

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Jovana J. Rosić

**Analiza nivoa ekspresije i varijanti gena
SMAD7 u kolorektalnom karcinomu**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Jovana J. Rosić

**Analysis of *SMAD7* gene expression levels
and variants in colorectal cancer**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

MENTORI:

dr Goran Barišić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

dr Katarina Zeljić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Marija Savić Veselinović, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Sandra Dragičević, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Velimir Marković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u saradnji Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, Klinike za digestivnu hirurgiju – Prve hirurške klinike, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije i Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, pod vođstvom naučnog saradnika dr Sandre Dragičević. Finansirana je od strane strateškog projekta Srpske akademije nauka i umetnosti (SANU) „Molekularna osnova odgovora na hemioradioterapiju u karcinomu rektuma – MOHERATEKA“ i projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Uloga preoperativnog određivanja stadijuma bolesti, prognostičkih, terapijskih markera, objektiviziranje funkcionalnih rezultata u odluci o strategiji lečenja karcinoma rektuma, a u cilju unapređenja onkoloških rezultata i kvaliteta života“, pod rukovodstvom akademika Zorana Krivokapića.

ZAHVALNICA

Zahvalnost za postojanje ovog doktorata, pre svih, dugujem svom mentoru, profesoru i doajenu srpske hirurgije, akademiku Zoranu Krivokapiću, pod čijim okriljem sam započela svoj profesionalni razvoj neobjašnjivim spletom srećnih okolnosti. Akademik Krivokapić je bio hirurg fasciniran naukom, vizionar svestan važnosti principa multidisciplinarnosti i mesta koje nauka zauzima u medicini budućnosti. Bio je inicijator, katalizator i realizator mnogobrojnih naučnoistraživačkih poduhvata i vanserijska podrška prilikom izrade ovog doktorata. Bila je čast i privilegija biti njegov učenik i doktorand.

Veliku zahvalnost dugujem mentorima ove disertacije. Prof. dr Goranu Barišiću hvala što je u osudnom trenutku preuzeo na sebe mentorisanje ovog doktorata i pobrinuo se za njegov uspešan završetak. Prof. dr Katarini Zeljić hvala na profesionalizmu, entuzijazmu i uvažavanju, što ni jedno pitanje nije ostalo bez odgovora i što je bila i ostala uzor.

Članovima komisije prof. dr Mariji Savić Veselinović, dr Sandri Dragičević i prof. dr Velimiru Markoviću zahvaljujem se na oceni teksta ove doktorske disertacije, kao i na konstruktivnim savetima i konkretnim sugestijama koji su ga značajno unapredili. Dr Sandri Dragičević se posebno zahvaljujem na podršci i pomoći u eksperimentalnom radu i na nesebičnom deljenju svih svojih znanja i iskustava.

Veliku zahvalnost dugujem lekarima i medicinskim sestrama III odeljenja Klinike za digestivnu hirurgiju – Prve hirurške klinike, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, za koju sa ponosom mogu da kažem da je u proteklih 6 godina postala moja druga kuća. Prim. dr Milošu Popoviću, prim. dr Slađanu Antiću, doc. dr Ivanu Dimitrijeviću, ass. dr Aleksandru Sekuliću i prim. dr Jeleni Petrović Šunderić velika hvala na uvek prijatnim i poučnim razgovorima i što su me od prvog dana prihvatili kao člana svoje znamenite hirurške porodice. Dr Marku Miladinovu i dr Jelenku Jelenkoviću se posebno zahvaljujem na izuzetnoj profesionalnoj saradnji, kao i na tome što su postali i ostali dragi prijatelji na dugom i turbulentnom doktorandskom putu kojim smo zajedno koračali. Dr Aleksandri Đikić-Rom, dr Katarini Erić i dipl. farm. Jasni Bjelanović sam zahvalna na ogromnoj profesionalnoj i ličnoj podršci i pomoći koju su uvek nesebično nudile i pružale. Ass. dr Aleksandru Bogdanoviću se zahvaljujem na predanom i savesnom naučnoistraživačkom angažmanu. Zahvaljujem se i svim poštovanim ispitanicima koji su pristali na učešće u ovoj studiji.

Zahvalnost dugujem i članovima Laboratorije za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, u kojoj je urađen eksperimentalni deo ove doktorske disertacije. Svojoj „nezvaničnoj mentorki“ dr Aleksandri Nikolić se zahvaljujem na ključnim sugestijama prilikom odabira i formulisanja teme istraživanja, kao i na pruženoj autonomiji u radu i odlučivanju. Tamari Babić i dr Jovani Despotović sam zahvalna na zdušnoj podršci u eksperimentalnom radu i svim naučnim i nenaučnim ćaskanjima uz kafu.

Prof. dr Marini Stamenković Radak se zahvaljujem na ukazanom poverenju i korisnim smernicama prilikom upisa na doktorske akademske studije na katedri kojom je rukovodila.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim najbližim prijateljima i kumovima: Mici, Nati, Aleksiću, Ilinki, Šani, Jejki, Joki i Bogiju. Ne znam čime sam zavredela privrženost, odanost i ljubav takve grupe izuzetnih pojedinaca, ali znam da su oni moja najveća dragocenost.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici. Najpre svom vereniku Luki, koji je još u našim studentskim danima prepoznao moj put i vrednost u njemu i postao moja pokretačka snaga, bezrezervna podrška, sreća i smisao. Bratu Ljubomiru, koji je moj životni oslonac i inspirator neprekidnog rasta i razvoja, čiji ću neprikosnoveni intelekt zauvek težiti da dostignem. Tati Jovanu koji je najponosniji tata i baki Smilji koja bi danas bila najponosnija baka na svetu. I na kraju, najvažnijoj i najzaslužnijoj osobi, mojoj mami Milki. Mama, hvala ti što si uvek beskompromisno nudila kvalitet, a mene puštala da pravim izbore, hvala na безусловnoj ljubavi koja je preduslov za sticanje samopoštovanja i samopouzdanja sa kojima u životu nema nepremostivih prepreka. Zbog toga je svako moje dostignuće isto toliko i tvoje.

Posvećeno mojoj mami Milki Rosić.

Analiza nivoa ekspresije i varijanti gena *SMAD7* u kolorektalnom karcinomu

Sažetak

Inhibitorski *SMAD7* ima ključnu regulatornu ulogu u TGF- β signalizaciji posredovanoj *SMAD* proteinima, koja je često narušena u kolorektalnom karcinomu (CRC). U ovoj studiji je analizirana ekspresija *SMAD7* gena i njegov balans sa zajedničkim medijatorom *SMAD4* genom u progresiji primarnog i metastatskog CRC i predikciji terapijskog odgovora, kao i genetička varijabilnost 3' netranslatirajućeg regiona (3'UTR) *SMAD7* i funkcionalne posledice otkrivenih varijanti. Ekspresija i odnos *SMAD7* i *SMAD4* ispitivani su metodom kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR) u tumorskim i uparenim netumorskim tkivima primarnih i metastatskih CRC ispitanika, sedam humanih ćelijskih linija i SW620 ćelijama tretiranim hemioterapeuticima. 3'UTR *SMAD7* je analiziran direktnim sekvenciranjem, relativnom kvantifikacijom diferencijalne alelske ekspresije otkrivenih varijanti metodom alel-specifični qRT-PCR, kao i *in silico* predikcijom njihovih regulatornih posledica. Rezultati su pokazali promenu odnosa *SMAD7/SMAD4* u tumorima i odgovoru na terapiju, povišenu *SMAD7* ekspresiju u tumorima ispitanika sa dobrim u odnosu na one sa lošim odgovorom na neoadjuvantnu hemioradioterapiju (nCRT) i četiri različite varijante pojedinačnog nukleotida (SNV) u 3'UTR-u koje su ispoljavale alelsku neravnotežu i modifikovale mesta vezivanja mikroRNK (miRNK), od kojih je jedna prvi put detektovana somatska varijanta. Izmenjen odnos *SMAD7/SMAD4* u tumorskim ćelijama i tkivima ukazuje na značaj narušavanja ovog balansa u progresiji tumorske bolesti. Diferencijalnu ekspresiju *SMAD7* u odgovoru na nCRT treba dalje istražiti zbog moguće prediktivne vrednosti. Alelska neravnoteža u ekspresiji detektovanih SNV koje menjaju vezivanje miRNK ukazuje na njihovu potencijalno važnu ulogu u regulaciju ekspresije *SMAD7* u CRC.

Ključne reči: kolorektalni karcinom, *SMAD7*, *SMAD4*, neoadjuvantna hemioradioterapija, varijanta pojedinačnog nukleotida, 3' netranslatirajući region, alelska neravnoteža, mikroRNK

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna genetika

Analysis of *SMAD7* gene expression levels and variants in colorectal cancer

Abstract

Inhibitory *SMAD7* plays a crucial regulatory role in *SMAD*-dependent TGF- β signaling that is often disrupted in colorectal cancer (CRC). This study aimed to analyze the expression of *SMAD7* and its balance with common mediator *SMAD4* in primary and metastatic CRC progression and prediction, as well as genetic variation in *SMAD7* 3' untranslated region (3'UTR) and its functional consequences. The expression and ratio of *SMAD7* and *SMAD4* were analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in tumor and non-tumor primary and metastatic CRC tissues, seven human cell lines, and SW620 cells treated with chemotherapeutics. *SMAD7* 3'UTR was analyzed by direct sequencing, followed by the relative quantification of differential allelic expression of detected variants by allele-specific qRT-PCR and *in silico* predictions of their regulatory consequences. The results showed changes in the expression ratio of *SMAD7* and *SMAD4* in tumors and treatment response, elevated *SMAD7* expression in tumors obtained from responders to neoadjuvant chemoradiotherapy (nCRT) compared to non-responders, and four different single nucleotide variants (SNVs) in 3'UTR (among which one novel somatic point variant) that all exhibited variable extents of allelic imbalance in expression and altered miRNA-binding. Changes in the expression ratio of *SMAD7* and *SMAD4* in CRC cell lines and tissues emphasize the importance of *SMAD7/SMAD4* balance disruption for disease progression. Differential expression of *SMAD7* in responders versus non-responders to nCRT should be further investigated for its potential predictive value. The expression imbalance observed in the SNV alleles altering miRNA binding suggests that all investigated SNVs are possible contributing factors impacting *SMAD7* expression regulation in CRC.

Key words: colorectal cancer, *SMAD7*, *SMAD4*, neoadjuvant chemoradiotherapy, single nucleotide variant, 3' untranslated region, allelic imbalance, microRNA

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular genetics

Lista skraćenica:

5-FU	5-fluorouracil
aa	aminokiselina (eng. <i>amino acid</i>)
AJCC	Američki udruženi komitet za rak (eng. <i>American Joint Committee on Cancer</i>)
Akt	protein kinaza B
AMH	antimilerijanski hormon (eng. <i>anti-Müllerian hormone</i>)
AREs	AU-bogati elementi (eng. <i>AU-rich elements</i>)
AUC	površina ispod ROC krive (eng. <i>area under the curve</i>)
BLAST	eng. <i>The Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMPs	koštani morfogenetički proteini (eng. <i>bone morphogenetic proteins</i>)
bp	bazni par
CA 19-9	karbohidratni antigen 19-9 (eng. <i>carbohydrate antigen 19-9</i>)
CAPIRI	kapecitabin + irinotekan
CAPOX	kapecitabin + oksaliplatin
CDC25A	eng. <i>cell division cycle 25A</i>
CDC42	eng. <i>cell division cycle 42</i>
CDS	kodirajuća sekvenca (eng. <i>coding sequence</i>)
CEA	karcinoembrijski antigen (eng. <i>carcinoembryonic antigen</i>)
Chr	hromozom (eng. <i>chromosome</i>)
CI	interval poverenja (eng. <i>confidence interval</i>)
CIMP	fenotip nastao metilacijom CpG ostrvaca (eng. <i>CpG island methylator phenotype</i>)
CIMP-H	CIMP-visok (eng. <i>CIMP-high</i>)
CIN	hromozomska nestabilnost (eng. <i>chromosomal instability</i>)
circRNK	kružna RNK (eng. <i>circular, circ</i>)
CLM	kolorektalne metastaze u jetri (eng. <i>colorectal liver metastases</i>)
CMS	konsenzusni molekularni podtip (eng. <i>consensus molecular subtype</i>)
Co-SMAD	zajednički SMAD (eng. <i>common SMAD</i>)
COSMIC	Katalog somatskih mutacija u kanceru (eng. <i>Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer</i>)
CpG	eng. <i>5'-C-phosphate-G-3'</i>
CRC	kolorektalni karcinom (eng. <i>colorectal cancer</i>)
CRM	cirkumferentna resekciona margina (eng. <i>circumferential resection margin</i>)
CT	komputerizovana tomografija (eng. <i>computed tomography</i>)
Ct	eng. <i>threshold cycle</i>
CtBP	eng. <i>C-terminal binding protein</i>
cTNM	klinički TNM stadijum (eng. <i>clinical TNM</i>)
ddH₂O	dvostruko-destilovana H ₂ O
ddNTPs	dideoksinukleotid trifosfati (eng. <i>dideoxynucleoside triphosphates</i>)
DEPC	dietilpirokarbonat (eng. <i>diethylpyrocarbonate</i>)
dH₂O	destilovana H ₂ O
DMEM	eng. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dMMR	MMR-deficitarni (eng. <i>MMR-deficient</i>)
DPD	dihidropirimidin dehidrogenaza

EDTA	eng. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta (eng. <i>epithelial growth factor receptor</i>)
eIF2α	eng. <i>eukaryotic Initiation Factor 2α</i>
EMT	epitelno-mezenhimska tranzicija (eng. <i>epithelial-mesenchymal transition</i>)
EMVI	ekstramuralna vaskularna invazija (eng. <i>extramural vascular invasion</i>)
eQTLs	ekspresioni lokusi kvantitativnih osobina (eng. <i>expression quantitative trait loci</i>)
FAP	familijarna adenomatozna polipoza (eng. <i>familial adenomatous polyposis</i>)
FBS	fetalni goveđi serum (eng. <i>fetal bovine serum</i>)
FOLFOX	5-fluorouracil + oksaliplatin + leukovorin
FOLOXIRI	5-fluorouracil + oksaliplatin + irinotekan
FOX	5-fluorouracil + oksaliplatin
FOXFIRI	5-fluorouracil + irinotekan
G	gradus; stepen histološkog maligniteta
GADD34	eng. <i>growth-arrest and DNA-damage-inducible protein 34</i>
GAPDH	gliceraldehid 3-fosfodehidrogenaza (eng. <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GDFs	faktori rasta i diferencijacije (eng. <i>growth and differentiation factors</i>)
GLOBOCAN	eng. <i>Global Cancer Observatory</i>
GRCh38.p13/14	eng. <i>Genome Reference Consortium Human Build 38, patch release 13/14</i>
GWAS	studija genetičkih asocijacija na čitavom genomu (eng. <i>Genome Wide Association Study</i>)
Gy	grej
h	čas (eng. <i>hour</i>)
HNPCC	hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom (eng. <i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>); Lynch sindrom
IBD	inflamatorna bolest creva (eng. <i>inflammatory bowel disease</i>)
iRNK	informaciona RNK
I-SMAD	inhibitorni SMAD (eng. <i>inhibitory SMAD</i>)
KLF4	eng. <i>Krüppel-like factor 4</i>
L	limfovaskularna invazija
LARC	lokalno uznapredovali karcinom rektuma (eng. <i>locally advanced rectal cancer</i>)
LD	neravnoteža vezanosti (eng. <i>linkage disequilibrium</i>)
lncRNK	duga nekodirajuća RNK (eng. <i>long noncoding, lnc</i>)
LOH	gubitak heterozigotnosti (eng. <i>loss of heterozygosity</i>)
M	metastatski stadijum
m7G	7-metilguanozin 5' kapa
MAF	učestalost varijantnog alela (eng. <i>minor allele frequency</i>)
MAPK	mitogenom aktivirana protein kinaza (eng. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MET	mezenhimsko-epitelna tranzicija (eng. <i>mesenchymal-epithelial transition</i>)
MH1/2	eng. <i>MAD homology 1/2</i>
miRISC	miRNK-indukovani kompleks za utišavanje (eng. <i>miRNA-induced silencing complex</i>)
miRNK	mikroRNK
MMR	reparacija pogrešno sparenih baza (eng. <i>mismatch repair</i>)
MRI	magnetna rezonanca (eng. <i>magnetic resonance imaging</i>)

MSI	mikrosatelitska nestabilnost (eng. <i>microsatellite instability</i>)
MSI-H	MSI-visok (eng. <i>MSI-high</i>)
N	limfonodalni stadijum
NCBI	eng. <i>National Center for Biotechnology Information database</i>
ncRNK	nekodirajuća RNK (eng. <i>noncoding, nc</i>)
nCRT	neoadjuvantna hemioradioterapija (eng. <i>neoadjuvant chemoradiotherapy</i>)
NF-κB	nukleusni faktor κB (eng. <i>nuclear factor-κB</i>)
nt	nukleotid
NX	konzensusni normalizovan nivo ekspresije (eng. <i>Consensus Normalized eXpression level</i>)
ORF	otvoreni okvir čitanja (eng. <i>open reading frame, ORF</i>)
OXA	oksaliplatin
P	fosforilacija (eng. <i>phosphorilation</i>)
PARP	poli (ADP-riboza) polimeraza
PBS	rastvor fosfatnog pufera (eng. <i>phosphate buffer saline</i>)
PCR	reakcija lančanog umnožavanja polimerazom (eng. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PET	pozitronska emisiona tomografija (eng. <i>positron-emission tomography</i>)
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza (eng. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PN	perineuralna invazija
PP1c	eng. <i>protein phosphatase 1c</i>
PPI	protein-protein interakcije
pre-iRNK	prekursorska informaciona RNK
pre-miRNK	prekursorska mikroRNK
pri-miRNK	primarna mikroRNK
PRK	eng. <i>RNA-dependent protein kinase R</i>
pTNM	patološki TNM stadijum (eng. <i>pathological TNM</i>)
PY	prolin-tirozin motiv (P-prolin, Y-tirozin)
qRT-PCR	kvantitativni PCR u realnom vremenu (eng. <i>Quantitative Real-Time PCR</i>)
R	rezidualni status
RBPs	RNK-vezujući proteini (eng. <i>RNA-binding proteins</i>)
RefSeq	baza referentnih sekvenci (eng. <i>Reference Sequence Database</i>)
RhoA	eng. <i>Ras homolog family member A</i>
ROC	eng. <i>receiver operating curves</i>
rpm	eng. <i>revolutions per minute</i>
R-SMADs	receptorom regulisani SMAD (eng. <i>receptor regulated SMADs</i>)
RT	reverzna transkripcija
RTKs	tirozin-kinazni receptori (eng. <i>receptor tyrosine kinases</i>)
SAD	Sjedinjene Američke Države
SBEs	eng. <i>smad binding elements</i>
SD	standardna devijacija
SNV/SNP	varijanta/polimorfizam pojedinačnog nukleotida (eng. <i>single nucleotide variant/polymorphism</i>)
sRNK	mala RNK (eng. <i>small, s</i>)
T	tumorski stadijum
TD	tumorski depozit

TGF-β	transformišući faktor rasta β (eng. <i>transforming growth factor β</i>)
TGF-βRI/II/III	TGF- β receptor tipa I/II/III
TIL	tumor-infiltrativni limfociti
Tm	temperatura topljenja graničnika (eng. <i>primer melting temperature</i>)
TME	totalna mezorektalna ekscizija (eng. <i>total mesorectal excision</i>)
TNM	eng. <i>Tumor, Node, Metastasis</i>
TRG	tumor regresioni gradus (eng. <i>tumor regression grade</i>)
UbcH7	eng. <i>ubiquitin-conjugating enzyme 7</i>
UTR	netranslatirajući region (eng. <i>untranslated region</i>)
V	venska invazija
VEGF-A	vaskularni endotelni faktor rasta A (eng. <i>vascular endothelial growth factor A</i>)
WT	alel divljeg tipa (eng. <i>wild-type</i>)
WW	protokol <i>watch and wait</i>
WW	proteinski domen dužine ~40 nt koji sadrži dva konzervisana ostatka triptofana (W-triptofan)
ycTNM	klinički TNM stadijum nakon primljene terapije
ypTNM	patološki TNM stadijum nakon primljene terapije

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kolorektalni karcinom	1
1.1.1. Epidemiologija CRC	2
1.1.2. Faktori rizika za nastanak CRC	3
1.1.3. Molekularne osnove kolorektalne karcinogeneze	5
1.1.4. Putevi kolorektalne karcinogeneze	7
1.1.5. Prirodni tok CRC	8
1.1.5.1. Lokalno uznapredovali karcinom rektuma	8
1.1.5.2. Metastatski CRC	10
1.1.6. Dijagnostika CRC	11
1.1.6.1. Prognostički faktori CRC	13
1.1.7. Lečenje CRC	14
1.1.7.1. Prediktivni faktori CRC	16
1.2. TGF-β signalni put	16
1.2.1. Kaskada i učesnici TGF-β signalnog puta	16
1.2.2. Uloga TGF-β signalizacije u tumorima	18
1.3. SMAD7	19
1.3.1. SMAD7 gen	20
1.3.2. Regulacija ekspresije SMAD7	22
1.3.3. Značaj SMAD7 u tumorima	23
1.3.4. Interakcija između SMAD7 i SMAD4	24
1.4. SMAD4 i njegov značaj u tumorima	24
1.5. Regulatorna uloga 3' netranslatirajućeg regiona	25
1.5.1. Regulacija mikroRNK molekulima	26
1.5.2. Značaj genetičke varijabilnosti 3'UTR-a	28
2. CILJEVI	29
3. MATERIJAL I METODE	30
3.1. Čelijske linije	30
3.2. Tretmani SW620 ćelija hemioterapeuticima i bevacizumabom	31
3.3. Ispitanici	31
3.4. Izolacija RNK	33
3.5. Određivanje koncentracije i provera čistoće izolovane RNK	34
3.6. Sintaza komplementarne DNK reakcijom reverzne transkripcije	34

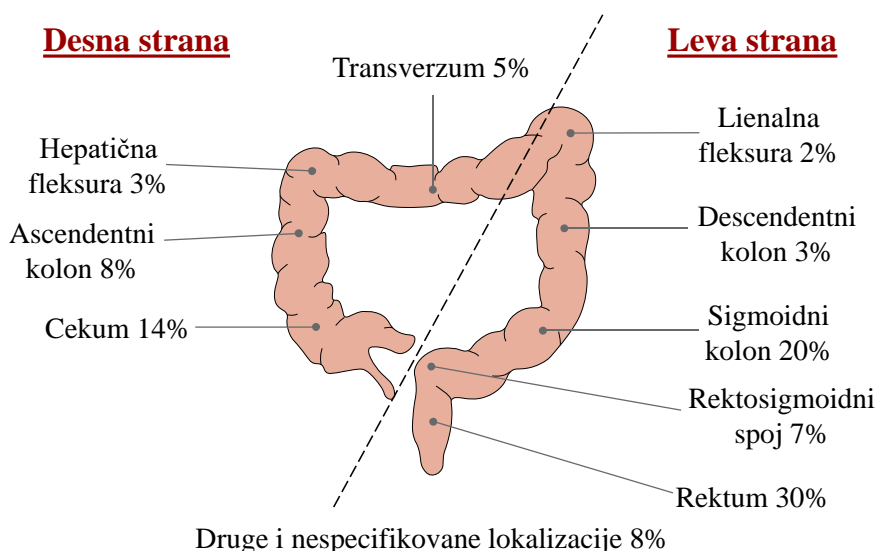
3.7. Određivanje relativnih nivoa iRNK metodom kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR).....	34
3.7.1. Određivanje relativne ekspresije <i>SMAD7</i> i <i>SMAD4</i> gena i njihovog odnosa	35
3.7.2. Određivanje relativne alel-specifične ekspresije detektovanih varijanti pojedinačnog nukleotida	36
3.8. Izolacija DNK	37
3.9. Određivanje koncentracije i provera čistoće izolovane DNK	39
3.10. Amplifikacija celokupne genomske DNK niske koncentracije	39
3.11. Reakcija lančanog umnožavanja polimerazom	40
3.11.1. Analiza uspešnosti i specifičnosti PCR reakcije elektroforezom u agaroznom gelu	41
3.12. Prečišćavanje umnoženih DNK fragmenata	41
3.13. Sekvenciranje DNK	42
3.13.1. Obrada podataka nakon sekvenciranja DNK	43
3.14. <i>In silico</i> predikcija efekata varijanti pojedinačnih nukleotida na efikasnost vezivanja miRNK	43
3.15. Statistička obrada podataka	44
4. REZULTATI.....	45
4.1. Ekspresija <i>SMAD7</i> i <i>SMAD4</i> gena i njihov odnos u ćelijskim linijama	45
4.2. Ekspresija <i>SMAD7</i> i <i>SMAD4</i> gena i njihov odnos u SW620 ćelijama nakon tretmana hemioterapeuticima i bevacizumabom.....	46
4.3. Demografske i kliničko-patološke karakteristike ispitanika.....	47
4.4. Ekspresija <i>SMAD7</i> i <i>SMAD4</i> gena i njihov odnos u tumorskim i netumorskim tkivima LARC i CLM ispitanika	49
4.4.1. Dijagnostički potencijal ekspresije <i>SMAD7</i> i <i>SMAD4</i> gena i njihovog odnosa u LARC i CLM.....	51
4.5. Promena ekspresije <i>SMAD7</i> i <i>SMAD4</i> gena i njihovog odnosa u tumorskom i okolnom netumorskom tkivu LARC ispitanika nakon nCRT	54
4.6. Prediktivni značaj ekspresije <i>SMAD7</i> i <i>SMAD4</i> gena i njihovog odnosa u odgovoru na nCRT kod LARC ispitanika	56
4.7. Povezanost ekspresije <i>SMAD7</i> i <i>SMAD4</i> gena i njihovog odnosa sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika	58
4.8. Genetička varijabilnost 3'UTR-a <i>SMAD7</i> gena u ćelijskim linijama i tumorskim tkivima ispitanika.....	59
4.9. Alel-specifična ekspresija iRNK svih detektovanih SNV u <i>SMAD7</i> 3'UTR-u u ćelijskim linijama i tkivima ispitanika sa varijantama.....	60
4.10. <i>In silico</i> predikcija funkcionalnih posledica detektovanih varijanti 3'UTR-a <i>SMAD7</i> gena na vezivanje miRNK.....	63
4.11. Povezanost prisustva genetičkih varijanti u 3'UTR-u <i>SMAD7</i> gena sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika.....	64

5. DISKUSIJA	65
5.1. Ekspresija i odnos <i>SMAD7</i> i <i>SMAD4</i> gena u progresiji karcinoma kolorektuma i odgovoru na terapiju	65
5.2. Genetička varijabilnost i alel-specifična ekspresija <i>SMAD7</i> 3'UTR varijanti u karcinomu kolorektuma	69
6. ZAKLJUČCI	72
7. LITERATURA	74

1. UVOD

1.1. Kolorektalni karcinom

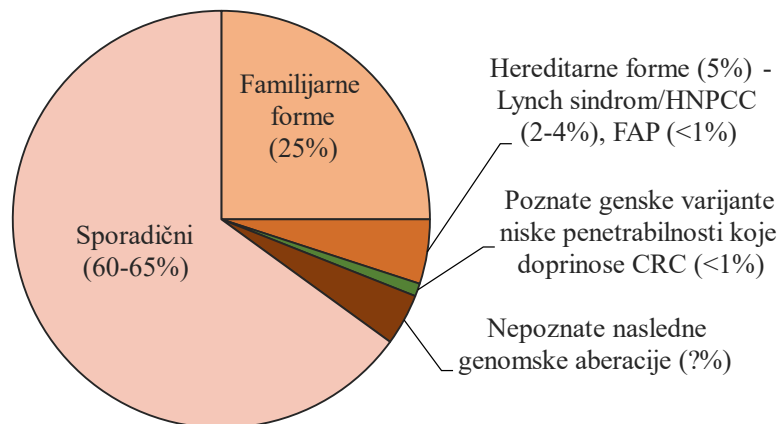
Kolorektalni karcinom (eng. *colorectal cancer*, CRC) je maligni tumor epitelnog tkiva debelog creva. Adenokarcinomi čine više od 90% svih CRC i predstavljaju maligne tumore koji vode poreklo od žlezdanih epitelnih ćelija mukoze kolona i rektuma.¹ Pored adenokarcinoma, znatno ređe se javljaju ostali histopatološki tipovi CRC, kao što su neuroendokrini, skvamozni, adenoskvamozni, karcinomi vretenastih ćelija i nediferentovani maligniteti epitela.² Karcinomi kolorektuma se dele u odnosu na anatomsku lokalizaciju tumora na karcinome proksimalnog ili desnog kolona (cekum, ascendentni kolon, hepatična fleksura i transversum), distalnog ili levog kolona (lienalna fleksura, descendentni kolon i sigma) i rektuma (Slika 1).¹ Rektum predstavlja najčešće mesto nastanka CRC, s obzirom da je u oko 30-37% slučajeva karcinom lokalizovan u završnom, pravom delu debelog creva (lat. *rectus* - prav).^{3,4} Karcinomi distalnog kolona češće se javljaju u odnosu na karcinome proksimalnog kolona (Slika 1) i razlikuju se međusobno po kliničkim, histološkim i molekularno-genetičkim karakteristikama, što odražava biološke razlike između leve i desne strane kolona koji su različitog embrionalnog porekla.^{4,5}



Slika 1. Procentualna distribucija kolorektalnog karcinoma u odnosu na anatomsku lokalizaciju tumora. Preuzeto i modifikovano od Thrumurthy i sar.⁶

Rizik za nastanak CRC je definisan kumulativnim uticajem nasledne genetičke predispozicije i faktora spoljašnje sredine. Oko 5% svih slučajeva CRC su hereditarni oblici koji su povezani sa visoko penetrabilnim germinativnim genskim mutacijama, od kojih su dva najčešća Lynch sindrom, koji se još naziva i hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom (eng. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC) i familijarna adenomatozna polipoza (eng. *familial adenomatous polyposis*, FAP).^{1,7} Oko 25-30% slučajeva čine familijarne forme kod kojih postoji pozitivna porodična anamneza na CRC, ali se bolest ne može klasifikovati kao hereditarna.^{1,7} Ostalih 60-65% slučajeva čini sporadičan CRC koji se razvija putem stečenih somatskih genomskih alteracija i koji je najzastupljenija forma karcinoma kolona i rektuma (Slika 2).¹ Godine starosti predstavljaju najvažniji faktor rizika za obolevanje od sporadičnog CRC, s obzirom da se u preko 90% slučajeva ovaj tip maligniteta javlja kod osoba starih 50 i više godina.⁸ Nagli skok stope incidence CRC u ovoj uzrasnoj populaciji objašnjava se akumulacijom nasumičnih somatskih mutacija koje narušavaju složen sistem biološke homeostaze. CRC je kompleksna i heterogena bolest koja se razvija kao

posledica nakupljanja genetičkih i epigenetičkih promena koje dovode do postepene neoplastične transformacije normalne crevne mukoze. Bolje razumevanje složenih mehanizama koji se nalaze u osnovi inicijacije, promocije, progresije i metastaziranja CRC pruža mogućnost personalizovanog pristupa bolesti i njenog preciznijeg lečenja u kliničkoj praksi.



Slika 2. Procenat slučajeva karcinoma kolorektuma povezanih sa sporadičnim i hereditarnim faktorima. Preuzeto i modifikovano od Keum i sar.¹

1.1.1. Epidemiologija CRC

CRC predstavlja značajan javno-zdravstveni problem koji sve više doprinosi ukupnom globalnom opterećenju društva bolestima. U svetu od CRC oboli oko 1,9 miliona ljudi, dok se broj umrlih procenjuje na gotovo 935 hiljada godišnje⁹, tj. na svakih pola minuta umre po jedna osoba od CRC. Jedan od 10 svih dijagnostikovanih tumora i umrlih onkoloških bolesnika je obolelo od ovog tipa maligniteta. Prema podacima GLOBOCAN-a (eng. *Global Cancer Observatory*) u 2020. godini, CRC je bio treći najčešće dijagnostikovani maligni tumor (iza raka dojke i pluća) i drugi najčešći uzrok smrti od maligniteta (iza raka pluća) u svetu sa procenjenih 1 931 590 novodijagnostikovanih slučajeva i 935 173 novih smrtnih slučajeva.⁹ CRC je treći najčešće dijagnostikovani maligni tumor kod muškaraca (iza raka pluća i prostate), a drugi kod žena (iza raka dojke) i treći vodeći uzrok smrti i kod muškaraca (iza raka pluća i jetre) i kod žena (iza raka dojke i pluća).⁹ Stope incidence i smrtnosti su više kod muškaraca nego kod žene u odnosu 1,2:1.³

U poslednjih 30 godina, stopa incidence CRC je u svetu porasla za 9,5%¹⁰, sa najdramatičnijim skokom zabeleženim u zemljama u razvoju.¹ Stopa incidence je i dalje gotovo 4 puta veća u razvijenim zemljama u poređenju sa zemljama u razvoju i nerazvijenim zemljama, te se ovaj parametar smatra indikatorom socio-ekonomske razvijenosti.^{9,10} Najveća stopa incidence (standardizovana na 100 000 stanovnika) za CRC je u Južnoj i Severnoj Evropi (80,6 i 76,8, redom), dok je najniža u Centralnoj i Zapadnoj Africi (3,2 i 3,4, redom).³ Trend smanjenja incidence kod nekih visoko razvijenih zemalja se pripisuje sve zdravijim navikama stanovništva (kao što je smanjenje broja pušača), ali i sprovođenju nacionalnih programa skrininga i povećanom broju kolonoskopija i blagovremenom uklanjanju premalignih lezija.⁹ S druge strane, rapidan porast incidence CRC u zemljama u razvoju pripisuje se promeni načina života i ishrane koji su sve sličniji navikama u razvijenim zemljama i podrazumevaju sedentarni način života i manjak fizičke aktivnosti, kao i povećan unos hrane životinjskog porekla i mesnih prerađevina koji dovode do porasta učestalosti gojaznosti, praćeno sa dodatnim faktorima rizika kao što su povećana konzumacija alkohola i duvana.⁹

S druge strane, diskrepanca u stopi mortaliteta je nešto manja s obzirom da je smrtnost od ovog tipa maligniteta viša u zemljama u razvoju nego u razvijenim zemljama.⁹ Najveća stopa mortaliteta (standardizovana na 100 000 stanovnika) za CRC je u Južnoj, Centralnoj i Istočnoj Evropi (36,1, 31, 9 i 31, 9, redom), dok je najniža u Centralnoj i Zapadnoj Africi (2,4 i 2,5, redom).³ Uprkos globalnom trendu smanjenja stope mortaliteta u protekle tri decenije¹⁰, stope smrtnosti su i dalje u porastu u mnogim zemljama sa niskim i srednjim prihodima, uključujući i Srbiju.^{11,12}

U zemljama u tranziciji kao što je Srbija, opterećenje karcinomom kolorektuma je značajno, s obzirom na povećanje stope incidence za 27,5% u poslednje tri decenije,¹⁰ koje je praćeno permanentnim porastom smrtnosti.^{11,12} Sa 5989 novootkrivenih slučajeva (3785 muškaraca i 2204 žena) i 3356 smrtnih slučajeva (2114 muškaraca i 1242 žena) u 2020. godini, Srbija je zauzela 22. mesto po stopi incidence (68,5) i 11. mesto po stopi mortaliteta (38,4) od CRC u svetu.³ Gledano po polovima, Srbija se našla na 15. mestu po stopi incidence (88,4) i 6. mestu po stopi mortaliteta (49,4) od CRC u muškom delu populacije i na 39. mestu po stopi incidence (49,4) i 30. mestu po stopi mortaliteta (27,9) od CRC u ženskom delu populacije u svetu.³ Razlika u odnosu incidence i mortaliteta između muškaraca i žena još je izraženija u Srbiji nego na globalnom nivou i iznosi 1,7:1.

Do 2040. godine, predviđa se da će broj obolelih od CRC u svetu dostići 3 014 519, a broj umrlih 1 584 119, što je porast od 56,1%, odnosno 69,4%.¹³

1.1.2. Faktori rizika za nastanak CRC

Rizik za nastanak CRC povezan je sa mnogobrojnim faktorima, od kojih su najznačajniji sumirani na Slici 3.



Slika 3. Glavni faktori rizika asocirani sa nastankom kolorektalnog karcinoma. Preuzeto i modifikovano od Sawicki i sar.¹⁴

Pokazano je da postoji povećan rizik za obolevanje od CRC kod osoba sa pozitivnom porodičnom anamnezom na CRC i prekanceroznim hereditarnim sindromima, kao i pozitivnom ličnom anamnezom na polipoze i inflamatorne bolesti creva (eng. *inflammatory bowel disease*, IBD). Osobe kod kojih je CRC prisutan kod srodnika prvog stepena karakteriše 2,24 puta veći rizik za obolevanje od ove bolesti u odnosu na osobe sa negativnom porodičnom anamnezom, pri čemu je rizik višestruko veći ukoliko je srodnik oboleo pre 50. godine života ili je veći broj obolelih srodnika.¹⁵ Takođe, hereditarni nepolipozni i polipozni monogeni sindromi (koji se uglavnom nasleđuju autozomno dominantno), od kojih su dva najčešća Lynch sindrom i FAP, značajno povećavaju rizik za obolevanje od CRC. Oboleli od Lynch sindroma, koje karakteriše germinativna mutacija u nekom od gena koji učestvuju u mehanizmima reparacije DNK (*MSH2*, *MLH1*, *MLH6*, *PMS1* ili *PMS2*) imaju rizik od 50% za obolevanje od CRC pre 70. godine starosti, a gotovo 100% osoba sa FAP sindromom, koji nastaje usled germinativnih mutacija u tumor-supresorskom *APC* genu, razviće CRC pre 40. godine starosti ukoliko se on prethodno ne dijagnostikuje i ne leči.^{14,16,17} Pored toga, u hereditarna oboljenja koja mogu dovesti do nastanka CRC spadaju i Peutz-Jeghers sindrom, Juvenilni polipozni sindrom, PTEN hamartoma tumor sindrom, *MUTYH*-udružena polipoza i drugi.¹⁴ Procenjuje se da se oko 95% karcinoma kolorektuma razvije iz adenomatoznih polipa, prekanceroznih neoplastičnih lezija mukoze kolona koje imaju potencijal maligne alteracije. Iako gotovo svi CRC nastaju od polipa, samo 5% polipa se razvije u CRC, a rizik za transformaciju adenomatoznog polipa u invazivni adenokarcinom se povećava sa veličinom polipa, stepenom displazije i starošću osobe i traje između 5 i 15 godina.¹⁴ Ulcerozni kolitis i Kronova bolest su dve najčešće forme IBD, koje predstavljaju hronične bolesti okarakterisane nekontrolisanom inflamacijom creva koja je posledica narušenog imunskog sistema gastrointestinalnog trakta. IBD su predisponirajuća stanja za razvoj CRC, s obzirom da hronična inflamacija često dovodi do atipičnog rasta ćelija poznatog kao displazija.¹⁶ Iako displastične ćelije nisu anaplastične, imaju povećane šanse da to postanu, što povećava rizik od nastanka CRC za 3,7% kod osoba sa ulceroznim kolitisom¹⁸ i 2,5% kod onih sa Kronovom bolešću.¹⁹

Tokom proteklih nekoliko decenija, ustanovljena je važnost efekata koje faktori rizika podložni modifikaciji, kao što su način života i ishrana, imaju na razvoj CRC. Procenjuje se da se oko 55% slučajeva sporadičnih CRC dijagnostikovanih u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) može pripisati faktorima rizika na koje se može uticati, kao što su neadekvatna ishrana (bogata crvenim mesom i mesnim prerađevinama, a siromašna vlaknima iz voća i povrća, integralnim žitaricama, mlečnim proizvodima, kalcijumom i vitaminom D), prekomerna telesna masa i gojaznost, nedostatak fizičke aktivnosti, pušenje duvana i konzumiranje alkohola.²⁰ Promena načina života u pogledu navika u ishrani i fizičkoj aktivnosti predstavlja efikasnu strategiju prevencije i pruža mogućnost smanjenja incidence CRC. Fizička aktivnost i održavanje zdrave telesne težine mogu kumulativno smanjiti rizik za obolevanje od CRC za do 50%, uz dodatno smanjenje kroz adekvatnu modifikaciju ishrane, dok smanjenje konzumacije alkohola, duvana, crvenog mesa i mesnih prerađevina združeno mogu dovesti do smanjenja rizika od CRC za preko 50%.¹⁷

Pored toga, poznato je da mikrobiota creva, starost, pol i socio-ekonomski status utiču na rizik za obolevanje od CRC. Nedavna istraživanja mikrobioma osoba sa CRC pokazala su da narušen sastav i funkcionalnost mikrobiote može dovesti do inicijacije, promocije i progresije karcinoma, s obzirom da toksični metaboliti izmenjene crevne flore mogu dovesti do oštećenja DNK, uticati na ćelijski ciklus, stimulisati imunski odgovor i dovesti do poremećaja u funkcionisanju crevne barijere.¹⁴ Narušena homeostaza mikrobiote creva (tzv. disbioza) može kreirati mikrosredinu koja pogoduje nastanku CRC.²¹ Budući da je kancer grupa bolesti karakteristična za starije životno doba, brz porast stopa incidence i mortaliteta od CRC zapaža se nakon 50. godine starosti, što se dovodi u vezu sa nakupljanjem mutacija u toku života. Osobe stare 65 i više godina imaju oko tri puta veći rizik za obolevanje od CRC u odnosu na osobe uzrasta 50-64 godine i oko 30 puta veći rizik u odnosu na osobe uzrasta 25-49 godina, te se godine starosti smatraju jednim od najznačajnijih faktora koji utiču na rizik za obolevanje od CRC.¹⁷ Stopa incidence CRC je 30% veća kod muškaraca nego kod žena, dok se kod žena češće javljaju karcinomi proksimalnog kolona koji su agresivniji i imaju znatno

lošiju prognozu.¹⁴ Iako uzroci dispariteta među polovima nisu u potpunosti razjašnjeni, dovode se u vezu sa razlikama u izloženosti faktorima rizika kao što su alkohol, duvan i način ishrane, kao i uticajem polnih hormona.¹⁴ Osobe nižeg socio-ekonomskog statusa imaju povećan rizik za obolevanje od CRC, što se u velikoj meri pripisuje ograničenom pristupu kvalitetnoj zdravstvenoj zaštiti i najsavremenijim metodama lečenja, nezdravom načinu ishrane i navikama kao što su prekomerna konzumacija duvana.¹⁴

1.1.3. Molekularne osnove kolorektalne karcinogeneze

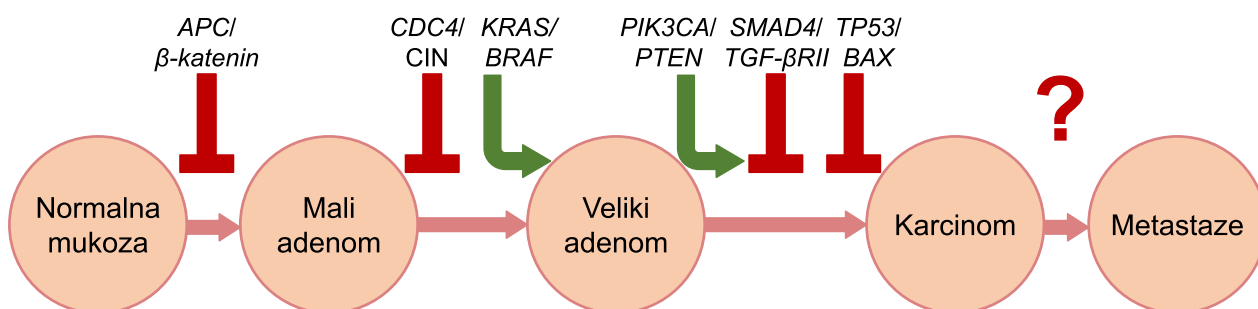
Sporadičan CRC predstavlja etiološki heterogenu bolest koja, uopšteno gledano, nastaje kao posledica stečenih genetičkih i epigenetičkih somatskih alteracija u protoonkogenima i tumor-supresorskim genima. Smatra se da je u osnovi karcinogeneze narušen balans između mutageneze i kontrolnih mehanizama ćelijskog ciklusa koji održavaju somatski integritet i obezbeđuju ćelijsku deobu bez grešaka. Genomske alteracije koje nastaju kao posledica ovog disbalansa obuhvataju različite oblike mutacija na specifičnim genima, amplifikacije, delecije ili hromozomske rearanžmane, aneuploidije ili poliploidije i druge.²² Gubitak genomske stabilnosti je ključni događaj u molekularnoj patogenezi koji se događa rano u procesu karcinogeneze i omogućava mutacionu aktivaciju onkogenih puteva i inaktivaciju tumor-supresorskih gena koji potom neoplastično transformišu ćeliju i omogućavaju razvoj tumora.²³ Genomska nestabilnost podrazumeva povećanu tendenciju nastanka genomskih izmena u toku ćelijske deobe, odnosno nemogućnost ćelijskog ciklusa da kontroliše stopu mutacija.^{24,25} Osim genomske nestabilnosti, epigenetička nestabilnost predstavlja važnu karakteristiku kancera i ima značajnu ulogu u patofiziologiji CRC.²⁶ Epigenetičke alteracije, koje podrazumevaju modifikaciju, između ostalog, obrazaca DNK metilacije i N krajeva histona, kao i promenu aktivnosti regulatornih, nekodirajućih RNK molekula, takođe se dešavaju rano u patogenezi bolesti i obuhvataju gotovo sve ključne signalne puteve asociirane sa karcinogenezom.²⁶

Tri osnovna patofiziološka mehanizma nastanka CRC koja podrazumevaju genomsku i epigenetičku nestabilnost su:

- 1) hromozomska nestabilnost (eng. *chromosomal instability*, CIN),
- 2) mikrosatelitska nestabilnost (eng. *microsatellite instability*, MSI) i
- 3) fenotip nastao metilacijom CpG ostrvaca (eng. *CpG island methylator phenotype*, CIMP).^{27,28}

CIN se karakteriše aberacijama broja hromozoma (uglavnom aneuploidije, retko poliploidije) i strukture hromozoma (uglavnom duplikacije i delecije, retko hromozomski rearanžmani), što rezultuje aktivacijom puteva koji pospešuju ćelijski rast ili smanjenjem aktivnosti apoptotskih puteva.^{23,26,29} CIN je najčešći mehanizam nastanka CRC i dešava se u 80-85% slučajeva ovog tipa maligniteta.³⁰ Fearon i Vogelstein su ga prvi put predložili 1990. godine u kontekstu klasičnog modela karcinogeneze, koji podrazumeva da je nastanak maligniteta višestepeni proces u kojem se somatske mutacije dešavaju određenim redosledom i dovode do neoplastične transformacije (Slika 4).^{28,31} Prvi korak u ovoj kaskadi je inaktivacija Wnt/ β -katenin signalnog puta deaktivirajućim mutacijama u *APC* genu, praćeno aktivirajućim mutacijama u genima ključnim za stimulaciju rasta, kao što su *KRAS*, *CDC4*, *PIK3CA* i drugi.²⁸ Mutacije koje pomeraju okvir čitanja (eng. *frameshift*) i mutacije bez smisla (eng. *nonsense*) u tumor-supresorskom *APC* genu dovode do sinteze skraćenog proteinskog produkta i imaju značajnu ulogu u nastanku sporadičnih i hereditarnih oblika CRC, a javljaju se u 30-70% sporadičnih formi adenoma i karcinoma kolorektuma.³² Sticanje aktivirajućih mutacija u *KRAS* i *BRAF* genima, koji su učesnici signalnih puteva mitogenom aktiviranih protein kinaza (eng. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK), značajan je korak u karcinogenezi, s obzirom da RAS/RAF/MAPK put reguliše ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju, senescenciju i apoptozu.³² Najčešće su mutacije u onkogenu *KRAS*, nishodnom medijatoru signalnog puta receptora za epidermalni faktor rasta (eng. *epithelial growth factor receptor*, EGFR), koje su prisutne u oko 40% sporadičnih CRC.^{32,33}

Nakon toga sledi narušavanje negativnog regulatora rasta, signalizacije transformišućeg faktora rasta β (eng. *transforming growth factor β* , TGF- β), najčešće kroz inaktivaciju jednog ili više *SMAD* gena, i, krajnje, transformacija ćelije iz benigne u malignu mutacijama ili delecijom *TP53* gena, što dovodi do inaktivacije kontrolne tačke G1/S ćelijskog ciklusa i omogućava replikaciju DNK molekula sa lezijama.²⁸ Gubitak heterozigotnosti (eng. *loss of heterozigosity*, LOH) dugog kraka hromozoma 18, na kojem su lokalizovani *DCC* i *SMAD4* geni, karakterističan je za oko 70% CRC slučajeva i može dovesti do inhibicije apoptoze zbog nemogućnosti vezivanja proteina netrin-1 za mutiran *DCC* transmembranski protein, kao i do gubitka inhibicije rasta indukovanog aberantnom *SMAD*-zavisnom TGF- β signalizacijom.³² Funkcionalna inaktivacija gena *TP53* je čest događaj u CRC i ključan je u malignoj transformaciji CIN mehanizmom, a najčešće se događa putem udružene mutacije izgubljenog smisla (eng. *missense*) i delecije dela kratkog kraka hromozoma 17 na kojem je lokalizovan ovaj tumor-supresorski gen.³⁴



Slika 4. Glavne genetičke alteracije asocirane sa klasičnim modelom kolorektalne karcinogeneze CIN mehanizmom. Hromozomska nestabilnost (CIN) javlja se relativno rano u kolorektalnoj karcinogenezi, a poznato je da se mutacije *CDC4* gena javljaju u malim adenomima dok se mutacije u genima *KRAS/BRAF* česte u velikim, ali retke u malim adenomima. Mutacije u genima puteva *PIK3CA/PTEN*, *SMAD4/TGF- β RII* i *TP53/BAX* retko se javljaju kod velikih adenoma, ali su česte kod karcinoma, te su ova tri puta najverovatnije uključena u tranziciju od benignih lezija do progresivnih maligniteta. Iako je svaki od navedenih puteva izmenjen u većini karcinoma kolorektuma, svaki tumor nema alteracije u svakom putu, a varijabilnost među tumorima doprinosi njihovoj biološkoj heterogenosti. Preuzeto i modifikovano od Jones i sar.³⁵ i Kalady i sar.²⁸

MSI podrazumeva promenu dužine DNK molekula u okviru mikrosatelitskih lokusa i karakteriše se neispravnim mehanizmom reparacije pogrešno sparenih baza (eng. *mismatch repair*, MMR) u DNK molekulu, što je posledica mutacija u MMR genima kao što su *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*.³⁶ Mikrosateliti su tandemske ponovljene DNK sekvence koje se sastoje iz motiva dužine 1-6 baznih parova (bp) i uzastopno se ponavljaju tako da dužina niza može biti od nekoliko desetina do stotina bp. Germinativne mutacije u MMR genima prouzrokuju Lynch sindrom, koji je najčešći oblik naslednog CRC, dok sporadični CRC nastaje u slučaju inaktivacije promotora *MLH1* gena putem bialelske hipermetilacije ili dvostrukim somatskim mutacijama u nekom od MMR gena.^{26,37} Na osnovu MSI statusa definisana je podgrupa pacijenata sa MMR-deficitarnim i MSI-visokim CRC (eng. *MMR-deficient and MSI-high*, dMMR-MSI-H), koji se javlja u oko 15% slučajeva sporadične bolesti i ima bolju prognozu, ali je refraktoran (neosetljiv) na tretman 5-fluorouracilom (5-FU).³⁷

Za razliku od CIN i MSI mehanizama genomske nestabilnosti, CIMP podrazumeva epigenetičke alteracije koje se ogledaju u visokom nivou metilacije citozinskih ostataka u okviru sekvence dinukleotidnih CG ponovaka (eng. *5'-C-phosphate-G-3'*, CpG) u promotorima određenih tumor-supresorskih gena.^{26,28} CIMP mehanizmom nastaje oko 20% sporadičnih CRC koji su u velikoj meri asocirani sa hipermetilacijom promotora *MLH1* gena, seratnim putem karcinogeneze, proksimalnom lokalizacijom, ženskim polom, starijom životnom dobi, lošom histologijom i *BRAF* mutacijama.^{1,26,28} Međutim, translacija ovog patofiziološkog aspekta u kliničku praksu i dalje je nepotpuna zbog odsustva standardizovane definicije CIMP-visokih (eng. *CIMP-high*, CIMP-H)

CRC. Geni *MLH1*, *MINT1*, *CACNA1G* i *CDKN2A* su najčešće testirani geni za CIMP, ali trenutno nema konsenzusa u pogledu toga koje sve gene treba uključiti u CIMP panelima za testiranje, koje granične vrednosti treba koristiti za definisanje CIMP-H i koja metodologija je najadekvatnija za ovo testiranje.²⁶

Iako su nabrojani patofiziološki mehanizmi distinktni, oni se međusobno ne isključuju. Pa su tako MSI i CIMP mehanizmi u korelaciji s obzirom da do visokog nivoa MSI dovodi inaktivacija MMR gena hipermetilacijom CpG ostrvaca, što je karakteristično za CIMP. U oko 12% svih CRC neoplastična transformacija započinje CIMP mehanizmom, ali nakon epigenetičke inaktivacije *MLH1* gena primat preuzima MSI mehanizam koji dovodi do dalje rapidne akumulacije mutacija, te je približno 70% MSI-H CRC takođe i CIMP-H. Ovakvi tumori imaju MSI fenotip iako je pozadinski mehanizam CIMP, a najčešće ih odlikuju i aktivirajuće *BRAF* mutacije.²⁸ Takođe, nastanak malog procenta svih CRC, koji su definisani sindromom nalik Lynch sindromu (eng. *Lynch-like syndrome*), započinje CIN putem koji dovodi do bialelskih mutacija na jednom od DNK MMR gena, nakon čega MSI mehanizam nadvladava prethodni fenotip.²⁸ Kako bi se bolje okarakterisali ovakvi slučajevi CRC, nova klasifikacija konsenzusnih molekularnih podtipova (eng. *consensus molecular subtype*, CMS) uzima u obzir i patološke karakteristike tumora i gensku ekspresiju na osnovu kojih svrstava CRC u jednu od četiri podtipa: CMS1, MSI-imunski (hipermutiran, mikrosatelitno nestabilan sa jakom imunskom aktivacijom); CMS2, kanonski (epitelni, okarakterisan aktivacijom Wnt/MYC signalizacije); CMS3, metabolički (epitelni, izražena metabolička deregulacija); i CMS4, mezenhimalni (izražena TGF- β aktivacija, stromalna invazija i angiogeneza).³⁸

1.1.4. Putevi kolorektalne karcinogeneze

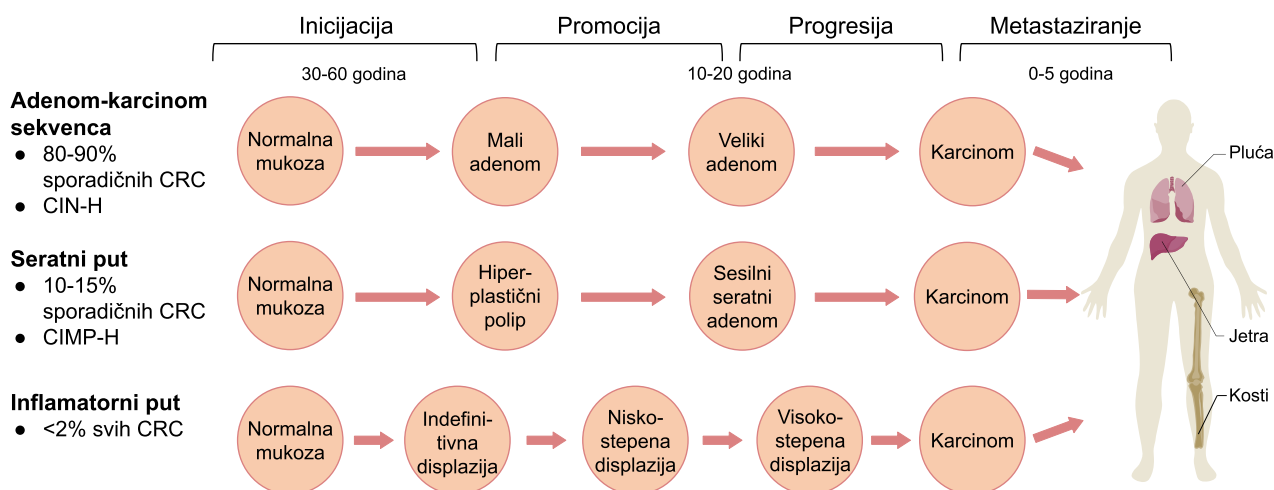
Razlikuju se tri puta nastanka CRC (Slika 5):

- 1) adenom-karcinom sekvenca,
- 2) seratni put i
- 3) inflamatorni put.¹

Adenom-karcinom sekvenca je opisana pre više od tri decenije i predstavlja klasični put karcinogeneze u kojem je adenom prekursor CRC.³¹ U ovom modelu, koji objašnjava većinu CRC slučajeva, postepeno višestepeno nakupljanje genetičkih i epigenetičkih promena dovodi do transformacije normalnih ćelija crevne mukoze preko malog i velikog adenoma do karcinoma.^{31,33,39} Adenom-karcinom sekvenca je dominantno u vezi sa CIN patofiziološkim mehanizmom nastanka CRC, iako ostaje nejasno da li CIN leži u osnovi akumulacija mutacija u pogođenim tumor-supresorskim genima i onkogenima ili obrnuto.³⁹ Kao što je već opisano u objašnjenju CIN mehanizma (videti sekciju 1.1.3), inaktivirajuće mutacije tumor-supresorskog *APC* gena rezultiraju povišenom aktivacijom Wnt/ β -katenin signalnog puta, što dovodi do deregulacije ćelijske proliferacije i razvoja adenoma; potonje mutacije u onkogenu *KRAS* podstiču rast adenoma, dok inaktivacija *TP53* tumor-supresorskog gena doprinosi progresiji CRC.

Drugi put karcinogeneze je seratni put u kojem se CRC razvija od seratnih adenoma koji su uglavnom sesilni. Ovaj model podrazumeva progresiju od normalnih ćelija crevne mukoze preko hiperplastičnog polipa i sesilnog seratnog adenoma do karcinoma.^{40,41} Dva molekularna događaja su karakteristična za seratni put, od kojih prvi doprinosi formiranju hiperplastičnih polipa i podrazumeva aktivirajuće mutacije *BRAF* onkogeni (od kojih je najčešća V600E, tačkasta mutacija u egzonu 15 koja uzrokuje aminokiselinsku supstituciju p.Val600Glu), koje dovode do nekontrolisane proliferacije ćelija kroz konstitutivnu aktivaciju MAPK signalnog puta.^{41,42} CIMP je drugi događaj koji potom dovodi do dalje progresije hiperplastičnog polipa u sesilni seratni adenom i karcinom.⁴¹ Pokazano je da CIMP-H adenomi i karcinomi najčešće nastaju seratnim putem karcinogeneze, odnosno čak 75% seratnih adenoma i 90% seratnih adenokarcinoma je CIMP-H.^{1,26}

Treći put karcinogeneze je povezan sa hroničnom inflamacijom. Kod pacijenata sa IBD put karcinogeneze ide od odsustva displazije, preko indefinitivne, niskostepene i visokostepene displazije do CRC.⁴³ Za razliku od diskretnih displastičnih prekursorskih lezija kao što su adenomi ili seratni adenomi u drugim putevima, displazija koja se javlja u kontekstu hronične inflamacije je često prisutna multifokalno u ravni mukoze što otežava detekciju lezija. Vremenski okvir i učestalost molekularnih događaja se takođe razlikuju. Za razliku od adenom-karcinom sekvence, gde se mutacije u *APC* i *TP53* gena događaju rano i kasno u karcinogenezi, u inflamatornom putu mutacije u *TP53* genu predstavljaju rani događaj, dok mutacije *APC* gena najčešće izostaju, a ukoliko su prisutne događaju se kasno u karcinogenezi.⁴³



Slika 5. Putevi kolorektalne karcinogeneze. Detaljno objašnjenje i razlike između puteva nastanka CRC dato je u tekstu. Preuzeto i modifikovano od Keum i sar.¹

1.1.5. Prirodni tok CRC

Prirodni tok CRC može se podeliti u četiri osnovne faze: inicijacija, promocija, progresija i metastaziranje (Slika 5).¹ Inicijacija podrazumeva ireverzibilna oštećenja genetičkog materijala koja predisponiraju pogođene ćelije na neoplastičnu transformaciju. U fazi promocije, inicirane ćelije proliferišu i izazivaju abnormalni rast (neoplaziju). U narednoj fazi progresije, genetičke i epigenetičke promene koje slede pružaju selektivnu prednost ćelijskom rastu, a benigne tumorske ćelije se transformišu u maligne i stiču sve odlike malignih ćelija i metastatski potencijal. Metastaziranje je poslednja faza koja podrazumeva širenje malignih ćelija iz primarnog organa nastanka u druge organe ili tkiva kroz krvotok ili limfni sistem. Trajanje svake pojedinačne faze je teško proceniti, ali se smatra da su decenije potrebne za kompletnu transformaciju od normalne mukoze creva do invazivnog karcinoma.

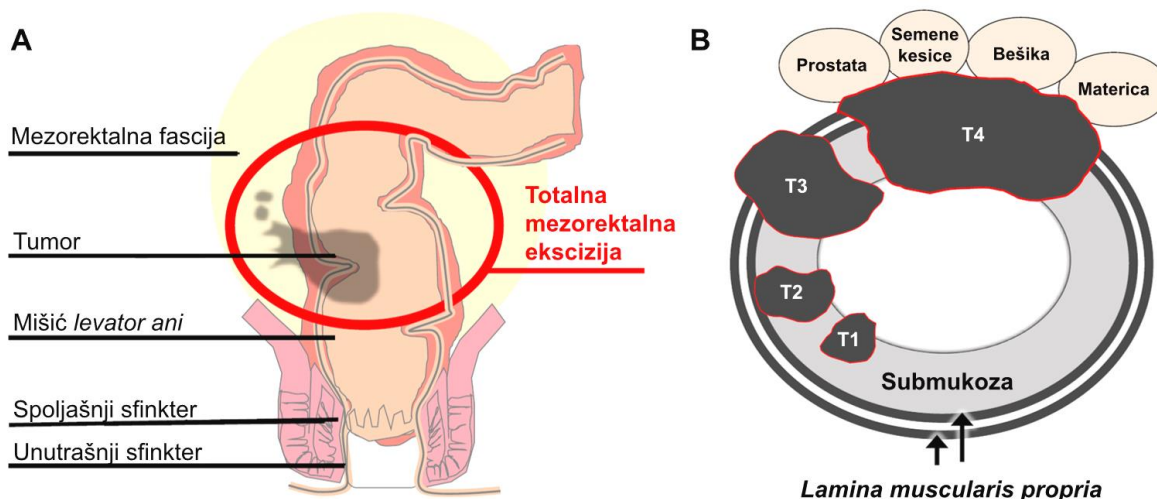
1.1.5.1. Lokalno uznapredovali karcinom rektuma

Oko trećinu CRC čine rektalni karcinomi, dok je blizu 45% dijagnostikovanih karcinoma rektuma lokalno uznapredovalo (eng. *locally advanced rectal cancer*, LARC), što ih čini najčešćom formom karcinoma rektuma.^{44,45} LARC se definiše na osnovu TNM stadijuma (eng. *Tumor, Node, Metastasis*, TNM) kao primarni karcinom rektuma bez udaljenih metastaza (M0 stadijum), stadijuma T3-4 sa ili bez infiltracije regionalnih limfnih nodusa (bilo koji N stadijum) ili bilo kog stadijuma T (T1-4) sa infiltracijom regionalnih limfnih nodusa (N1-2 stadijumi), odnosno kao II i III stadijum bolesti (videti sekciju 1.1.6).^{46,47} Određivanje T stadijuma prema TNM klasifikaciji zasniva se na

dubini invazije karcinoma u odnosu na mišićni sloj zida rektuma (lat. *lamina muscularis propria*), pri čemu su karcinomi rektuma stadijuma T1 ograničeni na mukozu i submukozu, T2 infiltrišu, ali ne probijaju mišićni sloj zida rektuma, T3 propagiraju izvan mišićnog sloja i infiltrišu mezorektalno masno tkivo, pri čemu mogu i ne moraju zahvatati mezorektalnu fasciju, dok T4 infiltrišu okolne organe ili peritoneum (Slika 6).⁴⁶

Savremeni terapijski protokol za lečenje LARC, koji je značajno smanjio stope lokalnog recidiva i unapredio preživljavanje, podrazumeva primenu neoadjuvantne hemioradioterapije (eng. *neoadjuvant chemoradiotherapy*, nCRT) i hiruršku resekciju metodom koja se naziva totalna mezorektalna ekscizija (eng. *total mesorectal excision*, TME; Slika 6). Iako je uvođenje i kombinovanje unapređenih neoadjuvantnih, hirurških i adjuvantnih terapijskih modaliteta dovelo do presudnog napretka u lečenju LARC, stope lokalnog i udaljenog recidiva su i dalje zabrinjavajuće visoke i trećina pacijenata obolelih od LARC umire u roku od 5 godina od završetka terapije.⁴⁸

Lečenje LARC pacijenata uvođenjem nCRT podrazumeva kliničko praćenje odgovora i za cilj ima preoperativno smanjenje stadijuma i veličine tumora (eng. *downstaging and downsizing*) i izbegavanje hirurške resekcije u slučajevima dobrog terapijskog odgovora. Ova organ prezervirajuća strategija se primenjuje u okviru tzv. *watch and wait* (WW) protokola, koji podrazumeva da se pacijenti sa kompletnim kliničkim odgovorom na nCRT podvrgavaju intenzivnom praćenju umesto radikalnoj resekciji.⁴⁹ Neki od najvećih izazova u lečenju LARC pacijenata i implementaciji WW protokola su varijabilan klinički odgovor nakon primene nCRT, nemogućnost precizne predikcije odgovora, odsustvo potpune korelacije između kliničkog i patološkog odgovora, nizak procenat pacijenata sa kompletnim patološkim odgovorom (svega 10%), kao i blagovremena detekcija lokalnog recidiva kod pacijenata sa inicijalnim kompletnim kliničkim odgovorom.^{49,50} Pored otkrića novih i inovativnih tretmana koji bi povećali stope kompletnog odgovora, neophodno je otkriće molekularnih biomarkera za precizniju i efikasniju evaluaciju odgovora na terapiju. U budućnosti bi molekularni markeri trebalo da omoguće stratifikaciju pacijenta na one koji bi imali benefite od primene nCRT i one kod kojih bi dobar odgovor izostao i trebalo bi primeniti druge terapijske modalitete radi postizanja optimalnog onkološkog rezultata.



Slika 6. Hirurško lečenje (A) i tumorski T stadijumi (B) karcinoma rektuma. Totalna mezorektalna ekscizija (TME) je standardna hirurška procedura za lečenje karcinoma rektuma kojom se u potpunosti resekcira rektum, okolno mezorektalno masno tkivo, perirektalni limfni čvorovi i mezorektalna fascija (A). Određivanje tumorskog (T) stadijuma karcinoma rektuma prema TNM klasifikaciji zasnovano je na dubini invazije karcinoma u odnosu na mišićni sloj zida rektuma (lat. *lamina muscularis propria*); (B). Preuzeto i modifikovano od Oronsky i sar.⁴⁶

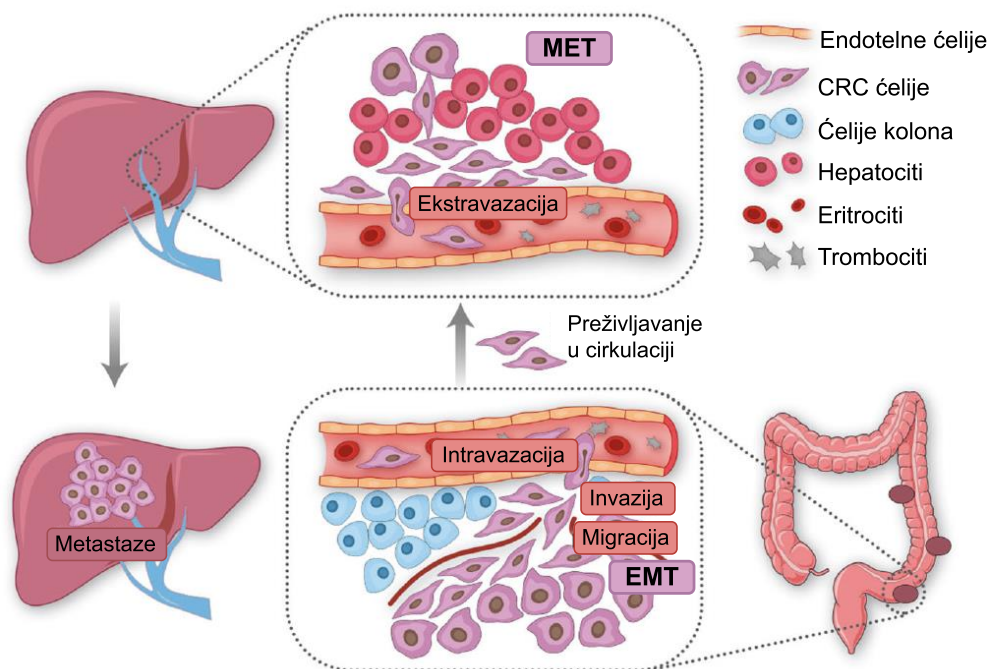
1.1.5.2. Metastatski CRC

Maligne tumore odlikuje sposobnost metastaziranja, što podrazumeva odvajanje tumorskih ćelija od primarnog mesta nastanka, migraciju, invaziju krvnih ili limfnih sudova, diseminaciju i krajnje, kolonizaciju udaljenog, sekundarnog tkiva ili organa (Slika 7).⁸ Epitelno-mezenhimska tranzicija (eng. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) je proces u kojem tumorske ćelije podležu dediferencijaciji na invazivnom frontu kako bi stekle fenotip nalik mezenhimskom i omogućile invaziju i metastaziranje tumorskih ćelija.⁵¹ Ovaj proces, koji je ključan za diferencijaciju tkiva i organa u toku embrionalnog razvića, ponovo se aktivira u adultnom organizmu tokom zarastanja rana, regeneracije tkiva, ali i fibroze organa i kancerske progresije.^{52,53} EMT ćeliji obezbeđuje svojstva migratornosti, invazivnosti i matičnosti, sprečava apoptozu i starenje i doprinosi imunosupresiji.⁵⁴ Ovakvo mezenhimsko stanje je povezano sa sposobnošću ćelija da migriraju u udaljene organe i održava matičnost, što omogućava njihovu kasniju diferencijaciju u više tipova ćelija tokom iniciranja i razvoja metastaza.⁵⁴ Epitelne ćelije moraju podleći morfološkim i funkcionalnim promenama koje favorizuju invaziju, kao što su gubitak apikalno-bazalnog polariteta, reorganizacija citoskeleta i promena oblika ćelije, gubitak međućelijskih veza posredovanih E-kadherinom, kao i remodelovanje ekstracelularnog matriksa i degradacija bazalne membrane posredstvom metaloproteinaza.⁵⁴ Svaki korak u metastatskom širenju podrazumeva genetičke i epigenetičke promene, ali tačan mehanizam koji leži u osnovi ovih promena i dalje nije u potpunosti rasvetljen. Genetičke promene uključuju aktivaciju većeg broja signalnih puteva, od kojih su najznačajniji TGF- β , Wnt signalizacija i tirozinkinazni receptori (eng. *receptor tyrosine kinases*, RTKs), koji modifikuju ekspresiju grupe transkripcionih faktora asociiranih sa EMT (SNAIL, ZEB i TWIST), što za posledicu ima smanjenje ekspresije intercelularnog adhezionog proteina E-kadherina i povećanje ekspresije mezenhinskog N-kadherina, odnosno gubitak povezanosti sa epitelnim i sticanje afiniteta ka mezenhimskim ćelijama.^{51,53,55} TGF- β signalizacija posredstvom intracelularnih SMAD proteina reguliše SNAIL ekspresiju, pri čemu je SMAD4 značajan negativan regulator ove kaskade jer suprimira STAT3 aktivaciju koja dalje pospešuje ZEB1 ekspresiju i EMT.⁵⁶ Wnt signalizacija pospešuje EMT proces posredstvom β -katenina, koji u interakciji sa TCF4 u jedru direktno aktivira ZEB1 i SNAIL ekspresiju.⁵⁶ RTKs stimulišu EMT proces aktivacijom RAS-RAF-MEK-ERK MAPK signalnog puta nakon vezivanja epidermalnog, fibroblasnog ili hepatocitnog faktora rasta, što dovodi do promene SNAIL, SNAI2 i TWIST1 ekspresije.^{53,56} Epigenetičke promene podrazumevaju utišavanje ekspresije epitelnih proteina kroz aktivnost mikroRNK (miRNK), kao i represiju ekspresije miRNK koje ciljno deluju na mezenhimske karakteristika, što takođe pospešuje EMT.⁵³ Sekundarni metastatski depoziti uglavnom ispoljavaju morfološke karakteristike primarnog tumora (a ne invazivni mezenhimski fenotip) što ukazuje na rediferencijaciju, odnosno proces mezenhimsko-epitelne tranzicije (eng. *mesenchymal-epithelial transition*, MET) migrirajućih ćelija nakon kolonizacije udaljenog tkiva ili organa (Slika 7).⁵¹

Metastatska bolest karcinoma kolorektuma podrazumeva prisustvo sekundarnih depozita u udaljenim organima i predstavlja uznapredovali IV stadijum bolesti (bilo koji stadijumi T i N i stadijum M1; videti sekciju 1.1.6). Smatra se da gotovo trećina pacijenata obolelih od CRC ima metastaze u vreme dijagnostikovanja primarnog karcinoma (sinhrona bolest), dok polovina razvija metastaze u daljem toku bolesti (metahrona bolest).⁵⁷ CRC najčešće daje udaljene metastaze u jetri (u oko 50% slučajeva) što je u vezi sa činjenicom da portni venski sistem direktno povezuje kolorektum i jetru i smatra se glavnim putem diseminacije.⁵⁷⁻⁵⁹ Pluća su drugi najčešći organ u koji CRC metastazira (u 10-15% slučajeva), a oboleli od karcinoma rektuma imaju veći rizik za pojavu sinhronih i metahronih metastaza pluća u odnosu na one sa karcinomom kolona.^{57,60} CRC ređe metastazira u udaljene limfne čvorove, peritoneum, kosti i centralni nervni sistem.⁶⁰

Glavni uzrok umiranja od CRC je razvoj kolorektalnih metastaza u jetri (eng. *colorectal liver metastases*, CLM).⁵⁷ Više od 30% pacijenata sa dijagnostikovanim CRC razvije CLM u toku bolesti, dok blizu 20% obolelih već ima jednu ili više metastatskih depozita u jetri prilikom dijagnostikovanja primarne bolesti.⁶¹ Hirurška resekcija jetre i dalje predstavlja najefikasniju terapiju CLM sa

petogodišnjim preživljavanjem preko 40%, ali manje od 20% pacijenata su kandidati za ovaj modalitet lečenja.⁵⁸ Kod većine pacijenata sa CLM izlečenje nije moguće uprkos svim naprecima u dijagnostici i lečenju bolesti u doba personalizovane medicine. Ipak, preživljavanje obolelih od CLM je značajno unapređeno poslednjih decenija i iznosi više od 30 meseci, što je posledica implementacije novih terapijskih protokola koji podrazumevaju hirurško lečenje, neoadjuvantnu i adjuvantnu hemioterapiju i inovativne biološke lekove.⁶²



Slika 7. Šematski prikaz kaskade događaja u metastaziranju karcinoma kolorektuma u jetru. Ova kaskada podrazumeva biološki proces u kojem mala podgrupa ćelija primarnog CRC stiče invazivne sposobnosti morfološkim promenama koje omogućava epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT), lizom ekstracelularnog matriksa, invazijom susjednih tkiva, intravazacijom, preživljavanjem u cirkulaciji, ekstravazacijom, i na kraju, kolonizacijom jetre i formiranjem sekundarnih depozita u procesu mezenhimsko-epitelne tranzicije (MET). Preuzeto i modifikovano od Zhou i sar.⁵⁹

1.1.6. Dijagnostika CRC

Preoperativna dijagnostika je od velikog značaja za donošenje optimalnog plana lečenja CRC. Osnovne dijagnostičke metode uključuju klinički pregled, digitorektalni pregled i endoskopiju (rektoskopiju, sigmoidoskopiju i kolonoskopiju) kojom se vrši biopsija suspektne lezije. Dijagnoza CRC se postavlja histopatološkim pregledom endoskopskih biopsija nakon čega se pacijent podvrgava daljim procedurama radi utvrđivanja stepena uznapredovalosti bolesti i rasprostranjenosti tumora. Ove procedure uključuju vizuelne metode pregleda (radiološke, „imidžing“ metode), kao što su kompjuterizovana tomografija (eng. *computed tomography*, CT), magnetna rezonanca (eng. *magnetic resonance imaging*, MRI) i pozitronska emisija tomografija (eng. *positron-emission tomography*, PET), kojima se određuje klinički stadijum tumorske bolesti (eng. *clinical TNM*, cTNM).⁶³ Takođe se određuju vrednosti serumskih tumor markera karcinoembrionskog antigena (eng. *carcinoembryonic antigen*, CEA) i karbohidratnog antigena 19-9 (eng. *carbohydrate antigen 19-9*, CA 19-9), kako bi se omogućilo praćenje dinamike bolesti. Odluka o terapiji se donosi na osnovu opšteg zdravstvenog stanja pacijenta, cTNM stadijuma, ali i molekularnih markera (npr. mutacioni status *KRAS*) koji determinišu osetljivost tumora na pojedine sistemske terapije.

Radiološke metode se koriste i za ponovno određivanje stadijuma tumorske bolesti (eng. *restaging*) nakon primljene terapije (ycTNM). Patološki stadijum tumorske bolesti (eng. *pathological TNM*, pTNM) određuje se histopatološkim pregledom resekata nakon hirurškog odstranjivanja tumora, a ukoliko je hirurškom lečenju prethodila neoadjuvantna terapija dodatno se određuje i regresioni status bolesti (ypTNM), odnosno tumor regresioni gradus (eng. *tumor regression grade*, TRG).⁶³

Za procenu stadijuma tumorske bolesti određuju se sledeći parametri: tumorski stadijum (T) koji se, kao što je već pomenuto, definiše dubinom penetracije tumora u slojeve zida debelog creva ili okolnih tkiva i organa; limfonodalni stadijum (N), koji se definiše lokalnim metastatskim širenjem bolesti u regionalne limfne noduse ili satelitskim ekstramuralnim nodularnim strukturama koje se nazivaju tumorski depoziti; metastatski stadijum (M), koji se definiše odsustvom odnosno prisustvom udaljenih metastaza na mestima i/ili organima izvan područja primarnog tumora i definisanih regionalnih limfnih nodusa.⁶⁴ U kliničkoj praksi se za procenu CRC stadijuma najčešće koristi priručnik za određivanje stadijuma bolesti Američkog udruženog komiteta za rak (eng. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC), a TNM klasifikacija za CRC aktuelnog, osmog izdanja ovog priručnika iz 2017. godine, prikazana je u Tabeli 1.

Tabela 1. TNM klasifikacija kolorektalnog karcinoma prema osmom izdanju priručnika za određivanje stadijuma bolesti Američkog udruženog komiteta za rak (eng. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC). Preuzeto i modifikovano od Amin i sar.⁶⁴

T kategorija	T kriterijum
Tx	Primarni tumor se ne može proceniti
T0	Bez dokazanog prisustva primarnog tumora
Tis	Karcinom <i>in situ</i> , intramukozalni karcinom
T1	Tumor zahvata submukozu
T2	Tumor zahvata sloj <i>muscularis propria</i>
T3	Tumor probija kroz sloj <i>muscularis propria</i> u perikolorektalna tkiva
T4	Tumor direktno zahvata visceralni peritoneum ili zahvata ili adherira okolne organe ili strukture
T4a	Tumor direktno zahvata visceralni peritoneum
T4b	Tumor direktno zahvata ili adherira okolne organe ili strukture
N kategorija	N kriterijum
Nx	Regionalni limfni nodusi se ne mogu proceniti
N0	Regionalni limfni nodusi su bez metastaza (negativni)
N1	Jedan do tri regionalna limfna nodusa su pozitivna na prisustvo metastaza (tumorska infiltracija u limfnom nodusu $\geq 0,2$ mm) ili je prisutan bilo koji broj tumorskih depozita, a svi identifikovani limfni nodusi su negativni
N1a	Jedan regionalni limfni nodus je pozitivan
N1b	Dva ili tri regionalna limfna nodusa su pozitivna
N1c	Nema pozitivnih regionalnih limfnih nodusa, ali su prisutni tumorski depoziti u subserozi, mezenterijumu ili u neperitonealizovanom perikoličnom ili perirektalnom/mezorektalnom tkivu
N2	Četiri ili više regionalnih limfnih nodusa je pozitivno
N2a	Četiri do šest regionalnih limfnih nodusa je pozitivno
N2b	Sedam ili više regionalnih limfnih nodusa je pozitivno

M kategorija	M kriterijum
M0	Nema udaljenih metastaza (na osnovu „imidžing“ metoda)/nema dokaza o tumoru na udaljenim mestima ili organima; ovu kategoriju ne procenjuje patolog
M1	Identifikovane metastaze na jednom ili više udaljenih mesta ili organa ili na peritonealnoj površini
M1a	Metastaze ograničene na jedno mesto ili organ bez peritonealnih metastaza
M1b	Metastaze na dva ili više mesta ili organa bez peritonealnih metastaza
M1c	Metastaze na peritonealnoj površini sa ili bez metastaza na drugim mestima i organima

1.1.6.1. Prognostički faktori CRC

Pregled najznačajnijih prognostičkih faktora CRC predstavljeni su u Tabeli 2.

Tabela 2. Najznačajniji i novi visokoznačajni klinički prognostički faktori karcinoma kolorektuma prema sedmom izdanju priručnika za određivanje tumorskog stadijuma AJCC; prema preporukama Nacionalnog instituta za rak SAD, prognostički faktori su svrstani u više kategorija (I, IIa, IIb, III i IV). Preuzeto i modifikovano od Micev, M.⁶⁵

NAJZNAČAJNIJI KLINIČKI FAKTORI	KATEGORIJA I	KATEGORIJA IIA	KATEGORIJA III
TNM grupni stadijum	pT (stadijum tumora)	G (gradus, tj. stepen histološkog maligniteta)	Peritumorska fibroza i inflamatorni odgovor
R (rezidualni status)	pN (limfonodalni status)	CRM (cirkumferentna resekciona margina)	Fokalna neuroendokrina diferencijacija
sCEA (nivo serumskog karcinoembrionalnog antigena)	R kategorija (prisustvo rezidualnog tumora)	TRG (tumor regresioni gradus, nakon neoadjuvantne terapije)	KRAS mutacioni status i efekti anti-EGFR ciljane terapije
NOVI FAKTORI	pV (vaskularna invazija)	KATEGORIJA IIB	Mikrovaskularna gustina
TD (tumorski depoziti)	TD (tumorski depoziti)	Histološki tip	DNK sadržaj tumorskih ćelija
CRM distanca (cirkumf. resekcione margine od tumora)	LN(mi)+ (mikrometastaze)	Odnos tumorska margina/okolina	Proliferativna aktivnost
PN (perineuralna invazija)	Povišen nivo sCEA	PN (perineuralna invazija)	Površinski ćelijski molekuli
MSI (mikrosatelitska nestabilnost tumora)		MSI (mikrosatelitska nestabilnost)	KATEGORIJA IV
TRG (tumor regresioni gradus, nakon neoadjuvantne terapije)		TIL (tumor-infiltrativni limfociti)	Ostali ispitivani parametri CRC
KRAS mutacioni status		DCC mutacija (18q delecija)	

Nezavisni prognostički faktori kolorektalnog karcinoma, koji obezbeđuju informaciju o ishodu bolesti nezavisno od primenjenog terapijskog modaliteta i imaju veoma značajnu ulogu u određivanju terapije, su: ukupni stadijum tumorske bolesti (TNM grupni stadijum), rezidualni status (R kategorija), zahvaćenost/udaljenost tumora od cirkumferentne resekcione margine (eng. *circumferential resection margin*, CRM), prisustvo tumorskih depozita (TD), limfovaskularna (L), venska (V), perineuralna (PN) invazija, TRG nakon neoadjuvantne terapije i vrednosti serumskog tumor markera CEA.^{65,66} U skladu sa preporukama američkog Nacionalnog instituta za rak, nezavisni prognostički faktori su na osnovu nivoa naučnih dokaza svrstani u kategorije najznačajnijih, visokoznačajnih, verovatnih i mogućih (kategorije I, II, III i IV, redom; Tabela 2).⁶⁵ Najznačajniji prognostički faktori se saopštavaju kao komponente pTNM klasifikacije i čine sastavni deo dijagnoze i zaključka histopatoloških ispitivanja u rutinskoj kliničkoj praksi.

Kao što je naglašeno, jedan od najznačajnijih prognostičkih faktora za CRC je TNM grupni stadijum, na osnovu kojeg se pacijenti stratifikuju u određene kliničke i prognostičke kategorije. Prognostičke grupe prema preporukama osmog izdanja AJCC priručnika za određivanje tumorskog stadijuma prikazane su u Tabeli 3.⁶⁴

Tabela 3. AJCC prognostički CRC stadijumi na osnovu TNM klasifikacije prema osmom izdanju priručnika za određivanje tumorskog stadijuma. Preuzeto i modifikovano od Amin i sar.⁶⁴

Kada je T...	I N...	I M...	Onda je grupni stadijum...
Tis	N0	M0	0
T1-T2	N0	M0	I
T3	N0	M0	IIA
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
T1-T2	N1/N1c	M0	IIIA
T1	N2a	M0	IIIA
T3-T4a	N1/N1c	M0	IIIB
T2-T3	N2a	M0	IIIB
T1-T2	N2b	M0	IIIB
T4a	N2a	M0	IIIC
T3-T4a	N2b	M0	IIIC
T4b	N1-N2	M0	IIIC
Bilo koji T	Bilo koji N	M1a	IVA
Bilo koji T	Bilo koji N	M1b	IVB
Bilo koji T	Bilo koji N	M1c	IVC

1.1.7. Lečenje CRC

Odabir terapije za pacijente obolele od CRC podrazumeva multidisciplinarni pristup koji se zasniva na tumor-zavisnim faktorima (kao što su tumorska lokalizacija, stadijum bolesti, stepen diferencijacije, veličina i biološke odlike tumora, postojanje i lokalizacija metastaza, biohemijski markeri, itd) i pacijent-zavisnim faktorima (opšte stanje pacijenta, starost i prateći komorbiditeti, itd).⁶⁶ Kod pacijenta I/II stadijuma bolesti, hirurška resekcija sa kurativnom namerom je primarna terapija kojoj se pridružuje adjuvantna sistemska terapija kod visoko-rizičnih pacijenata II stadijuma.⁶⁷ Za III stadijum karcinoma kolona, dublet hemioterapija, koja podrazumeva

fluoropirimidine i oksaliplatin, unapredila je preživljavanje, dok je neoadjuvantna hemioradioterapija poboljšala ishod bolesti kod LARC pacijenata.⁶⁷ Iako je uvođenje multimodalne terapije i unapređenje hirurške tehnike smanjilo stope lokalnog recidiva, pojava udaljenih metastaza je i dalje česta. Hirurgija je jedina kurativna opcija za pacijente IV stadijuma bolesti, s obzirom da se kod manje od 0,5% metastatskih pacijenata izlečenje postigne samo hemioterapijom.⁶⁷ Stoga je jedan od glavnih izazova u lečenju CRC konvertovati neresektabilnu metastatsku bolest u resektabilnu kombinovanjem hemioterapije, odnosno citotoksičnih agenasa i bioloških ciljanih lekova.

Sistemska terapija karcinoma kolorektuma zasniva se na upotrebi fluoropirimidina 5-FU, analoga uracila sa atomom fluora umesto vodonika na poziciji C5.^{68,69} Mehanizam delovanja 5-FU podrazumeva inhibiciju timidilat sintaze, enzima koji učestvuje u sintezi pirimidina.⁶⁹ 5-FU se uglavnom primenjuje sa redukovanim folatom leukovorinom, koji stabilizuje vezivanje 5-FU za timidilat sintazu, što dodatno pospešuje i prolongira inhibiciju DNK sinteze.⁶⁸ Iako je terapija bazirana na 5-FU značajno unapredila ukupno preživljavanje i preživljavanje bez recidiva kod pacijenata sa resekovanim karcinomom kolona III stadijuma, stope odgovora su samo 10-15% kada se koristi kao prva linija terapije kod pacijenata uznapredovalog IV stadijuma CRC.⁶⁹ Zbog toga se kod metastatske bolesti 5-FU primenjuje u kombinaciji sa jednim ili više hemioterapeutika, kao što su irinotekan, oksaliplatin i kapecitabin, što je povećalo stope odgovora na 40-50% i produžilo ukupno preživljavanje na 20 meseci.^{69,70} Irinotekan je polusintetički derivat prirodnog alkaloida kamptotecina koji ispoljava citotoksično dejstvo stabilizujući jednolančane prekide DNK nastale delovanjem enzima koji učestvuje u odmotavanju DNK u replikaciji i transkripciji (topoizomeraza I).⁶⁸ Nemogućnost pravovremene reparacije jednolančanih prekida dovodi do fragmentacije DNK i smrti ćelije putem interakcije sa replikacionom viljuškom.⁶⁸ Oksaliplatin je derivat platine treće generacije (nakon cisplatine i karboplatine) koji formira DNK adukte i indukuje ćelijsku smrt.^{68,71} Kapecitabin je oralni fluoropirimidin dizajniran kao prolek kako bi se izbegla njegova degradacija u jetri enzimom dihidropirimidin dehidrogenazom (DPD), a koji se u organizmu enzimski konvertuje u 5-FU u tri koraka.^{68,69} Oksaliplatin se najuspešnije primenjuje kao prva ili druga linija terapije kod pacijenata sa metastatskim CRC u kombinaciji sa 5-FU i leukovorinom u okviru FOLFOX režima.⁶⁸ Ostale kombinovane terapije koje se često primenjuju u prvoj liniji lečenja su FOXFIRI (5-FU + irinotekan), CAPOX (kapecitabin + oksaliplatin) i CAPIRI (kapecitabin + irinotekan).⁷⁰ Veća efikasnost režima sa više agenasa kao što je FOLOXIRI (5-FU + oksaliplatin + irinotekan) nije potvrđena u novijim studijama, a ređe se primenjuje i zbog povećane toksičnosti.⁷⁰

Terapijske opcije za CRC pacijente sa metastatskom bolešću proširene su uvođenjem humanizovanih monoklonalnih antitela kao lekova koji targetuju specifične molekule i signalne puteve sa značajnom ulogom u kolorektalnoj karcinogenezi.^{70,72} Ove biološke, ciljane terapije deluju na tumorske ćelije tako što direktno inhibiraju njihovu proliferaciju, diferencijaciju i migraciju.^{70,72} Pored toga, ovi biološki agensi mogu modifikovati tumorsku mikrosredinu, uključujući lokalne krvne sudove i imunske ćelije, sprečavajući na taj način tumorski rast i istovremeno podstičući imunološki nadzor i odgovor.⁷⁰ Najčešće molekularne mete koje biološke terapije inhibiraju, i tako ometaju rast tumorskih ćelija i pokreću apoptozu, su ciklin zavisne kinaze, proteazomi i poli (ADP-riboza) polimeraze (PARP).⁷⁰ U terapiji uznapredovalog CRC od 2004. godine primenjuju se bevacizumab i cetuksimab (monoklonalna antitela na vaskularni endotelni faktor rasta A (eng. *vascular endothelial growth factor A*, VEGF-A) i EGFR, redom), dok je od 2006. godine uveden i panitumumab (anti-EGFR antitela). Do danas je za lečenje CRC u upotrebu ušao veći broj anti-VGF/VGFR agenasa (ziv-aflibercept, regorafenib i ramucirumab) kao i inhibitora kontrolnih imunoloških tačaka (pembrolizumab, nivolumab i ipilimumab).⁷⁰ Različite kombinacije bioloških i hemioterapeutskih lekova su u upotrebi u kliničkoj praksi.

1.1.7.1. Prediktivni faktori CRC

Sa identifikacijom sve većeg broja efikasnih agenasa za lečenje CRC pojavila se potreba za prediktivnim markerima za odabir optimalnih terapijskih režima, što je naročito važno zbog postojanja varijabilnosti u tumorskom odgovoru i toksičnih efekata terapije. Prediktivni markeri definišu efekte terapije na tumor i obezbeđuju informaciju o ishodu specifičnog terapijskog modaliteta.⁶⁶ Poslednjih godina, prepoznat je potencijal genetičkih i epigenetičkih alteracija kao efikasnih prediktivnih molekularnih markera, što je dovelo do intenzivnih istraživanja u ovoj oblasti i uvođenja pojedinih markera u rutinsku kliničku praksu. Istraživanje mehanizama rezistencije na lečenje cetuksimabom pokazalo je potencijal upotrebe mutiranih gena u personalizaciji lečenja. Naime, stopa odgovora na terapiju anti-EGFR antitelima kod pacijenata sa mutacijama u kodonima 12 i 13 egzona 2 *KRAS* gena su drastično niže u odnosu na nosioce alela divljeg tipa (eng. *wild-type*, WT).^{73,74} Funkcionalne studije pokazale su da mutacije *KRAS* gena dovode do nekontrolisane aktivnosti *KRAS* proteina nezavisne od EGFR signalizacije i validirale su potencijal mutacionog statusa *KRAS* gena kao prediktivnog biomarkera odgovora na terapiju anti-EGFR antitelima, koji je uveden u kliničku upotrebu.⁷⁴ Još nekoliko molekularnih biomarkera pokazalo je prediktivni potencijal u okviru različitih istraživanja, kao što su *BRAF*, *PIK3CA* i *PTEN* mutanti, ali je neophodna dodatna validacija pre eventualne rutinske kliničke upotrebe.⁷⁴ Istraživački naponi su takođe usmereni na identifikaciju molekularnih karakteristika CRC koje predviđaju odgovor na sistemsku hemioterapiju citotoksičnim agensima 5-FU, irinotekanom i oksaliplatinom.

1.2. TGF- β signalni put

Superfamilija TGF- β otkrivena je tokom potrage za autokrinim faktorima koje sekretuju tumorske ćelije, a koje pospešuju malignu transformaciju.⁷⁵ Daljim istraživanjima ove velike familije proteina i istoimenog signalnog puta postalo je jasno da igraju značajnu ulogu u regulaciji širokog spektra razvojnih i homeostatskih procesa i da je signalna kaskada narušena u mnogobrojnim bolestima, uključujući i maligne bolesti.⁷⁶ TGF- β signalizacija posredovana SMAD intracelularnim medijatorima predmet je intenzivnog istraživanja u kontekstu maligne evolucije s obzirom da ovaj put reguliše bitne ćelijske procese kao što su proliferacija, diferencijacija, apoptoza, invazija i alteracija mikrosredine koje tumorske ćelije mogu upotrebiti u svoju korist.⁷⁷⁻⁷⁹

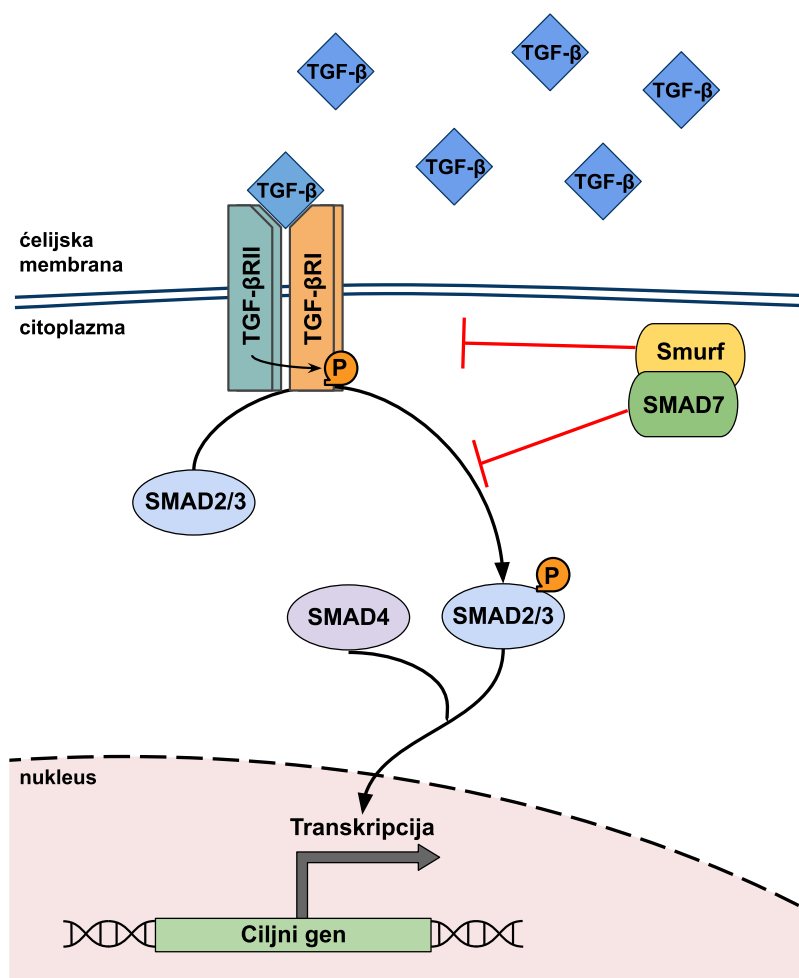
1.2.1. Kaskada i učesnici TGF- β signalnog puta

TGF- β je član po kojem je istoimena superfamilija sekretornih dimernih citokina dobila naziv, a koja je na osnovu razlika u strukturi liganda, aktivacionim procesima i učesnicima signalne transdukcije podeljena na podfamiliju TGF- β , koju čine TGF- β , aktivin i Nodal, i podfamiliju koštanih morfogenetičkih proteina (eng. *bone morphogenetic proteins*, BMPs), čiji su članovi BMPs, faktori rasta i diferencijacije (eng. *growth and differentiation factors*, GDFs) i antimilerijanski hormon (eng. *anti-Müllerian hormone*, AMH).^{78,80} Postoje tri aktivne izoforme TGF- β proteina kod sisara, TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3.^{76,78,81}

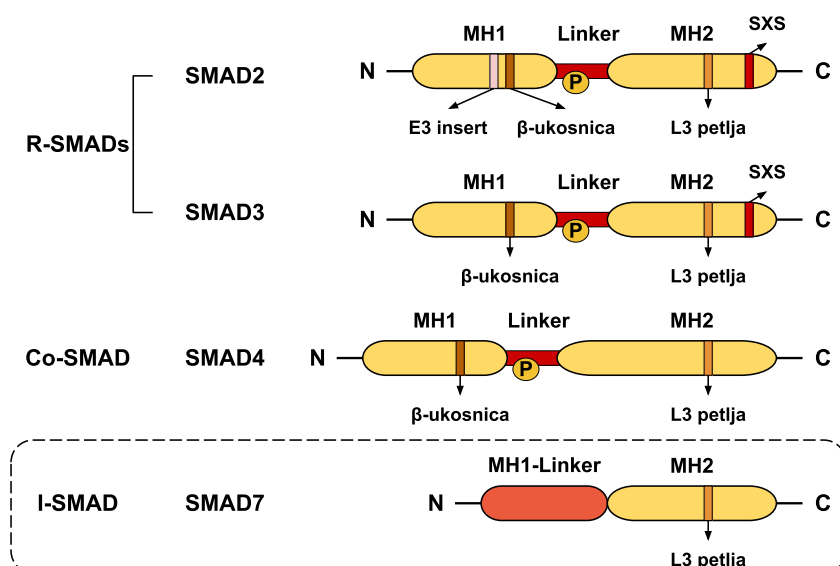
Aktivirani TGF- β dimeri započinju signalnu transdukciju vezivanjem za transmembranske serin/treonin kinazne receptore, receptor tipa I (TGF- β R1) i receptor tipa II (TGF- β R2).^{78,79,82} Receptor tipa III (TGF- β R3), koji je usidren u fosfolipidni dvosloj, ima adaptersku ulogu i omogućava vezivanje liganda za konstitutivno aktivan TGF- β R2.⁷⁸ TGF- β protein se sa visokim afinitetom vezuje za TGF- β R2 i dovodi do formiranja heterotetramernog kompleksa sa TGF- β R1, što rezultuje fosforilacijom TGF- β R1 od strane TGF- β R2.⁷⁸ U klasičnom ili kanonskom signalnom putu (Slika 8), TGF- β R1 pokreće nizvodnu unutarćelijsku signalizaciju regrutovanjem i fosforilacijom SMAD proteina. Receptorom regulisani SMAD proteini (eng. *receptor regulated SMADs*, R-

SMADs), od kojih su SMAD2 i SMAD3 učesnici TGF- β signalizacije, aktiviraju se fosforilacijom C-terminalnog Ser-X-Ser (SXS) motiva MH2 domena (eng. *MAD homology 2*; Slika 9) od strane TGF- β RI.^{78,80} Dalje u signalnoj transdukciji R-SMADs regrutuju SMAD4, označen kao zajednički SMAD (eng. *common SMAD*, Co-SMAD), pri čemu formiraju heterokomplekse SMAD2/3/4 koji se translociraju u jedro i zajedno sa drugim transkripcionim faktorima i koregulatorima učestvuju u regulaciji ekspresije ciljnih gena.⁷⁸ Kada se nađe u nukleusu, fosfo-R-SMADs-SMAD4 kompleks se MH1 (eng. *MAD homology 1*) amino-terminalnim domenom može vezati direktno za specifične DNK sekvence (eng. *smad binding elements*, SBEs) i na taj način učestvovati u aktivaciji ili inhibiciji ciljnih gena.⁷⁶ Transkripcija *SMAD7* gena se upravo ovako aktivira i dovodi do ekspresije SMAD7 proteina, koji pripada grupi inhibitornih SMAD proteina (eng. *inhibitory SMAD*, I-SMAD) i opšti je antagonist TGF- β i BMP signalizacije koji negativnom povratnom spregom inhibira signalnu transdukciju posredstvom nekoliko mehanizama (videti sekciju 1.3), među kojima je i degradacija TGF- β RI regrutovanjem E3 ubikvitin ligaza (Smurf; Slika 8).^{76,80,83}

Pored kanonskog TGF- β signalnog puta posredovanog SMAD medijatorima, postoji TGF- β signalizacija nezavisna od SMAD koja deluje aktivacijom drugih signalnih molekula kao što su MAPK, fosfatidilinozitol 3-kinaza (eng. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K)/protein kinaza B (Akt), RhoA (eng. *Ras homolog family member A*)/ CDC42 (eng. *cell division cycle 42*) GTPaze i drugih.⁸⁰



Slika 8. Šematski prikaz kanonskog TGF- β signalnog puta posredovanog SMAD proteinima. Detaljno objašnjenje ilustrovane signalne kaskade je dato u tekstu. P, fosforilacija. Preuzeto i modifikovano od De Ceuninck van Capelle i sar.⁸⁴



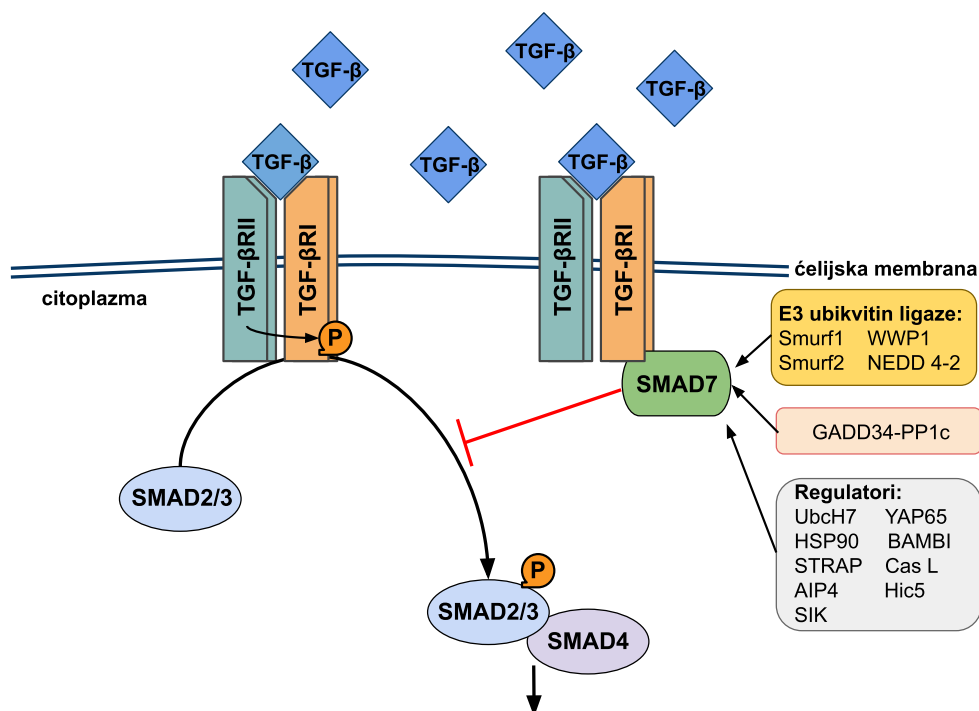
Slika 9. Šematski prikaz strukture SMAD proteina. N-terminalni MH1 domen R-SMADs sadrži strukturu β -ukosnice koja je neophodna pri vezivanju za DNK. U slučaju SMAD2, MH1 domen sadrži dodatnu aminokiselinsku sekvencu, E3 insert, koja negativno reguliše kapacitet vezivanja SMAD2 za DNK. C-terminalni MH2 domen R-SMADs sadrži L3 petlju koja posreduje u interakciji između R-SMADs i aktiviranog TGF- β RI. L3 petlja je takođe deo SMAD4 strukture i važna je za formiranje heterokompleksa SMAD2/3/4. Na samom kraju C-terminusa R-SMADs imaju kratak očuvan motiv dva serina razdvojena jednom aminokiselinom (SXS) koji se fosforiliše aktiviranim TGF- β RI, što dovodi do R-SMADs aktivacije. Linker regioni sadrže višestruka mesta fosforilacije (P) koje targetuju različite kinaze koje moduliraju stabilnost i funkciju SMAD proteina. Inhibitorni SMAD7 sadrži očuvani MH2 domen, ali mu nedostaje SXS motiv na C-terminusu, dok je N-terminalni region rudimentaran. Preuzeto i modifikovano od Tzavlaki i Moustakas.⁸⁵

1.2.2. Uloga TGF- β signalizacije u tumorima

Svaki korak TGF- β signalnog puta je prostorno i vremenski kontrolisan specijalizovanim faktorima od kojih su mnogi izmenjeni u humanim tumorima. Tokom tumorske progresije TGF- β može imati tumor-supresorsku ulogu, ali takođe može pospešivati maligne procese, te ishod signalizacije umnogome zavisi od konteksta, tipa ćelije, tkiva i tumora.⁷⁸ Ova dualna priroda TGF- β signalizacije u tumorima odavno je primećena i poznata je pod nazivom TGF- β paradoks, ali mehanizmi koji leže u osnovi te dihotomije, kao i klinički značaj koji ima ostaju nerazjašnjeni.⁸⁶ U normalnoj i premalignoj ćeliji TGF- β održava homeostazu i suprimira progresiju tumora direktno, ćelijskim tumor-suprimirajućim efektima kao što su citostaza, diferencijacija i apoptoza, ili indirektno, preko efekata na stromu, supresijom inflamacije i mitogena poreklom iz strome.⁷⁷ U ranim stadijumima razvića tumora TGF- β signalni put nastavlja da deluje kao tumor-supresor prevenirajući ćelijski rast, ali mutacije u genima koji kodiraju učesnike TGF- β kaskade (TGF- β receptori ili SMAD proteini) dovode do inaktivacije ili poremećaja u signalnom odgovoru.⁷⁸ Tumori koji umesto mutacione inaktivacije TGF- β signalizacije steknu sposobnosti zaobilazanja tumor-suprimirajućeg puta imaju selektivnu prednost koja se ogleda u kooptiranju TGF- β puta u protumorogene svrhe i mogu iskoristiti određene aspekte signalizacije za aktivno pospešivanje progresije tumorskih ćelija.⁷⁸ Kod agresivnih tumora koji nisu senzitivni na suprimirajuće efekte TGF- β , ostaju očuvane osnovne komponente signalizacije čime tumori zadržavaju sposobnost njene eksploatacije kroz indukovanje puteva tumorske progresije, kao što su utišavanje imunskog odgovora, produkcija faktora rasta, diferencijacija u invazivni fenotip i metastatska diseminacija.^{77,78}

1.3. SMAD7

SMAD7 je glavni antagonist TGF- β puta koji reguliše signalnu kaskadu mehanizmom negativne povratne sprege.^{81,83} To je plejotropni intracelularni regulator i medijator komunikacije TGF- β signalizacije sa drugim putevima, koji ima inhibitornu ulogu ključnu za njegovu kontrolu (Slika 10).^{80,81} SMAD7 poseduje evoluciono očuvan C-terminalni MH2 domen, ali za razliku od R-SMADs ili Co-SMAD, ima samo rudimente MH1 N-terminalnog domena i nedostaje mu mesto fosforilacije od strane TGF- β R1 na C-terminusu (Slika 9).^{81,85} I N-terminus i MH2 domen SMAD7 su esencijalni za njegovu specifičnu inhibitornu ulogu koja se ispoljava delovanjem kako u citoplazmi, tako i u nukleusu.^{80,81}



Slika 10. Šematski prikaz negativne regulacije TGF- β signalnog puta uticajem SMAD7 na aktivnost i stabilnost TGF- β RI. TGF- β signalizacija je regulisana inhibicijom signalne transdukcije vezivanjem za TGF- β RI i sprečavanjem dalje fosforilacije (P) R-SMADs, regrutovanjem E3 ubikvitin ligaza radi degradacije TGF- β RI, kao i fosfataze GADD34-PP1c radi defosforilacije. Takođe je pokazano da regulaciju TGF- β RI vrše i navedeni proteinski regulatori kroz interakcije sa SMAD7. Preuzeto i modifikovano od Yan i Chen.⁸⁰

SMAD7 inhibira TGF- β signalizaciju putem nekoliko mehanizama: vezivanjem za TGF- β RI i sprečavanjem dalje fosforilacije R-SMADs, indukcijom degradacije receptora regrutovanjem E3 ubikvitin ligaza, posredovanjem u defosforilaciji TGF- β RI od strane fosfataze GADD34-PP1c, kao i interakcijom sa drugim regulatornim proteinima u citoplazmi (Slika 10).⁸⁰ Pokazano je da SMAD7 formira stabilan kompleks sa TGF- β RI i dovodi do inhibicije R-SMADs fosforilacije i formiranja R-SMADs-SMAD4 heterokompleksa. SMAD7 takođe regrutuje HECT tip E3 ubikvitin ligaza koje sadrže WW domen (dužine ~40 nt sa dva konzervisana ostatka triptofana; W-triptofan), kao što su Smurf1, Smurf2, WWP1 i NEDD 4-2.⁸⁷ Kao odgovor na TGF- β aktivnost SMAD7 se vezuje za Smurf proteine u nukleusu i translocira u citoplazmu gde se vezuje za aktivni receptor MH2 domenom i regrutuje UbcH7 enzim (eng. *ubiquitin-conjugating enzyme 7*) na N-terminusu, čime omogućava Smurf2 aktivaciju i degradaciju receptora posredstvom proteozomalnog puta, pri čemu se i SMAD7 degraduje.^{80,81} Pored toga, E3 ligaze NEDD 4-2 i WWP1/Tiul1 mogu pospešivati degradaciju TGF-

β RI kao i R-SMADs i SMAD4, pri čemu SMAD7 ima adaptersku ulogu.⁸¹ Degradacija SMAD7 je regulisana balansom između acetilacije, deacetilacije i ubikvitinacije, s obzirom da se acetilacija SMAD7 događa na istom ostatku lizina na kom se dešava i ubikvitinacija i inhibira ubikvitinaciju i degradaciju putem proteozoma.⁸¹ SMAD7 može takođe regrutovati holoenzim GADD34 (eng. *growth-arrest and DNA-damage-inducible protein 34*)-PP1c (eng. *protein phosphatase 1c*) za defosforilaciju TGF- β RI.⁸⁸ Reverzija fosforilacije TGF- β RI posredstvom SMAD7 predstavlja efikasan mehanizam kontrole negativne povratne sprege TGF- β signalizacije.⁸⁸ Takođe je pokazano da mnogi drugi proteini interaguju sa SMAD7 i učestvuju u regulaciji aktivnosti i stabilnosti TGF- β RI (Slika 10).

SMAD7 ispoljava svoju inhibitornu aktivnost i u nukleusu vezivanjem za SBE mesta u genomskoj DNK koja sadrži nukleotidnu CAGA sekvencu.⁸¹ Ali za razliku od drugih SMAD proteina, SMAD7 se za DNK vezuje MH2 domenom, a ne N-terminalnim regionom.⁸¹ U pojedinim humanim tumorskim ćelijskim linijama pokazana je dominantna lokalizacija SMAD7 proteina u nukleusu i njegova inhibicija TGF- β signalizacije ometanjem formiranja funkcionalnog kompleksa fosfo-R-SMADs-SMAD4-DNK na promotorima ciljnih gena.⁸⁹ Pored toga, pokazano je da se SMAD7 može vezati za histonske deacetilaze HDAC1 i SIRT1 i acetyltransferazu p300, što ukazuje na mogući uticaj na transkripciju ciljnih gena TGF- β signalizacije kroz epigenetičku regulaciju hromatinskog statusa.⁸⁰

1.3.1. SMAD7 gen

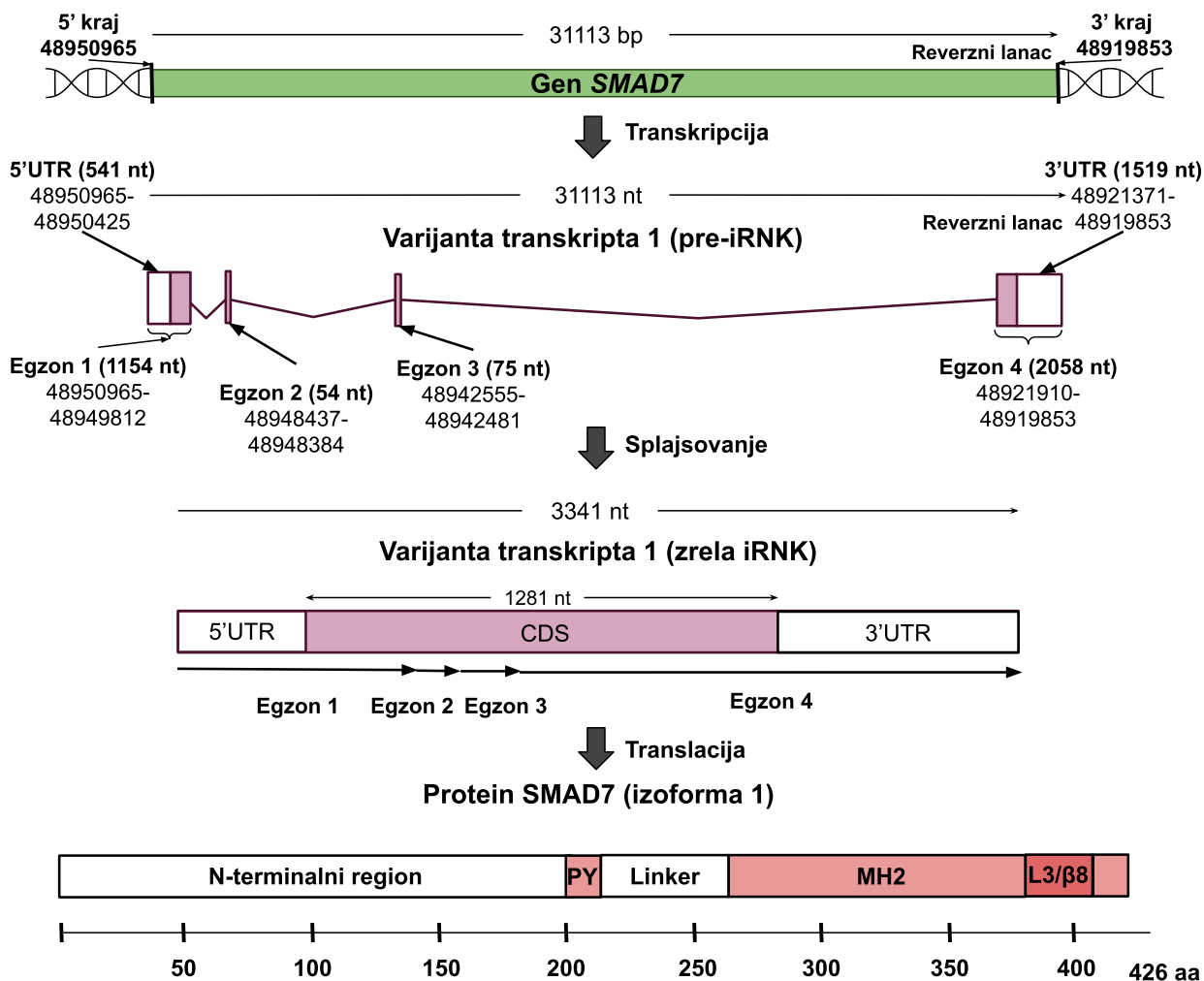
Humani *SMAD7* gen lokalizovan je na dugom kraku hromozoma 18, na poziciji 18q21.1, sa genomskim koordinatama Chr 18: 48919853-48950965 (eng. *chromosome*, Chr) u ažuriranoj referentnoj sekvenci humanog genoma GRCh38 (eng. *Genome Reference Consortium Human Build 38*) na reverznom (-) lancu i dužine je 31 113 nukleotida (nt). Sadrži četiri egzona, od kojih egzoni 2 i 3 kodiraju linker region koji nije evoluciono očuvan, dok egzoni 1 i 2 kodiraju funkcionalne MH1 i MH2 domene.⁹⁰ Osnovni podaci o transkriptima i proteinskim produktima *SMAD7* gena iz javno dostupnih baza podataka NCBI (eng. *National Center for Biotechnology Information database*, NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/gene/id/4092/products>, datum pristupa 11. 5. 2023) i Ensembl (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000101665;r=18:48919853-48950965, datum pristupa 11. 5. 2023) sumirano su predstavljani u Tabeli 4.

Na osnovu dostupnih podataka u NCBI i Ensembl bazama, sa *SMAD7* gena se prepisuje devet transkripata, od kojih su četiri protein-kodirajuća i kodiraju četiri izoforme SMAD7 proteina (1-4, Tabela 4). Pored toga, dva protein-kodirajuća transkripta su predviđena na osnovu različitih kompjuterskih (lat. *in silico*) modela (5 i 6, Tabela 4), dok su dodatna tri transkripta označena kao nekodirajući u okviru Ensembl baze (7-9, Tabela 4). Prema navedenom ažuriranom unosu NCBI baze referentnih sekvenci (eng. *NCBI Reference Sequence Database*, RefSeq), postoje četiri eksperimentalno potvrđene varijante transkripta koje kodiraju proteine, a varijanta transkripta 1 je najduža i kodira najduži proteinski produkt (izoforma 1), od koje se ostale varijante i izoforme razlikuju u sledećem: varijanta transkripta 2 koristi alternativno mesto splajsovanja na 5' kraju egzona 3 koje ne menja okvir čitanja, te dobijena proteinska izoforma 2 ima iste N- i C-terminuse, ali je za jednu aminokiselinu kraća; varijanta transkripta 3 razlikuje se u 5' netranslatirajućem regionu (eng. *untranslated region*, UTR) i kodirajućoj sekvenci, te je dobijena proteinska izoforma 3 kraća na N-terminusu; varijanta transkripta 4 razlikuje se u 5'UTR regionu i kodirajućoj sekvenci, a proteinska izoforma 4 ima kraći i različit N-terminus. Šematski prikaz *SMAD7* gena sa detaljima o egzonima i UTR regionima najduže varijante transkripta, kao i translatisanog izoformi proteina, ilustrovani su na Slici 11.

Tabela 4. Podaci o transkriptima i proteinima gena *SMAD7* dobijeni iz baza NCBI i Ensembl (verzije humanog genoma GRCh38.p14 i GRCh38.p13, redom). NCBI pristupni brojevi transkripata i proteina (sa prefiksima NM/XM i NP/XP), Ensembl identifikacioni brojevi unosa (ID) transkripata i proteina (sa prefiksima ENST i ENSP) kao i nazivi varijanti transkripta dati su jedno za drugim u tabeli u slučaju postojanja unosa u obe baze. U slučaju različitih informacija između baza, prikazan je noviji unos (NCBI, NC_000018.10, datum ažuriranja 20. 3. 2023). Transkripti su po tipu klasifikovani kao protein-kodirajući (PK) i nekodirajući (NK).

<i>SMAD7</i> (4092/ENSG00000101665)								
	Transkript (T)	Genomske koordinate*	Dužina T/CDS (nt)	Varijanta T	Tip T	Protein (P)	Dužina P (aa)	Izofor- ma P
1.	NM_005904.4/ ENST00000262158.8	Chr 18: 48919853- 48950965 (-)	3341/1281	1/SMAD7- 201	PK	NP_005895.1/ ENSP00000262158.2	426	1
2.	NM_001190821.2/ ENST00000589634.1	Chr 18: 48919853- 48950965 (-)	3338/1278	2/SMAD7- 207	PK	NP_001177750.1/ ENSP00000467621.1	425	2
3.	NM_001190822.2/ ENST00000591805.5	Chr 18: 48919853- 48949333 (-)	2292/636	3/SMAD7- 208	PK	NP_001177751.1/ ENSP00000466902.1	211	3
4.	NM_001190823.2/ ENST00000545051.2	Chr 18: 48919853- 48942807 (-)	2385/717	4/SMAD7- 202	PK	NP_001177752.1	238	4
5.†	XM_047437509.1	Chr 18: 48919853- 48949333 (-)	2289/633	X1	PK	XP_047293465.1	210	X1
6.	ENST00000586093.1	Chr18: 48921534- 48948505	574/474	SMAD7- 204	PK	ENSP00000465590.1‡	158	/
7.	ENST00000585986.1	Chr 18: 48921501- 48942732 (-)	563	SMAD7- 203	NK	/	/	/
8.	ENST00000587336.1	Chr 18: 48921411- 48930182 (-)	549	SMAD7- 205	NK	/	/	/
9.	ENST00000588190.1	Chr 18: 48921641- 48933722 (-)	401	SMAD7- 206	NK	/	/	/

*Na osnovu NCBI referentnih sekvenci: transkripti 1-5 - NC_000018.10 (*Homo sapiens chromosome 18, GRCh38.p14 Primary Assembly*); 6-9 - CM000680.2 (*Homo sapiens chromosome 18, GRCh38 reference primary assembly*); Predikcija †automatizovanom kompjuterskom analizom korišćenjem metode Gnomon ili ‡u okviru UniProtKB baze; Skraćenice: CDS - kodirajuća sekvenca (eng. *coding sequence*); aa - aminokiselina (eng. *amino acid*).



Slika 11. Šematski prikaz i genomske koordinate *SMAD7* gena sa detaljima o egzonima i UTR regionima najdužeg prepisivanog transkripta (varijanta transkripta 1), kao i najdužoj transliranoj formi proteina (izoforma 1). PY (prolin-tirozin) motiv u okviru linker regiona *SMAD7* proteina je ključan element za regrutovanje E3 ubikvitin ligaza koje se vežu WW domenom i posreduju u degradaciji TGF- β RI; L3/ β 8 modul sa susednim lizinskim ostacima je važan za povezivanje *SMAD7* sa *SMAD3* i značajno doprinosi njegovoj funkcionalnoj fleksibilnosti. Pre-iRNA, prekursorska iRNA; CDS, kodirajuća sekvenca. Originalna šema kreirana na osnovu podataka iz baza NCBI, Ensembl i istraživanja De Ceuninck van Capelle i sar.⁸⁴

1.3.2. Regulacija ekspresije *SMAD7*

SMAD7 ekspresija je tkivno-specifična i podleže striktnoj regulaciji na transkripcionom, posttranskripcionom i posttranslacionom nivou od strane brojnih molekula i regulatornih mehanizama.⁸⁴ Ekspresiju *SMAD7* aktiviraju *SMAD3* i *SMAD4* direktnim vezivanjem za SBE konsenzusne elemente *SMAD7* promotora.^{83,91,92} S obzirom da *SMAD7* funkcioniše kao TGF- β signalni antagonist, on sâm učestvuje u mehanizmu sopstvene regulacije negativnom povratnom spregom.^{83,92} Genska ekspresija takođe može biti kontrolisana moduliranjem pristupačnosti gena transkripcionim faktorima reverzibilnim kovalentnim histonskim modifikacijama (metilacijom i acetilacijom), pa je tako pokazano da TGF- β stimulacija povećava H4 histonsku acetilaciju na *SMAD7* promotoru koja indukuje transkripciju.⁸⁴ S druge strane, asocirani korepresori Evi-1 i CtBP (eng. *C-terminal binding protein*) ometaju TGF- β -indukovanu acetilaciju histona na endogenom *SMAD7* promotoru, na taj način smanjujući transkripciju.⁸⁴ Slično tome, transkripcioni kofaktor Ski

u interakciji sa PRMT5 (eng. *protein arginine methyltransferase 5*) i HDAC3 prisutan je na *SMAD7* promotoru i dovodi do represije njegove transkripcije, dok PRMT5 i HDAC3 imaju ulogu u održavanju utišanog bazalnog stanja *SMAD7* gena.^{84,93}

Ekspresija *SMAD7* je u velikoj meri regulisana posredstvom nekodirajućih RNK molekula (eng. *noncoding*, nc), kao što su miRNK, kružne RNK (eng. *circular*, circ) i duge nekodirajuće RNK (eng. *long noncoding*, lnc).⁸⁴ Poznato je da veliki broj miRNK, među kojima je najbolje izučena *hsa-miR-21*, modulišu *SMAD7* ekspresiju translacionom represijom koju ostvaruju vezivanjem za 3'UTR iRNK.^{84,94} S druge strane, circRNK, kao što je npr. cESRP1, ponaša se kao „mamac“ ili „sunder“ za *hsa-miR-93-5p* koji je negativni regulator *SMAD7*, što za posledicu ima povećanu *SMAD7* ekspresiju i inhibiciju TGF- β signalizacije.⁹⁵ Pored toga, lncRNK, kao što je npr. Erbb4-IR, suprimiraju transkripciju vezivanjem za 3'UTR *SMAD7* gena.⁹⁶

Takođe je poznato da je *SMAD7* značajno regulisan posttranslacionim proteinskim modifikacijama, kao što su metilacija, ubikvitinacija, acetilacija i fosforilacija.⁹⁷

1.3.3. Značaj *SMAD7* u tumorima

Izmenjena ekspresija *SMAD7* zabeležena je u različitim malignitetima, a dosadašnja otkrića ukazuju na nedovoljno razjašnjenu, ambivalentnu ulogu *SMAD7* u patofiziologiji tumora koja je tkivno-specifična i zavisna od konteksta i tipa tumora. Uprkos funkciji inhibitora TGF- β signalizacije, *SMAD7* takođe ima ulogu pro-apoptotskog molekula u ćelijama humanog karcinoma prostate, pri čemu povišena *SMAD7* ekspresija amplifikuje apoptotski TGF- β signal i čak indukuje apoptozu aktivacijom signalizacije nukleusnog faktora κ B (eng. *nuclear factor- κ B*, NF- κ B).⁹⁸ Takođe je utvrđeno da gubitak KLF4 (eng. *Krüppel-like factor 4*) i posledično smanjenje ekspresije *SMAD7* pospešuje onkogeni TGF- β signalizaciju i progresiju hepatocelularnog karcinoma, kao i da povećanje ekspresije KLF4, koje dovodi do povišene *SMAD7* ekspresije, inhibira TGF- β -posredovanu migraciju i invaziju.⁹⁹ Osim toga, *SMAD7* degradacija putem ubikvitinacije HECT ubikvitin ligazom HERC3 dovodi do aktivacije TGF- β signalizacije koja omogućava epitelno-mezenhimsku tranziciju ćelija glioblastoma i asocirana je sa rezistencijom na hemioradioterapiju.¹⁰⁰

Suprotno tome, u kolorektalnom karcinomu je pokazano da povećana ekspresija *SMAD7* doprinosi neosetljivosti TGF- β puta na signale, što dalje uzrokuje imunsku supresiju, promenu u ćelijskoj diferencijaciji i mikrosredini, kao i progresiju tumora i metastatsku diseminaciju.^{77,82,101} Zabeležena je povišena *SMAD7* ekspresija u tumorskom u odnosu na okolno netumorsko tkivo mukoze kolona i pokazano da inhibicija *SMAD7* dovodi do zaustavljanja ćelije u S fazi ćelijskog ciklusa, što inhibira proliferaciju CRC ćelija *in vitro*.¹⁰² Funkcionalne studije su pokazale da inhibicija *SMAD7* pospešuje hiperfosforilaciju i aktivaciju eIF2 α puta (eng. *eukaryotic Initiation Factor 2 α*) od strane serin-treonin protein kinaze PRK (eng. *RNA-dependent protein kinase R*, PKR), što dovodi do smanjene ekspresije CDC25A (eng. *cell division cycle 25A*) proteina koji kontroliše prolazak ćelije kroz S fazu ćelijskog ciklusa.^{102,103} Studije genetičkih asocijacija na čitavom genomu (eng. *Genome Wide Association Study*, GWAS) pokazale su da učestale varijante *SMAD7* gena doprinose riziku za nastanak CRC,^{104,105} od kojih su neke funkcionalno okarakterisane kao modulatori *SMAD7* ekspresije i dovode do izmenjene TGF- β signalizacije i predispozicije za nastanak CRC.¹⁰⁶ Značaj *SMAD7* u karcinomu kolorektuma prvi put je demonstriran GWAS studijom koja je utvrdila povezanost CRC sa germinativnom intronskom varijantom/polimorfizmom pojedinačnog nukleotida (eng. *single nucleotide variant/polymorphism*, SNV/SNP) rs4939827 *SMAD7* gena.¹⁰⁴ Nakon toga je pokazano da *SMAD7* varijante rs4464148 i rs12953717 umereno doprinose riziku za nastanak CRC.¹⁰⁷ Takođe je utvrđena neravnoteža vezanosti (eng. *linkage disequilibrium*, LD) četiri SNV (rs6507874, rs6507875, rs8085824 i rs58920878) sa rs4939827, kao i povezanost varijantnog (C) alela rs8085824 sa povećanom ekspresijom *SMAD7* u neizmenjenoj mukozi kolona.¹⁰⁸ Pokazana je i značajna asocijacija varijantnog (G) alela rs4939827 sa lošijim ukupnim preživljavanjem obolelih od CRC.¹⁰⁹

Navedene studije ukazale su na važnost SMAD7-posredovanog narušavanja TGF- β signalizacije u kolorektalnom karcinomu, kao i potrebu za daljim ispitivanjem uloge SMAD7 ekspresije, genskih varijanti i interakcije sa drugim medijatorima TGF- β signalizacije u patofiziologiji karcinoma kolorektuma.

1.3.4. Interakcija između SMAD7 i SMAD4

Mehanistički gledano, SMAD7 i SMAD4 su u kompeticiji za vezivanje za aktiviranu, fosforilisanu formu R-SMADs i pretpostavlja se da balans između vezivanja SMAD7 i SMAD4 za aktivni R-SMADs determiniše jačinu i trajanje TGF- β signala.¹¹⁰ Naime, za razliku od SMAD4 vezivanja, kada dolazi do formiranja fosfo-R-SMADs-SMAD4 heterokompleksa koji se translocira u jedro i reguliše ekspresiju ciljnih gena, vezivanje SMAD7 dovodi do regrutacije E3 ubikvitin ligaze NEDD 4-2 do aktivnih R-SMADs, što uzrokuje njihovu poliubikvitinaciju i proteozomalnu degradaciju.¹¹⁰ Pored toga, kao što je već napomenuto, pokazano je da SMAD7 može ometati formiranje fosfo-R-SMADs-SMAD4-DNK kompleksa kompetitivnim vezivanjem za DNK sekvencu u nukleusu.⁸⁹ Takođe je primećena kolokalizacija SMAD7, SMAD4 i Smurfs u citoplazmi i formiranje SMAD7-SMAD4 asocijacija i pokazano da SMAD7 omogućava proteozomalnu degradaciju SMAD4 posredstvom E3 ubikvitin ligaza Smurfs.^{110,111} Smurfs, koji se ne mogu direktno vezati za SMAD4, posreduju u poliubikvitinaciji SMAD4 u prisustvu SMAD7 koji ima adaptersku ulogu.¹¹¹

1.4. SMAD4 i njegov značaj u tumorima

Gen *SMAD4*, lokalizovan na dugom kraku hromozoma 18 (18q21.1), sastoji se od 12 egzona i kodira intracelularnog medijatora TGF- β signalizacije dugačkog 552 aa sa značajnom ulogom u heterooligomerizaciji sa drugim SMAD proteinima, transportu SMAD kompleksa u nukleus i regulaciji ekspresije ciljnih gena u okviru ćelijskog odgovora na signalizaciju.^{112,113} Smanjenje ili potpuni gubitak ekspresije ovog tumor-supresorskog gena primećeno je kod maligniteta različitih organa, uključujući kolorektum, pankreas, jetru, bešiku, jednjak, dojku, grlić materice, jajnik i glavu i vrat.^{114,115} Mutacije, funkcionalna inaktivacija i gubitak ekspresije *SMAD4* su česti u kasnijim stadijumima maligne transformacije¹¹⁶⁻¹¹⁸ i okarakterisani su kao ključni događaji za sticanje sposobnosti zaobilazanja tumor-suprimirajuće signalizacije i kooptiranje TGF- β puta za aktivno pospešivanje progresije tumorskih ćelija.¹¹⁹ Pokazana je povezanost između snižene *SMAD4* ekspresije u tumorima i većeg invazivnog potencijala, formiranja udaljenih metastaza, sticanja rezistencije i lošeg odgovora na 5-FU hemioterapiju, kao i lošije prognoze kod obolelih od CRC.^{117,120-124} LOH inaktivacija *SMAD4* gena je takođe odgovorna za nastanak Familijarne juvenilne polipoze, hereditarne autozomno-dominantne bolesti koja je predisponirajuće stanje za nastanak kolorektalnog karcinoma.¹²⁵ Međutim, *SMAD4* inaktivacija je generalno kasni događaj u karcinogenezi, s obzirom da je pokazano da heterozigotna inaktivacija *SMAD4* ne uzrokuje inicijaciju karcinoma, ali pospešuje progresiju intestinalnih polipa u karcinome kod APC-deficitarnih tumora u slučaju gubitka preostalog WT alela kod heterozigotnih nosilaca.¹²⁶ 18q LOH se detektuje kod 46% invazivnih karcinoma, ali ne i u adenomima i ranim karcinomima, što je još jedna potvrda da se ova alteracija dešava na stupnju progresije karcinoma u invazivni fenotip.¹²⁵ Različiti mehanizmi mogu biti u osnovi smanjene ekspresije SMAD4 u tumorima, uključujući inaktivirajuće delecije *SMAD4* gena, prisutne u 5-20% sporadičnih CRC slučajeva,¹²⁷ koje su češće kod tumora sa udaljenim metastazama nego kod lokalno uznapredovalih tumora.¹¹⁶ Najveći broj mutacija u *SMAD4* genu su mutacije izgubljenog smisla, bez smisla i mutacije koje pomeraju okvir čitanja u MH2 regionu, koje dovode do značajnih funkcionalnih posledica kao što su nemogućnost pravilne homooligomerizacije prilikom formiranja SMAD4 proteina i heterooligomerizacije između SMAD4 i SMAD2, što uzrokuje narušavanja TGF- β signalizacije.¹²⁵

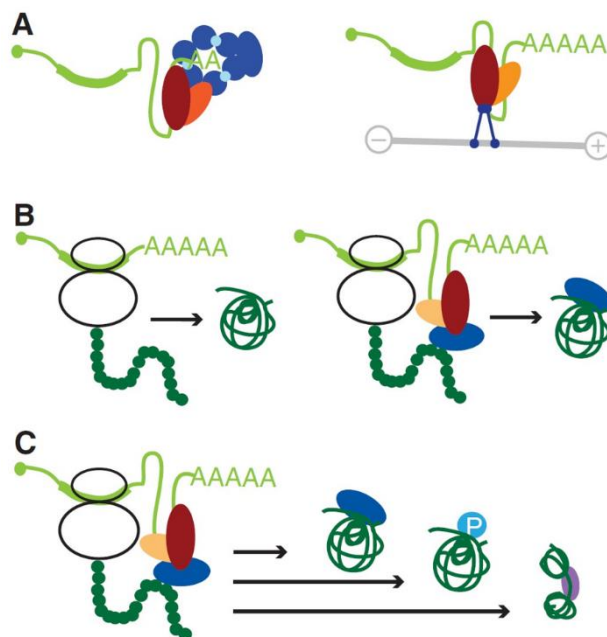
1.5. Regulatorna uloga 3' netranslatirajućeg regiona

3'UTR je nekodirajući deo sekvence iRNK na 3' kraju koji obuhvata region od kodona za završetak translacije (stop kodona) do poslednjeg nukleotida u iRNK. Dužina ovog očuvanog regiona varira od nekoliko desetina do nekoliko stotina nukleotida i doživela je ekspanziju tokom evolucije koja je u korelaciji sa složenošću organizma.¹²⁸ Novija istraživanja ukazuju da regulacija genske funkcije koju 3'UTR ostvaruje uticajem na iRNK i proteine ima važnu ulogu u kontroli bioloških procesa koji su u osnovi biološke kompleksnosti.^{129,130}

3'UTR regioni mogu:

- a) regulisati stabilnost, translaciju i lokalizaciju iRNK;
- b) funkcionisati nezavisno kao lncRNK ili male (eng. *small, s*) RNK, fragmentisani ili u celini;
- c) generisati različite 3'UTR izoforme u zavisnosti od ćelijskog konteksta i aktivnosti signalnih puteva;
- d) posredovati u interakcijama između proteina (protein-protein interakcije, PPI), što za posledicu može imati uticaj na formiranje proteinskih kompleksa, lokalizaciju i funkciju proteina.^{129,130}

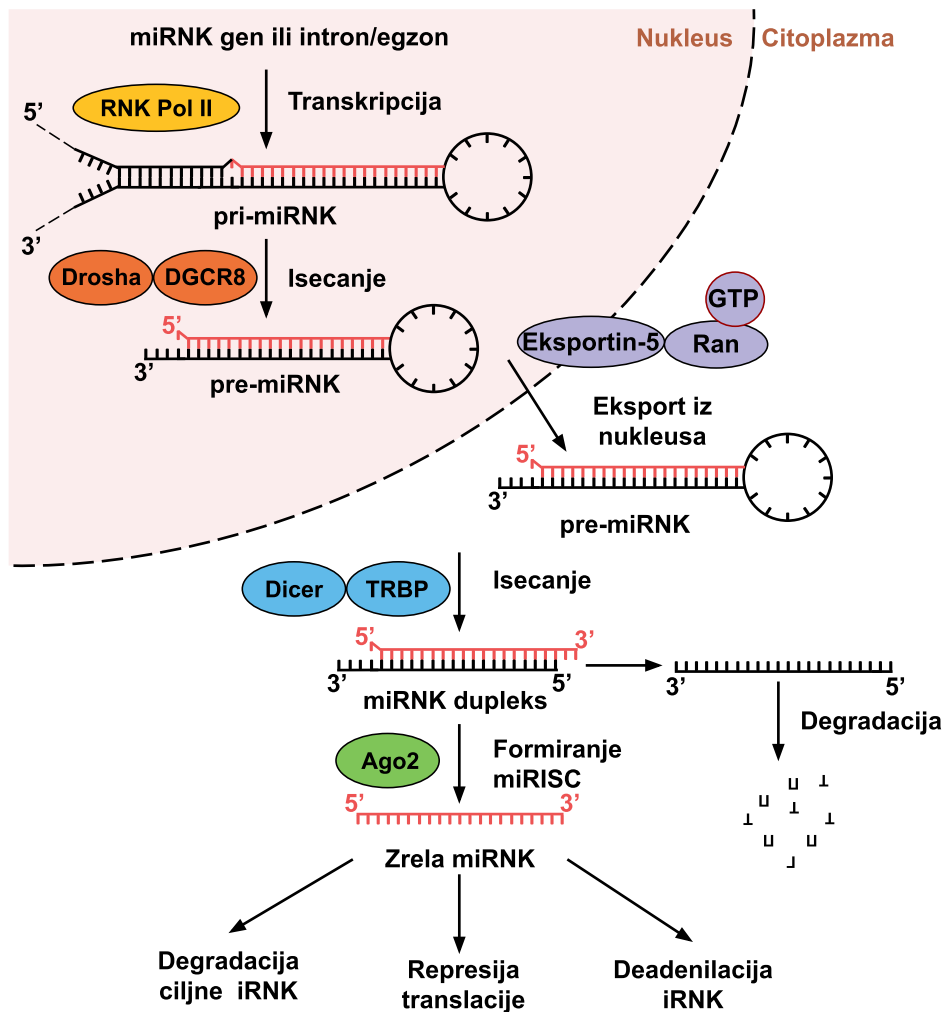
3'UTR je najpoznatiji po tome što određuje nivoe proteina kroz regulaciju stabilnosti i translacije iRNK, najčešće posredstvom AU-bogatih elemenata (eng. *AU-rich elements*, AREs) i miRNK molekula (videti sekciju 1.5.1).¹²⁹ Prva otkrića koja su rasvetlila značaj regulatorne uloge ovog regiona ukazala su na evolucionu očuvanost 3'UTR sekvence homologih gena za aktin među organizmima i istovremeno veliku divergenciju između sličnih izoformi ovog gena sa različitom funkcijom i distribucijom u tkivima.¹³¹ Visok nivo očuvanosti pokazao je da 3'UTR ima važnu regulatornu ulogu, a divergencija sekvenci različitih izoformi da 3'UTR sadrži dodatnu genetičku informaciju koja obezbeđuje zasebne funkcije veoma sličnih proteina.¹³⁰ Potraga za regulatornim *cis*-elementima 3'UTR-a dovela je do otkrića AREs za koje je pokazano da destabilizuju iRNK i da su dominantno prisutni kod klasa gena koji kodiraju kratkoživeće proteine, kao što su citokini, limfokini, faktori rasta i onkogeni, kod kojih su često više očuvani nego sami kodirajući regioni.^{132,133} *Trans*-aktivirajući faktori koji se vezuju za AREs i dalje su predmet intenzivnog istraživanja.¹³⁰ Pokazano je da većinu funkcija nezavisnih od miRNK regulacije 3'UTR ostvaruje kroz vezivanje RNK-vezujućih proteina (eng. *RNA-binding proteins*, RBPs) za *cis*-elemente 3'UTR-a na način koji zavisi od sekvence ili strukture.¹²⁹ Međutim, RBPs deluju samo kao adapteri koji posreduju u mnogobrojnim, često suprotstavljenim funkcijama 3'UTR-a kroz regrutovanje efektorskih proteina (Slika 12). Biološke posledice regulacije 3'UTR-om zavise od funkcije efektorskih proteina, pa se tako destabilizacija iRNK postiže preko RBPs koji regrutuju deadenilazu, dok se translaciona represija postiže pomoću RBPs koji regrutuju enzime za dekapiranje (Slika 12).¹²⁹ Iako se smatralo da se regulacija lokalizacije iRNK dešava samo u slučaju određenih iRNK u polarizovanim ćelijama, pokazalo se da je ovo veoma rasprostranjen fenomen. Lokalizacija iRNK je uglavnom posredovana signalima lokalizacije u 3'UTR-u koji su u vezi sa RBPs koji regrutuju motorne proteine, što rezultuje u kretanju iRNK duž filamenata citoskeleta (Slika 12).¹²⁹ 3'UTR takođe ima ulogu nezavisne informacione jedinice, s obzirom da ovaj region u celini ili njegovi fragmenti funkcionišu autonomno kao regulatorne RNK (lncRNK i sRNK) za koje je pokazano da mogu imati ekspresiju nezavisnu od kodirajućeg regiona.¹²⁹ Osim toga, odnos nivoa ekspresije alternativnih izoformi 3'UTR-a varira u zavisnosti od tipa ćelije i pokazano je da se menja kao odgovor na stimulaciju receptora i aktivaciju različitih signalnih puteva.¹³⁰ 3'UTR takođe određuju sudbinu novotranslatiranih proteina, što je posredovano RBPs koji regrutuju efektorske proteine koji se na kotranslacioni način transferuju na rastući polipeptidni lanac.^{129,134} Ovo ukazuje na činjenicu da 3'UTR može posredovati u PPI i tako regulisati lokalizaciju i funkciju proteina nezavisno od iRNK regulacije (Slika 12).^{129,130,134}



Slika 12. Ilustracija različitih funkcija 3'UTR-a. RBPs se vezuju za 3'UTR i regrutuju različite efektorske proteine koji određuju njegovu funkciju. (A) 3'UTR reguliše procese na nivou iRNK. RBPs (crvene i narandžaste boje) se vezuju za 3'UTR iRNK (svetlozelene boje) i regrutuju različite efektorske proteine. Regrutovanje egzozoma (šema levo, plave boje) dovodi do destabilizacije iRNK, dok regrutovanje motornog proteina (šema desno, plave boje) dovodi do regulacije lokalizacije iRNK kretanjem po citoskeletnoj mikrotubuli (šema desno, siva linija). (B) 3'UTR reguliše karakteristike proteina posredstvom 3'UTR-zavisnih PPI. Alternativni 3'UTR mogu odrediti alternativne funkcije proteina uprkos njihovim identičnim aminokiselinskim sekvencama. Ovo je rezultat 3'UTR-zavisnih PPI koje su posredovane samo dugom 3'UTR izoformom (šema desno), a ne kratkom 3'UTR izoformom (šema levo). RBP koji se vezuju za 3'UTR, kao i regrutovani efektorski protein, označeni su istim bojama kao u A. (C) 3'UTR regulišu različite karakteristike proteina posredovanjem 3'UTR-zavisnih PPI. Ovo može dovesti do formiranja 3'UTR-zavisnog proteinskog kompleksa, 3'UTR-zavisnih posttranslacionih modifikacija (P) i 3'UTR-zavisnog savijanja proteina. Preuzeto od Mayr, C.¹³⁰

1.5.1. Regulacija mikroRNK molekulima

MiRNK su klasa endogenih malih nekodirajućih RNK koje dovode do utišavanja aktivnosti gena RNK interferencijom. Zrele miRNK su jednolančani molekuli dužine 18-25 nukleotida i nastaju obradom primarnih miRNK (pri-miRNK) dužine i do nekoliko kilobaza koje prepisuje RNK polimeraza II sa posebnih genskih lokusa ili introna i egzona protein-kodirajućih gena (Slika 13).¹³⁵⁻¹³⁷ Pri-RNK formira unutarlančanu ukosnicu koju prepoznaje mikroprocesorski kompleks sastavljen od endonukleaze Drosha i proteina DGCR8 i obrađuje je u prekursorsku miRNK (pre-miRNK) dugačku 60-80 nukleotida.^{135,137} Pre-miRNK se zatim transportuje u citoplazmu posredstvom proteinskog kompleksa Ekspartin-5-Ran-GTP, gde se daljim delovanjem endonukleaze Dicer sa kofaktorom TRBP obrađuje u miRNK dupleks, koji se potom ugrađuje u Ago2 protein. Tom prilikom se prateći lanac miRNK dupleksa degraduje, a zrela miRNK formira miRNK-indukovani kompleks za utišavanje (eng. *miRNA-induced silencing complex*, miRISC; Slika 13).



Slika 13. Kanonski put biogeneze i mehanizmi delovanja miRNAK. Detaljno objašnjenje prikazanog puta je dato u tekstu. Preuzeto i modifikovano od Winter i sar.¹³⁵

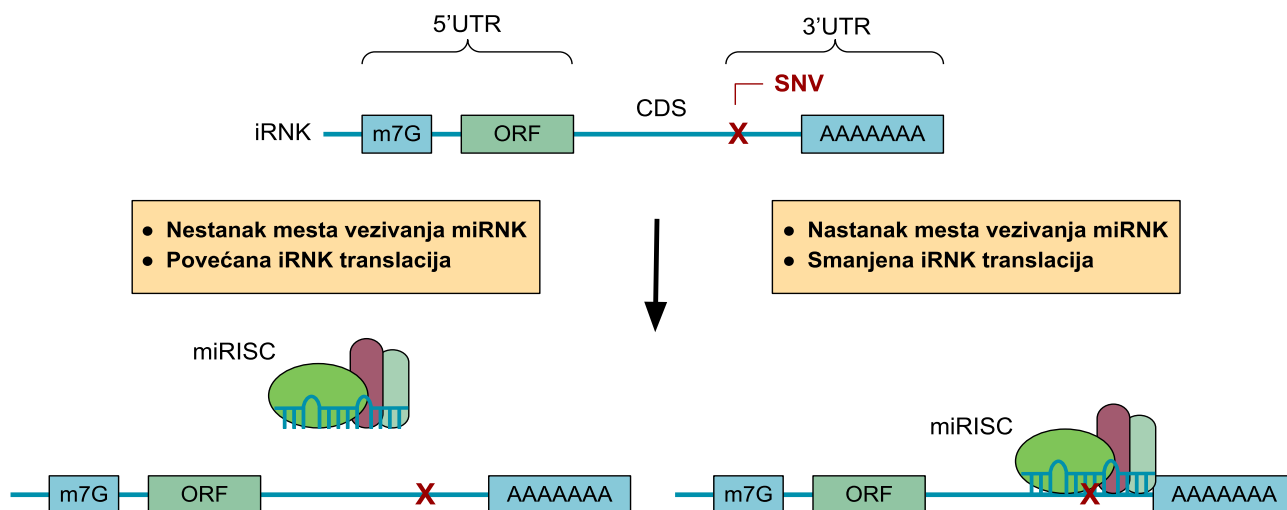
Do sada je detektovano hiljade različitih miRNAK, a svaka od njih može targetovati stotine iRNAK i dovesti do represije gena degradacijom, destabilizacijom i translacionom inhibicijom iRNAK.^{135,138} U sklopu miRISC kompleksa zrela miRNAK najčešće prepoznaje i vezuje se za regulatorne elemente 3'UTR-a ciljane iRNAK komplementarnim sparivanjem regiona semena (eng. *seed region*) na svom 5' kraju (nukleotidi na pozicijama 2-8), pri čemu stepen komplementarnosti određuje mehanizam posttranskripcionog utišavanja.¹³⁹⁻¹⁴² U slučaju potpune komplementarnosti dolazi do utišavanja isecanjem ciljane iRNAK posredstvom Ago2 proteina, što dovodi do smanjenja nivoa iRNAK i, posledično, njenog proteinskog produkta.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Delimična komplementarnost može dovesti do smanjenja nivoa iRNAK deadenilacijom poli-A repa, tj. gubitkom ponovaka adenina na 3' kraju ciljane iRNAK, što je destabilizuje i ubrzava proces razgradnje.¹⁴⁵ S druge strane, nepotpuno sparivanje uzrokuje i represiju translacije putem inhibicije inicijacionog kompleksa, u tom slučaju se smanjuje nivo proteinskog produkta, ali ne i iRNAK molekula.^{139,140,142}

Procenjuje se da između 30% i čak 60% protein-kodirajućih gena kontrolišu miRNAK i da su gotovo svi ćelijski putevi direktno ili indirektno pod uticajem ovog tipa posttranslacione regulacije.^{146,147} MiRNAK učestvuju u ćelijskoj proliferaciji, diferencijaciji, metabolizmu i apoptozi i utvrđeno je da njihova deregulacija može dovesti do nastanka tumora.¹⁴⁶ U humanoju karcinogenezi ista miRNAK se može ponašati kao onkogen ili tumor-supresor, u zavisnosti od tipa ćelije i njenog obrasca genske ekspresije.¹⁴⁸ Povišen nivo zrele miRNAK može biti posledica transkripcione aktivacije ili amplifikacije gena koji je kodira, dok utišavanje ili smanjena ekspresija može biti rezultat delecije

istog gena ili hromozomskog regiona na kojem je lokalizovan, epigenetičkog utišavanja ili defekata u biogenezi.¹³⁶ Pokazano je da obrasci ekspresije miRNK mogu biti u snažnoj korelaciji sa tipom i stadijumom tumora i da se potencijalno mogu koristiti kao klinički dijagnostički, prognostički i prediktivni markeri.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Brojne studije zasnovane na profilisanju ekspresije su dokazale da postoje značajne promene nivoa ekspresije miRNK u CRC tkivu u poređenju sa neizmenjenim kolorektalnim epitelom i identifikovale su grupe miRNK koje omogućavaju prognostičku stratifikaciju ovih pacijenata i predviđanje odgovora na odabrane hemioterapeutske režime i radioterapiju.¹⁵²

1.5.2. Značaj genetičke varijabilnosti 3'UTR-a

Sve veći broj studija ukazuje na značaj genetičke varijabilnosti koja utiče na interakcije između miRNK i njenih targeta, kao i na to da varijante u okviru sekvence 3'UTR-a modulišu predispoziciju za nastanak tumora i asocirane su sa rizikom za razvoj i progresiju malignih bolesti.^{146,153} SNV lokalizovane na predviđenim mestima vezivanja miRNK unutar 3'UTR-a mogu dovesti do poremećaja genske funkcije uticajem na efikasnost vezivanja miRNK (narušavanjem postojećih ili kreiranjem novih mesta vezivanja), kao i na stabilnost i translaciju iRNK kroz izmene u poliadenilaciji i regulatornim interakcijama iRNK i proteina.^{136,141,154} Arnold i sar. su identifikovali četiri mehanizma kojima varijante u 3'UTR-u utiču na regulaciju posredovanu miRNK molekulima: 1) brisanje, ili 2) stvaranje elemenata za prepoznavanje miRNK u okviru mesta vezivanja miRISC kompleksa, 3) alteracije mesta splajsovanja 3'UTR-a koje dovode do gubitka mesta vezivanja i 4) promene u afinitetu vezivanja usled modifikovanog savijanja 3'UTR-a.¹⁵⁴ Varijante koje remete mesta vezivanja miRNK dovode do povišenog nivoa translacije ciljne iRNK usled izostanka miRNK funkcije utišavanja genske ekspresije, dok one koje stvaraju nova mesta vezivanja dovode do smanjenog nivoa proteinskog produkta ciljne iRNK usled povećanog afiniteta vezivanja miRNK i utišavanja genske ekspresije (Slika 14).¹⁴¹ Pokazano je da su varijante na mestima vezivanja miRNK asocirane sa tumorima i imaju potencijal dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera.¹⁵⁵ Takođe je utvrđena njihova povezanost sa rizikom za nastanak, ishodom, lečenjem, prognozom i progresijom kolorektalnog karcinoma.¹⁵⁶



Slika 14. Osnovni mehanizmi kojima SNV u sklopu mesta vezivanja miRNK utiču na miRNK-posredovanu regulaciju. AA, poli-A rep; m7G, 7-metilguanozin 5' kapa; ORF, otvoreni okvir čitanja (eng. *open reading frame*); CDS, kodirajuća sekvenca. Preuzeto i modifikovano od Ryan i sar.¹⁴¹ i Slaby i sar.¹³⁶

2. CILJEVI

Dosadašnja otkrića ukazuju na postojanje nedovoljno jasne, dualne uloge *SMAD7* gena u kolorektalnoj karcinogenezi i progresiji bolesti. Od posebnog su interesa promene obrazaca genske ekspresije i njihova regulacija, kao i neistražen balans *SMAD7* sa njegovim interakcionim partnerom *SMAD4*, čija je funkcionalna inaktivacija često naznačena kao ključan događaj za sticanje sposobnosti zaobilaženja tumor-suprimirajuće signalizacije i kooptiranje TGF- β puta za aktivno pospešivanje progresije tumorskih ćelija.

Imajući u vidu kompleksnost uloge *SMAD7* u kolorektalnoj karcinogenezi, kao i važnost 3'UTR regiona za regulaciju genske ekspresije, opšti cilj doktorske disertacije je ispitivanje značaja obrasca ekspresije *SMAD7* gena i njegovog odnosa sa genom *SMAD4*, kao i prisustva genetičke varijabilnosti u 3'UTR-u *SMAD7* gena u progresiji i toku CRC i predikciji odgovora na terapiju. Iz postavljenog opšteg cilja istraživanja proistekli su sledeći specifični ciljevi:

- 1) Analiza ekspresije i odnosa *SMAD7* i *SMAD4* gena u progresiji karcinoma kolorektuma i odgovoru na terapiju u okviru koje je ispitivan/a:
 - a) razlika u nivou ekspresije i odnosu *SMAD7* i *SMAD4* gena između ćelijskih linija karcinoma kolona i nemalignog epitela kolona;
 - b) promena nivoa ekspresije i odnosa *SMAD7* i *SMAD4* gena u ćelijama SW620 nakon tretmana hemioterapeutcima, bevacizumabom i njihovim kombinacijama;
 - c) razlika u nivou ekspresije i odnosu *SMAD7* i *SMAD4* gena između primarnog tumorskog tkiva i uparenog okolnog netumorskog tkiva mukoze rektuma poreklom od istih LARC ispitanika i njihov potencijal kao dijagnostičkih biomarkera;
 - d) razlika u nivou ekspresije i odnosu *SMAD7* i *SMAD4* gena između tkiva kolorektalnih metastaza i uparenog okolnog netumorskog tkiva jetre poreklom od istih CLM ispitanika i njihov potencijal kao dijagnostičkih biomarkera;
 - e) razlika u nivou ekspresije i odnosu *SMAD7* i *SMAD4* gena između tumorskih tkiva primarnog (LARC) i metastatskog (CLM) CRC;
 - f) promena nivoa ekspresije i odnosa *SMAD7* i *SMAD4* gena u primarnom tumorskom i okolnom netumorskom tkivu LARC ispitanika nakon nCRT;
 - g) translacioni potencijal nivoa ekspresije i odnosa *SMAD7* i *SMAD4* gena kao prediktivnih biomarkera odgovora na nCRT kod LARC pacijenata;
 - h) povezanost nivoa ekspresije i odnosa *SMAD7* i *SMAD4* gena sa kliničko-patološkim odlikama ispitanika.
- 2) Genetička analiza i alel-specifična ekspresija *SMAD7* 3'UTR varijanti u karcinomu kolorektuma u okviru koje je ispitivan/a/o:
 - a) prisustvo genetičke varijabilnosti u 3'UTR-u *SMAD7* gena u ćelijskim linijama karcinoma kolona i germinativnih i somatskih varijanti u tkivima CRC ispitanika;
 - b) balans u ekspresiji alela svih detektovanih varijanta u 3'UTR-u *SMAD7* gena u ćelijskim linijama karcinoma kolona i tkivima CRC ispitanika;
 - c) postojanje funkcionalnih posledica na efikasnost vezivanja miRNK svih detektovanih varijanta u 3'UTR-u *SMAD7* gena u ćelijskim linijama karcinoma kolona i tkivima CRC ispitanika *in silico* predikcijom;
 - d) povezanost prisustva genetičke varijabilnosti u 3'UTR-u *SMAD7* gena sa demografskim i kliničko-patološkim odlikama ispitanika.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ćelijske linije

U ovoj studiji su korišćene sledeće ćelijske linije:

- adherentne humane ćelijske linije primarnog adenokarcinoma kolona: Caco-2, HT-29, SW480, DLD-1 i HCT116;
- adherentna humana ćelijska linija metastatskog adenokarcinoma kolona SW620;
- adherentna humana ćelijska linija nemalignog epitela kolona HCEC-1CT.

Caco-2, HT-29, SW480, DLD-1, HCT116 i SW620 ćelije su kultivisane u kompletnom medijumu za gajenje koji se sastoji od bazalnog medijuma DMEM (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Thermo Fisher Scientific, SAD) obogaćenog 10% fetalnim goveđim serumom (eng. *fetal bovine serum*, FBS; Thermo Fisher Scientific, SAD) i 100 U/mL penicilin-streptomycinom (Thermo Fisher Scientific, SAD). HCEC-1CT ćelije su kultivisane u kompletnom medijumu za gajenje koji se sastoji od medijuma ColoUp (Evercyte, Austrija) obogaćenog 2% FBS-om i 100 U/mL penicilin-streptomycinom. Sve ćelije su gajene na temperaturi od 37°C u inkubatoru sa automatskim protokom 5% CO₂ u sterilnim uslovima. Kultivacija, subkultivacija, brojanje i zamrzavanje ćelija vršeni su prema uputstvu opisanom u Tabeli 5.

Tabela 5. Detaljno uputstvo za kultivaciju, subkultivaciju, određivanje broja i pripremu za zamrzavanje ćelija

Korak	Postupak
1. Kultivacija ćelija	1.1. Izvaditi ćelijski alikvot čuvan na -196°C (tečni azot), resuspendovati i brzo otopiti u odgovarajućem kompletnom medijumu za gajenje zagrejanom na temperaturi od 37°C
	1.2. Zasejati ćelije u posudu za gajenje (T-25 ili T-75 flask; Sarstedt, SAD) i čuvati u inkubatoru na 37°C do subkultivacije
	1.3. Vršiti subkultivaciju ćelija kada dostignu konfluentnost od ~90% (na svaka 3 ili 4 dana)
2. Subkultivacija ćelija	2.1. Odliti medijum za gajenje i dva puta isprati ćelije rastvorom 1 × PBS (eng. <i>phosphate buffer saline</i>)
	2.2. Dodati rastvor 1 × tripsin-EDTA (0,5 mg/mL tripsina i 0,2 mg/mL EDTA (eng. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ; Sigma Aldrich, SAD))
	2.3. Vratiti ćelije u inkubator u trajanju od 3 do 5 minuta (min)
	2.4. Inaktivirati tripsin dodavanjem odgovarajućeg kompletnog medijuma
	2.5. Ćelije resuspendovati i zasejati u odgovarajuću posudu za gajenje
3. Određivanje broja ćelija	3.1. Na pločicu za brojanje ćelija sa 4 velika polja podeljena na 16 manjih polja (Neubauer, Austrija) naneti 10 µL resuspendovanih ćelija
	3.2. Prebrojati ćelije u 2 velika polja

	3.3.	Odrediti broj ćelija u rastvoru primenom formule $broj\ \acute{c}elija/mL = (broj\ \acute{c}elija/2) \times 10^4$
4. Zamrzavanje ćelija	4.1.	Odliti medijum za gajenje i dva puta isprati ćelije rastvorom $1 \times PBS$
	4.2.	Dodati rastvor $1 \times$ tripsin-EDTA kako bi se ćelije odlepile od posude za gajenje
	4.3.	Centrifugirati 3 min. na 1800 rpm (eng. <i>revolutions per minute</i>) na sobnoj temperaturi i odliti supernatant
	4.4.	Resuspendovati ćelije u medijumu za zamrzavanje (90% FBS-a i 10% dimetil sulfoksida; Serva, Nemačka), a potom ih staviti u kriotube (Sarstedt, SAD)
	4.5.	Postepeno zamrznuti ćelije sukcesivnim prebacivanem na sve niže temperature (sa $37^{\circ}C$ na $-20^{\circ}C$ (~2 h; eng. <i>hour</i>), pa na $-80^{\circ}C$ (~24 h) i konačno smestiti i čuvati u tečnom azotu na $-196^{\circ}C$

3.2. Tretmani SW620 ćelija hemioterapeuticima i bevacizumabom

Ćelije SW620 su tretirane hemioterapeutskim lekovima 5-fluorouracilom (5-FU), oksaliplatinom i kombinacijom 5-FU + oksaliplatinom (FOX), kao i ciljanim, biološkim lekom bevacizumabom i njegovom kombinacijom sa 5-FU/oksaliplatinom (bevacizumab + FOX). Ćelijska linija SW620 zasejana je pri gustini 5×10^5 ćelija po bunariću u mikrotitarsku ploču sa 6 bunarića i tretirana nakon 24 h (eng. *hour*, h) navedenim hemioterapeuticima, bevacizumabom i njihovim kombinacijama. Svi korišćeni lekovi su sveže pripremljeni neposredno pre tretiranja ćelija rastvaranjem u dvostruko destilovanoj vodi (ddH₂O) i razblaženi u medijumu za gajenje ćelija do sledećih koncentracija:

- 21,4 μM 5-FU (EBEWE Pharma Ges.m.b.H Nfg.KG, Austrija)
- 85 μM oksaliplatin (Actavis Italy S.p.A, Italija)
- 250 $\mu g/mL$ bevacizumaba (Avastin®, F.Hoffmann-La Roche Ltd, Švajcarska).

Navedene koncentracije svakog leka su korišćene i u kombinovanim tretmanima FOX (5-FU + oksaliplatin) i bevacizumab + FOX. Osim tretmana lekovima, u svakom eksperimentu ćelije su tretirane i samo ddH₂O (negativna kontrola). Tretirane ćelije i negativna kontrola su zatim inkubirane 72 h na $37^{\circ}C$. Nakon perioda inkubacije, ćelije su lizirane pomoću reagensa *TRI Reagent™ Solution* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD) odlivanjem medijuma u kojem su ćelije gajene i dodavanjem 1 mL *TRI Reagent™* reagensa u trajanju od 1 minuta (min). Ćelije su homogenizovane pomoću pipete tako što su nekoliko puta propuštene kroz nastavak od 1 mL, zatim pokupljene u plastičnu tubu od 1,5 mL i čuvane na $-80^{\circ}C$ do izolacije RNK.

3.3. Ispitanici

U ovu studiju je uključeno ukupno 85 ispitanika sa CRC i CLM koji su lečeni, operisani i praćeni na Klinici za digestivnu hirurgiju – Prvoj hirurškoj klinici Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u periodu od januara 2017. godine do oktobra 2020. godine. Studija je odobrena od strane Etičkog odbora Univerzitetskog kliničkog centra Srbije pod brojem 717/7, dana 23. 11. 2020. godine. Pismena saglasnost za učešće u studiji dobijena je za sve ispitanike uključene u studiju.

Osamdeset i pet ispitanika uključenih u studiju mogu se stratifikovati u tri grupe:

- Grupa A, koja obuhvata 19 ispitanika sa LARC kojima je ordinirana nCRT. Pre početka terapije uzorci tumorskog i okolnog netumorskog tkiva rektuma sakupljeni su biopsijom anoskopskim putem. Osam do 12 nedelja nakon završetka terapije uzorci tumorskog i okolnog netumorskog tkiva ponovo su prikupljeni isecanjem sa preparata neposredno nakon urađene resekcije rektuma kod 10 od 19 pacijenata;
- Grupa B, koja obuhvata 16 ispitanika sa CLM koji nisu primili neoadjuvantnu terapiju za metastatsku bolest. Uzorci metastatskog tumorskog i okolnog netumorskog tkiva jetre kod ovih pacijenata prikupljeni su sa preparata neposredno nakon urađene resekcije jetre;
- Grupa C, koja obuhvata 50 ispitanika sa primarnim CRC koji nisu primili neoadjuvantnu terapiju pre kurativne resekcije kolona (32 pacijenta) ili rektuma (18 pacijenata). Uzorci tumorskog i okolnog netumorskog tkiva prikupljeni su isecanjem sa preparata neposredno nakon urađene resekcije kolona ili rektuma.

U studiji su korišćeni prikupljeni demografski i kliničko-patološki podaci o ispitanicima koji podrazumevaju: pol, starost, lokalizaciju (primarnog) karcinoma (tumor ili rektum) i TNM stadijum za sve ispitanike (cTNM za ispitanike iz grupe A, pTNM za sve ostale), kao i vrednosti serumskih tumor markera CEA i CA 19-9 za ispitanike iz grupe A i B.

Ispitanici iz grupe A su definisani kao LARC na osnovu ukupnog TNM stadijuma tumorske bolesti (stadijumi T3-4, bilo koji N i M0 ili bilo koji T, N1-2 i M0). T i N stadijumi, CRM, kao i invazija karcinoma u ekstramuralnoj vaskularizaciji (eng. *extramural vascular invasion*, EMVI), procenjeni su na osnovu MRI. Odsustvo udaljene metastaze (M stadijum) potvrđeno je korišćenjem CT grudnog koša i CT ili MRI abdomena i karlice. Podela tumora rektuma prema lokalizaciji određena je na osnovu udaljenosti od anokutane linije rektoskopskim merenjem, pri čemu su tumori udaljeni do 5 cm klasifikovani kao niski karcinomi rektuma, a oni udaljeni od 5 do 10 cm kao karcinomi srednjeg rektuma. Takođe, LARC ispitanici su klasifikovani u odnosu na prognozu bolesti u grupu sa dobrom (T1-3/N1) i lošom (T4 ili N2) prognozom. Šesnaest ispitanika iz grupe A primilo je nCRT koja se sastojala iz zračenja ukupne doze 50,4 greja (Gy) u 28 frakcija u kombinaciji sa dva ili tri ciklusa hemioterapije bazirane na 5-FU u formi 425 mg/m² 5-FU i 20 mg/m² leukovorina. Osam do 12 nedelja nakon nCRT izvedena je hirurška resekcija, a svi uzorci su histopatološki pregledani i procenjen je stepen tumorske regresije na nCRT određivanjem TRG stadijuma korišćenjem Mandardovog sistema.¹⁵⁷ Mandardov sistem histopatološke procene stepena tumorske regresije nakon neoadjuvantne terapije klasifikuje terapijski odgovor u jedan od 5 stadijuma: TRG 1 - odsustvo rezidualnog tumora, ekstenzivna fibroza; TRG 2 - retke rezidue tumorskih ćelija sporadično unutar fibroze; TRG 3 - znatne rezidue tumora, ali sa dominantnom fibrozom; TRG 4 - dominantne rezidue tumora unutar fibroze; TRG 5 - bez vidljivih znakova regresije tumora.⁶⁵ Ispitanici su na osnovu Mandardovog sistema dalje grupisani u one sa dobrim odgovorom na nCRT (TRG 1 i TRG 2) i one sa lošim odgovorom na nCRT (TRG 3, TRG 4 i TRG 5).

Kod ispitanika iz grupe B, resekcija jetre rađena je sinhrono ili nakon hirurškog lečenja primarne bolesti. Stadijum tumora pre resekcije određen je korišćenjem transabdomalnog ultrazvuka, radiografije grudnog koša, CT i/ili MRI. Dodatni kliničko-patološki podaci prikupljeni o ispitanicima iz grupe B podrazumevaju informacije o primarnom karcinomu (L, V i PN stadijumi i primena neoadjuvantne i/ili adjuvantne terapije) i informacije o metastatskoj bolesti (broj CLM, sinhrono/metahrono metastaze, stepen histološkog maligniteta i pojava recidiva).

Svi prikupljeni uzorci tumorskog i netumorskog tkiva su podeljeni na dva dela, pri čemu je deo predviđen za izolaciju RNK momentalno potopljen u 500 µL reagensa *TRI Reagent™ Solution* dok je deo predviđen za izolaciju DNK smešten u praznu plastičnu tubu od 1,5 mL, nakon čega su zamrznuti i čuvani na -80°C do izolacije RNK i DNK.

3.4. Izolacija RNK

Ukupna RNK je izolovana iz ćelijskih linija i sakupljenih uzoraka tkiva pomoću reagensa *TRI Reagent™ Solution* prateći instrukcije proizvođača (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD). Početni korak liziranja i homogenizacije uzoraka se razlikuje u zavisnosti od početnog materijala (ćelije ili tkiva), a svi naredni koraci uputstva su isti i detaljno navedeni u Tabeli 6.

Liziranje ćelija započinje odlivanjem medijuma u kojem su ćelije gajene i dodavanjem 1 mL *TRI Reagent™* reagensa u trajanju od 1 min. Ćelije su homogenizovane pomoću pipete tako što su nekoliko puta propuštene kroz nastavak od 1 mL, zatim pokupljene u plastičnu tubu od 1,5 mL i čuvane na -80°C do izolacije RNK.

Uzorci tkiva, koji su nakon sakupljanja čuvani u 500 µL *TRI Reagent™* reagensa, najpre su sterilnom pincetom prebačeni iz plastične tube od 1,5 mL u Petri posudu gde su usitnjeni pomoću skalpela, a zatim vraćeni u istu plastičnu tubu sa reagensom i homogenizovani plastičnim homogenizerima za tube od 1,5 mL (NIPPON Genetics Europe). Nakon toga je dodato još po 500 µL *TRI Reagent™* reagensa u homogenizovane uzorke koji su inkubirani 10 min. na sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim centrifugirani 4 min. na 3500 × g na 4°C, nakon čega je supernatant prebačen u novu plastičnu tubu od 1,5 mL i izolacija je nastavljena od koraka 2 po uputstvu opisanom u Tabeli 6.

Tabela 6. Detaljno uputstvo za izolaciju ukupne RNK *TRI Reagent™* reagensom

	Korak	Postupak
Liziranje i homogenizacija uzoraka	1.	U skladu sa početnim materijalom u 1 mL <i>TRI Reagent™</i> reagensa
Razdvajanje faza	2.	Dodati 200 µL hloroforma (Merck, Nemačka) u 1mL <i>TRI Reagent™</i> reagensa
	3.	Mućkati sadržaj 15 sekundi (s) i ostaviti da se inkubira 15 min. na sobnoj temperaturi
	4.	Centrifugirati 15 min. na 12000 × g na temperaturi od 4°C
	5.	Prebaciti ~600µL vodene (bezbojne, gornje) faze koja sadrži RNK u novu plastičnu tubu od 1,5 mL
Precipitacija RNK	6.	Dodati 500 µL hladnog 100% izopropanola (Merck, Nemačka) i ostaviti da se inkubira 10 min. na sobnoj temperaturi
	7.	Centrifugirati 10 min. na 12000 × g na temperaturi od 4°C radi precipitacije RNK u vidu beličastog taloga na dnu plastične tube
Ispiranje RNK	8.	Odliti supernatant, a u formiran RNK talog na dnu plastične tube dodati 1 mL hladnog 75% etanola (Merck, Nemačka) napravljenog u ddH ₂ O tretiranoj dietilpirokarbonatom (DEPC, Thermo Fisher Scientific, SAD)
	9.	Pomešati sadržaj i centrifugirati 5 min. na 7500 × g na temperaturi od 4°C
	10.	Odliti supernatant i ostaviti sadržaj da se osuši 3-5 min.
Elucija RNK	11.	Resuspendovati sadržaj u 30 µL vode tretitane DEPC-om i inkubirani 10 min. na 55°C u termo bloku
	12.	Uzorak izolovane RNK čuvati na temperaturi od -80°C

3.5. Određivanje koncentracije i provera čistoće izolovane RNK

Koncentracija izolovane ukupne RNK merena je spektrofotometrijski na aparatu *Ultrospec 3300 Pro spectrophotometer* (Amersham Biosciences, Ujedinjeno Kraljevstvo), a čistoća je na istom aparatu određena merenjem odnosa apsorbanci na talasnim dužinama 260nm i 280nm ($A_{260/280}$), pri čemu su za optimalno čiste uzorke smatrani oni u opsegu od 1,9 do 2,1. Koncentracija RNK izmerenih uzoraka je izražena u ng/ μ L.

3.6. Sinteza komplementarne DNK reakcijom reverzne transkripcije

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, SAD) je korišćen za reverznu transkripciju (RT) 2 μ g ukupne RNK u jednolančanu cDNK na osnovu matrice informacione RNK (iRNK) u reakcionoj smeši ukupnog volumena od 20 μ L sledećeg sastava:

- 2 μ L 10 \times RT Buffer
- 2 μ L 10 \times RT Random Primers
- 0,8 μ L 25 \times dNTP Mix (100 mM)
- 1 μ L MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/ μ L)
- 1 μ L RNase Inhibitor
- 2 μ g RNK
- Do 20 μ L dopunjeno ddH₂O bez nukleaza

Za sintezu cDNK je prema uputstvu korišćen sledeći program: 10 min. na 25°C, 120 min. na 37°C, 5 min. na 85°C, ∞ min. na 4°C.

Sintetisana cDNK je čuvana na temperaturi od -20°C.

3.7. Određivanje relativnih nivoa iRNK metodom kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR)

Kvantitativni PCR u realnom vremenu (eng. *Quantitative Real-Time PCR*, qRT-PCR) je korišćen za analizu relativne ekspresije genskih iRNK transkripata i alel-specifičnih iRNK od interesa. Ova metoda, u čijoj osnovi je detekcija fluorescentnog signala, jedna je od najosetljivijih, najpouzdanijih i najčešće korišćenih metoda za kvantifikaciju nukleinskih kiselina. Jednolančana cDNK sintetisana na osnovu iRNK je polazna matrica u reakciji amplifikacije u kojoj se prati akumulacija DNK produkta i prikupljaju podaci o intenzitetu detektovanog fluorescentnog signala u svakom ciklusu PCR reakcije. PCR ciklus u kojem se prvi put detektuje fluorescencija poreklom od amplifikovane sekvence, koja tada premašuje osnovni nivo signala amplifikacione krive (pozadinsku fluorescenciju), definiše se parametrom Ct kao *threshold cycle*.

Parametar Ct je automatski određivan u softveru *7500 System Software* korišćenom za prikupljanje i obradu dobijenih podataka za čije merenje je korišćen aparat *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, SAD).

Za kvantifikaciju ekspresije iRNK na osnovu merenja njima odgovarajućih cDNK korišćen je komercijalni kit *Power SYBR™ Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, SAD) prema uputstvu proizvođača, u reakcionoj smeši ukupnog volumena od 10 μ L sledećeg sastava:

- 5 μL *Power SYBR™ Green PCR Master Mix*
- 0,1 μL *forward* graničnika (10 μM)
- 0,1 μL *reverse* graničnika (10 μM)
- 1 μL cDNK razblažene 4 puta (\approx 500 ng)
- Do 10 μL dopunjeno ddH₂O bez nukleaza

Za reakciju umnožavanja je korišćen sledeći program: 2 min. na 50°C, 10 min. na 95°C, praćeno sa 40 ciklusa od 15 s na 95°C i 1 min. na 60°C.

Merenja su vršena u triplikatu sa dodatnim određivanjem krive topljenja fragmenta kako bi se potvrdila specifičnost produkata umnožavanja.

Vrednost relativnog nivoa ekspresije ciljnih iRNK metodom 2^{-dCt} (X_1) izračunata je prema formuli:

$$X_1 = 2^{-dCt}, \text{ gde je}$$

$$dCt = Ct_{\text{target, uzorak}} - Ct_{\text{endogena kontrola, uzorak}}$$

Razlika u relativnom nivou ekspresije ciljnih iRNK, tj. koliko puta se ekspresija ispitivanog targeta određenog uzorka razlikuje u odnosu na isti target referentnog uzorka (kalibratora) ili drugi target istog uzorka, predstavljena je kao stepen promene ($X_{2.1}$), odnosno stepen razlike ($X_{2.2}$; eng. *fold change*, odnosno *fold difference*) i izračunata metodom 2^{-ddCt} prema formuli:

$$X_{2.1} = 2^{-ddCt}, \text{ gde je}$$

$$ddCt = dCt_{\text{uzorak}} - dCt_{\text{kalibrator}} = (Ct_{\text{target, uzorak}} - Ct_{\text{endogena kontrola, uzorak}}) - (Ct_{\text{target, kalibrator}} - Ct_{\text{endogena kontrola, kalibrator}})$$

ili

$$X_{2.2} = 2^{-dCt_{[1]}} / 2^{-dCt_{[2]}} \text{ gde su}$$

$$dCt_{[1]} = Ct_{\text{target}[1], uzorak} - Ct_{\text{endogena kontrola, uzorak}}, \text{ a}$$

$$dCt_{[2]} = Ct_{\text{target}[2], uzorak} - Ct_{\text{endogena kontrola, uzorak}}$$

Ct vrednost u navedenim formulama je prosečna Ct vrednost analiziranih triplikata.

3.7.1. Određivanje relativne ekspresije *SMAD7* i *SMAD4* gena i njihovog odnosa

Relativna ekspresija *SMAD7* i *SMAD4* gena kvantifikovana je metodom qRT-PCR i normalizacijom u odnosu na endogenu kontrolu, ekspresiju humanog gena gliceraldehid 3-fosfodehidrogenaza (eng. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, *GAPDH*). Nukleotidne sekvence graničnika korišćenih u određivanju ekspresije *SMAD7*, *SMAD4* i *GAPDH* gena prikazane su u Tabeli 7.

Rezultati su analizirani poređenjem 2^{-dCt} vrednosti tretiranih i netretiranih SW620 ćelija, kao i tumorskog i okolnog netumorskog tkiva svakog ispitanika. Stepenn promene ekspresije *SMAD7* i *SMAD4* gena ispitivanih ćelijskih linija izračunat je metodom 2^{-ddCt} prema formuli $X_{2.1}$, u kojoj je kalibrator HCEC-1CT ćelijska linija. Odnos relativne ekspresije *SMAD7* i *SMAD4* gena (*SMAD7/SMAD4*) za svaku ćelijsku liniju i tkivo izračunat je prema formuli $X_{2.2}$, u kojoj je $target_{[1]}$ *SMAD7*, a $target_{[2]}$ *SMAD4*.

Tabela 7. Oligonukleotidne sekvence korišćenih graničnika u određivanju relativne ekspresije gena. Sekvence graničnika *SMAD7* su preuzete od Koinuma i sar.¹⁵⁸, *SMAD4* od Babic i sar.¹⁵⁹, a *GAPDH* od Grange i sar.¹⁶⁰

Parovi graničnika za svaki gen	Sekvenca graničnika u 5'-3' smeru	Dužina produkta (bp)
<i>SMAD7 forward</i> <i>SMAD7 reverse</i>	CCTTAGCCGACTCTGCGAACTA CCAGATAATTCGTTCCCCCTGT	134/131*
<i>SMAD4 forward</i> <i>SMAD4 reverse</i>	CACTACGAACGAGTTGTATCACC CTTGATGGAGCATTACTCTGCAG	71
<i>GAPDH forward</i> <i>GAPDH reverse</i>	GTGAAGGTCGGAGTCAACG TGAGGTCAATGAAGGGGTC	112

Skraćenica: bp - bazni par.

*Za varijantu transkripta NM_001190821.2

3.7.2. Određivanje relativne alel-specifične ekspresije detektovanih varijanti pojedinačnog nukleotida

Relativna kvantifikacija diferencijalne ekspresije alela svih detektovanih varijanti pojedinačnog nukleotida u 3'UTR-u *SMAD7* gena vršena je metodom qRT-PCR upotrebom alel-specifičnih graničnika. Za svaku SNV dizajnirana su 3 graničnika, od kojih jedan zajednički, *forward* graničnik i dva *reverse* graničnika koji se razlikuju samo u jednom nukleotidu, u odnosu na to da li je sekvenca komplementarna alelu divljeg tipa (WT) ili varijantnom alelu. Kombinacije nukleotidnih sekvenci graničnika dizajniranih za svaku detektovanu SNV u 3'UTR-u *SMAD7* gena prikazane su u Tabeli 8.

Graničnici su dizajnirani korišćenjem algoritma Primer-BLAST¹⁶¹ (eng. *The Basic Local Alignment Search Tool*, BLAST) dostupnog na web adresi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Ova softverska alatka, dostupna u okviru NCBI baze podataka, koristi se za dizajniranje specifičnih graničnika za optimalno umnožavanje produkta od interesa reakcijom lančanog umnožavanja polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Referentne sekvence *SMAD7* gena i najdužeg iRNK transkripta preuzete su u FASTA formatu sa web strane Ensembl dostupne na web adresi <http://www.ensembl.org/index.html>. Preuzete sekvence su deo ažurirane referentne sekvence humanog genoma GRCh38.p13 (eng. *patch release 13*, p13) sledećih identifikacionih brojeva: gen - 4092 u NCBI bazi, ENSG00000101665 u Ensembl bazi; transkript - NM_005904.4 u NCBI bazi, ENST00000262158.8 u Ensembl bazi. Sekvence su potom anotirane korišćenjem softvera *Vector NTI Advance™ v11.0* (Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD). Regioni od interesa su pretraženi i selektovano je više kombinacija preliminarnih parova graničnika od kojih su odabrani najoptimalniji pomoću algoritma Primer-BLAST, a na osnovu temperature topljenja graničnika (eng. *primer melting temperature*, T_m; T_m=59-64°C), dužine graničnika (21-26 bp), GC sastava graničnika (39-62%) i dužine ciljanog PCR produkta (122-177 bp).

Svaka ćelijska linija i uzorak tkiva sa detektovanom varijantom analizirani su u triplikatu korišćenjem zajedničkog *forward* graničnika za datu varijantu u dve paralelne reakcije od kojih se u jednoj reakciji koristi *reverse* graničnik komplementaran WT, a u drugoj varijantnom alelu. Relativna ekspresija alel-specifične iRNK svake merene SNV dobijena je normalizacijom u odnosu na endogenu kontrolu, ekspresiju humanog gena *GAPDH*, korišćenjem nukleotidnih sekvenci graničnika prikazanih u Tabeli 7.

Stepen razlike ekspresije dva alel-specifična transkripta u svakoj ćelijskoj liniji i uzorku tkiva izračunat je metodom $2^{-\Delta\Delta C_t}$ prema formuli X_{2.2}, u kojoj je target_[1] WT alel, a target_[2] varijantni alel. Procenat zastupljenosti alel-specifičnih transkripata izračunat je kao udeo transkripta specifičnog za svaki alel u zbiru ekspresije detektovane u obe reakcije specifične za datu SNV.

Tabela 8. Oligonukleotidne sekvence dizajnirane za relativnu kvantifikaciju alel-specifične ekspresije iRNK koje sadrže detektovane SNV u SMAD7 3'UTR-u. Alel-specifični nukleotidi za svaku SNV po kojima se razlikuju dva *reverse* graničnika su podebljani i podvučeni.

SNV	Aleli		Sekvence graničnika u 5'-3' smeru	Dužina produkta (bp)
Novel 1	G>C	Forward graničnik	GTGTTAAGCTCTGCTATTAGGCC	122
		Alel-specifični <i>reverse</i> graničnici	GTCAGCCTAGGATGGTACCTT <u>G/C</u>	
rs16950113	T>C	Forward graničnik	GGCTGACACCTAACTCTTCTTTC	156
		Alel-specifični <i>reverse</i> graničnici	CCAATGAGAATGCTTCTCTTGTTCAT <u>T/C</u>	
rs1050799536	G>A	Forward graničnik	CTGCTCCCATCCTGTGTGTTAAG	128
		Alel-specifični <i>reverse</i> graničnici	GGATGGTACCTTGGGTTATGAC <u>G/A</u>	
rs1043778717	C>T	Forward graničnik	GCGGTCATCATTTCACTTGTTCAGG	177
		Alel-specifični <i>reverse</i> graničnici	TGTCCAAGGGGCAGGAGAGAC <u>C/T</u>	

3.8. Izolacija DNK

Genomska DNK je izolovana iz ćelijskih linija i sakupljenih uzoraka tkiva pomoću komercijalnog kita *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD) prateći instrukcije proizvođača.

Iz posude za gajenje ćelija odliven je medijum za gajenje i ćelije su isprane rastvorom 1 × PBS, nakon čega je dodat rastvor 1 × tripsin-EDTA kako bi se ćelije odlepile od posude za gajenje. Nakon toga su ćelije centrifugirane 3 min. na 1800 rpm na sobnoj temperaturi, supernatant je odliven, a ćelije su potom resuspendovane u 200 µL 1 × PBS-a, prebačene u plastičnu tubu od 1,5 mL i izolacija je dalje nastavljena po uputstvu opisanom u Tabeli 9.

Uzorci tkiva, koji su nakon sakupljanja čuvani u praznoj plastičnoj tubi od 1,5 mL, najpre su iz nje prebačeni sterilnom pincetom u Petri posudu gde su usitnjeni pomoću skalpela, a zatim prebačeni u novu praznu plastičnu tubu od 1,5 mL i izolacija je dalje nastavljena po uputstvu opisanom u Tabeli 9.

Tabela 9. Detaljno uputstvo za izolaciju genomske DNK *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* komercijalnim kitom

Korak	Postupak		
	Ćelijske linije	Tkiva	
Priprema lizata ćelija i tkiva	1.	U plastičnu tubu sa prethodno pripremljenim ćelijama dodati 20 μ L <i>Proteinase K</i>	U plastičnu tubu sa prethodno pripremljenim tkivom dodati 200 μ L mešavine digestivnog pufera koji sadrži 180 μ L <i>PureLink® Genomic Digestion Buffer</i> i 20 μ L <i>Proteinase K</i>
	2.	-	Inkubirati uzorke 4 h na temperaturi od 55°C u termo bloku uz povremeno vorteksovanje
	3.	-	Centrifugirati lizat 3 min. na 12000 \times g na sobnoj temperaturi
	4.	-	Prebaciti supernatant u novu plastičnu tubu od 1,5 mL
	5.	Dodati 20 μ L <i>RNase A</i> , dobro izmešati kratkim vorteksovanjem i inkubirati 2 min. na sobnoj temperaturi	
	6.	Dodati 200 μ L <i>PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer</i> i dobro izmešati kratkim vorteksovanjem	
	7.	Inkubirati ćelije 10 min. na temperaturi od 55°C u termo bloku	-
	8.	Dodati 200 μ L 96-100% etanola (Merck, Nemačka) i dobro izmešati vorteksovanjem u trajanju od 5 s	
Vezivanje DNK	9.	Prebaciti ~640 μ L pripremljenog lizata na <i>PureLink® Spin Column</i> kolonu sa silikatnom membranom u plastičnoj tubi <i>PureLink® Collection Tube</i> od 2 mL	
	10.	Centrifugirati prebačeni lizat na koloni na 10000 \times g na sobnoj temperaturi	
	11.	Baciti plastičnu tubu sa lizatom, a kolonu na čijoj membrani se nalazi DNK prebaciti u novu <i>PureLink® Collection Tube</i> plastičnu tubu	
Ispiranje DNK	12.	Dodati 500 μ L <i>PureLink® Genomic Wash Buffer 1</i> na kolonu	
	13.	Centrifugirati 1 min. na 10000 \times g na sobnoj temperaturi	
	14.	Baciti korišćenu plastičnu tubu i kolonu prebaciti u novu plastičnu tubu	
	15.	Dodati 500 μ L <i>PureLink® Genomic Wash Buffer 2</i> na kolonu	
16.	Centrifugirati 3 min. na 12000 \times g na sobnoj temperaturi i baciti korišćenu plastičnu tubu		
Elucija DNK	17.	Staviti kolonu u novu plastičnu tubu od 1,5 mL	
	18.	Dodati 150 μ L ddH ₂ O na kolonu i inkubirati 10 min. na sobnoj temperaturi	
	19.	Centrifugirati 1 min. na 12000 \times g na sobnoj temperaturi	
	20.	Baciti kolonu, a plastičnu tubu koja sadrži uzorak izolovane DNK čuvati na temperaturi od -20°C	

3.9. Određivanje koncentracije i provera čistoće izolovane DNK

Koncentracija izolovane genomske DNK merena je spektrofotometrijski na aparatu *BioSpec-nano* (Shimadzu, Japan), a čistoća je na istom aparatu određena merenjem odnosa apsorbanci na talasnim dužinama 260nm i 280nm ($A_{260/280}$), pri čemu su za optimalno čiste uzorke smatrani oni u opsegu od 1,8 do 2,0. Koncentracija DNK izmerenih uzoraka je izražena u ng/ μ L.

3.10. Amplifikacija celokupne genomske DNK niske koncentracije

U slučaju niske koncentracije genomske DNK izolovane iz malih uzoraka tkiva sakupljenih bioptiranjem, komercijalni kit *REPLI-g UltraFast Mini Kit* (Qiagen, Nemačka) je korišćen kako bi se uniformnom amplifikacijom celokupne genomske DNK obezbedila dovoljna količina svakog uzorka za dalje analize. Kit je korišćen po uputstvu proizvođača opisanom u Tabeli 10.

Tabela 10. Detaljno uputstvo za amplifikaciju celokupne genomske DNK, izolovane u niskim koncentracijama zbog ograničene veličine uzorka, korišćenjem *REPLI-g UltraFast Mini Kit* komercijalnog kita

Korak	Postupak
1.	Unapred pripremiti denaturišući pufer D1 (za 40 reakcija: 5 μ L pufera <i>Reconstituted Buffer DLB</i> i 35 μ L ddH ₂ O bez nukleaza) i neutrališući pufer N1 (za 40 reakcija: 8 μ L <i>Stop solution</i> rastvora i 72 μ L ddH ₂ O bez nukleaza) i čuvati ih najduže 3 meseca na -20°C
2.	Prebaciti 1 μ L uzorka DNK matrice u plastičnu tubu od 1 mL
3.	Dodati 1 μ L D1 pufera DNK matrici, dobro izmešati vorteksovanjem i kratko centrifugirati
4.	Inkubirati 3 min. na sobnoj temperaturi
5.	Dodati 2 μ L N1 pufera u smešu, dobro izmešati vorteksovanjem i kratko centrifugirati
6.	Otopiti polimerazu <i>REPLI-g UltraFast DNA Polymerase</i> na ledu, a pufer <i>REPLI-g UltraFast Reaction Buffer</i> na sobnoj temperaturi i kratko ga vorteksovati i centrifugirati
7.	U novoj plastičnoj tubi pripremiti smešu dodavanjem 1 μ L <i>REPLI-g UltraFast DNA Polymerase</i> polimeraze i 15 μ L <i>REPLI-g UltraFast Reaction Buffer</i> pufera, izmešati vorteksovanjem, kratko centrifugirati i držati je na ledu do skorog korišćenja
8.	Dodati 16 μ L smeše napravljene u 7. koraku u smešu iz 5. koraka sa denaturisanom DNK matricom
9.	Inkubirati 1,5 h na 30°C u termo bloku
10.	Inaktivirati <i>REPLI-g UltraFast DNA Polymerase</i> polimerazu zagrevanjem uzorka 3 min. na 65°C u termo bloku
11.	Izmeriti koncentraciju umnožene DNK i razblažiti do željene koncentracije dodavanjem ddH ₂ O
12.	Uzorak umnožene DNK čuvati na temperaturi od -20°C

3.11. Reakcija lančanog umnožavanja polimerazom

Ciljni fragmenti DNK molekula u okviru 3'UTR-a *SMAD7* gena amplifikovani su PCR metodom. Ova metoda omogućava dobijanje velikog broj kopija ciljne sekvence DNK *in vitro* selektivnim umnožavanjem, a zasnovana je na aktivnosti DNK polimeraze koja ugrađuje pojedinačne nukleotide komplementarne postojećoj DNK matrici na 3'-OH kraj rastućeg polinukleotidnog lanca. Od polazne male količine DNK, definisani ciljni fragment se umnožava u nekoliko miliona kopija tokom mnogobrojnih uzastopnih PCR ciklusa, od kojih se svaki sastoji od koraka denaturacije DNK matrice (eng. *template denaturation*), vezivanja oligonukleotidnih graničnika sa slobodnom OH grupom na 3' kraju (eng. *primer annealing*) i izduživanja graničnika duž DNK matrice po principu komplementarnosti (eng. *primer extension*), pri čemu svakog narednog ciklusa DNK lanci sintetisani u prethodnom ciklusu služe kao matrica.

Osim različitih oligonukleotidnih graničnika kojima su definisani ciljni fragmenti DNK molekula i koji su komplementarni njihovim krajevima, u PCR reakciji primenjene su iste komponente reakcione smeše ukupnog volumena od 30 μ L sledećeg sastava:

- 3 μ L 10 \times pufera za *Taq* polimerazu sa $MgCl_2$ (KAPA Biosystems, SAD)
- 3 μ L smeše dNTP (2 mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dGTP, 2 mM dCTP)
- 0,25 μ L *forward* graničnika (10 μ M)
- 0,25 μ L *reverse* graničnika (10 μ M)
- 0,25 μ L polimeraze *Taq* (5 u/ μ L; KAPA Biosystems, SAD)
- ~100 ng DNK
- Do 30 μ L dopunjeno ddH₂O bez nukleaza

Za PCR reakciju korišćen je sledeći program: 10 min. na 94°C, praćeno sa 35 ciklusa od 30 s na 94°C, 30 s na 55°C i 30 s na 72°C, praćeno sa 10 min. na 72°C.

Ciljni fragmenti DNK u okviru 3'UTR-a *SMAD7* gena umnožavani su korišćenjem dva seta graničnika čije su nukleotidne sekvence prikazane u Tabeli 11.

Tabela 11. Oligonukleotidne sekvence graničnika korišćenih u PCR reakciji za umnožavanje fragmenata DNK u okviru 3'UTR-a *SMAD7* gena. Sekvence graničnika su preuzete od Broderick i sar.¹⁰⁴

Parovi graničnika	Sekvenca graničnika u 5'-3' smeru	Dužina produkta (bp)
<i>SMAD7</i> 3'UTR1 <i>forward</i>	AGCAGGCCACACTTCAAACCT	784
<i>SMAD7</i> 3'UTR1 <i>reverse</i>	GGCACTGGGTGAGCAATACT	
<i>SMAD7</i> 3'UTR2 <i>forward</i>	GCCGAACCAGAACCAATTAT	755
<i>SMAD7</i> 3'UTR2 <i>reverse</i>	TTTGGCATTGTTATTTGCATT	

3.11.1. Analiza uspešnosti i specifičnosti PCR reakcije elektroforezom u agaroznom gelu

Elektroforezom u 2% gelu od agaroze u puferu $1 \times$ TAE (40 mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1 mM Na_2EDTA) proveravana je uspešnost i specifičnost PCR reakcije. Priprema gela od agaroze, elektroforeza i vizuelizacija produkata PCR reakcije vršeni su prema uputstvu opisanom u Tabeli 12.

Uočavanje jedne diskretne trake očekivane dužine u gelu označavala je uspešnu PCR reakciju i specifično umnožavanje ciljnog fragmenta DNK molekula.

Tabela 12. Detaljno uputstvo za pripremu gela od agaroze, elektroforezu i vizuelizaciju produkata PCR reakcije

Korak	Postupak
Priprema gela od agaroze	1. U 100 mL $1 \times$ TAE pufera dodati 2 grama (g) agaroze (Sigma-Aldrich, Nemačka) i zagrejati do ključanja
	2. U prohladjeni rastvor pre polimerizacije dodati etidijum-bromid u krajnjoj koncentraciji od 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, koji omogućava kasniju vizualizaciju DNK
	3. Ohlađen rastvor izliti u kadicu sa postavljenim češljicom za pravljenje bunarića za nanošenje PCR produkta u gel
	4. Ostaviti gel da polimerizuje 30 min. do 1 h na sobnoj temperaturi i ukloniti češljic iz očvrnutog gela
Elektroforeza	5. Gel od agaroze položiti horizontalno u kadicu za elektroforezu napunjenu $1 \times$ TAE puferom
	6. Naneti u bunariće u gelu uzorke PCR produkta zapremine 8 μL pomešane sa 2 μL Orange G boje (Sigma-Aldrich, SAD)
	7. Kao i uzorke PCR produkta u gel naneti 1 μL standarda dužine <i>GeneRuler 100 bp DNA Ladder</i> za proveru očekivane veličine PCR produkta
	8. Elektroforezu sprovesti u puferu $1 \times$ TAE pri konstantnom naponu struje od 100 V u toku 30ak min.
Vizualizacija PCR produkta	9. Nakon završene elektroforeze gel osvetliti UV svetlošću talasne dužine 266 nm radi vizualizacije PCR produkata
	10. Rezultate elektroforeze na gelu dokumentovati <i>BioDocAnalyze</i> sistemom sa CCD kamerom (Biometra, Nemačka).

3.12. Prečišćavanje umnoženih DNK fragmenata

Ciljni DNK fragmenti 3'UTR-a *SMAD7* gena umnoženi PCR reakcijom su prečišćeni korišćenjem *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, Litvanija) komercijalnog kita prateći instrukcije proizvođača opisane u Tabeli 13.

Tabela 13. Detaljno uputstvo za prečišćavanje produkta PCR reakcije *GeneJET PCR Purification Kit* komercijalnim kitom

Korak	Postupak
1.	U jednu zapreminu smeše PCR produkta dodati jednu zapreminu <i>Binding Buffer</i> pufera (odnos 1:1). Dobro izmućkati i proveriti boju rastvora - žuta boja ukazuje na optimalnu pH vrednost za vezivanje DNK, dok u slučaju narandžaste ili ljubičaste boje dodati 10 µL 3 M natrijum acetata, pH 5,2 i dobro izmešati.
2.	Prebaciti do 800 µL rastvora iz koraka 1 na <i>GeneJET purification column</i> kolonu i centrifugirati 1 min. na 12000 × g na sobnoj temperaturi. Odbaciti tečnost sakupljenu u plastičnoj tubi od 2 mL i kolonu vratiti u istu tubu.
3.	Dodati 700 µL <i>Wash Buffer</i> na <i>GeneJET purification column</i> kolonu i centrifugirati 1 min. na 12000 × g na sobnoj temperaturi. Odbaciti tečnost sakupljenu u plastičnoj tubi i kolonu vratiti u istu tubu.
4.	Centrifugirati praznu <i>GeneJET purification column</i> kolonu dodatni 1 min. na 12000 × g na sobnoj temperaturi
5.	Prebaciti kolonu u novu plastičnu tubu od 1,5 mL, naneti 30 µL ddH ₂ O na kolonu i inkubirati 1 min. na sobnoj temperaturi
6.	Eluirati DNK sa kolone centrifugiranjem 1 min. na 12000 × g na sobnoj temperaturi
7.	Baciti kolonu, a plastičnu tubu koja sadrži uzorak prečišćenog produkta PCR-a čuvati na temperaturi od -20°C

3.13. Sekvenciranje DNK

Redosled nukleotidnih baza u molekulu DNK određen je Sangerovom metodom sekvenciranja.¹⁶² Ova metoda se zasniva na upotrebi dideoksinukleotid trifosfata (eng. *dideoxynucleoside triphosphates*, ddNTPs) u reakciji sekvenciranja, čijom se ugradnjom u rastući nukleotidni lanac komplementaran postojećoj DNK matrici zaustavlja dalja elongacija molekula DNK, s obzirom da ddNTP-ovi ne poseduju 3'-OH grupu na molekulu dezoksiriboze neophodnu za ugrađivanje narednog nukleotida. Produkt ove reakcije je serija jednolančanih DNK molekula koji se završavaju ddNTP-ovima i razlikuju u dužini za po jedan nukleotid. Svaki od četiri ddNTP-ova je obeležen različitom fluorescentnom bojom koju detektuje laserski čitač u toku elektroforeze ovih DNK lanaca, koja se odvija u odgovarajućem komercijalnom polimeru. Kada svi DNK lanci (od najkraćeg do najdužeg) prođu kroz kapilaru i detektor očitava obeležene ddNTP-ove, podaci se automatski obrađuju i predstavljaju u obliku elektroferograma sa koga se očitava redosled nukleotida u ciljnoj sekvenci.

Za reakciju sekvenciranja je korišćen komercijalni kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, SAD) u reakcionoj smeši ukupne zapremine od 8 µl sledećeg sastava:

- 2 µL *BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix* (Applied Biosystems, SAD)
- 1 µL *forward* ili *reverse* graničnika (3,2 µM)
- 1 µL PCR produkta
- 4 µL ddH₂O

Za umnožavanje u reakciji sekvenciranja je korišćen sledeći program: 1 min. na 96°C, praćeno sa 25 ciklusa od 10 s na 96°C, 5 s na 50°C i 4 min. na 60°C.

Nakon umnožavanja, dobijeni produkti reakcije sekvenciranja su prečišćeni po uputstvu opisanom u Tabeli 14.

Tabela 14. Detaljno uputstvo za prečišćavanje produkta umnožavanja reakcije sekvenciranja

Korak	Postupak
1.	U 8 µL reakcione smeše dodati 40 µL rastvora A (1,2 mL 3M Na-acetata (pH 5,2), 25 mL etanola, 5,8 mL H ₂ O)
2.	Smešu centrifugirati 10 min. na 11400 × g na sobnoj temperaturi
3.	Odliti supernatant i talog isprati sa 200 µL 70% etanola (Merck, Nemačka)
4.	Smešu centrifugirati 10 min. na 11400 × g na sobnoj temperaturi
5.	Odliti supernatant i osušiti talog
6.	Dodati 20 µL Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, SAD) i dobro izmešati vorteksovanjem

Prečišćeni uzorci reakcije sekvenciranja analizirani su na *3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, SAD) automatizovanom četvorokapilarnom sistemu za elektroforezu sa sistemom za detekciju zasnovanom na fluorescenciji.

3.13.1. Obrada podataka nakon sekvenciranja DNK

Softver *Sequencing Analysis Software v5.2* (Applied Biosystems, SAD) je korišćen za očitavanje i obradu dobijenih elektroferograma sekvenci. Svaki elektroferogram je najpre pregledan u celosti, nakon čega je sekvenca upoređena sa postojećom referentnom sekvencom humanog genoma GRCh38.p13 u javno dostupnoj bazi podataka NCBI pomoću algoritma BLAST^{163,164} dostupnog na web adresi <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Pronađene varijante su zatim identifikovane pretragom u NCBI *dbSNP* bazi podataka (dostupnoj na web adresi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) pomoću njihovih genomskih koordinati. Kako bismo utvrdili da li je otkrivena somatska varijanta ranije prijavljena, pretraženi su Katalog somatskih mutacija u kanceru (eng. *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*, COSMIC) v96¹⁶⁵ (dostupan na web adresi <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, datum pristupa 8. 8. 2022), *SomamiR 2.0* baza podataka¹⁶⁶ (dostupna na web adresi https://compbio.uthsc.edu/So_mamiR/, datum pristupa 8. 8. 2022) i *SomaMutDB* baza podataka¹⁶⁷ (dostupna na web adresi <https://vijglab.einsteinmed.org/SomaMutDB>, datum pristupa 8. 8. 2022).

3.14. *In silico* predikcija efekata varijanti pojedinačnih nukleotida na efikasnost vezivanja miRNK

Za predikciju posledica detektovanih varijanti u 3'UTR-u *SMAD7* gena na interakcije između iRNK i miRNK molekula, korišćena su dva web servera za predikciju efekata genskih varijanti - *PolymiRTS Database 3.0*¹⁶⁸ (dostupan na web adresi <https://compbio.uthsc.edu/miRSNP/home.php>, datum pristupa 23. 11. 2021) i *miRNASNP-v3*¹⁶⁹ (dostupan na web adresi <http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP/#/>, datum pristupa 17. 6. 2022). *SNP ID* alatka za pretraživanje *PolymiRTS Database 3.0* baze podataka je korišćena za predikciju uticaja normalno

prisutne varijabilnosti DNK u okviru mesta vezivanja miRNK molekula na interakcije između iRNK i miRNK molekula. *miRNASNP-v3* baza podataka je korišćena za predikciju da li detektovane germinativne varijante dovode do većeg ili manjeg afiniteta za vezivanje, odnosno, da li dovode do nastanka novih ili gubitka već postojećih mesta za vezivanje specifičnih miRNK molekula. Modul *miRNASNP-v3* web servera, prilagođen za predikciju efekata novootkrivenih SNV u okviru mesta vezivanja miRNK, korišćen je u slučaju detektovane nove somatske varijante. U ovoj analizi upoređene su dve sekvence dužine 101 bp (po 50 nukleotida uzvodno i nizvodno od varijante), od kojih je jedna imala WT, a druga varijantni alel.

3.15. Statistička obrada podataka

Softveri *GraphPad Prism v8.4.3* (*GraphPad Software Inc.*, San Dijego, Kalifornija, SAD) i *IBM SPSS Statistics v20.0* (*SPSS Inc.*, Čikago, Illinois, SAD) su korišćeni za statističku obradu podataka. Za procenu normalnosti raspodele kontinualnih varijabli i homogenosti varijanse, korišćeni su Kolmogorov-Smirnov test i Levene-ov test, redom, od čijih rezultata je zavisio dalji odabir adekvatnih statističkih testova. Za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli normalne raspodele i ispunjenog uslova homogenosti, korišćeni su t-test (uparenih uzoraka za zavisne i Studentov za nezavisne uzorke) i Analiza varijanse (ANOVA) praćena Dunette-ovim *post hoc* testom. Za analizu međuzavisnosti kontinualnih varijabli normalne raspodele i ispunjenog uslova homogenosti, korišćen je Pearson-ov koeficijent korelacije. Za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli čija raspodela odstupa od normalne, korišćeni su Wilcoxon-ov test sume rangova za zavisne uzorke i Mann-Whitney U test i Kruskal-Wallis-ov test za dve, odnosno tri ili više grupa nezavisnih uzoraka, redom. Za analizu međuzavisnosti kontinualnih varijabli čija raspodela odstupa od normalne, korišćen je Spearman-ov koeficijent korelacije. Za poređenje vrednosti nezavisnih kategorijskih varijabli, korišćen je Fisher-ov exact test. Kako bi se utvrdio translacioni potencijal ispitivanih obrazaca ekspresije kao dijagnostičkih i prediktivnih biomarkera, korišćena je ROC analiza (eng. *receiver operating curves*), pri čemu je efikasnost biomarkera procenjena na osnovu površine ispod krive (eng. *area under the curve*, AUC) i *p* vrednosti, dok su granične vrednosti (eng. *cut-off*) određene na osnovu maksimalnog Youden-ovog indeksa. *P* vrednost $\leq 0,05$ je smatrana značajnom.

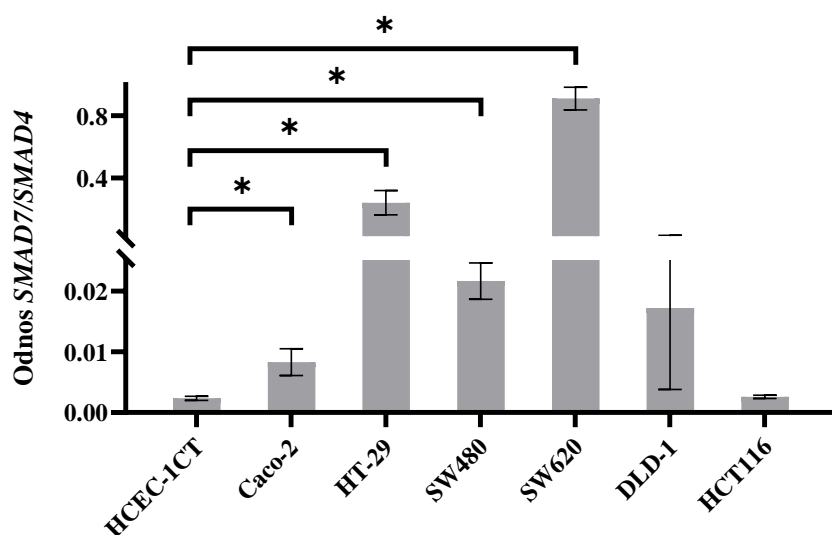
4. REZULTATI

4.1. Ekspresija *SMAD7* i *SMAD4* gena i njihov odnos u ćelijskim linijama

Kako bi se ispitala promena u nivou ekspresije i međusobnom odnosu *SMAD7* i *SMAD4* gena u tumorskim u odnosu na netumorske ćelije kolona *in vitro*, ekspresija je izmerena u 6 ćelijskih linija karcinoma kolona (Caco-2, HT-29, SW480, SW620, DLD-1 i HCT116) i upoređena sa ekspresijom u ćelijama nemalignog epitela kolona (HCEC-1CT). Stepen promene ekspresije ($2^{-\text{ddCt}}$) *SMAD7* i *SMAD4* gena u tumorskim ćelijama kolona u odnosu na HCEC-1CT prikazan je u Tabeli 15. Odnos *SMAD7/SMAD4* se značajno razlikovao između ispitivanih ćelijskih linija ($p=0,012$, Kruskal-Wallisov test) i bio je povišen u tumorskim ćelijskim linijama u poređenju sa HCEC-1CT (Slika 15), sa značajnom razlikom u svim ćelijskim linijama ($p=0,05$ za sve, Mann-Whitney U test) izuzev DLD-1 i HCT116 ćelija ($p=0,513$ i $p=0,275$, redom, Mann-Whitney U test za obe).

Tabela 15. Stepen promene ekspresije relativnog nivoa iRNK u ćelijskim linijama humanog primarnog i metastatskog adenokarcinoma kolona u odnosu na humanu ćelijsku liniju nemalignog epitela kolona (HCEC-1CT). Napomena: tabela je publikovana na engleskom jeziku u radu proisteklom iz ove doktorske disertacije, Rosic i sar.¹⁷⁰

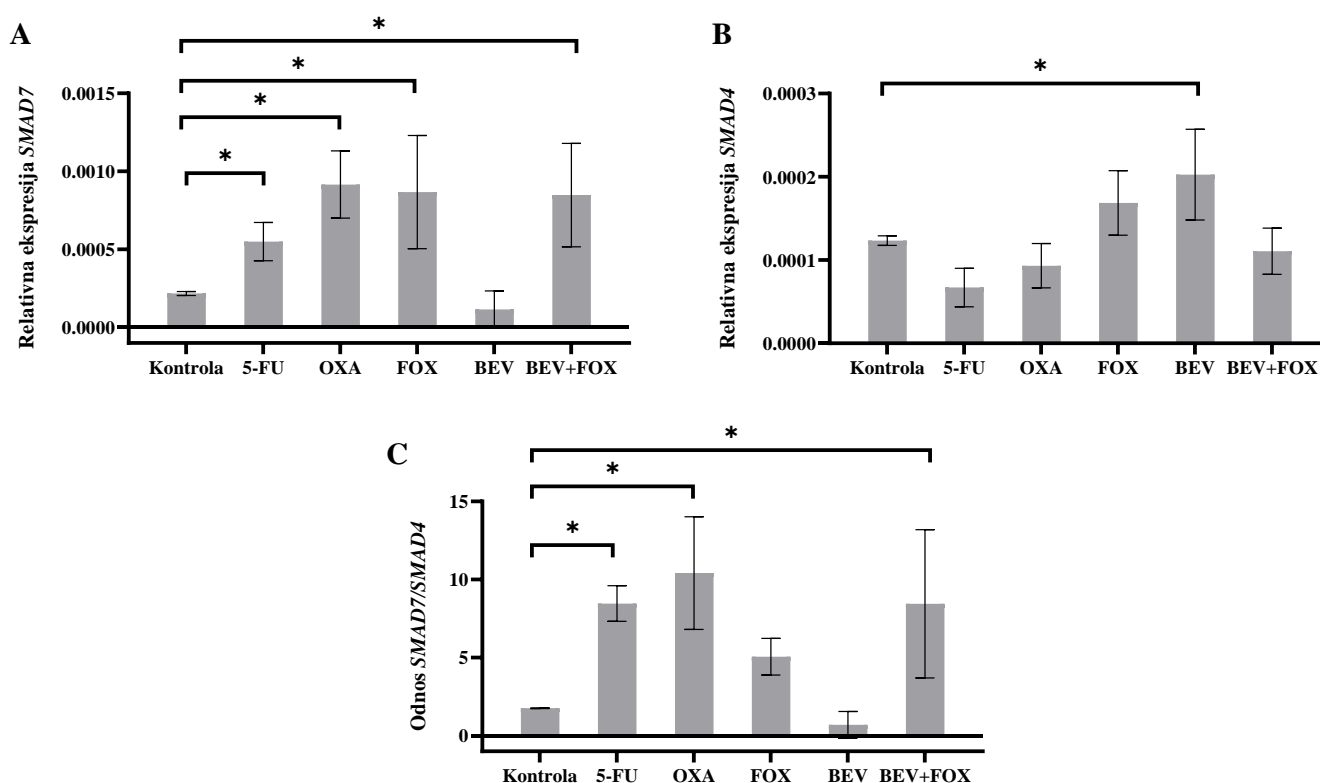
Ćelijska linija	Stepen promene iRNK ekspresije ($2^{-\text{ddCt}}$)	
	<i>SMAD7</i>	<i>SMAD4</i>
Caco-2	6,9	2,0
HT-29	10,1	-9,8
SW480	21,6	2,3
SW620	8,8	-44,6
DLD-1	18,2	1,7
HCT116	2,1	1,9



Slika 15. Odnos *SMAD7/SMAD4* u CRC ćelijskim linijama u poređenju sa HCEC-1CT. Odnos nivoa relativne ekspresije gena *SMAD7* i *SMAD4* u CRC ćelijama analiziran qRT-PCR metodom normalizovan je na ekspresiju gena *GAPDH* i upoređen sa humanom ćelijskom linijom nemalignog epitela kolona (HCEC-1CT). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $2^{-\text{dCt}} \pm$ standardna devijacija (SD) triplicate. Značajna razlika u ekspresiji između tumorskih i netumorske ćelijske linije je označena zvezdicom (* $p \leq 0,05$).

4.2. Ekspresija *SMAD7* i *SMAD4* gena i njihov odnos u SW620 ćelijama nakon tretmana hemioterapeuticima i bevacizumabom

Kako bi se ispitaio uticaj različitih terapijskih režima za lečenje CRC na nivo ekspresije i međusobni odnos *SMAD7* i *SMAD4* gena *in vitro*, SW620 ćelije su tretirane hemioterapeutskim lekovima (21,4 μ M 5-FU i 85 μ M oksaliplatinom), biološkom, ciljanom terapijom (250 μ g/mL bevacizumaba) i njihovim kombinacijama (FOX i bevacizumab + FOX, u istim pojedinačnim koncentracijama) tokom 72 h. Nakon toga, relativna ekspresija ciljnih gena je izmerena qRT-PCR metodom i upoređena između tretiranih i kontrolnih ćelija (u ddH₂O). Prethodno je pokazano da ova ćelijska linija dobro odgovara na sve primenjene terapijske režime analizom apoptoze SW620 ćelija korišćenjem metode protočne citofluorimetrije.¹⁷¹ Ekspresija *SMAD7* i odnos *SMAD7/SMAD4* su bili značajno povišeni nakon tretmana 5-FU ($p=0,05$, Mann-Whitney U test i $p=0,028$, Dunette-ov *post hoc* test, redom), oksaliplatinom ($p=0,05$, Mann-Whitney U test i $p=0,005$, Dunette-ov *post hoc* test, redom) i bevacizumabom u kombinaciji sa FOX ($p=0,05$, Mann-Whitney U test i $p=0,029$, Dunette-ov *post hoc* test, redom; Slika 16). Ekspresija *SMAD7* je takođe bila značajno povišena nakon tretmana FOX ($p=0,05$, Mann-Whitney U test), dok je ekspresija *SMAD4* bila značajno povišena jedino nakon tretmana bevacizumabom ($p=0,046$, Dunette-ov *post hoc* test; Slika 16). Ekspresija *SMAD7* se nije značajno razlikovala jedino nakon tretmana bevacizumabom ($p=0,513$, Mann-Whitney U test), dok je, suprotno tome, ekspresija *SMAD4* ostala nepromenjena nakon svih ostalih tretmana (5-FU, $p=0,195$; oksaliplatin, $p=0,698$; FOX, $p=0,358$; bevacizumab + FOX, $p=0,984$; Dunette-ov *post hoc* test za sve). Odnos *SMAD7/SMAD4* se nije značajno promenio nakon tretmana FOX ($p=0,411$, Dunette-ov *post hoc* test) i bevacizumabom ($p=0,978$, Dunette-ov *post hoc* test).



Slika 16. Nivo relativne ekspresije gena *SMAD7* (A), *SMAD4* (B) i odnos *SMAD7/SMAD4* (C) nakon 72 h tretmana SW620 ćelija različitim režimima hemioterapeutske i ciljane terapije. Nivo iRNK je normalizovan na ekspresiju gena *GAPDH* i upoređen sa kontrolom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $2^{-dCt} \pm SD$ tri ponovljena eksperimenta. 5-FU: 5-fluorouracil; OXA: oksaliplatin; FOX: 5-fluorouracil + oksaliplatin; BEV: bevacizumab. Značajna razlika u ekspresiji nakon tretmana je označena zvezdicom ($*p \leq 0,05$). *Napomena:* slika je publikovana na engleskom jeziku u radu proisteklom iz ove doktorske disertacije, Rosic i sar.¹⁷⁰

4.3. Demografske i kliničko-patološke karakteristike ispitanika

Prikupljene demografske i kliničko-patološke karakteristike svih ispitanika uključenih u istraživanje prikazani su u Tabeli 16, dok su karakteristike specifične za ispitanike iz grupa A i B prikazane u Tabeli 17 i Tabeli 18, redom.

Tabela 16. Demografske i kliničko-patološke karakteristike svih ispitanika uključenih u istraživanje

Karakteristika	Svi ispitanici n (%)	Grupa A n (%)	Grupa B n (%)	Grupa C n (%)
Broj ispitanika	85	19 (22,4)	16 (18,8)	50 (58,8)
Pol				
Muškarci	56 (65,9)	12 (63,2)	9 (56,2)	35 (70)
Žene	29 (34,1)	7 (36,8)	7 (43,8)	15 (30)
Starost (godine), srednja vrednost, opseg	68, 34-85	67, 34-83	69, 47-77	68, 38-85
Lokalizacija [#]				
Kolon	37 (43,5)	0 (0)	5 (31,2)	32 (64)
Rektum	48 (56,5)	19 (100)	11 (68,8)	18 (36)
Stadijum bolesti [#]				
T stadijum				
T1	3 (3,5)	0 (0)	0 (0)	3 (6)
T2	9 (10,6)	0 (0)	0 (0)	9 (18)
T3	54 (63,5)	14 (73,7)	11 (68,8)	29 (58)
T4	19 (22,4)	5 (26,3)	5 (31,2)	9 (18)
N stadijum				
N0	33 (38,8)	0 (0)	3 (18,8)	30 (60)
N1	21 (24,7)	2 (10,5)	9 (56,2)	10 (20)
N2	31 (36,5)	17 (89,5)	4 (25)	10 (20)
M stadijum				
Mx	46 (54,1)	0	0	46 (92)
M0	19 (22,4)	19 (100)	0	0 (0)
M1	20 (23,5)	0 (0)	16 (100)	4 (8)

[#]Za primarni karcinom

Tabela 17. Dodatne kliničko-patološke karakteristike LARC ispitanika

Karakteristika	Grupa A n (%)
Broj ispitanika	19
Lokalizacija tumora	
Niski rektum	8 (42,1)
Srednji rektum	11 (57,9)
CRM	
Da	7 (36,8)
Ne	12 (63,2)
EMVI	
Da	9 (47,4)
Ne	10 (52,6)
Prognoza bolesti	
Dobra (T1-3/N1)	2 (10,5)
Loša (T4 ili N2)	17 (89,5)
Neoadjuvantna hemioradioterapija	16 (84,2)
Odgovor na nCRT	
Dobar (TRG 1 + 2)	3 (18,8)
Loš (TRG 3 + 4)	13 (81,2)
CEA* (IU/mL), srednja vrednost, opseg	3,9, 0,6-30,5
CA 19-9* (IU/mL), srednja vrednost, opseg	10,0, 2-363

*Referentne vrednosti: CEA, 0,0-5,0 IU/mL; CA 19-9, 0,0-37,0 IU/mL

Tabela 18. Dodatne kliničko-patološke karakteristike CLM ispitanika

Karakteristika	Grupa B n (%)
Broj ispitanika	16
Broj metastaza	
Jedna	11 (68,8)
Više	5 (31,2)
Prisustvo metastaza pri dijagnozi	
Sinhrono	8 (50)
Metahrono	8 (50)
Stepen histološkog maligniteta (gradus, G)	
Dobro diferentovane	7 (43,8)
Umereno diferentovane	9 (56,2)
Pojava recidiva	
Da	7 (43,8)
Ne	9 (56,2)
Limfatična invazija (L stadijum) [#]	
L0	10 (62,5)

L1	6 (37,5)
Vaskularna invazija (V stadijum) [#]	
V0	11 (68,8)
V1	5 (31,2)
Perineuralna invazija (PN stadijum) [#]	
PN0	8 (50)
PN1	8 (50)
Neoadjuvantna hemioradioterapija [#]	
Da	10 (62,5)
Ne	6 (37,5)
CEA* (IU/mL), srednja vrednost, opseg	29,5, 2-204
CA 19-9* (IU/mL), srednja vrednost, opseg	94,5, 2-12999

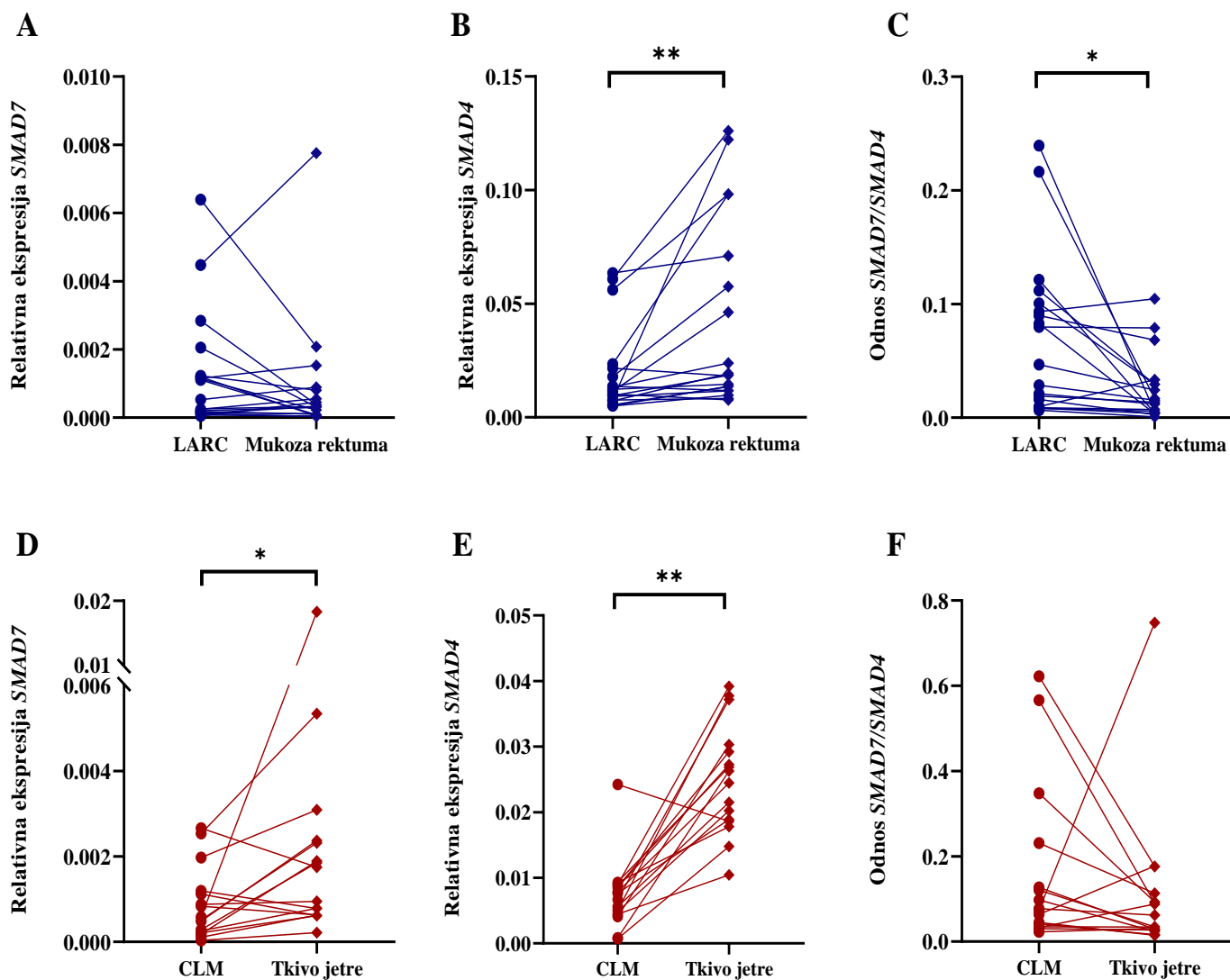
[#]Za primarni karcinom

*Referentne vrednosti: CEA, 0,0-5,0 IU/mL; CA 19-9, 0,0-37,0 IU/mL

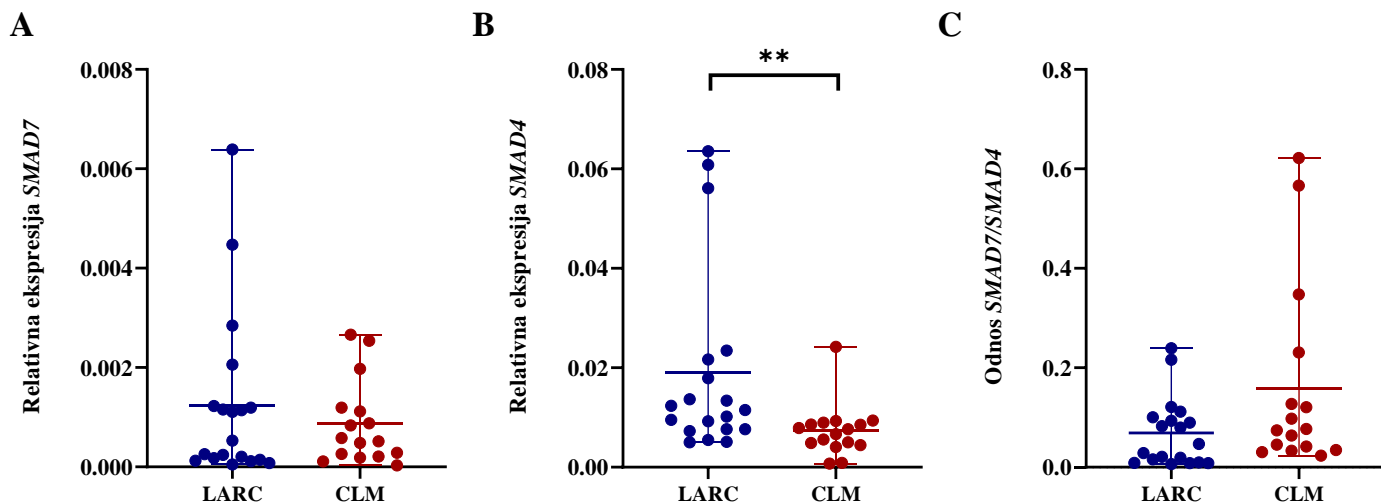
4.4. Ekspresija *SMAD7* i *SMAD4* gena i njihov odnos u tumorskim i netumorskim tkivima LARC i CLM ispitanika

Kako bi se ispitala razlika u nivou ekspresije i međusobnom odnosu *SMAD7* i *SMAD4* gena između tumorskih i netumorskih tkiva ispitanika sa primarnim i metastatskim CRC, ekspresija je izmerena i upoređena između tumorskih i okolnih netumorskih tkiva poreklom od svakog od 19 LARC i 16 CLM ispitanika (Slika 17). Kod LARC ispitanika, ekspresija *SMAD4* gena je bila značajno snižena u tumorskom tkivu, a odnos *SMAD7/SMAD4* značajno povišen u tumorskom u poređenju sa netumorskim tkivom ($p=0,001$ i $p=0,003$, redom, Wilcoxon-ov test za obe). Ekspresija gena *SMAD7* nije se značajno razlikovala u tumorskim i netumorskim tkivima LARC ispitanika ($p=0,355$, Wilcoxon-ov test). Kod CLM ispitanika, ekspresija *SMAD7* i *SMAD4* gena je bila značajno snižena u tumorskom u poređenju sa netumorskim tkivom ($p=0,017$ i $p=0,001$, redom, Wilcoxon-ov test za obe). Odnos gena *SMAD7* i *SMAD4* nije se značajno razlikovao u tumorskim i netumorskim tkivima CLM ispitanika ($p=0,109$, Wilcoxon-ov test).

Kako bi se ispitala razlika u nivou ekspresije i međusobnom odnosu *SMAD7* i *SMAD4* gena između tumorskih tkiva primarnih i metastatskih CRC, ekspresija i odnos ovih gena je upoređen između tumorskih tkiva poreklom od 19 LARC i 16 CLM ispitanika (Slika 18). Ekspresija *SMAD4* gena je bila značajno niža u metastatskom tkivu u poređenju sa primarnim karcinomom ($p=0,001$, Mann-Whitney U test). Ekspresija gena *SMAD7* kao i njegov odnos sa genom *SMAD4* nisu se značajno razlikovali između tumorskih tkiva LARC i CLM ispitanika ($p=0,289$ i $p=0,427$, redom, Mann-Whitney U test za obe).



Slika 17. Relativna ekspresija gena *SMAD7*, *SMAD4* i odnos *SMAD7/SMAD4* u LARC (A, B, C) i CLM (D, E, F) tkivima u poređenju sa odgovarajućim okolnim netumorskim tkivima poreklom od istih ispitanika. Relativni nivo iRNK ekspresije je izmeren qRT-PCR metodom i prikazan kao grafik uparenih uzoraka, gde je svaki pojedinačni simbol 2^{-dCt} vrednost u tumorskom (●) i odgovarajućem netumorskom (◆) tkivu, dok horizontalna linija povezuje uparene uzorke poreklom od istog ispitanika. Značajna razlika u ekspresiji između tumorskog i netumorskog tkiva je označena odgovarajućim brojem zvezdica (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$). Napomena: slika je publikovana na engleskom jeziku u radu proisteklom iz ove doktorske disertacije, Rosic i sar.¹⁷⁰



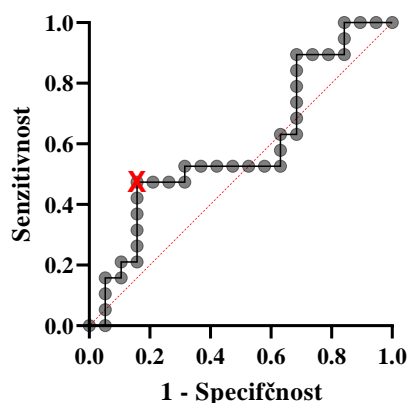
Slika 18. Relativna ekspresija gena *SMAD7* (A), *SMAD4* (B) i odnos *SMAD7/SMAD4* (C) u tkivima primarnog karcinoma (LARC) i metastazama (CLM). Nivo iRNK je normalizovan na ekspresiju gena *GAPDH* i predstavljen kao pojedinačne $2^{-\Delta Ct}$ vrednosti sa srednjom vrednošću i opsegom. **** $p \leq 0,001$.** Napomena: slika je publikovana na engleskom jeziku u radu proisteklom iz ove doktorske disertacije, Rosic i sar.¹⁷⁰

4.4.1. Dijagnostički potencijal ekspresije *SMAD7* i *SMAD4* gena i njihovog odnosa u LARC i CLM

Kako bi se ispitao dijagnostički potencijal ekspresije i odnosa *SMAD7* i *SMAD4* gena kao biomarkera za diskriminaciju tumorskog od okolnog netumorskog tkiva kod lokalno uznapredovalog primarnog i metastatskog CRC u jetri, urađena je ROC analiza (Slike 19 i 20, redom). Translacioni potencijal ispitivanih obrazaca ekspresije kao dijagnostičkih biomarkera određen je na osnovu AUC vrednosti, 95% intervala poverenja (eng. *confidence interval*, CI) i p vrednosti. AUC vrednosti manje od 0,6 ukazuju na lošu, od 0,6 do 0,7 na dovoljnu, od 0,7 do 0,8 na dobru, od 0,8 do 0,9 na veoma dobru, a od 0,9 do 1 na odličnu diskriminacijsku moć ispitivanog biomarkera. Optimalne granične vrednosti (*cut-off*) za razlikovanje tumorskog od netumorskog tkiva određene su za svaki ispitivani ekspresioni obrazac na osnovu maksimalne vrednosti Youden-ovog indeksa (Youden indeks = senzitivnost + specifičnost - 1), a za identifikovane *cut-off* vrednosti određene su specifičnost i senzitivnost.

Kod LARC ispitanika, ekspresija *SMAD4* gena i odnos *SMAD7/SMAD4* pokazale su dobru moć kao biomarkeri za diskriminaciju tumorskog od netumorskog tkiva (AUC=0,731, $p=0,015$ i AUC=0,745, $p=0,010$, redom), dok se ekspresija *SMAD7* nije pokazala kao dobar dijagnostički biomarker (AUC=0,593, $p=0,328$; Slika 19). Kod CLM ispitanika, ekspresija *SMAD7* i *SMAD4* gena pokazale su dobru i odličnu moć kao biomarkeri za diskriminaciju metastatskog od netumorskog tkiva jetre (AUC=0,719, $p=0,035$ i AUC=0,973, $p < 0,0001$, redom), dok se odnos *SMAD7/SMAD4* nije pokazao kao dobar dijagnostički biomarker (AUC=0,629, $p=0,214$; Slika 20).

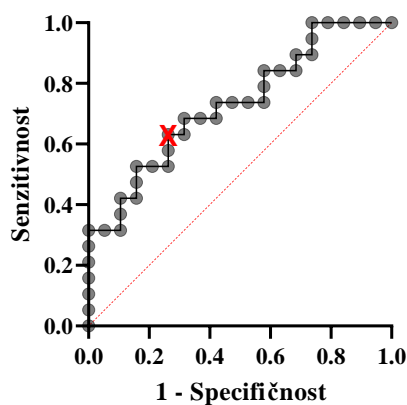
A.1.

SMAD7

A.2.

Karakteristika	<i>SMAD7</i>
AUC (95% CI)	0,593 (0,407-0,779)
<i>p</i>	0,328
<i>Cut-off</i>	0,0010
Senzitivnost	0,474
1-Specifičnost	0,158
Specifičnost	0,842
Youden indeks	0,316

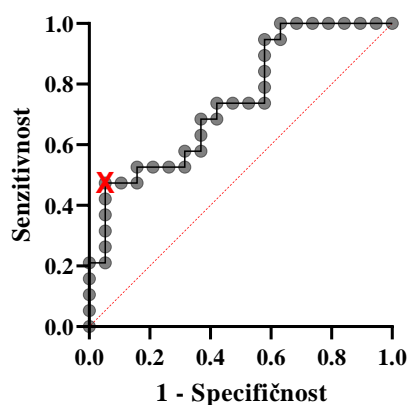
B.1.

SMAD4

B.2.

Karakteristika	<i>SMAD4</i>
AUC (95% CI)	0,731 (0,573-0,890)
<i>p</i>	0,015*
<i>Cut-off</i>	0,0134
Senzitivnost	0,632
1-Specifičnost	0,263
Specifičnost	0,737
Youden indeks	0,368

C.1.

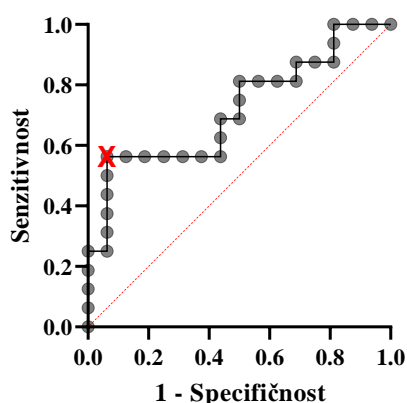
SMAD7/SMAD4

C.2.

Karakteristika	<i>SMAD7/SMAD4</i>
AUC (95% CI)	0,745 (0,590-0,901)
<i>p</i>	0,010*
<i>Cut-off</i>	0,0794
Senzitivnost	0,474
1-Specifičnost	0,053
Specifičnost	0,947
Youden indeks	0,421

Slika 19. Dijagnostički potencijal ekspresije gena *SMAD7* (A), *SMAD4* (B) i odnosa *SMAD7/SMAD4* (C) za diskriminaciju tkiva primarnog karcinoma (LARC) od okolnog netumorskog tkiva. A.1, B.1. i C.1. predstavljaju ROC krive, dok A.2, B.2. i C.2. prikazuju karakteristike ROC krive i optimalnu graničnu vrednost (*cut-off*) sa senzitivnošću i specifičnošću, kao i Youden-ov indeks na osnovu kojeg je ova vrednost određena. Analizirani obrasci ekspresije su smatrani korisnim biomarkerima ukoliko je AUC > 0,600, a *p* < 0,05. *Cut-off* vrednost je na ROC krivi obeležena simbolom X crvene boje. **p* < 0,05 je podebljano i označeno zvezdicom.

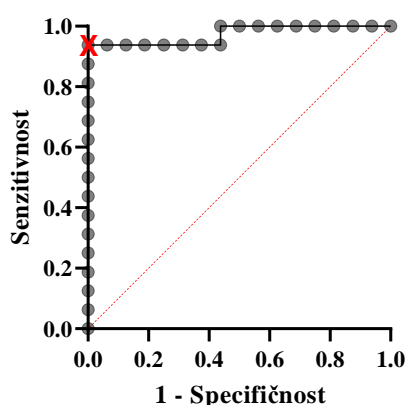
A.1.

SMAD7

A.2.

Karakteristika	<i>SMAD7</i>
AUC (95% CI)	0,719 (0,538-0,900)
<i>p</i>	0,035*
<i>Cut-off</i>	0,0006
Senzitivnost	0,563
1-Specifičnost	0,063
Specifičnost	0,938
Youden indeks	0,500

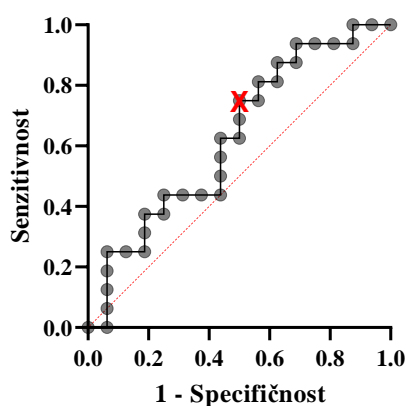
B.1.

SMAD4

B.2.

Karakteristika	<i>SMAD4</i>
AUC (95% CI)	0,973 (0,917-1,000)
<i>p</i>	<0,0001***
<i>Cut-off</i>	0,0099
Senzitivnost	0,938
1-Specifičnost	0,000
Specifičnost	1,000
Youden indeks	0,938

C.1.

SMAD7/SMAD4

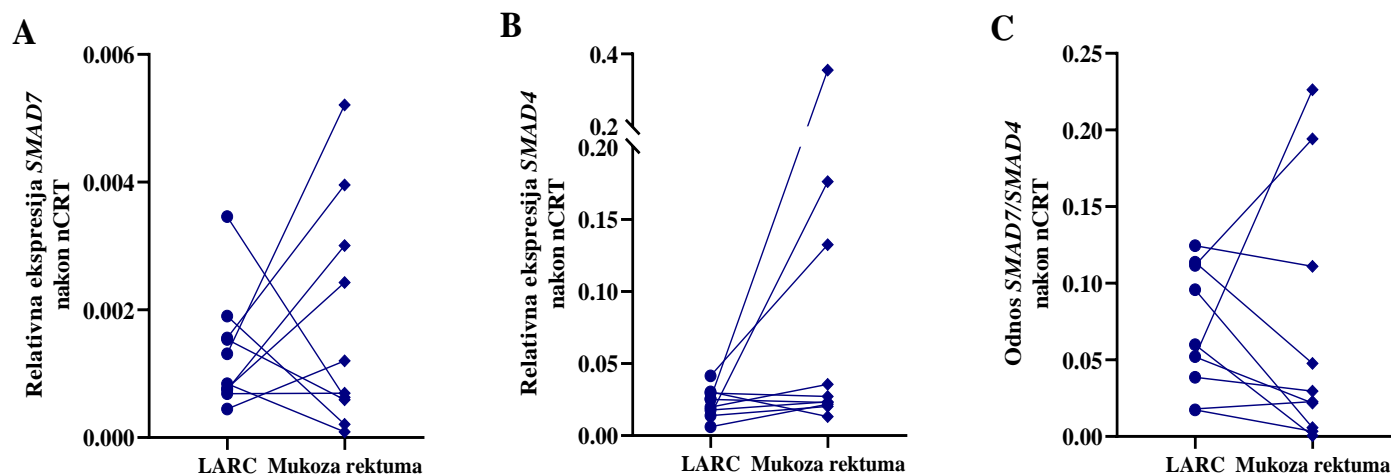
C.2.

Karakteristika	<i>SMAD7/SMAD4</i>
AUC (95% CI)	0,629 (0,433-0,825)
<i>p</i>	0,214
<i>Cut-off</i>	0,0382
Senzitivnost	0,750
1-Specifičnost	0,500
Specifičnost	0,500
Youden indeks	0,250

Slika 20. Dijagnostički potencijal ekspresije gena *SMAD7* (A), *SMAD4* (B) i odnosa *SMAD7/SMAD4* (C) za diskriminaciju tkiva kolorektalnih metastaza (CLM) od okolnog netumorskog tkiva jetre. A.1, B.1. i C.1. predstavljaju ROC krive, dok A.2, B.2. i C.2. prikazuju karakteristike ROC krive i optimalnu graničnu vrednost (*cut-off*) sa senzitivnošću i specifičnošću, kao i Youden-ov indeks na osnovu kojeg je ova vrednost određena. Analizirani obrasci ekspresije su smatrani korisnim biomarkerima ukoliko je $AUC > 0,600$, a $p < 0,05$. *Cut-off* vrednost je na ROC krivi obeležena simbolom X crvene boje. * $p < 0,05$ i *** $p < 0,0001$ je podebljano i označeno odgovarajućim brojem zvezdica.

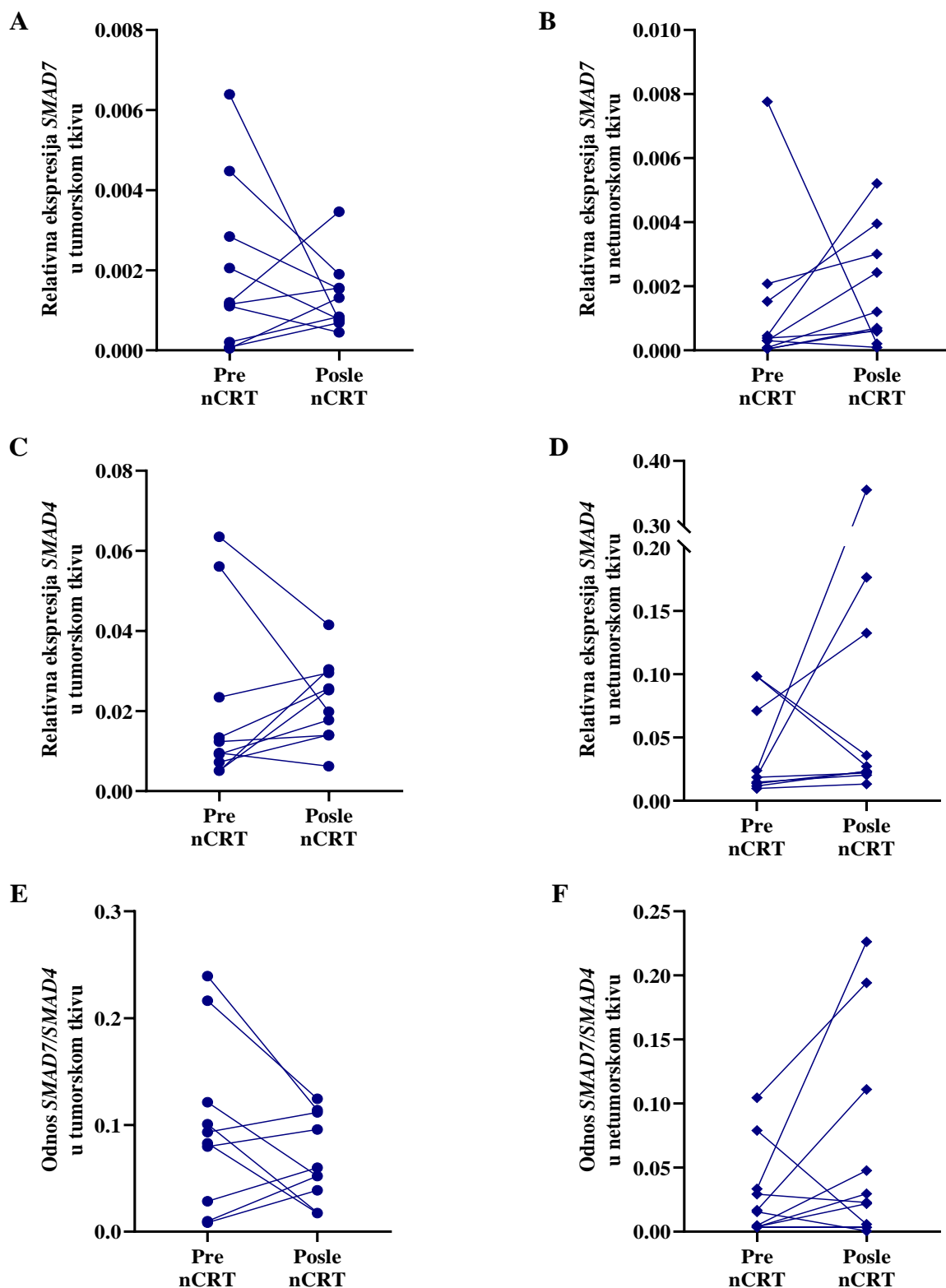
4.5. Promena ekspresije *SMAD7* i *SMAD4* gena i njihovog odnosa u tumorskom i okolnom netumorskom tkivu LARC ispitanika nakon nCRT

Kako bi se ispitala razlika u nivou ekspresije i međusobnom odnosu *SMAD7* i *SMAD4* gena između tumorskih i netumorskih tkiva ispitanika sa LARC nakon primljene nCRT, ekspresija je izmerena i upoređena između tumorskih i okolnih netumorskih tkiva poreklom od svakog od 10 LARC ispitanika nakon terapije (Slika 21). Nivo ekspresije i odnos *SMAD7/SMAD4* nije se značajno razlikovao između tumorskih i netumorskih tkiva nakon nCRT (*SMAD7*, $p=0,557$; *SMAD4*, $p=0,084$; *SMAD7/SMAD4*, $p=0,432$; Wilcoxon-ov test za sve).



Slika 21. Relativna ekspresija gena *SMAD7* (A), *SMAD4* (B) i odnos *SMAD7/SMAD4* (C) u LARC tkivima u poređenju sa odgovarajućim okolnim netumorskim tkivima poreklom od istih ispitanika nakon primljene nCRT. Relativni nivo iRNK ekspresije je izmeren qRT-PCR metodom i prikazan kao grafik uparenih uzoraka, gde je svaki pojedinačni simbol 2^{-dCt} vrednost u tumorskom (●) i netumorskom (◆) tkivu, dok horizontalna linija povezuje uparene uzorke poreklom od istog ispitanika.

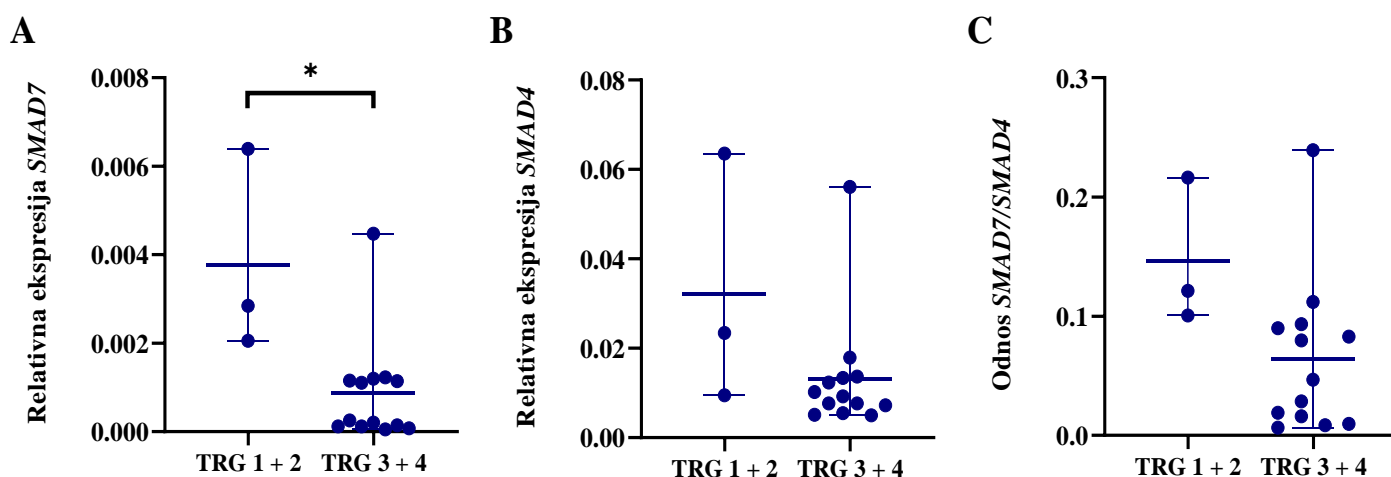
Kako bi se istražio uticaj terapije na promenu u nivou ekspresije i međusobnom odnosu *SMAD7* i *SMAD4* gena, ekspresija je upoređena između tumorskih i okolnih netumorskih tkiva 10 LARC ispitanika sakupljenih pre i nakon nCRT (Slika 22). Nivo ekspresije i odnos *SMAD7/SMAD4* nije se značajno razlikovao između tumorskih (*SMAD7*, $p=0,432$, Wilcoxon-ov test; *SMAD4*, $p=0,752$ t-test uparenih uzoraka; *SMAD7/SMAD4*, $p=0,171$, t-test uparenih uzoraka) i netumorskih (*SMAD7*, $p=0,106$; *SMAD4*, $p=0,232$; *SMAD7/SMAD4*, $p=0,160$; Wilcoxon-ov test za sve) tkiva pre i nakon terapije.



Slika 22. Relativna ekspresija gena *SMAD7* (A i B), *SMAD4* (C i D) i odnos *SMAD7/SMAD4* (E i F) u LARC tumorskim i netumorskim tkivima upoređenim pre i nakon nCRT. Relativni nivo iRNK ekspresije je izmeren qRT-PCR metodom i prikazan kao grafik uparenih uzoraka, gde je svaki pojedinačni simbol 2^{-dCt} vrednost u tumorskom (●) i netumorskom (◆) tkivu, dok horizontalna linija povezuje uzorke pre i nakon nCRT poreklom od istog ispitanika.

4.6. Prediktivni značaj ekspresije *SMAD7* i *SMAD4* gena i njihovog odnosa u odgovoru na nCRT kod LARC ispitanika

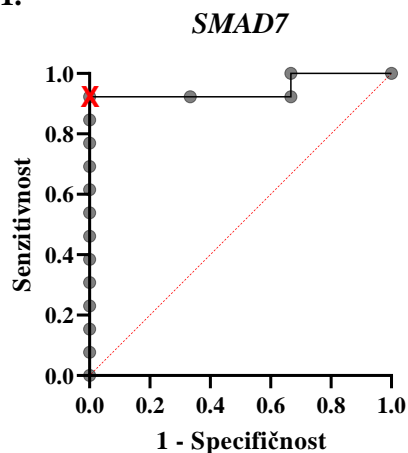
Prediktivni potencijal nivoa ekspresije i međusobnog odnosa *SMAD7* i *SMAD4* gena procenjen je kod 16 LARC pacijenata koji su primili nCRT. Na osnovu određenog TRG stepena histopatološke tumorske regresije nakon nCRT po Mandardovom sistemu, tri ispitanika su klasifikovana u grupu sa dobrim odgovorom na nCRT (dva ispitanika TRG 1 i jedan ispitanik TRG 2), a 13 ispitanika u grupu sa lošim odgovorom na nCRT (5 ispitanika TRG 3 i 8 ispitanika TRG 4). Ekspresija i međusobni odnos *SMAD7* i *SMAD4* gena u tumorskim tkivima bioptiranim pre terapije upoređeni su između ispitanika sa dobrim i lošim odgovorom na nCRT (Slika 23). Ekspresija *SMAD7* gena bila je značajno viša u tumorskim tkivima ispitanika sa dobrim u poređenju sa ispitanicima sa lošim histopatološkim odgovorom na nCRT ($p=0,014$, Mann-Whitney U test). Ekspresija gena *SMAD4* i odnos *SMAD7/SMAD4* u tumorskim tkivima nisu se značajno razlikovali između ispitanika sa dobrim i lošim odgovorom na nCRT ($p=0,111$, Mann-Whitney U test i $p=0,066$, i Studentov t-test, redom).



Slika 23. Relativna ekspresija gena *SMAD7* (A), *SMAD4* (B) i odnos *SMAD7/SMAD4* (C) u LARC tkivima bioptiranim pre terapije između ispitanika sa dobrim (TRG 1 + 2) i lošim (TRG 3 + 4) odgovorom na nCRT. Nivo iRNK je normalizovan na ekspresiju gena *GAPDH* i predstavljen kao pojedinačne 2^{-dCt} vrednosti sa srednjom vrednošću i opsegom. * $p \leq 0,05$. Napomena: slika je publikovana na engleskom jeziku u radu proisteklom iz ove doktorske disertacije, Rosic i sar.¹⁷⁰

Kako bi se ispitao translacioni potencijal nivoa ekspresije i odnosa *SMAD7* i *SMAD4* gena kao prediktivnih biomarkera odgovora na nCRT kod LARC pacijenata urađena je ROC analiza. Translacioni potencijal ispitivanih obrazaca ekspresije kao prediktivnih biomarkera određen je kao i u slučaju ispitivanja dijagnostičkog potencijala (za detaljno objašnjenje ROC krive videti sekciju 4.4.1). Ekspresija *SMAD7* gena pokazala je odličnu moć kao biomarker za diskriminaciju dobrog od lošeg patološkog odgovora tumora na nCRT (AUC=0,949, $p=0,019$; Slika 24). Odnos *SMAD7/SMAD4* je pokazao veoma dobru diskriminacijsku moć (AUC=0,897, $p=0,037$), dok se ekspresija *SMAD4* nije pokazala kao dobar prediktivni biomarker, iako je AUC vrednost bila veća od 0,600 (AUC=0,821, $p=0,093$; Slika 24).

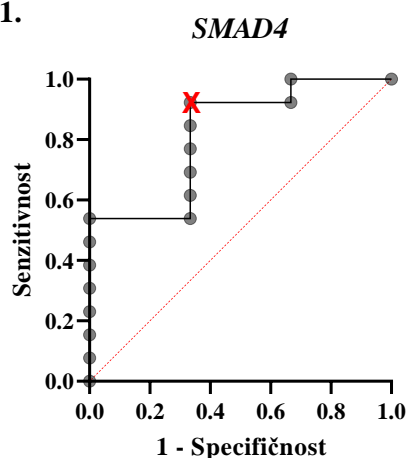
A.1.



A.2.

Karakteristika	SMAD7
AUC (95% CI)	0,949 (0,837-1,00)
<i>p</i>	0,019*
<i>Cut-off</i>	0,0016
Senzitivnost	0,923
1-Specifičnost	0
Specifičnost	1
Youden indeks	0,923

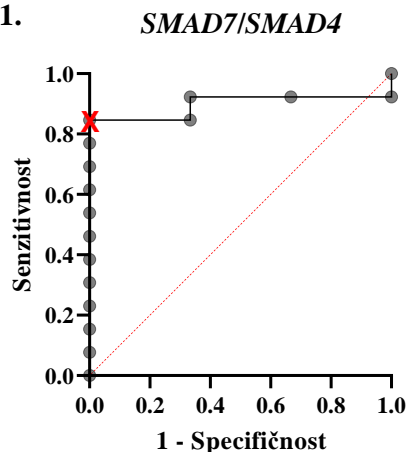
B.1.



B.2.

Karakteristika	SMAD4
AUC (95% CI)	0,821 (0,553-1,00)
<i>p</i>	0,093
<i>Cut-off</i>	0,0207
Senzitivnost	0,923
1-Specifičnost	0,333
Specifičnost	0,667
Youden indeks	0,590

C.1.



C.2.

Karakteristika	SMAD7 /SMAD4
AUC (95% CI)	0,897 (0,738-1,00)
<i>p</i>	0,037*
<i>Cut-off</i>	0,0969
Senzitivnost	0,846
1-Specifičnost	0
Specifičnost	1
Youden indeks	0,846

Slika 24. Prediktivni potencijal ekspresije gena *SMAD7* (A), *SMAD4* (B) i odnosa *SMAD7/SMAD4* (C) u odgovoru na nCRT kod LARC ispitanika. A.1, B.1. i C.1. predstavljaju ROC krive, dok A.2, B.2. i C.2. prikazuju karakteristike ROC krive i optimalnu graničnu vrednost (*cut-off*) sa senzitivnošću i specifičnošću, kao i Youden-ov indeks na osnovu kojeg je ova vrednost određena. Analizirani obrasci ekspresije su smatrani korisnim biomarkerima ukoliko je $AUC > 0,600$, a $p < 0,05$. *Cut-off* vrednost je na ROC krivi obeležena simbolom X crvene boje. * $p < 0,05$ je podebljano i označeno zvezdicom.

4.7. Povezanost ekspresije *SMAD7* i *SMAD4* gena i njihovog odnosa sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika

Ispitivana je povezanost ekspresije *SMAD7* i *SMAD4* gena i njihovog odnosa sa sledećim kliničko-patološkim podacima: T stadijum bolesti, lokalizacija karcinoma (niski ili srednji rektum), CRM, EMVI, CEA i CA 19-9 nivoi za LARC ispitanike (Grupa A) i broj CLM, sinhrono/metahrono metastaze, stepen histološkog maligniteta, pojava recidiva, informacije o primarnom karcinomu (lokalizacija, stadijumi bolesti T, N, L, V, PN i primena neoadjuvantne i/ili adjuvantne terapije), CEA i CA 19-9 nivoi za CLM ispitanike (Grupa B).

Rezultati prikazani u Tabeli 19 pokazuju odsustvo statistički značajne povezanosti između ekspresije i odnosa *SMAD7* i *SMAD4* gena i navedenih karakteristika LARC ispitanika ($p > 0,05$ za sve). U metastatskim tkivima CLM ispitanika ekspresija gena *SMAD7* je bila značajno niža kod pacijenata koji su primili neoadjuvantnu i/ili adjuvantnu terapiju za primarnu bolest u odnosu na one koji nisu ($p = 0,031$, Mann-Whitney U test), a značajno viša kod pacijenata sa N0 stadijumom primarne bolesti u odnosu na one sa N1 i N2 stadijumom ($p = 0,030$, Kruskal-Wallis-ov test). Nije pronađena druga statistički značajna povezanost između ekspresije i odnosa *SMAD7* i *SMAD4* gena i navedenih karakteristika CLM ispitanika ($p > 0,05$; Tabela 19).

Tabela 19. Rezultati analize povezanosti ekspresije i odnosa *SMAD7* i *SMAD4* gena u tumorskim tkivima sa kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika. * $p \leq 0,05$

Karakteristika	Grupa ispitanika	P vrednost		
		<i>SMAD7</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SMAD7/SMAD4</i>
Stadijum bolesti [#]				
T stadijum	A	0,893	0,444	0,687
	B	0,377	0,743	0,180
N stadijum	B	0,030*	0,306	0,308
Lokalizacija (niski/srednji rektum)	A	0,717	0,310	0,492
CRM	A	0,592	0,967	0,650
EMVI	A	0,780	0,497	0,592
Lokalizacija (kolon/rektum) [#]	B	0,827	0,052	0,115
Broj metastaza (jedna/više)	B	0,583	0,320	0,320
Sinhrono/metahrono metastaze	B	0,798	0,328	0,645
Stepen histološkog maligniteta (gradus, G; dobra/umerena diferentovanost)	B	1,000	0,758	0,606
Pojava recidiva	B	0,837	0,252	0,758
L stadijum [#]	B	1,000	0,635	1,000
V stadijum [#]	B	1,000	0,510	0,827
PN stadijum [#]	B	0,083	0,721	0,105
Neoadjuvantna/adjuvantna terapija [#] (primao/nije primao)	B	0,031*	0,093	0,264
CEA	A	0,698	0,741	0,507

	B	0,276	0,063	0,837
CA 19-9	A	0,794	0,702	0,619
	B	0,327	0,244	0,424

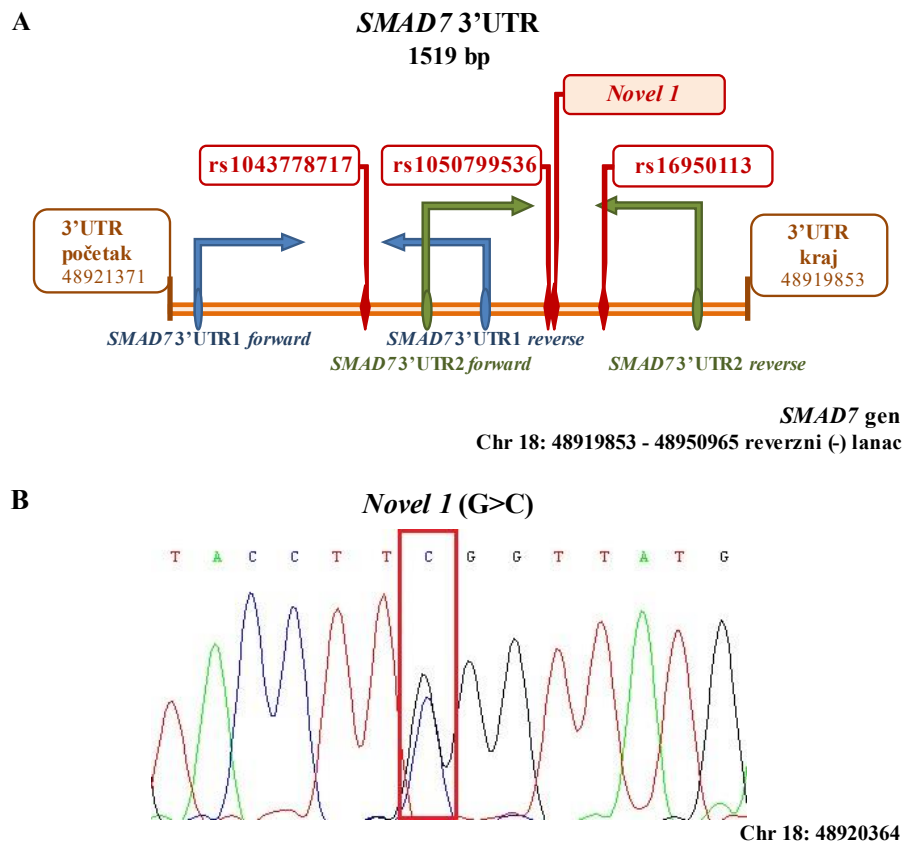
#Za primarni karcinom

P vrednost je određena Mann-Whitney U testom, Studentovim t-testom, Kruskal-Wallis-ovim test, Spearman-ovim koeficijentom korelacije, Pearson-ovim koeficijentom korelacije

4.8. Genetička varijabilnost 3'UTR-a *SMAD7* gena u ćelijskim linijama i tumorskim tkivima ispitanika

Genetička varijabilnost 3'UTR-a *SMAD7* gena je analizirana sekvenciranjem DNK u 6 ćelijskih linija karcinoma kolona (Caco-2, HT-29, SW480, DLD-1, HCT116 i SW620) i tumorskim tkivima 80 CRC ispitanika (18 LARC iz grupe A, 12 CLM iz grupe B i svih 50 CRC iz grupe C). Genetički region 3'UTR-a *SMAD7* gena, koji je dugačak 1519 bp, analiziran je korišćenjem dva seta graničnika čiji se umnoženi ciljni regioni preklapaju, kao što je prikazano na Slici 25. Odgovarajuće okolno netumorsko tkivo poreklom od svakog ispitanika sa detektovanom varijantom u tumoru dodatno je genotipizirano sekvenciranjem kao bi se utvrdilo da li je varijanta germinativna ili somatska. Germinativne varijante su bile prisutne i u netumorskom tkivu, dok su somatske bile detektovane isključivo u tumorskom tkivu.

Ukupno je detektovano 4 različite SNV (Slika 25). Među njima je jedna nova somatska genetička varijanta otkrivena u tumorskom tkivu CLM ispitanika, *Novel 1* (pozicija chr18:48920364; aleli G>C), koja je kao nova varijanta prijavljena u bazi podataka *GenBank* u NCBI pomoću servera *BankIt*, a kojoj je dodeljen pristupni broj OP413428. Ostale tri genetičke varijante su bile već poznate, germinativne SNV: rs16950113, detektovana u HCT116 ćelijama i tkivima 6 ispitanika (4 sa karcinomom kolona i 2 sa LARC), rs1050799536 u tkivima jednog ispitanika sa karcinomom kolona, kao i rs1043778717 u tkivima jednog ispitanika sa LARC. Detektovane genetičke varijante, njihove hromozomske pozicije, detektovani genotipovi, kao i učestalosti u ispitivanoj grupi prikazani su u Tabeli 20.



Slika 25. Šematski prikaz 3'UTR-a *SMAD7* gena, parova graničnika korišćenih za njegovu genotipizaciju sekvenciranjem, detektovanih genetičkih varijanti (A) i elektroferogram sekvence novootkrivene somatske varijante *Novel 1* (B). Napomena: slika je publikovana na engleskom jeziku u radu proisteklom iz ove doktorske disertacije, Rosic i sar.¹⁷²

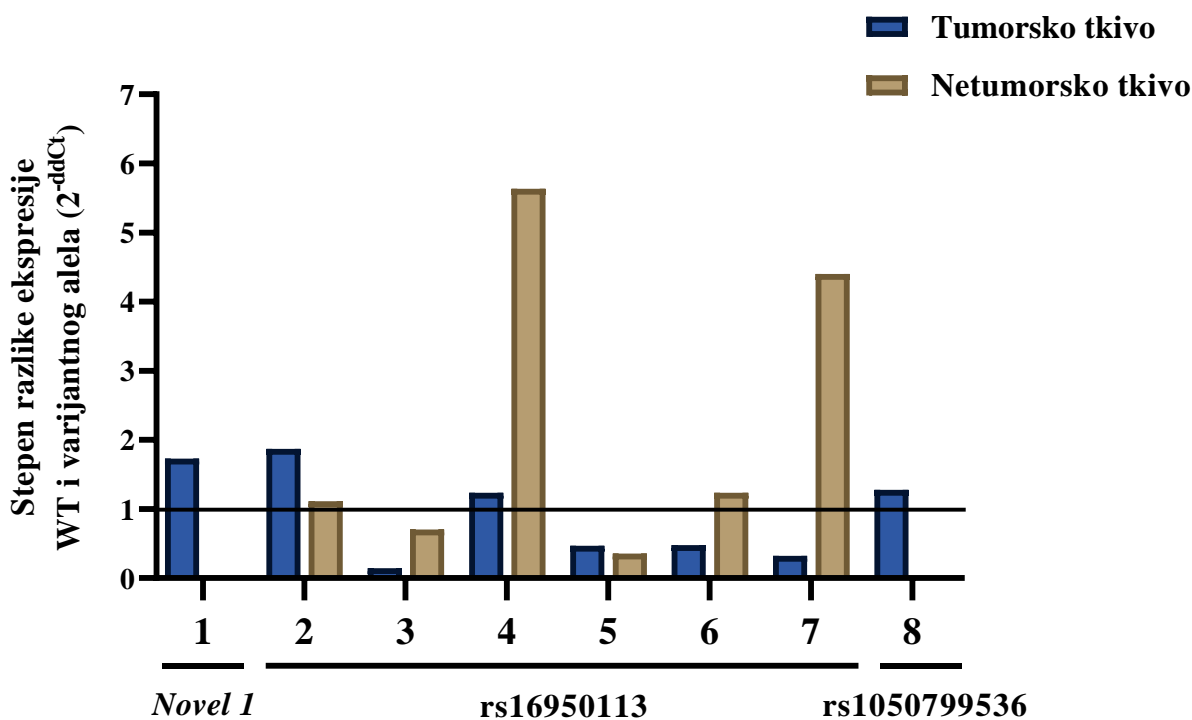
4.9. Alel-specifična ekspresija iRNK svih detektovanih SNV u *SMAD7* 3'UTR-u u ćelijskim linijama i tkivima ispitanika sa varijantama

Relativna količina alel-specifičnih transkripata je kvantifikovana u svim uzorcima sa detektovanim SNV korišćenjem qRT-PCR metode i graničnika dizajniranih za svaku varijantu.

U CLM tkivu ispitanika sa detektovanom *Novel 1* somatskom genetičkom varijantom, transkript sa WT (G) alelom imao je 1,7 puta višu ekspresiju, a udeo transkripta sa novodetektovanom varijantom (C) bio je 36,6% (Slika 26 i Tabela 20).

U HCT116 ćelijama, u kojima je detektovana SNV rs16950113, zabeležen je udeo transkripta sa WT (T) alelom od 99,3%, dok je kod 6 ispitanika sa detektovanom istom varijantom udeo transkripta sa WT alelom bio u opsegu od 12,7 do 65,1% u tumorskim i od 26,1 do 84,9% u netumorskim tkivima (Tabela 20). Kod ovih ispitanika, zabeležena ekspresija transkripata sa WT alelom bila je od 6,9 puta niža do 1,9 puta viša u tumorskim i od 2,8 puta niža do 5,6 puta viša u netumorskim tkivima (Slika 26).

Analizirano tumorsko tkivo ispitanika sa SNV rs1050799536 je imalo relativno izbalansiranu ekspresiju oba alela, sa zabeleženim udelom transkripta sa WT (G) alelom od 56,1%, dok je u netumorskom tkivu istog ispitanika zabeležena isključivo ekspresija transkripta sa WT (G) alelom (100%; Tabela 20 i Slika 26). U tumorskom i netumorskom tkivu ispitanika sa SNV rs1043778717, svi detektovani transkripti sadržali su WT (C) alel (Tabela 20).



Slika 26. Stepen razlike ekspresije dva alel-specifična transkripta (WT i varijantnog alela) za svaku ispitivanu SNV u tumorskim i netumorskim tkivima u kojima su detektovana oba transkripta metodom qRT-PCR. Stepen razlike je izračunat kao odnos 2^{-dCt} vrednosti varijanti prema formuli $X_{2,2} = 2^{-dCt}_{[1]} / 2^{-dCt}_{[2]}$, u kojoj je [1] WT alel, a [2] varijantni alel. Brojevi na horizontalnoj osi označavaju redni broj ispitanika. Obeležena granična vrednost 1 označava jednaku ekspresiju oba alela (stepen razlike jednak je 0). *Napomena:* slika je publikovana na engleskom jeziku u radu proisteklom iz ove doktorske disertacije, Rosic i sar.¹⁷²

Tabela 20. Pregled detektovanih SNV u 3'UTR-u *SMAD7* gena i njihove relativne alel-specifične ekspresije u ćelijskim linijama i tumorskim i netumorskim tkivima ispitanika.

SNV	Varijante	Hromozomska lokacija*	Detektovan genotip	n (%)	Grupa ispitanika	Relativni doprinos pojedinačnih alela u ukupnoj detektovanoj iRNK (%)				
						Ispitanik br.	Tumorsko tkivo	Netumorsko tkivo		
<i>Novel 1</i> [#]	G>C	48920364	GC	1 (1,25)	B (CLM)	1	G 63,4	C 36,6	G C /#	
rs16950113	T>C	48920219	TC	6 (7,5) + HCT116	2-5 – C (karcinom kolona); 6, 7 – A (LARC)	2	T 65,1	C 34,9	T 52,6	C 47,4
						3	12,7	87,3	41,3	58,7
						4	55,3	44,7	84,9	15,1
						5	31,9	68,1	26,1	73,9
						6	32,2	67,8	55,3	44,7
						7	24,4	75,6	81,5	18,5
						HCT116	99,3	0,7	/	
rs1050799536	G>A	48920374	GA	1 (1,25)	C (karcinom kolona)	8	G 56,1	A 43,9	G 100	A 0
rs1043778717	C>T	48920906	CT	1 (1,25)	A (LARC)	9	C 100	T 0	C 100	T 0

*Referentna sekvenca humanog genoma GRCh38.p13

[#]Somatska varijanta

Napomena: tabela je publikovana na engleskom jeziku u radu proisteklom iz ove doktorske disertacije, Rosic i sar.¹⁷²

4.10. *In silico* predikcija funkcionalnih posledica detektovanih varijanti 3'UTR-a *SMAD7* gena na vezivanje miRNK

In silico rezultati *PolymiRTS Database 3.0* predikcije posledica detektovanih varijanti u 3'UTR-u *SMAD7* gena na interakcije između molekula miRNK i iRNK (miRNK:iRNK interakcije) pokazali su da prisustvo varijantnog alela rs16950113 (C) narušava očuvana mesta vezivanja 6 miRNK molekula, a generiše novo mesto vezivanja za jednu miRNK (Tabela 21). *miRNASNP-v3* baza je predvidela isto za rs16950113 uz dodatne predikcije nastanka novih i gubitka postojećih mesta vezivanja za specifične miRNK u slučaju svih ispitivanih SNV, uključujući i novu somatsku varijantu *Novel 1*. Rezultati predikcije *miRNASNP-v3* baze su prikazani u Tabeli 21.

Tabela 21. Predikcija uticaja detektovanih SNV varijanti 3'UTR-a *SMAD7* gena na vezivanje miRNK od strane *miRNASNP-v3* web servera

SNV	Uticaj na miRNK:iRNK interakcije	miRNK
<i>Novel 1</i>[#]	Novonastalo mesto vezivanja	<i>hsa-miR-101-2-5p</i>
	Nestalo mesto vezivanja	<i>hsa-miR-212-5p</i>
		<i>hsa-miR-3189-3p</i>
		<i>hsa-miR-3200-3p</i>
		<i>hsa-miR-3940-5p</i>
		<i>hsa-miR-4507</i>
		<i>hsa-miR-635</i>
		<i>hsa-miR-6774-5p</i>
		<i>hsa-miR-6813-3p</i>
<i>hsa-miR-6839-3p</i>		
rs16950113*	Novonastalo mesto vezivanja	<i>hsa-miR-302a-5p</i>
	Nestalo mesto vezivanja	<i>hsa-miR-5696</i>
		<i>hsa-miR-664b-3p</i>
		<i>hsa-miR-4729</i>
		<i>hsa-miR-1206</i>
		<i>hsa-miR-6853-3p</i>
<i>hsa-miR-579-3p</i>		
rs1050799536	Novonastalo mesto vezivanja	<i>hsa-miR-425-5p</i>
	Nestalo mesto vezivanja	<i>hsa-miR-6502-3p</i>
		<i>hsa-miR-3619-3p</i>
		<i>hsa-miR-4757-3p</i>
rs1043778717	Novonastalo mesto vezivanja	<i>hsa-miR-6529-5p</i>
	Nestalo mesto vezivanja	<i>hsa-miR-4524a-3p</i>

[#] Somatska varijanta

*Predikcija *PolymiRTS Database 3.0*. baze podataka, takođe.

Napomena: tabela je publikovana na engleskom jeziku u radu proisteklom iz ove doktorske disertacije, Rosic i sar.¹⁷²

4.11. Povezanost prisustva genetičkih varijanti u 3'UTR-u *SMAD7* gena sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika

Među 9 ispitanika sa detektovanim genetičkim varijantama u 3'UTR-u *SMAD7* gena, 8 je muškaraca i jedna žena, 5 je imalo primarni karcinom kolona, troje LARC i jedan CLM poreklom od primarnog karcinoma rektuma. Njihovi stadijumi bolesti bili su T2N0 kod jednog, T3N0 kod jednog, T3N1 kod dvoje, i T3N2 kod petoro ispitanika. Ispitanik sa detektovanom novom somatskom varijantom *Novel 1* je 63 godine star muškarac sa dve sinhrono unilobarne metastaze poreklom od karcinoma rektuma stadijuma T3N1.

Prisustvo genetičkih varijanti u 3'UTR-u *SMAD7* gena testirano je u odnosu na pol, starost, lokalizaciju tumora (kolon ili rektum) i T i N stadijume bolesti. Kao što rezultati u Tabeli 22 prikazuju, nije bilo statistički značajne povezanosti između prisustva/odsustva SNV u 3'UTR-u *SMAD7* gena i pomenutih karakteristika ispitanika ($p > 0,05$ za sve).

Tabela 22. Rezultati analize povezanosti prisustva genetičkih varijanti u 3'UTR-u *SMAD7* gena sa demografskim i kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika

Karakteristika	<i>P</i> vrednost
	Prisustvo/odsustvo SNV u 3'UTR-u <i>SMAD7</i> gena (n=80)
Pol	0,260
Starost (godine)	0,214
Lokalizacija (kolon/rektum) [#]	0,494
Stadijum bolesti [#]	
T stadijum	>0,999
N stadijum	0,273

[#]Za primarni karcinom

P vrednost je određena Fisher-ovim exact testom ili Mann-Whitney U testom

5. DISKUSIJA

5.1. Ekspresija i odnos *SMAD7* i *SMAD4* gena u progresiji karcinoma kolorektuma i odgovoru na terapiju

Rezultati dve nezavisne studije, koje su istraživale karcinom želuca, ukazale su na značaj odnosa *SMAD7* i *SMAD4* za apoptozu, diferencijaciju i metastaziranje malignih ćelija i pokazale da je povišena ekspresija *SMAD7* i snižena ekspresija *SMAD4* povezana sa boljim preživljavanjem tumorskih ćelija, slabo diferentovanim tumorskim tkivom, većom stopom metastaziranja u regionalne limfne noduse i lošijim ukupnim petogodišnjim preživljavanjem.^{173,174} Pored toga, istraživanje karcinoma bubrega pokazalo je da su ćelijska invazija i metastaze pospešene posttranskripcionom negativnom regulacijom *SMAD4* i nizvodnim efektima koji ima na *SMAD7*, naglašavajući važnost kombinovane evaluacije ova dva gena kod karcinoma.¹⁷⁵ S obzirom da inhibitorni *SMAD7* i zajednički medijator *SMAD4* imaju ključne uloge u TGF- β signalizaciji posredovanoj *SMAD* proteinima koja je često izmenjena u karcinomu kolorektuma, u okviru ove doktorske disertacije istraživali smo ekspresiju i odnos *SMAD7* sa *SMAD4* genom u ćelijskim linijama karcinoma kolona i tumorskim i netumorskim tkivima LARC i CLM pacijenata. Takođe smo analizirali povezanost obrazaca ekspresije ciljnih gena i njihovog međusobnog balansa sa terapijskim odgovorom i kliničko-patološkim karakteristikama ispitanika. Ovo je prva studija koja je istraživala odnos ekspresije *SMAD7/SMAD4* gena u kolorektalnom karcinomu.

U šest analiziranih ćelijskih linija karcinoma kolona *SMAD7* ekspresija je bila povišena u odnosu na nemalignu ćelijsku liniju u opsegu od 2,1 do 21,6 puta. Ovo je u skladu sa prethodnim istraživanjem Stolfi i sar, u kojem je detektovana povišena proteinska ekspresija u ćelijskim linijama HCT116, HT-115, HT-29, i DLD-1, za koju je dalje pokazano da pospešuje karcinogenezu ćelija *in vitro* i *in vivo*.¹⁰² Ekspresija *SMAD4* bila je snižena 9,8 puta u HT-29 i 44,6 puta u SW620 ćelijama, dok su druge ispitivane ćelijske linije karcinoma kolona imale povišenu ekspresiju istog gena u odnosu na normalnu ćelijsku liniju u opsegu od 1,7 do 2,3 puta. Par graničnika koji je korišćen za relativnu kvantifikaciju *SMAD4* ekspresije u ovoj studiji umnožavao je spoj prvog i drugog kodirajućeg egzona i odabran je kako bi detektovao sve *SMAD4* transkripte u istraživanim ćelijskim linijama, uključujući i HT-29 ćelije sa poznatim stop kodonom u egzonu 7 i SW620 ćelije sa mutacijom pomeranja okvira čitanja u intronu 7 *SMAD4* gena. Ipak, nije isključeno da pomenute mutacije mogu imati posredan efekat na transkripcionu i posttranskripcionu regulaciju što može biti u vezi sa detektovanim drastičnim smanjenjem ekspresije *SMAD4* u HT-29 i SW620 ćelijama. Višestruko povećanje ekspresije *SMAD7* gena u proseku je bilo znatno više nego *SMAD4* gena u ostalim tumorskim ćelijama (~11 puta u odnosu na ~2 puta, redom), što je rezultiralo povišenim odnosom *SMAD7/SMAD4* u svim ćelijskim linijama kolona u poređenju sa HCEC-1CT ćelijama neizmenjenog epitela kolona, od kojih u četiri sa statističkom značajnošću.

Rezultati sprovedenih *in vitro* tretmana metastatskih SW620 ćelija pokazali su značajnu promenu ekspresije *SMAD7* gena u četiri od pet primenjenih tretmana na koje je ova ćelijska linija pokazala adekvatan nivo osetljivosti. *SMAD7* ekspresija je bila značajno povišena pod uticajem svih tretmana i njihovih kombinacija, sa izuzetkom ćelija tretiranih samo bevacizumabom, gde je primećeno smanjenje ekspresije koje nije bilo statistički značajno. Suprotno tome, jedina značajna promena u ekspresiji *SMAD4* gena bilo je povećanje ekspresije u ćelijama tretiranim samo bevacizumabom. Suprotni profili ekspresije ćelija tretiranih samo bevacizumabom i drugim hemioterapeutskim režimima mogu biti posledica razlika u mehanizmima delovanja ovih lekova koji na različit način utiču na regulatore transkripcije koji regulišu ekspresiju ova dva gena, s obzirom da su 5-FU i oksaliplatin konvencionalni hemioterapeutici koji ispoljavaju citotoksična dejstva, dok je bevacizumab biološka terapija zasnovana na monoklonalnim antitelima.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Upotreba bevacizumaba za lečenje metastatskog kolorektalnog karcinoma u okviru različitih terapijskih režima

dovela je do značajnog unapređenja ishoda bolesti.^{178,179} Iako se većina hemioterapeutika ne koristi kao monoterapija u lečenju pacijenata sa CRC, tretirali smo ćelije svakim lekom zasebno i u kombinacijama kako bismo odvojili efekte koje ispoljavaju na ispitivane obrasce ekspresije. Naši rezultati su ukazali na povišen odnos *SMAD7/SMAD4* u ćelijama tretiranim bilo kojim terapijskim režimom koji sadrži citotoksične lekove, dok je smanjen odnos otkriven jedino u ćelijama tretiranim isključivo biološkom terapijom. Dalja istraživanja bi trebala da ispituju mehanizme kojima bevacizumab dovodi do povećanja *SMAD4* ekspresije i zašto se ovaj efekat, koji je povezan sa povoljnijim ishodom bolesti, poništava u kombinaciji sa dublet citotoksičnom FOX terapijom. Za bolje razumevanje mehanizama akcije konkretne kombinacije lekova trebalo bi koristiti sferoide ili organoide, čija trodimenzionalna organizacija vernije oponaša ćelijsko mikrokruženje i međućelijske interakcije i omogućava identifikaciju bioloških karakteristika tumorskih ćelija, posebno u oblasti osetljivosti na lekove u translacionoj medicini.¹⁸⁰

Rezultati dobijeni u grupi LARC ispitanika pokazali su blago povišenu ekspresiju *SMAD7* u tumorskim u odnosu na netumorska tkiva rektuma, ali bez statističke značajnosti. Stolfi i sar. su prethodno otkrili povišenu ekspresiju proteina *SMAD7* u CRC tkivima u poređenju sa odgovarajućom netumorskom mukozom kod sporadičnih CRC pacijenata Western blot analizom.¹⁰² Nasuprot tome, Hu i sar. su pokazali da je ekspresija *SMAD7* gena snižena u tumorskim tkivima LARC pacijenata u odnosu na upareno okolno netumorsko tkivo mukoze merenjem globalne genske ekspresije Microarray analizom.¹⁸¹ Razlike u korišćenoj metodologiji i veličini ispitivanog uzorka mogle bi da objasne razlike u rezultatima među studijama u pogledu nivoa ekspresije, ali i Stolfi i sar. i Hu i sar. su pokazali da je snižena ekspresija *SMAD7* povoljnija zbog povezanosti sa inhibicijom tumorskog rasta i preživljavanjem bez recidiva bolesti, redom.^{102,181} Halder i sar. pokazali su da ćelije dobijene iz adenokarcinoma kolona sa stabilnom ekspresijom *SMAD7* migriraju u jetru i tamo formiraju slabo diferentovane metastatske lezije u model-sistemu miša injeciranog tumorskim ćelijama u slezinu.¹⁸² Dosadašnja istraživanja *SMAD7* ekspresije u tumorima pretežno su se odnosila na nivo proteinskog produkta i pokazala su dosledne rezultate, dok su studije ekspresije iRNK retke. S obzirom na delovanje posttranskripcionih regulatornih mehanizama, ekspresija merena na nivou proteina retko odražava nivo iRNK, dok analiza nivoa iRNK pruža direktniji uvid u regulaciju i deregulaciju gena. Rezultati analize nivoa ekspresije iRNK *SMAD7* gena u tumorskim i netumorskim ćelijama i tkivima u našoj studiji pokazali su isti smer promene u tumorima kao i u prethodnim istraživanjima na proteinskom nivou, sa razlikama koje se mogu pripisati mehanizmima posttranskripcione regulacije.

Uočena snižena ekspresija *SMAD4* gena bila je očekivana u tumorskim tkivima LARC ispitanika, s obzirom da je već dokazana povezanost smanjenja i gubitak ekspresije *SMAD4* sa naprednijim stadijumima bolesti.^{120,124,183,184} Ekspresija *SMAD4* gena je takođe pokazala dobru moć kao biomarker za diskriminaciju tumorskog od netumorskog tkiva kod LARC ispitanika. Prethodne studije pokazale su postojanje asocijacije između snižene *SMAD4* ekspresije u CRC i većeg invazivnog potencijala, formiranja udaljenih metastaza, sticanja rezistencije i lošeg odgovora na hemioterapiju zasnovanu na 5-FU, kao i lošije prognoze, bez obzira na genetički status *SMAD4*.^{117,120-122,124} Zbog toga smo u našem istraživanju dali prednost proceni nivoa ekspresije *SMAD4* gena u odnosu na genetičku analizu, s obzirom da omogućava otkrivanje tumora sa gubitkom genske ekspresije usled tačkastih mutacija, alternativnih varijanti splajsovanja ili epigenetičke inaktivacije kao što je hipermetilacija promotora, a ne samo onih sa delecijama ovog gena.

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali značajno povišen odnos *SMAD7/SMAD4* u tumorskim tkivima LARC u odnosu na upareno okolno neizmenjeno tkivo mukoze rektuma, što je u skladu sa našim *in vitro* nalazima. Odnos ekspresije *SMAD7* i *SMAD4* gena kod LARC ispitanika je takođe pokazao dobru moć kao biomarker za diskriminaciju tumorskog od netumorskog tkiva. Do sada je ovaj odnos ispitivan samo u dve studije koje su se ticale karcinoma želuca.^{173,174} Leng i sar. su pokazali povišenu ekspresiju *SMAD7* i sniženu ekspresiju *SMAD4*

proteina u karcinomima želuca u poređenju sa odgovarajućim netumorskim tkivima, sa najizraženijim promenama u slabo diferentovanim tkivima i onim sa većom stopom pozitivnih limfnih nodusa.¹⁷³ Dalja *in vitro* karakterizacija apoptoze i preživljavanja pokazala je smanjenu apoptozu u SGC7901 ćelijama transdukovanim SMAD7 plazmidom i povećanu apoptozu u istoj ćelijskoj liniji transdukovanoj SMAD4 plazmidom i to u dozno- i vremenski-zavisnom maniru.¹⁷³ U sličnoj studiji, Zizi-Sermpetzoglou i sar. su pokazali negativnu korelaciju između SMAD7 i SMAD4 ekspresije.¹⁷⁴ Pored toga, postojala je značajna razlika u petogodišnjem ukupnom preživljavanju kod pacijenata sa suprotnim obrascima ekspresije SMAD4/SMAD7 u tumorskom tkivu želuca, pri čemu je obrazac asociran sa povoljnim ishodom bolesti podrazumevao očuvanu ekspresiju SMAD4 i izgubljenu ekspresiju SMAD7.¹⁷⁴ Iako se smatra da su profili ekspresije tkivno-specifični, rezultati naše studije pokazali su slične relacije između SMAD7 i SMAD4 ekspresije u tumorima poreklom od LARC ispitanika, što je rezultiralo povišenim odnosom SMAD7/SMAD4. Uočene sličnosti mogu biti rezultat činjenice da se radi o malignitetima gastrointestinalnog trakta, koji mogu imati određene zajedničke karakteristike. U odnosu na rezultate poređenja ekspresije u malignom i nemalignom epitelu kolona *in vitro*, poređenje ekspresije u malignim u odnosu na nemaligna tkiva LARC ispitanika pokazalo je manje drastično povećanje SMAD7 ekspresije i drastičnije smanjenje nivoa SMAD4. Ovo zapažanje može biti posledica heterogenosti i složenosti tumorskog tkiva u odnosu na pojedinačne ćelije gajene u dvodimenzionalnoj kulturi, kao i razlika u stadijumu bolesti među ispitivanim ćelijskim linijama koje zbog toga mogu ispoljavati veću varijabilnost u obrascima ekspresije. Ipak, odnos SMAD7/SMAD4 bio je viši kod malignih u odnosu na nemaligne ćelije i tkiva, što je u skladu sa predloženim konceptom da je balans između ekspresije SMAD7 i SMAD4 relevantniji za ćeliju od pukog gubitka ili smanjenja ekspresije SMAD4 ili prekomerne ekspresije SMAD7.

Rezultati dobijeni u grupi CLM ispitanika pokazali su značajno sniženu ekspresiju i SMAD7 i SMAD4 gena u kolorektalnim metastazama u jetri u poređenju sa uparenim okolnim nemalignim tkivima jetre, kao i dobru i odličnu moć diskriminacije metastatskog od netumorskog tkiva jetre. Iako metastatski uzorci i okolno nemaligno tkivo jetre nisu istog porekla, podaci o iRNK ekspresiji dostupni u bazi Atlas ljudskih proteina (eng. *The Human Protein Atlas*; dostupno na web adresi <http://www.proteinatlas.org>, datum pristupa 18. 5. 2021), koji su dobijeni normalizacijom tri seta transkriptomskih podataka (HPA, GTEX, i FANTOM5), ukazali su na postojanje niske tkivne specifičnosti u ekspresiji istraživanih gena između zdravog tkiva kolorektuma i jetre. Konsezusni normalizovani nivoi ekspresije (eng. *Consensus Normalized eXpression level*, NX) SMAD7 gena su približnih vrednosti u ispitivanim tkivima i iznose 7, 11,5 i 6,5 NX u zdravim tkivima rektuma, kolona i jetre, redom. Nivoi ekspresije SMAD4 su takođe međusobno bliski i iznose 17,6, 22,6 i 22 NX u zdravim tkivima rektuma, kolona i jetre, redom. Zbog sličnih obrazaca ekspresije koje ispoljavaju ispitivani geni u zdravim tkivima kolorektuma i jetre, u ovoj studiji smo poredili tkiva hepatičnih metastaza kolorektuma sa netumorskim okolnim tkivima jetre poreklom od svakog CLM ispitanika. U Microarray analizi globalne genske ekspresije od strane Sayagués i sar, sprovedenoj u tkivima primarnih karcinoma kolorektuma i od njih diseminovanih metastaza u jetri, pokazana je deregulacija SMAD7 i SMAD4 transkripata specifično u hepatičnim metastazama.¹⁸⁵ Naši rezultati nisu pokazali razlike u odnosu SMAD7/SMAD4 između tkiva kolorektalnih metastaza i okolnih nemalignih tkiva jetre poreklom od CLM ispitanika.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da je relativna ekspresija SMAD4 bila značajno snižena u tkivima hepatičnih metastaza CLM ispitanika u poređenju sa tumorskim tkivima LARC ispitanika. Činjenica da je ekspresija SMAD4 bila snižena u tumorskim tkivima LARC ispitanika u poređenju sa uparenom neizmenjenom rektalnom mukozom ukazuje na dodatnu funkcionalnu inaktivaciju SMAD4 u toku progresije bolesti i tumorske invazije. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Losi i sar, koji su dokumentovali gubitak SMAD4 ekspresije u tkivima 55% sinhronih i 53% metahronih hepatičnih metastaza, dok je ekspresija bila izgubljena u samo 15% tkiva primarnih CRC poreklom od nemetastatskih pacijenata.¹⁸⁶ Zbog smanjene ekspresije SMAD4 u metastatskim tkivima, uočeno je blago povećanje odnosa SMAD7/SMAD4 u CLM u poređenju sa LARC tkivima, ali bez

statističke značajnosti. Uprkos još većem snižavanju *SMAD4* ekspresije tokom tumorske faze metastaziranja, odnos *SMAD7/SMAD4* se nije značajno razlikovao između primarnih i metastatskih tumora.

Tumorska i uparena netumorska LARC tkiva uzorkovana nakon nCRT nisu ispoljavala značajne razlike u ispitivanim ekspresionim profilima. Kako bi se istražio efekat nCRT na promenu nivoa ekspresije i međusobnog odnosa *SMAD7* i *SMAD4* gena, relativna ekspresija je upoređena između tumorskih i netumorskih tkiva LARC ispitanika sakupljenih pre i nakon nCRT i nisu pronađene značajne razlike u ekspresiji. Uporedno poređenje tumorskih i netumorskih tkiva pre i nakon nCRT moglo bi ukazati na selektivnost uticaja terapije na maligno tkivo u odnosu na zdrave ćelije mukoze kolorektuma koje brzo proliferišu, što je odlika koju dele sa neoplastično transformisanim ćelijama i takođe ih čini targetom za delovanje citotoksičnih lekova. Odsustvo razlika u ekspresionim profilima LARC tumora pre i nakon terapije je u suprotnosti sa značajnim ekspresionim promenama zabeleženim u *in vitro* tretmanima ćelijske linije SW620. Iako rezultati dobijeni *in vitro* tretmanima nisu validirani na kliničkim uzorcima, niti se mogu direktno ekstrapolirati, ovaj rezultat bi trebalo validirati u studiji sa većim brojem ispitanika, s obzirom da je mali broj dostupnih uzoraka tumorskih i netumorskih tkiva pre i posle primljene terapije ograničavajući faktor ovog segmenta studije. Razlici između rezultata *in vitro* tretmana SW620 ćelija i onih dobijenih u tumorskom tkivu LARC ispitanika pre i nakon terapije može doprineti i činjenica da su metastatske ćelije često senzitivnije na delovanje sistemske terapije i imaju bolji patološki odgovor od primarnih tumora od kojih su diseminovani.¹⁸⁷

Novi standard za lečenje LARC pacijenata je multimodalni protokol koji podrazumeva nCRT praćenu hirurškom resekcijom. Međutim, odgovor na nCRT veoma varira među pacijentima, a kliničko-patološki i radiološki biomarkeri nisu dovoljno senzitivni i specifični da bi predvideli ishod terapije i diskriminirali pacijente koji bi imali koristi od ovog terapijskog modaliteta od onih koji ne bi. Zbog toga su istraživački napori poslednjih godina sve više usmereni ka otkrivanju prediktivnih molekularnih biomarkera odgovora na nCRT. U okviru naše studije je ispitivan translacioni potencijal analiziranih obrazaca ekspresije u tumorima uzorkovanim pre terapije od LARC ispitanika kao prediktivnih biomarkera odgovora na nCRT kroz procenu patološkog odgovora na terapiju na osnovu TRG stadijuma. Ekspresija *SMAD7* bila je značajno povišena kod ispitanika sa dobrim u odnosu na one sa lošim odgovorom na nCRT i pokazala je odličnu moć kao biomarker za diskriminaciju dobrog od lošeg patološkog odgovora tumora na nCRT. Prethodno istraživanje prediktivnog potencijala *SMAD7* od strane Su i sar. ukazalo je na povezanost između stabilne ekspresije *SMAD7* i ranog recidiva bolesti i lošijeg preživljavanja kod pacijenata koji su primali adjuvantnu hemioterapiju.¹⁸⁸ Nekoliko studija koje su upoređivale globalne ekspresione profile povezane sa dobrim i lošim odgovorom na nCRT identifikovale su veliki broj diferencijalno ekspimiranih gena u tkivima karcinoma rektuma, od kojih do danas ni jedan nije ušao u kliničku upotrebu zbog nemogućnosti replikabilnosti rezultata i nezavisne validacije dobijenih ekspresionih obrazaca kao prediktivnih biomarkera.¹⁸⁹⁻¹⁹² Značajno povišena ekspresija u tumorima ispitanika sa dobrim u odnosu na one sa lošim patološkim odgovorom ukazuje na prediktivni potencijal ekspresije *SMAD7* gena, a ovi preliminarni rezultati moraju biti validirani u budućoj studiji sprovedenoj na većoj kohorti pacijenata, s obzirom da je mali broj ispitanika uključenih u ovu studiju imalo dobar odgovor na terapiju.

Kako bismo procenili prognostički potencijal ispitivanih obrazaca ekspresije, analizirali smo povezanost nivoa i odnosa ekspresije *SMAD7* i *SMAD4* u LARC i CLM tkivima i kliničko-patoloških karakteristika. Naši rezultati su pokazali da je ekspresija *SMAD7* bila značajno niža u metastatskim tkivima CLM ispitanika koji su primili neoadjuvantnu i/ili adjuvantnu terapiju za primarnu bolest u odnosu na one koji nisu, a značajno viša kod pacijenata sa N0 stadijumom primarne bolesti u odnosu na one sa N1 i N2 stadijumom, dok nije bilo drugih značajnih asocijacija. Prethodna istraživanja su pokazala povezanost snižene ekspresije ili gubitka *SMAD7* sa ređom limfatičnom invazijom, dužim preživljavanjem bez recidiva bolesti i smanjenim rizikom od smrti i recidiva,^{181,188,193} kao i snižene

ekspresije ili gubitka SMAD4 sa višim T i N kategorijama, češćom limfovaskularnom i perineuralnom invazijom, tumorskim pupljenjem (eng. *tumor budding*) i udaljenim metastazama.^{120,188} Ovo je u skladu sa studijama koje su pokazale da je amplifikacija *SMAD7* gena povezana sa lošijim, a delecija sa boljim ishodom kolorektalnog karcinoma.¹⁰¹ S druge strane, postoje dokazi da povišena ekspresija *SMAD7* u ćelijama imunskog sistema koje infiltrišu upaljenu mukožu creva osoba sa IBD može izazvati antitumorske odgovore i dovesti do inhibicije rasta CRC ćelija. Ova oprečna zapažanja ukazuju na dvostruku ulogu *SMAD7* čak i u kolorektalnoj karcinogenezi, koja najverovatnije zavisi od analiziranih ćelija i biološkog konteksta.¹⁰¹

5.2. Genetička varijabilnost i alel-specifična ekspresija *SMAD7* 3'UTR varijanti u karcinomu kolorektuma

Genetička varijabilnost u okviru 3'UTR-a je odnedavno prepoznata kao važan aspekt koji utiče na regulaciju genske ekspresije i kao mehanizam u osnovi predispozicije za nastanak različitih složenih bolesti. Varijante lokalizovane unutar predviđenih ciljnih sekvenci miRNK u okviru 3'UTR-a mogu uticati na efikasnost vezivanja miRNK remećenjem postojećih ili kreiranjem novih mesta za vezivanja i na taj način narušavati funkcionisanje gena.^{136,141} Ovakva varijabilnost takođe može uticati na stabilnost iRNK i translaciju kroz alteracije poliadenilacije i regulatornih interakcija iRNK sa proteinima.^{136,141,154} Imajući u vidu važnost deregulacije *SMAD7* gena u progresiji karcinoma kolorektuma, kao i uloge koju genska varijabilnost u okviru regulatornih regiona može imati u predispoziciji za nastanak tumora, u ovoj doktorskoj disertaciji su analizirane genske varijante 3'UTR-a *SMAD7* gena u kolorektalnom karcinomu, merena je alelska neravnoteža u iRNK ekspresiji postojećih varijanti i testiran je njihov uticaj na regulaciju posredovanu miRNK molekulima predikcijom efekata koje detektovane varijante ostvaruju na miRNK:iRNK interakcije.

U šest ispitivanih ćelijskih linija i 80 CRC pacijenata, detektovano je ukupno četiri različite SNV, u jednoj ćelijskoj liniji (HCT116) i devet ispitanika, od kojih je jedna bila po prvi put detektovana somatska varijanta *Novel 1*. Otkrivena niska genetička varijabilnost je u skladu sa pretpostavkom da regioni vezivanja miRNK imaju manju gustinu SNV od očekivane i da su evoluciono očuvani.¹⁹⁴ Ovo ukazuje na negativan selektivni pritisak na mutacije u ovim genomskim sekvencama i naglašava važnost interakcije između miRNK i ciljnih gena za normalno funkcionisanje ćelije.^{141,194} GWAS studija Broderick i sar, koja je za cilj imala identifikovanje genetičkih varijanti koje dovode do povećanog rizika za nastanak CRC, analizirala je *SMAD7* gen direktnim sekvenciranjem kod 65 osoba u potrazi za dodatnim promenama DNK sekvence značajnim za patogenezu CRC i detektovala šest SNV u 3'UTR-u.¹⁰⁴ Među njima je bila rs16950113 kod 8% ispitanika i pet retkih SNV od kojih je svaka bila prisutna kod najviše dva ispitanika.¹⁰⁴ Slično ovoj studiji, naše istraživanje otkrilo je varijantu rs16950113 kod 7,5% ispitanika, kao i tri retke SNV, od kojih je svaka bila prisutna kod po jednog ispitanika.

S obzirom da se miRNK-posredovana posttranskripciona represija odvija komplementarnim sparivanjem regiona semena na 5' kraju miRNK i njene ciljne sekvence 3'UTR-a iRNK, dokazano je da su genetičke varijante koje narušavaju ove interakcije štetne i asocirane sa rizikom za razvoj i progresiju maligniteta.^{136,141,146,153,154,195} Sprovedena istraživanja su otkrila povezanost različitih genskih varijanti u okviru mesta vezivanja miRNK sa rizikom za nastanak CRC,^{143,196-198} progresijom,¹⁹⁷ prognozom,^{198,199} i predikcijom^{200,201} toka bolesti, od kojih su neke sa potencijalom molekularnih biomarkera. U studiji slučajeva i kontrola (eng. *a case-control study*) sprovedenoj od strane Landi i sar, prvi put je potvrđena povezanost dve SNV u okviru sekvenci vezivanja miRNK (rs17281995 u *CD86* i rs1051690 u *INSR*) i povećanog rizika od CRC.¹⁴³ U istom tipu studije, Schneiderova i sar. su otkrili da je rs8679 u okviru *PARP1* asociran sa rizikom za nastanak i prognozom kolorektalnog karcinoma.¹⁹⁸ Jiang i sar. su pokazali da je rs712 unutar 3'UTR-a gena *KRAS* asociran sa inicijacijom i progresijom karcinoma kolorektuma,¹⁹⁷ dok su Kim i sar. pokazali

da se rs3757417 i rs12373 u okviru 3'UTR-a gena *TPST1* i *PAUF*, redom, mogu potencijalno koristiti kao prognostički biomarkeri.¹⁹⁹ Graziano i sar. su ustanovili da je rs61764370 u okviru 3'UTR-a gena *KRAS* prediktivni biomarker hemioerezistencije kod pacijenata sa CLM koji su primili treću liniju terapije u režimu cetuksimab-irinotekan.²⁰⁰ Meta-analiza Gholami i sar. je pokazala da različiti aleli varijanti prisutnih u okviru miRNK-vezujućih sekvenci povećavaju rizik za nastanak karcinoma kolorektuma u grupi ispitanika iz Istočne Azije (rs3025039, rs3212986 i rs712) i Evrope (rs17281995).¹⁵⁶

U okviru našeg istraživanja testirali smo postojanje asocijacija između prisustva detektovanih genetičkih varijanti u *SMAD7* 3'UTR-u i pola, lokalizacije tumora i T i N stadijuma upoređivanjem ispitanika sa i bez SNV, ali nije utvrđeno postojanje značajnih relacija. Odsustvo povezanosti bilo je očekivano s obzirom na niske učestalosti detektovanih retkih varijanti u ispitivanoj grupi, za koje dosadašnja istraživanja nisu pokazala postojanje funkcionalnog efekta značajne veličine. S druge strane, prethodna studija Li i sar. je ustanovila povezanost prisustva varijante rs16950113 sa rizikom od razvoja akutnog ezofagitisa i pneumonitisa izazvanog zračenjem kod pacijenata sa lokalno uznapredovalim mikrocelularnim karcinomom pluća,²⁰² dok Broderick i sar. i Schneiderova i sar. nisu pronašli povezanost iste varijante sa rizikom za nastanak CRC^{104,198} i kliničkim ishodom bolesti.¹⁹⁸

S obzirom da je u okviru naše studije genetička varijabilnost bila detektovana kod malog broja ispitanika (njih devetoro) i samo u jednoj ćelijskoj liniji (HCT116), a da su sve varijante bile prisutne u heterozigotnom stanju, cilj nam je bio da okarakterišemo razlike u ekspresiji alela otkrivenih SNV u tumorskim i netumorskim tkivima i HCT116 ćelijama. Alelska neravnoteža predstavlja odstupanje od očekivane podjednake zastupljenosti iRNK prepisane sa oba alela u diploidnim ćelijama. I *cis*- i *trans*-regulatorni faktori mogu biti odgovorni za preferencijalnu ekspresiju određenog alela, što je proces zavisano od ćelijskog konteksta i tkivnih specifičnosti.²⁰³ Varijacije u okviru *cis*-regulatorne DNK sekvence 3'UTR-a direktno utiču na inicijaciju, stopu i stabilnost transkripcije, te bi se merenje alel-specifične ekspresije moglo koristiti za otkrivanje *cis*-regulatornih varijanti koje utiču na ekspresiju gena.²⁰³ Prema rezultatima ove doktorske disertacije, ekspresija iRNK sa WT alelom rs16950113 varijante u HCT116 ćelijskoj liniji bila je gotovo monoalelska, sa udelom od 99,3% svih detektovanih transkripata. Upotrebom SNP čipa visoke rezolucije, Lee i sar. su analizirali alel-specifičnu ekspresiju u 11 ćelijskih linija karcinoma kolorektuma i identifikovali dva monoalelski eksprimirana gena i 32 gena sa alelskom neravnotežom u ekspresiji.²⁰⁴ Među njima, 15 gena je bilo asociirano sa *cis*-regulatornim ekspresionim lokusima kvantitativnih osobina (eng. *expression quantitative trait loci*, eQTLs), što ukazuje na značaj *cis* mehanizama kontrole regulacije alel-specifične ekspresije u CRC ćelijama.²⁰⁴ Alelska neravnoteža za rs16950113 u tumorskim tkivima u okviru naše studije bila je bidirekciona, s obzirom da je kod četiri ispitanika detektovana više od dvostruko veća količina transkripta sa varijantnim alelom, dok je transkript sa WT alelom bio dominantno eksprimiran kod dva preostala ispitanika, ali sa razlikom manjom od dvostruke. S druge strane, uparena netumorska okolna tkiva imala su više nivoje transkripta sa WT alelom kod četiri nosioca, ali sa manjom razlikom od 1,5 puta između alela kod polovine ispitanika. Clayton i sar. su upoređivali tumorska i uparena okolna netumorska tkiva četiri različita karcinoma poreklom od 233 ispitanika i ustanovili promene u obrascima alel-specifične ekspresije kod pojedinaca heterozigotnih za tumor-supresorske gene čija je funkcionalna inaktivacija asociirana sa tumorskom inicijacijom i progresijom.²⁰⁵ Pored toga, razlike u alel-specifičnoj ekspresiji između tumorskih i uparenih neizmenjenih tkiva ispoljavale su svih šest mogućih kombinacija ekspresionih obrazaca, od alel-specifične ekspresije WT ili varijantnog alela prisutnog u tumorskim, ali odsutnog u netumorskim tkivima i obrnuto, do različitih alela preferencijalno eksprimiranih u tumorskim i netumorskim tkivima.²⁰⁵

Osim varijante rs16950113, sa populacionom učestalošću ređeg alela (eng. *minor allele frequency*, MAF) od 0,046504, druge dve otkrivene germinativne SNV, rs1050799536 kod jednog

ispitanika sa karcinomom kolona i rs1043778717 kod jednog LARC ispitanika, su retke genske varijante čije MAF iznose 0,000108 i 0,00009, redom.²⁰⁶ Ipak, ove retke varijante su pokazale zanimljive obrasce ekspresije - aleli varijante rs1050799536 su bili uravnoteženo ekspimirani u tumorskom, ali je isključivo WT alel bio prisutan u netumorskom tkivu istog ispitanika, dok je WT alel varijante rs1043778717 bio monoalelski ekspimiran i u tumorskom i u uparenom netumorskom tkivu nosioca. Regulatorni mehanizmi koji leže u osnovi nasumične monoalelske ekspresije, koja je definisana kao ekspresija ograničena na jedan alel u prisustvu heterozigotnog genoma kod gena koji nisu imprintovani, još uvek nisu razjašnjeni, ali se zna da doprinose varijacijama u fenotipu i predispoziciji za nastanak bolesti među pojedincima identičnog genotipa.²⁰⁷ Ukoliko pretpostavimo da je monoalelska ekspresija WT alela rs1050799536 varijante u netumorskom tkivu pod regulatornom kontrolom, podjednaka količina transkripta sa retkim varijantnim alelom koja se prepisuje u tumorskom tkivu može ukazivati na promenu u transkripciji ili posttranskripcionim mehanizmima koji favorizuju ovaj transkript u neoplastično transformisanim ćelijama, kao i selektivnu prednost u očuvanju ovog alela koji potencijalno utiče na tumor.

Iako aktuelna istraživanja nedvosmisleno ukazuju na važnost naslednih varijanti u okviru sekvenci vezivanja miRNK za rizik od nastanka i progresiji tumora, somatske mutacije u ovim regionima i dalje predstavljaju izazov za proučavanje i nedovoljno su istražene. Oskudni podaci o somatskim varijantama u okviru ciljnih sekvenci vezivanja miRNK kod karcinoma ukazuju na postojanje neistraženog regulatornog pejzaža koji bi mogao razotkriti mehanizme koji leže u osnovi pojedinih onkogenih svojstava. Približno trećina svih transkripata koje smo detektovali u CLM tkivu sa novom somatskom varijantom su bili nosioci ove mutacije. Neuravnotežena alelska ekspresija je ukazivala na potencijalne funkcionalne implikacije koje je potvrdila *in silico* analiza, predviđajući gubitak mesta vezivanja za devet miRNK i novonastalo mesto vezivanja za jednu miRNK kao posledica detektovane somatske varijante *Novel 1*. Gubitak target sekvence za vezivanje devet miRNK, za koje je predviđeno da se vezuju za iRNK i regulišu njenu ekspresiju, mogao bi narušiti degradaciju iRNK posredovanu miRNK i doprineti povišenoj ekspresiji *SMAD7* u ćelijama koje poseduju ovu varijantu. Takođe, za SNV rs16950113, oba web servera korišćena za predikciju funkcionalnih efekata ove varijante predvidela su gubitak mesta vezivanja za šest i novo mesto vezivanja za jednu miRNK. Ova germinativna genska varijanta takođe je pokazala različite obrasce alelske neravnoteže u tkivima šest ispitanika, sa odnosom transkripata koji je sveukupno bio pomešten u korist varijantnog alela u tumorskim i WT alela u netumorskim tkivima. U ovom slučaju, preferencijalna ekspresija transkripata sa varijantnim alelom, kojem nedostaje mesto vezivanja za šest miRNK u odnosu na transkript sa WT alelom, mogla bi narušiti miRNK-posredovanu iRNK degradaciju koja bi se neometano dešavala u WT transkriptu, što bi za posledicu moglo imati povišenu ekspresiju *SMAD7* koja je često primećena u CRC.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata ove doktorske disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

- Poređenje ispitivanih ekspresionih profila između primarnog tumorskog tkiva i uparene okolne netumorske mukoze rektuma, kao i rezultati dobijeni *in vitro* poređenjem malignih sa nemalignom ćelijskom linijom kolona, pokazali su da je balans između ekspresije *SMAD7* i *SMAD4* značajniji za ćeliju od pukog gubitka ili smanjenja ekspresije *SMAD4* ili prekomerne ekspresije *SMAD7*. Odnos ova dva gena je izmenjen u malignim ćelijama i ima potencijal dijagnostičkog biomarkera za diskriminaciju tumorskog od netumorskog tkiva kod LARC ispitanika.
- Poređenje ispitivanih ekspresionih profila između kolorektalnih metastaza u jetri i uparenog okolnog netumorskog tkiva jetre pokazalo je značajnu deregulaciju i *SMAD7* i *SMAD4* gena u tkivima metastaza, ali se uprkos tome odnos *SMAD7/SMAD4* nije značajno razlikovao između poređenih tkiva, pa nije potvrđen kao dijagnostički biomarker kod CLM ispitanika.
- Ekspresija *SMAD4* gena je bila značajno snižena u metastazama CLM ispitanika u poređenju sa primarnim tumorima LARC ispitanika, u kojima je nivo *SMAD4* takođe bio snižen u odnosu na neizmenjenu rektalnu mukozu, što ukazuje na dodatnu funkcionalnu inaktivaciju *SMAD4* u toku progresije bolesti i tumorske invazije.
- Ekspresija *SMAD7* u SW620 ćelijama je bila značajno povišena pod uticajem svih tretmana i njihovih kombinacija, sa izuzetkom snižene ekspresije u ćelijama tretiranim samo bevacizumabom, dok je jedini značajan efekat terapije na ekspresiju *SMAD4* bilo njeno povećanje u ćelijama tretiranim upravo samo bevacizumabom. Suprotni profili ekspresije *SMAD7* i *SMAD4* gena u ćelijama tretiranim samo bevacizumabom i drugim hemioterapeutskim režimima su verovatno posledica razlika u mehanizmima delovanja ovih lekova, a dalja istraživanja bi trebalo da ispitaju kako bevacizumab dovodi do povećanja *SMAD4* ekspresije i zašto se ovaj pozitivan efekat anulira u kombinaciji sa citotoksičnim FOX tretmanom. Za validaciju ovih rezultata bi trebalo koristiti sferoide ili organoide, čija trodimenzionalna organizacija vernije oponaša tumorsko mikrookruženje i međućelijske interakcije od korišćenih dvodimenzionalnih ćelijskih linija.
- Neoadjuvantna hemioradioterapija nije imala uticaja na ekspresiju i odnos *SMAD7* i *SMAD4* u tumorskim i netumorskim tkivima LARC ispitanika, što je u suprotnosti sa značajnim promenama zabeleženim u *in vitro* tretmanima ćelijske linije SW620. Ovaj rezultat bi trebalo validirati u studiji sa većim brojem ispitanika.
- Ekspresija *SMAD7*, merena u tumorima LARC ispitanika pre primljene nCRT, bila je značajno povišena kod onih sa dobrim u odnosu na one sa lošim patološkim odgovorom i pokazala je odličnu moć kao biomarker za diskriminaciju dobrog od lošeg tumorskog odgovora na nCRT, što ukazuje na potencijalnu prediktivnu vrednost koju *SMAD7* ekspresija ima kod LARC pacijenata lečenih nCRT, a koju bi trebalo validirati u studiji sa većim brojem ispitanika.
- Genetička analiza *SMAD7* 3'UTR varijanti u karcinomu kolorektuma pokazala je nizak stepen genetičke varijabilnosti, s obzirom da je detektovano prisustvo svega četiri različite SNV u ukupno devet ispitanika i jednoj ćelijskoj liniji. Među njima je jedna somatska genetička

varijanta u metastatskom tkivu CLM ispitanika, *Novel 1* (pozicija chr18:48920364; aleli G>C), koja je kao nova varijanta prvi put prijavljena u bazi podataka NCBI *GenBank*, dok su ostale tri genetičke varijante (rs16950113, rs1050799536 i rs1043778717) već bile poznate germinativne SNV.

- Alel-specifična ekspresija detektovanih varijanti ukazala je na visok stepen alelske neravnoteže koja je u određenoj meri bila prisutna u ekspresiji svih detektovanih varijanta u 3'UTR-u *SMAD7* gena u ćelijskim linijama kolona i tumorskim i netumorskim tkivima CRC ispitanika.
- *In silico* predikcije su potvrdile postojanje funkcionalnih posledica detektovanih varijanti u 3'UTR-u *SMAD7* gena, koje podrazumevaju uticaj na efikasnost vezivanja miRNK (narušavanje postojećih i kreiranje novih mesta vezivanja), što ukazuje na njihovu potencijalno značajnu regulatornu ulogu.

Opšti zaključak ove doktorske disertacije je da promene ekspresije i odnosa *SMAD7* i *SMAD4* u ćelijskim linijama kolona, primarnom karcinomu rektuma i kolorektalnim metastazama u jetri naglašavaju važnost ovih gena u različitim fazama progresije bolesti. Dobijeni ekspresioni profili *SMAD7* i *SMAD4* gena u tumorskim ćelijama kolona i tkivima rektuma ukazuju na značaj njihove združene evaluacije i odnosa u karcinomu kolorektuma. Diferencijalnu ekspresiju *SMAD7* gena u odgovoru na nCRT kod LARC ispitanika bi trebalo dalje istražiti zbog potencijalne prediktivne vrednosti. Alelska neravnoteža u ekspresiji detektovanih genetičkih varijanti, koja je udružena sa izmenama u afinitetu vezivanja miRNK, ukazuje da su svi ispitivani SNV potencijalni faktori koji utiču na regulaciju ekspresije *SMAD7* u CRC. Uzimajući u obzir da brojni molekularni mehanizmi mogu doprineti regulaciji *SMAD7* u tumorima, buduće studije bi trebalo da validiraju predložene mehanizme i razjasne njihov doprinos i efekte na maligni fenotip u CRC.

7. LITERATURA

1. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(12):713-732. doi:10.1038/s41575-019-0189-8
2. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3):153-173. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030
3. Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. Accessed March 1st, 2023. <https://gco.iarc.fr/today>
4. Caldarella A, Crocetti E, Messerini L, Paci E. Trends in colorectal incidence by anatomic subsite from 1985 to 2005: a population-based study. *Int J Colorectal Dis*. 2013;28(5):637-641. doi:10.1007/s00384-013-1672-2
5. Yang SY, Cho MS, Kim NK. Difference between right-sided and left-sided colorectal cancers: from embryology to molecular subtype. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18(4):351-358. doi:10.1080/14737140.2018.1442217
6. Thrumurthy SG, Thrumurthy SS, Gilbert CE, Ross P, Haji A. Colorectal adenocarcinoma: risks, prevention and diagnosis. *BMJ*. 2016;354:i3590. doi:10.1136/bmj.i3590
7. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2044-2058. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.054
8. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27(9):1423-1431. doi: 10.1111/j.1440-1746.2012.07200.x.
9. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
10. Collaborators GCC. The global, regional, and national burden of colorectal cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019;4(12):913-933. doi:10.1016/S2468-1253(19)30345-0
11. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683-691. doi:10.1136/gutjnl-2015-310912
12. Mihajlović J, Pechlivanoglou P, Miladinov-Mikov M, Zivković S, Postma MJ. Cancer incidence and mortality in Serbia 1999-2009. *BMC Cancer*. 2013;13:18. doi:10.1186/1471-2407-13-18
13. Ferlay J, Laversanne M, Ervik M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. International Agency for Research on Cancer. Accessed March 2nd 2023. <https://gco.iarc.fr/tomorrow>
14. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers (Basel)*. 2021;13(9):2025. doi:10.3390/cancers13092025
15. Butterworth AS, Higgins JP, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2006;42(2):216-227. doi:10.1016/j.ejca.2005.09.023
16. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1):197. doi: 10.3390/ijms18010197
17. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*. 2019;14(2):89-103. doi:10.5114/pg.2018.81072
18. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48(4):526-535. doi:10.1136/gut.48.4.526

19. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(8):1097-1104. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02854.x
20. Islami F, Goding Sauer A, Miller KD, et al. Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):31-54. doi:10.3322/caac.21440
21. Song M, Chan AT, Sun J. Influence of the Gut Microbiome, Diet, and Environment on Risk of Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2020;158(2):322-340. doi:10.1053/j.gastro.2019.06.048
22. Shen Z. Genomic instability and cancer: an introduction. *J Mol Cell Biol.* 2011;3(1):1-3. doi:10.1093/jmcb/mjq057
23. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2008;135(4):1079-1099. doi:10.1053/j.gastro.2008.07.076
24. Yao Y, Dai W. Genomic Instability and Cancer. *J Carcinog Mutagen.* 2014;5:1000165. doi:10.4172/2157-2518.1000165
25. Kanthan R, Senger JL, Kanthan SC. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Patholog Res Int.* 2012;597497. doi:10.1155/2012/597497
26. Jung G, Hernández-Illán E, Moreira L, Balaguer F, Goel A. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(2):111-130. doi:10.1038/s41575-019-0230-y
27. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn.* 2008;10(1):13-27. doi:10.2353/jmoldx.2008.070082
28. Kalady MF, Boland CR, Church JM. Inherited Colorectal Cancer and the Genetics of Colorectal Cancer. In: Yeo CJ, ed. *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set.* Eight ed. Elsevier; 2019:1959-1980:chap 165.
29. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(25):2449-2460. doi:10.1056/NEJMra0804588
30. Geigl JB, Obenaus AC, Schwarzbraun T, Speicher MR. Defining 'chromosomal instability'. *Trends Genet.* 2008;24(2):64-69. doi:10.1016/j.tig.2007.11.006
31. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-767. doi:10.1016/0092-8674(90)90186-i
32. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2012;5(1):19-27.
33. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:479-507. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130235
34. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science.* 1990;249(4971):912-915. doi:10.1126/science.2144057
35. Jones S, Chen WD, Parmigiani G, et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(11):4283-4288. doi:10.1073/pnas.0712345105
36. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol.* 2015;89(6):899-921. doi:10.1007/s00204-015-1474-0
37. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2073-2087.e3. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.064
38. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350-1356. doi:10.1038/nm.3967
39. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2059-2072. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.065
40. Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2088-2100. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.066
41. Kedrin D, Gala MK. Genetics of the serrated pathway to colorectal cancer. *Clin Transl Gastroenterol.* 2015;6(4):e84. doi:10.1038/ctg.2015.12

42. Mino P, Moyer MP, Jass JR. Role of BRAF-V600E in the serrated pathway of colorectal tumorigenesis. *J Pathol.* 2007;212(2):124-133. doi:10.1002/path.2160
43. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;287(1):G7-17. doi:10.1152/ajpgi.00079.2004
44. Du B, Wang X, Wu D, et al. MicroRNA expression profiles identify biomarkers for predicting the response to chemoradiotherapy in rectal cancer. *Mol Med Rep.* 2018;18(2):1909-1916. doi:10.3892/mmr.2018.9215
45. Liu Z, Meng X, Zhang H, et al. Predicting distant metastasis and chemotherapy benefit in locally advanced rectal cancer. *Nat Commun.* 2020;11(1):4308. doi:10.1038/s41467-020-18162-9
46. Oronsky B, Reid T, Larson C, Knox SJ. Locally advanced rectal cancer: The past, present, and future. *Semin Oncol.* 2020;47(1):85-92. doi:10.1053/j.seminoncol.2020.02.001
47. Weiser MR. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2018;25(6):1454-1455. doi:10.1245/s10434-018-6462-1
48. Aklilu M, Eng C. The current landscape of locally advanced rectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(11):649-659. doi:10.1038/nrclinonc.2011.118
49. Gani C, Kirschniak A, Zips D. Watchful Waiting after Radiochemotherapy in Rectal Cancer: When Is It Feasible? *Visc Med.* 2019;35(2):119-123. doi:10.1159/000499167
50. group ESoCEc. Evaluating the incidence of pathological complete response in current international rectal cancer practice: the barriers to widespread safe deferral of surgery. *Colorectal Dis.* 2018;20 Suppl 6:58-68. doi:10.1111/codi.14361
51. Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, et al. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs.* 2005;179(1-2):56-65. doi:10.1159/000084509
52. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1417-9. doi:10.1172/JCI39675
53. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178-196. doi:10.1038/nrm3758
54. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139(5):871-890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
55. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000;2(2):76-83. doi:10.1038/35000025
56. Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract.* 2015;211(8):557-569. doi:10.1016/j.prp.2015.05.010
57. Vatandoust S, Price TJ, Karapetis CS. Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World J Gastroenterol.* 2015;21(41):11767-11776. doi:10.3748/wjg.v21.i41.11767
58. Valderrama-Treviño AI, Barrera-Mera B, Ceballos-Villalva JC, Montalvo-Javé EE. Hepatic Metastasis from Colorectal Cancer. *Euroasian J Hepatogastroenterol.* 2017;7(2):166-175. doi:10.5005/jp-journals-10018-1241
59. Zhou H, Liu Z, Wang Y, et al. Colorectal liver metastasis: molecular mechanism and interventional therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):70. doi:10.1038/s41392-022-00922-2
60. Holch JW, Demmer M, Lamersdorf C, et al. Pattern and Dynamics of Distant Metastases in Metastatic Colorectal Cancer. *Visc Med.* 2017;33(1):70-75. doi:10.1159/000454687
61. Jegatheeswaran S, Mason JM, Hancock HC, Siriwardena AK. The Liver-First Approach to the Management of Colorectal Cancer With Synchronous Hepatic Metastases: A Systematic Review. *JAMA Surg.* 2013;148(4):385-391. doi:10.1001/jamasurg.2013.1216
62. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2014;371(17):1609-1618. doi:10.1056/NEJMoa1403108

63. Goiffon RJ, O'Shea A, Harisinghani MG. Advances in radiological staging of colorectal cancer. *Clin Radiol*. 2021;76(12):879-888. doi:10.1016/j.crad.2021.06.005
64. Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. vol 1024. Springer; 2017.
65. Micev M. Koliko patohistologija ima značaja u skriningu i tretmanu kolorektalnog karcinoma? In: Krivokapić Z, ed. *Karcinom debelog creva – od prevencije preko karcinogeneze do metastaze*. Zavod za udžbenike i Srpska akademija nauka i umetnosti; 2018:131-153.
66. Krivokapić Z, Kovač J, Sekulić A, Rosić J. Da li je došlo vreme za personalizaciju terapije karcinoma debelog creva? In: Krivokapić Z, ed. *Karcinom debelog creva – od prevencije preko karcinogeneze do metastaze*. Zavod za udžbenike i Srpska akademija nauka i umetnosti; 2018:315-346.
67. Van Cutsem E, Borràs JM, Castells A, et al. Improving outcomes in colorectal cancer: where do we go from here? *Eur J Cancer*. 2013;49(11):2476-2485. doi:10.1016/j.ejca.2013.03.026
68. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005;352(5):476-87. doi:10.1056/NEJMra040958
69. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):330-338. doi:10.1038/nrc1074
70. Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):22. doi:10.1038/s41392-020-0116-z
71. Zhang C, Xu C, Gao X, Yao Q. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics*. 2022;12(5):2115-2132. doi:10.7150/thno.69424
72. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*. 2011;60(1):116-129. doi:10.1136/gut.2009.206250
73. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(17):1757-1765. doi:10.1056/NEJMoa0804385
74. Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(9):519-527. doi:10.1038/nrclinonc.2009.111
75. Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(9):5339-5343. doi:10.1073/pnas.78.9.5339
76. Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2011;121(6):233-251. doi:10.1042/CS20110086
77. Massagué J. TGF β in cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-230. doi:10.1016/j.cell.2008.07.001
78. Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J Pathol*. 2011;223(2):205-218. doi:10.1002/path.2785
79. Samanta D, Datta PK. Alterations in the Smad pathway in human cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:1281-1293. doi:10.2741/3986
80. Yan X, Chen Y-G. Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- β signalling. *Biochem J*. 2011;434(1):1-10. doi:10.1042/BJ20101827
81. Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2009;41(4):263-272. doi:10.1093/abbs/gmp018
82. Levy L, Hill CS. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006;17(1-2):41-58. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.09.009
83. Nakao A, Afrakhte M, Morn A, et al. Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature*. 1997;389(6651):631-635. doi:10.1038/39369
84. De Ceuninck van Capelle C, Spit M, Ten Dijke P. Current perspectives on inhibitory SMAD7 in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2020;55(6):691-715. doi:10.1080/10409238.2020.1828260

85. Tzavlaki K, Moustakas A. TGF- β Signaling. *Biomolecules*. 2020; 10(3):487. doi:10.3390/biom10030487
86. Tian M, Schiemann WP. The TGF-beta paradox in human cancer: an update. *Future Oncol*. 2009;5(2):259-271. doi:10.2217/14796694.5.2.259
87. Komuro A, Imamura T, Saitoh M, et al. Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene*. 2004;23(41):6914-6923. doi:10.1038/sj.onc.1207885
88. Shi W, Sun C, He B, et al. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J Cell Biol*. 2004;164(2):291-300. doi:10.1083/jcb.200307151
89. Zhang S, Fei T, Zhang L, et al. Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. *Mol Cell Biol*. 2007;27(12):4488-4499. doi:10.1128/MCB.01636-06
90. Wang E, Jin W, Duan W, et al. Association of two variants in SMAD7 with the risk of congenital heart disease in the Han Chinese population. *PLoS One*. 2013;8(9):e72423. doi:10.1371/journal.pone.0072423
91. Afrakhte M, Morén A, Jossan S, et al. Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;249(2):505-511. doi:10.1006/bbrc.1998.9170
92. Nagarajan RP, Zhang J, Li W, Chen Y. Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4. *J Biol Chem*. 1999;274(47):33412-33418. doi:10.1074/jbc.274.47.33412
93. Tabata T, Kokura K, Ten Dijke P, Ishii S. Ski co-repressor complexes maintain the basal repressed state of the TGF-beta target gene, SMAD7, via HDAC3 and PRMT5. *Genes Cells*. 2009;14(1):17-28. doi:10.1111/j.1365-2443.2008.01246.x
94. Liu G, Friggeri A, Yang Y, et al. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med*. 2010;207(8):1589-1597. doi:10.1084/jem.20100035
95. Huang W, Yang Y, Wu J, et al. Circular RNA cESRP1 sensitises small cell lung cancer cells to chemotherapy by sponging miR-93-5p to inhibit TGF- β signalling. *Cell Death Differ*. 2020;27(5):1709-1727. doi:10.1038/s41418-019-0455-x
96. Feng M, Tang PM, Huang XR, et al. TGF- β Mediates Renal Fibrosis via the Smad3-ErbB4-IR Long Noncoding RNA Axis. *Mol Ther*. 2018;26(1):148-161. doi:10.1016/j.ymthe.2017.09.024
97. Xu P, Lin X, Feng XH. Posttranslational Regulation of Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(12):a022087. doi:10.1101/cshperspect.a022087
98. Sánchez-Capelo A. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(1):15-34. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.11.002
99. Sun H, Peng Z, Tang H, et al. Loss of KLF4 and consequential downregulation of Smad7 exacerbate oncogenic TGF- β signaling in and promote progression of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2017;36(21):2957-2968. doi:10.1038/onc.2016.447
100. Li H, Li J, Chen L, et al. HERC3-Mediated SMAD7 Ubiquitination Degradation Promotes Autophagy-Induced EMT and Chemoresistance in Glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2019;25(12):3602-3616. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-3791
101. Tronccone E, Monteleone G. Smad7 and Colorectal Carcinogenesis: A Double-Edged Sword. *Cancers*. 2019;11(5):612. doi:10.3390/cancers11050612
102. Stolfi C, De Simone V, Colantoni A, et al. A functional role for Smad7 in sustaining colon cancer cell growth and survival. *Cell Death Dis*. 2014;5(2):e1073-e1073. doi:10.1038/cddis.2014.49
103. De Simone V, Bevivino G, Sedda S, et al. Smad7 knockdown activates protein kinase RNA-associated eIF2 α pathway leading to colon cancer cell death. *Cell Death Dis*. 2017;8(3):e2681-e2681. doi:10.1038/cddis.2017.103
104. Broderick P, Carvajal-Carmona L, Pittman AM, et al. A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet*. 2007;39(11):1315-1317. doi:10.1038/ng.2007.18

105. Slattery ML, Herrick J, Curtin K, et al. Increased risk of colon cancer associated with a genetic polymorphism of SMAD7. *Cancer Res.* 2010;70(4):1479-1485. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1792
106. Pittman AM, Naranjo S, Webb E, et al. The colorectal cancer risk at 18q21 is caused by a novel variant altering SMAD7 expression. *Genome Res.* 2009;19(6):987-993. doi:10.1101/gr.092668.109
107. Tenesa A, Farrington SM, Prendergast JG, et al. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21. *Nat Genet.* 2008;40(5):631-637. doi:10.1038/ng.133
108. Fortini BK, Tring S, Plummer SJ, et al. Multiple functional risk variants in a SMAD7 enhancer implicate a colorectal cancer risk haplotype. *PLoS One.* 2014;9(11):e111914. doi:10.1371/journal.pone.0111914
109. Garcia-Albeniz X, Nan H, Valeri L, et al. Phenotypic and tumor molecular characterization of colorectal cancer in relation to a susceptibility SMAD7 variant associated with survival. *Carcinogenesis.* 2013;34(2):292-298. doi:10.1093/carcin/bgs335
110. Yan X, Liao H, Cheng M, et al. Smad7 Protein Interacts with Receptor-regulated Smads (R-Smads) to Inhibit Transforming Growth Factor- β (TGF- β)/Smad Signaling. *J Biol Chem.* 2016;291(1):382-392. doi:10.1074/jbc.M115.694281
111. Morén A, Imamura T, Miyazono K, Heldin CH, Moustakas A. Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases. *J Biol Chem.* 2005;280(23):22115-22123. doi:10.1074/jbc.M414027200
112. Heldin C-H, Miyazono K, Ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997;390(6659):465. doi:10.1038/37284
113. Ullah I, Sun W, Tang L, Feng J. Roles of Smads Family and Alternative Splicing Variants of Smad4 in Different Cancers. *J Cancer.* 2018;9(21):4018-4028. doi:10.7150/jca.20906
114. Brier B, Moses HL. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(1):49-59. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.11.008
115. Ikushima H, Miyazono K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(6):415-24. doi:10.1038/nrc2853
116. Miyaki M, Iijima T, Konishi M, et al. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene.* 1999;18(20):3098-3103. doi:10.1038/sj.onc.1202642
117. Maitra A, Molberg K, Albores-Saavedra J, Lindberg G. Loss of Dpc4 expression in colonic adenocarcinomas correlates with the presence of metastatic disease. *Am J Pathol.* 2000;157(4):1105-1111. doi:10.1016/S0002-9440(10)64625-1
118. Goswami RS, Patel KP, Singh RR, et al. Hotspot mutation panel testing reveals clonal evolution in a study of 265 paired primary and metastatic tumors. *Clin Cancer Res.* 2015;21(11):2644-2651. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2391
119. Zhang B, Halder SK, Kashikar ND, et al. Antimetastatic role of Smad4 signaling in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(3):969-980.e1-3. doi:10.1053/j.gastro.2009.11.004
120. Yoo S-Y, Lee J-A, Shin Y, Cho N-Y, Bae JM, Kang GH. Clinicopathological Characterization and Prognostic Implication of SMAD4 Expression in Colorectal Carcinoma. *J Pathol Transl Med.* 2019;53(5):289. doi:10.4132/jptm.2019.06.07
121. Alazzouzi H, Alhopuro P, Salovaara R, et al. SMAD4 as a prognostic marker in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(7):2606-2611. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1458
122. Isaksson-Mettävainio M, Palmqvist R, Forssell J, Stenling R, Öberg Å. SMAD4/DPC4 expression and prognosis in human colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2006;26(1B):507-510.
123. Papageorgis P, Cheng K, Ozturk S, et al. Smad4 inactivation promotes malignancy and drug resistance of colon cancer. *Cancer Res.* 2011;71(3):998-1008. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3269

124. Kozak MM, Von Eyben R, Pai J, et al. Smad4 inactivation predicts for worse prognosis and response to fluorouracil-based treatment in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2015;68(5):341-345. doi:10.1136/jclinpath-2014-202660
125. Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306(4):799-804. doi:10.1016/s0006-291x(03)01066-0
126. Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell*. 1998;92(5):645-656. doi:10.1016/s0092-8674(00)81132-0
127. Liao X, Hao Y, Zhang X, et al. Clinicopathological characterization of SMAD4-mutated intestinal adenocarcinomas: A case-control study. *PloS one*. 2019;14(2):e0212142-e0212142. doi:10.1371/journal.pone.0212142
128. Chen CY, Chen ST, Juan HF, Huang HC. Lengthening of 3'UTR increases with morphological complexity in animal evolution. *Bioinformatics*. 2012;28(24):3178-3181. doi:10.1093/bioinformatics/bts623
129. Mayr C. Regulation by 3'-Untranslated Regions. *Annu Rev Genet*. 2017;51:171-194. doi:10.1146/annurev-genet-120116-024704
130. Mayr C. What Are 3' UTRs Doing? *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019;11(10):a034728. doi:10.1101/cshperspect.a034728
131. Yaffe D, Nudel U, Mayer Y, Neuman S. Highly conserved sequences in the 3' untranslated region of mRNAs coding for homologous proteins in distantly related species. *Nucleic Acids Res*. 1985;13(10):3723-3737. doi:10.1093/nar/13.10.3723
132. Meijlink F, Curran T, Miller AD, Verma IM. Removal of a 67-base-pair sequence in the noncoding region of protooncogene fos converts it to a transforming gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(15):4987-4991. doi:10.1073/pnas.82.15.4987
133. Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(6):1670-1674. doi:10.1073/pnas.83.6.1670
134. Berkovits BD, Mayr C. Alternative 3' UTRs act as scaffolds to regulate membrane protein localization. *Nature*. 2015;522(7556):363-367. doi:10.1038/nature14321
135. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009;11(3):228-234. doi:10.1038/ncb0309-228
136. Slaby O, Bienertova-Vasku J, Svoboda M, Vyzula R. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med*. 2012;16(1):8-21. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01359.x
137. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-385. doi:10.1038/nrm1644
138. Zhang R, Su B. Small but influential: the role of microRNAs on gene regulatory network and 3'UTR evolution. *J Genet Genomics*. 2009;36(1):1-6. doi:10.1016/S1673-8527(09)60001-1
139. Mendell JT. MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle*. 2005;4(9):1179-1184. doi:10.4161/cc.4.9.2032
140. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008;9(2):102-114. doi:10.1038/nrg2290
141. Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(6):389-402. doi:10.1038/nrc2867
142. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(17):9779-9784. doi:10.1073/pnas.1630797100

143. Landi D, Gemignani F, Naccarati A, et al. Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2008;29(3):579-584. doi:10.1093/carcin/bgm304
144. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*. 2004;15(2):185-197. doi:10.1016/j.molcel.2004.07.007
145. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(11):4034-4039. doi:10.1073/pnas.0510928103
146. Landi D, Gemignani F, Landi S. Role of variations within microRNA-binding sites in cancer. *Mutagenesis*. 2012;27(2):205-210. doi:10.1093/mutage/ger055
147. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19(1):92-105. doi:10.1101/gr.082701.108
148. Fabbri M, Ivan M, Cimmino A, Negrini M, Calin GA. Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2007;7(7):1009-1019. doi:10.1517/14712598.7.7.1009
149. Wang V, Wu W. MicroRNA-based therapeutics for cancer. *BioDrugs*. 2009;23(1):15-23. doi:10.2165/00063030-200923010-00002
150. Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer. *Am J Pathol*. 2009;174(4):1131-1138. doi:10.2353/ajpath.2009.080794
151. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(11):857-866. doi:10.1038/nrc1997
152. Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer*. 2009;8:102. doi:10.1186/1476-4598-8-102
153. Nicoloso MS, Sun H, Spizzo R, et al. Single-nucleotide polymorphisms inside microRNA target sites influence tumor susceptibility. *Cancer Res*. 2010;70(7):2789-2798. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3541
154. Arnold M, Ellwanger DC, Hartsperger ML, Pfeufer A, Stümpflen V. Cis-acting polymorphisms affect complex traits through modifications of microRNA regulation pathways. *PLoS One*. 2012;7(5):e36694. doi:10.1371/journal.pone.0036694
155. Salzman DW, Weidhaas JB. SNPping cancer in the bud: microRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer. *Pharmacol Ther*. 2013;137(1):55-63. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.08.016
156. Gholami M, Larijani B, Sharifi F, et al. MicroRNA-binding site polymorphisms and risk of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Med*. 2019;8(17):7477-7499. doi:10.1002/cam4.2600
157. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer*. 1994;73(11):2680-2686. doi:10.1002/1097-0142(19940601)73:11<2680::aid-ncr2820731105>3.0.co;2-c
158. Koinuma D, Shinozaki M, Komuro A, et al. Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signalling through degradation of Smad7. *EMBO J*. 2003;22(24):6458-6470. doi:10.1093/emboj/cdg632
159. Babic T, Dragicevic S, Miladinov M, Krivokapic Z, Nikolic A. SMAD4-201 transcript as a putative biomarker in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2022;22(1):72. doi:10.1186/s12885-022-09186-z
160. Grange PA, Chéreau C, Raingeaud J, et al. Production of superoxide anions by keratinocytes initiates P. acnes-induced inflammation of the skin. *PLoS Pathog*. 2009;5(7):e1000527. doi:10.1371/journal.ppat.1000527
161. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134. doi:10.1186/1471-2105-13-134

162. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12):5463-5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
163. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
164. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*. 2000;7(1-2):203-214. doi:10.1089/10665270050081478
165. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D941-D947. doi:10.1093/nar/gky1015
166. Bhattacharya A, Cui Y. SomamiR 2.0: a database of cancer somatic mutations altering microRNA-ceRNA interactions. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D1005-10. doi:10.1093/nar/gkv1220
167. Sun S, Wang Y, Maslov AY, Dong X, Vijg J. SomaMutDB: a database of somatic mutations in normal human tissues. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D1100-D1108. doi:10.1093/nar/gkab914
168. Bhattacharya A, Ziebarth JD, Cui Y. PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D86-91. doi:10.1093/nar/gkt1028
169. Liu CJ, Fu X, Xia M, Zhang Q, Gu Z, Guo AY. miRNASNP-v3: a comprehensive database for SNPs and disease-related variations in miRNAs and miRNA targets. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D1276-D1281. doi:10.1093/nar/gkaa783
170. Rosic J, Dragicevic S, Miladinov M, et al. SMAD7 and SMAD4 expression in colorectal cancer progression and therapy response. *Exp Mol Pathol*. 2021;123:104714. doi:10.1016/j.yexmp.2021.104714
171. Despotović J. *Uloga mikroRNK uključenih u regulaciju TGFβ signalnog puta u metastatskom kolorektalnom karcinomu-funkcionalna analiza i odgovor na terapiju*. Univerzitet u Beogradu; 2022.
172. Rosic J, Miladinov M, Dragicevic S, et al. Genetic analysis and allele-specific expression of SMAD7 3'UTR variants in human colorectal cancer reveal a novel somatic variant exhibiting allelic imbalance. *Gene*. 2023;859:147217. doi:10.1016/j.gene.2023.147217
173. Leng A, Liu T, He Y, Li Q, Zhang G. Smad4/Smad7 balance: A role of tumorigenesis in gastric cancer. *Exp Mol Pathol*. 2009;87(1):48-53. doi:10.1016/j.yexmp.2009.03.003
174. Zizi-Sermpetzoglou A, Myoteri D, Arkoumani E, Voultzos M, Marinis A. A study of Smad4 and Smad7 expression in surgically resected samples of gastric adenocarcinoma and their correlation with clinicopathological parameters and patient survival. *J BUON*. 2014;19(1):221-227.
175. Zhai W, Li S, Zhang J, et al. Sunitinib-suppressed miR-452-5p facilitates renal cancer cell invasion and metastasis through modulating SMAD4/SMAD7 signals. *Mol Cancer*. 2018;17(1):157. doi:10.1186/s12943-018-0906-x
176. Matuo R, Sousa FG, Escargueil AE, et al. 5-Fluorouracil and its active metabolite FdUMP cause DNA damage in human SW620 colon adenocarcinoma cell line. *J Appl Toxicol*. 2009;29(4):308-316. doi:10.1002/jat.1411
177. Graham J, Muhsin M, Kirkpatrick P. Oxaliplatin. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(1):11. doi:10.1038/nrd1287
178. Mahipal A, Grothey A. Role of Biologics in First-Line Treatment of Colorectal Cancer. *J Oncol Pract*. 2016;12(12):1219-1228. doi:10.1200/JOP.2016.018382
179. Bupathi M, Ahn DH, Bekaii-Saab T. Spotlight on bevacizumab in metastatic colorectal cancer: patient selection and perspectives. *Gastrointest Cancer*. 2016;6:21-30. doi:10.2147/GICTT.S97740
180. Poornima K, Francis AP, Hoda M, et al. Implications of Three-Dimensional Cell Culture in Cancer Therapeutic Research. *Front Oncol*. 2022;12:891673. doi:10.3389/fonc.2022.891673
181. Hu Y, Gaedcke J, Emons G, et al. Colorectal cancer susceptibility loci as predictive markers of rectal cancer prognosis after surgery. *Genes Chromosomes Cancer*. 2018;57(3):140-149. doi:10.1002/gcc.22512

182. Halder SK, Rachakonda G, Deane NG, Datta PK. Smad7 induces hepatic metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2008;99(6):957-965. doi:10.1038/sj.bjc.6604562
183. Voorneveld PW, Jacobs RJ, De Miranda NF, et al. Evaluation of the prognostic value of pSMAD immunohistochemistry in colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev*. 2013;22(5):420-424. doi:10.1097/CEJ.0b013e32835e88e2
184. Yan P, Klingbiel D, Saridaki Z, et al. Reduced Expression of SMAD4 Is Associated with Poor Survival in Colon Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(12):3037-3047. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0939
185. Sayagués JM, Corchete LA, Gutiérrez ML, et al. Genomic characterization of liver metastases from colorectal cancer patients. *Oncotarget*. 2016;7(45):72908-72922. doi:10.18632/oncotarget.12140
186. Losi L, Bouzourene H, Benhattar J. Loss of Smad4 expression predicts liver metastasis in human colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2007;17(5):1095-1099. doi: 10.3892/or.17.5.1095
187. Gervaz P, Rubbia-Brandt L, Andres A, et al. Neoadjuvant chemotherapy in patients with stage IV colorectal cancer: a comparison of histological response in liver metastases, primary tumors, and regional lymph nodes. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(10):2714-2719. doi:10.1245/s10434-010-1056-6
188. Su F, Li X, You K, et al. Expression of VEGF-D, SMAD4, and SMAD7 and Their Relationship with Lymphangiogenesis and Prognosis in Colon Cancer. *J Gastrointest Surg*. 2016;20(12):2074-2082. doi:10.1007/s11605-016-3294-9
189. Agostini M, Zangrando A, Pastrello C, et al. A functional biological network centered on XRCC3: a new possible marker of chemoradiotherapy resistance in rectal cancer patients. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(8):1160-1171. doi:10.1080/15384047.2015.1046652
190. Gim J, Cho YB, Hong HK, et al. Predicting multi-class responses to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *Radiat Oncol*. 2016;11:50. doi:10.1186/s13014-016-0623-9
191. Gantt GA, Chen Y, DeJulius K, Mace AG, Barnholtz-Sloan J, Kalady MF. Gene expression profile is associated with chemoradiation resistance in rectal cancer. *Colorectal Dis*. 2014;16(1):57-66. doi:10.1111/codi.12395
192. Lopes-Ramos C, Koyama FC, Habr-Gama A, et al. Comprehensive evaluation of the effectiveness of gene expression signatures to predict complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy and guide surgical intervention in rectal cancer. *Cancer Genet*. 2015;208(6):319-326. doi:10.1016/j.cancergen.2015.03.010
193. Boulay JL, Mild G, Lowy A, et al. SMAD7 is a prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2003;104(4):446-449. doi:10.1002/ijc.10908
194. Chen K, Rajewsky N. Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nat Genet*. 2006;38(12):1452-1456. doi:10.1038/ng1910
195. Cipollini M, Landi S, Gemignani F. MicroRNA binding site polymorphisms as biomarkers in cancer management and research. *Pharmgenomics Pers Med*. 2014;7:173-191. doi:10.2147/PGPM.S61693
196. Kang BW, Jeon HS, Chae YS, et al. Impact of Genetic Variation in MicroRNA-binding Site on Susceptibility to Colorectal Cancer. *Anticancer Res*. 2016;36(7):3353-3361.
197. Jiang QH, Peng HX, Zhang Y, Tian P, Xi ZL, Chen H. rs712 polymorphism within let-7 microRNA-binding site might be involved in the initiation and progression of colorectal cancer in Chinese population. *Oncotargets Ther*. 2015;8:3041-3045. doi:10.2147/OTT.S89746
198. Schneiderova M, Naccarati A, Pardini B, et al. MicroRNA-binding site polymorphisms in genes involved in colorectal cancer etiopathogenesis and their impact on disease prognosis. *Mutagenesis*. 2017;32(5):533-542. doi:10.1093/mutage/gex026
199. Kim JG, Chae YS, Lee SJ, et al. Genetic variation in microRNA-binding site and prognosis of patients with colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141(1):35-41. doi:10.1007/s00432-014-1780-6

200. Graziano F, Canestrari E, Loupakis F, et al. Genetic modulation of the Let-7 microRNA binding to KRAS 3'-untranslated region and survival of metastatic colorectal cancer patients treated with salvage cetuximab-irinotecan. *Pharmacogenomics J.* Oct 2010;10(5):458-464. doi:10.1038/tpj.2010.9
201. Saridaki Z, Weidhaas JB, Lenz HJ, et al. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in KRAS predicts improved outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with salvage cetuximab/panitumumab monotherapy. *Clin Cancer Res.* 2014;20(17):4499-4510. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0348
202. Li R, Pu X, Chang JY, et al. MiRNA-Related Genetic Variations Associated with Radiotherapy-Induced Toxicities in Patients with Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One.* 2016;11(3):e0150467. doi:10.1371/journal.pone.0150467
203. Gaur U, Li K, Mei S, Liu G. Research progress in allele-specific expression and its regulatory mechanisms. *J Appl Genet.* 2013;54(3):271-283. doi:10.1007/s13353-013-0148-y
204. Lee RD, Song MY, Lee JK. Large-scale profiling and identification of potential regulatory mechanisms for allelic gene expression in colorectal cancer cells. *Gene.* 2013;512(1):16-22. doi:10.1016/j.gene.2012.10.001
205. Clayton EA, Khalid S, Ban D, Wang L, Jordan IK, McDonald JF. Tumor suppressor genes and allele-specific expression: mechanisms and significance. *Oncotarget.* 2020;11(4):462-479. doi:10.18632/oncotarget.27468
206. Phan L, Jin Y, Zhang H, et al. ALFA: Allele Frequency Aggregator (National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine). www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/. 10 Mar. 2020.
207. Reinius B, Sandberg R. Random monoallelic expression of autosomal genes: stochastic transcription and allele-level regulation. *Nat Rev Genet.* 2015;16(11):653-664. doi:10.1038/nrg3888

BIOGRAFIJA AUTORA

Jovana Rosić rođena je 6. januara 1993. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu „Branko Radičević“ i Devetu gimnaziju „Mihailo Petrović Alas“. Studije biologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (UB) upisala je školske 2012/2013. godine, a završila septembra 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,67. Master akademske studije na Biološkom fakultetu UB, modul Primenjena genetika, upisala je školske 2016/2017. godine, a završila jula 2017. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu UB, modul Genetika, upisala je školske 2017/2018. godine i položila sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 10,00. Od januara 2018. godine zaposlena je na Medicinskom fakultetu UB radi obavljanja istraživačke delatnosti na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (III41033), kao i projektima Srpske akademije nauka i umetnosti (F-69 i F-20) pod rukovodstvom akademika Zorana Krivokapića. Na Medicinskom fakultetu UB je stekla zvanje istraživač pripravnik u maju 2018, a istraživač saradnik u maju 2021. godine. Član je Društva genetičara Srbije, Srpskog biohemijskog društva, Srpskog društva istraživača raka, Federacije evropskih biohemijskih društava (eng. *Federation of European Biochemical Societies*) i Evropske asocijacije za istraživanje raka (eng. *European Association for Cancer Research*). Do sada je učestvovala kao autor/koautor na 5 radova objavljenih u međunarodnim časopisima (dva M21 i tri M22 kategorije), jednom poglavlju u monografiji od nacionalnog značaja i 10 saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јована Росић

Број индекса Б3004/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа нивоа експресије и варијанти гена *SMAD7* у колоректалном карциному

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 19. 9. 2023.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора Јована Росић

Број индекса Б3004/2017

Студијски програм Биологија

Наслов рада Анализа нивоа експресије и варијанти гена *SMAD7* у колоректалном карциному

Ментор проф. др Горан Баришић и проф. др Катарина Зељић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 19. 9. 2023.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Анализа нивоа експресије и варијанти гена *SMAD7* у колоректалном карциному

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 19. 9. 2023.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.