

# Polimorfizimi gena TLR4 u tumorigenezi sporadičnog karcinoma debelog crijeva

---

**Salar, Anamarija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:036627>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-10**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno matematički fakultet  
Biološki odsjek

Anamarija Salar

**Polimorfizmi gena *TLR4* u tumorigenezi  
sporadičnog karcinoma debelog crijeva**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za personaliziranu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr.sc. Sanje Kapitanović, zn. savjetnice u trajnom zvanju IRB, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

*Zahvaljujem dr. sc. Sanji Kapitanović, dr. med. na povjerenju, stručnom vodstvu, savjetima i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Najveće hvala mojim roditeljima na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju koje su mi pružali za vrijeme trajanja studija. Također zahvaljujem bratu, baki i djedu na podršci. Posebne zahvale dugujem Ivanu koji je bio tu za mene kada je bilo najteže.*

*I na samom kraju zahvaljujem Kristini Vuković i Gordani Jurinić na stručnoj i tehničkoj pomoći pri izradi diplomskog rada.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Polimorfizmi gena *TLR4* u tumorigenezi sporadičnog karcinoma debelog crijeva**

Anamarija Salar

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Sporadični karcinom debelog crijeva je jedan od najčešćih zloćudnih tumora u svijetu. Receptor *TLR4* je ključni regulator koji pomaže u održavanju ravnoteže između mikrobioma i imunološkog sustava crijeva. Poremećena homeostaza uslijed promijenjene ekspresije *TLR4* bi mogla biti ključna značajka u patogenezi karcinoma debelog crijeva. Poznata su dva polimorfizma gena *TLR4* +896A/G i +1196C/T za koje je pokazana povezanost s nastankom tumora. Cilj ovog diplomskog rada je ispitati postoji li povezanost polimorfizama +896A/G i +1196C/T sa sklonošću za obolijevanje od sporadičnog karcinoma debelog crijeva te postoji li povezanost s preživljenjem oboljelih. Rezultati nisu pokazali povezanost ispitivanih polimorfizama *TLR4* s povećanim rizikom obolijevanja od sporadičnog karcinoma debelog crijeva niti s preživljenjem oboljelih. Učestalost varijantnih alela +896 G i +1196 T bila je statistički značajno veća kod zdravih ispitanika u odnosu na učestalost kod ispitanika oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Homozigotni nosioci varijantnog alela +896 G i +1196 T bili su statistički značajno zastupljeniji u populaciji zdravih ispitanika. Genotipovi polimorfizama +896A/G i +1196C/T gena *TLR4* su bili vezani na ispitivanoj populaciji te su se nasljeđivali u tri kombinacije genotipova (AA,CC; AG,CT i GG,TT).

(47 stranica, 13 slika, 5 tablica, 60 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *TLR4*, polimorfizmi gena, sporadični karcinom debelog crijeva

Voditelj: Dr. sc. Sanja Kapitanović, dr. med., zn. savjetnica u trajnom zvanju, IRB

Suvoditelj: Izv. prof. dr. sc. Inga Marijanović, PMF

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Inga Marijanović, PMF

Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić, PMF

Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner, PMF

Rad prihvaćen: 07.11.2018

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### ***TLR4* polymorphisms in sporadic colon cancer tumorigenesis**

Anamarija Salar

Roosveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Sporadic colon cancer is one of the most common malignant tumors in the world. TLR4 receptor is a key regulator that helps maintain balance between the microbial and immune system in the gut. Abnormal homeostasis in altered *TLR4* expression could be a key feature in colon cancer pathogenesis. *TLR4* polymorphisms +896A/G and +196C/T are known to be associated with tumorigenesis. The aim of this graduate thesis is to examine whether there is a correlation between polymorphisms +896A/G and +1196C/T and sporadic colon cancer susceptibility as well as with the patient's survival. Our results showed no correlation of *TLR4* polymorphisms with sporadic colon cancer susceptibility or with survival. The incidence of variant alleles +896 G and +1196 T was significantly higher in healthy controls compared to patient's with sporadic colon cancer. Homozygous carriers of variant alleles +896 G and +1196 T were statistically significantly more present in the population of healthy controls. *TLR4* polymorphisms +896A/G and +1196C/T cosegregate in our sample, and are inherited in three combinations of genotypes (AA,CC; AG,CT i GG,TT).

(47 pages, 13 figures, 5 tables, 60 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: *TLR4*, polymorphisms, sporadic colon cancer

Supervisor: Prof. Sanja Kapitanović, M.D., Ph.D., Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute

Cosupervisor: Inga Marijanović, Ph.D., Associate Prof., Faculty of Science

Reviewers: Inga Marijanović, Ph.D., Associate Prof., Faculty of Science

Martina Šeruga Musić, Ph.D., Associate Prof., Faculty of Science

Jasna Lajtner, Ph.D., Associate Prof., Faculty of Science

Thesis accepted: November 7<sup>th</sup> 2018

## POPIS KRATICA

|              |  |
|--------------|--|
| APC          | od engl. adenomatous polyposis coli, protein koji je regulator Wnt signalnog puta              |
| CAF          | od engl. tumor-promoting cancer-associated fibroblasts   |
| c-Myc        | od engl. v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog                                   |
| CRC          | od engl. colorectal cancer, karcinom debelog crijeva   |
| COX-2        | od engl. cyclooxygenase 2, ciklooksigenaza 2   |
| CTL          | od engl. cytotoxic T cells, citotoksične T-stanice   |
| EGF          | od engl. epidermal growth factor, epidermalni faktor rasta                                     |
| EGFR         | od engl. epidermal growth factor receptor, receptor epidermalnog faktora rasta                 |
| ERK          | od engl. extracellular-signal-regulated kinase   |
| FAP          | od engl. familial adenomatous polyposis, obiteljska adenomatozna polipoza                      |
| HNPCC        | od engl. hereditary non-polyposis colon cancer, nasljedni nepolipozni karcinom debelog crijeva |
| HSP          | od engl. heat-shock proteins   |
| IBD          | od engl. inflammatory bowel disease, upalna bolest crijeva                                     |
| IEC          | od engl. intestinal epithelial cells, stanice epitela sluznice crijeva                         |
| IFN          | od engl. type I interferons, interferon tipa I   |
| IFN- $\beta$ | od engl. interferon $\beta$  |
| IKK          | od engl. I $\kappa$ B kinase   |
| I $\kappa$ B | od engl. inhibitor of NF- $\kappa$ B, inhibitor NF- $\kappa$ B signalnog puta                  |
| IL           | interleukin  |
| IRAK         | od engl. IL-1 receptor-associated kinase   |
| IRF3         | od engl. interferon regulatory factor 3, interferon nadzorni transkripcijski faktor-3          |
| JNK          | od engl. c-Jun N-terminal Kinase   |
| KRAS         | od engl. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog  |
| LBP          | od engl. lipopolysaccharide-binding protein, lipopolisaharid-vezujući protein                  |
| LPS          | od engl. lipopolysaccharide, lipopolisaharid   |
| LRR          | od engl. leucine-rich repeats  |
| MAPK         | od engl. mitogen-associated protein kinase   |
| MDSC         | od engl. myeloid-derived suppressor cells, mijeloidne supresorske stanice                      |

|                  |   |
|------------------|---|
| MD-2             | od engl. myeloid differentiation protein-2, mijeloidni diferencijacijski protein-2  |
| MMR              | od engl. mismatch repair, popravak krivo sparenih baza  |
| MMTV             | od engl. mouse mammary tumor virus  |
| MyD88            | od engl. myeloid differentiation primary response gene 88   |
| NF- $\kappa$ B   | od engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells   |
| NK               | od engl. natural killer   |
| PAMP             | od engl. pathogen-associated molecular patterns, molekularni uzorak patogena  |
| PGE <sub>2</sub> | prostaglandin E2  |
| PRR              | od engl. pattern recognition receptor   |
| p53              | od engl. tumor protein p53, tumorski protein p53  |
| RIP1             | od engl. receptor interacting protein 1   |
| RON              | od engl. reactive nitrogen, reaktivni dušik   |
| ROS              | od engl. reactive oxygen species, reaktivni kisikovi radikali   |
| RSV              | od engl. respiratory syncytial virus  |
| SMAD4            | od engl. SMAD family member 4, član 4 SMAD obitelji<br>"small" worm phenotype (SMA) Mothers Against Decapentaplegic (MAD) |
| SNP              | od engl. single-nucleotide polymorphisms, polimorfizmi jedne baze   |
| TAB2             | od engl. TGF- $\beta$ -activated kinase   |
| TAK1             | od engl. factor- $\beta$ -activated protein kinase 1  |
| TAM              | od engl. tumor-associated macrophages, tumoru pridruženi makrofagi  |
| TBK1             | od engl. TANK binding kinase 1  |
| TGF- $\beta$     | od engl. transforming growth factor-beta  |
| T <sub>H</sub>   | od engl. T helper cells, pomoćničke T-stanice   |
| TIR              | od engl. Toll–interleukin 1 receptor  |
| TIRAP            | od engl. TIR domain-containing adaptor protein; drugi naziv mu je Mal, engl.<br>MyD88-adaptor-like                        |
| TLR              | od engl. toll-like receptors  |
| TNF              | od engl. tumor necrosis factor  |
| TRAF             | od engl. tumor necrosis factor receptor-associated factor   |
| TRAM             | od engl. TRIF-related adaptor molecule  |
| T <sub>reg</sub> | od engl. regulatory T cells, regulatorne T-stanice  |



TRIF od engl. TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$   
uPA od engl. urokinase plasminogen activator  
VEGF od engl. vascular endothelial growth factor

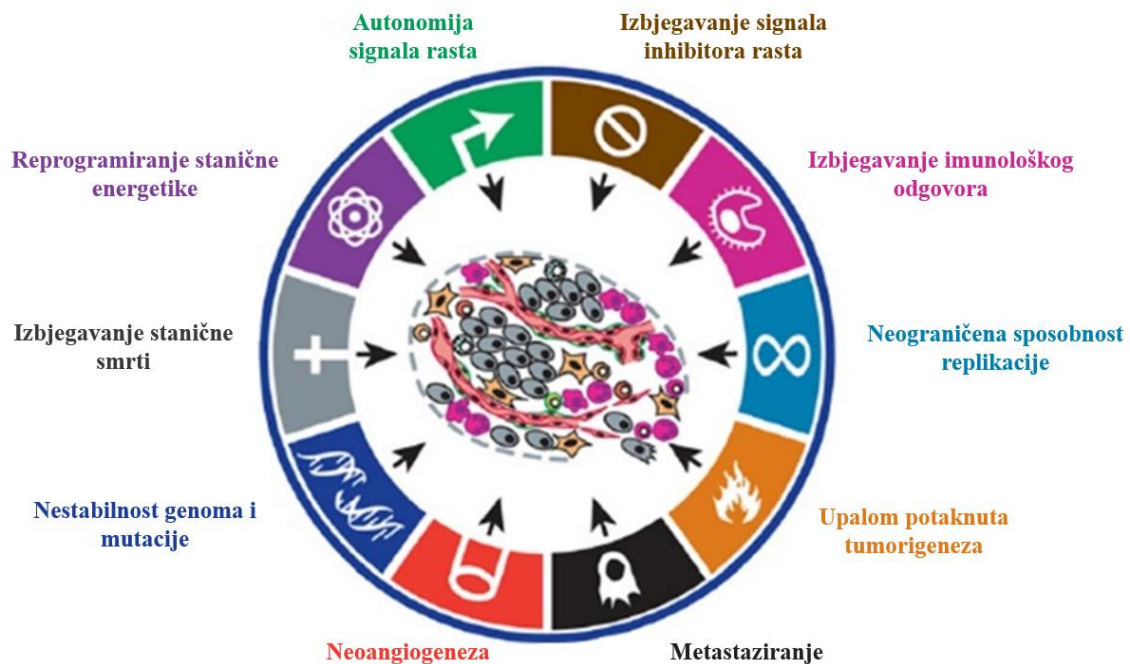
# Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| 1. Uvod.....   | 1  |
| 1.1. Karcinom debelog crijeva .....                                    | 2  |
| 1.1.1. Morfološka obilježja karcinoma debelog crijeva .....            | 2  |
| 1.1.2. Molekularna genetika sporadičnog karcinoma debelog crijeva..... | 4  |
| 1.2. Upala i tumorigeneza .....  | 6  |
| 1.3. Receptori TLR u tumorigenezi .....                                | 8  |
| 1.4. Struktura i funkcija receptora TLR.....                           | 9  |
| 1.5. Receptor TLR4 .....   | 10 |
| 1.5.1. Signalni put receptora TLR4.....                                | 11 |
| 1.5.2. Uloga upale posredovane receptorom TLR4 u karcinomu .....       | 13 |
| 1.5.3. Polimorfizmi receptora TLR4 .....                               | 15 |
| 1.6. Cilj istraživanja.....  | 17 |
| 2. Materijali i metode.....  | 18 |
| 2.1. Uzorci.....   | 18 |
| 2.2. Izolacija DNA iz krvi.....  | 18 |
| 2.3. Izolacija DNA iz tkiva .....                                      | 19 |
| 2.4. Određivanje koncentracije DNA .....                               | 20 |
| 2.5. Metoda <i>TaqMan</i> ® <i>real-time</i> PCR-SNP .....             | 20 |
| 2.6. Statistička obrada podataka .....                                 | 22 |
| 2.6.1. Hardy-Weinbergov zakon.....                                     | 22 |
| 2.6.2. $\chi^2$ test .....   | 23 |
| 2.6.3. Kaplan-Meier metoda .....                                       | 23 |
| 2.6.4. Omjer izgleda .....   | 24 |
| 3. Rezultati .....   | 25 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.1.   | Analiza polimorfizama gena <i>TLR4</i> .....   | 25 |
| 3.2.   | Povezanost polimorfizama +896A/G i +1196C/T gena <i>TLR4</i> sa sklonošću obolijevanju od sporadičnog karcinoma debelog crijeva..... | 26 |
| 3.3.   | Analiza preživljenja .....   | 29 |
| 3.3.1. | Povezanost dobi s preživljenjem oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva .....   | 29 |
| 3.3.2. | Povezanost spola s preživljenjem oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva .....  | 30 |
| 3.3.3. | Povezanost smještaja tumora s preživljenjem oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva .....                                 | 31 |
| 3.3.4. | Povezanost preživljenja oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva sa stadijem tumora po Dukes`-u.....                       | 32 |
| 3.3.5. | Povezanost polimorfizma +896A/G gena <i>TLR4</i> s preživljenjem oboljelih od sporadičnog karcinoma crijeva.....                     | 33 |
| 3.3.6. | Usporedba analize preživljenja i kliničkih osobina oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva .....                          | 34 |
| 4.     | Rasprava .....   | 35 |
| 5.     | Zaključak.....   | 39 |
| 6.     | Literatura .....   | 40 |

# 1. Uvod

Rak predstavlja skupinu bolesti koju karakterizira nekontroliran rast i dioba stanica te invazija i širenje stanica raka u okolna tkiva i udaljene organe. Glavne karakteristike raka su autonomija signala rasta, izbjegavanje signala inhibitora rasta, izbjegavanje imunološkog odgovora, neograničena sposobnost replikacije, upalom potaknuta tumorigeneza, metastaziranje, nestabilnost genoma, izbjegavanje stanične smrti, reprogramiranje stanične energetike i neoangiogeneza tj. stvaranje novih krvnih žila (Slika 1.) (Hanahan i Weinberg 2011). Izraz koji koristimo za svaku promijenjenu proliferaciju stanica (dobročudnu ili zloćudnu) u tijelu je tumor (Cooper i Hausman 2004). Približno 85% zloćudnih tumora nastaje u epitelnim stanicama i klasificiraju se kao karcinomi (Pecorino 2012). Najčešći tipovi karcinoma u čovjeka su karcinom prostate, dojke, pluća i debelog crijeva (Cooper i Hausman 2004).



**Slika 1.** Glavne karakteristike raka (prilagođeno na temelju Hanahan i Weinberg 2011).

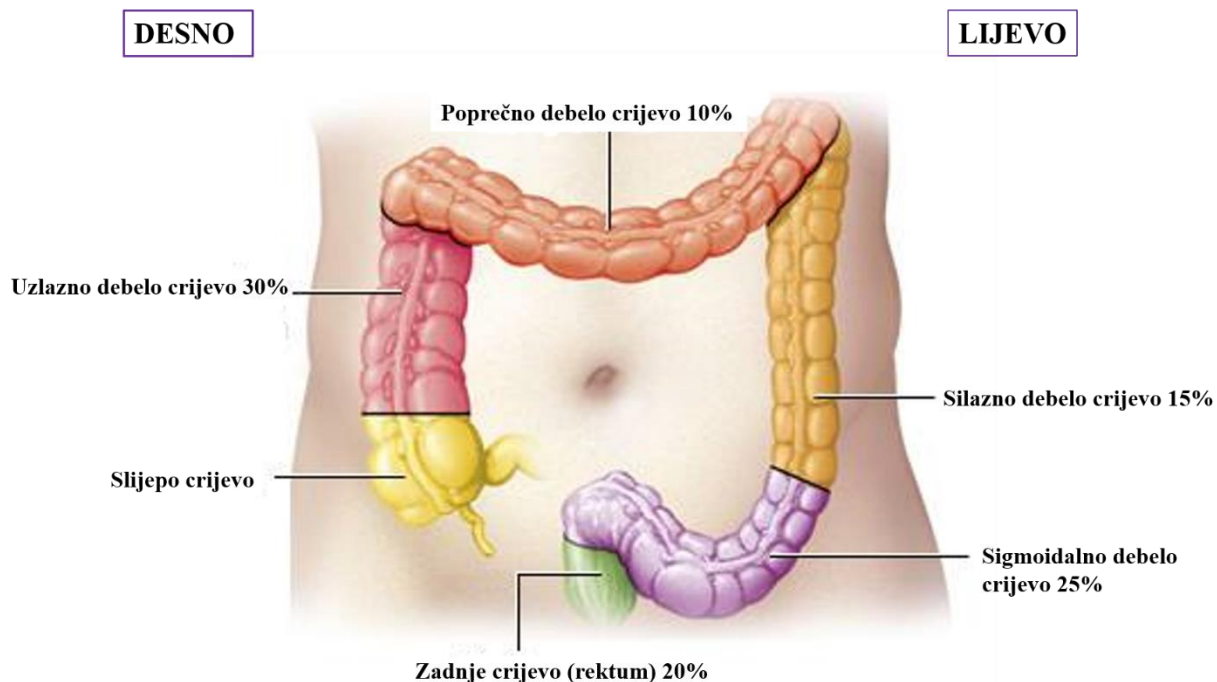
## 1.1. Karcinom debelog crijeva

Karcinom debelog crijeva (CRC od engl. *colorectal cancer*) jedan je od najčešćih zloćudnih tumora od kojeg godišnje u svijetu oboli više od 1.2 milijuna ljudi te se zabilježi više od 600 000 smrtnih slučajeva. Javlja se podjednakom učestalošću u muškaraca i žena, a pojavnost sporadičnog karcinoma debelog crijeva raste sa starošću pacijenata. Srednja dob dijagnosticiranja je oko 70 godina u razvijenim zemljama (Brenner i sur. 2014). Petogodišnja stopa preživljenja za oboljele od karcinoma debelog crijeva iznosi 60-95% u početnim stadijima te se drastično smanjuje na 35% u stadijima kada su zahvaćeni regionalni limfni čvorovi. Zbog kasnog uočavanja simptoma i kasnog dijagnosticiranja, tumori debelog crijeva se najčešće otkrivaju u kasnim stadijima bolesti što značajno smanjuje mogućnosti za primjenu djelotvornog liječenja. Najviše stope pojavnosti oboljelih od karcinoma debelog crijeva zabilježene su u Australiji, Novom Zelandu, zapadnoj Europi i sjevernoj Americi dok su najniže zabilježene u Aziji i Africi. Uočeno je da stope pojavnosti karcinoma debelog crijeva značajno rastu u zemljama koje su bile poznate po niskom riziku za pojavu ovog karcinoma, primjerice u Španjolskoj te zemljama istočne Europe i Aziji. Pretpostavlja se da je razlog tomu promjena životnog stila i prehrane, odnosno smanjena fizička aktivnost, povećana konzumacija alkohola i pušenje, povećana konzumacija crvenog mesa, šećera i životinjskih masti te smanjena konzumacija vlakana u prehrani (Mogoantă i sur. 2014).

### 1.1.1. Morfološka obilježja karcinoma debelog crijeva

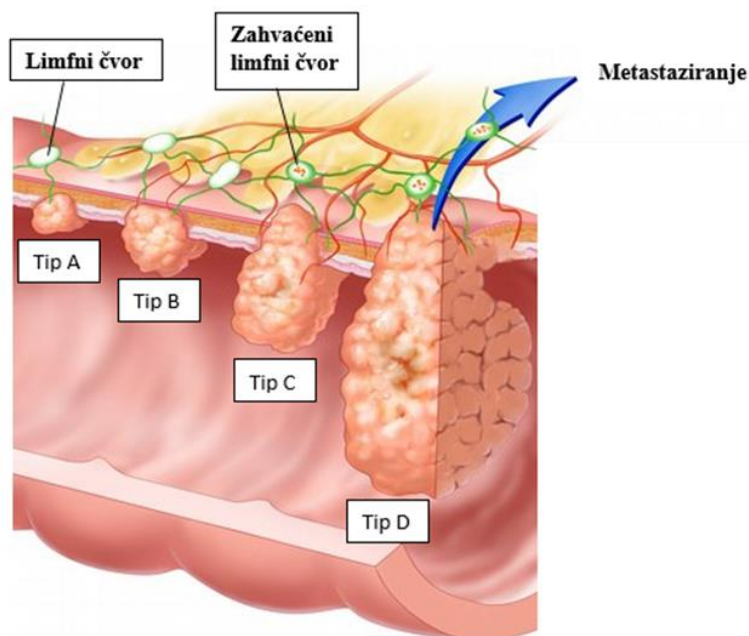
Najveći broj sporadičnih karcinoma debelog crijeva nastaje iz adenoma, dobroćudnih tumora koji nastaju uslijed proliferacije stanica epitela sluznice debelog crijeva i predstavljaju najraniji stadij u nastanku ovog zloćudnog tumora. Zloćudnom preobrazbom stanica adenoma nastaje zloćudni tumor koji daljnjom proliferacijom prelazi u lokalno invazivni, odnosno metastatski tumor koji se širi u susjedne trbušne organe (primjerice mokraćni mjehur i tanko crijevo), regionalne limfne čvorove i udaljene organe. Karcinomi debelog crijeva metastaziraju putem krvnih žila (hematogeno npr. u jetru) odnosno limfnih žila (limfogeno u regionalne i udaljene limfne čvorove) (Cooper i Hausman 2004).

Desna strana debelog crijeva uključuje proksimalne 2/3 poprečnog crijeva te uzlazno i slijepo crijevo. Lijeva strana debelog crijeva uključuje distalnu trećinu poprečnog crijeva te silazno, sigmoidalno i zadnje crijevo (Baek 2017). Opsežna analiza kliničkih studija je pokazala da su u slučaju smještaja karcinoma s desne strane crijeva pacijenti imali lošije preživljenje u odnosu na pacijente kojima je tumor bio smješten na lijevoj strani crijeva (Slika 2.) (Petrelli 2016).



**Slika 2.** Učestalost pojave karcinoma debelog crijeva ovisno o smještaju (prilagođeno prema <https://newsnetwork.mayoclinic.org>).

Karcinomi debelog crijeva klasificiraju se prema stadijima po Dukes'-u za koje je dokazano da su dobar prognostički pokazatelj za oboljele od ovog zloćudnog tumora. Klasifikacija po Dukes' – u obuhvaća sljedeće stadije: Dukes' A karcinom ograničen na stijenku debelog crijeva bez širenja u regionalne limfne čvorove ili susjedna tkiva, Dukes' B tumor se širi na okolna tkiva ali nisu zahvaćeni regionalni limfni čvorovi, Dukes' C zahvaćeni su i regionalni limfni čvorovi. Stadij Dukes' D podrazumijeva prisustvo metastaza u udaljenim organima (Slika 3.) (Astler i Coller 1954).



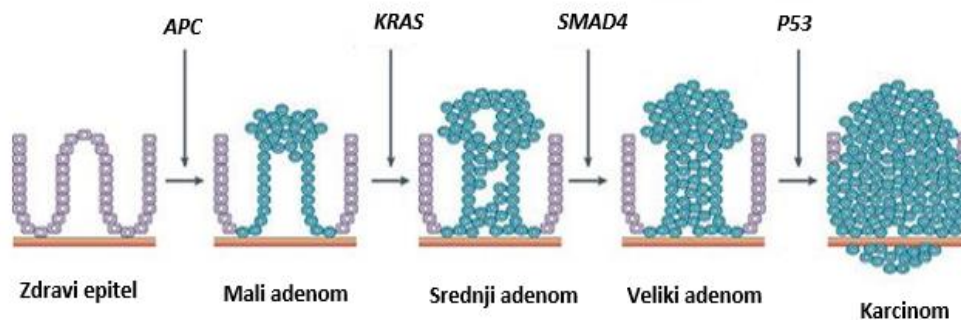
**Slika 3.** Klasifikacija karcinoma debelog crijeva po Dukes'-u (prilagođeno prema <http://www.advmodoncolres.com>).

### 1.1.2. Molekularna genetika sporadičnog karcinoma debelog crijeva

Najveći broj karcinoma debelog crijeva (75%) javlja se u sporadičnom obliku kao posljedica načina života te utjecaja čimbenika okoliša. Poznati čimbenici rizika za nastanak karcinoma debelog crijeva su mutageneza uzrokovana hranom, zagađenjem, određene komenzalne bakterije te kronična upala crijeva (Yesudhas i sur. 2014). Upalna bolest crijeva (IBD od engl. *inflammatory bowel disease*) je poligenski autoimuni poremećaj čiji su glavni klinički fenotipovi Chronova bolest i ulcerozni kolitis. Pacijenti koji boluju od ulceroznog kolitisa ili Chronove bolesti imaju povećani rizik za razvoj karcinoma debelog crijeva (Sipos i sur. 2014). Oko 25% karcinoma debelog crijeva javlja se kao posljedica nasljednih sindroma koji nose povećani rizik za obolijevanje od ovog zloćudnog tumora, obiteljske adenomatozne polipoze (FAP od engl. *familial adenomatous polyposis*) i nasljednog nepolipoznog karcinoma debelog crijeva (HNPCC od engl. *hereditary non-polyposis colon cancer* ili sindroma Lynch) (Migliore i sur. 2011).

Karcinom debelog crijeva jedan je od prvih i najbolje molekularno okarakteriziranih solidnih tumora (Dienstmann 2017). Molekularno-genetička sekvenca nastanka karcinoma debelog crijeva po prvi je puta opisana 1990. godine (Volgenstein i Fearon) i poznata je kao adenom-karcinom sekvenca. Razvoj karcinoma debelog crijeva je dugogodišnji stupnjeviti proces koji nastaje uslijed nakupljanja mutacija u onkogenima (*KRAS*), tumor supresorskim genima (*APC* od engl. *Adenomatous Polyposis Coli*, *p53*, *SMAD4*) i genima za popravak krivo sparenih baza u DNA (MMR od engl. *MisMatch Repair*) (Dienstmann 2017). Mutacija gena *APC* je dokazana u većini sporadičnih karcinoma debelog crijeva. Istraživanja su pokazala da je inaktivacija gena *APC* jedan od najranijih, a moguće i inicijalni događaj u značajnom broju karcinoma debelog crijeva uključujući i sporadični karcinom debelog crijeva (Gryfe i sur. 1997). Mutacija se nalazi u adenomima ili karcinomima ali ne i u okolnom tkivu što znači da je somatskog porijekla. Stoga, mutacija gena *APC* predstavlja rani događaj koji je nastao u jednoj stanici iz koje se zatim razvio adenom procesom klonalne ekspanzije. Sljedeći rani događaj u tumorigenezi karcinoma debelog crijeva je mutacija gena *KRAS* koja je prisutna samo u 20% adenoma s mutacijama gena *APC* što potvrđuje pretpostavku da mutacija gena *APC* prethodi mutaciji gena *KRAS* (Carethers i Jung 2015). Mutirani oblik proteina *KRAS* kontinuirano stimulira nizvodni prijenos signala u proliferativnim signalnim putevima (Gryfe i sur. 1997). Također se pretpostavlja da bi aktivirani protein *KRAS* mogao imati značajnu ulogu u transformaciji adenoma u karcinome (Al-Sohaily i sur. 2012). U većine karcinoma debeloga crijeva (70%) dokazan je gubitak heterozigotnosti na kromosomu 18 te zbog toga dolazi do inaktivacije tumor supresor gena *SMAD4*. Delecija gena *SMAD4* sudjeluje u progresiji adenoma te se pretpostavlja da je povezana s lošom prognozom u oboljelih (Pritchard i Gardy 2011). Mutacija tumor supresor gena *p53* predstavlja kasni događaj u tumorigenezi debelog crijeva (Al-Sohaily i sur. 2012). Navedena mutacija je najznačajnija u zloćudnoj transformaciji. Istraživanja su pokazala da se mutacija jednog alela gena *p53* te gubitak heterozigotnosti drugog alela podudara sa zloćudnom transformacijom adenoma u adenokarcinom. Mutirani protein *p53* omogućava klonalnu ekspanziju stanica unutar adenoma koje sada imaju zloćudni potencijal (Slika 4.) (Carathers i Jung 2015).





**Slika 4.** Tumorigeneza karcinoma debelog crijeva, genetski put razvoja karcinoma debelog crijeva iz normalne sluznice do invazivnog karcinoma (prilagođeno na temelju Raskov 2017).

Najnovija istraživanja ukazuju na povezanost kronične upale i nastanak karcinoma. Upala je u nekim slučajevima vidljiva u najranijim fazama napredovanja tumora te je dokazano da ima sposobnost poticanja napredovanja ranih stadija tumora u zloćudne invazivne karcinome. Upalne stanice u mikrookolišu tumora oslobađaju molekule (citokine i kemokine) koje potiču stanice zloćudnog tumora na proliferaciju, te tako pojačavaju invazivnost i metastatski potencijal zloćudnog tumora (Hanahan i Weinberg 2011).

## 1.2. Upala i tumorigeneza

Pokazano je da upala doprinosi razvoju glavnih karakteristika raka na temelju brojnih primjera povezanosti kronične upale i nastanka karcinoma poput: upalna bolest crijeva i karcinom debelog crijeva, kronični pankreatitis i rak gušterače, hepatitis i hepatocelularni karcinom, upala epitela jajnika i karcinom jajnika, kronična astma i karcinom bronha, kronična upala žučnog mjehura i karcinom žučnog mjehura, gastritis uzrokovan *Helicobacter pylori* i karcinom želuca, Epstein-Barr virus i Burkittov limfom, HPV i genitalni karcinomi (Korneev i sur. 2016).

Mikrookoliš tumora uključuje razne stanice urođene imunosti (makrofagi, neutrofil, mastocite, MDSC (od engl. *myeloid-derived suppressor cells*), dendritičke stanice i NK-stanice (od engl. *natural killer*)) i adaptivne (limfociti B i T) imunosti, te stanice karcinoma i strome (sastoji se od fibroblasta, endotelnih stanica, pericita i mezenhimalnih stanica). Navedene stanice

tumorskog mikrookoliša međusobno komuniciraju putem direktnih interakcija ili putem produkcije kemokina i citokina. Imunološke stanice u mikrookolišu tumora postaju immunosupresivne ili tumor stimulirajuće, ovisno o ispoljavanju imunoloških medijatora i modulatora te gustoći i aktivacijskom stanju različitih tipova stanica u tumorskom mikrookolišu. Najčešća vrsta imunoloških stanica u tumorskom mikrookolišu su tumoru pridruženi makrofagi (TAM od engl. *tumor-associated macrophages*) i T-stanice. Stanice TAM potiču rast tumora te su neophodni u neoangiogenezi, invaziji i metastaziranju. Velika koncentracija stanica TAM u tumorskom mikrookolišu je uglavnom povezana s lošijom prognozom oboljelih. Povećani broj T-stanica konkretno citotoksičnih T-stanica (CTL od engl. *cytotoxic T cells*) i T<sub>H</sub>1-stanica (od engl. *T helper 1 cells*) je povezan s boljim preživljenjem oboljelih u slučaju invazivnog karcinoma debelog crijeva. Novija istraživanja su pokazala da proinflammatorna infiltracija strome regulatornim T-stanicama (T<sub>reg</sub>), T<sub>H</sub>17-stanicama potiče tumorigenezu te je u ovom slučaju lošije preživljenje oboljelih. Jedine stanice koje do sada nisu pokazale tumor stimulirajuću ulogu su NK-stanice (Grivennikov i sur. 2010, Dienstmann i sur.2017).

Kronična upala može sudjelovati u svim fazama tumorigeneze uključujući nastanak i napredovanje tumora, invaziju, metastaziranje te izbjegavanje imunološkog odgovora. Stanični stres koji nastaje kao posljedica upale može uzrokovati oštećenje DNA ili gensku nestabilnost. Kronična upala također može izazvati mutacije gena i potaknuti epigenetičke mehanizme koji pogoduju zloćudnoj preobrazbi stanica (Sipos i sur. 2014). U uvjetima kronične upale je naročito izražen oksidativni stres, uglavnom zbog privlačenja neutrofila i makrofaga. Ove stanice se aktiviraju u tkivu zahvaćenom upalom gdje proizvode reaktivne kisikove radikale i reaktivni dušik (RON) koji u konačnici vode do oštećenja DNA (mutacije gena, nestabilnosti genoma i promijenjene metilacije). Moguće je da su RON-ovi u interakciji s genima uključenim u tumorigenezu karcinoma debelog crijeva (*p53*, DNA *MMR*, *NF-κB* (od engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)) i enzimom COX-2 (od engl. *cyclooxygenase 2*) (Cammarota i sur. 2010).

Tumorske stanice koje ispoljavaju receptore TLR (od engl. *Toll-like receptors*) mogu direktno ili indirektno doprinijeti tumorigenezi. Aktivacija signalnog puta TLR bi mogla poticati invaziju tumora, izbjegavanje apoptoze, kemorezistenciju, napredovanje tumorske bolesti i metastaziranje (Sipos i sur. 2014). Signalni put TLR/MyD88 neophodan je za razvoj karcinoma debelog crijeva uslijed upale uzrokovane mikrobiomom crijeva. Također, pokazano je da je

visoko ispoljavanje proteina TLR4 i MyD88 povezano s lošijom prognozom u oboljelih od karcinoma debelog crijeva (Li T.-T. i sur. 2014).

U slučajevima kronične upale, kada su zahvaćeni organi s velikom epitelnom površinom (npr. IBD), funkcija epitelne barijere ključna je za nastanak bolesti. Znamo da je crijevni epitel bogato nastanjen rezidentnom bakterijskom florom, stoga ne čudi bitna uloga urođenog imunološkog sustava u razlikovanju mikrobioma crijeva od štetnih bakterija kako bi se održala homeostaza. Kronični upalni odgovor crijevnog epitela je uglavnom uzrokovan promijenjenom imunološkom kontrolnom mrežom, te je u konačnici odgovoran za podložnost nastanku karcinoma debelog crijeva (Sipos i sur. 2014).

### 1.3. Receptori TLR u tumorigenezi

Receptori TLR osim prepoznavanja mikroba sudjeluju i u prepoznavanju unutarstaničnih promjena i podešavanju imunološkog odgovora, zbog čega su bitna komponenta u homeostazi imunološkog sustava. Promijenjena aktivacija receptora TLR mijenja normalne fiziološke procese te uzrokuje upalne bolesti, karcinome i autoimune bolesti. Pretpostavlja se da receptori TLR imaju važnu ulogu u razvoju karcinoma debelog crijeva i to uslijed promjena u mikrobiomu crijeva. Signaliziranje receptora TLR je prisutno prilikom upalnih odgovora u stanicama epitela sluznice crijeva (IEC od engl. *intestinal epithelial cells*). Upalni signali sudjeluju u kompleksnim interakcijama crijevnog mikrobioma i receptora TLR, te su neophodni za proliferaciju stanica epitela sluznice crijeva, imunološki odgovor, popravak i homeostazu (Yesudhas i sur. 2014).

Razvoj karcinoma ovisi o interakcijama između stanica tumora i zdravih stanica okolnog tkiva (Korneev i sur. 2016). Izuzev zdravih stanica, receptori TLR mogu biti ispoljeni i na tumorskim stanicama (Tartey i Takeuchi 2017). Potencijalno, tumor-stimulirajuću ulogu pokazuju receptori TLR na tumorskim stanicama i stanicama tumorskog mikrookoliša koji mogu prenositi proinflamatorne, anti-apoptotske ili proliferativne signale. Značajni tumor-stimulirajući učinak receptora TLR je dugotrajna aktivacija nizvodnog signalnog puta transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B (Sipos i sur. 2014). Aktivacija signalnog puta NF- $\kappa$ B u stanicama koje potiču nastanak karcinoma debelog crijeva može održati daljnji rast i napredovanje tumora preko produljene aktivacije signalnih puteva u mehanizmima regeneracije tkiva i upale (samoobnavljanje pluripotentnih tumorskih stanica) (Li T.-T. i sur. 2014). Također, aktivacijom receptora TLR koji

preko signalnog puta NF- $\kappa$ B povećava količinu otpuštenih proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6) stvara se mikrokoliš tumora koji potiče upalu te aktivaciju i širenje mijeloidnih supresorskih stanica (Sipos i sur. 2014, Korneev i sur. 2016). Signalni put receptora TLR je uključen i u inhibiciju apoptoze preko transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B. Smatra se da signalni put NF- $\kappa$ B predstavlja važan anti-apoptotski put zbog kontrole ekspresije anti-apoptotskih gena, te zbog ograničavanja aktivacije pro-apoptotskih puteva (Sipos i sur. 2014).

## 1.4. Struktura i funkcija receptora TLR

Receptori TLR su evolucijski konzervirani proteini prisutni u kralješnjacima i beskralješnjacima te spadaju u obitelj receptora PRR ( od engl. *pattern recognition receptor*) (Vaure i Liu 2014). U čovjeka je poznato 10 različitih receptora TLR (Kutkhin 2010). Urođeni imunološki sustav je uglavnom reguliran i aktiviran pomoću receptora TLR (od engl. *toll-like receptors*) koji se nalaze na membranama stanica imunološkog sustava (npr. neutrofil, dendritičke stanice i makrofagi), te na stanicama kože, genitourinarnog i gastrointestinalnog trakta (Semlali i sur. 2016). Smještaj receptora TLR je ili na staničnoj površini (TLR1,2,4,5,6) ili u endosomima (TLR3,7,8,9) (Kawai i Akira 2006).

Receptori TLR su transmembranski glikoproteini tipa 1 koji su građeni od izvanstanične domene bogate leucinom i transmembranske domene (jedna transmembranska zavojnica), te unutarstanične Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domene. Izvanstanična domena prepoznaje molekularni uzorak patogena (PAMP, od engl. *pathogen-associated molecular patterns*) koji može biti lipid, lipoprotein, protein ili nukleinska kiselina porijeklom od širokog spektra mikroba uključujući bakterije, viruse, parazite i gljive. Unutarstanična domena TIR potrebna je za nizvodni prijenos signala (Kawai i Akira 2010). Unutarstanične domene receptora TLR su homologne, no razlika u strukturi izvanstanične domene ključna je za razlike u načinu raspoznavanja mikroba od strane pojedinih receptora TLR (Kutkhin 2010). Proučavanjem signalnog puta TLR otkriven je adaptorski protein MyD88 (engl. *myeloid differentiation primary response gene 88*) koji sadrži domenu TIR. Otkrivene su i druge adaptorske molekule s domenom TIR što dokazuje da pojedini receptori TLR privlače određene adaptorske molekule što u konačnici rezultira specifičnim imunološkim odgovorom (Kawai i Akira 2010).

Aktivirani receptori TLR potiču ispoljavanje proinflamatornih citokina i sazrijevanje antigen prezentirajućih stanica urođenog imunološkog odgovora (Lu i sur. 2008). Uslijed

prepoznavanja liganda, receptori TLR dimeriziraju i pokreću citoplazmatske signalne puteve koji mogu biti posredovani proteinom MyD88 ili proteinom TRIF (TRIF od engl. *TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$* ). Signaliziranje posredovano proteinom MyD88 potiče translokaciju i trans-aktivaciju transkripcijskih faktora NF- $\kappa$ B i IRF3 (od engl. *interferon regulatory factor 3*), te u konačnici aktivaciju raznih gena za upalne citokine. Signalni put posredovan adaptorskim proteinima TRIF ili TRAM (od engl. *TRIF-related adaptor molecule*; ograničen samo na TLR4 signalni put) stimulira ekspresiju gena *IFN- $\beta$*  (od engl. *interferon  $\beta$* ) i sazrijevanje dendritičkih stanica (Oblak i Jerala 2011, Semlali i sur. 2016).

## 1.5. Receptor TLR4

U čovjeka se gen *TLR4* nalazi na kromosomu 9q32-q33 i sastoji se od 4 eksona (Zhang i sur. 2012). Protein TLR4 se sastoji od 839 aminokiselina (Li T.-T. i sur. 2014). Receptor TLR4 specifično prepoznaje bakterijske lipopolisaharide (LPS od engl. *lipopolysaccharide*) i njegova aktivacija uglavnom vodi do sinteze pro-inflamatornih citokina i kemokina (Vaure i Liu 2014). Dodatni ligandi receptora TLR4 su protein F (od engl. *fusion*) virusa RSV (od engl. *respiratory syncytial virus*) i protein ovojnice virusa MMTV (od engl. *mouse mammary tumor virus*). Postoje i endogeni ligandi koji mogu direktno ili indirektno aktivirati receptor TLR4, primjerice proteini HSP (od engl. *heat-shock proteins*), hijaluronska kiselina i  $\beta$ -defensin 2 (Lu i sur. 2008). Stoga imunološki odgovor posredovan receptorom TLR može biti aktiviran i u odsutnosti stranih mikroba (Kutikhin 2010).

Receptor TLR4 se prirodno ispoljava na stanicama imunološkog sustava, te epitelnim stanicama i stanicama strome (Korneev i sur. 2016). Naročito visoko ispoljavanje proteina TLR4 uočeno je u stanicama epitela sluznice crijeva, makrofagima i dendritičkim stanicama sluznice oboljelih od upalnih bolesti crijeva (Kutkhin 2010). Ispoljavanje proteina TLR4 može biti dokazano na mnogim tumorskim stanicama i staničnim linijama (npr. humane stanice karcinoma pluća (linije A549 iH460), humane cervikalne skvamozne epitelne stanice i stanice karcinoma debelog crijeva). Protein TLR4 može biti prisutan i na vanjskoj membrani i u endosomima, te može signalizirati putem nizvodnih proteina MyD88 ili TRIF. Tako receptor TLR4 aktivira ciljne gene poput onih koji kodiraju za citokin TNF i ostale proinflamatorne citokine (Korneev i sur. 2016).

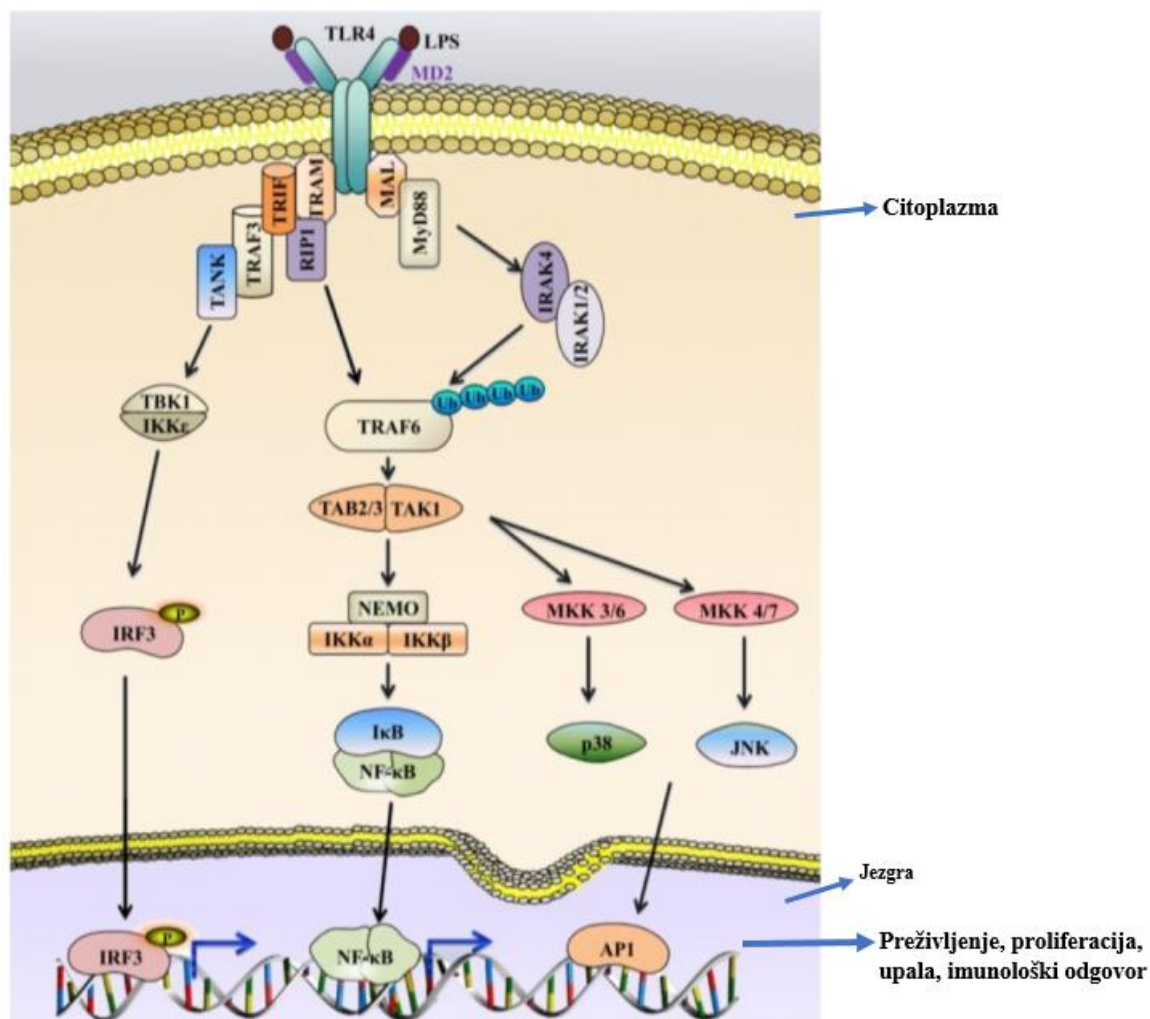
### 1.5.1. Signalni put receptora TLR4

Međudjelovanje receptora TLR4 s lipopolisaharidom je proces koji se sastoji od nekoliko koraka. Topivi lipopolisaharid-vezujući protein (LBP od engl. *lipopolysaccharide-binding protein*) direktno veže lipopolisaharid te olakšava povezivanje lipopolisaharida i proteina CD14. Protein CD14 katalizira vezanje lipopolisaharida i mijeloidnog diferencijacijskog proteina-2 (MD-2 od engl. *myeloid differentiation protein-2*). Nakon prijenosa lipopolisaharida na protein MD-2 novonastali kompleks se direktno veže na receptor TLR4 te nastaje novi kompleks LPS/MD-2/TLR4 (Kutikhin i 2010, Lu i sur. 2008). Istraživanja strukture kompleksa LPS/MD-2/TLR4 pokazala su da pet od šest lipidnih lanaca lipopolisaharida veže hidrofobni džep proteina MD-2, a preostali lipidni lanac veže receptor TLR4. U konačnici, receptorski multimer se sastoji od dvije kopije kompleksa LPS/MD-2/TLR4 (Kawai i Akira 2010). Posljedičnom dimerizacijom citoplazmatske domene TIR receptora TLR4 započinje prijenos signala (Kutikhin 2010). Razlikujemo dva signalna puta kojima receptor TLR4 potiče unutarstanični prijenos signala posredovan proteinima MyD88 ili TRIF.

Prijenos signala putem proteina MyD88 sudjeluje u ranoj aktivaciji transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B, te posljedično dolazi do sinteze upalnih citokina (npr. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12). Uslijed dimerizacije citoplazmatske domene receptora TLR4, adaptorski protein TIRAP (od engl. *TIR domain-containing adaptor protein*; drugi naziv mu je Mal, engl. *MyD88-adaptor-like*) veže protein MyD88 što dovodi do aktivacije kinaza IRAK (od engl. *IL-1 receptor-associated kinase*) (Lu i sur. 2008). Kinaza IRAK4 fosforilira kinazu IRAK1 na ključnim serinskim i treoninskim ostacima, te tako omogućuje kinazi IRAK1 da aktivira protein TRAF6 (od engl. *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*). Protein TRAF6 aktivira kinazu TAK1 (od engl. *factor- $\beta$ -activated protein kinase 1*) koji spada u mitogen aktivirane protein kinaze (MAP-kinaze) Potom kinaza TAK1 stvara kompleks s kinazom TAB2 (od engl. *TGF- $\beta$ -activated kinase 2*) i TAB3, te fosforilira kinazu IKK koji zatim fosforilira protein I $\kappa$ B za proteosomalnu degradaciju, čime se oslobađa transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B. Transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B nakon toga može translocirati u jezgru gdje će potaknuti transkripciju proinflamatornih gena i sintezu odgovarajućih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12). Kinaza TAK1 također može sudjelovati u aktivaciji kinaza MKK3 (od engl. *MAP kinase kinase 3*) i

MKK6 te time aktivirati signalni put koji fosforilira kinazu JNK (od engl. *c-Jun N-terminal Kinase*) i protein p38 (Slika 5.) (Yesidhuas i sur. 2014, Kutikhin 2010 ).

Signaliziranjem posredovanim proteinom TRIF aktivira se transkripcijski faktor IRF3 koji pospješuje ekspresiju gena za interferon tipa I (IFN, od engl. *type I interferons*) i IFN-inducibilnih gena. Signalni put posredovan proteinom TRIF također aktivira sintezu i sekreciju citokina TNF- $\alpha$ . Vezanje izlučenog citokina TNF- $\alpha$  na njegov receptor vodi do kasne aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B (Vaure i Liu 2014). Ovaj signalni put je posredovan preko proteina TRAM i TRIF. Protein TRIF privlači protein TRAF3 te kinaze TBK1 (od engl. *TANK binding kinase 1*) i IKK. Na ovaj način se u konačnici aktivira transkripcijski faktor IRF3 koji se translocira u jezgru. Transkripcijski faktor IRF3 potom potiče transkripciju IFN-inducibilnih gena i gena *IFN- $\beta$* . Također, signalni put posredovan proteinom TRIF može preko proteina RIP1 prenijeti signal proteinima TRAF6, TAK1 i IKK koji sudjeluju u kasnoj aktivaciji transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B i MAP-kinaza (Slika 5.) (Yesudhas i sur. 2014, Kutikhin 2010 ).



**Slika 5.** Shematski prikaz aktivacije receptora TLR4 vezanjem lipopolisaharida. Prikazana su dva signalna puta kojima receptor TLR4 potiče unutarstanični prijenos signala: signalni put posredovan kompleksom MyD88/Mal i signalni put posredovan kompleksom TRIF/TRAM. Oba puta aktiviraju transkripcijski faktor NF-κB, a signalni put posredovan proteinom TRIF aktivira i transkripcijski faktor IRF3 za antivirusni odgovor. (prilagođeno prema <https://openi.nlm.nih.gov>).

### 1.5.2. Uloga upale posredovane receptorom TLR4 u karcinomu

Potencijalno, receptor TLR4 može aktivirati signalne puteve MAPK i NF-κB što ukazuje na moguću izravnu ulogu autonomnog staničnog signala receptora TLR4 u regulaciji karcinogeneze, posebice kroz povećanu proliferaciju tumorskih stanica, inhibiciju apoptoze i



poticanje metastaziranja (Korneev i sur. 2016). Receptor TLR4 je eksprimiran i funkcionalno aktivan na stanicama karcinoma debelog crijeva. Poticanjem sinteze imunosupresivnih faktora i inhibiranjem apoptoze omogućava bijeg stanica karcinoma od imunološkog sustava. Pretpostavlja se da je povećano ispoljavanje proteina TLR4 i IL-6 karakteristično za karcinome debelog crijeva te da je povezano s lošom prognozom u oboljelih (Li T.-T. i sur. 2014). Također je utvrđena tumor stimulirajuća uloga receptora TLR4 u slučaju oboljelih od upalnih bolesti crijeva (Sipos i sur. 2014).

Jedinstven i poprilično stabilan mikrobiom crijeva u simbiotskom je suživotu s domaćinom. U zdravoj sluznici crijeva prisutna je imunološka tolerancija na antigene prisutne u mikrobiomu pojedinca dok poremećaj imunološke tolerancije dovodi do nastanka upalnih bolesti crijeva (Sipos i sur. 2014). Receptor TLR4 je ključni regulator koji pomaže u održavanju ravnoteže između mikrobioma i imunološkog sustava u crijevima gdje je prisutna neprekidna interakcija mikrobioma i stanica epitela crijeva. Poremećena homeostaza uslijed promijenjenog ispoljavanja proteina TLR4 mogla bi biti ključna značajka u patogenezi karcinoma debelog crijeva (Li X.-X. i sur. 2014). Pojačano ispoljavanje proteina TLR4 povezano s bakterijskom upalom u odnosu na normalno tkivo bi moglo biti jedan od uzroka nastanka karcinoma (Semlali i sur. 2016). Delecija gena *TLR4* značajno smanjuje upalu i veličinu tumora u miševa oboljelih od karcinoma uzrokovanog upalnim bolestima crijeva (Fukata i sur. 2009) Prekomjerno ispoljavanje i aktivacija receptora TLR4 povezana je s povećanom sklonošću nastanku karcinoma debelog crijeva uzrokovanog upalom u transgeničnih miševa (Fukata i sur. 2011). Stoga se pretpostavlja da receptor TLR4 ima važnu ulogu u razvoju upalom-potaknutog karcinoma debelog crijeva (Oblak i Jerala 2011). Razlog tomu je aktivirani receptor TLR4 koji pokreće povećanu sintezu prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>, od engl. *prostaglandin E2*), pojačava indukciju enzima COX-2 i utječe na signalni put epidermalnog faktora rasta (EGFR, od engl. *epidermal growth factor receptor*) (Yesudhas i sur. 2014). Enzim COX-2 i njegov enzimatski produkt PGE<sub>2</sub> su ispoljeni u većini karcinoma debelog crijeva te su vjerojatno uključeni i u sam razvoj karcinoma debelog crijeva (Oblak i Jerala 2011). Receptor TLR4 sudjeluje u metastaziranju karcinoma debelog crijeva preko fosforilacije protein kinaze B koja aktivira β1 integrin. Također, ispoljavanje proteina uPA (od engl. *urokinase plasminogen activator*) olakšava metastaziranje i rast ovog karcinoma. Komparativne imunohistokemijske analize zdrave sluznice i adenoma su pokazale povećano ispoljavanje proteina TLR4 u 20% adenoma. Mutacije gena *APC* predstavljaju predispoziciju za

nastanak karcinoma debelog crijeva. Nedavna istraživanja su ustanovila povezanost između signalnog puta TLR/MyD88 i mutacija gena *APC* (Wang i sur. 2010, Rakoff-Nahoum i Medzhitov 2007). Pretpostavlja se da signalni put MyD88 olakšava rast crijevnih polipa, a izostanak ovog signalnog puta ograničava rast polipa (Rakoff-Nahoum i Medzhitov 2007, Lee i sur. 2010). Također, protein MyD88 aktivira kinazu ERK kako bi se blokirala degradacija onkoproteina c-Myc. Stanice koje imaju neprekidnu aktivaciju proteina c-Myc su sklone neoplastičnim transformacijama (Gustafson i Weiss 2010). Signalni put TLR4/MyD88 doprinosi tumorigenezi karcinoma debelog crijeva ne samo u slučaju upale crijeva već i kod sporadičnog karcinoma debelog crijeva (Li T.-T. i sur. 2014). Bitno je naglasiti da sama kronična upala nije dovoljna za nastanak karcinoma debelog crijeva već je potreban i doprinos ostalih rizičnih čimbenika npr. mutageneza uzrokovana hranom, zagađenjem, određene komenzalne bakterije te kronična upala crijeva (Yesudhas i sur. 2014).

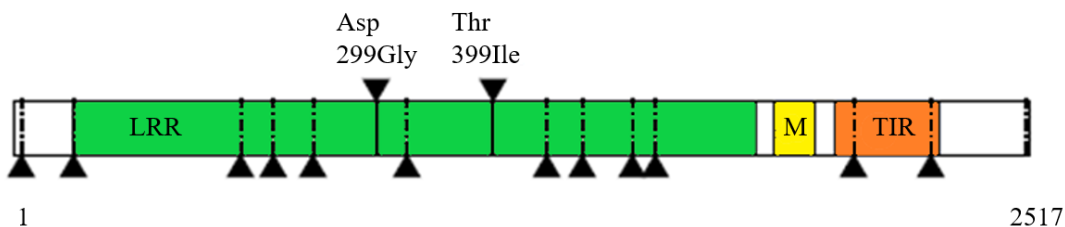
Signalni put receptora TLR4 u imunološkim i upalnim stanicama tumorskog mikrookoliša može voditi do proizvodnje proinflammatoryh citokina (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, itd.), imunosupresivnih citokina (IL-10, TGF- $\beta$  (engl. *transforming growth factor-beta*), itd.) i medijatora neoangiogeneze (VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*), EGF (engl. *epidermal growth factor*), TGF- $\beta$ , itd.). Ove aktivnosti mogu rezultirati polarizacijom tumor-pridruženih makrofaga, diferencijacijom fibroblasta u pro-tumorigene pridružene fibroblaste (CAF od engl. *tumor-promoting cancer-associated fibroblasts*), diferencijacijom dendritičkih stanica u tumor-pridružene dendritičke stanice i aktivacijom pro-tumorigenih funkcija nezrelih mijeloidnih stanica koje potom postaju mijeloidne supresorske stanice. Signalni put receptora TLR je povezan s nakupljanjem i funkcijom MDSC na mjestu tumora, dok mezenhimalnim stanicama strome (od engl. *mesenchymal stromal cells*) omogućuje da se suprotstave anti-tumorskoj imunosti posredovanoj NK-stanicama (Korneev i sur. 2016).

### 1.5.3. Polimorfizmi receptora TLR4

Polimorfizmi jednog nukleotida (SNP od engl. *single-nucleotide polymorphisms*) predstavljaju najjednostavniji tip DNA polimorfizama. SNP-ovi su specifična mjesta u genomu gdje se javljaju razlike u pojedinim nukleotidima među nesrodnim jedinkama iste vrste (Hartwell i sur. 2011). Prirodno se većina SNP-ova nalazi u nekodirajućoj sekvenci (El-Omar i sur 2008).

Ako se SNP nalazi u kodirajućoj sekvenci DNA može dovesti do promjena u slijedu aminokiselina proteina te imati učinak na sam fenotip (Hartwell i sur. 2011). Međutim, SNP-ovi koji se nalaze u nekodirajućoj sekvenci većinom ne utječu na promjene u slijedu aminokiselina, te ne uzrokuju funkcionalne posljedice (El-Omar i sur. 2008).

Poznata su 2 SNP-a gena *TLR4*: Asp299Gly (rs4986790) i Thr399Ile (rs4986791) za koje je pokazana povezanost sa sklonošću za nastanak karcinoma želuca i sporadičnog karcinoma debelog crijeva (Garza Gonzales i sur. 2007, Li X.-X. i sur. 2014). Oba SNP-a se nalaze u kodirajućoj sekvenci za izvanstaničnu domenu receptora TLR4 (Slika 6.) (Yesudhas i sur. 2014). Supstitucija asparginske kiseline glicinom na poziciji 299 je posljedica tranzicije adenin-gvanin na poziciji +896 nizvodno od start kodona cDNA (TLR4\_896A/G; divlji tip je AA), a supstitucija treonina izoleucinom je posljedica tranzicije citozin-timin na poziciji +1196 nizvodno od start kodona cDNA (TLR4\_1196C/T; divlji tip je CC) (Kutikhin 2010). SNP-ovi mijenjaju normalnu strukturu izvanstanične domene receptora TLR4, te se smatra da uslijed promjena dolazi do otežanog vezanja liganda i prepoznavanja patogena (El-Omar i sur. 2008). Promjenom strukture izvanstanične domene dolazi i do promjena u signalnom putu receptora TLR4. Promjene u signalnom putu mogu dovesti do promjene u ravnoteži između pro- i anti-inflamatornih citokina te stvoriti pro-inflamatorni okoliš koji potiče razvoj i rast tumora (Li X.-X. i sur. 2014).



**Slika 6.** Polimorfizmi gena *TLR4*. Na slici je prikazana kodirajuća sekvencija gena *TLR4*. Polimorfizmi SNP čija je frekvencija pojavnosti veća od 2% su prikazani punim linijama, a oni kojima je frekvencija manja od 2% isprekidanim linijama. ■ LRR (od engl. *leucine-rich repeats*) označava leucinom bogatu izvanstaničnu domenu, ■ M označava transmembransku domenu, a ■ TIR Toll-interleukin 1 receptor domenu (prilagođeno prema Schröder i Schumann 2005).

## 1.6. Cilj istraživanja

Receptori TLR predstavljaju potencijalnu vezu između infekcije, kronične upale i tumorigeneze. Pretpostavlja se da aktivacija urođenog imunološkog sustava preko receptora TLR potiče razvoj karcinoma unutar upalnog mikrokoliša (Zhang i sur. 2012). Konkretno, povećano ispoljavanje receptora TLR4 je uočeno u epitelnim i endotelnim slojevima, te stromi karcinoma debelog crijeva (Yesudhas i sur. 2014).

Hipoteza istraživanja je da je genotip pojedinca definiran polimorfizmima gena *TLR4* povezan sa sklonošću za nastanak sporadičnog karcinoma debelog crijeva.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati postoji li povezanost između polimorfizama gena *TLR4* i sklonosti obolijevanju od sporadičnog karcinoma debelog crijeva te postoji li povezanost s preživljenjem oboljelih.

Specifični ciljevi:

1. Analizirala sam distribuciju polimorfizama +896A/G i +1196C/T gena *TLR4* na 200 uzoraka DNA pacijenata oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva te na 200 uzoraka DNA zdravih kontrola.
2. Preživljenje 100 oboljelih analizirala sam s obzirom na polimorfizam +896A/G gena *TLR4*, stadij po Dukes`-u tumora, dob, spol i smještaj tumora u debelom crijevu.

## 2. Materijali i metode

### 2.1. Uzorci

Uzorci korišteni u ovom radu preuzeti su iz Hrvatske banke DNA i tumora za bazična istraživanja (Spaventi, 1994) koja se nalazi u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta "Ruđer Bošković". Korištenje navedenih uzoraka odobreno je od strane etičkog povjerenstva te su ispitanici potpisali pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Provela sam analizu na 200 uzoraka DNA izoliranih iz normalnog tkiva pridruženog tumoru (najmanje 15 cm udaljenog od ruba tumora) pacijenata oboljelih od sporadičnog karcinoma crijeva te na 200 uzoraka izoliranih iz pune krvi kontrola (zdravi nesrodnici koji odgovaraju oboljelima s obzirom na dob i spol). Istraživanjem je obuhvaćeno 76 (38%) žena i 124 (62%) muškaraca oboljelih od CRC srednja životna dob 66 godina, te 91 (45%) žena i 109 (55%) muškaraca zdravih kontrola srednje životne dobi 64,4 godine. Uz dob i spol oboljelih, imala sam i podatke o smještaju tumora, stadiju po Dukes`-u. Za 100 ispitanika uključenih u studiju imala sam i podatke o preživljenju (praćenje je trajalo 8 godina).

### 2.2. Izolacija DNA iz krvi

Genomsku DNA izolirala sam iz uzoraka pune krvi ispitanika fenol/kloroform metodom. Punu krv (volumena 2-5 mL) prelila sam iz obične u Falcon epruvetu (od 50 mL) te ju nadopunila do 50 mL s 1×RETIC otopinom (5×RETIC: 40.9 g NaCl, 1.85 g KCl, 7.1 g MgCl<sub>2</sub>×H<sub>2</sub>O, 1 L dH<sub>2</sub>O) (Kemika, Hrvatska). Centrifugirala sam uzorke na 5000 rpm pri 4°C u trajanju od 10 minuta (Eppendorf, Centrifuge 5403, Njemačka). Uklonila sam supernatant te na talog ponovno dodala 1×RETIC i centrifugirala.

Nakon uklanjanja supernatanta, na talog sam dodala 30 mL otopine za lizu (131 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0.1 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, dH<sub>2</sub>O)(Kemika, Hrvatska), promiješala smjesu i centrifugirala uzorke na 13200 rpm u trajanju od 10 minuta. Uklonila sam supernatant i ponovila postupak.

Na talog sam dodala 300 µL pufera STE (0.1 M NaCl, 0.05 M Tris, 1 mM EDTA, pH 8) (Kemika, Hrvatska) te sam cijeli volumen prelila u tubicu od 1.5 mL. Na staničnu suspenziju

sam zatim dodala 15  $\mu\text{L}$  proteinaze K ( $c = 20 \text{ mg/mL}$ , Sigma, Sjedinjene Američke Države). Dobro sam resuspendirala otopinu te ju inkubirala preko noći na  $+37^\circ\text{C}$ .

Nakon hlađenja na sobnu temperaturu suspenziji sam dodala 500  $\mu\text{L}$  fenola (Kemika, Hrvatska) te sam laganim miješanjem u trajanju od 10 minuta dobila emulziju. Centrifugirala sam emulziju na 5000 rpm pri  $4^\circ\text{C}$  u trajanju od 10 minuta. Nakon centrifugiranja došlo je do odvajanja dvije faze. Gornju (vodenu) fazu izdvojila sam u novu sterilnu eprvetu. Postupak pročišćavanja ponovila sam još dva puta.

Vodenu sam fazu nakon toga pročistila s tri volumena smjese kloroform-izoamilni alkohol u omjeru 24:17 (Kemika, Hrvatska). Smjesu sam promiješala i centrifugirala na 5000 rpm pri  $4^\circ\text{C}$  u trajanju od 10 minuta. Gornju fazu sam premjestila u novu eprvetu te sam percipitirala DNA dodavanjem 500  $\mu\text{L}$  ledenog ( $-20^\circ\text{C}$ ) apsolutnog etanola (Kemika, Hrvatska).

Nakon centrifugiranja 1 minutu uklonila sam etanol, a talog DNA kratko posušila na  $+37^\circ\text{C}$ . Zatim sam dodala 300  $\mu\text{L}$  TE pufera (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8) (Kemika, Hrvatska) i pohranila DNA na  $+4^\circ\text{C}$ .

### 2.3. Izolacija DNA iz tkiva

Ukupnu genomsku DNA izolirala sam iz komadića normalnog tkiva pacijenata oboljelih od sporadičnog karcinoma crijeva koje sam homogenizirala u puferu za izolaciju DNA (10 mM Tris Cl, 0.1 M EDTA, pH 8, 0.5% SDS) (Kemika, Hrvatska).

U homogenizirane uzorke sam zatim dodala proteinazu K ( $c = 20 \text{ mg/mL}$ , Sigma, Sjedinjene Američke Države) do koncentracije 100  $\mu\text{g/ml}$ . Dobivenu suspenziju sam dobro promiješala pomoću drmalice i inkubirala preko noći na  $+37^\circ\text{C}$ .

Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, suspenziji sam dodala jednak volumen fenola (Kemika, Hrvatska). Laganim miješanjem u trajanju od 10 minuta dvije su faze izmiješane u emulziju. Faze sam zatim razdvojila centrifugiranjem na 13200 rpm pri sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta. Gornju (vodenu) fazu sam izdvojila u novu sterilnu eprvetu. Postupak pročišćavanja ponovila sam još dva puta.

Vodenu fazu sam zatim pročistila s jednakim volumenom smjese fenol-kloroform-izoamilni alkohol u omjeru 25:24:1 (Kemika, Hrvatska). Laganim miješanjem u trajanju od 10 minuta dvije su faze izmiješane u emulziju, i potom se faze razdvoje centrifugiranjem na 13200 rpm pri sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta. Vodenu fazu sam izdvojila u novu sterilnu

epruvetu, i dodala sam jednak volumen smjese kloroform-izoamilni alkohol u omjeru 24:1 (Kemika, Hrvatska). Nakon laganog miješanja, emulziju sam centrifugirala na 13200 rpm pri sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta kako bih dobila pročišćenu vodenu fazu. Iz pročišćene vodene faze sam percipitirala DNA dodavanjem 1000  $\mu$ L ledenog ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) apsolutnog etanola (Kemika, Hrvatska).

Nakon centrifugiranja 1 minutu uklonila sam etanol, a talog DNA kratko posušila na  $37^{\circ}\text{C}$ . Zatim sam dodala 300  $\mu$ L TE pufera (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8) (Kemika, Hrvatska) i pohranili DNA na  $+4^{\circ}\text{C}$ .

## 2.4. Određivanje koncentracije DNA

DNA izdvojenu opisanom metodom sam analizirala spektrofotometrijski na valnoj duljini od 260 nm. Pomoću izmjerene optičke gustoće izračunala sam koncentracije DNA prema formuli:

$$y = OD \times R \times \varepsilon$$

gdje je:

- $\gamma$  – masena koncentracija (g/mL)
- OD – optička gustoća očitana pri valnoj duljini od 260 nm
- R – razrjeđenje u kiveti
- $\varepsilon$  – ekstinkcijski koeficijent za DNA (50 g/mL)

Čistoća dobivene DNA se provjerava omjerom očitavanja na 260 i 280 nm ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) i za čistu DNA iznosi od 1.8 do 2.0 . Ako je DNA onečišćena ostacima proteina omjer će biti znatno manji.

## 2.5. Metoda *TaqMan*® *real-time* PCR-SNP

Metodu *TaqMan*® *real-time* PCR koristila sam za određivanje genotipova polimorfizama u jednoj bazi (SNP). Osnova ove metode je hibridizacija ciljnog slijeda i fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe koja je specifična za pojedini alel. Metoda se

također temelji na 5' nukleaznoj aktivnosti *Taq* DNA polimeraze koja prilikom cijepanja sonde u reakciji PCR dovodi do razdvajanja fluorofora od prigušivača (engl. *quencher*) i posljedične pojave fluorescentnog signala. Koriste se 2 sonde od kojih je svaka komplementarna jednom alelu SNP te su obilježene različitim fluoroforima. Pojava fluorescentnog signala od jedne ili obje sonde ukazuje na njihovo cijepanje tijekom reakcije PCR te prisutnost odgovarajućih alela DNA.

Polimorfizme gena *TLR4* analizirala sam korištenjem komercijalno dostupnih TaqMan® SNP genotipizacijskih eseja (Applied biosystems, SAD). Za analizu polimorfizma D299G koristila sam esej c\_11722238\_20 (TLR4\_896A>G, SNP ID: rs4986790), a za polimorfizam T399I koristila sam esej c\_11722237\_20 (TLR4\_1196C>T, SNP ID: rs4986791).

Reakciju *real-time* PCR sam provela prema preporukama proizvođača na uređaju Real Time PCR System 7300 (Applied Biosystems, SAD).

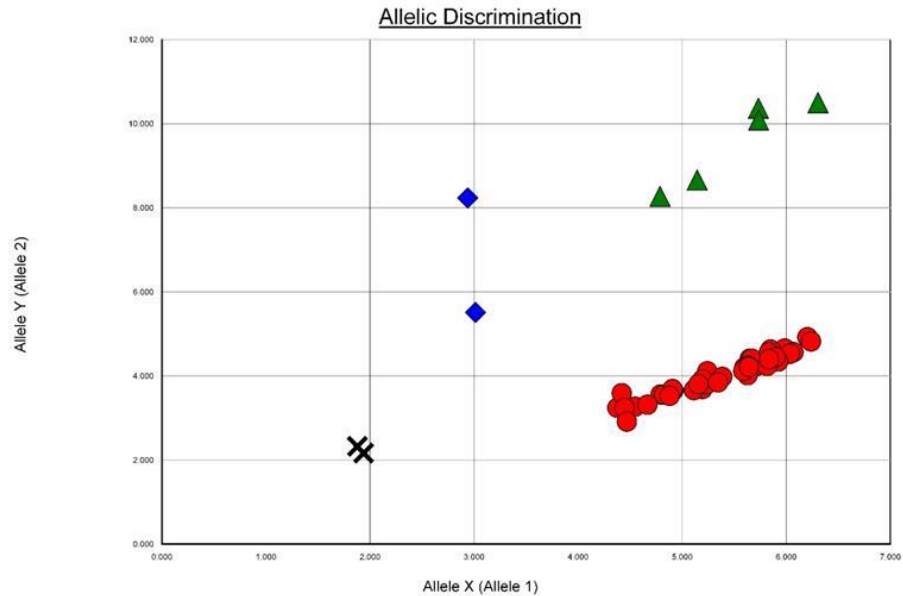
Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µL se sastojala od 200 ng po mikrolitru DNA, 0.6 µL eseja, 12.5 µL TaqMan® Universal PCR Master Mix-a (Applied Biosystems, Sjedinjene Američke Države) te QH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena.

PCR reakcija odvijala se pod sljedećim uvjetima:

- 2 minute na 50°C
  - 10 minuta na 95°C → aktivacija AmpliTaq Gold enzima (Applied Biosystems, Sjedinjene Američke Države)
  - 15 sekundi na 92°C → denaturacija
  - 1 minuta na 60°C → sparivanje proba/produljivanje lanca
- } 40 ciklusa

Produkti reakcije analizirani su pomoću programa za alelnu diskriminaciju uređaja Real Time PCR System 7300 (Applied Biosystems, Sjedinjene Američke Države) (Slika 7).





**Slika 7.** Alelna diskriminacija polimorfizma +896A/G (D299G) gena *TLR4*

◆ – alel G, ● – alel A, ▲ – oba alela (G i A), ✕ – negativna kontrola

## 2.6. Statistička obrada podataka

### 2.6.1. Hardy-Weinbergov zakon

Hardy-Weinbergov zakon govori o konstantnoj učestalosti gena i genotipova u velikoj populaciji koja je u ravnoteži. Pravilo vrijedi samo u slučaju populacija koje su u genetičkoj ravnoteži. Kako bi populacija bila u genetičkoj ravnoteži mora biti zadovoljeno nekoliko uvjeta: mora biti beskonačno velika (dolazi do slučajnog sparivanja), mora biti bez mutacija, bez migracija, bez genetičkog drifta i nema prirodne selekcije (tj. svaki genotip može preživjeti kao bilo koji drugi i svaki je genotip jednako efikasan u produkciji potomaka).

Hardy-Weinbergova jednadžba:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Gdje  $p$  predstavlja učestalost dominantnog alela, a  $q$  učestalost recesivnog alela.

Pomoću Hardy-Weinbergova zakona usporedila sam dobivene i očekivane frekvencije genotipova polimorfizma gena *TLR4* u oboljelih i kontrola.

### 2.6.2. $\chi^2$ test

Hi-kvadrat test je jedan od najčešće korištenih neparametarskih testova u empirijskim istraživanjima. Ovaj test može osobito poslužiti kad želimo utvrditi da li neke dobivene frekvencije odstupaju od frekvencija koje bih očekivala u slučaju određene hipoteze. Korištenjem ovog testa možemo tražiti postoji li povezanost između dvije varijable te nam također pokazuje vjerojatnost povezanosti. Može se postaviti hipoteza da neka teorijska raspodjela dobro opisuje dobivenu raspodjelu frekvencija. Za provjeru hipoteze koristila sam ovaj test.

Često želimo znati postoji li značajna razlika između dobivenih i očekivanih frekvencija. Navedenu razliku računamo prema formuli:

$$\chi^2 = \sum \frac{(f_o - f_i)^2}{f_i}$$

Gdje je  $f_o$  predstavlja dobivenu frekvenciju, a  $f_i$  očekivanu frekvenciju

Hi kvadrat test sam koristila kako bi pokazala postoji li statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih genotipova polimorfizama gena *TLR4* između pacijenata oboljelih od sporadičnog karcinoma i zdravih kontrola.

### 2.6.3. Kaplan-Meier metoda

Kaplan-Meierova metoda jedna je od najboljih za mjerenje preživljenja dijela ispitanika u određenom vremenu. U kliničkim ispitivanjima koristi se kako bi se pratilo preživljenje pacijenata nakon dijagnoze i liječenja. Vrijeme preživljenja počinje od određene točke (npr. dijagnoza) i traje do smrti ispitanika.

Kaplan-Meierova krivulja preživljenja je vjerojatnost preživljenja u danom vremenskom periodu koji je definiran s više manjih vremenskih intervala (Goel i sur. 2010).

Log-rank test (Mantel-Cox test) je statistička analiza koja uspoređuje dvije krivulje preživljenja te pokazuje da li postoji statistički značajna razlika između preživljenja dvije ispitivane skupine.

#### 2.6.4. Omjer izgleda

Omjer izgleda (OR od engl. *odds ratio*) je mjera povezanosti između određenog događaja i ishoda. Koristi se za usporedbu relativnih vjerojatnosti pojave specifičnog ishoda (npr. bolest), s obzirom na određeni događaj (npr. u mom slučaju specifični genotip polimorfizma gena *TLR4*). Omjer izgleda može se koristiti za određivanje je li određeni događaj rizični faktor za određeni ishod i za usporedbu značaja različitih rizičnih faktora za taj ishod (Szumilas 2010).

### 3. Rezultati

Korišteni su podaci o kliničkim karakteristikama ispitanika oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Istraživanje je obuhvatilo 124 oboljela muškarca (62%), i 76 oboljelih žena čija je srednja dob iznosila 66 godina. Od 200 oboljelih, u trenutku dijagnoze 124 ispitanika je bilo mlađe od 70 godina, a 76 ispitanika je bilo u dobi od 70 godina ili starije. U 142 ispitanika tumor je bio smješten na lijevoj strani debelog crijeva (71%), dok je u 58 ispitanika bio smješten na desnoj strani debelog crijeva (29%). U 22 ispitanika bolest je dijagnosticirana u stadiju Dukes` A (11%), u 74 ispitanika u stadiju Dukes` B (37%), u 79 ispitanika u stadiju Dukes` C (39,5%), te u 25 ispitanika u stadiju Dukes` D (12,5%) (Tablica 1.).

**Tablica 1.** Kliničke karakteristike ispitanika oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva.

| Kliničke karakteristike           |               | Oboljeli<br>N=200 (%) |
|-----------------------------------|---------------|-----------------------|
| Dob (godine)                      | Srednja dob   | 66                    |
|                                   | < 70          | 124 (62)              |
|                                   | ≥ 70          | 76 (38)               |
| Spol                              | Muškarci      | 124 (62)              |
|                                   | Žene          | 76 (38)               |
| Smještaj tumora u debelom crijevu | Lijeva strana | 142 (71)              |
|                                   | Desna strana  | 58 (29)               |
| Stadij po Dukes' – u tumora       | A             | 22 (11)               |
|                                   | B             | 74 (37)               |
|                                   | C             | 79 (39,5)             |
|                                   | D             | 25 (12,5)             |

#### 3.1. Analiza polimorfizama gena *TLR4*

U ovom istraživanju genotipizirala sam 200 uzoraka DNA pacijenata oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva i 200 uzoraka DNA zdravih kontrola. Frekvencije opaženih genotipova polimorfizama +896A/G, te +1196C/T gena *TLR4* u obje skupine ispitanika bile su u skladu s Hardy-Weinberg ravnotežom.

### 3.2. Povezanost polimorfizama +896A/G i +1196C/T gena *TLR4* sa sklonošću obolijevanju od sporadičnog karcinoma debelog crijeva

U Tablici 2. prikazana je razdioba genotipova polimorfizma +896A/G u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva i u zdravih kontrola. U skupini oboljelih genotip AA dokazan je u 89,5% (179/200) ispitanika, genotip AG u 9,5% (19/200) ispitanika, te genotip GG u 1% (2/200) ispitanika. U skupini zdravih kontrolnih ispitanika genotip AA dokazan je u 83% (166/200) ispitanika, genotip AG u 11,5% (23/200) ispitanika, te genotip GG u 5,5% (11/200) ispitanika.

Rezultati pokazuju da je učestalost varijantnog alela G od 11,2% (45/400) bila statistički značajno veća u skupini zdravih ispitanika u odnosu na učestalost u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva, koja je iznosila 5,7% (23/400). Na temelju rezultata uočila sam da je pojavnost nosioca alela A učestalija u ispitivanoj populaciji, dok se nosioci varijantnog alela G znatno češće pojavljuju u zdravoj populaciji ( $p=0,0049$ ).

**Tablica 2.** Omjer vjerojatnosti za povećanu sklonost obolijevanju genotipova A/G i G/G i alela G u odnosu na referentni genotip AA i alel A polimorfizma +896A/G u oboljelih i kontrola.

|         | Polimorfizam gena <i>TLR4</i> | Oboljeli 200 (%) | Zdravi 200 (%) | OR (95% CI)         | p             |
|---------|-------------------------------|------------------|----------------|---------------------|---------------|
| +896A/G | AA                            | 179 (89,5)       | 166 (83)       | 1                   |               |
|         | AG                            | 19 (9,5)         | 23 (11,5)      | 0.766 (0.403-1.458) | 0.4158        |
|         | GG                            | 2 (1)            | 11 (5,5)       | 0.169 (0.037-0.772) | <b>0.0069</b> |
|         | AG +GG                        | 21               | 34             | 0.573 (0.320-1.027) | 0.0581        |
|         | A                             | 377 (94,3)       | 355 (88,8)     | 1                   |               |
|         | G                             | 23 (5,7)         | 45 (11,2)      | 0.481 (0.285-0.812) | <b>0.0049</b> |

Tablica 3. prikazuje razdiobu genotipova polimorfizma +1196C/T u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva i u zdravih kontrola. U skupini oboljelih genotip CC dokazan je u 89,5% (179/200) ispitanika, genotip CT u 9,5% (19/200) ispitanika, te genotip TT u 1% (2/200) ispitanika. U skupini zdravih kontrolnih ispitanika genotip CC dokazan je u 83% (166/200) ispitanika, genotip CT u 11,5% (23/200) ispitanika, te genotip TT u 5,5% (11/200) ispitanika.

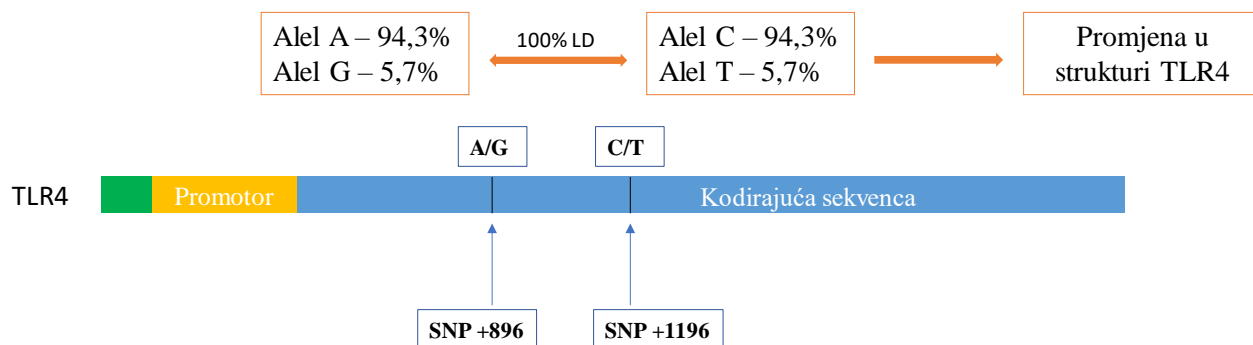
U skupini zdravih ispitanika rezultati su pokazali da je učestalost varijantnog alela T od 11,2% (45/400) statistički značajno veća u odnosu na učestalost u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva, u kojih je učestalost iznosila 5,7% (23/400). Dobiveni rezultati pokazali su da se nosioci alela C znatno češće pojavljuju u populaciji, dok su nosioci varijantnog alela T znatno učestaliji u zdravih ispitanika ( $p=0,0049$ ).

**Tablica 3.** Omjer vjerojatnosti za povećanu sklonost obolijevanju genotipova C/T i T/T i alela T u odnosu na referentni genotip CC i alel C polimorfizma +1196C/T u oboljelih i kontrola.

|          | Polimorfizam gena <i>TLR4</i> | Oboljeli 200 (%) | Zdravi 200 (%) | OR (95% CI)         | p             |
|----------|-------------------------------|------------------|----------------|---------------------|---------------|
| +1196C/T | CC                            | 179 (89,5)       | 166 (83)       | 1                   |               |
|          | CT                            | 19 (9,5)         | 23 (11,5)      | 0.766 (0.403-1.458) | 0.4158        |
|          | TT                            | 2 (1)            | 11 (5,5)       | 0.169 (0.037-0.772) | <b>0.0069</b> |
|          | CT +TT                        | 21               | 34             | 0.573 (0.320-1.027) | 0.0581        |
|          | C                             | 377 (94,3)       | 355 (88,8)     | 1                   |               |
|          | T                             | 23 (5,7)         | 45 (11,2)      | 0.481 (0.285-0.812) | <b>0.0049</b> |

Analizom polimorfizma SNP +896A/G te +1196C/T gena *TLR4* u uzorku ispitanika pokazana je statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva u odnosu na zdrave kontrole ( $p=0,0286$ ).

Rezultati pokazuju da su genotipovi polimorfizama +896A/G i +1196C/T gena *TLR4* u uzorku ispitanika 100% vezani (LD, eng. *linkage disequilibrium*), te se nasljeđuju u tri kombinacije genotipova (Slika 8. i Tablica 4.).



**Slika 8.** Učestalost i "linkage disequilibrium" (LD) genotipova/alela polimorfizama +896A/G i +1196C/T gena *TLR4*.

U analiziranom uzorku ispitanika utvrdila sam da iz vezanog nasljeđivanja proizlaze tri kombinacije genotipova polimorfizama +896/+1196 gena *TLR4* (Tablica 4.). Analiza učestalosti pokazala je da je kombinacija varijantnih homozigotnih genotipova +896/+1196 GG,TT statistički značajno učestalija u skupini zdravih ispitanika, u odnosu na skupinu oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva ( $p = 0,0069$ ).

**Tablica 4.** Učestalost kombinacija *TLR4* genotipova u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva i u skupini zdravih kontrolnih ispitanika.

| Kombinacija genotipova <i>TLR4</i> +896/+1196 | Oboljeli N=200 (%) | Zdravi N=200 (%) | OR (95% CI)         | p             |
|---|--------------------|------------------|---------------------|---------------|
| AA,CC   | 179 (90)           | 166 (83)         | 1                   |               |
| AG,CT   | 19 (10)            | 23 (12)          | 0.766 (0.403-1.458) | 0.4158        |
| GG,TT   | 2 (1)              | 11 (6)           | 0.169 (0.037-0.772) | <b>0.0069</b> |

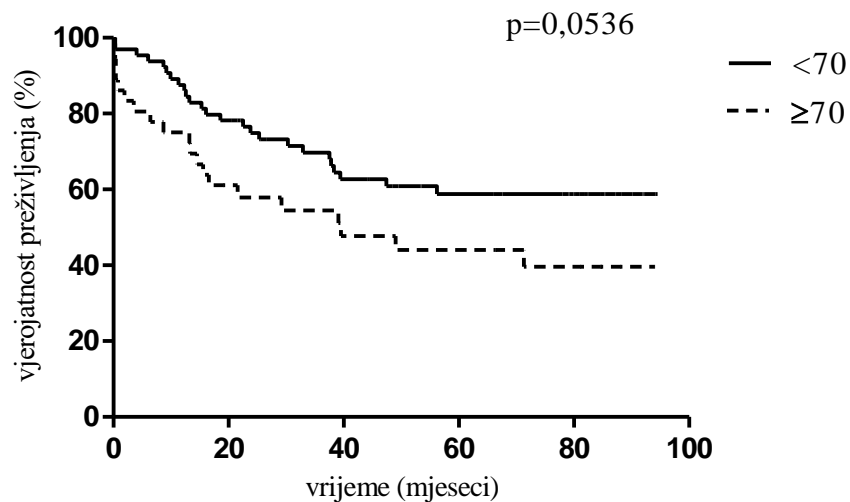
Budući da sam u rezultatima pokazala da postoji 100%-tni LD polimorfizama +896A/G i +1196C/T gena *TLR4*, u daljnjoj obradi podataka koristila sam vrijednosti dobivene za polimorfizam +896A/G.

### 3.3. Analiza preživljenja

Analizom preživljenja obuhvaćeno je 100 oboljelih čije sam uzorke DNA genotipizirala na polimorfizam +896A/G gena *TLR4*, te sam za njih imala podatke o dobi, spolu, smještaju tumora i stadiju po Dukes`-u u trenutku postavljanja dijagnoze sporadičnog karcinoma debelog crijeva.

#### 3.3.1. Povezanost dobi s preživljenjem oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva

Oboljele sam s obzirom na dob podijelila u dvije dobne skupine; oboljele koji su u trenutku dijagnosticiranja bolesti imali manje od 70 godina (<70) i one koji su imali 70 ili više godina ( $\geq 70$ ). Statistička analiza podataka pokazala je bolje preživljenje ispitanika u dobi od 70 godina ili mlađih, no razlika između dvije dobne skupine oboljelih nije bila statistički značajna ( $p=0,0536$ ) (Slika 9.).

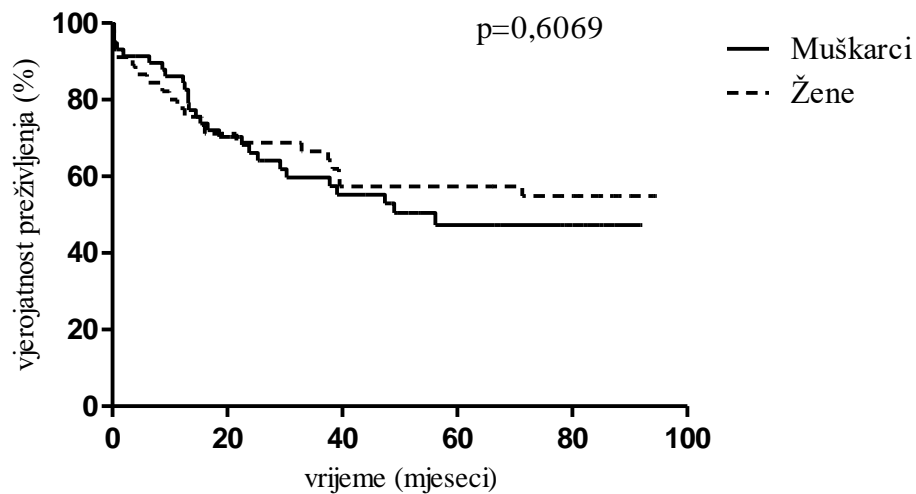


**Slika 9.** Povezanost preživljenja ispitanika oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva i dobi.



### 3.3.2. Povezanost spola s preživljenjem oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva

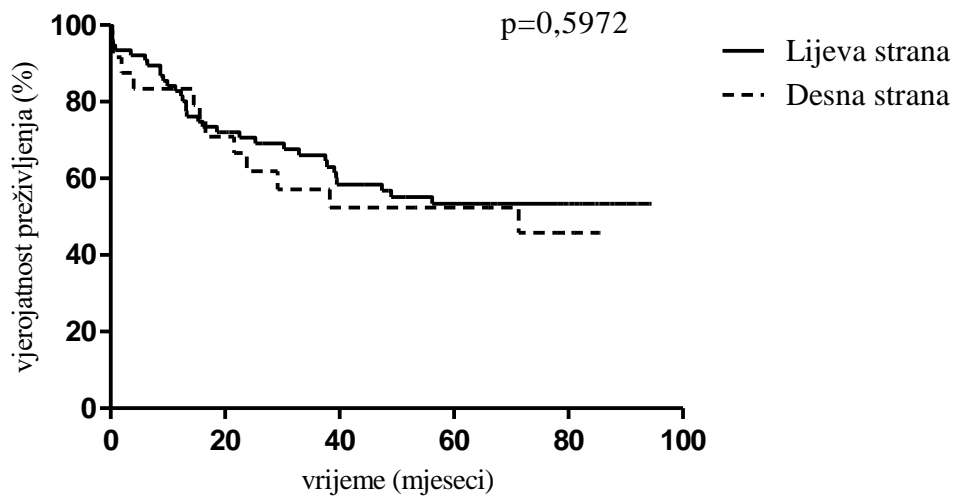
Kako bih utvrdila postoji li povezanost između spola i preživljenja oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva, oboljele ispitanike sam s obzirom na spol podijelila u dvije skupine. U uzorku oboljelih ispitanika dokazala sam da nema značajne razlike u preživljenju između muškaraca i žena ( $p=0,6069$ ) (Slika 10.).



**Slika 10.** Povezanost preživljenja ispitanika oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva i spola.

### 3.3.3. Povezanost smještaja tumora s preživljenjem oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva

Uzorak oboljelih ispitanika podijelila sam u dvije skupine s obzirom na smještaj tumora; na ispitanike kojima je tumor bio smješten na lijevoj strani, te one kojima je tumor bio smješten na desnoj strani debelog crijeva. Temeljem analize rezultata utvrdila sam da ne postoji statistički značajna razlika u preživljenju kod dvije skupine oboljelih s obzirom na smještaj tumora ( $p=0,5972$ ) (Slika 11.).

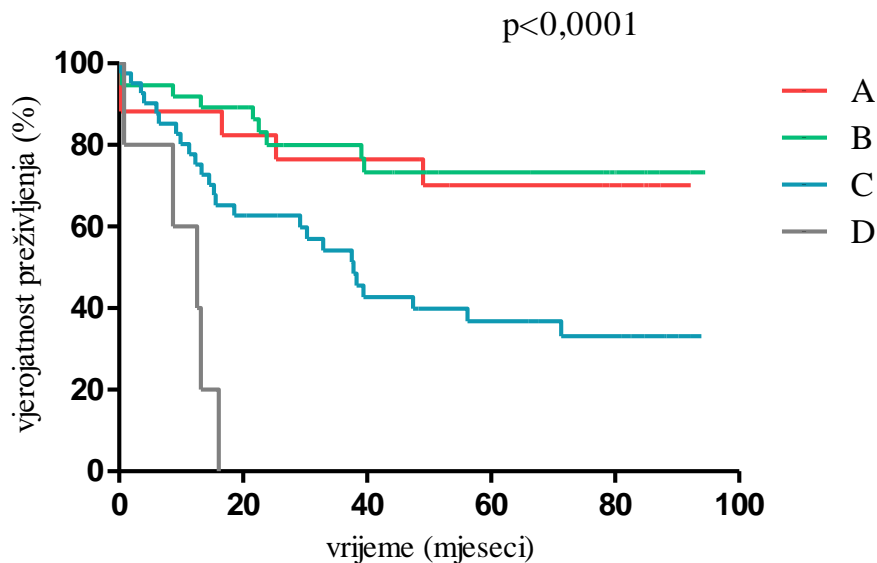


**Slika 11.** Povezanost preživljenja ispitanika i smještaja sporadičnog karcinoma u debelom crijevu.

### 3.3.4. Povezanost preživljenja oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva sa stadijem tumora po Dukes`-u

Na slici 12 je prikazana ovisnost preživljenja pacijenta o stadiju po Dukes`-u, koji se standardno koristi kao prognostički pokazatelj u osoba oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva.

Statističkom analizom podataka pokazano je da postoji značajna razlika u preživljenju između ove četiri skupine oboljelih ( $p < 0.0001$ ). Preživljenje na kraju perioda praćenja za oboljele klasificirane kao stadij Dukes` A je iznosilo 71%, za stadij Dukes` B 76%, za stadij Dukes` C 38%, dok je u skupini oboljelih klasificiranih kao stadij Dukes` D nije bilo preživjelih (slika 12.).



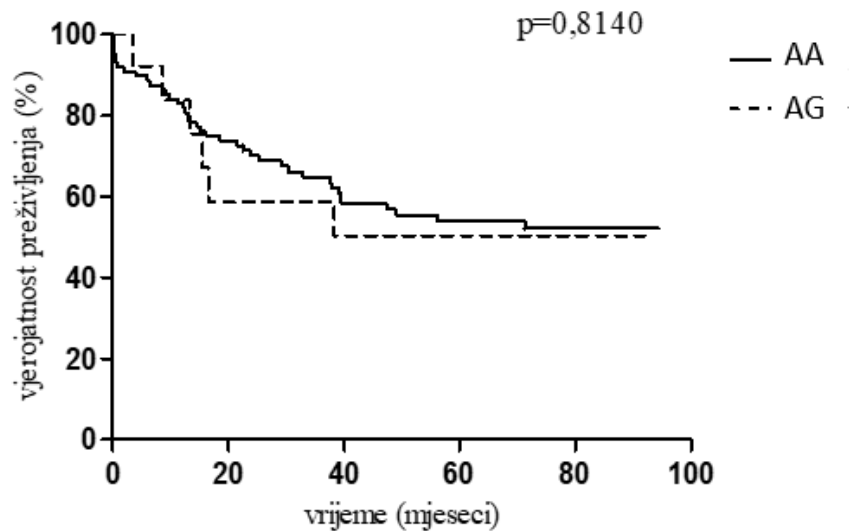
**Slika 12.** Preživljenje pacijenata oboljelih od sporadičnog karcinoma crijeva prema prognostičkom pokazatelju Dukes`.

### 3.3.5. Povezanost polimorfizma +896A/G gena *TLR4* s preživljenjem oboljelih od sporadičnog karcinoma crijeva

Kako bih ispitala prognostički potencijal SNP polimorfizma +896A/G gena *TLR4*, ispitanike sam s obzirom na rezultate genotipizacije podijelila u dvije skupine; na nosioce divljeg tipa alela A i genotipa AA, te nosioce varijantnog tipa alela G i genotipa AG.

Preživljenje na kraju perioda praćenja oboljelih nosioca genotipa AA iznosilo je 56,32%, a srednja vrijednost preživljenja bila je 46,84 mjeseci. U slučaju oboljelih nosioca genotipa AG preživljenje je iznosilo 53,84%, a srednja vrijednost preživljenja bila je 44,47 mjeseci. U analizi preživljenja nije bilo nosioca homozigotnog genotipa GG.

Rezultati su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika u preživljenju između dvije skupine oboljelih ( $p=0,8140$ ) (Slika 13.).



**Slika 13.** Analiza preživljenja oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva u odnosu na genotip polimorfizma +896A/G gena *TLR4*.

### 3.3.6. Usporedba analize preživljenja i kliničkih osobina oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva

Tablica 5. prikazuje dobivene rezultate analize preživljenja od statistički najznačajnije prema statistički najmanje značajnoj p vrijednosti. Prema dobivenim p vrijednostima mogu uočiti da je najpouzdaniji prognostički pokazatelj preživljenja osoba oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva ovisno o stadiju po Dukes`-u, dok polimorfizam +896A/G gena *TLR4* nije bio dovoljno dobar pokazatelj preživljenja u oboljelih ispitanika.

**Tablica 5.** Dobivene p vrijednosti s obzirom na kliničke karakteristike.

| <b>Kliničke karakteristike</b>        | <b>p vrijednost</b> |
|---------------------------------------|---------------------|
| Stadij po Dukes` – u tumora           | 0,0001              |
| Dob                                   | 0,0536              |
| Smještaj tumora u debelom crijevu     | 0,5972              |
| Spol                                  | 0,6069              |
| Polimorfizam +896A/G gena <i>TLR4</i> | 0,8140              |

## 4. Rasprava

Sporadični karcinom debelog crijeva predstavlja jednu od najčešćih i najtežih zloćudnih bolesti u zemljama razvijenog svijeta. Čimbenici koji doprinose nastanku ovog karcinoma su genetske promjene (mutacije u genima *KRAS*, *APC*, *p53*, *SMAD4*) ali i stil života pojedinca (prehrana bogata mastima, konzumacija alkohola, pretilost, pušenje, nedostatak fizičke aktivnosti) (Mogoantă i sur. 2014, Sun i Kato 2016). Stopa pojavnosti ovog zloćudnog tumora raste u pojedinim dijelovima svijeta vjerojatno uslijed kombinacije različitih rizičnih čimbenika (Pimentel-Nunes i sur. 2012).

Novija istraživanja ukazuju na bitnu ulogu mikrobioma u nastanku sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Postoje dokazi koji povezuju kroničnu infekciju i popratnu upalu s nastankom i napredovanjem tumora. Receptori TLR predstavljaju ključnu komponentu urođenog imunološkog odgovora domaćina na mikroorganizme. Navedeni receptori preko sluznice prepoznaju mikrobiom te je aktivacija receptora neophodna za održavanje homeostaze crijeva (Sun i Kato 2016, McConel i Yang 2009).

Kronična upala uzrokovana bakterijskom infekcijom je poznati rizični čimbenik za nastanak karcinoma debelog crijeva. Istraživanja su pokazala da je prisutna povećana ekspresija gena *TLR4* u karcinomu debelog crijeva. Posljedica povećane ekspresije gena *TLR4* je akutno lučenje upalnih citokina preko aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B. Promjena u signalnom putu receptora *TLR4* bi mogla doprinijeti tumor stimulirajućoj aktivnosti transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B (Landi i sur. 2006, Semlali i sur. 2016).

Poznata su dva polimorfizma gena *TLR4* koja bi potencijalno mogla imati ulogu u nastanku karcinoma: +896A/G i +1196C/T. Oba polimorfizma se nalaze u izvanstaničnoj domeni te se pretpostavlja da uzrokuju konformacijske promjene zbog kojih receptor slabije prepoznaje ligand (lipopolisaharid). Posljedično dolazi do smanjenog prijenosa signala i u konačnici se smanjuje upalni odgovor (Semlali i sur. 2016, El-Omar i sur. 2008). Posljednjih nekoliko godina utjecaj polimorfizama gena *TLR4* na različite vrste karcinoma je tema brojnih istraživanja. Jing i suradnici (2012) su proveli meta-analizu različitih istraživanja te povezali polimorfizam +896A/G s povećanim rizikom za nastanak gastrointestinalnih karcinoma dok je u slučajevima karcinoma prostate navedeni polimorfizam imao zaštitnu ulogu. Također su povezali polimorfizam +1196C/T s povećanim rizikom za nastanak karcinoma probavnog sustava. Hold i

suradnici (2007) su povezali polimorfizam +896A/G s povećanim rizikom za razvoj karcinoma želuca. Istraživanje koje su proveli Zhao i suradnici (2012) je također povezalovarijantni alel G polimorfizma +896A/G s povećanim rizikom za nastanak karcinoma želuca ali nisu povezali navedeni polimorfizam s karcinomom debelog crijeva.

U istraživanju sam ispitala postoji li povezanost između polimorfizama +896A/G i +1196C/T gena *TLR4* i sklonosti obolijevanju od sporadičnog karcinoma debelog crijeva, te postoji li povezanost s preživljenjem oboljelih ispitanika. Nisam ustanovila povezanost između pojave sporadičnog karcinoma debelog crijeva i preživljenja na uzorku ispitanika. Također nisam povezala polimorfizme gena *TLR4* s rizikom za nastanak sporadičnog karcinoma debelog crijeva.

Dobiveni rezultati nisu povezali polimorfizam +896A/G gena *TLR4* s povećanom sklonošću obolijevanju od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. U kontrolnoj skupini genotip AA je bio prisutan u 83% ispitanika, genotip AG u 11,5% ispitanika, te genotip GG u 5,5% ispitanika. U skupini oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva genotip AA je bio zastupljen u 89,5% ispitanika, genotip AG u 9,5% ispitanika, te genotip GG u 1% ispitanika. Dokazana je statistički značajna razlika u razdiobi genotipova i alela u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva i u zdravih ispitanika. Rezultati istraživanja su pokazali da je učestalost varijantnog alela G bila statistički značajno veća u zdravih ispitanika (11,2%) u odnosu na učestalost u ispitanika oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva (5,7%).

Analiza polimorfizma +1196C/T gena *TLR4* također nije pokazala povezanost navedenog polimorfizma s povećanom sklonosti obolijevanju od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. U skupini zdravih kontrola genotip CC je bio prisutan u 83% ispitanika, genotip CT u 11,5% ispitanika, te genotip TT u 5,5% ispitanika. U skupini oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva genotip CC dokazan je u 89,5% ispitanika, genotip CT u 9,5% ispitanika, te genotip TT u 1% ispitanika. Razlika u razdiobi genotipova i alela u oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva i u zdravih ispitanika je bila statistički značajna. Varijantni alel T je bio statistički značajno učestaliji u skupini zdravih ispitanika (11,2%) u odnosu na ispitanike oboljele od sporadičnog karcinoma debelog crijeva (5,7%).

Rezultati mog istraživanja su u skladu s rezultatima drugih autora koji nisu dokazali povezanost polimorfizama +896A/G i +1196C/T gena *TLR4* s povećanim rizikom obolijevanja od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Davoodi i Seow (2011) nisu povezali polimorfizme +896A/G i +1196C/T gena *TLR4* s rizikom obolijevanja od sporadičnog karcinoma debelog

crijeva. Landi i suradnici (2006) nisu pronašli povezanost između polimorfizma +896A/G i obolijevanja od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Proença i suradnici (2015) također nisu povezali polimorfizam +896A/G sa sklonošću za nastanak sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Rezultati mog istraživanja slažu se s rezultatima Ding i suradnika (2017) koji su povezali polimorfizam +1196C/T sa smanjenim rizikom za razvoj sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Suprotno mojim rezultatima dva su istraživanja pokazala povezanost polimorfizma +896A/G s povećanim rizikom obolijevanja od sporadičnog karcinoma debelog crijeva (Boraska Jelavić i sur. 2006, Pimentel-Nunes i sur. 2012).

Rezultati istraživanja su pokazali da su genotipovi polimorfizama +896A/G i +1196C/T gena *TLR4* vezani na ispitivanoj populaciji, te da se nasljeđuju u tri kombinacije genotipova (AA,CC; AG,CT i GG,TT). Dobiveni rezultati da se navedena dva polimorfizma gena *TLR4* nasljeđuju vezano su u skladu s rezultatima koje su dobili Arbour i suradnici (2000). Međutim, zbog evolucijskog pritiska i migracija ljudi polimorfizam +896A/G ima različitu raspodjelu u različitim populacijama te se može ali i ne mora nasljeđivati vezano s polimorfizmom +1196C/T (Ferwerda i sur. 2007). Postoje značajne geografske i etničke razlike u distribuciji polimorfizama +896A/G i +1196C/T gena *TLR4*. Oba polimorfizma su prisutna u 10% pripadnika bijele rase, dok se u slučaju istočno Azijske populacije ne pojavljuju (El-Omar i sur. 2008). Moguće je da su upravo zbog razlike u distribuciji polimorfizama +896A/G i +1196C/T između kontinenata rezultati istraživanja o povezanosti polimorfizama s karcinomom debelog crijeva oprečni (Zhao i sur. 2012).

Prema dobivenim rezultatima kombinacija varijantnih homozigotnih genotipova +896/+1196 GG,TT je bila statistički značajno učestalija u skupini zdravih ispitanika u odnosu na ispitanike oboljele od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Homozigotnih nosioca varijantnog alela +896 G odnosno +1196 T je bilo 11 (5,5 %) u skupini zdravih kontrola te 2 (1 %) u skupini ispitanika oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Dobiveni rezultati sugeriraju da bi varijantni alel +896 G odnosno +1196 T mogao imati zaštitnu ulogu u razvoju sporadičnog karcinoma debelog crijeva. U istraživanjima polimorfizma +896A/G drugih autora učestalost varijantnog alela G je bila vrlo niska, kao i učestalost homozigota alela G. Istraživanje provedeno na stanovništvu Brazila također je pokazalo nisku učestalost alela +896 G dok homozigotni GG nosioci nisu bili prisutni u skupini oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva ni u kontrolnoj skupini (Proença i sur. 2015). Niska učestalost genotipa +896 GG je



uočena i u istraživanjima provedenim u drugim državama poput Hrvatske (Boraska Jelavić i sur. 2006), sjeverne Indije (Pandey i sur. 2009) i Grčke (Theodoropoulos i sur. 2012).

Statistička analiza preživljenja (log-rank test) nije pokazala značajnu razliku u preživljenju između oboljelih nosioca genotipa +896 AA i oboljelih nosioca genotipa +896 AG. Također, u ispitivanom uzorku nije bilo statistički značajne razlike u preživljenju između muškaraca i žena kao ni značajne razlike u preživljenju s obzirom na smještaj tumora. Nadalje analizom preživljenja sam ustanovila da je bolje preživljenje ispitanika u dobi od 70 godina ili mlađih. Dobiveni rezultati su u skladu sa stadijima po Dukes'-u za koje je poznato da su dobar prognostički pokazatelj za ove zloćudne tumora te stoga mogu reći da je uzorak ispitanika dobar.

Postoje oprečni rezultati istraživanja provedenih vezano uz polimorfizme(+896A/G i +1196C/T) gena *TLR4* i sklonosti za obolijevanje od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Rezultati mog istraživanja su u skladu s onim istraživanjima koja pokazuju da polimorfizmi gena *TLR4* utječu na smanjenu sklonost obolijevanju od sporadičnog karcinoma debelog crijeva, ali nemaju značajnu ulogu u preživljenju oboljelih. Rezultati provedenog istraživanja sugeriraju da bi varijantni alel +896 G odnosno +1196 T mogao imati zaštitnu ulogu u nastanku sporadičnog karcinoma debelog crijeva, no potrebno je provesti opsežnije istraživanje s većim uzorkom ispitanika kako bi se pojačala snaga studije i značajnost dobivenog rezultata o povezanosti ovog polimorfizma s nastankom ovog zloćudnog tumora.

## 5. Zaključak

Analizirala sam distribuciju genotipova/alela polimorfizama +896A/G i +1196C/T gena *TLR4* na 200 ispitanika oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva i 200 zdravih ispitanika koji odgovaraju oboljelima s obzirom na dob i spol.

U kontrolnoj skupini genotip *TLR4* +896 AA je bio prisutan u 83% ispitanika, genotip AG u 11,5% ispitanika, te genotip GG u 5,5% ispitanika. U skupini oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva genotip AA dokazan je u 89,5% ispitanika, genotip AG u 9,5% ispitanika, te genotip GG u 1% ispitanika. Učestalost varijantnog alela G bila statistički značajno veća kod zdravih ispitanika u odnosu na učestalost kod ispitanika oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Također, homozigotni nosioci varijantnog alela G su bili statistički značajno zastupljeniji u populaciji zdravih ispitanika.

U skupini zdravih kontrola genotip *TLR4* +1196 CC je bio prisutan u 83% ispitanika, genotip CT u 11,5% ispitanika, te genotip TT u 5,5% ispitanika. U skupini oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva genotip CC dokazan je u 89,5% ispitanika, genotip CT u 9,5% ispitanika, te genotip TT u 1% ispitanika. Učestalost varijantnog alela T je bila statistički značajno veća u skupini zdravih ispitanika u odnosu na ispitanike oboljele od sporadičnog karcinoma debelog crijeva. Homozigotni nosioci varijantnog alela T bili su statistički značajno zastupljeniji u populaciji zdravih ispitanika.

Genotipovi polimorfizama +896A/G i +1196C/T gena *TLR4* su bili vezani na ispitivanu populaciju, te su se nasljeđivali u tri kombinacije genotipova (AA,CC; AG,CT i GG,TT).

Analiza preživljenja (log-rank test) oboljelih od sporadičnog karcinoma debelog crijeva u odnosu na genotip polimorfizma +896A/G gena *TLR4* nije pokazala statistički značajnu razliku u preživljenju između oboljelih nosioca genotipa AA i oboljelih nosioca genotipa AG.

## 6. Literatura

- Al-Sohaily S., Biankin A., Leong R., Kohonen-Corish M., Warusavitarne J. (2012): Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **27**: 1423–1431.
- Arbour N. C., Lorenz E., Schutte B. C., Zabner J., Kline J. N., Jones M., Frees K., Watt J. L., Schwartz D. A. (2000): *TLR4* mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature Genetics* **25**: 187–191.
- Astler V. B., Collier F. A. (1954): The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Annals of Surgery* **139**: 846–851.
- Baek S. K. (2017): Laterality: right-sided and left-sided colon cancer. *Annals of Coloproctology* **33**: 205–206.
- Boraska Jelavić T., Barisić M., Drmic Hofman I., Boraska V., Vrdoljak E., Peruzović M., Hozo I., Puljiz Z., Terzić J. (2006): Microsatellite GT polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with colorectal cancer. *Clinical Genetics* **70**: 156–160.
- Brenner H., Kloor M., Pox C. P. (2014): Colorectal cancer. *Lancet* **383**: 1490-1502.
- Cammarota R., Bertolini V., Pennesi G., Bucci E. O., Gottardi O., Garlanda C., Laghi L., Barberis M. C., Sessa F., Noonan D. M., Albini A. (2010): The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *Journal of Translational Medicine* **8**: 112.
- Carethers J. M., Jung B. H. (2015): Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* **149**: 1177–1190.
- Cooper G. M., Hausman R. E. (2004): Stanica: Molekularni pristup, 3. izd. Preveo s engleskog jezika: Lauc G. Rak. Zagreb: Medicinska naklada, str. 632-634.

- Davoodi H., Seow H. F. (2011): Variant Toll-like receptor 4 (Asp299Gly and Thr399Ile alleles) and Toll-like receptor 2 (Arg753Gln and Arg677Trp alleles) in colorectal cancer. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* **10**: 91-99.
- Dienstmann R., Vermeulen L., Guinney J., Kopetz S., Tejpar S., Tabernero J. (2017): Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer* **17**:79-92.
- Ding L., Jiang Q., Li G., Shen J., Du J., Lu X., Xiong X. (2017): Comprehensive assessment of association between TLR4 gene polymorphisms and cancer risk: a systematic meta-analysis. *Oncotarget* **8**: 100593-100602.
- El-Omar E. M., Ng M. T., Hold G. L. (2008): Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene* **27**: 244–252.
- Fearon E. R., Vogelstein B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-767.
- Ferwerda B., McCall M. B., Alonso S., Giamarellos-Bourboulis E. J., Mouktaroudi M., Izagirre N., Syafruddin D., Kibiki G., Cristea T., Hijmans A., Hamann L., Israel S., ElGhazali G., Troye-Blomberg M., Kumpf O., Maiga B., Dolo A., Doumbo O., Hermsen C. C., Stalenhoef A. F., van Crevel R., Brunner H. G., Oh D. Y., Schumann R. R., de la Rúa C., Sauerwein R., Kullberg B. J., van der Ven A. J., van der Meer J. W., Netea M. G. (2007): *TLR4* polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *PNAS* **104**: 16645-16650.
- Fukata M., Shang L., Santaolalla R., Sotolongo J., Pastorini C., España C., Ungaro R., Harpaz N., Cooper H. S., Elson G., Kosco-Vilbois M., Zaias J., Perez M. T., Mayer L., Vamadevan A. S., Lira S. A., Abreu M. T. (2011): Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis. *Inflammatory bowel diseases* **17**: 1464–1473.

- Fukata M., Hernandez Y., Conduah D., Cohen J., Chen A., Breglio K., Goo T., Hsu D., Xu R., Abreu M. T. (2009): Innate immune signaling by Toll-like receptor-4 (TLR4) shapes the inflammatory microenvironment in colitis-associated tumors. *Inflammatory bowel diseases* **15**: 997-1006.
- Garza-Gonzalez E., Bosques-Padilla F. J., Mendoza-Ibarra S. I., Flores-Gutierrez J. P., Maldonado-Garza H. J., Perez-Perez G. I. (2007): Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC Cancer* **7**: 70
- Goel M. K., Khanna P., Kishore J. (2010): Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. *International journal of Ayurveda research* **1**: 274-278.
- Grivennikov S. I., Greten F. R., & Karin M. (2010): Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**: 883-899.
- Gryfe R., Bapat B., Gallinger S., Swallow C., Redston M., Couture J. (1997): Molecular biology of colorectal cancer. *Current Problems in Cancer* **21**: 235-299.
- Gustafson W.C., Weiss W. A. (2010): Myc proteins as therapeutic targets. *Oncogene* **29**: 1249–1259.
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**: 646-674.
- Hold G. L., Rabkin C. S., Chow W. H., Smith M. G., Gammon M. D., Risch H. A., Vaughan T. L., McColl K. E., Lissowska J., Zatonski W., Schoenberg J. B., Blot W. J., Mowat N. A., Fraumeni J. F. Jr, El-Omar E. M. (2007): A functional polymorphism of Toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors. *Gastroenterology* **132**: 905-912.
- Jing J. J., Li M., Yuan Y. (2012): Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in cancer: A meta-analysis. *Gene* **499**: 237-242.

- Kawai T., Akira S. (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* **11**: 373-384.
- Korneev K. V., Atretkhany K. S. N., Drutskaya M. S., Grivennikov S. I., Kuprash D. V., Nedospasov S. A. (2017): TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. *Elsevier* **89**: 127-135.
- Kutikhin A. G. (2010): Impact of Toll-like receptor 4 polymorphisms on risk of cancer. *Human immunology* **72**: 193-206.
- Landi S., Gemignani F., Bottari F., Gioia-Patricola L., Guino E., Cambray M., Biondo S., Capella G., Boldrini L., Canzian F., Moreno V. (2006): Polymorphisms within inflammatory genes and colorectal cancer. *Journal of Negative Results in BioMedicine* **5**: 15.
- Lee S. H., Hu L. L., Gonzalez-Navajas J., Seo G. S., Shen C., Brick, J., Herdman S., Varki N., Corr M., Lee J., Raz, E. (2010): ERK activation drives intestinal tumorigenesis in *Apc(min/+)* mice. *Nature medicine* **16**: 665-670.
- Li T. T., Ogino S., Qian Z. R. (2014): Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: carcinogenesis to cancer therapy. *World journal of gastroenterology*, **20**: 17699-17708.
- Li X. X., Sun G. P., Meng J., Li X., Tang Y. X., Li Z., Wang M. F., Liang G. F., Lu X. B. (2014): Role of toll-like receptor 4 in colorectal carcinogenesis: a meta-analysis. *PloS one*, **9**: e93904.
- Lu Y. C., Yeh W. C., Ohashi P. S. (2008): LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**:145-151.
- McConnell B. B., Yang V. W. (2009): The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Current colorectal cancer reports* **5**: 69-74.

- Migliore L., Migheli F., Spisni R., Coppedè F. (2011): Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**: 792362.
- Mogoantă S. Ş., Vasile I., Totolici B., Neamţu C., Streba L., Busuioc C. J., Mateescu G. O. (2014): Colorectal cancer – clinical and morphological aspects. *Romanian Journal of Morphology & Embryology* **55**:103–110
- Oblak A., Jerala R. (2011): Toll-like receptor 4 activation in cancer progression and therapy. *Clinical & developmental immunology* **2011**: 609579.
- Pandey S., Mittal R. D., Srivastava M., Srivastava K., Singh S., Srivastava S., Mittal B. (2009): Impact of Toll-like receptors [TLR] 2 (–196 to –174 del) and TLR 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in cervical cancer susceptibility in North Indian women. *Gynecologic Oncology* **114**: 501-505.
- Pecorino L. (2012): *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets and Therapeutics*, 3rd ed. Introduction. Oxford: Oxford University Press, str. 2-3.
- Petrelli F., Tomasello G., Borgonovo K., Ghidini M., Turati L., Dallera P., Passalacqua R., Sgroi G., Barni S. (2017): Prognostic survival associated with left-sided vs right-sided colon cancer: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncology* **3**: 211-219.
- Pimentel-Nunes P., Teixeira A. L., Pereira C., Gomes M., Brandão C., Rodrigues C., Gonçalves N., Boal-Carvalho I., Roncon-Albuquerque R. Jr, Moreira-Dias L., Leite-Moreira A. F., Medeiros R., Dinis-Ribeiro M. (2013): Functional polymorphisms of Toll-like receptors 2 and 4 alter the risk for colorectal carcinoma in Europeans. *Digestive and Liver Disease* **45**: 63-69.
- Pritchard C. C., Grady W. M. (2010): Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* **60**: 116-129.

- Proença M. A., de Oliveira J. G., Cadamuro A. C., Succi M., Netinho J. G., Goloni-Bertolo E. M., Pavarino É. C., Silva A. E. (2015): *TLR2* and *TLR4* polymorphisms influence mRNA and protein expression in colorectal cancer. *World journal of gastroenterology* **21**: 7730-7741.
- Rakoff-Nahoum S., Medzhitov R. (2007): Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science* **317**: 124-127.
- Raskov H., Burcharth J., Pommegaard H. C. (2017): Linking Gut Microbiota to Colorectal Cancer. *Journal of Cancer* **8**: 3378-3395.
- Schröder N. W., Schumann R. R. (2005): Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *The Lancet Infectious Diseases* **5**:156-164.
- Semlali A., Parine N. R., Arafah M., Mansour L., Azzi A., Al Shahrani O., Al Amri A., Shaik J. P., Aljebreen A.M., Alharbi O., Almadi M.A., Azzam N.A., Kohailan M., Rouabhia M., Alanazi M.S., (2016): Expression and Polymorphism of Toll-Like Receptor 4 and Effect on NF- $\kappa$ B Mediated Inflammation in Colon Cancer Patients. *PloS one* **11**: e0146333.
- Sipos F., Fúri I., Constantinovits M., Tulassay Z., Múzes G. (2014): Contribution of TLR signaling to the pathogenesis of colitis-associated cancer in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology* **20**: 12713-12721.
- Sun J., Kato I. (2016): Gut microbiota, inflammation and colorectal cancer. *Genes & diseases* **3**: 130-143.
- Szumilas M. (2010): Explaining odds ratios. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry = Journal de l'Academie canadienne de psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent* **19**: 227-229.
- Tartey S., Takeuchi O. (2017): Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. *International Reviews of Immunology* **36**: 57-73.



Theodoropoulos G. E., Saridakis V., Karantanos T., Michalopoulos N. V., Zagouri F., Kontogianni P., Lymperi M., Gazouli M., Zografos G. C. (2012): Toll-like receptors gene polymorphisms may confer increased susceptibility to breast cancer development. *Breast* **21**:534-538.

Vaure C, Liu Y. (2014): A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol* **5**: 316.10.3389/fimmu.2014.00316.

Wang E. L., Qian Z. R., Nakasono M., Tanahashi T., Yoshimoto K., Bando Y., Kudo E., Shimada M., Sano T. (2010): High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *British journal of cancer* **102**: 908-915.

Yesudhas D., Gosu V., Anwar M. A., Choi S. (2014): Multiple roles of toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Front Immunol* **5**: 334.

Zhang K., Zhou B., Wang Y., Rao L., Zhang L. (2013): The TLR4 gene polymorphisms and susceptibility to cancer: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer* **49**: 946-954.

Zhao X., Kang S., Liu L., Zhang D. (2012): Correlation of Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in toll-like receptor 4 gene with digestive cancer risk: A meta-analysis. *Biomedical reports* **1**: 294-302.

<http://www.advmoloncolres.com/index.php/AMOR/announcement/view/47> [03.12.2018.]

<https://newsnetwork.mayoclinic.org/discussion/colon-cancer-prevention-webinar-wed-march-25-at-1200-p-m-ct/> [21.12.2018.]

[https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC4052302\\_marinedrugs-12-02485-g010&req=4](https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC4052302_marinedrugs-12-02485-g010&req=4)  
[06.12.2018.]

## Životopis

Rođena sam 6.7.1993. godine u Zagrebu, Republika Hrvatska.

Školovanje sam započela 2000 godine u osnovnoj školi "Sesvetski Kraljevec" u Sesvetskom Kraljevcu. Sve razrede osnovne škole završila sam s odličnim uspjehom. Tijekom osnovne škole pohađala sam tečaj engleskog jezika u školi stranih jezika "Mikić".

Godine 2008. upisala sam prvi razred Druge gimnazije u Zagrebu.

Na osnovi odličnog uspjeha tijekom cijelog srednjoškolskog obrazovanja i položenih ispita državne mature 2012. godine upisala sam Prirodoslovno matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu studijski program Biologija. Položila sam sve propisane ispite, stekla 180 ECTS bodova te uspješno završila seminarski rad naslova "Inhibitori imunosupresije u terapiji tumora". Godine 2015. završila sam sveučilišni preddiplomski studij Biologije i stekla akademski naziv sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) biologije.

Diplomski studij Molekularne biologije upisala sam 2015. godine. Godine 2017. odradila sam laboratorijsku stručnu praksu u Kliničkom bolničkom centru Zagreb na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku pod vodstvom prim. dr. Sc. Sanje Davidović Mrsić, dr. med. Tijekom diplomskog studija učlanila sam se u Hrvatsko društvo za istraživanje raka te sam sudjelovala na seminarima iz područja molekularne i stanične biologije.