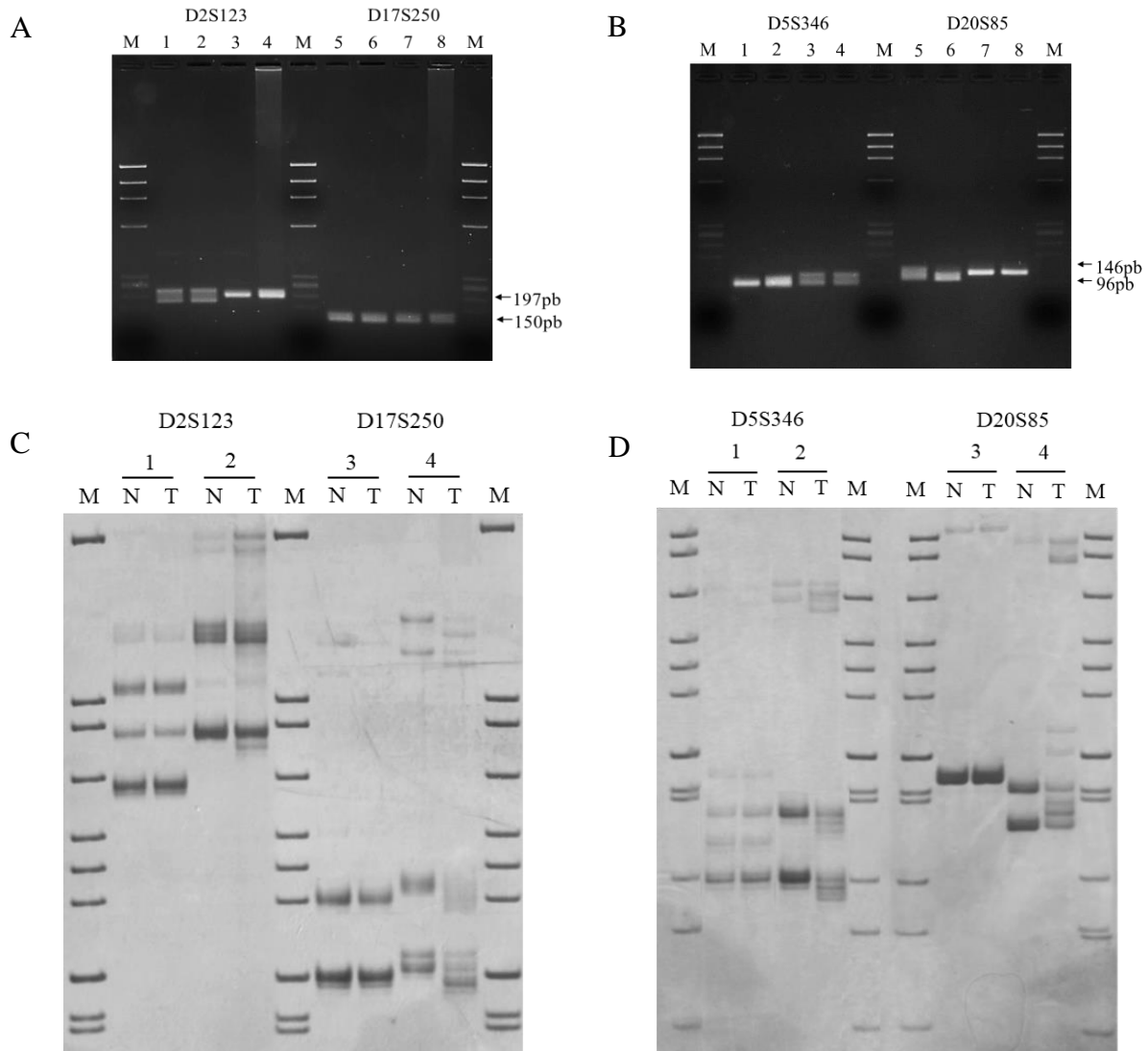
Analiza mikrosatelitne nestabilnosti tipa MSI i EFAST napravljena je na uzorcima genomske DNA izolirane iz tkiva 250 parova tumora i pridružene normalne sluznice debelog crijeva (15 cm udaljene od ruba tumora) oboljelih od sporadičnog karcinoma kolona. Analizirani uzorci su odabrani od strane patologa kao što je prethodno opisano u Materijalima i metodama.

Reakcijom PCR umnožili smo odsječke genomske DNA specifične za mikrosatelitne biljege nestabilnosti tipa MSI i tipa EFAST. Kvalitetu produkata reakcije PCR za mononukleotidne biljege BAT25 i BAT26 provjerili smo elektroforezom u gelu agaroze (Slika 12A), nakon čega smo metodom fragmentarne analize na uređaju za sekvencioniranje analizirali odsutnost (Slika 12B) ili prisutnost (Slika 12C) mikrosatelitne nestabilnosti. Nakon provjere kvalitete produkata reakcije PCR za dinukleotidne biljege D2S123, D17S250 (Slika 13A), D5S346 (Slika 13B) i tetranukleotidni biljeg D20S85 (Slika 13B), analizu mikrosatelitne nestabilnosti proveli smo metodom vertikalne elektroforeze u gelu poliakrilamida odgovarajuće gustoće (Slika 13C, D). Na isti smo način provjerili kvalitetu produkata za preostale tetranukleotidne biljege D8S321, D20S82 (Slika 14A) te MYCL1 i D9S242 (Slika 14B), te ih potom analizirali metodom vertikalne elektroforeze u gelu poliakrilamida odgovarajuće gustoće (Slika 14C). Mikrosatelitnu nestabilnost definirali smo kao vidljivu promjenu u dužini specifičnog odsječka DNA pojedinog analiziranog biljega u tumoru u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu debelog crijeva (15 cm udaljenu od ruba tumora). Tumore smo na temelju mikrosatelitne nestabilnosti tipa MSI klasificirali kao stabilne (od engl. *microsatellite stable*, MSS) ukoliko u njima nismo utvrdili nestabilnost u niti jednom od ispitivanih biljega, niskonestabilne na MSI (MSI-L) ukoliko smo nestabilnost utvrdili u samo jednom biljegu te viskonestabilne na MSI (MSI-H) ukoliko smo nestabilnost utvrdili u dva ili više ispitivanih biljega. S obzirom da za analizu mikrosatelitne nestabilnosti tipa EFAST ne postoje usuglašeni kriteriji, analizu odabranih tetranukleotidnih biljega tumačili smo na isti način kao i nestabilnost tipa MSI, pri čemu smo tumore klasificirali kao stabilne na EFAST (od engl. *EFAST-stable*, EFAST-S) ukoliko u njima nismo utvrdili nestabilnost u niti jednom

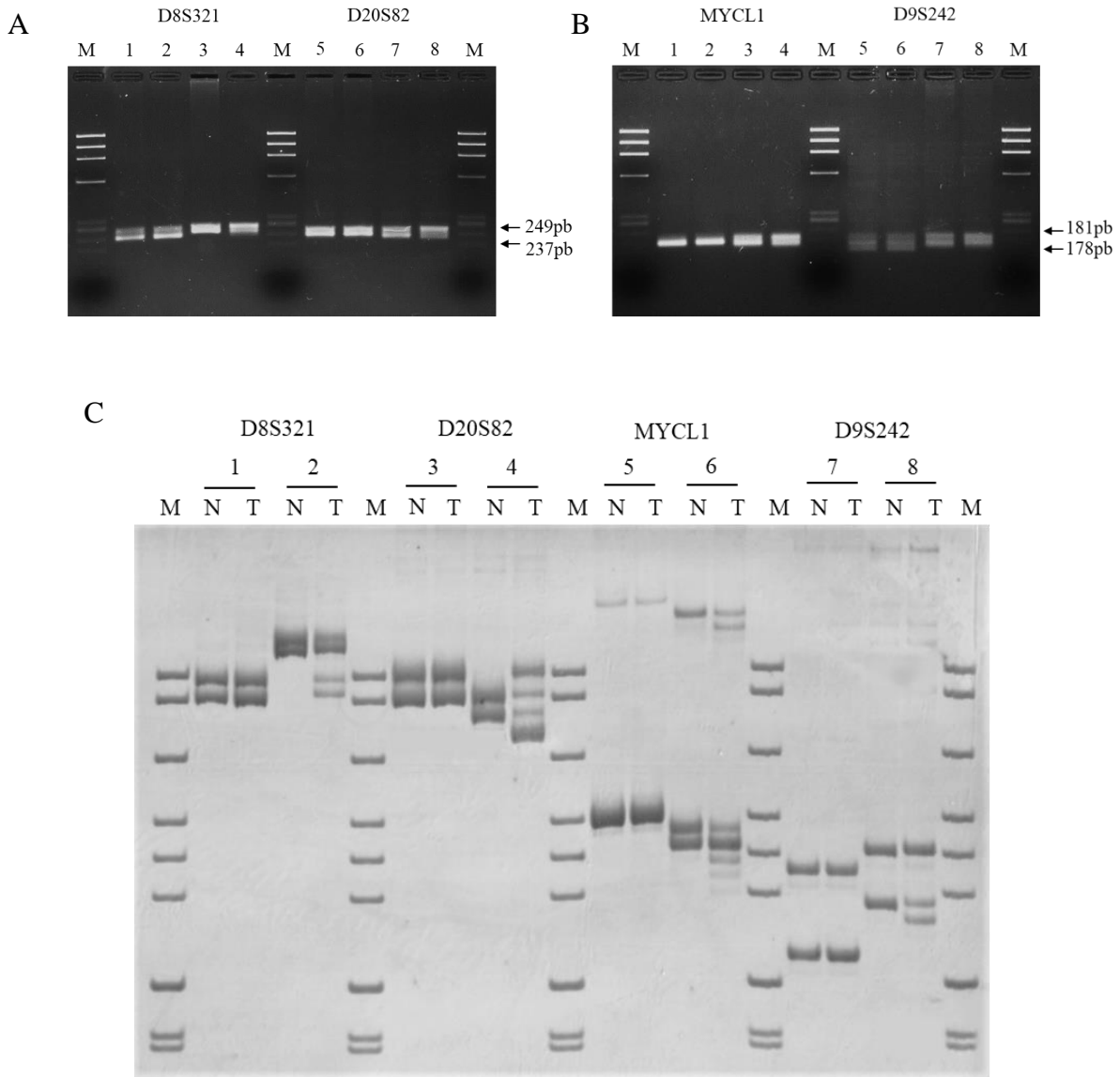
ispitivanom biljegu, niskonestabilne na EMAST (od engl. *EMAST-low*, EMAST-L) ukoliko smo nestabilnost utvrdili u samo jednom ispitivanom biljegu te viskonestabilne na EMAST (od engl. *EMAST-high*, EMAST-H) ukoliko smo nestabilnost utvrdili u dva ili više ispitivanih tetranukleotidnih biljega.



Slika 12. Fragmentarna analiza nestabilnosti u mononukleotidnim mikrosatelitnim biljezima *BAT25* i *BAT26* na uređaju za sekvencioniranje. (A) Provjera kvalitete produkta reakcije multiplex PCR za biljege *BAT25* (123 pb) i *BAT26* (181 pb); M, DNA standard IX (Φ x174/*Hae*III); 1-4, produkti reakcije PCR. (B) Analiza uzorka u kojem nije prisutna nestabilnost u mononukleotidnim biljezima *BAT25* i *BAT26*. (C) Analiza uzorka u kojem je utvrđena nestabilnost u mononukleotidnim biljezima *BAT25* i *BAT26*. Strelicom je označena nestabilnost u ispitivanom mikrosatelitnom biljegu. N, pridružena normalna sluznica udaljena 15 cm od ruba tumora; T, tumor.



Slika 13. *Analiza nestabilnosti u dinukleotidnim mikrosatelitnim biljezima D2S123, D17S250, D5S346 i tetranukleotidnom mikrosatelitnom biljegu D20S85. Provjera kvalitete produkta reakcije PCR za (A) biljege D2S123 (197 pb) i D17S250 (150 pb) te (B) biljege D5S346 (96 pb) i D20S85 (146 pb); M, DNA standard IX (Φ x174/HaeIII); 1-8, produkti reakcije PCR. (C) Analiza prisutnosti nestabilnosti u dinukleotidnim biljezima D2S123 i D17S250 u 10 %-tnom nenedaturirajućem gelu poliakrilamida. (D) Analiza prisutnosti nestabilnosti u dinukleotidnom biljegu D5S346 i tetranukleotidnom biljegu D20S85 u 12 %-tnom nenedaturirajućem gelu poliakrilamida. M, DNA standard pBR322/MspI; N, pridružena normalna sluznica udaljena 15 cm od ruba tumora; T, tumor; 1, 3, uzorci u kojima nije prisutna mikrosatelitna nestabilnost; 2, 4, uzorci s prisutnom mikrosatelitnom nestabilnosti.*



Slika 14. Analiza nestabilnosti u tetranukleotidnim mikrosatelitnim biljezima D8S321, D20S82, MYCL1 i D9S242. Provjera kvalitete produkta reakcije PCR za biljege (A) D8S321 (249pb) i D20S82 (237pb) te biljege (B) MYCL1 (181 pb) i D9S242 (178 pb); M, DNA standard IX (Φ x174/HaeIII); 1-16, produkti reakcije PCR. (C) Analiza prisutnosti nestabilnosti u tetranukleotidnim biljezima u 10 %-tnom nedenaturirajućem gelu poliakrilamida; M, DNA standard pBR322/MspI. N, pridružena normalna sluznica udaljena 15 cm od ruba tumora; T, tumor; 1, 3, 5, 7 uzorci u kojima nije prisutna mikrosatelitna nestabilnost; 2, 4, 6, 8 uzorci s prisutnom mikrosatelitnom nestabilnosti.

Rezultati analize mikrosatelitne nestabilnosti tipa MSI pokazali su da u 228 (91,2%) ispitivanih tumora nije bila prisutna nestabilnost tipa MSI (MSS), 4 (1,6%) tumora pokazivala su nisku nestabilnost (MSI-L), dok je u 18 (7,2%) tumora dokazana visoka nestabilnost tipa MSI (MSI-H). Analizom mikrosatelitne nestabilnosti tipa EMAST utvrđeno je da je 161 (64,4%) ispitivani tumor bio stabilan (EMAST-S), dok je niska nestabilnost (EMAST-L) bila prisutna u 53 (21,2%) tumora, a visoka nestabilnost (EMAST-H) u 36 (14,4%) tumora.

Na temelju prethodno navedenih kriterija za analizu mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST, analizirane smo uzorke, umjesto u devet očekivanih, mogli podijeliti u šest podskupina. Najveći broj uzoraka dokazan je u podskupini stabilnih tumora (MSS/EMAST-S) (63,6%), dok su 53 (21,2 %) uzorka bila niskonestabilna na EMAST (MSS/EMAST-L). Visoka nestabilnost tipa EMAST (MSS/EMAST-H) utvrđena je u 16 (6,4 %) uzoraka, dok je u 18 (7,2 %) uzoraka bila udružena s visokom nestabilnosti tipa MSI (EMAST-H/MSI-H). U ukupnom ispitivanom uzorku utvrđena je vrlo niska učestalost podskupina uzoraka s niskom nestabilnosti tipa MSI, MSI-L/EMAST-S (0,8 %) i MSI-L/EMAST-H (0,8 %) (Tablica 2).

Tablica 2. Sporadični karcinomi debelog crijeva podijeljeni u podskupine s obzirom na prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i/ili EMAST.

Status tumora		N=250 (%)
MSS	EMAST-S	159 (63,6)
MSS	EMAST-L	53 (21,2)
MSS	EMAST-H	16 (6,4)
MSI-L	EMAST-S	2 (0,8)
MSI-L	EMAST-L	0 (0,0)
MSI-L	EMAST-H	2 (0,8)
MSI-H	EMAST-S	0 (0,0)
MSI-H	EMAST-L	0 (0,0)
MSI-H	EMAST-H	18 (7,2)

Četiri najzastupljenije podskupine tumora (u tablici 2 označene podebljano) dobivene analizom mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST korelirane su s kliničko-patološkim karakteristikama oboljelih i tumora (dobi, spolom, veličinom tumora, smještajem tumora, stupnjem diferencijacije i mucinoznom histologijom tumora). Budući da je u našem uzorku dokazana vrlo niska učestalost tumora niskonestabilnih na MSI (MSI-L/EMAST-S i MSI-L/EMAST-H), ove tumore nismo uključili u daljnje analize. Usporedbom četiri najzastupljenije podskupine tumora utvrđeno je da su tumori viskonestabilni na MSI i EMAST (MSI-H/EMAST-H) imali značajno veći promjer tumora ($p=0,021$), veću učestalost u desnom kolonu ($p<0,001$) te učestaliju prisutnost mucinozne komponente ($p<0,001$) (Tablica 3).

Tablica 3. Kliničko-patološke karakteristike oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva podijeljenih u podskupine s obzirom na prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i/ili EMAST u tumoru

Karakteristika	Mikrosatelitna nestabilnost				p
	MSS/ EMAST-S (%) 159 (63,6)	MSS/ EMAST-L (%) 53 (21,2)	MSS/ EMAST-H (%) 18 (7,2)	MSI-H/ EMAST-H (%) 16 (6,4)	
Dob					
< 70 godina	106 (66,7)	34 (64,2)	8 (50,0)	10 (55,6)	0,492
≥ 70 godina	53 (33,3)	19 (35,8)	8 (50,0)	8 (44,4)	
Spol					
Muški	101 (63,5)	32 (60,4)	9 (56,3)	7 (38,9)	0,236
Ženski	58 (36,5)	21 (39,6)	7 (43,8)	11 (61,1)	
Veličina tumora					
≤ 5 cm	92 (57,9)	32 (60,4)	7 (43,8)	4 (22,2)	0,021*
> 5 cm	67 (42,1)	21 (39,6)	9 (56,3)	14 (77,8)	
Smještaj tumora					
Lijevi kolon	130 (81,8)	35 (66,0)	8 (50,0)	4 (22,2)	<0,001***
Desni kolon	29 (18,2)	18 (34,0)	8 (50,0)	14 (77,8)	
Stupanj diferencijacije					
Dobro (1)	59 (37,1)	21 (39,6)	6 (37,5)	5 (27,8)	0,065
Umjereno (2)	87 (54,7)	27 (50,9)	6 (37,5)	7 (38,9)	
Slabo (3)	12 (7,5)	5 (9,4)	4 (25,0)	5 (27,8)	
Mucinozna histologija					
Odsutna	153 (96,2)	49 (92,5)	14 (87,5)	11 (61,1)	<0,001***
Prisutna	6 (3,8)	4 (7,5)	2 (12,5)	7 (38,9)	

p-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Iste podskupine tumora korelirane su sa stupnjem pupanja tumora i gustoćom unutar tumorskog limfocitnog infiltrata. Analiza je provedena na 203 uzorka za koje smo imali dostupne podatke o stupnju pupanja tumora i gustoći unutar tumorskog limfocitnog infiltrata. U oboljelih s tumorima visokonestabilnim na MSI i EMAST (MSI-H/EMAST-H) bio je prisutan obilniji unutar tumorski limfocitni infiltrat u odnosu na druge podskupine tumora ($p < 0,001$) (Tablica 4).

Tablica 4. Kliničko-patološke karakteristike oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva podijeljenih u podskupine s obzirom na prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i/ili EMAST u tumoru

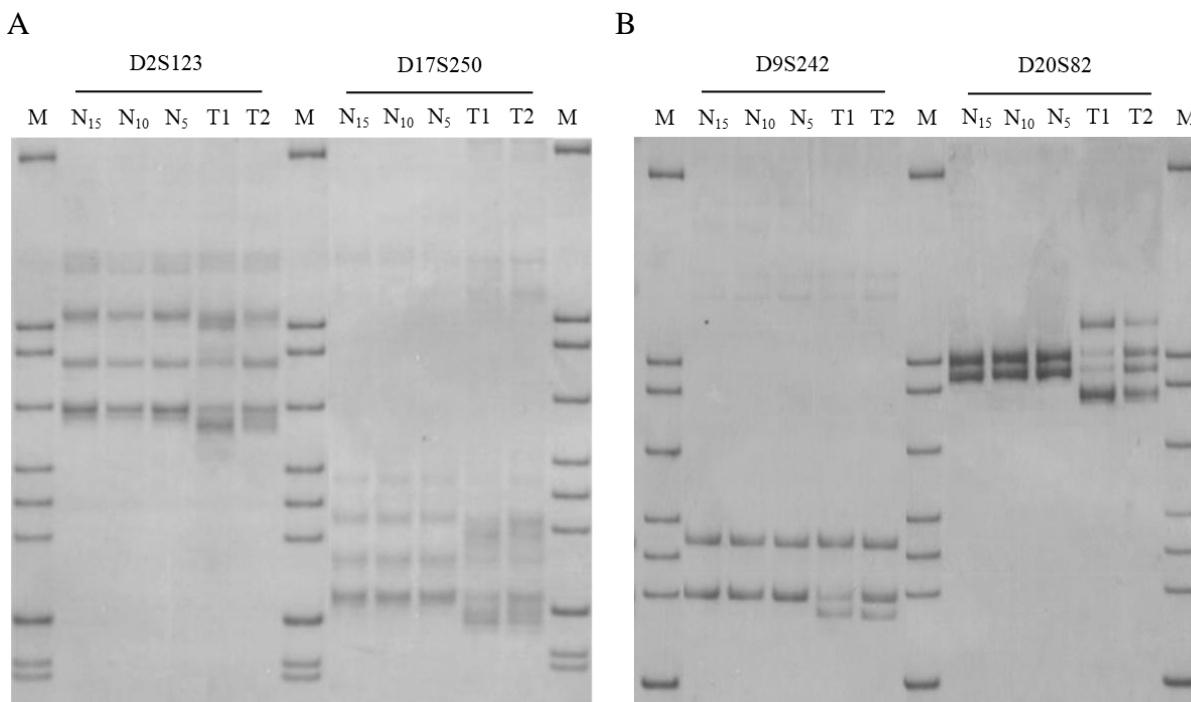
Karakteristika	Mikrosatelitna nestabilnost				p
	MSS/ EMAST-S (%) 125 (61,6)	MSS/ EMAST-L (%) 46 (22,6)	MSS/ EMAST-H (%) 15 (7,4)	MSI-H/ EMAST-H (%) 17 (8,4)	
Stupanj pupanja tumora					
Niski (1)	57 (45,6)	21 (45,7)	7 (46,7)	7 (41,2)	0,408
Srednji (2)	26 (20,8)	11 (23,9)	6 (40,0)	2 (11,8)	
Visoki (3)	42 (33,6)	14 (30,4)	2 (13,3)	8 (47,1)	
Unutartumorski limfocitni infiltrat					
Odsutan (0)	48 (38,4)	28 (60,9)	8 (53,3)	5 (29,4)	<0,001***
Oskudan (1)	38 (30,4)	7 (15,2)	5 (33,3)	2 (11,8)	
Srednje obilan (2)	23 (18,4)	4 (8,7)	1 (6,7)	1 (5,9)	
Obilan (3)	16 (12,8)	7 (15,2)	1 (6,7)	9 (52,9)	

p-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

4.2 Analiza mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST u različitim segmentima tumora i tumoru pridružene normalne sluznice

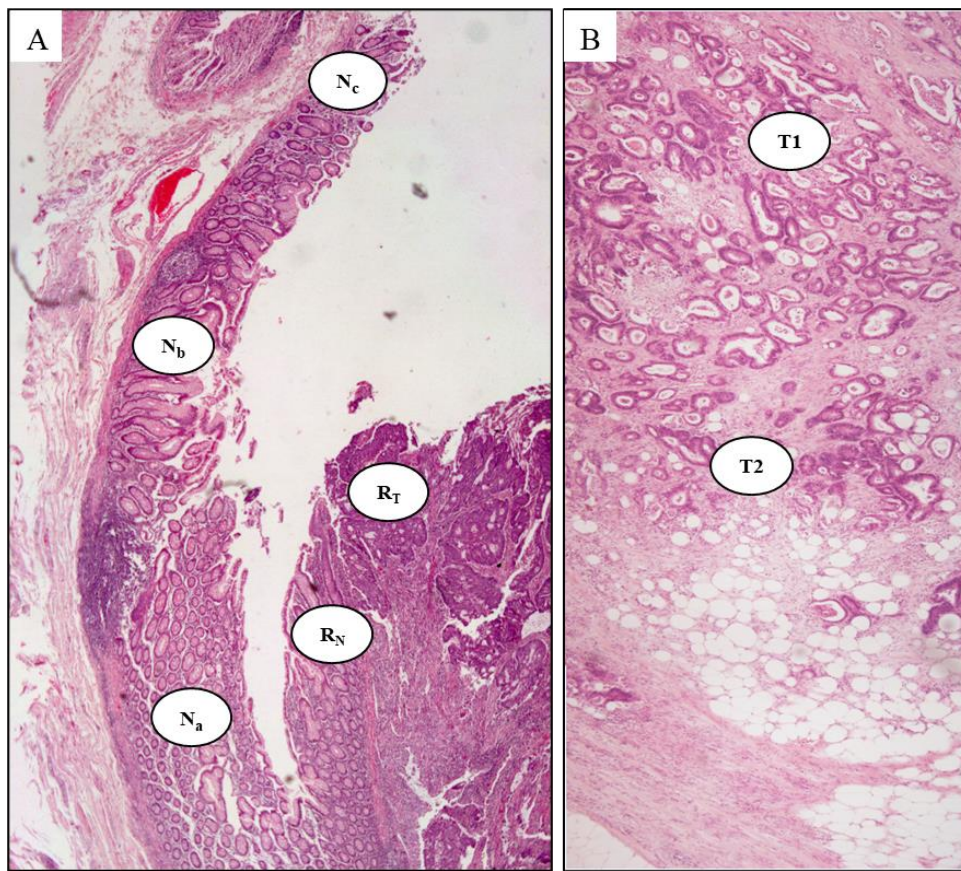
Tumore debelog crijeva karakterizira unutartumorska heterogenost koja proizlazi iz većeg broja supklonova stanica jedinstvenog profila mutacija koji su različito distribuirani unutar istog tumora. Kako bismo ispitali distribuciju mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST u tumoru, analizu nestabilnosti proveli smo na 185 uzoraka za koje smo, osim uzorka tkiva iz središta tumora (T1), imali dostupan i uzorak tkiva iz invazivne fronte tumora (T2). S obzirom na to da u uzorku normalne sluznice debelog crijeva udaljene 15 cm od ruba tumora (N₁₅) nismo dokazali prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST, u analizu smo uključili i uzorke pridružene normalne sluznice udaljene 10 cm (N₁₀) i 5 cm (N₅) od ruba tumora.

U uzorcima normalne sluznice udaljene 15 cm (N₁₅), 10 cm (N₁₀) i 5 cm (N₅) od ruba tumora nismo utvrdili prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST (Slika 15A i B). U svim analiziranim tumorima, mikrosatelitne nestabilnosti MSI (Slika 15A) i EMAST (Slika 15B) bile su prisutne u uzorku iz središta tumora (T1) kao i u uzorku iz invazivne fronte tumora (T2), ali minimalno promijenjenih obrazaca.



Slika 15. Analiza mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST u DNA izoliranoj iz različitih segmenata tumora i tumoru pridružene normalne sluznice. Analiza prisutnosti (A) nestabilnosti tipa MSI u dinukleotidnim biljezima D2S123 i D17S250 te (B) nestabilnosti tipa EMAST u tetranukleotidnim biljezima D9S242 i D20S82; M, DNA standard pBR322/MspI. N₁₅, pridružena normalna sluznica na 15 cm; N₁₀, pridružena normalna sluznica na 10 cm; N₅, pridružena normalna sluznica na 5 cm udaljenosti od ruba tumora; T1, središte tumora; T2, invazivni rub tumora.

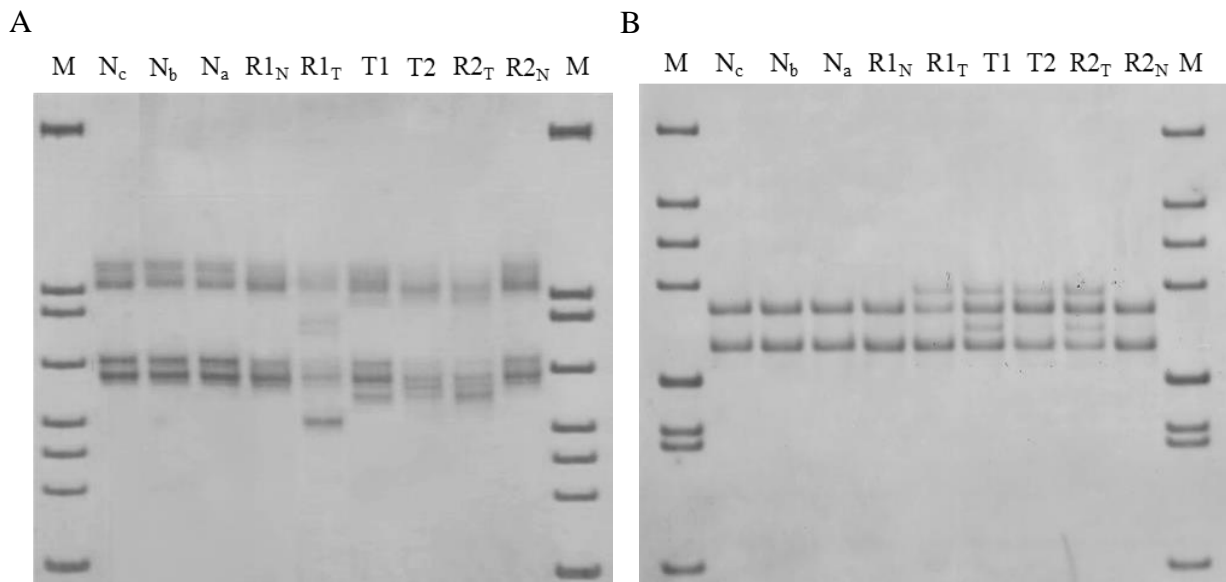
Budući da u uzorku pridružene normalne sluznice udaljene 5 cm od ruba tumora nismo dokazali prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST, njihovu smo distribuciju ispitali u uzorcima pridružene normalne sluznice na maksimalnoj udaljenosti od 1 cm od ruba tumora te u uzorcima histološki promijenjene normalne sluznice uz sam rub tumora (R_N) (Slika 16A). Osim toga, distribuciju mikrosatelitnih nestabilnosti ispitali smo i u tkivima različitih segmenata tumora, uključujući tumorsko tkivo u rubu tumora (R_T) (Slika 16A), tkivo središta tumora (T1) i tkivo invazivnog ruba tumora (T2) (Slika 16B). Analizu smo proveli na DNA izoliranoj iz navedenih segmenata tumora debelog crijeva metodom mikrodisekcije iz rezova tkiva uklopljenih u parafin.



Slika 16. Prikaz različitih segmenata tumora metodom histokemijskog bojenja H&E. Segmenti tumora uzorkovani metodom mikrodisekcije tkiva uklopljenih u parafin uključivali su: (A) N_a - N_c , pridružena normalna sluznica unutar 1 cm od ruba tumora; R_N , promijenjena normalna sluznica neposredno uz rub tumora; R_T , tumorsko tkivo u rubu tumora (povećanje 40x); (B) T_1 , središte tumora i T_2 , invazivni rub tumora (povećanje 100x).

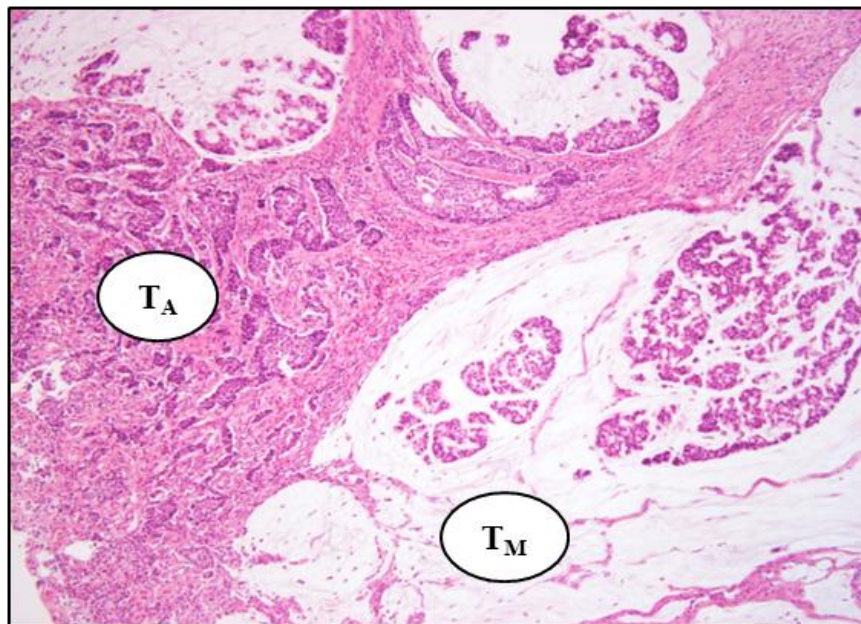
U uzorcima DNA izoliranim iz pridružene, histološki nepromijenjene normalne sluznice unutar 1 cm od ruba tumora, te promijenjene normalne sluznice smještene neposredno uz rub tumora (R_{1N} i R_{2N}) nismo dokazali prisutnost nestabilnosti MSI (Slika 17A) i EMAS (Slika 17B). Analiza mikrosatelitnih biljega u DNA iz uzoraka tumorskih tkiva pokazala je da su oba tipa mikrosatelitne nestabilnosti prisutna u svim segmentima tumora, uključujući rub tumora uz normalnu sluznicu (R_{1T} i R_{2T}), središte tumora (T_1) te invazivni rub tumora (T_2).

Međutim, u uzorcima pojedinih segmenata tumora uočili smo razlike u obrascima mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST. Pri tome je nestabilnost tipa MSI pokazivala vrlo heterogen obrazac koji se očitovao razlikama u veličini i broju nestabilnih alela te nakupljanjem novih mikrosatelitnih alela (Slika 17A), dok je obrazac nestabilnosti tipa EMAST bio minimalno promijenjen (Slika 17B).



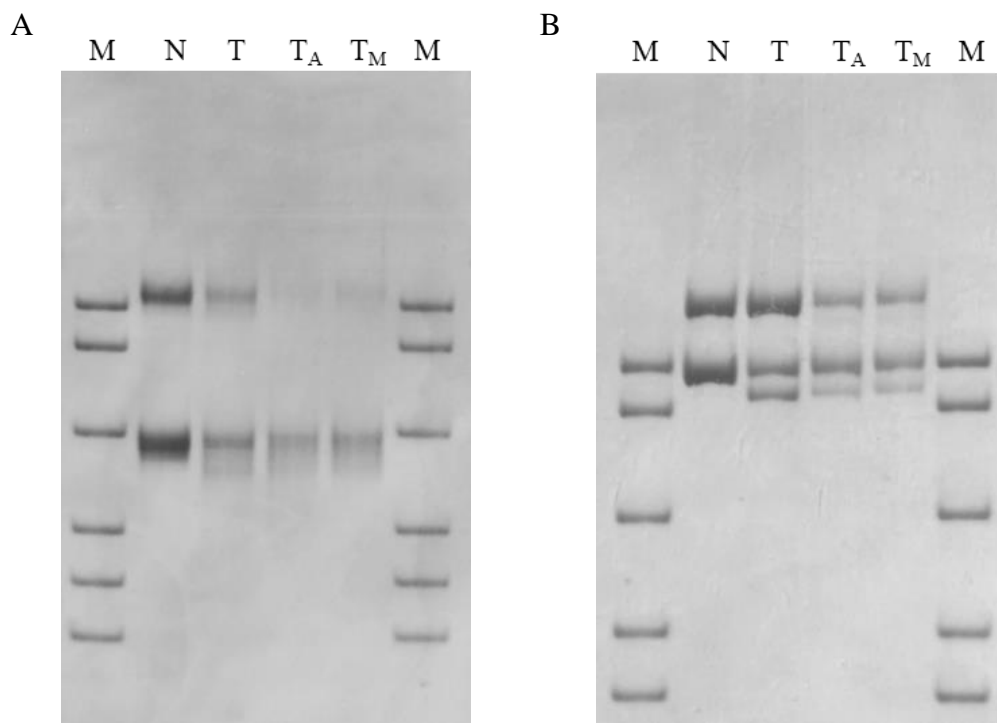
Slika 17. Analiza mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST u različitim segmenatima tumora i tumoru pridružene normalne sluznice debelog crijeva. Analiza prisutnosti (A) nestabilnosti tipa MSI u dinukleotidnom biljegu D2S123 i (B) nestabilnosti tipa EMAST u tetranukleotidnom biljegu D9S242; M, DNA standard pBR322 (DNA/MspI). N_a-N_c, pridružena normala unutar 1 cm od ruba tumora; R1_N, R2_N, normala neposredno uz rub tumora; R1_T, R2_T, tumorsko tkivo ruba tumora; T1, središte tumora; T2, invazivni rub tumora.

Budući da smo prethodno pokazali veću učestalost nestabilnosti tipa MSI-H/EMAST-H u adenokarcinomima s mucinoznom komponentom, željeli smo ispitati distribuciju mikrosatelitnih nestabilnosti u ovim tumorima. Analizu mikrosatelitnih biljega za MSI i EMAST proveli smo na uzorcima DNA izoliranim iz tkiva histološki različite adenokarcinomske (T_A) i mucinozne komponente (T_M) tumora (Slika 18).



Slika 18. *Prikaz histološki različitih segmenata mucinoznog adenokarcinoma debelog crijeva H&E metodom histokemijskog bojenja. T_A , adenokarcinomska komponenta tumora; T_M , mucinozna komponenta tumora. Povećanje 100x.*

Naši rezultati pokazali su da nema razlike u distribuciji i obrascu mikrosatelitnih nestabilnosti MSI (Slika 19A) i EMAST (Slika 19B) između tkiva mucinozne i tkiva adenokarcinomske komponente tumora.

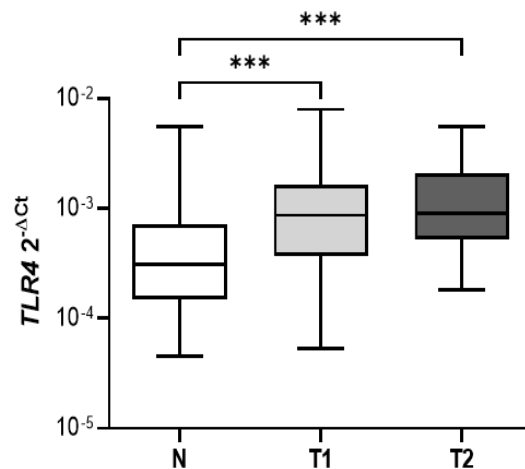


Slika 19. *Analiza mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST u različitim segmenatima mucinoznog adenokarcinoma debelog crijeva. Analiza (A) nestabilnosti tipa MSI u dinukleotinom biljegu D2S123 i (B) nestabilnosti tipa EMAST u tetranukleotidnom biljegu D8S321; M, DNA standard pBR322 (DNA/MspI). N, pridružena normalna sluznica udaljena 15 cm od ruba tumora; T, tumor; T_A, adenokarcinomska komponenta tumora; T_M mucinozna komponenta tumora.*

4.3 Analiza ekspresije mRNA gena *TLR4*

Razina ekspresije specifične mRNA gena *TLR4* ispitana je u uzorcima 90 parova tumora i pridružene normalne sluznice debelog crijeva (na udaljenosti 15 cm od ruba tumora) (N). Od svakog smo tumora analizirali uzorak iz središta tumora (T1) te invazivnu frontu tumora (T2). U analizi specifične mRNA gena *TLR4* kao endogena kontrola je korišten gen β -aktin (*ACTB*).

Statistička analiza pokazala je značajno višu ekspresiju specifične mRNA gena *TLR4* u uzorku tkiva iz središta tumora (T1) ($p=0,003$) te uzorku iz invazivne fronte tumora (T2) ($p=0,002$) u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu (N). Razina ekspresije mRNA *TLR4* nije se značajno razlikovala u uzorku iz središta tumora (T1) i uzorku invazivne fronte tumora (T2) ($p=0,882$) (Slika 20).



Slika 20. Razina ekspresije gena *TLR4* određena metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu u uzorcima sporadičnih tumora debelog crijeva i tumoru pridružene normalne sluznice. N, pridružena normalna sluznica udaljena 15 cm od ruba tumora; T1, središte tumora; T2, invazivna fronta tumora. Prikazane su prosječne vrijednosti ekspresije za svaku grupu uzoraka. Naznačena je srednja vrijednost i srednja vrijednost standardne pogreške svake grupe. $2^{-\Delta C_t}$ označava ekspresiju ispitivanog gena normaliziranog prema ekspresiji endogene kontrole *ACTB*. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (ANOVA test).

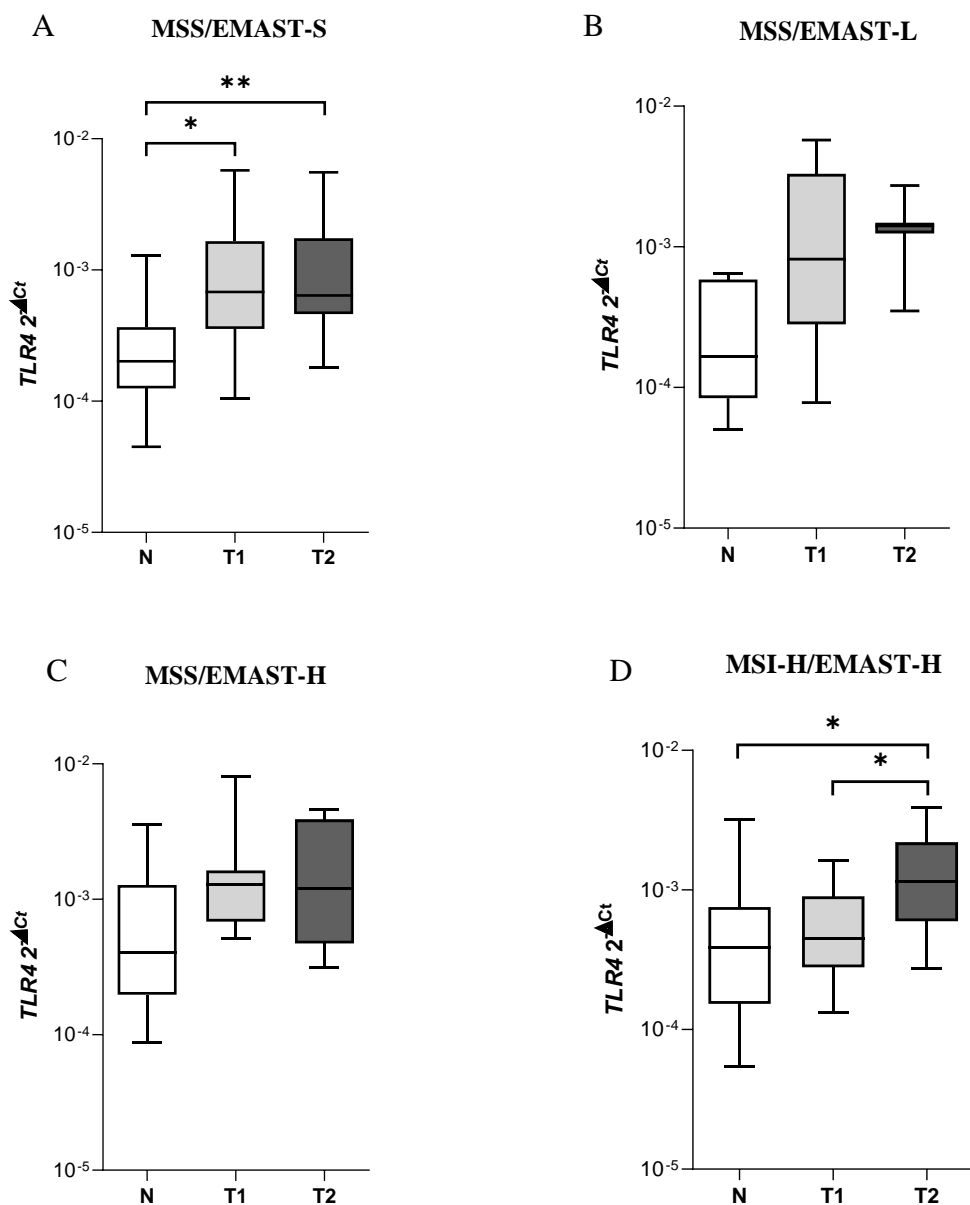
Osim toga, razina ekspresije specifične mRNA gena *TLR4* analizirana je i u podskupinama tumora dobivenih analizom mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST: MSS/EMAST-S (35 uzoraka), MSS/EMAST-L (21 uzorak) MSS/EMAST-H (16 uzoraka) i MSI-H/EMAST-H (18 uzoraka).

U podskupini stabilnih tumora (MSS/EMAST-S) dokazali smo statistički značajno višu ekspresiju specifične mRNA *TLR4* u uzorku tkiva iz središta tumora (T1) ($p=0,024$) te invazivne fronte tumora (T2) ($p=0,002$) u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu (N). Razlika razine ekspresije mRNA *TLR4* između uzoraka iz različitih segmenata tumora nije bila značajna (T1 vs. T2, $p>0,999$) (Slika 21A).

Analiza ekspresije mRNA *TLR4* u podskupini tumora niskonestabilnih na EMAST (MSS/EMAST-L) pokazala je nešto višu ekspresiju mRNA *TLR4* u uzorku iz središta tumora (T1) u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu (N), međutim razlika nije bila statistički značajna ($p=0,099$) (Slika 21B).

U podskupini tumora viskonestabilnih na EMAST (MSS/EMAST-H) nismo dokazali značajnu razliku u ekspresiji mRNA *TLR4* između pridružene normalne sluznice (N) i uzorka tumorskog tkiva iz središta tumora (T1) ($p=0,512$) (Slika 21C). U uzorku invazivne fronte tumora (T2) uočili smo nešto višu razinu ekspresije mRNA *TLR4* u odnosu na razinu u pridruženoj normalnoj sluznici (N), no bez statistički značajne razlike ($p=0,302$). Također, u ovoj podskupini tumora razlika razine ekspresije između uzorka iz središta tumora (T1) i uzorka invazivne fronte tumora (T2) nije bila statistički značajna ($p>0,999$) (Slika 21C).

U tumorima viskonestabilnim na MSI i EMAST (MSI-H/EMAST-H) nismo utvrdili razliku u razini ekspresije mRNA gena *TLR4* između pridružene normalne sluznice (N) i središta tumora (T1) ($p>0,999$). Međutim, statistička analiza pokazala je značajno višu ekspresiju mRNA *TLR4* u tumorskom tkivu invazivne fronte tumora (T2) u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu (N) ($p=0,028$). Osim toga, u ovoj podskupini tumora dokazali smo značajnu razliku u ekspresiji mRNA *TLR4* između uzorka iz središta tumora (T1) i uzorka invazivne fronte tumora (T2) ($p=0,018$) (Slika 21D).

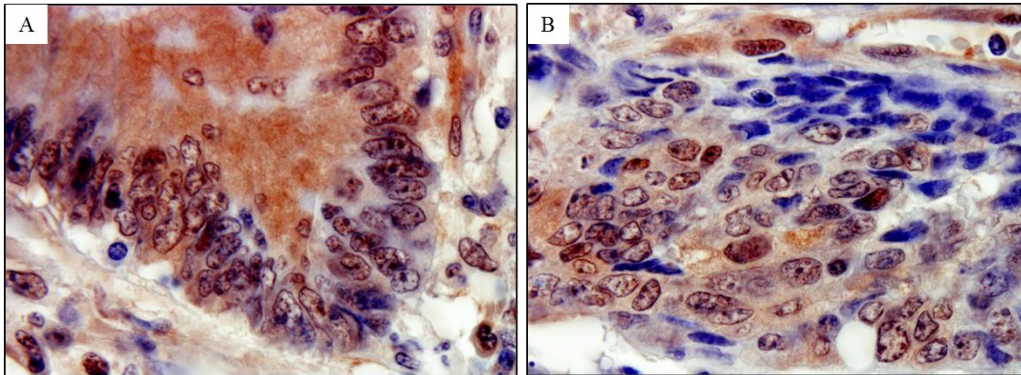


Slika 21. Razina ekspresije mRNA gena *TLR4* određena metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu u uzorcima sporadičnih tumora debelog crijeva podijeljenih u podskupine s obzirom na prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i/ili EMAST. Analiza ekspresije prisutna u (A) MSS, (B) EMAST-L, (C) EMAST-H i (D) MSI-H/EMAST-H podskupinama tumora. N, pridružena normalna sluznica udaljena 15 cm od ruba tumora; T1, središte tumora; T2, invazivna fronta tumora. Prikazane su prosječne vrijednosti ekspresije za svaku skupinu uzoraka. Naznačena je srednja vrijednost i srednja vrijednost standardne pogreške svake grupe. $2^{-\Delta Ct}$ označava ekspresiju ispitivanog gena normaliziranog prema ekspresiji endogene kontrole ACTB. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (ANOVA test)

4.4 Analiza ekspresije proteina TLR4

4.4.1 Analiza ekspresije proteina TLR4 u tumorskim stanicama sporadičnih karcinoma debelog crijeva

U našem smo istraživanju metodom imunohistokemije ispitali ekspresiju proteina TLR4 u histološkim preparatima tkiva 90 sporadičnih karcinoma debelog crijeva. U svakom preparatu analizirali smo središnji dio tumora (T1), a ukoliko je bilo moguće analizirali smo i uzorke pridružene normalne sluznice debelog crijeva (N) te invazivnu frontu tumora (T2). U svakom je tumoru analiziran intenzitet imunohistokemijskog obojenja u citoplazmi i jezgri tumorskih stanica. U svim uzorcima pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na protein TLR4 dokazali smo u citoplazmi i jezgri tumorskih stanica (Slika 22). Intenzitet ekspresije proteina TLR4 u citoplazmi tumorskih stanica razlikovao se od negativnog (0) do jako pozitivnog (3) obojenja, dok je intenzitet pozitivnog obojenja na protein TLR4 u jezgrama tumorskih stanica bio slabo pozitivan te se nije razlikovao u tumorima s visokom (Slika 22A) i niskom (Slika 22B) ekspresijom proteina TLR4 u citoplazmi tumorskih stanica.



Slika 22. *Analiza ekspresije proteina TLR4 u tumorskim stanicama sporadičnog karcinoma debelog crijeva metodom imunohistokemije. Prikaz ekspresije proteina TLR4 u jezgri tumorskih stanica s (A) visokom i (B) niskom ekspresijom proteina TLR4 u citoplazmi. Smeđe obojenje označava protein TLR4, plavo obojenje označava stanične jezgre. Povećanje 1000x.*

Ekspresija proteina TLR4 u citoplazmi tumorskih stanica bila je jako i umjereno pozitivna u 33 (36,7 %) uzorka, slabo pozitivna u 18 (20,0 %) uzoraka, dok je 6 (6,6 %) uzoraka bilo negativno na protein TLR4 (Tablica 5.).

Intenzitet ekspresije proteina TLR4 u citoplazmi tumorskih stanica korelirali smo s kliničko-patološkim karakteristikama oboljelih od sporadičnog karcinoma kolona. Rezultati statističke analize pokazali su značajno veću učestalost negativne ekspresije proteina TLR4 u tumorima smještenim u desnom dijelu debelog crijeva ($p=0,023$) (Tablica 5.)

Tablica 5. *Kliničko-patološke karakteristike oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva s obzirom na ekspresiju proteina TLR4 u tumorskim stanicama*

Karakteristika	Intenzitet ekspresije proteina TLR4				p
	0, n (%)	1, n (%)	2, n (%)	3, n (%)	
	6 (6,6)	18 (20,0)	33 (36,7)	33 (36,7)	
Dob					
< 70 godina	3 (5,4)	10 (17,9)	20 (35,7)	23 (41,1)	0,673
≥ 70 godina	3 (8,8)	8 (23,5)	13 (38,2)	10 (29,4)	
Spol					
Muški	1 (1,7)	12 (20,3)	22 (37,3)	24 (40,7)	0,068
Ženski	5 (16,1)	6 (19,4)	11 (35,5)	9 (29,0)	
Veličina tumora					
≤ 5 cm	3 (6,3)	9 (18,8)	17 (35,4)	19 (39,6)	0,942
> 5 cm	3 (7,1)	9 (21,4)	16 (38,1)	14 (33,3)	
Smještaj tumora					
Lijevi kolon	0 (0,0)	11 (20,8)	20 (37,7)	22 (41,5)	0,023*
Desni kolon	6 (16,2)	7 (18,9)	13 (35,1)	11 (29,7)	
Stupanj diferencijacije					
Dobro (1)	1 (3,3)	6 (20,0)	10 (33,3)	13 (43,3)	0,391
Umjereno (2)	3 (6,3)	9 (18,8)	17 (35,4)	19 (39,6)	
Slabo (3)	2 (16,7)	3 (25,0)	6 (50,0)	1 (8,3)	

p-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom * $P < 0,05$

Analiza korelacije intenziteta ekspresije proteina TLR4 sa stupnjem pupanja tumora i unutar tumorskom limfocitnom infiltracijom nije pokazala statistički značajnu razliku ($p > 0,05$) (Tablica 6).

Tablica 6. Stupanj pupanja tumora i stupanj gustoće unutar tumorskog limfocitnog infiltrata u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva s obzirom na ekspresiju proteina TLR4 u tumoru

Karakteristika	Intenzitet ekspresije proteina TLR4				p
	0, n (%)	1, n (%)	2, n (%)	3, n (%)	
	4 (5)	13 (18)	29 (40)	27 (37)	
Stupanj pupanja tumora					
Niski (1)	0 (3,3)	6 (20,7)	12 (41,4)	11 (37,9)	0,2515
Srednji (2)	0 (0,0)	3 (16,7)	8 (44,4)	7 (38,9)	
Visoki (3)	4 (15,4)	4 (15,4)	9 (34,6)	9 (34,6)	
Unutar tumorski limfocitni infiltrat					
Odsutan (0)	0 (0,0)	4 (14,3)	11 (39,3)	13 (46,4)	0,229
Oskudan (1)	1 (4,2)	4 (16,7)	11 (45,8)	8 (33,3)	
Srednje obilan (2)	1 (9,1)	4 (36,4)	2 (18,2)	4 (36,4)	
Obilan (3)	2 (20,0)	1 (10,0)	5 (50,0)	2 (20,0)	

p-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom

Intenzitet ekspresije proteina TLR4 u citoplazmi tumorskih stanica usporedili smo i u četiri podskupine tumora dobivene analizom mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAS: MSS/EMAS-S (35 uzoraka), MSS/EMAS-L (18 uzoraka), MSS/EMAS-H (16 uzoraka) i MSI-H/EMAS-H (18 uzoraka).

U svim podskupinama tumora, epitelne stanice u tkivu pridružene normalne sluznice debelog crijeva udaljene 15 cm od ruba tumora (N) pokazivale su negativnu imunohistokemijsku reakciju na protein TLR4 (Slika 23).

Visoka ekspresija proteina TLR4 većinom je bila zastupljena u stabilnim tumorima (MSS/EMAST-S) i to s jakim intenzitetom imunohistokemijske reakcije u 54,3 % uzoraka te umjereno jakim intenzitetom u 31,4 % uzoraka (Tablica 7. ; Slika 23).

Sličan rezultat dobili smo i u podskupini tumora niskonestabilnih na EMAST (MSS/EMAST-L), pri čemu je najveći broj uzoraka pokazivao jaku (38,9 %) i umjereno jaku (33,3 %) pozitivnu reakciju na protein TLR4. Nismo dokazali značajnu razliku u ekspresiji proteina TLR4 između ove podskupine i podskupine stabilnih tumora ($p=0,479$) (Tablica 7; Slika 23).

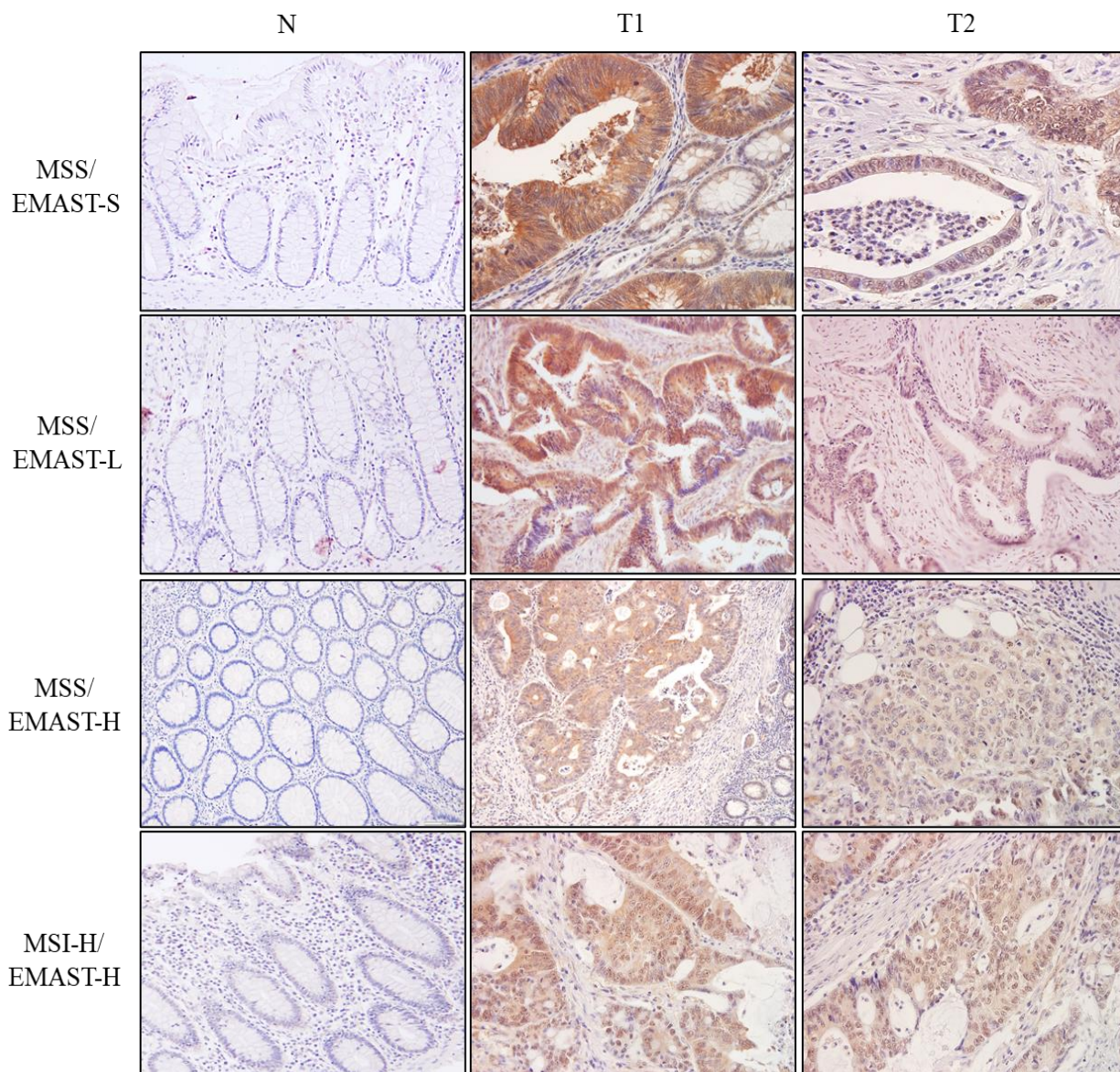
U podskupini tumora viskonestabilnih na EMAST (MSS/EMAST-H) imunohistokemijska analiza je pokazala nešto nižu ekspresiju proteina TLR4, koja je u više od 50 % uzoraka bila umjereno jakog intenziteta (Tablica 7; Slika 23), no nije se značajno razlikovala u odnosu na stabilne tumore ($p=0,167$).

Međutim, u tumorima viskonestabilnim na MSI i EMAST (MSI-H/EMAST-H) ekspresija proteina TLR4 je bila značajno niža u odnosu na ekspresiju u stabilnim tumorima ($p=0,014$). Pri tome je u 66,6 % tumora ove podskupine intenzitet reakcije na protein TLR4 bio slabo i umjereno pozitivan, dok je u 14,3 % tumora dokazana potpuno negativna reakcija na protein TLR4 u odnosu na svega 2,9 % stabilnih tumora (Tablica 7; Slika 23).

Tablica 7. Ekspresija proteina TLR4 u sporadičnim tumorima debelog crijeva podijeljenim u podskupine s obzirom na prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST.

MSI/EMAST	Intenzitet ekspresije proteina TLR4				p
	0, n (%)	1, n (%)	2, n (%)	3, n (%)	
MSS/EMAST-S	1 (2,9)	4 (11,4)	11 (31,4)	19 (54,3)	0,479 ^a
MSS/EMAST-L	2 (11,1)	3 (16,7)	6 (33,3)	7 (38,9)	0,167 ^b
MSS/EMAST-H	0 (0,0)	3 (18,8)	9 (56,3)	4 (25,0)	
MSI-H/EMAST-H	3 (16,7)	6 (33,3)	6 (33,3)	3 (16,7)	0,014^{c*}

Slova označavaju razliku između ^aMSS/EMAST-S i MSS/EMAST-L, ^bMSS/EMAST-S i MSS/EMAST-H, ^cMSS/EMAST-S i MSI-H/EMAST-H
p-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom * $P < 0.05$



Slika 23. *Analiza ekspresije proteina TLR4 metodom imunohistokemije u uzorcima sporadičnih tumora debelog crijeva podijeljenih u podskupine s obzirom na prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i/ili EMAS. Na slici su prikazani reprezentativni rezovi pridružene normalne sluznice udaljene 15 cm od ruba tumora (N), te rezovi središnjeg dijela tumora (T1) i invazivnog ruba tumora (T2) u podskupinama tumora. Smeđe obojenje označava protein TLR4, plavo obojenje označava stanične jezgre. Povećanje 200x.*

Analizom ekspresije proteina TLR4 u invazivnoj fronti (T2) stabilnih tumora (MSS/EMAST-S), u 60 % uzoraka dokazali smo slabo pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na protein TLR4. Također, u ovoj podskupini tumora dokazan je značajan pad ekspresije proteina TLR4 u invazivnoj fronti tumora u odnosu na središte tumora (T1) ($p=0,002$) (Tablica 8; Slika 23).

U podskupini tumora niskonestabilnih na EMAST (MSS/EMAST-L) uočili smo većinom slabo pozitivnu ekspresiju proteina TLR4 u invazivnoj fronti tumora u odnosu na središte tumora, no razlika nije bila statistički značajna ($p=0,103$) (Tablica 8; Slika 23).

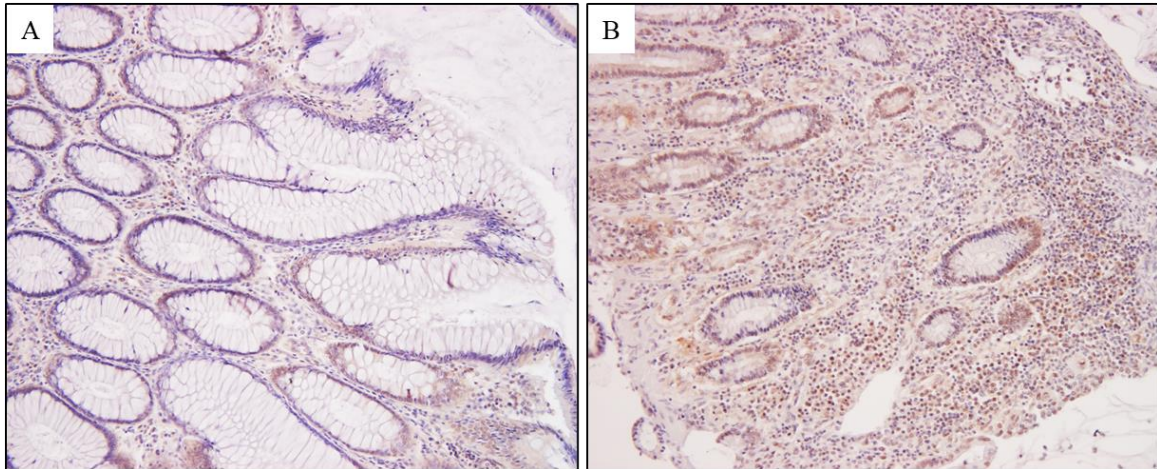
Slabo pozitivna imunohistokemijska reakcija na protein TLR4 bila je prisutna i u invazivnoj fronti tumora u više od 50 % uzoraka tumora viskonestabilnih na EMAST (MSS/EMAST-H), no, iako smo uočili trend pada ekspresije proteina TLR4 u odnosu na ekspresiju u središtu tumora, nije dokazana statistički značajna razlika ($p=0,065$) (Tablica 8; Slika 23).

U podskupini tumora viskonestabilnih na MSI i EMAST (MSI-H/EMAST-H) dokazali smo podjednaku ekspresiju proteina TLR4 u invazivnoj fronti (T2) i u središtu tumora (T1), pri čemu je najveći broj uzoraka pokazivao slabo i umjereno pozitivan intenzitet imunohistokemijske reakcije na protein TLR4. Također, u invazivnoj fronti ovih tumora uočena je negativna imunohistokemijska reakcija na protein TLR4 u većem broju uzoraka u odnosu na stabilne tumore (Tablica 8; Slika 23).

Tablica 8. Ekspresija proteina TLR4 u središtu (T1) i invazivnoj fronti (T2) sporadičnih tumora debelog crijeva podijeljenih u podskupine s obzirom na prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST.

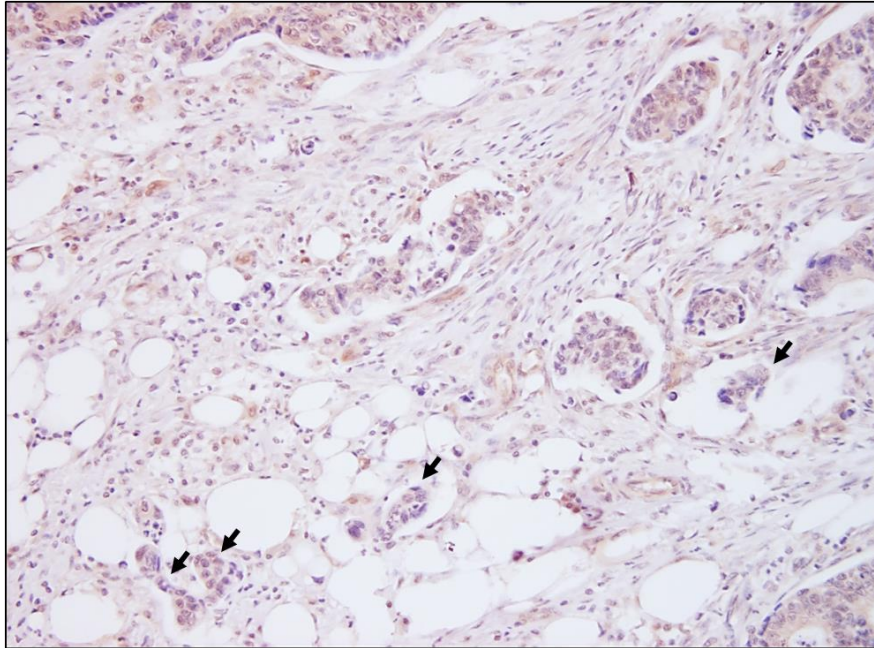
MSI/EMAST	Intenzitet ekspresije proteina TLR4				p
	0, n (%)	1, n (%)	2, n (%)	3, n (%)	
MSS/EMAST-S					
T1	1 (2,9)	4 (11,4)	11 (31,4)	19 (54,3)	0,002**
T2	1 (4,0)	15 (60,0)	7 (28,0)	2 (8,0)	
MSS/EMAST-L					
T1	2 (11,1)	3 (16,7)	6 (33,3)	7 (38,9)	0,103
T2	0 (0,0)	9 (52,9)	4 (23,5)	4 (23,5)	
MSS/EMAST-H					
T1	0 (0,0)	3 (18,8)	9 (56,3)	4 (25,0)	0,065
T2	1 (9,1)	6 (54,5)	4 (36,4)	0 (0,0)	
MSI-H/EMAST-H					
T1	3 (16,7)	6 (33,3)	6 (33,3)	3 (16,7)	0,672
T2	4 (36,4)	3 (27,3)	3 (27,3)	1 (9,1)	
p-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$					

Također, u svim podskupinama tumora uočili smo slabu do umjereno pozitivnu ekspresiju proteina TLR4 u tkivu pridružene normalne sluznice debelog crijeva neposredno uz tumor. Slika 24 prikazuje imunohistokemijsku reakciju na protein TLR4 u epitelnim stanicama stabilnih tumora (MSS/EMAST-S) (Slika 24A) i tumora viskonestabilnih na MSI i EMAST (MSI-H/EMAST-H) (Slika 24B).



Slika 24. *Analiza ekspresije proteina TLR4 metodom imunohistokemije u uzorcima priručene normalne sluznice debelog crijeva neposredno uz tumor. Prikaz reprezentativnih rezova pridružene normalne sluznice debelog crijeva (A) stabilnih tumora (MSS/EMAST-S) i (B) tumora viskonestabilnih na MSI i EMAST (MSI-H/EMAST-H). Smeđe obojenje označava protein TLR4, plavo obojenje označava stanične jezgre. Povećanje 200x.*

Ekspresiju proteina TLR4 analizirali smo i u pupovima tumora (ukoliko je bilo moguće). U svim analiziranim tumorima, uočili smo negativnu do slabo pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na protein TLR4 u citoplazmi tumorskih stanica pupova (Slika 25.).

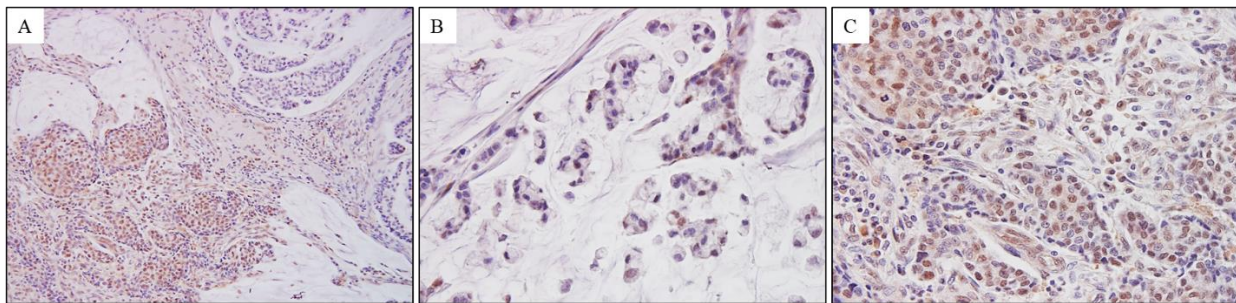


Slika 25. *Analiza ekspresije proteina TLR4 metodom imunohistokemije u pupovima tumora sporadičnih karcinoma debelog crijeva. Na slici je prikazan reprezentativni rez tkiva invazivnog ruba tumora. Strelice označavaju pupove tumorskih stanica. Smeđe obojenje označava protein TLR4, plavo obojenje označava stanične jezgre. Povećanje 200x.*

4.4.2 Analiza ekspresije proteina TLR4 u mucinoznim adenokarcinomima debelog crijeva

Osim u različitim segmentima tumora, ekspresiju proteina TLR4 analizirali smo i u tumorskim stanicama histološki različitih komponenti mucinoznih adenokarcinoma debelog crijeva (Slika 26A.).

Analizom imunohistokemijskog bojenja dokazali smo smještaj ekspresije proteina TLR4 u citoplazmama i jezgrama tumorskih stanica u obje analizirane komponente tumora. Analizom ekspresije proteina TLR4 u mucinoznoj komponenti tumora dokazali smo dominantno pozitivnu ekspresiju proteina TLR4 u jezgrama, dok su citoplazme tumorskih stanica bile negativne (Slika 26B). S druge strane, u citoplazmi tumorskih stanica adenokarcinomske komponente uočili smo slabo pozitivnu ekspresiju proteina TLR4, dok je u jezgrama prevladavala umjerena do jako pozitivna reakcija (Slika 26C).

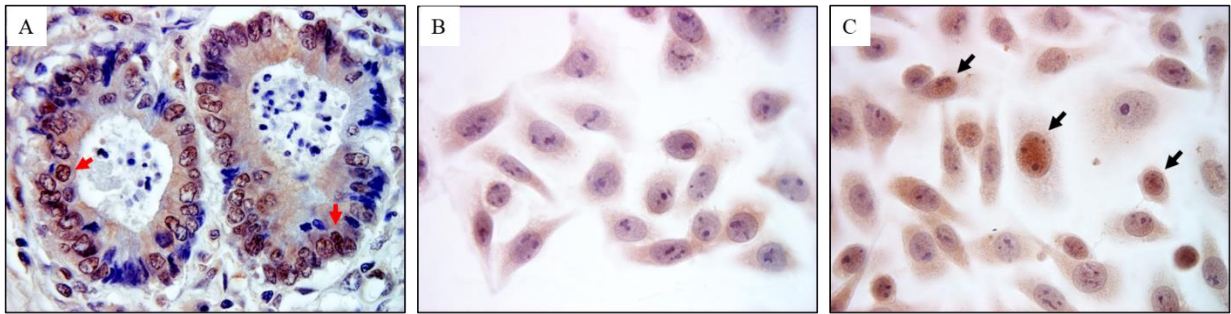


Slika 26. *Analiza ekspresije proteina TLR4 metodom imunohistokemije u mucinoznim adenokarcinomima debelog crijeva. (A) Prikaz ekspresije proteina TLR4 u histološki različitim komponentama tumora (povećanje 200x). Prikaz ekspresije proteina TLR4 u (B) mucinoznoj komponenti i (C) adenokarcinomske komponenti tumora (povećanje 400x). Smeđe obojenje označava protein TLR4, plavo obojenje označava stanične jezgre.*

4.4.3 Analiza smještaja proteina TLR4 u tumorskim stanicama karcinoma debelog crijeva

Budući da smo, uz očekivanu ekspresiju proteina TLR4 u citoplazmi tumorskih stanica, u većini analiziranih uzoraka tumora uočili i pozitivnu imunohistokemijsku reakciju u jezgrama tumorskih stanica (Slika 27A), željeli smo detaljnije ispitati smještaj proteina TLR4 u stanicama.

Smještaj proteina TLR4 analizirali smo u trajnim linijama stanica karcinoma kolona čovjeka SW480 nakon stimulacije ligandom receptora TLR4, LPS-om. Imunocitokemijska analiza netretirane kontrole (Slika 27B) pokazala je blago pozitivnu reakciju na protein TLR4 u citoplazmi i na membrani tumorskih stanica. Nakon stimulacije LPS-om, u tumorskim smo stanicama uočili pojačanu ekspresiju proteina TLR4 u jezgri, uz također jači intenzitet ekspresije u citoplazmi (Slika 27C).

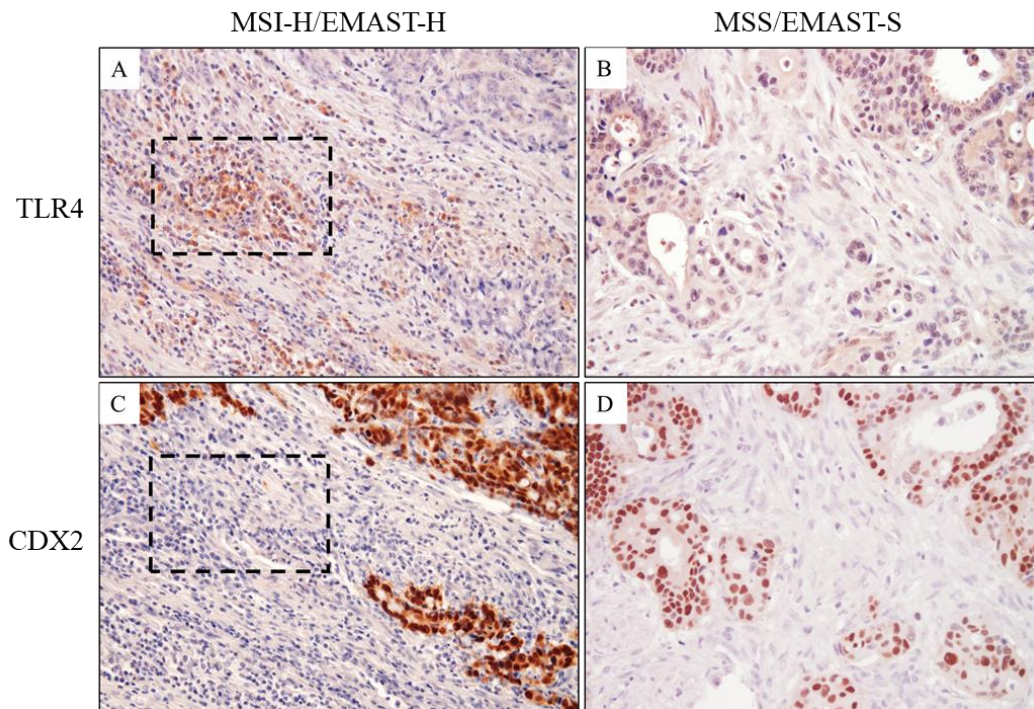


Slika 27. Analiza smještaja proteina TLR4 u citoplazmi i jezgri tumorskih stanica karcinoma debelog crijeva. (A) Prikaz smještaja proteina TLR4 u citoplazmi i jezgri tumorskih stanica sporadičnog karcinoma debelog crijeva metodom imunohistokemije. Analiza smještaja proteina TLR4 u liniji stanica karcinoma kolona čovjeka SW480 (B) prije tretmana LPS-om i (C) nakon tretmana LPS-om metodom imunocitokemije. Strelice označavaju stanice s pozitivnim obojenjem na protein TLR4 u jezgri i citoplazmi. Smeđe obojenje označava protein TLR4, plavo obojenje označava stanične jezgre. Povećanje 1000x.

4.4.4 Analiza ekspresije proteina TLR4 u stromi tumora sporadičnih karcinoma debelog crijeva

S obzirom na to da je razina ekspresije mRNA gena *TLR4* bila povećana u tumorima s nestabilnosti tipa MSI-H/EMAST-H, dok se razina proteina TLR4 nije razlikovala, željeli smo ovu nepodudarnost pobliže analizirati.

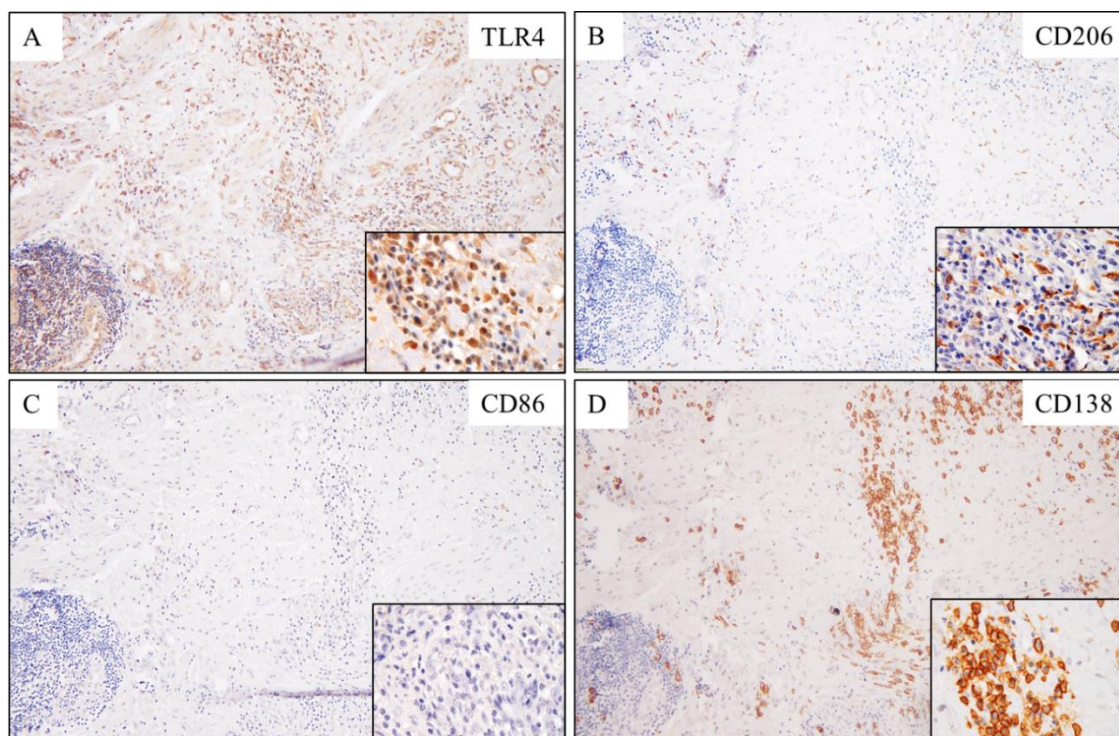
U stromi invazivne fronte tumora s nestabilnosti tipa MSI-H/EMAST-H uočili smo povećanu gustoću stanica s jakim intenzitetom ekspresije proteina TLR4 (Slika 28A), što nismo vidjeli u tumorima stabilnim na MSI i EMAST (Slika 28B). Imunohistokemijskom analizom proteina CDX2, pokazali smo da stanice s visokom ekspresijom proteina TLR4 u stromi tumora ne odgovaraju tumorskim stanicama (Slika 28C, D).



Slika 28. Analiza ekspresije proteina *TLR4* i *CDX2* u invazivnoj fronti tumora sporadičnih karcinoma debelog crijeva. Prikaz ekspresije proteina *TLR4* i *CDX2* u tumorskim stanicama i stanicama strome (A, C) tumora visokonestabilnog na MSI i EMAST (MSI-H/EMAST-H) i (B, D) stabilnog tumora (MSS/EMAST-S). Kvadratima je označeno područje u stromi tumora s negativnom ekspresijom *CDX2* i pojačanom ekspresijom proteina *TLR4* u tumoru visokonestabilnom na MSI i EMAST (MSI-H/EMAST-H). Povećanje 200x.

Stoga smo na uzorcima serijskih rezova tkiva imunohistokemijskom metodom analizirali različite populacije stanica za koje je poznato da pokazuju pojačanu ekspresiju TLR4. Analiza biljega za tumoru-pridružene makrofage fenotipa M1 (CD86) i fenotipa M2 (CD206) pokazala je slabu do umjereno pozitivnu ekspresiju proteina TLR4 (Slika 29A) na stanicama CD206⁺ u stromi tumora (Slika 29B), dok su stanice CD86⁺ bile zastupljene u vrlo malom broju te na njima nismo uočili ekspresiju proteina TLR4 (Slika 29C).

Nadalje, analizom imunohistokemijskog bojenja na biljeg plazma stanica (CD138) uočili smo da je u stromi invazivne fronte tumora visokonestabilnih na MSI i EMAS (MSI-H/EMAS-H) najveći udio ukupne ekspresije proteina TLR4 bio prisutan na stanicama koje su, osim biljegom CD138, i morfološki odgovarale plazma stanicama (Slika 29D).



Slika 29. Analiza ekspresije proteina TLR4 u stromi invazivne fronte visokonestabilnog tumora (MSI-H/EMAS-H). Prikaz ekspresije proteina (A) TLR4, (B) CD206, (C) CD86 i (D) CD138 na stanicama u stromi tumora (povećanje 200x i 1000x).

4.5. Analiza polimorfizma gena *TLR4* u sporadičnim karcinomima debelog crijeva

Kako bismo ispitali regulaciju aktivacije receptora TLR4 analizirali smo učestalost funkcionalnog polimorfizama gena *TLR4* +896A/G koji dovodi do slabije aktivacije nizvodnog prijenosa signala receptora TLR4. Učestalost polimorfizma *TLR4* +896A/G ispitali smo u skupini 250 oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva te 250 nesrodnih zdravih kontrola.

U populaciji zdravih ispitanika i oboljelih od sporadičnog karcinoma kolona učestalosti opaženih genotipova polimorfizma *TLR4* +896A/G bile su u skladu s Hardy-Weinberg ravnotežom.

U našem istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova i alela polimorfizma *TLR4* +896A/G između skupine zdravih ispitanika i skupine oboljelih od sporadičnog karcinoma kolona. Također, u ispitivanom uzorku nismo utvrdili povezanost ovog polimorfizama sa sklonošću obolijevanju od sporadičnog karcinoma kolona. Rezultati analize učestalosti genotipova i alela polimorfizma *TLR4* +896A/G u populaciji zdravih i oboljelih ispitanika te rezultati analize sklonosti obolijevanju od sporadičnog karcinoma kolona prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Omjer vjerojatnosti za povećanu sklonost obolijevanju genotipova AG i GG i alela G u odnosu na referentni genotip AA i alel A polimorfizma +896A/G gena *TLR4* u zdravih ispitanika i oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva

<i>TLR4</i> +896A/G	Zdravi N=250 (%)	Oboljeli N=250 (%)	OR (95% CI)	p
<i>Genotipovi</i>				
AA	211 (84,4)	218 (87,2)	1	0,6622
AG	38 (15,2)	31 (12,4)	1,266 (0,7630 – 2,085)	
GG	1 (0,4)	1 (0,4)	1,033 (0,05415 – 16,62)	
AA	211 (84,4)	218 (87,0)	1	0,4422
AG + GG	39 (15,6)	32 (12,8)	1,259 (0,7682 – 2,106)	
<i>Aleli</i>				
A	460 (92,0)	467 (93,4)	1	0,4660
G	40 (8,0)	33 (6,6)	1,231 (0,7650 – 1,955)	
p-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom				

Analizu polimorfizma +896A/G proveli smo i u skupini oboljelih ispitanika čije smo sporadične tumore debelog crijeva prethodno podijelili u podskupine prema prisutnosti mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST. Raspodjela i učestalost genotipova i alela polimorfizma +896A/G gena *TLR4* prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Učestalost genotipova i alela polimorfizma +896A/G gena *TLR4* u oboljelih od sporadičnih karcinoma kolona čiji tumori su podijeljeni u podskupine s obzirom na prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAS

<i>TLR4</i> +896A/G	Mikrosatelitna nestabilnost				p
	MSS/ EMAS-S N=161 (%)	MSS/ EMAS-L N=53 (%)	MSS/ EMAS-H N=16 (%)	MSI-H/ EMAS-H N=18 (%)	
<i>Genotipovi</i>					
AA	135 (83,9)	50 (94,3)	14 (87,5)	17 (94,4)	0,540
AG	25 (15,5)	3 (5,7)	2 (12,5)	1 (5,6)	
GG	1 (0,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<i>Aleli</i>					
A	295 (91,6)	103 (97,2)	30 (93,8)	35 (97,2)	0,177
G	27 (8,4)	3 (2,8)	2 (6,3)	1 (2,8)	
p-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom					

Budući da se učestalosti genotipova i alela ispitivanog polimorfizma nisu značajnije razlikovale između pojedinih podskupina oboljelih (Tablica 10), usporedili smo učestalost polimorfizma +896A/G između skupine zdravih ispitanika te oboljelih ispitanika čije smo sporadične tumore kolona prethodno klasificirali kao EMAS-stabilne (EMAS-S) ukoliko nisu pokazivali nestabilnost u niti jednom ispitivanom tetranukleotinom biljegu i EMAS-nestabilne (EMAS-N) ukoliko je nestabilnost dokazana u jednom ili više tetra-nukleotidnih biljega. Analiza učestalosti genotipova i alela polimorfizma *TLR4* +896A/G u populaciji zdravih ispitanika te ispitanika oboljelih od EMAS-stabilnih i EMAS-nestabilnih sporadičnih tumora kolona prikazana je u Tablici 11.

Analizom polimorfizma +896A/G nismo dokazali statistički značajnu razliku u raspodjeli genotipova i alela ispitivanog polimorfizma između skupine zdravih kontrola i skupine ispitanika

oboljelih od EMAST-stabilnih sporadičnih karcinoma kolona. Također, nismo utvrdili povezanost ovog polimorfizma, odnosno njegovih genotipova i alela, sa sklonošću obolijevanju od EMAST-stabilnih karcinoma kolona.

U skupini ispitanika oboljelih od EMAST-nestabilnih sporadičnih karcinoma kolona nismo dokazali značajnu razliku u učestalosti pojedinih genotipova ispitivanog polimorfizma u odnosu na kontrolnu skupinu ($p=0,102$). U našem uzorku oboljelih od EMAST-nestabilnih sporadičnih karcinoma kolona nije bilo nosioca varijantnog homozigotnog genotipa GG, dok je u kontrolnoj skupini i skupini oboljelih od EMAST-stabilnih karcinoma kolona zabilježen po jedan nosioc.

Međutim, u odnosu na skupinu zdravih kontrola, u skupini oboljelih od EMAST-nestabilnih sporadičnih karcinoma debelog crijeva dokazali smo značajno manju učestalost nosioca genotipova AG+GG, odnosno nosioca varijantnog alela G povezanog sa slabijom aktivacijom receptora TLR4 ($p=0,037$). Također, analiza je pokazala da nosioci varijantnog alela G imaju 2,5 puta manju vjerojatnost za razvoj EMAST-nestabilnih sporadičnih karcinoma debelog crijeva u odnosu na nosioce divljeg tipa alela A (Tablica 11).

Tablica 11. Omjer vjerojatnosti za povećanu sklonost obolijevanju genotipova AG i GG i alela G u odnosu na referentni genotip AA i alel A polimorfizma +896A/G gena TLR4 u zdravih ispitanika i oboljelih od EMAST-negativnog i EMAST-pozitivnog sporadičnog karcinoma debelog crijeva

<i>TLR4</i> +896A/G	Zdravi N=250 (%)	EMAST-S N=161 (%)	OR (95% CI)	p	EMAST-N N=89 (%)	OR (95% CI)	p
Genotipovi							
AA	211 (84,4)	135 (83,9)	1	0,947	83 (95,4)	1	0,102
AG	38 (15,2)	25 (15,5)	0,972 (0,5695 – 1,668)		6 (6,9)	2,491 (1,020 – 5,745)	
GG	1 (0,4)	1 (0,6)	0,639 (0,03354 – 10,32)		0 (0,0)	1,184 (0,047 – 29,368)	
AA	211 (84,4)	135 (83,9)	1	0,890	83 (95,4)	1	0,044*
AG+GG	39 (15,6)	26 (16,1)	0,959 (0,5701 – 1,617)		6 (6,9)	2,557 (1,052 – 5,884)	
Aleli							
A	460 (92,0)	295 (91,6)	1	0,896	172 (98,9)	1	0,037*
G	40 (8,0)	27 (8,4)	0,950 (0,5796 – 1,571)		6 (3,4)	2,493 (1,080 – 5,569)	

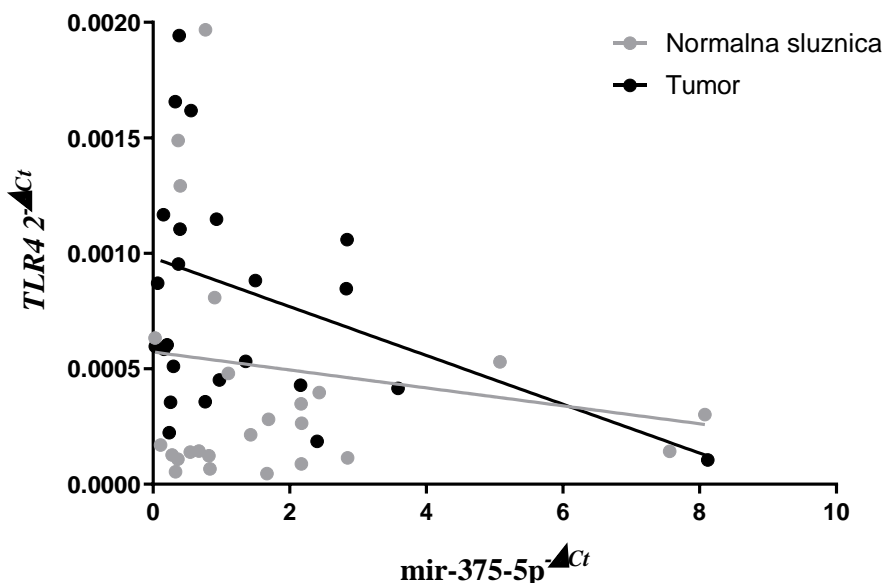
EMAST-S označava oboljele s EMAST-stabilnim tumorima; EMAST-N označava oboljele s EMAST-nestabilnim tumorima

p-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom *P <0.05

4.6 Analiza ekspresije *miR-375-3p* u sporadičnim karcinomima debelog crijeva

Kako bismo ispitali regulaciju ekspresije proteina TLR4, u ovom smo istraživanju analizirali razinu ekspresije negativnog regulatora gena *TLR4*, *miR-375-3p*.

U odnosu na normalnu sluznicu ($p=0,552$), u tkivu tumora smo uočili trend povezanosti između povišene ekspresije mRNA gena *TLR4* i smanjene ekspresije *miR-375-3p* ($p=0,129$), no rezultat nije bio statistički značajan (Slika 30).

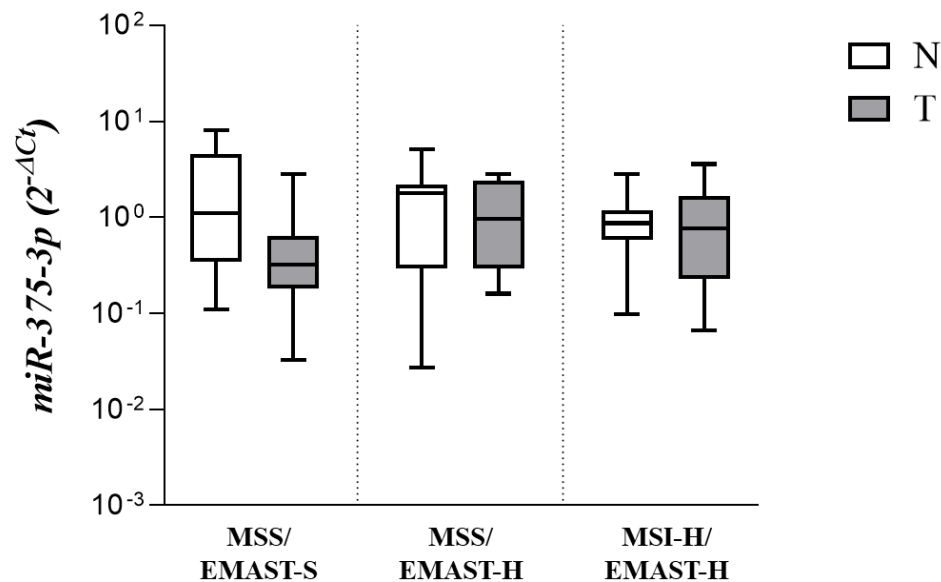


Slika 30. Analiza korelacije između ekspresije *miR-375-3p* i ekspresije specifične mRNA gena *TLR4* u tumoru i normalnoj sluznici debelog crijeva. Razina ekspresije *miR-375-3p* i specifične mRNA gena *TLR4* određena je metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu. Kružići označavaju vrijednosti ekspresije *miR-375-3p* i specifične mRNA gena *TLR4* u uzorcima tumorskog tkiva i normalne sluznice debelog crijeva. $2^{-\Delta C_t}$ označava ekspresiju ispitivanog gena normaliziranog prema ekspresiji endogene kontrole *miR-16-5p*.

Nadalje, ekspresiju *miR-375-3p* ispitali smo i u podskupinama tumora stratificiranim s obzirom na mikrosatelitne nestabilnosti MSI i EMAST (Slika 31).

Uzorak iz središta tumora stabilnih na MSI i EMAST pokazivao je trend prema nižoj razini ekspresije *miR-375-3p* u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu debelog crijeva, međutim razlika nije bila statistički značajna ($p=0,088$).

Nismo dokazali značajnu razliku u razini ekspresije *miR-375-3p* između tumora i pridružene normalne sluznice debelog crijeva u podskupini tumora s nestabilnosti tipa EMAST-H ($p=0,428$) te tumorima viskonestabilnim na MSI i EMAST (MSI-H/EMAST-H) ($p=0,823$).



Slika 31. Razina ekspresije miRNA *miR-375-3p* određena metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu u uzorcima sporadičnih tumora debelog crijeva podijeljenih u podskupine s obzirom na prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i/ili EMAST. N, pridružena normalna sluznica udaljena 15 cm od ruba tumora; T, tumor. Prikazane su prosječne vrijednosti ekspresije za svaku podskupinu uzoraka. Naznačena je srednja vrijednost i srednja vrijednost standardne pogreške svake skupine. $2^{-\Delta Ct}$ označava ekspresiju ispitivanog gena normaliziranog prema ekspresiji endogene kontrole *miR-16-5p*. Statistička analiza provedena je pomoću t-testa.

5. RASPRAVA

Karcinom debelog crijeva, s obzirom na stalni porast njegove učestalosti, predstavlja jedan od vodećih zdravstvenih problema u zemljama razvijenog svijeta [291]. Tumorigeneza sporadičnog karcinoma debelog crijeva započinje nakupljanjem mutacija u onkogenima i tumor supresorskim genima, te u više od 85 % slučajeva prati stupnjeviti slijed preobrazbe normalne sluznice kolona preko adenoma do zloćudnog invazivnog karcinoma, poznat kao put kromosomske nestabilnosti [292]. U približno 15 % slučajeva karcinom debelog crijeva razvija se kao posljedica neispravnog sustava popravka MMR te se takvi tumori odlikuju specifičnim kliničko-patološkim karakteristikama, poput pojačane unutartumorske infiltracije limfocitima i bolje kliničke prognoze s duljim preživljenjem oboljelih [293]. S druge strane, sporadični karcinomi kolona koji pokazuju drugi tip mikrosatelitne nestabilnosti - EMAS, pokazuju drugačija kliničko-patološka svojstva, te su povezani s bržim napredovanjem tumorske bolesti i kraćim preživljenjem u oboljelih [294]. S napretkom u razumijevanju unutartumorskog upalnog okoliša u karcinomu debelog crijeva, pokazalo se da su tijekom razvoja karcinoma s visokom učestalosti mikrosatelitne nestabilnosti, ali i prognoza u oboljelih, usko povezani s prirodom upalnog odgovora u tumoru [295].

Kronična upala je dobro poznat čimbenik rizika za nastanak tumora. Novija su istraživanja pokazala povezanost između kronične upale i signalnog puta receptora TLR u nastanku i napredovanju zloćudnih tumora [296]. Receptor TLR4 jedan je od glavnih medijatora upale u sluznici debelog crijeva, a pojačana ekspresija ovog receptora često je prisutna u karcinomima debelog crijeva [297]. Iako je pokazano da povećana aktivnost signalnog puta receptora TLR4 može doprinijeti nastanku i napredovanju karcinoma debelog crijeva [298], većina dosadašnjih saznanja temeljena je na istraživanjima karcinoma kolona nastalih kao posljedica upalnih bolesti crijeva. Unatoč biološkoj sličnosti sa sporadičnim karcinomom kolona, karcinomi kolona povezani s upalnim bolestima crijeva dijele drugačiji genetski i upalni put nastanka i napredovanja [299].

Stoga smo u ovom doktorskom radu po prvi put istražili i opisali ekspresiju i funkciju receptora TLR4, kao i potencijalnu regulaciju aktivacije receptora TLR4 te ekspresije gena *TLR4*, u podskupinama sporadičnih karcinoma kolona definiranim s obzirom na učestalost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i/ili EMAS. Ukratko, naši su rezultati pokazali različitost

ekspresije mRNA i proteina TLR4 ovisno o prisutnosti mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST, pri čemu ekspresija proteina TLR4 u tumoru obrnuto korelira s visokom učestalošću nestabilnosti MSI i EMAST. Dok je u stabilnim tumorima (MSS/EMAST-S) ekspresija mRNA i proteina TLR4 bila značajno viša u središtu tumora u odnosu na invazivnu frontu, u visokonestabilnim tumorima (MSI-H/EMAST-H) smo taj rezultat vidjeli samo na razini mRNA, ali ne i na razini proteina TLR4. Međutim, dokazali smo da je takva nepodudarnost u podskupini visokonestabilnih tumora (MSI-H/EMAST-H) rezultat obilne unutar tumorske infiltracije limfocitima te da visoka ekspresija mRNA i proteina TLR4 dominantno potječe od plazma stanica u stromi invazivnog ruba tumora. U ovom istraživanju pokazujemo da bi receptor TLR4 mogao imati značajniju ulogu u nastanku sporadičnih tumora debelog crijeva koji nastaju putem kromosomske nestabilnosti, nego u tumorima visokonestabilnim na MSI i EMAST. Također, moguće je da smanjena ekspresija TLR4 u tumorskim stanicama, uz povećanu ekspresiju TLR4 u stromi tumora visokonestabilnih na MSI i EMAST, predstavlja dodatni mehanizam koji doprinosi povoljnijoj prognozi u oboljelih od ovih zloćudnih tumora.

U našem istraživanju ispitivane uzorke tumora podijelili u četiri podskupine s obzirom na prisutnost mikrosatelitne nestabilnosti tipa MSI i mikrosatelitne nestabilnosti tipa EMAST u tumoru. Najzastupljenija je bila podskupina tumora stabilnih na MSI i EMAST (MSS/EMAST-S, 63,3 %) te podskupina tumora niskonestabilnih na EMAST (MSS/EMAST-L, 21,2 %). Iako je nestabilnost tipa EMAST u karcinomu debelog crijeva prvi put opisana u povezanosti s MSI-L tumorima [294], u našoj analizi grupu oboljelih s MSI-L tumorima činilo je svega 1,6 % ukupnog ispitivanog uzorka uzorka pri čemu pretpostavljamo da su u našem istraživanju nestabilnosti u ova četiri uzorka vjerojatno rezultat spontane tumorigeneze u mikrosatelitnim ponavljanjima. Međutim, treba uzeti u obzir da istraživanja ukazuju na slabiju osjetljivost dinukleotidnih biljega u detekciji nestabilnosti tipa MSI [300] i da bi analiza panela od tri mononukleotidna biljega mogla značajno utjecati na detekciju ove skupine tumora [301]. Stoga smatramo da bi niska učestalost tumora s MSI-L u našem istraživanju također mogla biti rezultat nedovoljne osjetljivosti analiziranih mikrosatelitnih biljega te da bismo upotrebom šireg panela mononukleotidnih biljega identificirali veći broj tumora s MSI-L. S obzirom na to da je pokazana važnost analize

mononukleotidnih biljega u analizi tumora s MSI-L [301], moguće je da ovaj tip nestabilnosti predstavlja prijelazni fenotip između stabilnih tumora i tumora s MSI-H.

S druge strane, naši su rezultati pokazali prisutnost visoke učestalosti nestabilnosti tipa EMAST u svim tumorima s MSI-H. Iako se do nedavno smatralo da tumori koji pokazuju visoke učestalosti nestabilnosti tipa MSI i tipa EMAST predstavljaju zasebne molekularne podskupine karcinoma debelog crijeva [294], rezultati novijih istraživanja, uključujući i naše, upućuju na to da se nestabilnost tipa MSI-H vrlo rijetko pojavljuje zasebno te većinom korelira s visokom učestalošću nestabilnosti tipa EMAST [302].

U našem istraživanju, učestalost nestabilnosti tipa MSI-H/EMAST-H dokazana je u 7,2 %, a učestalost nestabilnosti samo tipa EMAST-H tipa nestabilnosti u 6,4 % tumora, što je u skladu s najnovijim istraživanjem provedenim na više od 1000 oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva u kojemu je učestalost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST bila značajno manja u odnosu na ranija istraživanja [303]. Prethodno je pokazano da su tetranukleotidna mikrosatelitna ponavljanja podložnija nakupljanju spontanijih mutacija u odnosu na kraća ponavljanja [304], zbog čega nekoliko istraživanja ukazuje na to da bi nestabilnost tipa EMAST mogla biti pokazatelj spontane mutageneze [294]. Biogeneza nestabilnosti tipa EMAST u tumorima povezana je s drugačijim mehanizmom nastanka u odnosu na MSI-H, a uključuje reverzibilnu promjenu smještaja proteina MSH3 iz jezgre u citoplazmu te posljedični gubitak njegove funkcije u popravku dužih ponavljanja. Stoga smatramo da bi sam fenotip EMAST-H mogao prethoditi nastanku nestabilnosti u mono- i dinukleotidnim ponavljanjima, s obzirom na to da naši rezultati pokazuju kako je u MSI-H tumorima prisutno potpuno preklapanje oba tipa nestabilnosti. Podaci o učestalosti mikrosatelitnih nestabilnosti MSI-H i EMAST-H u karcinomima debelog crijeva značajno variraju, a najčešći razlog takvim varijacijama su razlike u metodama analize te panelima mikrosatelitnih biljega. Osim toga, nekoliko istraživanja pokazuje da na učestalost nestabilnosti u specifičnim mikrosatelitnim ponavljanjima može utjecati i podrijetlo ispitanika [305-307].

U posljednjih deset godina postalo je jasnije da se razlike u kliničkom ishodu karcinoma debelog crijeva mogu samo djelomično objasniti razlikama u biologiji tumora te da karcinom kolona predstavlja vrlo heterogenu bolest koja često pokazuje svojstva različitih puteva razvoja. Stoga sve veći broj istraživanja potiče analizu molekularnih podskupina tumora i njihovu primjenu

u predviđanju prognoze i planiranju liječenja oboljelih od karcinoma kolona. Klasifikacija koja obuhvaća četiri podskupine karcinoma kolona, nazvana klasifikacija CMS (od engl. *Consensus molecular subtype*), nastala je analizom ekspresijskih profila tumora i trenutno predstavlja jednu od najdetaljnije opisanih molekularnih klasifikacija karcinoma debelog crijeva [308]. U kontekstu ove klasifikacije, karcinomi debelog crijeva s mikrosatelitnom nestabilnosti tipa MSI, povećanom stopom mutacija te pojačanom unutartumorskom infiltracijom limfocitima T pripadaju skupinu CMS1, dok karcinomi kolona s mikrosatelitnom nestabilnosti tipa EMASST nisu uvršteni u ovu klasifikaciju [294]. Međutim, naši rezultati pokazuju podskupinu tumora s preklapanjem mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMASST, kao i postojanje tumora s nestabilnosti tipa EMASST-L. Iako neki autori opisuju tumore s nestabilnosti tipa EMASST-L kao stabilne, nedavno istraživanje pokazuje povezanost između tumora s EMASST-L i lošije prognoze u oboljelih od karcinoma debelog crijeva [301]. Uz to, visoka zastupljenost tumora s nestabilnosti tipa EMASST-L u našoj ispitivanoj populaciji upućuje na to da bi detaljnija karakterizacija tumora s ovim tipom nestabilnosti mogla imati važan klinički značaj.

U našem je istraživanju podskupina tumora viskonestabilnih na MSI i EMASST (MSI-H/EMASST-H), u odnosu na sve druge podskupine, bila u korelaciji s tumorima većim od 5 cm, smještajem u desnom kolonu, povećanom prisutnosti mucinozne komponente, te većom prisutnosti obilnog unutartumorskog infiltrata, što je u suglasju s rezultatima drugih istraživanja [309]. Visoka imunogeničnost tumora s mikrosatelitnom nestabilnosti tipa MSI-H danas predstavlja temelj u terapiji ovih karcinoma. Štoviše, novije istraživanje pokazuje da su sporadični karcinomi debelog crijeva koji pokazuju visoku učestalost oba tipa mikrosatelitne nestabilnosti (MSI-H i EMASST) povezani sa značajno duljim preživljenjem [309]. Do sada nije poznato postoji li veza između nestabilnosti tipa EMASST i imunogeničnosti tumora, no moguće je da istovremena prisutnost nestabilnosti u mono-, di- i tetranukleotidima dovodi do povećane stope mutacija, rezultirajući pojačanom sintezom neoantigena koji snažno potiču imunosni odgovor.

Izražena unutartumorska heterogenost predstavlja jedan od glavnih izazova u području personalizirane onkologije. Nedavna istraživanja temeljena na sekvenciranju više različitih segmenata tumora debelog crijeva pokazuju da svaki tumor u prosjeku posjeduje 75 različitih mutacija, od čega je svega 15 mutacija ključnih za nastanak karcinoma kolona [310].

Unutartumorska heterogenost povezana je s metastaziranjem i rezistencijom na terapiju u oboljelih od karcinoma debelog crijeva [311]. Tako je u slučaju gena *KRAS* neophodno analizirati prisutnost somatske mutacije u različitim segmentima tumora, kako bi se predvidjela rezistencija na anti-EGFR terapiju u oboljelih [311]. S obzirom na prognostički i terapijski značaj mikrosatelitne nestabilnosti tipa MSI-H te potencijalnu primjenu nestabilnosti tipa EMASST u prognozi i praćenju oboljelih od sporadičnog karcinoma kolona, u našem smo istraživanju, upotrebom metode mikrodisekcije tumorskog tkiva, željeli ispitati prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMASST u više različitih segmenata tumora i tumoru pridružene normalne sluznice. Naši su rezultati pokazali da su oba tipa mikrosatelitne nestabilnosti prisutna u svim segmentima visokonestabilnih tumora, uključujući središte i invazivnu frontu tumora. Osim toga, u našem smo istraživanju po prvi puta analizirali profil mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMASST u stanicama pridružene normalne sluznice udaljene do 15 cm od ruba tumora te histološki promijenjene sluznice debelog crijeva neposredno uz rub tumora. Naime, često se zbog nedostatka uzoraka normalne sluznice debelog crijeva zdravih pojedinaca, kao zdrava kontrola u analizi tumora koristi pridružena normalna sluznica udaljena do 15 cm od ruba tumora. Međutim, novija istraživanja ukazuju na sličnosti u ekspresijskom profilu između pridružene normalne sluznice i samog tumora [312], stoga se postavlja pitanje predstavlja li uzorak tumoru pridružene normale primjerenu kontrolu u analizi tumora. Naši su rezultati pokazali da mikrosatelitne nestabilnosti MSI i EMASST nisu prisutne u tkivu tumoru pridružene normalne sluznice debelog crijeva, a nismo ih dokazali niti u histološki promijenjenim normalnim stanicama neposredno uz sam rub tumora. Ovi rezultati potvrđuju da su mikrosatelitne nestabilnosti MSI i EMASST u sporadičnim tumorima debelog crijeva isključivo svojstvene tumorskim stanicama. Izgled stanica normalne sluznice u samom rubu tumora ukazuje na to da je u njima došlo do histološke promjene, no moguće je da naša metoda nije pokazala dovoljnu osjetljivost za takve promjene. Nadalje, analizom mikrodisekcija dokazali smo prisutnost heterogenosti u obrascu mikrosatelitne nestabilnosti tipa MSI koja se očitovala razlikama u veličini i broju mikrosatelitnih alela identificiranih u različitim segmentima tumora, dok isto nismo uočili u analizi mikrosatelitne nestabilnosti tipa EMASST. Iako rezultati ranijih istraživanja također opisuju nakupljanje novih mikrosatelitnih alela u različitim uzorcima tumora s nestabilnosti tipa MSI [313], u njima je analiza provedena na manjem broju različitih uzoraka tumorskog tkiva za koje nije definirano iz kojeg segmenta tumora su uzorkovani. U našem

je istraživanju po prvi put mikrosatelitna nestabilnost opisana u samom rubu tumora gdje smo dokazali heterogenost u odnosu na tkivo središta i invazivne fronte tumora. Svi ovi rezultati upućuju na postojanje supklonova stanica s različitim promjenama u MSI-nestabilnim mikrosatelitnim lokusima ili s različitim profilom mikrosatelitske nestabilnosti tipa MSI.

Mucinozni adenokarcinomi jedinstvena su histološka varijanta adenokarcinoma debelog crijeva karakterizirana s više od 10 % stanica s unutarstaničnim mucinom te obilnom izvanstaničnom mucinoznom komponentom koja može zahvaćati više od 50 % volumena tumora. Poznato je da ovi karcinomi pokazuju različit profil mutacija u odnosu na klasične adenokarcinome debelog crijeva te su učestalije povezani s nestabilnosti tipa MSI-H [314]. S obzirom na to da smo u ovom istraživanju imali uzorke mucinoznih adenokarcinoma s jasno ograničenom mucinoznom i adenokarcinomskom komponentom, zanimalo nas je postoje li razlike u distribuciji i heterogenosti mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i E-MAST između ovih histološki različitih segmenata tumora. Analizom mikrodisekcija nismo dokazali razlike u prisutnosti i obrascu mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i E-MAST između različitih komponenti tumora što ukazuje na to da mucinozna diferencijacija nije povezana s prisutnosti mikrosatelitnih nestabilnosti tipa MSI i E-MAST. Osim toga, ključnu ulogu u razvoju mucinoznih adenokarcinoma ima disregulacija signalnog puta EGFR, najvećim dijelom uslijed mutacija u genima *BRAF* i *KRAS*, što za posljedicu ima slabiji odgovor na anti-EGFR terapiju u oboljelih s mucinoznim adenokarcinomima debelog crijeva [315]. Stoga smatramo da bi valjalo ispitati prisutnost mutacija u histološki različitim segmentima mucinoznih adenokarcinoma kako bi utvrdili postoji li razlika u njihovoj distribuciji, kao i utjecaj na diferencijaciju ovih tumora.

Uz nestabilnost genoma, upalni odgovor u tumoru ima ključnu ulogu u razvoju i napredovanju sporadičnih karcinoma debelog crijeva. Međutim, lokalni imunosni odgovor, osobito u invazivnoj fronti tumora, povezan je s duljim preživljenjem u oboljelih od karcinoma debelog crijeva [316]. S obzirom na to da je upala u sluznici kolona primarno povezana s pojačanom aktivacijom receptora TLR4 na stanicama epitela, u ovom istraživanju je razina ekspresije mRNA gena *TLR4* ispitana u uzorcima pridružene normalne sluznice udaljene 15 cm od ruba tumora te u uzorcima iz središta i invazivne fronte tumora sporadičnih karcinoma debelog crijeva. Naši rezultati pokazali su da je razina ekspresije specifične mRNA gena *TLR4* bila značajno viša u središtu tumora u odnosu na

pridruženu normalnu sluznicu udaljenu 15 cm od ruba tumora, dok između tkiva središta i tkiva invazivne fronte tumora nije bilo razlike. Sussman i suradnici su, koristeći metode *in silico*, također pokazali povišenu ekspresiju mRNA gena *TLR4* u sporadičnim tumorima debelog crijeva [309]. Za razliku od njih, mi smo u ovom istraživanju ekspresiju mRNA *TLR4* ispitali izravno u tkivima dva različita segmenta tumora te smatramo da naši rezultati prikazuju objektivniju sliku ekspresije mRNA *TLR4* u sporadičnim tumorima debelog crijeva.

S obzirom na to da mi u ovom radu po prvi puta uspoređujemo podskupine sporadičnih karcinoma kolona, dokazali smo da je u stabilnim tumorima razina mRNA gena *TLR4* bila značajno viša u tumorskim tkivima središta i invazivne fronte tumora u odnosu na normalnu sluznicu. U odnosu na stabilne tumore, tumori s nestabilnosti tipa EMAS^T-H (MSS/EMAS^T-H) nisu pokazivali razliku u razini ekspresije mRNA *TLR4* između normalne sluznice i tumorskih tkiva. S druge strane, ekspresija mRNA *TLR4* u tkivu normalne sluznice ovih tumora bila je viša u odnosu na ekspresiju u normalnoj sluznici stabilnih tumora. Iako je pokazano da je IL-6 jedan od glavnih pokretača za nastanak nestabilnosti tipa EMAS^T-H u karcinomima kolona[309], nema mnogo podataka o povezanosti ovog tipa nestabilnosti s ključnim aktivatorima lučenja IL-6, poput signalnog puta receptora TLR4. Naši rezultati po prvi put pokazuju povezanost između nestabilnosti tipa EMAS^T-H i ekspresije mRNA *TLR4*, sugerirajući da bi pojačan proupalni odgovor u udaljenoj normalnoj sluznici debelog crijeva mogao imati važnu ulogu u patogenezi karcinoma kolona s nestabilnosti EMAS^T-H. Sličan porast ekspresije mRNA *TLR4* uočili smo i u normalnoj sluznici viskonestabilnih tumora (MSI-H/EMAS^T-H), ali nije bio značajan. U odnosu na sve ostale podskupine tumora, u ovim je tumorima razina mRNA *TLR4* u tkivu invazivne fronte tumora bila značajno viša nego u središtu tumora i pridruženoj normalnoj sluznici. Do sada je, na manjem broju uzoraka te primjenom metoda *in silico* i *ex vivo*, pokazana smanjena ekspresija mRNA *TLR4* u tumorima debelog crijeva s nestabilnosti tipa MSI-H u odnosu na stabilne tumore [297]. Također, Scarpa i suradnici su na uzorku od 63 oboljela od karcinoma kolona pokazali da je smanjena razina ekspresije mRNA *TLR4* u izravnoj korelaciji s hipermetilacijom gena *MLH1*[317]. S obzirom na to da su u našem radu svi tumori s MSI-H ujedno pokazivali i visoku učestalost nestabilnosti tipa EMAS^T (EMAS^T-H), teško ih je usporediti s rezultatima drugih

istraživanja. Međutim, u središtu tumora visokonestabilnih na MSI-H/EMAST-H uočili smo nešto nižu ekspresiju mRNA *TLR4* u odnosu na stabilne tumore.

Jedan od nedostataka analize ekspresije mRNA u tumorskim tkivima je to što dobiveni rezultat proizlazi iz heterogenog unutartumorskog mikrookoliša koji osim tumorskih stanica, obuhvaća i stanice strome. Razlika u ekspresiji između pojedinih komponenti tumora osobito je važna u kontekstu karcinoma kolona, budući da signali koji potiču rast i invaziju tumora mogu potjecati od tumorskih stanica, kao i od stanica strome. Kako bismo potvrdili razlike dobivene u ekspresijskom profilu mRNA gena *TLR4*, u ovom smo istraživanju odredili i razinu proteina TLR4 u tkivu pridružene normalne sluznice te tkivima središta tumora i invazivne fronte tumora u podskupinama tumora. Budući da TLR4 može biti eksprimiran i na tumorskim i na imunostimuliranim stanicama, razinu proteina TLR4 odredili smo imunohistokemijski, pri čemu smo mogli analizirati ekspresiju TLR4 u tumorskim stanicama, kao i njegov smještaj u stanici.

Suprotno istraživanju Paarnio i suradnika [318], u našem smo istraživanju pokazali negativnu i relativno slabu ekspresiju proteina TLR4 u stanicama epitela pridružene normalne sluznice udaljene 15 cm od ruba tumora. S obzirom na to da u istraživanju Paarnio i suradnika nije navedeno radi li se o uzorcima udaljene ili histološki normalne sluznice smještene neposredno uz rub tumora, teško je rezultate usporediti s rezultatima našeg istraživanja. Poznato je da ekspresija proteina TLR4 u normalnoj sluznici kolona podliježe strogim mehanizmima regulacije, uključujući i metilaciju gena *TLR4* [319]. Budući da je takva regulacija neophodna kako bi se spriječila kontinuirana aktivacija TLR4 od strane komenzalnih mikroorganizama, smatramo da su naši rezultati u skladu s očekivanjem. Većina tumora u našem istraživanju pokazala je umjerenu i jaku ekspresiju proteina TLR4, što je u suglasju s dosadašnjim istraživanjima [224, 320]. No, za razliku od drugih autora [321], mi smo pokazali da je povećana ekspresija proteina TLR4 u tumoru bila značajno povezana sa smještajem tumora u lijevom kolonu, te da nije značajno povezana sa dobi i spolom oboljelih.

Imunohistokemijskom analizom pokazali smo smještaj proteina TLR4 u citoplazmi i jezgri tumorskih stanica većine analiziranih tumora. Budući da ovo opažanje nije bilo u skladu s očekivanjem smještajem proteina TLR4, ispitali smo ga *in vitro* te potvrdili da stimulacija linije stanica karcinoma kolona čovjeka LPS-om, uz pojačanu ekspresiju proteina TLR4 u citoplazmi,

rezultira i njegovom ekspresijom u jezgri. Iako je internalizacija membranskog kompleksa TLR4-LPS normalan odgovor stanica na aktivaciju receptora, nema mnogo podataka o smještaju i potencijalnoj funkciji ovog receptora u jezgri. Do sada je nuklearni smještaj proteina TLR4 pokazan u stanicama karcinoma gušterače [322] i fibroblasta rožnice čovjeka [323], dok je u stanicama glioblastoma pokazano da nuklearni protein TLR4 potiče ekspresiju gena *UNG* (od engl. *uracil DNA glycosylase*), *FEN1* (od engl. *flap structure-specific endonuclease 1*) i rekombinaze *RAD51*, koji su uključeni u popravak DNA [324]. Budući da navedeni rezultati imaju snažne implikacije u razumijevanju karcinoma kolona s disfunkcijom MMR sustava za popravak DNA, smatramo da naše istraživanje predstavlja čvrsti temelj za daljnje ispitivanje uloge nuklearnog TLR4 u stanicama karcinoma kolona.

Imunohistokemijskom analizom adenokarcinoma s mucinoznom komponentom utvrdili smo da postoji razlika u distribuciji proteina TLR4 u ovim tumorima. Naime, u odnosu na tumorske stanice adenokarcinomske komponente u kojima je TLR4 pokazivao slab do umjeren intenzitet ekspresije u jezgri i citoplazmi, u tumorskim stanicama s obilnom mucinoznom komponentom ekspresija proteina TLR4 bila je prisutna samo u jezgrama uz citoplazmu negativnu na ispitivani protein. Premda dosadašnja istraživanja ukazuju na povezanost mucinoznih adenokarcinoma debelog crijeva s negativnom ekspresijom TLR4, mi smo u ovom radu po prvi put pokazali da je takva negativna ekspresija specifično prisutna u mucinoznoj komponenti ovih tumora. U istraživanju Sodhi i suradnika pokazano je kako utišavanje gena *TLR4* u trajnoj liniji stanica epitela crijeva rezultira pojačanom produkcijom mucina [325]. S obzirom na to da naši rezultati podupiru njihovo istraživanje, možemo pretpostaviti da bi, inače homeostatska funkcija receptora TLR4, potencijalno mogla imati ulogu u patogenezi mucinoznih adenokarcinoma.

Iako smo mi, kao i drugi autori, pokazali da većina sporadičnih tumora debelog crijeva pokazuje relativno visoku ekspresija proteina TLR4 [224], dokazali smo da je umjerena do jaka razina proteina TLR4 dominantno prisutna u stabilnim tumorima, dok je u tumorskim stanicama visokonestabilnih tumora (MSI-H/EMAST-H) protein TLR4 bio značajno slabije eksprimiran ($p=0,014$). Smanjena razina proteina TLR4 u visokonestabilnim tumorima (MSI-H/EMAST-H) donekle se može objasniti istraživanjem Scarpe i suradnika koji pokazuju da je smanjena ekspresija gena i proteina TLR4 rezultat gubitka funkcije gena *MLH1* [317]. Međutim, u našem su

istraživanju svi tumori s nestabilnosti tipa MSI-H ujedno pokazivali i nestabilnost tipa EMAS-H, što ukazuje na to da smanjena ekspresija proteina TLR4 može biti rezultat disfunkcije proteina MLH1, ali i drugih proteina sustava MMR. Također, u ovom smo radu po prvi put pokazali da stabilni tumori pokazuju pad ekspresije proteina TLR4 od središta prema invazivnom rubu tumora, dok je u visokonestabilnim tumorima (MSI-H/EMAS-H) slabija ekspresija proteina TLR4 u središtu tumora bila podjednako održana i u invazivnoj fronti tumora. Paarnio i suradnici također pokazuju smanjenu ekspresiju proteina TLR4 u invazivnoj fronti u odnosu na središte tumora, sugerirajući povezanost s metastaziranjem tumora i lošijim preživljenjem u oboljelih od karcinoma debelog crijeva [326]. Međutim, njihovi uzorci nisu bili analizirani na nestabilnosti tipa MSI i tipa EMAS. Naši rezultati ukazuju na to da bi povećana ekspresija proteina TLR4 mogla imati ulogu u nastanku u stabilnih tumora, što otvara mogućnosti za daljnja istraživanja.

Invazivna fronta tumora debelog crijeva predstavlja dinamičan proces dediferencijacije tumorskih stanica, poznat kao EMT, ali i ključno područje interakcije imunskih i tumorskih stanica [326]. Istraživanja upućuju na to da upravo ravnoteža između protumorskih i protutumorskih utjecaja u invazivnoj fronti tumora kolona potencijalno ima odlučujuću ulogu u napredovanju tumora i kliničkom ishodu bolesti [327]. U odnosu na podskupinu stabilnih tumora, u tumorima visokonestabilnim na MSI i EMAS (MSI-H/EMAS-H) uočili smo pojačanu ekspresiju proteina TLR4 u stromi invazivnog ruba tumora. Ovaj rezultat ukazuje na to da je povišena razina ekspresije mRNA *TLR4* u tkivu invazivnog ruba tumora s MSI-H/EMAS-H zapravo odraz pojačane gustoće na protein TLR4 pozitivnih stanica u stromi tumora. Imunohistokemijskom analizom smo pokazali da je ekspresija proteina TLR4 slabog do srednjeg intenziteta prisutna u makrofazima fenotipa M2, dok je visoka ekspresija proteina TLR4 dokazana u plazma stanicama. Cammarota i suradnici u svojem istraživanju sugeriraju da visoka ekspresija proteina TLR4 u stromi tumora predstavlja potencijalni prognostički pokazatelj napredovanja tumora [328]. Međutim, rezultati našeg istraživanja pokazuju da bi u visokonestabilnim tumorima (MSI-H/EMAS-H), pojačana gustoća plazma stanica pozitivnih na protein TLR4 mogla ukazivati na specifični protutumorski imunski odgovor. Unatoč brojnim dokazima koji ukazuju na važnost unutartumorskih CD8⁺ limfocita T u karcinomima kolona, zadnjih se nekoliko godina počinje prepoznavati uloga i prognostički značaj unutartumorskih plazma stanica [329]. Neki su

autori pokazali prognostički značaj pojačane infiltracije CD8⁺ limfocitima T ukoliko je udružena s povećanom gustoćom plazma stanica i limfocita B [330]. Receptor TLR4 ima važnu ulogu u aktivaciji i sazrijevanju limfocita B te proizvodnji protutijela od strane plazma stanica [331]. S obzirom na to da je prethodno pokazano kako su sporadični tumori debelog crijeva visokonestabilni na MSI i EMASST povezani sa značajno povoljnijom prognozom u oboljelih [309], možemo očekivati da bi pojačana infiltracija plazma stanicama pozitivnih na protein TLR4 mogla doprinijeti boljoj prognozi i duljem preživljenju oboljelih od ovih zloćudnih tumora.

Osim razinom ekspresije, aktivacija receptora TLR4 može, biti uvjetovana i polimorfizmom u genu *TLR4*. Iako neka istraživanja pokazuju da je polimorfizam *A896G* povezan s povećanim rizikom za obolijevanje od gastrointestinalnih tumora [288] rezultati našeg istraživanja, kao i rezultati Proenca i suradnika [332], ne ukazuju na statistički značajnu povezanost ovog polimorfizma s obolijevanjem od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Naše istraživanje pokazalo je povećanu učestalost varijantnog alela (G), povezanog sa slabijom aktivacijom receptora TLR4, u zdravih ispitanika u odnosu na oboljele od EMASST-nestabilnih tumora. S obzirom na to da se EMASST-nestabilni tumori povezuju s upalom, ovakav rezultat ide u prilog toj hipotezi te bi alel G polimorfizma *A896G* gena *TLR4* mogao imati zaštitnu ulogu u obolijevanju od EMASST-nestabilnih sporadičnih karcinoma debelog crijeva. Osim toga, u ovom smo istraživanju imali vrlo nisku prisutnost homozigota GG te smatramo da bi bilo dobro proširiti ovo istraživanje i ispitati utjecaj ovog polimorfizma na većem broju ispitanika oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva.

Mikro RNA *miR-375-3p* uglavnom ima tumor-supresorsku ulogu u karcinomima kolona [333], a pokazano je da putem izravne regulacije ekspresije gena *TLR4* može djelovati i na regulaciju upale u sluznici debelog crijeva. U našim uzorcima tumorskih tkiva nismo dokazali značajnu korelaciju između ekspresije *miR-375-3p* i gena *TLR4*, iako je u tumorskim tkivima uočen trend pada ekspresije gena *TLR4* s porastom ekspresije *miR-375-3p*. Budući da se u ovom istraživanju ekspresijski profil gena i proteina TLR4 razlikovao u podskupinama tumora, uz najznačajniju razliku u stabilnim tumorima, željeli smo ispitati da li je takva razlika rezultat utjecaja *miR-375-3p* u tumoru. U podskupinama visokonestabilnih tumora (MSS/EMASST-H i MSI-H/EMASST-H) razina ekspresije *miR-375-3p* bila je podjednaka, dok smo u stabilnim

tumorima uočili pad ekspresije *miR-375-3p* u tumorskom tkivu u odnosu na tumoru pridruženu normalnu sluznicu debelog crijeva. Dobiveni rezultat ukazuje na to da je u stabilnim tumorima i tumorima s visokom učestalosti nestabilnosti tipa EMASST i tipa MSI ekspresija gena i proteina TLR4 regulirana različitim mehanizmima, pri čemu bi ova mikroRNA mogla biti uključena u regulaciju ekspresije gena i proteina TLR4 u stabilnim tumorima.

U ovom smo radu pokazali razlike u ekspresijskom profilu gena i proteina TLR4 u sporadičnim karcinomima debelog crijeva podijeljenim u podskupine s obzirom na učestalost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMASST. Ekspresija gena i proteina TLR4 bila je veća u stabilnim tumorima u odnosu na visokonestabilne (MSI-H/EMASST-H). Pojačana ekspresija proteina TLR4 stabilnih tumora bila je veća u središtu tumora u odnosu na invazivnu frontu, ukazujući na moguću ulogu TLR4 u njihovom nastanku. S druge strane, u tumorskim stanicama visokonestabilnih sporadičnih karcinoma debelog crijeva (MSI-H/EMASST-H) prisutna je podjednaka ekspresija proteina TLR4 u središtu i invazivnoj fronti tumora. Međutim, u ovim je karcinomima protein TLR4 pojačano eksprimiran u stanicama strome tumora, posebice plazma stanicama, što ukazuje na moguću ulogu TLR4 u imunskom odgovoru na tumor.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

- Među sporadičnim karcinomima debelog crijeva najzastupljenije su četiri podskupine tumora: stabilni tumori (MSS/EMAST-S; 63,6 %), tumori niskonestabilni na EMAST (MSS/EMAST-L; 21,2 %), tumori viskonestabilni na EMAST (MSS/EMAST-H; 6,4 %) i tumori viskonestabilni na MSI i EMAST (MSI-H/EMAST-H; 7,2 %).
- U sporadičnim karcinomima debelog crijeva, mikrosatelitna nestabilnost tipa EMAST-H javlja se zasebno te u kombinaciji s nestabilnosti tipa MSI-H.
- Tumori viskonestabilni na MSI i EMAST (MSI-H/EMAST-H) imali su značajno veći promjer tumora ($p=0,021$), veću učestalost u desnom kolonu ($p<0,001$), učestaliju prisutnost mucinozne komponente ($p<0,001$) kao i obilniji unutartumorski limfocitni infiltrat u odnosu na druge podskupine tumora ($p<0,001$).
- Mikrosatelitne nestabilnosti MSI i EMAST prisutne su u svim segmentima tumora sporadičnih karcinoma debelog crijeva, uključujući rubove tumora (R), središte (T1) i invazivnu frontu tumora (T2) te su isključivo svojstvene tumorskim stanicama.
- Nestabilnost tipa MSI pokazuje varijacije u profilu nestabilnih alela među različitim segmentima tumora, što ukazuje na postojanje supklonova stanica s različitim promjenama u mikrosatelitnim ponavljanjima.
- Nema razlike u distribuciji i obrascu mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAST između tkiva mucinozne i tkiva adenokarcinomske komponente tumora.
- U stabilnim tumorima (MSS/EMAST-S) prisutna je pojačana ekspresija mRNA i proteina TLR4 u središtu tumora (T1) u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu debelog crijeva (N).
- Pojačana ekspresija proteina TLR4 u tumorskim stanicama središta (T1) stabilnih tumora te pad ekspresije u invazivnoj fronti (T2) upućuje na ulogu proteina TLR4 u nastanku ovih tumora.

- U tumorima viskonestabilnim na MSI i EMAST (MSI-H/EMAST-H) pokazali smo povećanu ekspresiju mRNA *TLR4* u invazivnoj fronti tumora (T2) u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu (N) i središte tumora (T1) ($p=0,028$; $p=0,018$).
- U podskupini viskonestabilnih tumora (MSI-H/EMAST-H) pokazali smo podjednaku ekspresiju proteina TLR4 u središtu (T1) i invazivnoj fronti tumora (T2) koja je bila značajno niža u odnosu na stabilne tumore (MSS/EMAST-S) ($p=0,014$).
- Pojačana ekspresija mRNA *TLR4* u invazivnoj fronti viskonestabilnih tumora (MSI-H/EMAST-H) pokazatelj je pojačane ekspresije proteina TLR4 u stanicama strome tumora, osobito u plazma stanicama.
- Varijantni alel G polimorfizma *A896G* u genu *TLR4*, povezan sa slabijom aktivacijom prijenosa signala putem receptora TLR4, učestaliji je u zdravih ispitanika te može imati zaštitnu ulogu u obolijevanju od EMAST-nestabilnih sporadičnih karcinoma debelog crijeva.
- Trend smanjenja ekspresije *miR-375-3p* u tkivu tumora (T) u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu debelog crijeva (N) ukazuje na moguću ulogu ove miRNA u regulaciji ekspresije proteina TLR4 u stabilnim tumorima (MSS/EMAST-S).

7. LITERATURA

1. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational oncology*. 2021;14(10):101174.
2. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2019;16(12):713-32.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
4. Murphy N, Moreno V, Hughes DJ, Vodicka L, Vodicka P, Aglago EK, Gunter MJ, Jenab M. Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Molecular aspects of medicine*. 2019;69:2-9.
5. Danese S. Inflammatory bowel disease and inflammation-associated colon cancer: partners in crime. *Current drug targets*. 2008;9(5):360.
6. Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat Immunol*. 2016;17(3):230-40.
7. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2101-14 e5.
8. Buikhuisen JY, Torang A, Medema JP. Exploring and modelling colon cancer inter-tumour heterogeneity: opportunities and challenges. *Oncogenesis*. 2020;9(7):66.
9. Conteduca V, Sansonno D, Russi S, Dammacco F. Precancerous colorectal lesions (Review). *International journal of oncology*. 2013;43(4):973-84.
10. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2012;3(3):153-73.
11. Jaspersion KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2044-58.

12. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nature reviews Cancer*. 2015;15(3):181-94.
13. Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, Wahlberg S, Fox EA, Peel D, Ziogas A, Garber JE, Syngal S, Anton-Culver H, Li FP. Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer research*. 1999;59(20):5068-74.
14. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*. 1994;368(6468):258-61.
15. Worthley DL, Walsh MD, Barker M, Ruzskiewicz A, Bennett G, Phillips K, Suthers G. Familial mutations in PMS2 can cause autosomal dominant hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2005;128(5):1431-6.
16. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, Haile R, Casey G, Baron J, Gallinger S, Bapat B, Aronson M, Hopper J, Jass J, LeMarchand L, Grove J, Potter J, Newcomb P, Terdiman JP, Conrad P, Moslein G, Goldberg R, Ziogas A, Anton-Culver H, de Andrade M, Siegmund K, Thibodeau SN, Boardman LA, Seminara D. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA*. 2005;293(16):1979-85.
17. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(22):5248-57.
18. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *The American journal of gastroenterology*. 2006;101(2):385-98.
19. Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*. 2000;103(2):311-20.
20. Brosens LA, van Hattem WA, Jansen M, de Leng WW, Giardiello FM, Offerhaus GJ. Gastrointestinal polyposis syndromes. *Current molecular medicine*. 2007;7(1):29-46.

21. Tenesa A, Dunlop MG. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(6):353-8.
22. Dunlop MG, Tenesa A, Farrington SM, Ballereau S, Brewster DH, Koessler T, Pharoah P, Schafmayer C, Hampe J, Volzke H, Chang-Claude J, Hoffmeister M, Brenner H, von Holst S, Picelli S, Lindblom A, Jenkins MA, Hopper JL, Casey G, Duggan D, Newcomb PA, Abuli A, Bessa X, Ruiz-Ponte C, Castellvi-Bel S, Niittymaki I, Tuupanen S, Karhu A, Aaltonen L, Zanke B, Hudson T, Gallinger S, Barclay E, Martin L, Gorman M, Carvajal-Carmona L, Walther A, Kerr D, Lubbe S, Broderick P, Chandler I, Pittman A, Penegar S, Campbell H, Tomlinson I, Houlston RS. Cumulative impact of common genetic variants and other risk factors on colorectal cancer risk in 42,103 individuals. *Gut*. 2013;62(6):871-81.
23. Hsu L, Jeon J, Brenner H, Gruber SB, Schoen RE, Berndt SI, Chan AT, Chang-Claude J, Du M, Gong J, Harrison TA, Hayes RB, Hoffmeister M, Hutter CM, Lin Y, Nishihara R, Ogino S, Prentice RL, Schumacher FR, Seminara D, Slattery ML, Thomas DC, Thornquist M, Newcomb PA, Potter JD, Zheng Y, White E, Peters U. A model to determine colorectal cancer risk using common genetic susceptibility loci. *Gastroenterology*. 2015;148(7):1330-9 e14.
24. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1177-90 e3.
25. Rabeneck L, Davila JA, El-Serag HB. Is there a true "shift" to the right colon in the incidence of colorectal cancer? *The American journal of gastroenterology*. 2003;98(6):1400-9.
26. Schreuders EH, Ruco A, Rabeneck L, Schoen RE, Sung JJ, Young GP, Kuipers EJ. Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes. *Gut*. 2015;64(10):1637-49.
27. Rabeneck L, Chiu HM, Senore C. International Perspective on the Burden of Colorectal Cancer and Public Health Effects. *Gastroenterology*. 2020;158(2):447-52.
28. Patel SG, Karlitz JJ, Yen T, Lieu CH, Boland CR. The rising tide of early-onset colorectal cancer: a comprehensive review of epidemiology, clinical features, biology, risk factors, prevention, and early detection. *The lancet Gastroenterology & hepatology*. 2022;7(3):262-74.

29. Koncina E, Haan S, Rauh S, Letellier E. Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers for Colorectal Cancer: Updates and Challenges. *Cancers*. 2020;12(2).
30. Bosman FT, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010. 417 p. p.
31. Nitsche U, Zimmermann A, Spath C, Muller T, Maak M, Schuster T, Slotta-Huspenina J, Kaser SA, Michalski CW, Janssen KP, Friess H, Rosenberg R, Bader FG. Mucinous and signet-ring cell colorectal cancers differ from classical adenocarcinomas in tumor biology and prognosis. *Annals of surgery*. 2013;258(5):775-82; discussion 82-3.
32. Mekenkamp LJ, Heesterbeek KJ, Koopman M, Tol J, Teerenstra S, Venderbosch S, Punt CJ, Nagtegaal ID. Mucinous adenocarcinomas: poor prognosis in metastatic colorectal cancer. *European journal of cancer*. 2012;48(4):501-9.
33. Gao P, Song YX, Xu YY, Sun Z, Sun JX, Xu HM, Wang ZN. Does the prognosis of colorectal mucinous carcinoma depend upon the primary tumour site? Results from two independent databases. *Histopathology*. 2013;63(5):603-15.
34. Akkoca AN, Yanik S, Ozdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG, Cam A, Ozer C. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2014;7(9):2828-35.
35. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2007;50(1):151-62.
36. Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. *Oncotarget*. 2010;1(7):651-61.
37. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, El Zimaity H, Flejou JF, Hansen TP, Hartmann A, Kakar S, Langner C, Nagtegaal I, Puppa G, Riddell R, Ristimaki A, Sheahan K, Smyrk T, Sugihara K, Terris B, Ueno H, Vieth M, Zlobec I, Quirke P. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol*. 2017;30(9):1299-311.
38. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.

39. Grady WM. Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer. *Biochemical Society transactions*. 2005;33(Pt 4):684-8.
40. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
41. Muller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2016;469(2):125-34.
42. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2059-72.
43. Miyaki M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Enomoto M, Igari T, Tanaka K, Muraoka M, Takahashi H, Amada Y, Fukayama M. Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer research*. 1994;54(11):3011-20.
44. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 1992;359(6392):235-7.
45. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer research*. 1998;58(6):1130-4.
46. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(6):459-65.
47. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer research*. 2012;72(10):2457-67.
48. Tian S, Simon I, Moreno V, Roepman P, Tabernero J, Snel M, van't Veer L, Salazar R, Bernards R, Capella G. A combined oncogenic pathway signature of BRAF, KRAS and PI3KCA mutation improves colorectal cancer classification and cetuximab treatment prediction. *Gut*. 2013;62(4):540-9.
49. Menendez D, Inga A, Resnick MA. The expanding universe of p53 targets. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(10):724-37.

50. Beroud C, Soussi T. The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. *Human mutation*. 2003;21(3):176-81.
51. Riggins GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E, Weinstein CL, Kern SE, Hamilton SR, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Mad-related genes in the human. *Nature genetics*. 1996;13(3):347-9.
52. Hahn SA, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Schutte M, Rozenblum E, Seymour AB, Weinstein CL, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Homozygous deletion map at 18q21.1 in pancreatic cancer. *Cancer research*. 1996;56(3):490-4.
53. Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T, Mori T. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene*. 1999;18(20):3098-103.
54. Koyama M, Ito M, Nagai H, Emi M, Moriyama Y. Inactivation of both alleles of the DPC4/SMAD4 gene in advanced colorectal cancers: identification of seven novel somatic mutations in tumors from Japanese patients. *Mutation research*. 1999;406(2-4):71-7.
55. Maitra A, Molberg K, Albores-Saavedra J, Lindberg G. Loss of Dpc4 expression in colonic adenocarcinomas correlates with the presence of metastatic disease. *The American journal of pathology*. 2000;157(4):1105-11.
56. Lin EI, Tseng LH, Gocke CD, Reil S, Le DT, Azad NS, Eshleman JR. Mutational profiling of colorectal cancers with microsatellite instability. *Oncotarget*. 2015;6(39):42334-44.
57. Caliman LP, Tavares RL, Piedade JB, AC DEA, K DEJDDC, Braga LD, Silva LM, AL DASF. Evaluation of microsatellite instability in women with epithelial ovarian cancer. *Oncology letters*. 2012;4(3):556-60.
58. Loeb LA, Springgate CF, Battula N. Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. *Cancer research*. 1974;34(9):2311-21.
59. Loeb LA. Human Cancers Express a Mutator Phenotype: Hypothesis, Origin, and Consequences. *Cancer research*. 2016;76(8):2057-9.

60. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Loda M, Fuchs CS. CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer: possible associations with male sex and KRAS mutations. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2006;8(5):582-8.
61. Molinari C, Marisi G, Passardi A, Matteucci L, De Maio G, Ulivi P. Heterogeneity in Colorectal Cancer: A Challenge for Personalized Medicine? *International journal of molecular sciences*. 2018;19(12).
62. Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, Cabrera BL, Goel A, Arnold CA, Miyai K, Boland CR. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2004;126(2):394-401.
63. Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular ecology*. 2002;11(12):2453-65.
64. Buerger H, Gebhardt F, Schmidt H, Beckmann A, Hutmacher K, Simon R, Lelle R, Boecker W, Brandt B. Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of egfr is related to cytogenetic alterations and epithelial growth factor receptor expression. *Cancer research*. 2000;60(4):854-7.
65. Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, Maitra A, Cusatis G, Iacobuzio-Donahue C, Baker SD, Ashfaq R, Takimoto C, Forastiere A, Hidalgo M. An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer research*. 2004;64(24):9139-43.
66. Marinovic S, Vukovic K, Skrtic A, Poljak M, Petek S, Petek L, Kapitanovic S. Epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Oncology letters*. 2021;21(2):131.
67. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews Genetics*. 2004;5(6):435-45.
68. Kim TM, Laird PW, Park PJ. The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. *Cell*. 2013;155(4):858-68.

69. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*. 1995;268(5215):1336-8.
70. Mori Y, Yin J, Rashid A, Leggett BA, Young J, Simms L, Kuehl PM, Langenberg P, Meltzer SJ, Stine OC. Instabilotyping: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer research*. 2001;61(16):6046-9.
71. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature genetics*. 2001;29(2):117-29.
72. Fernandez-Peralta AM, Nejda N, Oliart S, Medina V, Azcoita MM, Gonzalez-Aguilera JJ. Significance of mutations in TGFBR2 and BAX in neoplastic progression and patient outcome in sporadic colorectal tumors with high-frequency microsatellite instability. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2005;157(1):18-24.
73. Ionov Y, Yamamoto H, Krajewski S, Reed JC, Perucho M. Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(20):10872-7.
74. Carethers JM, Pham TT. Mutations of transforming growth factor beta 1 type II receptor, BAX, and insulin-like growth factor II receptor genes in microsatellite unstable cell lines. *In vivo*. 2000;14(1):13-20.
75. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet*. 2012;49(3):151-7.
76. Fukui K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J Nucleic Acids*. 2010;2010.
77. Jiricny J. Postreplicative mismatch repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(4):a012633.

78. Junop MS, Obmolova G, Rausch K, Hsieh P, Yang W. Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair. *Molecular cell*. 2001;7(1):1-12.
79. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell research*. 2008;18(1):85-98.
80. Pecina-Slaus N, Kafka A, Salamon I, Bukovac A. Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. *Front Mol Biosci*. 2020;7:122.
81. Groothuizen FS, Winkler I, Cristovao M, Fish A, Winterwerp HH, Reumer A, Marx AD, Hermans N, Nicholls RA, Murshudov GN, Lebbink JH, Friedhoff P, Sixma TK. MutS/MutL crystal structure reveals that the MutS sliding clamp loads MutL onto DNA. *eLife*. 2015;4:e06744.
82. Umar A, Buermeyer AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM, Kunkel TA. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell*. 1996;87(1):65-73.
83. van Oers JM, Roa S, Werling U, Liu Y, Genschel J, Hou H, Jr., Sellers RS, Modrich P, Scharff MD, Edelmann W. PMS2 endonuclease activity has distinct biological functions and is essential for genome maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(30):13384-9.
84. Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell*. 2006;126(2):297-308.
85. Kadyrov FA, Holmes SF, Arana ME, Lukianova OA, O'Donnell M, Kunkel TA, Modrich P. *Saccharomyces cerevisiae* MutLalpha is a mismatch repair endonuclease. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(51):37181-90.
86. Tishkoff DX, Amin NS, Viars CS, Arden KC, Kolodner RD. Identification of a human gene encoding a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, an exonuclease implicated in mismatch repair and recombination. *Cancer research*. 1998;58(22):5027-31.
87. Randrian V, Evrard C, Tougeron D. Microsatellite Instability in Colorectal Cancers: Carcinogenesis, Neo-Antigens, Immuno-Resistance and Emerging Therapies. *Cancers*. 2021;13(12).

88. Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P. Hypermutable and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell*. 1993;75(6):1227-36.
89. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet*. 2009;76(1):1-18.
90. Li K, Luo H, Huang L, Zhu X. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer cell international*. 2020;20:16.
91. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(12):6870-5.
92. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(15):8698-702.
93. Duraturo F, Liccardo R, De Rosa M, Izzo P. Genetics, diagnosis and treatment of Lynch syndrome: Old lessons and current challenges. *Oncology letters*. 2019;17(3):3048-54.
94. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073-87 e3.
95. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993;260(5109):816-9.
96. Greenson JK, Huang SC, Herron C, Moreno V, Bonner JD, Tomsho LP, Ben-Izhak O, Cohen HI, Trougouboff P, Bejhar J, Sova Y, Pinchev M, Rennert G, Gruber SB. Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. *The American journal of surgical pathology*. 2009;33(1):126-33.

97. Vayrynen JP, Sajanti SA, Klintrup K, Makela J, Herzig KH, Karttunen TJ, Tuomisto A, Makinen MJ. Characteristics and significance of colorectal cancer associated lymphoid reaction. *International journal of cancer*. 2014;134(9):2126-35.
98. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2000;342(2):69-77.
99. Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, Hawkins N. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut*. 2001;48(6):821-9.
100. Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, George J, Goldblatt J, Walpole I, Robin SA, Borten MM, Stitz R, Searle J, McKeone D, Fraser L, Purdie DR, Podger K, Price R, Buttenshaw R, Walsh MD, Barker M, Leggett BA, Jass JR. Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *The American journal of pathology*. 2001;159(6):2107-16.
101. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, Truta B, Sleisenger MH, Kim YS. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(1 Pt 1):191-5.
102. McGivern A, Wynter CV, Whitehall VL, Kambara T, Spring KJ, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, Simms LA, Leggett BA, Young J, Jass JR. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Familial cancer*. 2004;3(2):101-7.
103. Roudko V, Bozkus CC, Orfanelli T, McClain CB, Carr C, O'Donnell T, Chakraborty L, Samstein R, Huang KL, Blank SV, Greenbaum B, Bhardwaj N. Shared Immunogenic Poly-Epitope Frameshift Mutations in Microsatellite Unstable Tumors. *Cell*. 2020;183(6):1634-49 e17.
104. Willis JA, Reyes-Uribe L, Chang K, Lipkin SM, Vilar E. Immune Activation in Mismatch Repair-Deficient Carcinogenesis: More Than Just Mutational Rate. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2020;26(1):11-7.

105. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, Lynch HT. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer*. 2001;91(12):2417-22.
106. Badalamenti G, Fanale D, Incorvaia L, Barraco N, Listi A, Maragliano R, Vincenzi B, Calo V, Iovanna JL, Bazan V, Russo A. Role of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with solid tumors: Can a drop dig a stone? *Cellular immunology*. 2019;343:103753.
107. Maby P, Tougeron D, Hamieh M, Mlecnik B, Kora H, Bindea G, Angell HK, Fredriksen T, Elie N, Fauquembergue E, Drouet A, Leprince J, Benichou J, Mauillon J, Le Pessot F, Sesboue R, Tuech JJ, Sabourin JC, Michel P, Frebourg T, Galon J, Latouche JB. Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer research*. 2015;75(17):3446-55.
108. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Maby P, Angelova M, Tougeron D, Church SE, Lafontaine L, Fischer M, Fredriksen T, Sasso M, Bilocq AM, Kirilovsky A, Obenauf AC, Hamieh M, Berger A, Bruneval P, Tuech JJ, Sabourin JC, Le Pessot F, Mauillon J, Rafii A, Laurent-Puig P, Speicher MR, Trajanoski Z, Michel P, Sesboue R, Frebourg T, Pages F, Valge-Archer V, Latouche JB, Galon J. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity*. 2016;44(3):698-711.
109. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(25):2654-66.
110. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):298-306.
111. Carethers JM, Chauhan DP, Fink D, Nebel S, Bresalier RS, Howell SB, Boland CR. Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology*. 1999;117(1):123-31.
112. Jo WS, Carethers JM. Chemotherapeutic implications in microsatellite unstable colorectal cancer. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2006;2(1-2):51-60.

113. Droeser RA, Hirt C, Viehl CT, Frey DM, Nebiker C, Huber X, Zlobec I, Eppenberger-Castori S, Tzankov A, Rosso R, Zuber M, Muraro MG, Amicarella F, Cremonesi E, Heberer M, Iezzi G, Lugli A, Terracciano L, Sconocchia G, Oertli D, Spagnoli GC, Tornillo L. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *European journal of cancer*. 2013;49(9):2233-42.
114. Rosenbaum MW, Bledsoe JR, Morales-Oyarvide V, Huynh TG, Mino-Kenudson M. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2016;29(9):1104-12.
115. Cui G. The Mechanisms Leading to Distinct Responses to PD-1/PD-L1 Blockades in Colorectal Cancers With Different MSI Statuses. *Frontiers in oncology*. 2021;11:573547.
116. Yaghoubi N, Soltani A, Ghazvini K, Hassanian SM, Hashemy SI. PD-1/ PD-L1 blockade as a novel treatment for colorectal cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2019;110:312-8.
117. Cercek A, Lumish M, Sinopoli J, Weiss J, Shia J, Lamendola-Essel M, El Dika IH, Segal N, Shcherba M, Sugarman R, Stadler Z, Yaeger R, Smith JJ, Rousseau B, Argiles G, Patel M, Desai A, Saltz LB, Widmar M, Iyer K, Zhang J, Gianino N, Crane C, Romesser PB, Pappou EP, Paty P, Garcia-Aguilar J, Gonen M, Gollub M, Weiser MR, Schalper KA, Diaz LA, Jr. PD-1 Blockade in Mismatch Repair-Deficient, Locally Advanced Rectal Cancer. *The New England journal of medicine*. 2022;386(25):2363-76.
118. Wright CM, Dent OF, Newland RC, Barker M, Chapuis PH, Bokey EL, Young JP, Leggett BA, Jass JR, Macdonald GA. Low level microsatellite instability may be associated with reduced cancer specific survival in sporadic stage C colorectal carcinoma. *Gut*. 2005;54(1):103-8.
119. Mori Y, Selaru FM, Sato F, Yin J, Simms LA, Xu Y, Olaru A, Deacu E, Wang S, Taylor JM, Young J, Leggett B, Jass JR, Abraham JM, Shibata D, Meltzer SJ. The impact of microsatellite instability on the molecular phenotype of colorectal tumors. *Cancer research*. 2003;63(15):4577-82.

120. Hile SE, Shabashev S, Eckert KA. Tumor-specific microsatellite instability: do distinct mechanisms underlie the MSI-L and EMASST phenotypes? *Mutation research*. 2013;743-744:67-77.
121. Lee SY, Kim DW, Lee HS, Ihn MH, Oh HK, Min BS, Kim WR, Huh JW, Yun JA, Lee KY, Kim NK, Lee WY, Kim HC, Kang SB. Low-Level Microsatellite Instability as a Potential Prognostic Factor in Sporadic Colorectal Cancer. *Medicine*. 2015;94(50):e2260.
122. Halling KC, French AJ, McDonnell SK, Burgart LJ, Schaid DJ, Peterson BJ, Moon-Tasson L, Mahoney MR, Sargent DJ, O'Connell MJ, Witzig TE, Farr GH, Jr., Goldberg RM, Thibodeau SN. Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(15):1295-303.
123. Temam S, Casiraghi O, Lahaye JB, Bosq J, Zhou X, Julieron M, Mamelle G, Lee JJ, Mao L, Luboinski B, Benard J, Janot F. Tetranucleotide microsatellite instability in surgical margins for prediction of local recurrence of head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(12 Pt 1):4022-8.
124. Choi YD, Choi J, Kim JH, Lee JS, Lee JH, Choi C, Choi HS, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Nam JH. Microsatellite instability at a tetranucleotide repeat in type I endometrial carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2008;27:88.
125. Singer G, Kallinowski T, Hartmann A, Dietmaier W, Wild PJ, Schraml P, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. Different types of microsatellite instability in ovarian carcinoma. *International journal of cancer*. 2004;112(4):643-6.
126. Burger M, Denzinger S, Hammerschmied CG, Tannapfel A, Obermann EC, Wieland WF, Hartmann A, Stoehr R. Elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides (EMASST) and mismatch repair gene expression in prostate cancer. *Journal of molecular medicine*. 2006;84(10):833-41.
127. Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, Yang SC, Eisenberger CF, Esteller M, Herman JG, Wu L, Decker PA, Jen J, Sidransky D. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(4):332-9.

128. Xu L, Chow J, Bonacum J, Eisenberger C, Ahrendt SA, Spafford M, Wu L, Lee SM, Piantadosi S, Tockman MS, Sidransky D, Jen J. Microsatellite instability at AAAG repeat sequences in respiratory tract cancers. *International journal of cancer*. 2001;91(2):200-4.
129. Haugen AC, Goel A, Yamada K, Marra G, Nguyen TP, Nagasaka T, Kanazawa S, Koike J, Kikuchi Y, Zhong X, Arita M, Shibuya K, Oshimura M, Hemmi H, Boland CR, Koi M. Genetic instability caused by loss of MutS homologue 3 in human colorectal cancer. *Cancer research*. 2008;68(20):8465-72.
130. Watson MM, Berg M, Soreide K. Prevalence and implications of elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides in cancer. *British journal of cancer*. 2014;111(5):823-7.
131. Carethers JM, Koi M, Tseng-Rogenski SS. E-MAST is a Form of Microsatellite Instability That is Initiated by Inflammation and Modulates Colorectal Cancer Progression. *Genes*. 2015;6(2):185-205.
132. Venderbosch S, van Lent-van Vliet S, de Haan AF, Ligtenberg MJ, Goossens M, Punt CJ, Koopman M, Nagtegaal ID. E-MAST is associated with a poor prognosis in microsatellite unstable metastatic colorectal cancer. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124538.
133. Devaraj B, Lee A, Cabrera BL, Miyai K, Luo L, Ramamoorthy S, Keku T, Sandler RS, McGuire KL, Carethers JM. Relationship of E-MAST and microsatellite instability among patients with rectal cancer. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2010;14(10):1521-8.
134. Lee SY, Chung H, Devaraj B, Iwaizumi M, Han HS, Hwang DY, Seong MK, Jung BH, Carethers JM. Microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats are associated with morphologies of colorectal neoplasias. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1519-25.
135. Torshizi Esfahani A, Seyedna SY, Nazemalhosseini Mojarad E, Majd A, Asadzadeh Aghdaei H. MSI-L/E-MAST is a predictive biomarker for metastasis in colorectal cancer patients. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(8):13128-36.

136. Garcia M, Choi C, Kim HR, Daoud Y, Toiyama Y, Takahashi M, Goel A, Boland CR, Koi M. Association between recurrent metastasis from stage II and III primary colorectal tumors and moderate microsatellite instability. *Gastroenterology*. 2012;143(1):48-50 e1.
137. Ahrendt SA, Decker PA, Doffek K, Wang B, Xu L, Demeure MJ, Jen J, Sidransky D. Microsatellite instability at selected tetranucleotide repeats is associated with p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2000;60(9):2488-91.
138. Danaee H, Nelson HH, Karagas MR, Schned AR, Ashok TD, Hirao T, Perry AE, Kelsey KT. Microsatellite instability at tetranucleotide repeats in skin and bladder cancer. *Oncogene*. 2002;21(32):4894-9.
139. Chen MH, Chang SC, Lin PC, Yang SH, Lin CC, Lan YT, Lin HH, Lin CH, Lai JI, Liang WY, Lu ML, Yang MH, Chao Y. Combined Microsatellite Instability and Elevated Microsatellite Alterations at Selected Tetranucleotide Repeats (EMAST) Might Be a More Promising Immune Biomarker in Colorectal Cancer. *The oncologist*. 2019;24(12):1534-42.
140. Li J, Koike J, Kugoh H, Arita M, Ohhira T, Kikuchi Y, Funahashi K, Takamatsu K, Boland CR, Koi M, Hemmi H. Down-regulation of MutS homolog 3 by hypoxia in human colorectal cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1823(4):889-99.
141. Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, Erozan YS, Merlo A, Schwab D, Sidransky D. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science*. 1996;271(5249):659-62.
142. Yamada K, Kanazawa S, Koike J, Sugiyama H, Xu C, Funahashi K, Boland CR, Koi M, Hemmi H. Microsatellite instability at tetranucleotide repeats in sporadic colorectal cancer in Japan. *Oncology reports*. 2010;23(2):551-61.
143. Campregher C, Schmid G, Ferik F, Knasmuller S, Khare V, Kortum B, Dammann K, Lang M, Scharl T, Spittler A, Roig AI, Shay JW, Gerner C, Gasche C. MSH3-deficiency initiates EMAST without oncogenic transformation of human colon epithelial cells. *PloS one*. 2012;7(11):e50541.

144. Mohammadpour S, Torshizi Esfahani A, Karimpour R, Bakhshian F, Mortazavi Tabatabaei SA, Laleh A, Nazemalhosseini-Mojarad E. High expression of Snail1 is associated with EMAST and poor prognosis in CRC patients. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*. 2019;12(Suppl1):S30-S6.
145. Lee SY, Miyai K, Han HS, Hwang DY, Seong MK, Chung H, Jung BH, Devaraj B, McGuire KL, Carethers JM. Microsatellite instability, EMAST, and morphology associations with T cell infiltration in colorectal neoplasia. *Digestive diseases and sciences*. 2012;57(1):72-8.
146. Munakata K, Koi M, Kitajima T, Tseng-Rogenski S, Uemura M, Matsuno H, Kawai K, Sekido Y, Mizushima T, Toiyama Y, Yamada T, Mano M, Mita E, Kusunoki M, Mori M, Carethers JM. Inflammation-Associated Microsatellite Alterations Caused by MSH3 Dysfunction Are Prevalent in Ulcerative Colitis and Increase With Neoplastic Advancement. *Clinical and translational gastroenterology*. 2019;10(12):e00105.
147. Chang CL, Marra G, Chauhan DP, Ha HT, Chang DK, Ricciardiello L, Randolph A, Carethers JM, Boland CR. Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *American journal of physiology Cell physiology*. 2002;283(1):C148-54.
148. Rodriguez-Jimenez FJ, Moreno-Manzano V, Lucas-Dominguez R, Sanchez-Puelles JM. Hypoxia causes downregulation of mismatch repair system and genomic instability in stem cells. *Stem cells*. 2008;26(8):2052-62.
149. Lu Y, Wajapeyee N, Turker MS, Glazer PM. Silencing of the DNA mismatch repair gene MLH1 induced by hypoxic stress in a pathway dependent on the histone demethylase LSD1. *Cell reports*. 2014;8(2):501-13.
150. Tseng-Rogenski SS, Hamaya Y, Choi DY, Carethers JM. Interleukin 6 alters localization of hMSH3, leading to DNA mismatch repair defects in colorectal cancer cells. *Gastroenterology*. 2015;148(3):579-89.
151. Greten FR, Grivnickov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*. 2019;51(1):27-41.

152. Schafer M, Werner S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(8):628-38.
153. Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nature reviews Immunology*. 2021;21(10):653-67.
154. Li J, Chen D, Shen M. Tumor Microenvironment Shapes Colorectal Cancer Progression, Metastasis, and Treatment Responses. *Frontiers in medicine*. 2022;9:869010.
155. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, Vecchiato N, Macri E, Fornasarig M, Boiocchi M. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *The American journal of pathology*. 1999;154(6):1805-13.
156. Dai Y, Zhao W, Yue L, Dai X, Rong D, Wu F, Gu J, Qian X. Perspectives on Immunotherapy of Metastatic Colorectal Cancer. *Frontiers in oncology*. 2021;11:659964.
157. Liao W, Overman MJ, Boutin AT, Shang X, Zhao D, Dey P, Li J, Wang G, Lan Z, Tang M, Jiang S, Ma X, Chen P, Katkhuda R, Korphaisarn K, Chakravarti D, Chang A, Spring DJ, Chang Q, Zhang J, Maru DM, Maeda DY, Zebala JA, Kopetz S, Wang YA, DePinho RA. KRAS-IRF2 Axis Drives Immune Suppression and Immune Therapy Resistance in Colorectal Cancer. *Cancer Cell*. 2019;35(4):559-72 e7.
158. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in immunology*. 2016;37(3):208-20.
159. Guo L, Wang C, Qiu X, Pu X, Chang P. Colorectal Cancer Immune Infiltrates: Significance in Patient Prognosis and Immunotherapeutic Efficacy. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1052.
160. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
161. Lakatos PL, Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(25):3937-47.

162. Simin J, Fornes R, Liu Q, Olsen RS, Callens S, Engstrand L, Brusselaers N. Antibiotic use and risk of colorectal cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis. *British journal of cancer*. 2020;123(12):1825-32.
163. Butto LF, Haller D. Dysbiosis in intestinal inflammation: Cause or consequence. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2016;306(5):302-9.
164. Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer metastasis reviews*. 2010;29(2):273-83.
165. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell host & microbe*. 2013;14(2):195-206.
166. Wang X, Huycke MM. Colorectal cancer: role of commensal bacteria and bystander effects. *Gut microbes*. 2015;6(6):370-6.
167. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(5):313-23.
168. Okumura R, Takeda K. Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers. *Inflammation and regeneration*. 2018;38:5.
169. Fukata M, Arditi M. The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal immunology*. 2013;6(3):451-63.
170. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(5):373-84.
171. Regan T, Nally K, Carmody R, Houston A, Shanahan F, Macsharry J, Brint E. Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. *J Immunol*. 2013;191(12):6084-92.
172. Lee SM, Kok KH, Jaume M, Cheung TK, Yip TF, Lai JC, Guan Y, Webster RG, Jin DY, Peiris JS. Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(10):3793-8.

173. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*. 2013;38(2):209-23.
174. Burgueno JF, Abreu MT. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2020;17(5):263-78.
175. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 1998;281(5383):1680-3.
176. Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, Xu R, Inoue H, Arditi M, Dannenberg AJ, Abreu MT. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*. 2006;131(3):862-77.
177. Brandl K, Sun L, Nepl C, Siggs OM, Le Gall SM, Tomisato W, Li X, Du X, Maennel DN, Blobel CP, Beutler B. MyD88 signaling in nonhematopoietic cells protects mice against induced colitis by regulating specific EGF receptor ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(46):19967-72.
178. Hsu D, Fukata M, Hernandez YG, Sotolongo JP, Goo T, Maki J, Hayes LA, Ungaro RC, Chen A, Breglio KJ, Xu R, Abreu MT. Toll-like receptor 4 differentially regulates epidermal growth factor-related growth factors in response to intestinal mucosal injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2010;90(9):1295-305.
179. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science*. 2007;317(5834):124-7.
180. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual review of immunology*. 2000;18:621-63.
181. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-7.
182. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*. 2021;6(1):291.

183. Mita Y, Dobashi K, Endou K, Kawata T, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M. Toll-like receptor 4 surface expression on human monocytes and B cells is modulated by IL-2 and IL-4. *Immunology letters*. 2002;81(1):71-5.
184. Ganley-Leal LM, Liang Y, Jagannathan-Bogdan M, Farraye FA, Nikolajczyk BS. Differential regulation of TLR4 expression in human B cells and monocytes. *Molecular immunology*. 2010;48(1-3):82-8.
185. Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *Am J Pathol*. 2013;182(2):375-87.
186. Kim JI, Lee CJ, Jin MS, Lee CH, Paik SG, Lee H, Lee JO. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. *J Biol Chem*. 2005;280(12):11347-51.
187. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & molecular medicine*. 2013;45:e66.
188. Kelley SL, Lukk T, Nair SK, Tapping RI. The crystal structure of human soluble CD14 reveals a bent solenoid with a hydrophobic amino-terminal pocket. *Journal of immunology*. 2013;190(3):1304-11.
189. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511.
190. O'Neill LA, Dunne A, Edjeback M, Gray P, Jefferies C, Wietek C. Mal and MyD88: adapter proteins involved in signal transduction by Toll-like receptors. *Journal of endotoxin research*. 2003;9(1):55-9.
191. Takaesu G, Surabhi RM, Park KJ, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Gaynor RB. TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *Journal of molecular biology*. 2003;326(1):105-15.
192. Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, Granucci F, Kagan JC. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell*. 2011;147(4):868-80.

193. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003;301(5633):640-3.
194. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004;118(3):285-96.
195. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(2):131-44.
196. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2005;129(1):50-65.
197. Takahashi K, Sugi Y, Hosono A, Kaminogawa S. Epigenetic regulation of TLR4 gene expression in intestinal epithelial cells for the maintenance of intestinal homeostasis. *Journal of immunology*. 2009;183(10):6522-9.
198. Takahashi K, Sugi Y, Nakano K, Tsuda M, Kurihara K, Hosono A, Kaminogawa S. Epigenetic control of the host gene by commensal bacteria in large intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(41):35755-62.
199. Price AE, Shamardani K, Lugo KA, Deguine J, Roberts AW, Lee BL, Barton GM. A Map of Toll-like Receptor Expression in the Intestinal Epithelium Reveals Distinct Spatial, Cell Type-Specific, and Temporal Patterns. *Immunity*. 2018;49(3):560-75 e6.
200. Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *Journal of immunology*. 2001;167(3):1609-16.
201. Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Kawashima K, Ishimura N, Kazumori H, Udagawa J, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *Journal of immunology*. 2003;170(8):3977-85.

202. Gaudino SJ, Kumar P. Cross-Talk Between Antigen Presenting Cells and T Cells Impacts Intestinal Homeostasis, Bacterial Infections, and Tumorigenesis. *Frontiers in immunology*. 2019;10:360.
203. Pandolfi F, Altamura S, Frosali S, Conti P. Key Role of DAMP in Inflammation, Cancer, and Tissue Repair. *Clinical therapeutics*. 2016;38(5):1017-28.
204. Fukata M, Michelsen KS, Eri R, Thomas LS, Hu B, Lukasek K, Nast CC, Lechago J, Xu R, Naiki Y, Soliman A, Arditi M, Abreu MT. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2005;288(5):G1055-65.
205. Jang GY, Lee JW, Kim YS, Lee SE, Han HD, Hong KJ, Kang TH, Park YM. Interactions between tumor-derived proteins and Toll-like receptors. *Experimental & molecular medicine*. 2020;52(12):1926-35.
206. Yu L, Chen S. Toll-like receptors expressed in tumor cells: targets for therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(9):1271-8.
207. Stenson WF, Ciorba MA. Nonmicrobial Activation of TLRs Controls Intestinal Growth, Wound Repair, and Radioprotection. *Frontiers in immunology*. 2020;11:617510.
208. Liu A, Gong P, Hyun SW, Wang KZ, Cates EA, Perkins D, Bannerman DD, Puche AC, Toshchakov VY, Fang S, Auron PE, Vogel SN, Goldblum SE. TRAF6 protein couples Toll-like receptor 4 signaling to Src family kinase activation and opening of paracellular pathway in human lung microvascular endothelia. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(20):16132-45.
209. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of pathology*. 2013;229(2):176-85.
210. Schneeman TA, Bruno ME, Schjerven H, Johansen FE, Chady L, Kaetzel CS. Regulation of the polymeric Ig receptor by signaling through TLRs 3 and 4: linking innate and adaptive immune responses. *Journal of immunology*. 2005;175(1):376-84.
211. Shang L, Fukata M, Thirunarayanan N, Martin AP, Arnaboldi P, Maussang D, Berin C, Unkeless JC, Mayer L, Abreu MT, Lira SA. Toll-like receptor signaling in small intestinal

epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. *Gastroenterology*. 2008;15(2):529-38.

212. Kim KH, Jo MS, Suh DS, Yoon MS, Shin DH, Lee JH, Choi KU. Expression and significance of the TLR4/MyD88 signaling pathway in ovarian epithelial cancers. *World journal of surgical oncology*. 2012;10:193.

213. Yuan X, Zhou Y, Wang W, Li J, Xie G, Zhao Y, Xu D, Shen L. Activation of TLR4 signaling promotes gastric cancer progression by inducing mitochondrial ROS production. *Cell Death Dis*. 2013;4:e794.

214. Zhang JJ, Wu HS, Wang L, Tian Y, Zhang JH, Wu HL. Expression and significance of TLR4 and HIF-1alpha in pancreatic ductal adenocarcinoma. *World journal of gastroenterology*. 2010;16(23):2881-8.

215. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*. 2000;68(12):7010-7.

216. Fukata M, Shang L, Santaolalla R, Sotolongo J, Pastorini C, Espana C, Ungaro R, Harpaz N, Cooper HS, Elson G, Kosco-Vilbois M, Zaias J, Perez MT, Mayer L, Vamadevan AS, Lira SA, Abreu MT. Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(7):1464-73.

217. Pastille E, Fassnacht T, Adamczyk A, Ngo Thi Phuong N, Buer J, Westendorf AM. Inhibition of TLR4 Signaling Impedes Tumor Growth in Colitis-Associated Colon Cancer. *Frontiers in immunology*. 2021;12:669747.

218. Beilmann-Lehtonen I, Bockelman C, Mustonen H, Koskensalo S, Hagstrom J, Haglund C. The prognostic role of tissue TLR2 and TLR4 in colorectal cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2020;477(5):705-15.

219. Chung YH, Kim D. Enhanced TLR4 Expression on Colon Cancer Cells After Chemotherapy Promotes Cell Survival and Epithelial-Mesenchymal Transition Through Phosphorylation of GSK3beta. *Anticancer Res.* 2016;36(7):3383-94.
220. Hao B, Chen Z, Bi B, Yu M, Yao S, Feng Y, Yu Y, Pan L, Di D, Luo G, Zhang X. Role of TLR4 as a prognostic factor for survival in various cancers: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2018;9(16):13088-99.
221. Sussman DA, Santaolalla R, Bejarano PA, Garcia-Buitrago MT, Perez MT, Abreu MT, Clarke J. In silico and Ex vivo approaches identify a role for toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR.* 2014;33:45.
222. Wang EL, Qian ZR, Nakasono M, Tanahashi T, Yoshimoto K, Bando Y, Kudo E, Shimada M, Sano T. High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *British journal of cancer.* 2010;102(5):908-15.
223. Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, Cohen J, Breglio K, Krishnareddy S, Hsu D, Xu R, Harpaz N, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K, Cooper HS, Itzkowitz SH, Abreu MT. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology.* 2007;133(6):1869-81.
224. Santaolalla R, Sussman DA, Ruiz JR, Davies JM, Pastorini C, Espana CL, Sotolongo J, Burlingame O, Bejarano PA, Philip S, Ahmed MM, Ko J, Dirisina R, Barrett TA, Shang L, Lira SA, Fukata M, Abreu MT. TLR4 activates the beta-catenin pathway to cause intestinal neoplasia. *PLoS One.* 2013;8(5):e63298.
225. Tang X, Zhu Y. TLR4 signaling promotes immune escape of human colon cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Oncology research.* 2012;20(1):15-24.
226. Shi YJ, Zhao QQ, Liu XS, Dong SH, E JF, Li X, Liu C, Wang H. Toll-like receptor 4 regulates spontaneous intestinal tumorigenesis by up-regulating IL-6 and GM-CSF. *J Cell Mol Med.* 2020;24(1):385-97.

227. Kashani B, Zandi Z, Pourbagheri-Sigaroodi A, Bashash D, Ghaffari SH. The role of toll-like receptor 4 (TLR4) in cancer progression: A possible therapeutic target? *Journal of cellular physiology*. 2021;236(6):4121-37.
228. Li J, Yang F, Wei F, Ren X. The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment. *Oncotarget*. 2017;8(39):66656-67.
229. Soler AP, Miller RD, Laughlin KV, Carp NZ, Klurfeld DM, Mullin JM. Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis*. 1999;20(8):1425-31.
230. Su L, Shen L, Clayburgh DR, Nalle SC, Sullivan EA, Meddings JB, Abraham C, Turner JR. Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology*. 2009;136(2):551-63.
231. Nighot M, Al-Sadi R, Guo S, Rawat M, Nighot P, Watterson MD, Ma TY. Lipopolysaccharide-Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Permeability Is Mediated by Toll-Like Receptor 4/Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MyD88) Activation of Myosin Light Chain Kinase Expression. *The American journal of pathology*. 2017;187(12):2698-710.
232. Chen T, Li Q, Wu J, Wu Y, Peng W, Li H, Wang J, Tang X, Peng Y, Fu X. *Fusobacterium nucleatum* promotes M2 polarization of macrophages in the microenvironment of colorectal tumours via a TLR4-dependent mechanism. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2018;67(10):1635-46.
233. Chen Y, Peng Y, Yu J, Chen T, Wu Y, Shi L, Li Q, Wu J, Fu X. Invasive *Fusobacterium nucleatum* activates beta-catenin signaling in colorectal cancer via a TLR4/P-PAK1 cascade. *Oncotarget*. 2017;8(19):31802-14.
234. Yang Y, Weng W, Peng J, Hong L, Yang L, Toiyama Y, Gao R, Liu M, Yin M, Pan C, Li H, Guo B, Zhu Q, Wei Q, Moyer MP, Wang P, Cai S, Goel A, Qin H, Ma Y. *Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor-kappaB, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology*. 2017;152(4):851-66 e24.

235. Naidoo N, Pawitan Y, Soong R, Cooper DN, Ku CS. Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome. *Human genomics*. 2011;5(6):577-622.
236. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65.
237. Zhang Y, Liu J, Wang C, Lu W. Toll-Like Receptors Gene Polymorphisms in Autoimmune Disease. *Front Immunol*. 2021;12:672346.
238. Ohto U, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K, Shimizu T. Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. *J Biol Chem*. 2012;287(48):40611-7.
239. Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, van der Ven AJ, Van der Meer JW, Netea MG. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. *Molecular medicine*. 2008;14(5-6):346-52.
240. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature genetics*. 2000;25(2):187-91.
241. Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, Syafruddin D, Kibiki G, Cristea T, Hijmans A, Hamann L, Israel S, ElGhazali G, Troye-Blomberg M, Kumpf O, Maiga B, Dolo A, Doumbo O, Hermsen CC, Stalenhoef AF, van Crevel R, Brunner HG, Oh DY, Schumann RR, de la Rúa C, Sauerwein R, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW, Netea MG. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(42):16645-50.
242. Tulic MK, Hurrelbrink RJ, Prele CM, Laing IA, Upham JW, Le Souef P, Sly PD, Holt PG. TLR4 polymorphisms mediate impaired responses to respiratory syncytial virus and lipopolysaccharide. *Journal of immunology*. 2007;179(1):132-40.

243. Rallabhandi P, Bell J, Boukhvalova MS, Medvedev A, Lorenz E, Arditi M, Hemming VG, Blanco JC, Segal DM, Vogel SN. Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *Journal of immunology*. 2006;177(1):322-32.
244. Figueroa L, Xiong Y, Song C, Piao W, Vogel SN, Medvedev AE. The Asp299Gly polymorphism alters TLR4 signaling by interfering with recruitment of MyD88 and TRIF. *J Immunol*. 2012;188(9):4506-15.
245. Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers in immunology*. 2014;5:316.
246. Richard K, Piepenbrink KH, Shirey KA, Gopalakrishnan A, Nallar S, Prantner DJ, Perkins DJ, Lai W, Vlk A, Toshchakov VY, Feng C, Fanaroff R, Medvedev AE, Blanco JCG, Vogel SN. A mouse model of human TLR4 D299G/T399I SNPs reveals mechanisms of altered LPS and pathogen responses. *The Journal of experimental medicine*. 2021;218(2).
247. Schroder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *The Lancet Infectious diseases*. 2005;5(3):156-64.
248. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Deviere J, Rutgeerts P. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*. 2004;53(7):987-92.
249. Zhang K, Zhou B, Wang Y, Rao L, Zhang L. The TLR4 gene polymorphisms and susceptibility to cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2013;49(4):946-54.
250. Theodoropoulos GE, Saridakis V, Karantanos T, Michalopoulos NV, Zagouri F, Kontogianni P, Lymperi M, Gazouli M, Zografos GC. Toll-like receptors gene polymorphisms may confer increased susceptibility to breast cancer development. *Breast*. 2012;21(4):534-8.
251. Santini D, Angeletti S, Ruzzo A, Dicuonzo G, Galluzzo S, Vincenzi B, Calvieri A, Pizzagalli F, Graziano N, Ferraro E, Lorino G, Altomare A, Magnani M, Graziano F, Tonini G. Toll-like

receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in gastric cancer of intestinal and diffuse histotypes. *Clin Exp Immunol.* 2008;154(3):360-4.

252. Yang H, Pan T, Duan G, Wang Y. A cumulative meta-analysis on the association of toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with cancer risk. *Eur J Cancer.* 2016;58:130-7.

253. de Oliveira JG, Silva AE. Polymorphisms of the TLR2 and TLR4 genes are associated with risk of gastric cancer in a Brazilian population. *World J Gastroenterol.* 2012;18(11):1235-42.

254. Boraska Jelavic T, Barisic M, Drmic Hofman I, Boraska V, Vrdoljak E, Peruzovic M, Hozo I, Puljiz Z, Terzic J. Microsatellite GT polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with colorectal cancer. *Clin Genet.* 2006;70(2):156-60.

255. Pimentel-Nunes P, Teixeira AL, Pereira C, Gomes M, Brandao C, Rodrigues C, Goncalves N, Boal-Carvalho I, Roncon-Albuquerque R, Jr., Moreira-Dias L, Leite-Moreira AF, Medeiros R, Dinis-Ribeiro M. Functional polymorphisms of Toll-like receptors 2 and 4 alter the risk for colorectal carcinoma in Europeans. *Dig Liver Dis.* 2013;45(1):63-9.

256. Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez GI. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC Cancer.* 2007;7:70.

257. Yang CX, Li CY, Feng W. Toll-like receptor 4 genetic variants and prognosis of breast cancer. *Tissue Antigens.* 2013;81(4):221-6.

258. Proenca MA, de Oliveira JG, Cadamuro AC, Succi M, Netinho JG, Goloni-Bertolo EM, Pavarino EC, Silva AE. TLR2 and TLR4 polymorphisms influence mRNA and protein expression in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2015;21(25):7730-41.

259. Semlali A, Reddy Parine N, Arafah M, Mansour L, Azzi A, Al Shahrani O, Al Amri A, Shaik JP, Aljebreen AM, Alharbi O, Almadi MA, Azzam NA, Kohailan M, Rouabhia M, Alanazi MS. Expression and Polymorphism of Toll-Like Receptor 4 and Effect on NF-kappaB Mediated Inflammation in Colon Cancer Patients. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146333.

260. Goodall GJ, Wickramasinghe VO. RNA in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2021;21(1):22-36.

261. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 2007;318(5858):1931-4.
262. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509-24.
263. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007;129(7):1401-14.
264. Hou N, Guo Z, Zhao G, Jia G, Luo B, Shen X, Bai Y. Inhibition of microRNA-21-3p suppresses proliferation as well as invasion and induces apoptosis by targeting RNA-binding protein with multiple splicing through Smad4/extracellular signal-regulated protein kinase signalling pathway in human colorectal cancer HCT116 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018;45(7):729-41.
265. Balzeau J, Menezes MR, Cao S, Hagan JP. The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Front Genet*. 2017;8:31.
266. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):111-22.
267. Bautista-Sanchez D, Arriaga-Canon C, Pedroza-Torres A, De La Rosa-Velazquez IA, Gonzalez-Barrios R, Contreras-Espinosa L, Montiel-Manriquez R, Castro-Hernandez C, Fragoso-Ontiveros V, Alvarez-Gomez RM, Herrera LA. The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;20:409-20.
268. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016;1:15004.

269. Wu Y, Song Y, Xiong Y, Wang X, Xu K, Han B, Bai Y, Li L, Zhang Y, Zhou L. MicroRNA-21 (Mir-21) Promotes Cell Growth and Invasion by Repressing Tumor Suppressor PTEN in Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(3):945-58.
270. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(5):1604-9.
271. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481-6.
272. Contreras J, Rao DS. MicroRNAs in inflammation and immune responses. *Leukemia*. 2012;26(3):404-13.
273. Chae YS, Kim JG, Lee SJ, Kang BW, Lee YJ, Park JY, Jeon HS, Park JS, Choi GS. A miR-146a polymorphism (rs2910164) predicts risk of and survival from colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2013;33(8):3233-9.
274. Garo LP, Ajay AK, Fujiwara M, Gabriely G, Raheja R, Kuhn C, Kenyon B, Skillin N, Kadowaki-Saga R, Saxena S, Murugaiyan G. MicroRNA-146a limits tumorigenic inflammation in colorectal cancer. *Nat Commun*. 2021;12(1):2419.
275. Chen S, Wang L, Fan J, Ye C, Dominguez D, Zhang Y, Curiel TJ, Fang D, Kuzel TM, Zhang B. Host miR155 promotes tumor growth through a myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2015;75(3):519-31.
276. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004;432(7014):226-30.
277. Liu Y, Wang Q, Wen J, Wu Y, Man C. MiR-375: A novel multifunctional regulator. *Life Sci*. 2021;275:119323.
278. Biton M, Levin A, Slyper M, Alkalay I, Horwitz E, Mor H, Kredo-Russo S, Avnit-Sagi T, Cojocaru G, Zreik F, Bentwich Z, Poy MN, Artis D, Walker MD, Hornstein E, Pikarsky E, Ben-

Neriah Y. Epithelial microRNAs regulate gut mucosal immunity via epithelium-T cell crosstalk. *Nat Immunol.* 2011;12(3):239-46.

279. Ke QH, Chen HY, He ZL, Lv Z, Xu XF, Qian YG, Zheng SS. Silencing of microRNA-375 affects immune function in mice with liver failure by upregulating astrocyte elevated gene-1 through reducing apoptosis of Kupffer cells. *J Cell Biochem.* 2019;120(1):253-63.

280. Wei J, Lu Y, Wang R, Xu X, Liu Q, He S, Pan H, Liu X, Yuan B, Ding Y, Zhang J. MicroRNA-375: potential cancer suppressor and therapeutic drug. *Biosci Rep.* 2021;41(9).

281. He XX, Chang Y, Meng FY, Wang MY, Xie QH, Tang F, Li PY, Song YH, Lin JS. MicroRNA-375 targets AEG-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2012;31(28):3357-69.

282. Miao L, Liu K, Xie M, Xing Y, Xi T. miR-375 inhibits Helicobacter pylori-induced gastric carcinogenesis by blocking JAK2-STAT3 signaling. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(7):699-711.

283. Dai X, Chiang Y, Wang Z, Song Y, Lu C, Gao P, Xu H. Expression levels of microRNA-375 in colorectal carcinoma. *Mol Med Rep.* 2012;5(5):1299-304.

284. Xu L, Li M, Wang M, Yan D, Feng G, An G. The expression of microRNA-375 in plasma and tissue is matched in human colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2014;14:714.

285. Mao Q, Quan T, Luo B, Guo X, Liu L, Zheng Q. MiR-375 targets KLF4 and impacts the proliferation of colorectal carcinoma. *Tumour Biol.* 2016;37(1):463-71.

286. Zaharie F, Muresan MS, Petrushev B, Berce C, Gafencu GA, Selicean S, Jurj A, Cojocneanu-Petric R, Lisencu CI, Pop LA, Pileczki V, Eniu D, Muresan MA, Zaharie R, Berindan-Neagoe I, Tomuleasa C, Irimie A. Exosome-Carried microRNA-375 Inhibits Cell Progression and Dissemination via Bcl-2 Blocking in Colon Cancer. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2015;24(4):435-43.

287. Liu XH, Wang J, Dong YH. The inhibitory effect of miR-375 targeting sp1 in colorectal cancer cell proliferation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(2):405-11.

288. Wu CP, Bi YJ, Liu DM, Wang LY. Hsa-miR-375 promotes the progression of inflammatory bowel disease by upregulating TLR4. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(17):7543-9.
289. Spaventi R, Pecur L, Pavelic K, Pavelic ZP, Spaventi S, Stambrook PJ. Human Tumor Bank in Croatia - a Possible Model for a Small Bank as Part of the Future European Tumor Bank Network. *European journal of cancer.* 1994;30A(3):419-.
290. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
291. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(12):713-32.
292. Muller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2016;469(2):125-34.
293. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7(3):153-62.
294. Carethers JM, Koi M, Tseng-Rogenski SS. EMAS is a Form of Microsatellite Instability That is Initiated by Inflammation and Modulates Colorectal Cancer Progression. *Genes (Basel).* 2015;6(2):185-205.
295. Guo L, Wang C, Qiu X, Pu X, Chang P. Colorectal Cancer Immune Infiltrates: Significance in Patient Prognosis and Immunotherapeutic Efficacy. *Front Immunol.* 2020;11:1052.
296. Lu L, Dong J, Liu Y, Qian Y, Zhang G, Zhou W, Zhao A, Ji G, Xu H. New insights into natural products that target the gut microbiota: Effects on the prevention and treatment of colorectal cancer. *Front Pharmacol.* 2022;13:964793.
297. Sussman DA, Santaolalla R, Bejarano PA, Garcia-Buitrago MT, Perez MT, Abreu MT, Clarke J. In silico and Ex vivo approaches identify a role for toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33(1):45.
298. Yesudhas D, Gosu V, Anwar MA, Choi S. Multiple roles of toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Front Immunol.* 2014;5:334.

299. Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(10):653-67.
300. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, Seruca R, Iacopetta B, Hamelin R. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology.* 2002;123(6):1804-11.
301. Torshizi Esfahani A, Seyedna SY, Nazemalhosseini Mojarad E, Majd A, Asadzadeh Aghdaei H. MSI-L/EMAST is a predictive biomarker for metastasis in colorectal cancer patients. *J Cell Physiol.* 2019;234(8):13128-36.
302. Watson MM, Lea D, Rewcastle E, Hagland HR, Soreide K. Elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides in early-stage colorectal cancers with and without high-frequency microsatellite instability: same, same but different? *Cancer Med.* 2016;5(7):1580-7.
303. Lee SY, Kim DW, Lee HS, Ihn MH, Oh HK, Min BS, Kim WR, Huh JW, Yun JA, Lee KY, Kim NK, Lee WY, Kim HC, Kang SB. Low-Level Microsatellite Instability as a Potential Prognostic Factor in Sporadic Colorectal Cancer. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(50):e2260.
304. Chakraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Davison LJ, Deka R. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(3):1041-6.
305. Ashktorab H, Smoot DT, Carethers JM, Rahmanian M, Kittles R, Vosgian G, Doura M, Nidhiry E, Naab T, Momen B, Shakhani S, Giardiello FM. High incidence of microsatellite instability in colorectal cancer from African Americans. *Clin Cancer Res.* 2003;9(3):1112-7.
306. Lim SB, Jeong SY, Lee MR, Ku JL, Shin YK, Kim WH, Park JG. Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2004;19(6):533-7.
307. Moghbeli M, Moaven O, Dadkhah E, Farzadnia M, Roshan NM, Asadzadeh-Aghdaei H, Bahar MM, Raeisossadati R, Forghanifard MM, Bakhtiari SR, Baradaran A, Abbaszadegan MR. High frequency of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer patients in Iran. *Genet Mol Res.* 2011;10(4):3520-9.
308. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Sonesson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E,

De Sousa EMF, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350-6.

309. Chen MH, Chang SC, Lin PC, Yang SH, Lin CC, Lan YT, Lin HH, Lin CH, Lai JI, Liang WY, Lu ML, Yang MH, Chao Y. Combined Microsatellite Instability and Elevated Microsatellite Alterations at Selected Tetranucleotide Repeats (EMAST) Might Be a More Promising Immune Biomarker in Colorectal Cancer. *Oncologist.* 2019;24(12):1534-42.

310. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2007;318(5853):1108-13.

311. Zheng Z, Yu T, Zhao X, Gao X, Zhao Y, Liu G. Intratumor heterogeneity: A new perspective on colorectal cancer research. *Cancer Med.* 2020;9(20):7637-45.

312. Pan Q, Qin F, Yuan H, He B, Yang N, Zhang Y, Ren H, Zeng Y. Normal tissue adjacent to tumor expression profile analysis developed and validated a prognostic model based on Hippo-related genes in hepatocellular carcinoma. *Cancer Med.* 2021;10(9):3139-52.

313. Danjoux M, Guimbaud R, Al Saati T, Meggetto F, Carrere N, Portier G, Delsol G, Selves J. Contribution of microdissection for the detection of microsatellite instability in colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2006;37(3):361-8.

314. Kim SH, Shin SJ, Lee KY, Kim H, Kim TI, Kang DR, Hur H, Min BS, Kim NK, Chung HC, Roh JK, Ahn JB. Prognostic value of mucinous histology depends on microsatellite instability status in patients with stage III colon cancer treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy: a retrospective cohort study. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(11):3407-13.

315. Li X, Sun K, Liao X, Gao H, Zhu H, Xu R. Colorectal carcinomas with mucinous differentiation are associated with high frequent mutation of KRAS or BRAF mutations, irrespective of quantity of mucinous component. *BMC Cancer*. 2020;20(1):400.
316. Richards CH, Roxburgh CS, Powell AG, Foulis AK, Horgan PG, McMillan DC. The clinical utility of the local inflammatory response in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2014;50(2):309-19.
317. Scarpa M, Ruffolo C, Kotsafti A, Canal F, Erroi F, Basato S, DallAgnese L, Fiorot A, Pozza A, Brun P, Bassi N, Dei Tos A, Castoro C, Castagliuolo I, Scarpa M. MLH1 Deficiency Down-Regulates TLR4 Expression in Sporadic Colorectal Cancer. *Front Mol Biosci*. 2021;8:624873.
318. Paarnio K, Vayrynen S, Klintrup K, Ohtonen P, Makinen MJ, Makela J, Karttunen TJ. Divergent expression of bacterial wall sensing Toll-like receptors 2 and 4 in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2017;23(26):4831-8.
319. Takahashi K, Sugi Y, Nakano K, Tsuda M, Kurihara K, Hosono A, Kaminogawa S. Epigenetic control of the host gene by commensal bacteria in large intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2011;286(41):35755-62.
320. Wang EL, Qian ZR, Nakasono M, Tanahashi T, Yoshimoto K, Bando Y, Kudo E, Shimada M, Sano T. High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(5):908-15.
321. Beilmann-Lehtonen I, Bockelman C, Mustonen H, Koskensalo S, Hagstrom J, Haglund C. The prognostic role of tissue TLR2 and TLR4 in colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2020;477(5):705-15.
322. Leppanen J, Helminen O, Huhta H, Kauppila JH, Isohookana J, Haapasaari KM, Karihtala P, Parkkila S, Saarnio J, Lehenkari PP, Karttunen TJ. Toll-like receptors 2, 4 and 9 and hypoxia markers HIF-1alpha and CAIX in pancreatic intraepithelial neoplasia. *APMIS*. 2018;126(11):852-63.
323. Wong Y, Sethu C, Louafi F, Hossain P. Lipopolysaccharide regulation of toll-like receptor-4 and matrix metalloprotease-9 in human primary corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(5):2796-803.

324. Moretti IF, Lerario AM, Trombetta-Lima M, Sola PR, da Silva Soares R, Oba-Shinjo SM, Marie SKN. Late p65 nuclear translocation in glioblastoma cells indicates non-canonical TLR4 signaling and activation of DNA repair genes. *Sci Rep.* 2021;11(1):1333.
325. Sodhi CP, Neal MD, Siggers R, Sho S, Ma C, Branca MF, Prindle T, Jr., Russo AM, Afrazi A, Good M, Brower-Sinning R, Firek B, Morowitz MJ, Ozolek JA, Gittes GK, Billiar TR, Hackam DJ. Intestinal epithelial Toll-like receptor 4 regulates goblet cell development and is required for necrotizing enterocolitis in mice. *Gastroenterology.* 2012;143(3):708-18 e5.
326. Zlobec I, Lugli A. Invasive front of colorectal cancer: dynamic interface of pro-/anti-tumor factors. *World J Gastroenterol.* 2009;15(47):5898-906.
327. Koelzer VH, Lugli A, Dawson H, Hadrich M, Berger MD, Borner M, Mallaev M, Galvan JA, Amsler J, Schnuriger B, Zlobec I, Inderbitzin D. CD8/CD45RO T-cell infiltration in endoscopic biopsies of colorectal cancer predicts nodal metastasis and survival. *J Transl Med.* 2014;12:81.
328. Cammarota R, Bertolini V, Pennesi G, Bucci EO, Gottardi O, Garlanda C, Laghi L, Barberis MC, Sessa F, Noonan DM, Albini A. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *J Transl Med.* 2010;8:112.
329. Edin S, Kaprio T, Hagstrom J, Larsson P, Mustonen H, Bockelman C, Strigard K, Gunnarsson U, Haglund C, Palmqvist R. The Prognostic Importance of CD20(+) B lymphocytes in Colorectal Cancer and the Relation to Other Immune Cell subsets. *Sci Rep.* 2019;9(1):19997.
330. Wouters MCA, Nelson BH. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;24(24):6125-35.
331. Dorner M, Brandt S, Tinguely M, Zucol F, Bourquin JP, Zauner L, Berger C, Bernasconi M, Speck RF, Nadal D. Plasma cell toll-like receptor (TLR) expression differs from that of B cells, and plasma cell TLR triggering enhances immunoglobulin production. *Immunology.* 2009;128(4):573-9.
332. Proenca MA, de Oliveira JG, Cadamuro AC, Succi M, Netinho JG, Goloni-Bertolo EM, Pavarino EC, Silva AE. TLR2 and TLR4 polymorphisms influence mRNA and protein expression in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2015;21(25):7730-41.

333. Xu L, Wen T, Liu Z, Xu F, Yang L, Liu J, Feng G, An G. MicroRNA-375 suppresses human colorectal cancer metastasis by targeting Frizzled 8. *Oncotarget*. 2016;7(26):40644-56.

8. SAŽETAK

Učestalost karcinoma debelog crijeva u stalnom je porastu zbog čega se ova bolest smatra jednim od vodećih zdravstvenih problema u svijetu. Oko 80 % karcinoma debelog crijeva javlja se u sporadičnom obliku te u većini slučajeva prati stupnjeviti proces nakupljanja genetskih promjena u onkogenima, tumor supresorskim genima i genima za popravak DNA, tijekom kojeg iz dobroćudnog adenoma nastaje zloćudni invazivni karcinom.

Jedan od glavnih puteva koji dovode do pojačanog nakupljanja genetskih promjena u sporadičnom karcinomu debelog crijeva je mikrosatelitna nestabilnost. Ona nastaje kao posljedica gubitka funkcije gena i proteina za popravak krivo sparenih baza, odnosno sustava MMR, te nakupljanja pogrešaka duž genoma, a najčešće u mikrosatelitnim ponavljanjima. Ovisno o promijenjenoj komponenti sustava MMR, opisana su dva tipa mikrosatelitne nestabilnosti. Mikrosatelitna nestabilnost tipa MSI odgovorna je za razvoj 10 do 15 % sporadičnih karcinoma debelog crijeva, a najčešće nastaje uslijed epigenetske inaktivacije gena *MLH1* i gubitka njegove funkcije. Ovaj tip nestabilnosti, uslijed povećane stope mutacija, može rezultirati sintezom oštećenih peptida koji potiču snažan imunski odgovor. Karcinomi debelog crijeva visokonestabilni na MSI (MSI-H) povezani su sa povoljnijom prognozom u oboljelih u odnosu na stabilne karcinome te se smatra da upravo pojačana aktivacija imunskog odgovora utječe na prognozu kod oboljelih. U sporadičnim karcinomima debelog crijeva dokazan je i drugi tip mikrosatelitne nestabilnosti, nazvan EMMST, koji se za razliku od nestabilnosti tipa MSI, javlja znatno učestalije te je povezan s napredovanjem tumorske bolesti i kraćim preživljenjem u oboljelih. Iako je etiologija nestabilnosti tipa EMMST još uvijek nedovoljno razjašnjena, pokazano je da proupalni imunski okoliš u tumoru ima ulogu u nastanku ovog tipa nestabilnosti.

Upala u sluznici debelog crijeva najčešće nastaje kao posljedica dugotrajnog i nekontroliranog imunskog odgovora na disbiozu i povećan broj patogenih bakterija. Receptor TLR4 je ključni aktivator upalnog odgovora u sluznici debelog crijeva te je često pojačano eksprimiran u karcinomima debelog crijeva. Pojačana aktivacija receptora TLR4 povezana je s razvojem i napredovanjem karcinoma kolona, no do sada je najbolje opisana u karcinomima koji nastaju kao posljedica upalne bolesti crijeva. Poznato je da u normalnoj sluznici receptor TLR4 podliježe vrlo

preciznoj regulaciji, međutim, regulacija ekspresije i aktivacije receptora TLR4 u sporadičnim karcinomima debelog crijeva nije dovoljno istražena.

Glavni cilj našeg istraživanja bio je ispitati ulogu receptora TLR4 u sporadičnim karcinomima debelog crijeva podijeljenim u podskupine s obzirom na prisutnost mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAS. Osim toga, u navedenim podskupinama sporadičnih karcinoma debelog crijeva istražena je i regulacija receptora TLR4 putem polimorfizma *A896G*, čiji je varijantni alel G povezan sa slabijom aktivacijom receptora TLR4, te *miR-375-3p* za koju je pokazano da negativno regulira ekspresiju proteina TLR4.

Analizom učestalosti mikrosatelitnih nestabilnosti MSI i EMAS dobili smo četiri podskupine sporadičnih karcinoma debelog crijeva (MSS/EMAS-S, MSS/EMAS-L, MSS/EMAS-H, i MSI-H/EMAS-H). U podskupini stabilnih tumora dokazana je pojačana ekspresija mRNA i proteina TLR4 u središtu i invazivnoj fronti tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu kolona. U istoj podskupini tumora uočen je pad ekspresije *miR-375-3p* u tumoru u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu debelog crijeva što bi moglo ukazivati da ova miRNA ima utjecaj na regulaciju proteina TLR4 u ovim tumorima. U stabilnim smo tumorima dokazali značajno višu ekspresiju proteina TLR4 u središtu tumora u odnosu na invazivnu frontu tumora što može ukazivati na ulogu proteina TLR4 u nastanku ovih tumora. U viskonestabilnim tumorima (MSI-H/EMAS-H) dokazana je značajno veća ekspresija mRNA *TLR4* u invazivnoj fronti u odnosu na središte tumora, međutim tu razliku nismo dokazali na razini proteina TLR4. Ova nepodudarnost u razini ekspresije mRNA i proteina objašnjena je analizom strome viskonestabilnih tumora (MSI-H/EMAS-H) gdje je pokazano da je povećana ekspresija mRNA gena *TLR4* u invazivnoj fronti tumora najvjerojatnije rezultat visoke ekspresije proteina TLR4 u plazma stanicama. Također, pokazali smo da je alel G polimorfizma *A896G*, povezan sa slabijom aktivacijom receptora TLR4, učestaliji u zdravih ispitanika te može imati potencijalno zaštitnu ulogu u obolijevanju od EMAS-nestabilnih sporadičnih karcinoma debelog crijeva.

Rezultati ovog rada ukazuju da povećana ekspresija receptora TLR4 ima ulogu u razvoju stabilnih sporadičnih karcinoma debelog crijeva. Također, u viskonestabilnim tumorima (MSI-H/EMAS-H) smanjena bi ekspresija proteina TLR4 u tumoru, uz pojačanu ekspresiju u plazma stanicama strome, mogla predstavljati dodatni mehanizam povezan s povoljnijom prognozom u oboljelih od ovih zloćudnih tumora.

9. SUMMARY

Increasing incidence of colorectal cancer (CRC) represents one of the main health problems worldwide. Majority of sporadic CRC cases (80%) occurs as a consequence of mutation accumulation in oncogenes, tumor suppressor genes and genes involved in DNA repair, which eventually leads to the transformation of benign adenoma towards invasive carcinoma.

One of the major pathways that leads to accumulation of mutations in sporadic CRC is microsatellite instability (MSI). MSI develops due to the loss of function in DNA mismatch repair (MMR) genes and proteins leading to a progressive accumulation of mutations across the genome, mostly in microsatellite regions. Two types of microsatellite instability are described depending on which component of MMR is defective. Microsatellite instability, abbreviated MSI, is involved in 10 to 15% of sporadic CRCs, and mostly occurs due to epigenetic inactivation of *MLH1* gene. Hypermethylation that occurs at genomic microsatellites leads to the generation of defective peptides which can stimulate robust antitumor immune response of the host. Patients with MSI-H CRCs have been associated with more favourable prognosis compared to those with stable CRCs, which is considered to be the result of enhanced activation of antitumor immune response. Another form of microsatellite instability, named EMAS, has also been observed in sporadic CRCs. Unlike MSI, EMAS has a significantly higher prevalence in sporadic CRCs and has been associated with the tumor progression and worse prognosis in CRC patients. Although the etiology of EMAS is still elusive, studies suggest that tumor proinflammatory microenvironment plays a significant role in EMAS development.

Inflammation of the colonic mucosa mostly occurs due to prolonged and dysregulated immune response towards perturbations of the gut microbiota (dysbiosis) and the increase in number of pathogenic bacteria in colon. TLR4 receptor is the main inducer of inflammatory response in colon mucosa, and its overexpression is a common feature of CRCs. Increased activation of TLR4 has been associated with development and progression of CRC, however, majority of these results come from the CRCs associated with inflammatory bowel disease. Even though it is well established that TLR4 expression and activation are precisely regulated in normal colonic mucosa, its regulation in CRCs still remains elusive.

The main goal of our research was to elucidate the role of TLR4 receptor in sporadic CRCs stratified into subtypes according to the presence of MSI and EMAST instability in tumor. We also wanted to investigate the regulation of TLR4 receptor by analyzing the polymorphism *A896G*, whose variant allele G is associated with aberrant activation of TLR4 signaling, together with *miR-375-3p* which has been suggested as a negative regulator of TLR4 protein expression.

Sporadic CRCs were divided into four subtypes according to the frequency of MSI and EMAST instability present in tumor (MSS/EMAST-S, MSS/EMAST-L, MSS/EMAST-H, and MSI-H/EMAST-H). In stable tumors, higher *TLR4* mRNA and protein expression have been observed in tumor centre and invasive tumor front in comparison to the matched normal tissues. In the same tumor subtype we observed decrease in *miR-375-3p* expression in tumor tissue in comparison to the matched normal tissue, which suggests the potential role of this miRNA in the regulation of TLR4 protein expression in these tumors. Stable tumors showed significantly higher expression of TLR4 protein in the tumor center than at the invasive tumor front suggesting a potential role of TLR4 in initiation of sporadic CRC tumorigenesis. In the MSI-H/EMAST-H subtype we saw significantly higher expression of *TLR4* mRNA in the invasive tumor front than in tumor centre, however this result was absent at the protein level. This discrepancy was explained with the analysis of the tumor stroma of MSI-H/EMAST-H tumors where we showed that increased *TLR4* mRNA most likely results from the high levels of TLR4 protein expression in the plasma cells. In addition, we showed that the variant allele G in the polymorphism *A896G*, which is associated with decreased activation of TLR4 signaling, is more frequent in the group of healthy individuals and has a potential protective role in the susceptibility to the EMAST-unstable sporadic CRCs.

Results of our study suggest that the overexpression of TLR4 receptor might be involved in development of microsatellite stable CRCs. Furthermore, decreased TLR4 expression in MSI-H/EMAST-H tumors, combined with the higher stromal TLR4 expression, might suggest additional mechanism associated with the favorable prognosis in these patients.

10. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA

Kristina Vuković Đerfi rođena je 09. 05. 1988. godine u Slavanskom Brodu. Diplomirala je 2014. godine na Odjelu za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, sveučilišni studij Biologija, znanstveni smjer. U periodu od 2015. do 2018. zaposlena je na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, u grupi prof. Stipana Jonjića. Od 2018. do danas radi kao znanstveni novak – asistent u Laboratoriju za personaliziranu medicine, Zavoda za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković, gdje je pod mentorstvom prof. dr. sc. Sanje Kapitanović i dr. sc. Sonje Marinović izradila doktorski rad. U fokusu njezinog znanstveno-istraživačkog rada je istraživanje molekularne biologije i imunologije tumora.

Tijekom svog rada aktivno je sudjelovala na više znanstvenih projekata. Svoj znanstveno-istraživački rad prezentirala je na više domaćih i međunarodnih kongresa i skupova.

POPIS PUBLIKACIJA:

1. Štolfa Čamagajevac I, Vuković R, Vuković K, Vuković A, Ivezić V, Žuna Pfeiffer T, Krstin L, Lončarić Z. Wheat Leaf Antioxidative Status—Variety-Specific Mechanisms of Zinc Tolerance during Biofortification. *Plants*. 2021;10(10):2223. <https://doi.org/10.3390/plants10102223> (Q1 in Plant Sciences, IF (2020.): 3.935)
2. Marinović S, Vuković K, Škrčić A, Poljak M, Petek S, Petek L, Kapitanović S. Epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2021;21(2):131. doi:10.3892/ol.2020.12392 (Q2 in Oncology, IF (2020.): 2.311)
3. Tršan T, Vuković K, Filipović P, Lesac Brizić A, Lemmermman NAW, Schober K, Busch DH, Britt WJ, Messerle M, Krmpotić A, Jonjić S Cytomegalovirus vector expressing RAE-1 γ induces enhanced anti-tumor capacity of murine CD8⁺ T cells. *Eur. J. Immunol*. 2017 doi: 10.1002/eji.201746964. (Q1 in Immunology, IF (2017): 4.057)

KONGRESNA PRIOPĆENJA:

1. Association of EMAST and NLRP3 inflammasome activating pathway in development of sporadic colorectal cancer. 4th World Cancer Research Conference, Amsterdam, Nizozemska, ožujak 2020. – usmena i poster prezentacija
2. Recombinant CMV vector expressing RAE-1 γ induces effector CD8 T cells with enhanced anti-tumor properties. Sastanak Srednjeeuropskih društava za imunologiju i alergologiju – MESIA, Budimpešta, Mađarska, prosinac 2016. – usmena prezentacija
3. KLRG1+ CD8 T cells induced by cytomegalovirus vector expressing RAE- 1 γ show the outstanding anti-tumor potential. Godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva, Zagreb, Hrvatska, listopad 2017. – usmena i poster prezentacija
4. Cytomegalovirus (CMV) vector expressing RAE-1 γ ligand serves as a highly efficient anti-tumor CD8 T cell vaccine. Godišnji sastanak Hrvatskog imunološkog društva, Ogulin, Hrvatska, listopad 2016. – usmena i poster prezentacija