

UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH

Lekárska fakulta

Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF



**Nové poznatky v SMAD dependentnej dráhe
transformujúceho rastového faktora
u pacientov s kolorektálnym karcinómom**

RNDr. Jana Mašlanková, PhD.

Košice 2023

Nové poznatky v SMAD dependentnej dráhe transformujúceho rastového faktora u pacientov s kolorektálnym karcinómom

Vedecká monografia

Autorka:

RNDr. Jana Mašlanková, PhD.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach

Recenzenti:

prof. MUDr. Dušan Dobrota, CSc.

Ústav lekárskej biochémie, Jeseniova lekárska fakulta UK v Bratislave

doc. MVDr. Zuzana Kostecká, PhD.

Katedra chémie, biochémie a biofyziky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Vedecký redaktor:

prof. Ing. Mária Mareková, CSc.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach

Tento text je publikovaný pod licenciou CC BY NC ND Creative Commons Attribution-



NonCommercial-No-derivates 4.0 („Uved'te pôvod – Nepoužívajte komerčne - Nespracovávajújte“)

Za odbornú a jazykovú stránku monografie zodpovedá autor. Rukopis neprešiel redakčnou ani jazykovou úpravou.

Dostupné od: 22.09.2023

Umiestnenie: www.unibook.upjs.sk

ISBN 978-80-574-0238-1 (e-publikácia)

Predhovor

Vážení čitatelia!

Kolorektálny karcinóm je najčastejším zhubným nádorom tráviaceho ústrojenstva a vzrastajúci trend jeho výskytu na Slovensku, hlavne v mužskej populácii je alarmujúci. Hoci sa dosiahol významný pokrok v diagnostike, skríningu a liečbe pacientov s pokročilým kolorektálnym karcinómom, terapeutické možnosti sú stále obmedzené, čo si vyžaduje objavenie ďalších markerov, ktoré budú pôsobiť ako prognostické prediktory.

Cieľom monografie je pritiahnúť pozornosť odbornej verejnosti k dôležitej úlohe a postaveniu TGF- β signálnej dráhy v procese iniciácie, rozvoja a liečbe kolorektálneho karcinómu. Pomerne rozsiahla kapitola sa sústreďí skôr na všeobecne menej známe, nové trendy a klinické štúdie prebiehajúce u pacientov s kolorektálnym karcinómom. Táto monografia má ambíciu vytvoriť vyvážený materiál, ktorý by bol zaujímavým informačným zdrojom nielen pre lekárov špecialistov, ale aj pre poslucháčov lekárskech fakúlt.

Autor

Pod'akovanie:

Moje veľké pod'akovanie patrí RNDr. Ivane Večurkovskej, ktorá mi pomohla pri grafickej úprave obrázkov, ktoré sú súčasťou tejto monografie.

Obsah

ÚVOD.....	1
MOLEKULÁRNE CESTY KOLOREKTÁLNEJ KARCINOGENÉZY.....	1
VPLYV GENOMICKÝCH ABERÁCIÍ NA VZNIK CRC.....	4
TGF-B A JEHO ÚLOHA V SUPRESII NÁDORU.....	6
TGF-B A JEHO ÚLOHA V PROGRESII NÁDORU.....	8
TGF- B V PROCESE FIBRÓZY.....	9
EMT INDUKOVANÁ SIGNÁLNOU DRÁHOU TGF- β PRI PROGRESII RAKOVINY.....	11
LIGANDY SUPERRODINY TGF- β	12
TGF- β RECEPTORY.....	13
SIGNÁLNE DRÁHY TGF- β	13
SMAD PROTEÍNY.....	15
POST-TRANSLAČNÁ MODIFIKÁCIA SMAD PROTEÍNOV.....	17
ÚLOHA SMADs V EXPRESII GÉNOV.....	18
ÚLOHA SMADs V TRANSKRIPCII A POST-TRANSKRIPČNEJ REGULÁCII.....	18
ÚLOHA SMAD2 A SMAD 3 V KARCINOGENÉZE CRC.....	19
ÚLOHA SMAD 4 V KARCINOGENÉZE CRC.....	20
ÚLOHA SMAD7 V KARCINOGENÉZE CRC.....	22
REGULÁCIA SIGNÁLNEJ DRÁHY TGF- β NEKÓDUJÚCIMI RNA.....	24
lncRNA AKO REGULÁTORY V CRC.....	24
miRNAs AKO REGULÁTORY V CRC.....	25
circRNAs AKO REGULÁTORY V CRC.....	27
TGF- β SIGNÁLNA DRÁHA V LIEČBE CRC.....	28
ANTI-TGF- β TERAPIA.....	30
MEDIKAMENTÓZNA LIEČBA, TERAPEUTICKÉ STRATÉGIE ZALOŽENÉ NA REGULÁCII SIGNÁLNEJ DRÁHY TGF-B/SMAD.....	38
ZÁVER.....	40
LITERATÚRA.....	41

ZOZNAM SKRATIEK

APC	adenatózna polypóza
ASO	antisense oligonukleotidy
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CABLES1	Cdk5 And Abl Enzyme Substrate 1
CDK	cyklín-dependentná kináza
CIMP	metylácia ostrova CpG
CIN	chromozomálna nestabilita
circRNA	kruhovú RNA (),
CRC	kolorektálny karcinóm
CTL	cytotoxická odpoveď T lymfocytov
DCC	DCC Netrin 1 Receptor
EGF	epidermálny rastový faktor
EGFR	receptor epidermálneho rastového faktora
EMT	epiteliálno-mezenchymálny prechod
FAS	receptor smrti
FDA	food and Drug Administration
ICI	inhibítory imunitného kontrolného bodu
I-SMAD	inhibičné SMAD
IL	interleukíny
lncRNA	dlhé ncRNA
LOH	strata heterozygotnosti
miRNA	mikroRNA
MMP	matrixové metaloproteinázy
MSI	nestabilita mikrosatelitov DNA
ncRNA	nekódujúce RNA
ROS	reaktívne formy kyslíka
SCNA	nízka prevalencia somatických zmien v počte kópií
SMAD2	mothers against decapentaplegic homolog 2
SMAD4	mothers against decapentaplegic homolog 4
TGF-β	transformujúci rastový faktor- β
TGFβRII	receptor TGF- β typu II
5-FU	fluorouracil

Úvod

Slovensko patrí dlhodobo medzi päť krajín s najvyššou incidenciou kolorektálneho karcinómu (CRC) na celom svete a táto miera naďalej každým rokom stúpa (Xi a kol., 2021). Hoci sa dosiahol významný pokrok v diagnostike, skríningu a liečbe pacientov s pokročilým CRC, terapeutické možnosti sú stále obmedzené, čo si vyžaduje objavenie ďalších markerov, ktoré budú pôsobiť ako prognostické prediktory (Lech a kol., 2016). Väčšina prípadov CRC (60 – 65 %) je sporadická (bez rodinnej anamnézy) a vzniká v dôsledku somatických mutácií a epigenetických zmien v dôsledku faktorov ako sú napr. obezita, alkoholizmus a fajčenie (Ahmad a kol., 2021).

MOLEKULÁRNE CESTY KOLOREKTÁLNEJ KARCINOGENÉZY

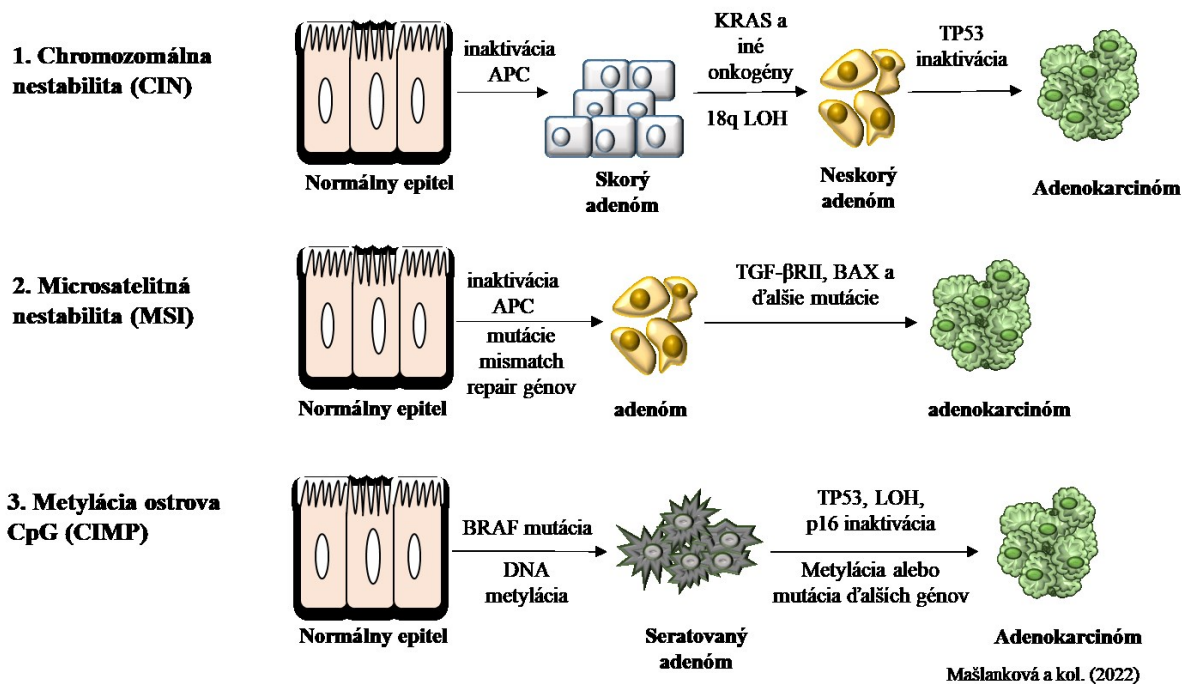
CRC môže vzniknúť tromi genetickými a epigenetickými aberáciami: chromozomálnou nestabilitou (CIN; 65 – 85 %), metyláciou ostrova CpG (CIMP; 10 – 20 %) a nestabilitou mikrosatelitov DNA (MSI; 12 – 15 %) (Obr.1) (Wang a kol., 2019).

CIN je spôsobená ziskom alebo stratou celých alebo veľkých častí chromozómov, a tak dochádza k variabilite karyotypu medzi bunkami. CIN vedie k chromozómovej nerovnováhe (aneuploidii), subchromozomálnej genómovej amplifikácii a strate heterozygotnosti (LOH) (Pino a kol., 2014). U kolorektálnych nádorov sa alelická strata na chromozóme vyskytuje najčastejšie (80 %) na dlhom ramene chromozómu 18q, po ktorej nasleduje LOH na chromozóme 17p (75 % – 80 %), 8p (40 %), 5q (30 %), a 22q (20 % – 30 %). Alelická strata na chromozóme 18q vykazuje silnú koreláciu so zlou prognózou (Nguyen a kol., 2018, Wang a kol., 2010). Na chromozóme 18q existuje veľa génov supresorov nádorov, vrátane SMAD2 (mothers against decapentaplegic homolog 2), SMAD4 (mothers against decapentaplegic homolog 4), DCC (DCC Netrin 1 Receptor) a CABLES1 (Cdk5 And Abl Enzyme Substrate 1) (Vacante a kol., 2018). Medzi najčastejšie príčiny straty heterozygotnosti patria mutácie v génoch SMAD2 a SMAD4, ktoré sú intracelulárnymi mediátormi bunkovej signalizácie aktivovanej rastovými faktormi superrodiny TGF- β (transformujúci rastový faktor- β) (Samanta a kol., 2012).

Mikrosatelitná nestabilita (MSI) je spôsobená hypermutabilným fenotypom v dôsledku straty DNA opravného mechanizmu (mismatch repair – MMR) (Mármol a kol., 2017). Schopnosť opraviť krátke reťazce DNA alebo tandemové opakovania (2 – 5 párov báz opakovania) je u nádorov s mikrosatelitnou nestabilitou znížená; preto majú mutácie v týchto regiónoch tendenciu hromadiť sa. Tieto mutácie môžu ovplyvniť mikrosatelity, ktoré sa nachádzajú v nekódujúcej alebo kódujúcej oblasti DNA, čo vedie k zmene expresie onkogénov

alebo nádorových supresorových génov. Strata expresie môže byť spôsobená hypermetyláciou promótoru alebo mutáciami, ako napr. pri Lynchovom syndróme. Tieto nádory sú hlavne diploidné a obsahujú menej LOH. Najčastejšie gény, zmutované v týchto nádoroch sú MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 a PMS2 (gény kódujúce proteíny potrebné pri opravách DNA) (Piersma a kol., 2020). Nádory s MSI patria väčšinou k dedičným typom (hereditary) a majú lepšiu prognózu ako sporadické nádory. 10–15 % sporadických kolorektálnych karcinómov však bude mať MSI. Mikrosatelitné nestabilné nádory možno rozdeliť do dvoch odlišných fenotypov MSI: MSI-high (MSI-H) a MSI-low (MSI-L) (Andre a kol., 2021, De'Angelis a kol., 2018).

Epigenetická nestabilita (CIMP) vzniká ako následok metylácie CpG ostrovčekov v promótorovej oblasti génu, čo môže ovplyvniť transkripčný proces a následne expresiu génu. Pri kolorektálnom karcinóme dochádza k metylácii génov na opravu DNA, génov kódujúcich proteíny WNT signalizačnej dráhy alebo génov, ktoré kódujú proteíny podieľajúce sa na regulácii bunkového cyklu. Pri kolorektálnom karcinóme sú metylované iné promótory génov ako u iných typov nádorov, čo naznačuje, že existuje selektívny proces, ktorý riadi výskyt metylovaných génov v rôznych typoch nádorov. Bolo identifikovaných niekoľko génov – APC, AXIN2, DKK1, HPP1, TUSC3, p16, SFRP1, SFRP2 a SFRP4, pri ktorých boli zistené významné rozdiely v úrovniach metylácie génov medzi pacientmi s novotvarmi hrubého čreva a bez nich. Tieto zmeny v metyláciách génov pozitívne korelujú s vekom (Lao a kol., 2011). Metylačný stav génov na opravu DNA, ako sú MGMT a MLH1, môže tiež korelovať so špecifickými mutáciami v nádoroch, ako sú mutácie KRAS alebo mikrosatelitová nestabilita. To naznačuje, že epigenetické zmeny vytvárajú predispozíciu vzniku špecifických mutácií, ku ktorým dochádza pri kolorektálnom karcinóme (Wang a kol., 2018, Reynolds a kol., 2019, Gallois a kol., 2016).



Obr.1 Genetické a epigenetické aberácie tvorby kolorektálneho karcinómu

Táto klasifikácia založená na jedinom molekulárnom markeri je pri včasnej diagnostike CRC nepostačujúca, preto bola navrhnutá kombinácia niekoľkých molekulárnych markerov. Konzorcium pre typizáciu kolorektálneho karcinómu (CRC Subtyping Consortium) navrhlo stratifikáciu CRC do nasledujúcich štyroch molekulárnych subtypov (CMS) (Guinney a kol., 2015, Fontana a kol., 2019) (Tab. 1).

Tabuľka 1 Charakteristiky jednotlivých podtypov CRC

CMS1 (13 %) (MSI imunitný)	CMS2 (37 %) (kanonický)	CMS3 (13 %) (metabolický)	CMS4 (23 %) (mezenchymálny)
vysoký výskyt CIMP hypermetylácia SCNA nízka	CIN SCNA – vysoká	nízky výskyt CIN, CIMP SCNA – stredná	CIN SCNA – vysoká
BRAF mutácie		KRAS mutácie	
imunitná aktivácia	WNT, MYC aktivácia	metabolická dysregulácia	TGF-β aktivácia
horšie prežívanie po relapse	vynikajúce prežívanie po relapse		horšie prežívanie bez relapsu a celkové prežívanie

CMS1 je zvyčajne pravostranný (proximálny) nádor, bežne diagnostikovaný u žien vo vyššom veku a je spojený s horším prežívaním po relapse. Tento podtyp je charakterizovaný hypermetyláciou ostrovčekov CpG, ktorá spôsobuje stratu supresorovej funkcie nádoru a má nízku prevalenciu somatických zmien v počte kópií (SCNA) (Guinney a kol., 2015).

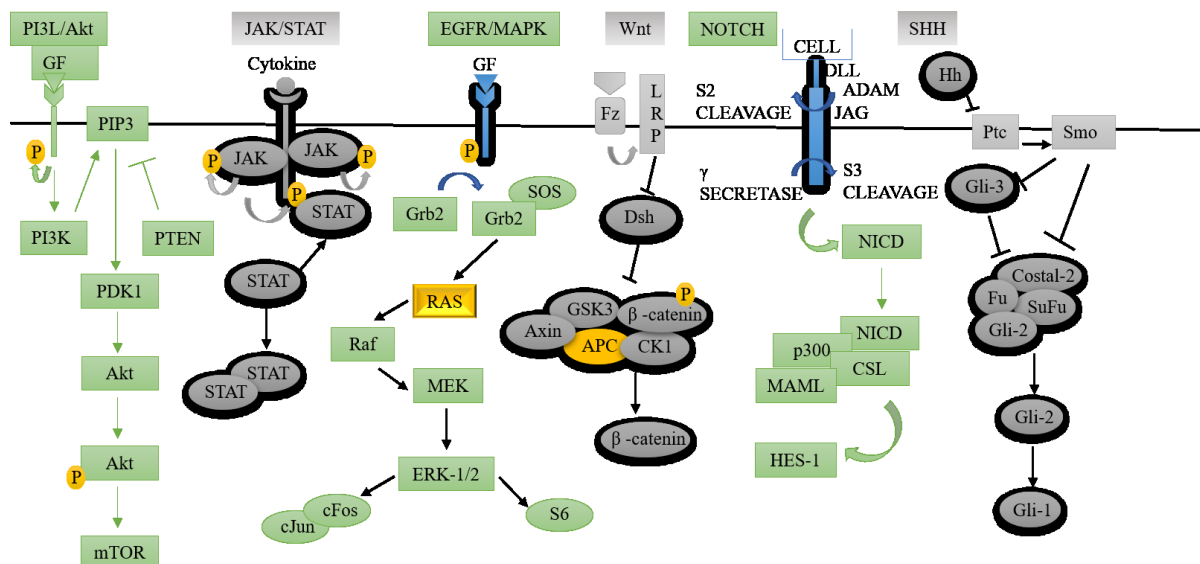
CMS2 je lokalizovaný hlavne na ľavej strane (distálna časť hrubého čreva) a je často diagnostikovaný u mužov s lepšou prognózou a vyššou mierou prežitia aj po recidíve. Tento profil génovej expresie je charakterizovaný nízkou mierou mutácií. CMS2 predstavuje molekulárny subtyp, pri ktorom dochádza k nadmernej aktivácii epidermálneho rastového faktora (EGF) s vyššou expresiou receptora epidermálneho rastového faktora (EGFR) (Stintzing a kol., 2019). Guinney a spol. detegovali častejšie prírastky počtu kópií v onkogénoch a straty v tumor supresorových génoch v CMS2 ako v iných podtypoch (Guinney a kol., 2015).

CMS3 je pravostranný podtyp a je najčastejšie diagnostikovaný u pacientov s evidentným metabolickým ochorením (Cai a kol., 2017). Hoci mutácia KRAS je prítomná v každom molekulárnom podtype, v tejto podskupine sa vyskytuje častejšie (Guinney a kol., 2015).

Nádory CMS4 sú prevažne lokalizované na ľavej strane, vykazujú extrémne nízku úroveň hypermutácie, dochádza u nich častejšie k aktivácii dráhy tkanivového rastového faktora (TGF- β), vďaka čomu sú viac chemorezistentné (Stintzing a kol., 2019). K diagnostike týchto typov nádorov dochádza prevažne v pokročilejších štádiách (III a IV), na rozdiel od relatívne priaznivej prognózy, ktorá sa spája s diagnostikou subtypov CMS1 a CMS2 (Guinney a kol., 2015). Základné charakteristiky jednotlivých podtypov CRC sú zhrnuté v tabuľke 1.

VPLYV GENOMICKÝCH ABERÁCIÍ NA VZNIK CRC

Nové genómové techniky umožnili identifikáciu veľkého počtu genómových aberácií zapojených do vzniku a šírenia kolorektálneho karcinómu. Aj keď sú mutácie hlavnou zmenou v genóme, v CRC možno často nájsť aj niekoľko chromozomálnych zmien a translokácií. Všetky tieto aberácie ovplyvňujú dôležité dráhy (WNT, MAPK/PI3K, TGF- β) a funkcie v bunke (TP53 a regulácia bunkového cyklu) (Obr. 2) (Mármol a kol., 2017).



Obr.2. Dôležité dráhy, ktoré sa zúčastňujú na vzniku a šírení kolorektálneho karcinómu (TGF- β je podrobnejšie na ďalších obr.)

Dráha WNT hrá kľúčovú úlohu v diferenciácii kmeňových buniek a bunkovom raste. Zmeny v tejto dráhe preto môžu regulovať vývoj nádoru. Hlavnou genómovou aberáciou v CRC súvisiacou s dráhou WNT sú mutácie génu APC (adenomatous polyposis coli). Napriek tomu, že ide o najbežnejší mutovaný gén, APC nie je zaručeným prognostickým markerom pre CRC kvôli vysokej frekvencii mutácií medzi prípadmi CRC a širokému rozsahu mutácií zistených v tomto géne (Herzig a kol., 2015). β -Catenin, ktorý sa tiež podieľa na regulácii v dráhe WNT, nie je vhodným prognostickým markerom, pretože pri CRC je nadmerne exprimovaný (Yuan a kol., 2020). Nadmerná expresia c-MYC, ktorá sa spúšťa aktiváciou dráhy WNT, sa však považuje za marker metastáz a dobrý prognostický faktor súvisiaci s prežívaním (Yang a kol., 2021).

Dráhy MAPK a PI3K sa podieľajú na bunkovej proliferácii a prežívaní pacientov s kolorektálnym karcinómom. Zmeny ovplyvňujúce tieto dráhy preto poskytujú proliferačné výhody nádorovým bunkám. Mutácie KRAS, BRAF a PIK3CA (PI3K) sú najbežnejším typom mutácií v CRC. Mutácie v kodóne 13 exónu 2 KRAS sú spojené so zlou prognózou, ako aj s nižším prežívaním, zatiaľ čo mutácie v kodóne 12 exónu 2 sú spojené s pokročilejšími nádormi a tvorbou metastáz (Timar a kol., 2020, Li a kol., 2015). Mutácie génu BRAF sú spájané tiež so zlou prognózou s nižšou mierou prežívania a to najmä u nádorov s mikrosatelitnou nestabilitou. Hoci BRAF V600E, ktorá je najbežnejšou mutáciou BRAF u mnohých typov rakoviny, je slabým prognostickým faktorom, je napriek tomu sľubným cieľom pre personalizovanú medicínu a kombinácia špecifických inhibítorov BRAF V600E s inými

inhibítormi dráhy MAPK/PI3K sa ukázala byť účinnejšia v liečbe CRC. Hoci boli pri kolorektálnom karcinóme detegované aj mutácie v géne PIK3CA, vzťah medzi výsledkom mutácie PIK3CA a CRC nie je tak dobre preukázaný. Napriek tomu sú mutácie PIK3CA spojené s horšou prognózou, ak sú sprevádzané mutáciami KRAS (Jiang a kol., 2021). Podobne, nádory s kombinovanými mutáciami v exónoch 9 a 20 PIK3CA majú horšiu prognózu, ako nádory s iba jednou z týchto mutácií (Voutsadakis a kol., 2021). Okrem toho strata PTEN, ktorá downreguluje dráhu PI3K v primárnych nádoroch, významne súvisí so zvýšeným rizikom smrti a so slabým prežívaním pacientov s kolorektálnym karcinómom (Codrich a kol., 2021).

Dráha TGF- β zohráva dôležitú úlohu v základných bunkových procesoch, ako je rast, diferenciácia alebo apoptóza. Strata 18q je jednou z hlavných genómových aberácií súvisiacich s dráhou TGF- β pri kolorektálnom karcinóme. Chromozóm 18q kóduje dva dôležité tumor supresorové gény známe ako SMAD2 a SMAD4, ktorých strata vedie k schopnosti vyhnúť sa apoptóze a dysregulácii bunkového cyklu. Súčasná štúdia ukazuje, že existuje slabá korelácia medzi zlou prognózou/kratšou mierou prežitia a stratou 18q chromozómu (van Dijk a kol., 2022).

TGF- β A JEHO ÚLOHA V SUPRESII NÁDORU

Cytostatická úloha

Signálna dráha TGF- β reguluje bunkovú proliferáciu hlavne inhibíciou progresie bunkového cyklu, jeho zastavením vo fáze G1. Vo väčšine epitelových, endotelových a hematopoetických buniek k tomuto zastaveniu dochádza prostredníctvom aktivácie inhibítorov *cyklín-dependentných kináz* (CDK), ako sú p21^{CIP1} a p15^{INK4b}. p15^{INK4b} inhibuje tvorbu komplexov cyklínu D s CDK4 alebo CDK6 a p21^{CIP1} inhibuje tvorbu komplexov cyklínu E alebo cyklínu A s CDK2. SMAD3/SMAD4 vytvárajú komplex s transkripčnými faktormi FoxO, a regulujú transkripciu väzbou na promótoru génu CDKN2B, ktorý kóduje p15^{INK4b}, a promótoru génu CDKN1A, ktorý kóduje p21^{CIP1} (Seoane a kol., 2017).

TGF- β stimuluje expresiu p21^{CIP1} v T bunkách, p57^{Kip2} v hematopoetických kmeňových/progenitorových bunkách a p15^{INK4b} a p21^{CIP1} v astrocytoch a nervových progenitorových bunkách. Konkrétne inhibítory CDK zapojené do cytostatickej odpovede na TGF- β teda závisia od typu bunky.

TGF- β signálna dráha sa podieľa tiež na inhibícií transkripcie onkogénu c-Myc, proteínových inhibítorov, ktoré sa viažu na DNA (ID1,2,3) a jadrových faktorov, ktoré hrajú

kľúčovú úlohu v diferenciacii buniek a progresii z G1 do S fázy bunkového cyklu (Seoane a kol., 2017).

c-Myc je kľúčovým transkripčným induktorom bunkového rastu a delenia. V keratinocytoch a epiteliálnych bunkách mliečnej žľazy, je down-regulácia Myc expresie sprostredkovaná proteínovým komplexom indukovaným TGF- β , ktorý je zložený zo SMAD3, SMAD4, transkripčných faktorov p107, E2F4 alebo E2F5 a CCAAT/enhancer viažuceho proteínu b (C/EBPb) (Gomis a kol., 2006).

Na antiproliferatívnej odpovedi sa tiež podieľajú TGF- β signálne dráhy nezávislé od SMAD. Napríklad TGF- β indukuje defosforyláciu p70S6K pomocou PP2A, čo vedie k zastaveniu bunkového cyklu (Petritsch a kol., 2000).

Bunková diferenciacia a apoptóza

Signálna dráha TGF- β /SMAD môže prostredníctvom transkripčnej represie alebo aktivácie rôznych génov spôsobiť zmeny v bunkovej diferenciacii.

TGF- β podporuje diferenciaciu mezenchymálnych prekursorov na fibroblasty a myofibroblasty na úkor diferenciacie adipocytov, myocytov a osteoblastov (Frangogiannis a kol., 2020).

Kanonická signálna dráha TGF- β indukuje v rôznych typoch buniek apoptózu, moduláciou expresie členov rodiny Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), aktiváciou receptora smrti FAS, zvýšením expresie *proteinkinázy* DAPK (Death-associated protein kinase 1), signálneho faktora GADD45b (Growth Arrest and DNA Damage Inducible Beta). V hepatocytoch a B lymfocytoch podporuje TGF- β signálna dráha apoptózu prostredníctvom SMAD3-dependentnej transkripcie génu, ktorý kóduje *fosfatázu* MKP2, a tak zvyšuje proapoptotický účinok proteínu Bim (člen rodiny Bcl-2) (Baba a kol., 2022).

Wang a kol. (2008) popísali dôležitú úlohu TGF- β signálnej dráhy v inhibícii expresie survivínu (najmenší člen rodiny inhibítorov apoptózy), ako aj aktivity Akt v bunkách CRC, čo viedlo k apoptóze

Ďalší proapoptický účinok signálnej dráhy TGF- β /SMAD je spojený s nádorovým supresorom p53 (Farooqi a kol., 2019).

Signálna dráha TGF- β môže indukovať bunkovú smrť aj prostredníctvom produkcie reaktívnych foriem kyslíka (ROS), potlačením expresie antioxidantných génov alebo aktiváciou expresie *NADPH oxidázy* 4 (NOX4). Takáto produkcia ROS môže podporovať apoptózu moduláciou rôznych členov rodiny Bcl-2 (Tang a kol., 2018).

TGF- β A JEHO ÚLOHA V PROGRESII NÁDORU

V niektorých prípadoch, nádorové bunky podliehajú somatickým mutáciám alebo epigenetickým modifikáciám v génoch, ktoré kódujú zložky TGF- β /SMAD signálnej dráhy, čo zapríčiňuje stratu protinádorovej funkcie cytokínu TGF- β . K takýmto nádorom patria aj kolorektálne karcinómy. V iných typoch nádorov nie sú zložky dráhy prenosu signálu TGF- β ovplyvnené, ale bunky sa stávajú špecificky rezistentnými voči antiproliferatívnej odpovedi na TGF- β . Pri rakovine prsníka a prostaty, gliómoch, melanómoch a hematopoetických neopláziách je cytostatický efekt tohto cytokínu selektívne narušený (Seoane a kol., 2017).

Selektívne zlyhávanie protinádorovej odpovede

Pri cytostatickej odpovedi génov p15INK4b a p21CIP1, ovplyvnenej signálnou dráhou TGF- β /SMAD zohrávajú transkripčné faktory FoxO, C/EBP a Miz-1 úlohu SMAD kofaktorov. FoxO (forkhead box class O) uľahčuje väzbu komplexu SMAD na promótor CDKN1A, zatiaľ čo C/EBP (CCAAT/enhancer binding proteins) a Miz-1 (Myc-interacting protein 1) vykonávajú podobnú úlohu v kontexte promótoru CDKN2B.

FoxO je regulovaný inými signálnymi kaskádami, ako je napríklad dráha PI3K-Akt, ktorá môže inhibovať vytvorenie jadrového komplexu FoxO-SMAD. Preto pri nádoroch s vysoko aktívnou PI3K-Akt dráhou je znížená expresia p21CIP1, čím sa blokuje cytostatická odpoveď indukovaná TGF- β signálnou dráhou (Laissue a kol., 2019).

Miz-1 väzbou na oblasť promótorov CDKN2B a CDKN1A, vytvára komplex s c-Myc, a jeho úloha aktivátora transkripcie sa mení na úlohu represora transkripcie. V nádoroch, ktoré nadmerne exprimujú Myc, nedochádza k expresii p15INK4b, pretože represívny komplex MycMiz-1 sa nachádza blízko miest iniciácie transkripcie CDKN2B a CDKN1A, čím sa znižuje cytostatická odpoveď indukovaná TGF- β signálnou dráhou (Wiese a kol., 2013).

Pôsobenie imunitného systému počas progresie nádoru

Účinok TGF- β na imunitný systém je pleiotropný, ovplyvňuje adaptívny aj vrodený imunitný systém, vrátane regulácie T buniek, NK buniek a makrofágov. Imunosupresívna funkcia TGF- β umožňuje nádorom vyhnúť sa protinádorovej imunitnej odpovedi, a tak TGF- β možno považovať za prít'azlivý terapeutický cieľ imunomodulácie nádorov (Seoane a kol., 2017).

TGF- β inhibuje proliferáciu aj aktiváciu T buniek, čím potláča diferenciáciu a funkciu tejto bunkovej populácie (Germann a kol., 2020). TGF- β inhibuje napr. expresiu granzýmu A, granzýmu B, perforínu, Fas ligandu a interferónu- γ , ktoré spolu podporujú cytotoxicitu

nádorových buniek sprostredkovanú T bunkami. Expresia granzýmu B a interferónu- γ je regulovaná transkripčnými faktormi SMAD2 a/alebo SMAD3 a ATF1 (D'Eliseo a kol., 2016).

TGF- β inhibuje efektorové funkcie NK buniek a tak prispieva k priaznivému mikroprostrediu pre progresiu nádoru. TGF- β sa dokáže naviazať na receptory chemokínov CXCR4 a CXCR3 a prostredníctvom týchto cytokínov zoslabuje expresiu receptorov NKp30, ako aj NKG2D, ktoré sú potrebné na apoptózu nádorových buniek (Castriconi a kol., 2013). Okrem toho sa ukázalo, že TGF- β potláča expresiu MHC glykoproteínov triedy I a II v mnohých populáciách buniek, čo má za následok zníženú apoptózu nádorových buniek sprostredkovanú NK bunkami (Dhatchinamoorthy a kol., 2021).

TGF- β podporuje migráciu monocytov do miesta proliferácie nádorových buniek a diferenciáciu makrofágov. Ukázalo sa, že tento cytokín blokuje aktiváciu makrofágov interferónom- γ , ako aj ich aktiváciu lipopolysacharidom, čím bráni týmto fagocytujúcim bunkám, aby indukovali smrť nádorových buniek (Landskron a kol., 2014).

TGF- β podporuje v monocytoch expresiu prozápalových mediátorov, vrátane interleukínu-1 (IL-1) a interleukínu-6 (IL-6), pričom potláča tvorbu voľných kyslíkových radikálov. V makrofágoch potláča TGF- β expresiu chemokínov vrátane makrofágového zápalového proteínu 1a a 2 (MIP-1a, MIP-2), chemokínového faktora CXCL1, cytokínového granulocytovo-makrofágového faktora stimulujúceho kolónie (GM-CSF) a interleukínov IL-1b, IL -8 a IL-10 , čo bráni predčasnej aktivácii makrofágovej imunity (Song a kol., 2018).

TGF- β reguluje diferenciáciu, aktiváciu, génovú expresiu a odpoveď na vonkajšie stimuly makrofágov, čím priamo ovplyvňuje progresiu nádoru (Qi a kol., 2022).

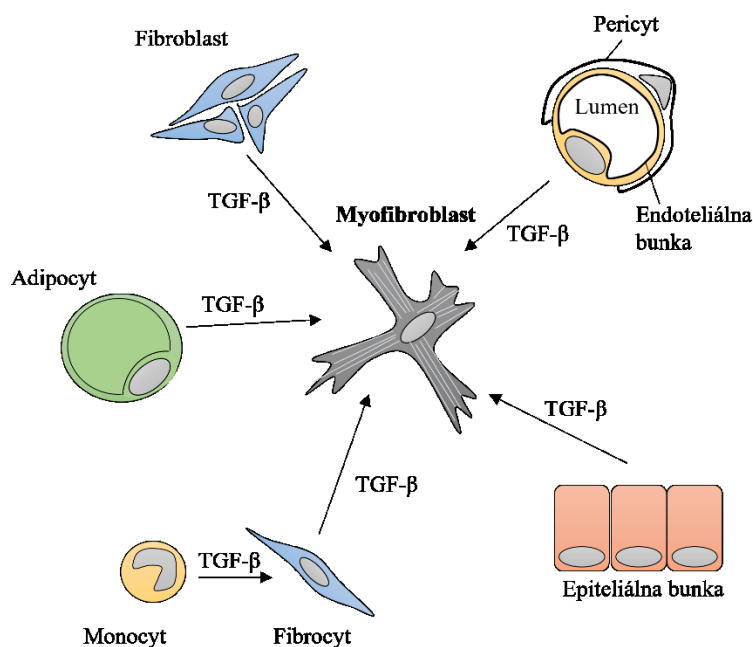
TGF- β V PROCESE FIBRÓZY

Nádorová bunka môže prispôsobiť svoje prostredie tak, aby podporovala iniciáciu a progresiu nádoru. Nádorové mikroprostredie sa skladá z rôznych typov neepiteliálnych buniek, vrátane fibroblastov, endotelových, imunitných buniek a proteínov extracelulárneho matrixu (Obr.3). Stav aktivácie signalizácie TGF- β počas progresie nádoru závisí od toho, či si epitelové bunky zachovávajú funkčnú signálnu dráhu TGF- β úplne alebo čiastočne. Avšak u určitých typov nádorov, ako je kolorektálny karcinóm korelujú zvýšené hladiny TGF- β so zlou prognózou a relapsom a sú spojené so zvýšenou aktivitou signálnej dráhy TGF- β v bunkách susediacich s nádorom a nie v malígnom epiteliálnom tkanive (Itatani a kol., 2019).

TGF- β signálna dráha sa podieľa aj na mobilizácii mezenchymálnych buniek a tvorbe myofibroblastov. Myofibroblasty sú vysoko pohyblivé, zachovávajú si vlastnosti fibroblastov a buniek hladkého svalstva a uľahčujú vývoj nádoru. Tieto bunky produkujú celý rad proteáz

(vrátane metaloproteináz MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 a MMP-14), cytokínov (napr. TGF- β , VEGF, EGF, PDGF, FGF, IGF-1) a kolagén typu I a chemokínov (napr. CXCL12), ktoré podporujú inváziu nádoru, proliferáciu a angiogézu (Chen a kol., 2021). Transformácia z fibroblastov na myofibroblasty je súčasťou procesu, ktorý sa nazýva fibróza (nadmerné alebo neregulované ukladanie proteínov extracelulárneho matrixu).

Fibroblasty v mikroprostredí nádoru (myofibroblasty) sa líšia od normálnych fibroblastov expresiou α -aktínu hladkého svalstva (α -SMA), povrchového proteínu fibroblastov (FSP1, tiež známy ako S100A4) a proteínu aktivovaného fibroblastmi (FAP). Tieto fibroblasty vznikajú z iných typov buniek (Obr.3). Transdiferenciácia endotelových buniek na mezenchymálne bunky indukovaná TGF- β signálnou dráhou vedie k expresii fibroblastového markera FSP1 a potlačeniu expresie endotelového markera CD31 (Zhao a kol., 2021).



Obr.3 Transformácia buniek na myofibroblasty

Významná časť nádorov CRC stratila cytostatickú odpoveď indukovanú TGF- β v dôsledku zmien na úrovni receptorov, ktoré túto dráhu inaktivujú. Pri CRC, nádorové bunky produkujú a uvoľňujú TGF- β do mikroprostredia, čím podporujú prometastatický program, ktorý je spojený s rizikom relapsu. Calon a kol. (2005) popísali, že toto riziko vyplýva z aktivity TGF- β stromálnych buniek, ktorá zvyšuje účinnosť šírenia, a liečba inhibítormi receptorov TGF- β RI bráni metastázam.

Úloha signálnej dráhy TGF- β v mikroprostredí nádorových buniek je bimodálna, spočiatku podporuje EMT a novo aktivované myofibroblasty, následne v pokročilých štádiách

podporuje prechod buniek karcinómu smerom k viac epiteliálnemu fenotypu, aby sa umožnila kolonizácia metastatických nádorových buniek (Del Pozo Martin a kol., 2015).

Signálna dráha TGF- β spúšťa aj nádorovú angiogenézu. V spolupráci s inými signálnymi kaskádami autokrinným/parakrinným spôsobom, vrátane vaskulárneho endotelového rastového faktora (VEGF), bazického fibroblastového rastového faktora (bFGF), PDGF, Notch, rastového faktora spojivového tkaniva (CTGF) a angiopoetínu, stimulujú angiogenézu podporou migrácie a proliferácie endotelových buniek (Malki a kol., 2020).

Nízka aktivita signálnej dráhy TGF- β prispieva k angiogenéze nepriamo, indukciou expresie proangiogénnych faktorov (VEGF, bFGF, CTGF) a aktiváciou enzýmov ako sú proteázy, zatiaľ čo vysoká aktivita signálnej dráhy TGF- β prostredníctvom SMAD2 a SMAD3 stimuluje tvorbu bazálnej membrány a inhibuje rast endotelových buniek (Hosseini a kol., 2022).

EMT INDUKOVANÁ SIGNÁLNOU DRÁHOU TGF- β PRI PROGRESII RAKOVINY

Úloha TGF- β pri progresii nádoru a fibróze sa spája s jeho schopnosťou epiteliálno-mezenchymálneho prechodu (EMT) a aktiváciou represorov E-kadherínov a induktorov EMT (Wang a kol., 2020). EMT je rozhodujúca pre normálny vývoj a je patologickým znakom progresie nádoru. Bunky podstupujúce EMT sú charakterizované znížením alebo stratou expresie E-kadherínu a epitelových bunkových spojení, čo vedie k bunkovej motilita a invazívnym vlastnostiam. EMT je regulovaný súborom transkripčných faktorov patriacich do rodín zinkových prstov, bHLH a forkhead, kde zaraďujeme Snail (Snail1), Slug (Snail2), Twist a zinkový prst E-box viažuci homeobox proteíny ZEB1 a ZEB2. Indukciou EMT umožňuje TGF- β rakovinovým bunkám získať schopnosť invázie a šírenia (Ishikawa a kol., 2021).

Hoci EMT je dôležitá pre šírenie nádoru, malígne bunky sa bežne vracajú k epitelovému fenotypu prostredníctvom mezenchymálneho prechodu. Aj keď možno špekulovať, že lokálne vysoké koncentrácie TGF- β môžu definovať EMT ešte pred inváziou nádorových buniek z primárneho nádoru, nie je známe, prečo, kedy alebo kde je zapojený EMT a do akej miery k tomu prispieva TGF- β signálna dráha (Seoane a kol., 2017).

Spoločné pôsobenie signálnej dráhy TGF- β , onkogénneho Ras a mutantného p53 vedie k sekvestracii transkripčného faktora p63, čo spôsobuje inaktiváciu tumor-supresívnej funkcie rastového faktora. TGF- β a Ras teda spolupracujú na indukcii expresie Snail1 a EMT v epitelových bunkách. Vynútená expresia Snail1 teda inhibuje apoptózu indukovanú TGF- β a podporuje EMT v bunkách tkanív. Na regulácii expresie SNAIL1, SNAIL2 a TWIST sa zúčastňujú SMAD komplexy. SMAD4 prispieva k downregulácii epitelového génu CDH1 (E-

CADHERIN) vytvorením komplexu transkripčného represora s transkripčným faktorom SNAIL1 (Frey a kol., 2022).

Podobne ZEB1 (proteín 1 interagujúci so SMAD; Sip-1) vytvára represívne komplexy s proteínmi SMAD a viaže sa na promótor génu E-kadherínu, aby ho potlačil. ZEB1 tak reguluje EMT svojou transkripčnou represiou E-kadherínu a iných epitelových markerových génov, ktoré priamo ovplyvňujú epiteliálny/mezenchymálny stav nádorových buniek, a teda EMT, bunkovú migráciu a tvorbu metastáz (Lee a kol., 2015).

Na základe informácií o funkcii signálnej dráhy TGF- β a SMAD4 v procesoch EMT by sa dalo predpokladať, že mutácie v zložkách dráhy TGF- β kategoricky vylučujú výskyt EMT v nádorových bunkách. Nedávno však niekoľko štúdií naznačilo, že mechanické cesty k EMT môžu podliehať značnej plasticite, a preto je možné, že v nádoroch s mutáciami v SMAD4 sa spustia alternatívne signálne dráhy, ktoré sa môžu podieľať na indukcii EMT (Meyer-Schaller a kol., 2019, Cook a kol., 2020).

LIGANDY SUPERRODINY TGF- β

Superrodina TGF- β obsahuje 33 génov, ktoré kódujú homodimérne alebo heterodimérne sekretované cytokíny. Patria sem TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, aktivíny, inhibíny, nodal, „müllerovské“ inhibičné látky (MIS), rôzne rastové diferenciačné faktory (GDF), kostné morfogenetické proteíny (BMP), myostatin a ďalšie. Sú to štruktúrne príbuzné proteíny, ktoré obsahujú v C-terminálnom segmente typicky usporiadané cysteíny. Fungujú ako diméry a viažu sa na špecifické transmembránové receptory na povrchu buniek a vnútrobunkových signálnych molekúl.

TGF- β (izoformy TGF- β 1, - β 2, - β 3) je multifunkčný člen rodiny cytokínov, ktorý hrá dôležitú úlohu v takých bunkových odpovediach, ako je bunková proliferácia, diferenciácia a patologické procesy. TGF- β hrá tiež kľúčovú úlohu v procese EMT a fibrózy (Baba a kol., 2022).

TGF- β je syntetizovaný ribozómami, ktoré sú pripojené k drsnému endoplazmatickému retikulu väčšiny buniek, kde dochádza k odstráneniu krátkeho N-koncového signálneho peptidu, skladaniu proteínu, glykozylácii a následnému transportu do Golgiho aparátu (Tzavlaki a kol., 2020).

Aktiváciu latentného TGF- β sprostredkujú matrixové metaloproteinázy (MMP) alebo je aktivácia založená na prítomnosti tripeptidového motívu Arg, Gly, Asp (RGD), ktorý umožňuje priamu interakciu s integrínovými receptormi uviazanými na plazmatickej membráne bunky (Hinck a kol., 2016).

Po aktivácii a uvoľnení zrelého TGF- β z jeho latentnej formy, dochádza k jeho naviazaniu na receptor na plazmatickej membráne a iniciácii kaskády signálnej transdukcie.

TGF- β RECEPTORY

TGF- β (TGF- β 1, - β 2, - β 3) sa naviaže na špecifický receptorový komplex pozostávajúci z dvoch rôznych proteínov, receptora TGF- β typu II (TGF β RII) a receptora TGF- β typu I (TGF β RI, tiež známy ako *kináza 5* podobná aktivínovému receptoru, ALK-5). V endotelových bunkách sa môžu ligandy TGF- β 1/2/3 naviazať na iný receptor TGF- β typu I, známy ako ActRL1/ALK-1. Ligandy superrodiny TGF- β sa môžu naviazať na komplexy signálnych receptorov tvorených z TGF- β typu II (5 rôznych typov-TGF- β RII, BMPRII, ACVRII, ACVRIIB, and AMHRII) a TGF- β RI (7 rôznych typov, ALK1-7) (Jung a kol., 2017).

Približne 20 – 30 % CRC obsahuje mutácie receptora TGF- β RII, ktoré sa väčšinou detegujú v bunkách rakoviny hrubého čreva s MSI. Jedna z najčastejších MSI mutácií sa vyskytuje v kódujúcom polyadenínovom trakte v exóne 3 génu TGF- β RII. Niektoré štúdie naznačujú, že jedným z dôležitých faktorov prispievajúcich k transformácii CRC je inaktivácia TGF- β RII, ktorá zvyšuje bunkovú proliferáciu v dôsledku predĺženej aktivácie expresie cdk4 (Fricke a kol., 2019, Grady a kol., 2015).

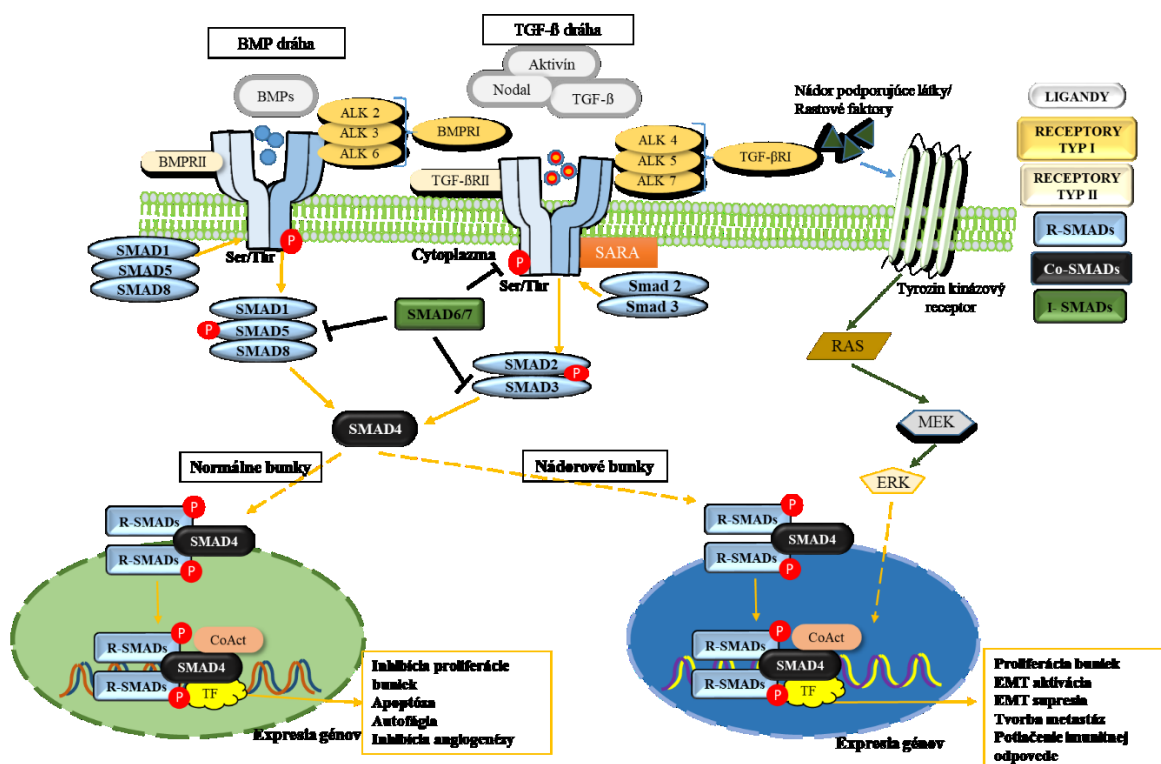
Nielen TGF- β RII, ale aj TGF- β RI môže podliehať mutáciám, ktoré sú spôsobené chybnými opravnými mechanizmami a predpokladá sa, že mutantná alela známa ako TGF- β RI6A má predispozíciu k rakovine hrubého čreva s frekvenciou 100 % (Zhou a kol., 2018).

Naše počiatočné, nepublikované výsledky stanovenia expresie TGF- β RII receptora v tkanive pacientov v rôznych štádiách CRC potvrdzujú, že u pacientov v benígnom štádiu a v štádiu I je expresia receptora TGF- β RII vyššia, zatiaľ čo v 2. a 3. štádiu už dochádza k poklesu expresie. Pri porovnaní pacientov, ktorí prežili a tých, ktorí podľahli ochoreniu, bola expresia TGF- β RII v benígnom a I. štádiu u prežívajúcich pacientov vyššia, zatiaľ čo v II. a III. štádiu je trend opačný a u pacientov, ktorí umreli sme stanovili vyššie expresie TGF- β RII.

SIGNÁLNE DRÁHY TGF- β

Kanonická (SMAD-dependntná) signálna dráha TGF- β (Obr. 4) využíva receptory *serín/treonínkinázy* (TGF- β RI/TGF- β RII) v plazmatickej membráne a fosforyluje ich cytoplazmatické efektoary SMAD2 a SMAD3. Medzi ligandy tejto dráhy patria najmä TGF- β , aktivíny a nodal. Receptory TGF- β RI sa líšia od TGF- β RII prítomnosťou N-koncovkej domény bohatej na glycín/serín (GS), ktorá reguluje aktivitu *kinázy* a väzbu SMAD. Receptor TGF-

β RRII fosforyluje serínové a treonínové zvyšky v doméne GS. TGF- β RI fosforyluje distálne C-konce SMAD2 a SMAD3. Na ukotvenie proteínov SMAD2/3 k receptoru TGF- β je potrebná kotva SARA. Po fosforylácii tvoria diméry SMAD2 a SMAD3 heterotrimérne komplexy so SMAD4 a translokujú sa do jadra. Jadrové komplexy SMAD spolu s DNA viažucimi transkripčnými faktormi, ale aj s modifikátormi chromatinu pozitívne alebo negatívne regulujú expresiu génov (Gough a kol., 2021).



Obr. 4 Transdukcia signálu superrodiny TGF- β .

V prípade naviazania BMP a niektorých GDF na receptory *serín/treonínkinázy*, BMPRI a BMPRII, v plazmatickej membráne sa spúšťa kanonická signalizácia BMP. Táto kanonická dráha je charakterizovaná fosforyláciou SMAD1/5/8, ktorá tvorí komplex so SMAD4 (Frey a kol., 2020).

SMAD2 a SMAD3, SMAD1, SMAD5 a SMAD8 sú súhrne známe ako receptorom aktivované (R-SMAD).

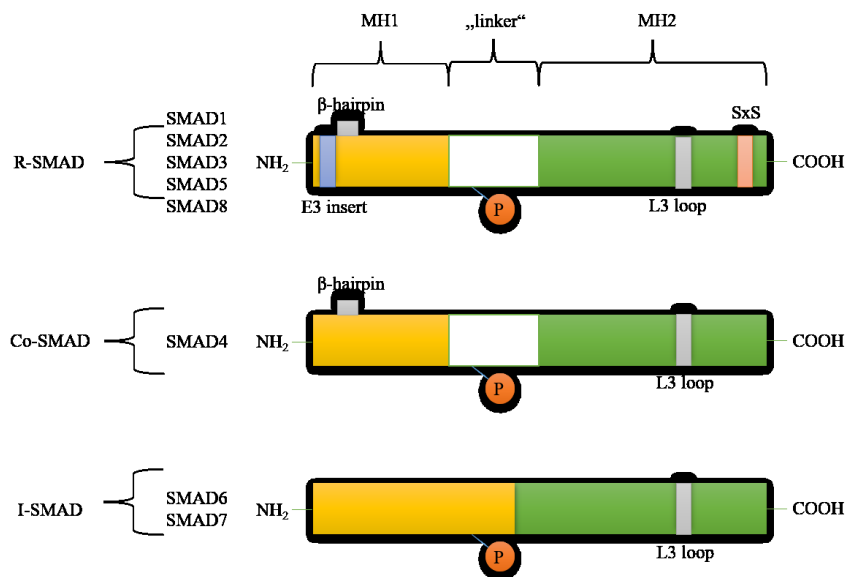
SMAD4 patrí do skupiny Co-SMAD, druhej triedy rodiny SMAD, ktorá slúži ako spoločný partner pre všetky R-SMAD, ako sú SMAD2, SMAD3, SMAD1, SMAD5 a SMAD8 na vytvorenie heterotrimérnych komplexov.

SMAD6 a SMAD7 majú v TGF- β /SMAD signálnej dráhe inhibičnú úlohu (de Ceuninck a kol., 2020, Miyazawa a kol., 2017).

TGF- β aktivuje aj tzv. alternatívnu signálnu dráhu (non-SMAD signalizácia), ktorá zahŕňa Ras a Rho *GTPázy* a mitogénom aktivované proteínové (MAP) *kinázy* (Obr. 2).

SMAD PROTEÍNY

SMAD proteíny sú zložené z približne 500 aminokyselín a pozostávajú z dvoch globulárnych domén (MH1 a MH2), ktoré sú spojené spojovacou oblasťou (linker) (Obr. 5). N-terminálna doména MH1 je vysoko konzervovaná vo všetkých R-SMAD a SMAD4, ale nie v SMAD 6 a 7, a obsahuje signál jadrovej lokalizácie (NSL) a vlásenkovú štruktúru so schopnosťou viazať DNA. C-terminálna doména MH2 – SMAD2 a SMAD3 obsahuje hydrofóbne prvky (L3 loop), ktoré sa viažu na transmembránové receptory TGF- β R a BMPR. Táto slučka L3 je prítomná aj v štruktúre SMAD4 a je nevyhnutná pre jej interakciu s R-SMAD počas tvorby trimérnych komplexov. C-koncový motív Ser-X-Ser (SXS) na doméne MH2 SMAD2 a SMAD3, slúži ako fosforylačné miesto pre receptor TGF- β RI (Tzavlaki a kol., 2020).



Obr. 5 Štruktúra jednotlivých typov SMAD proteínov

Doména MH2 sa podieľa na homooligomerizácii a heterooligomerizácii proteínu SMAD, cytoplazmatickom ukotvení a transkripcii. Domény MH1 a MH2 sú oddelené spojovacou oblasťou, ktorá sa líši medzi rôznymi proteínmi SMAD, obsahuje viaceré

fosforylačné miesta, ktoré sú dôležité pre reguláciu stability, subcelulárnej lokalizácie a aktivity SMAD (Gough a kol., 2021).

V normálnych a premalígných bunkách má signálna dráha TGF- β supresívnu úlohu, ale táto dráha môže byť inhibovaná, poškodená alebo dokonca využitá rakovinovými bunkami na podporu onkogénnych funkcií (Sinha a kol., 2021). Alternatívnym zosťrihom transkriptov mRNA SMAD proteínu, vznikne množstvo rôznych izoforiem SMAD, o ktorých je známe, že majú tkanivovo špecifickú expresiu a hrajú významné a odlišné úlohy počas vývoja. Úlohy jednotlivých SMAD proteínov sú zhrnuté v tabuľke 2.

Tabuľka 2 Úlohy jednotlivých SMAD proteínov pri vzniku a progresii kolorektálneho karcinómu

Typy SMAD	Úloha v kolorektálnom karcinóme	Publikácie
SMAD1	<ul style="list-style-type: none"> • podieľa sa na modifikácii bunkového rastu, diferenciácie, apoptóze a ďalších procesov, ktoré sú nevyhnutné pri regulácii imunitného systému organizmu • podporuje proces epiteliálno-mezenchymálneho prechodu • indukuje autofágiu zvýšením expresie génu 5 súvisiaceho s autofágiou (ATG5) 	(de Ceuninck a kol., 2020, Miyazawa a kol., 2017, Tecalco-Cruz a kol., 2018, Chen a kol., 2021)
SMAD2	<ul style="list-style-type: none"> • inhibuje bunkovú proliferáciu a expresiu príbuzných funkčných génov a súvisí s transkripčnou odpoveďou, ktorá podporuje bunkovú apoptózu • expresia SMAD2 koreluje s prežívaním pacienta 	(Romano a kol., 2016, Xu a kol., 2020)
SMAD3	<ul style="list-style-type: none"> • hrá dvojitú úlohu onkogénu a tumor supresorového génu pri tvorbe tumoru • znižuje jeho expresiu prostredníctvom miR-4429 a v konečnom dôsledku inhibuje výskyt, vývoj a metastázy rakovinových buniek 	(Liu a kol., 2016, Wang a kol., 2016, Lin a kol., 2018)
SMAD4	<ul style="list-style-type: none"> • hrá kľúčovú úlohu v transdukcii signálnej dráhy TGF-β, vďaka čomu bunkový cyklus zostáva vo fáze G1, čo vedie k abnormálnej proliferácii nádoru • je tumor supresorovým génom • vysoká miera mutácií SMAD4 u pacientov s CRC je spájaná so zlou prognózou, ale nie s klinickým štádiom 	(Zhao a kol., 2018, McCarthy a kol., 2018)
SMAD5	<ul style="list-style-type: none"> • sprostredkúva signálnu dráhu ligandu superrodiny TGF-β na ovplyvnenie progresie rakoviny • za posledných 5 rokov sa nenašli žiadne relevantné štúdie o úlohe SMAD5 u pacientov s CRC 	(Cafri a kol., 2019)
SMAD6	<ul style="list-style-type: none"> • reguluje signálnu dráhu TGF-β, stimuluje extracelulárny matrix, podporuje angiogénu a inhibuje imunitu, takže prispieva k rastu nádorov, difúzií a tvorbe metastáz • za posledných 5 rokov sa našla iba jedna relevantná štúdia o úlohe SMAD6 u pacientov s CRC 	(Bayat a kol., 2021)
SMAD7	<ul style="list-style-type: none"> • hrá dvojakú úlohu v rôznych štádiách nádoru, pôsobí ako nádorový supresorový gén tým, že inhibuje proliferáciu a podporuje apoptózu v 	(Troncone a kol., 2021, Li a kol., 2021)

ranom štádiu, podporuje epiteliálno-mezenchymálnu degeneráciu a zvyšuje inváziu v neskorom štádiu, čo pozitívne koreluje so stupňom malignity

2020, Alidoust
a kol., 2022,
Monteleone
a kol., 2001)

POST-TRANSLAČNÁ MODIFIKÁCIA SMAD PROTEÍNOV

MH1 doména SMAD2 môže byť fosforylovaná *kinázou* ERK1 (*kináza* regulovaná mimobunkovým signálom) a táto modifikácia vedie k zvýšenej stabilite SMAD2, čo nakoniec vedie k zvýšenej transkripcii závislej od SMAD (Funaba a kol., 2002). Fosforylácia Ser 417 SMAD2 proteínu *P21-aktivovanou kinázou 2* (PAK2) zoslabuje aktiváciu SMAD2 (Yan a kol., 2012).

SMAD3 obsahuje na doméne MH1 fosforylačné miesta pre proteínkinázu C (PKC). Touto fosforyláciou dochádza k inhibícii naviazania SMAD3 na DNA, a tak k zastaveniu SMAD3-dependentnej transkripcie (Yakymovych a kol., 2001). Negatívnym regulátorom aktivity SMAD3 je *kazeínkináza 1 γ 2* (CKI γ 2), ktorá podporuje jeho ubikvitináciu a degradáciu prostredníctvom fosforylácie Ser418 na doméne MH2 (Guo a kol., 2008).

SMAD4 môže byť tiež fosforylovaný ERK *kinázou*, čím zvyšuje transkripčnú aktivitu SMAD4 (Roelen a kol., 2003). Na druhej strane *pečeňová kináza B1* (LKB1) negatívne reguluje transkripciu závislú od SMAD4 prostredníctvom fosforylácie Thr77 v β -vlásenke MH1 domény SMAD4, čo bráni SMAD4 vo väzbe na DNA (Morén a kol., 2011).

Seong a kol. popísali aktiváciu signalizácie TGF- β pomocou fosforylácie spojovacej oblasti SMAD2, SMAD3 a domény MH2 SMAD4 *serín/treonín kinázou 38* (MPK38). C-koncová aktivačná fosforylácia a inhibičná fosforylácia v spojovacej oblasti SMAD môžu byť zvrátené pôsobením rôznych fosfatáz. Defosforylácia C-koncových serínov vedie k deaktivácii R-SMAD a zoslabeniu signalizácie TGF- β (Seong a kol., 2010).

Hladiny a aktivita SMAD sú tiež regulované ubikvitináciou. Najviac študovanými *E3 ligázami*, ktoré ubikvitinujú proteíny SMAD, sú SMURF1 a SMURF2. SMURF2 polyubikvitinuje a zameriava sa na degradáciu SMAD2 (Zhang a kol., 2001), pričom indukuje viacnásobnú mono-ubikvitináciu SMAD3 (Tang a kol., 2011).

Počas sumoylácie, enzymatického procesu podobného ubikvitinácii, sú malé modifikátorové proteíny podobné ubikvitínu (SUMO), kovalentne pripojené k proteínovým substrátom a modifikujú ich funkciu, ich subcelulárnu lokalizáciu alebo ich interakcie s inými proteínmi. Bolo opísané, že proteínový inhibítor aktivovaného STAT1 (PIAS1), ligáza SUMO E3, podporuje sumoyláciu SMAD4, čo vedie ku zvýšenej transkripcii indukovanej dráhou TGF- β (Liang a kol., 2004).

TGF- β tiež podporuje acetyláciu SMAD2 a SMAD3 *histónacetyltransferázou* p300 a táto modifikácia zvyšuje ich aktivitu (Inoue a kol., 2006).

ÚLOHA SMADs v EXPRESII GÉNOV

SMAD komplexy, ktoré sa translokujú do jadra, regulujú expresiu cieľových génov. SMAD3 a SMAD4 sa môžu priamo viazať (hoci s nízkou afinitou), prostredníctvom β -vlásky v ich doméne MH1 na špecifické sekvencie DNA (SBE – SMAD binding elements) (Morikawa a kol., 2013). Najrozšírenejšia izoforma, SMAD2 sa nedokáže viazať priamo na DNA kvôli jedinečnej 30 aminokyselinovej sekvencii (E3 inzert) v jej doméne MH1 (chýba v doméne MH1 SMAD3 a SMAD4) (Martin-Malpartida a kol., 2017). Tento vnútorný štruktúrny rozdiel medzi proteínmi SMAD2 a SMAD3 hrá tiež úlohu v ich subcelulárnej distribúcii, SMAD3 je väčšinou v neprítomnosti ligandu lokalizovaný v jadre, zatiaľ čo SMAD2 je cytoplazmatický, a preto sa účinnejšie aktivuje po stimulácii TGF- β (Liu a kol., 2016). Avšak aj keď samotné komplexy SMAD majú nízku afinitu k DNA, interagujú so širokou škálou DNA viažucich transkripčných faktorov, modifikátorov chromatinu a iných regulátorov, aby účinne kontrolovali expresiu cieľových génov.

ÚLOHA SMADs v TRANSKRIPCII A POST-TRANSKRIPČNEJ REGULÁCII

Na regulácii transkripcie génov, ktoré sú výsledkom TGF- β /SMAD signálnej dráhy sa podieľajú napr. *histónacetyltransferázy* (HAT) a iné modifikátory chromatinu buď modifikáciou histónov alebo/a reguláciou aktivity SMAD. SMAD4 pôsobí ako transkripčný koaktivátor, pretože stabilizuje interakciu SMAD3 s *histónacetyltransferázovou doménou* CREB-viažuceho proteínu (CBP) a p300, čo vedie k zvýšenej transkripčnej aktivite SMAD3 (Du a kol., 2018).

SMAD môžu regulovať génovú expresiu aj na posttranskripčnej úrovni, pričom ovplyvňujú zostih mRNA, stabilitu a transláciu prostredníctvom proteínov viažucich RNA (RBP) a nekódujúcich RNA (ncRNA). SMAD môžu tiež riadiť proces dozrievania miRNA. Viazu sa na konzervované sekvencie na primárnych transkriptoch miRNA (pri-miRNA), uľahčujú naviazanie komplexu DROSHA, čím podporujú účinné štiepenie pri-miRNA na pre-miRNA (prekurzorové miRNA). SMADs sú teda multifunkčné proteíny, ktoré modulujú génovú expresiu transkripčne prostredníctvom väzby DNA a posttranskripčne prostredníctvom väzby pri-miRNA a regulácie spracovania miRNA (Davis a kol., 2010).

ÚLOHA SMAD2 a SMAD 3 V KARCINOGENÉZE CRC

Mnohé štúdie ukázali, že SMAD2 a SMAD3 hrajú ústrednú úlohu v epiteliálnom mezenchymálnom prechode (EMT), ktorý je dôležitý pre vývoj a diferenciáciu kmeňových buniek. Chen a kol. (2013) vo svojej práci popísali, že inaktiváciou SMAD3 génu, dochádza k blokovaniu migrácie buniek, ktorá je indukovaná TGF- β dráhou, čo naznačuje, že SMAD3 je kritickým mediátorom EMT. Analýzy tkaniva pacientov s Crohnovou chorobou odhalili výrazne znížený fosforylovaný SMAD3 a zvýšené hladiny jeho inhibítora SMAD7 (Monteleone a kol., 2001). Táto choroba predstavuje vysoké riziko vzniku CRC; molekulárne mechanizmy, ktoré sú základom prechodu na CRC, sú však nejasné (Romano a kol., 2016).

Wang a kol. ukázali, že inaktivácia aktivátora transkripcie 3 (STAT3) viedla k zvýšeniu transkripčnej aktivity SMAD3, fosforylácii SMAD2 a zníženiu expresie SMAD7, čo nakoniec viedlo k potlačeniu progresie nádoru v CRC. STAT3 je členom rodiny proteínov STAT a môže podporovať onkogenézu CRC rôznymi cestami (Wang a kol., 2016). Liu a kol. (2014) popísali, že liečba exogénnym interleukínom 6 (IL-6) stimulovala aktiváciu STAT3, zvýšila expresiu SMAD3 a Snail a inhibovala proces EMT, čo naznačuje, že JAK/STAT3 dráha je potrebná pre TGF- β -indukovanú EMT, migráciu a inváziu nádorových buniek.

Xu a kol. (2020) na základe svojich výsledkov demonštrovali, že expresia SMAD2 koreluje s prežívaním pacienta. Ich výsledky potvrdili, že MIR22 (MIR22HG) sa kompetitívne viaže na SMAD2, čím bráni interakcii medzi SMAD2 a SMAD4 v bunkách CRC. Tieto údaje naznačujú, že umlčanie MIR22HG podporuje tumorigenicitu v bunkách CRC a podporuje proces.

V posledných rokoch bolo publikovaných veľa prác, ktoré spájajú pôsobenie signálnej dráhy TGF- β s inými dráhami. Dráha mitogénom aktivovanej proteínkinázy (MAPK) môže fosforylovať skupinu proteínov, ktoré sú zodpovedné za zmenu správania sa buniek, alebo naopak, proteíny tejto dráhy môžu byť aktivované extracelulárnymi molekulami, ako sú cytokíny produkované signálnou dráhou TGF- β . Dráha kinázy regulovanej extracelulárnym signálom (ERK) inhibuje dráhu TGF- β fosforyláciou SMAD2 a SMAD3 bez ich translokácie do jadra (Haque a kol., 2017, Boye a kol., 2021).

Lin a kol. opísali, že *nitriláza-1* (NIT1) potláča proliferáciu buniek CRC prostredníctvom pozitívnej spätnej väzby medzi NIT1 a signálnou dráhou TGF- β /SMAD, pretože SMAD3 „upreguluje“ na transkripčnej úrovni. NIT1 patrí do superrodiny *C-N hydroláz* a hrá dôležitú úlohu pri supresii CRC (Lin a kol., 2018).

Prevalencia mutácií týchto dôležitých proteínov v procese signalizácie TGF- β (SMAD2 a SMAD3) sa odhadla až na 6 %. Fleming a kol. (2013) ukázali, že percento mutácií v primárnych sporadických CRC sa zvýšilo až na 14,8 % v kombinovanej prevalencii mutácií SMAD4, SMAD2 a SMAD3.

ÚLOHA SMAD 4 V KARCINOGENÉZE CRC

Kľúčovým proteínom signalizácie TGF- β je SMAD4, ktorý hrá dôležitú úlohu ako takzvaný prepínač pri rozhodovaní, či sa bunkový cyklus zastaví alebo dôjde ku karcinogéze (Zhao a kol., 2018). V 16 % – 25 % CRC dochádza k ovplyvneniu signalizácie TGF- β v dôsledku delécie SMAD4 (Razzaque a kol., 2020). Najjar Sadeghi a kol. (2021) našli mutácie SMAD4 dokonca v 33,3 % analyzovaných tkanív odobratých pacientom s CRC.

Väčšina mutácií SMAD4 sa vyskytuje v doméne MH2, hoci táto doména predstavuje iba 41,5 % kódujúcej sekvencie celého proteínu SMAD4 (Najjar Sadeghi a kol., 2021, McCarthy a kol., 2018, Zi a kol., 2019). Doména MH2 je nevyhnutná pre homodimerizáciu a heterooligomerizáciu s proteínmi SMAD2 alebo SMAD3. Preto mutácie v tejto oblasti môžu spôsobiť dysreguláciu rastu, inhibície a apoptózy buniek. Navyše mutácie SMAD4 podporujú zápal indukovaný TGF- β signálnou dráhou, a tak môžu geneticky poškodené bunky počas tumorigenézy expandovať (Najjar Sadeghi a kol., 2021). Najčastejšou mutáciou génu SMAD4 v CRC je R361H (Arg361 tvorí soľný mostík s Asp351), ktorá ovplyvňuje homodimerizáciu a heterooligomerizáciu so SMAD2 a SMAD3 (Liao a kol., 2019, Mehrvarz-Sarshekeh a kol., 2017).

Sadeghi a kol. (2021) vo svojej publikácii opísali, že ďalším prevládajúcim typom zmien v CRC sú mutácie na kodónoch 264 a 271. Tieto kodóny sa nachádzajú v linkerovej doméne proteínu SMAD4, oblasti potrebnej na subcelulárnu lokalizáciu a transkripčnú aktiváciu.

Imunohistochemické analýzy tkanivových rezov, odobratých z 1210 karcinómov rôznych orgánov, ukázali stratu expresie SMAD4 u viac ako 50 % kolorektálnych karcinómov (Ritterhouse a kol., 2019). Hoci LOH na chromozóme 18q môže byť hlavnou príčinou straty SMAD4 pri CRC, existujú aj iné posttranskripčné a posttranslačné mechanizmy, ktoré môžu prispieť k jeho strate alebo dysfunkcii, ako je ubikvitinácia, sumoylácia a interferencia s mikroRNA (miRNA) (Silva a kol., 2021).

Čo sa týka korelácie medzi SMAD4 a klinicko-patologickými charakteristikami, Yang a kol. (2018) ukázali, že koncentrácie SMAD4 boli významne vyššie u pacientov s CRC v štádiu N0 ako u pacientov v štádiu N1. Koncentrácie SMAD4 boli znížené u pacientov v pokročilom

štádiu (metastázy v nádorových uzlinách (TNM III-IV) v porovnaní s pacientmi v ranom štádiu (TNM I-II). Navyše, SMAD4 bol významne znížený u starších jedincov (> 65-ročných).

Naše ešte nepublikované výsledky expresie SMAD 4 v tkanivách pacientov s CRC prekvapivo nepotvrdili výsledky Yanga a kol., kedy sme najvyššie expresie zaznamenali v II a III štádiu pacientov s CRC. Pri porovnaní expresie SMAD 4 skupiny pacientov s benígnym adenómom so skupinou pacientov v I. štádiu sme zaznamenali pokles expresie u pacientov v štádiu I.

Szeglin a kol. (2022) popísali zodpovedajúce gény získané analýzou SBE (SMAD-binding elements), ktoré korelovali s expresiou SMAD4. Následne potvrdili, že génový profil modulovaný SMAD4 predpovedal prežívanie pacientov v štádiu II a III CRC. Tento génový profil má podľa nich u vybraných pacientov s CRC potenciál na prognostické využitie.

FUNKCIA A REGULÁCIA INHIBIČNÝCH SMAD PROTEÍNOV

Iniciáciu a propagáciu signalizačnej dráhy TGF- β inhibujú proteíny SMAD6 a SMAD7, ktoré patria do skupiny inhibičných SMAD (I-SMAD). Pokiaľ ide o štruktúru (Obr.5), MH2 doména I-SMAD je homológna s R-SMAD a co-SMAD, hoci jej chýba motív SXS, zatiaľ čo ich N-domény sa výrazne líšia nielen od iných SMAD, ale aj medzi samotnými SMAD6 a SMAD7.

I-SMAD sa svojou MH2 doménou pripájajú na TGF- β RI receptor a pôsobia ako antagonisti signalizácie TGF- β , inhibujú tak fosforyláciu a aktiváciu R-SMADs. N-doména SMAD7 uľahčuje interakciu MH2 domény SMAD7 s receptorom TGF- β , čím sa SMAD7 stáva silnejším inhibítorom signalizácie TGF- β v porovnaní so SMAD6, ktorý prednostne inhibuje signalizáciu BMP (Murayama a kol., 2020). SMAD7 tiež môže podporovať defosforyláciu a inaktiváciu TGF- β RI v kooperácii s E3 *ubikvitínligázami* SMURF1/2. SMAD7 interaguje s mnohými členmi ubikvitínových ligáz, okrem SMURF1 a SMURF2 tiež s WWP1 (WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1) a NEDD4-2 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4 ligase) účinkujú podobným spôsobom ako SMURF, zvyšujú cytoplazmatickú akumuláciu SMAD7, jeho asociáciu s TGF β RI, polyubikvityláciu a degradáciu receptora a dokonca aj degradáciu R-SMAD ako napríklad v prípade NEDD4-2 (Murayama a kol., 2020).

TGF- β podporuje cytoplazmatickú akumuláciu prevažne jadrového SMAD7, a tiež indukuje jeho expresiu mRNA, čím vytvára negatívnu spätnú väzbu, ktorá pevne kontroluje signalizáciu (Nabhan a kol., 2017).

SMAD7 môže byť tiež lokalizovaný v jadre a obmedziť väzbu komplexu SMAD2-3/SMAD4 na špecifické sekvencie DNA (Troncone a kol., 2021).

Podobne ako R-SMAD sú inhibičné SMAD regulované prostredníctvom posttranslačných modifikácií. MPK38-sprostredkovaná fosforylácia SMAD7 umožňuje translokáciu SMAD7 do cytoplazmy, ale tiež interferuje s naviazaním SMAD7 na TGF β RI a tak má pozitívny vplyv na TGF- β signalizáciu (Seong a kol., 2010).

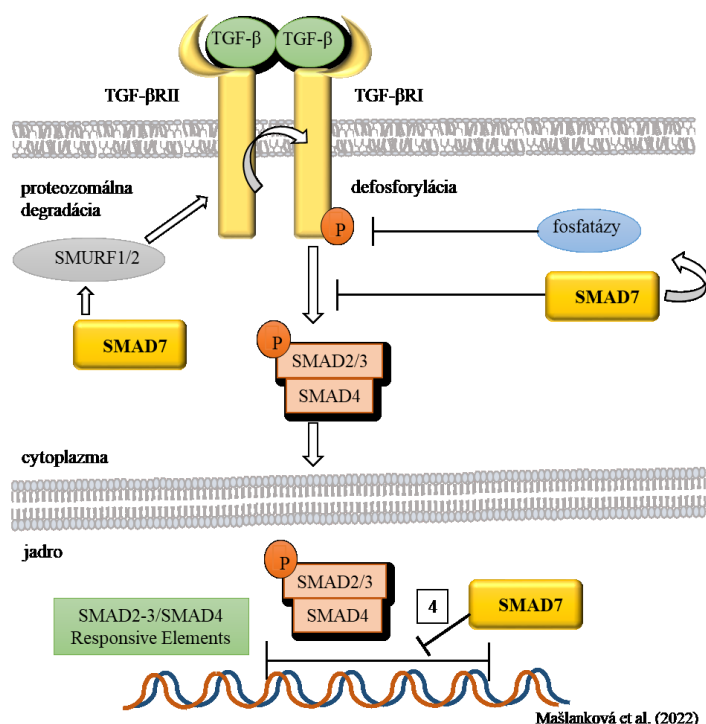
Jadrový SMAD7 môže byť acetylovaný *acetyltransferázou* p300 a deacetylovaný HDAC1 a NAD-dependentnou proteínovou deacetylázou sirtuín-1 (SIRT1). Acetylovaný SMAD7 je stabilnejší, zatiaľ čo jeho deacetylácia podporuje jeho ubikvitináciu a degradáciu (Kume a kol., 2007).

Metyláciou SMAD7 dochádza k jeho spojeniu s E3 *ubikvitínligázou* Arkadia, čím sa zvyšuje jeho ubikvitinácia a následná degradácia (Elkouris a kol., 2016). I-SMAD teda poskytujú špecifickú negatívnu kontrolu komplexu R-SMAD/co-SMAD, ktorý prenáša signál prostredníctvom TGF- β dráhy.

ÚLOHA SMAD7 V KARCINOGENÉZE CRC

SMAD7 hrá úlohu v jadre aj cytoplazme, čím udržiava rovnováhu prechodu signálu (Obr. 6). Inaktivácia ktorejkoľvek zložky v TGF- β dráhe bude mať za následok dysreguláciu signálov apoptózy, čo vedie k nekontrolovanému rastu a diferenciacii buniek a následnej indukcii karcinogenézy (Li a kol., 2020). Preto nadprodukcia SMAD7 vedie k významnému zníženiu EMT ovplyvnenej TGF- β dráhou (Alidoust a kol., 2022).

Niekoľko štúdií uvádza dôležitú úlohu SMAD7 pri sporadickom CRC. Podľa výsledkov publikovaných Li a kol. (2020) je SMAD7 ovplyvnený miR-424, ktorá sa podieľa na regulácii expresie SMAD7 prostredníctvom osi circTBL1XR1/miR-424. Po znížení circTBL1XR1 sa výrazne znížila schopnosť migrácie a invázie buniek rakoviny hrubého čreva. CircTBL1XR1 sa môže viazať na mikroRNA-424 (miR-424), ktorá reguluje expresiu Smad7.



Obr. 6: Inhibičný účinok SMAD7 na proces karcinogenézy kolorektálneho karcinómu

Boulay a kol. (2003) detegovali vo vzorkách biopsie 264 pacientov s CRC, že delécia SMAD7 je menej častá ako delécia SMAD4 a SMAD2 a pacienti s takouto deléciou majú výrazne lepšiu prognózu. Ich zistenia ukázali, že CRC pacienti s deléciami SMAD7 mali nízky pomer rizika úmrtia a relapsu, čo jasne definovalo SMAD7 ako prognostický marker s negatívnou koreláciou u pacientov s CRC.

Stolfi a kol. (2014) zaznamenali, že v bunkách CRC je výrazne vyšší nárast expresie SMAD7 (~ 11,3-krát) v porovnaní s expresiou SMAD4 (~ 2-krát). V závislosti od štádia nádoru, môže prejsť aktivita SMAD7 z nádorovej supresie na nádor podporujúcu. Vzhľadom na rovnako protichodné úlohy signalizácie TGF-β, nie sú tieto zdanlivo protichodné funkcie prekvapujúce. Li a kol. (2020) vo svojej práci popisujú, že expresia proteínu SMAD7 úzko súvisí s Dukesovým štádiom, hĺbkou invázie CRC a metastázami do lymfatických uzlín a pozitívne koreluje s expresiou (Tronccone a kol., 2019).

REGULÁCIA SIGNÁLNEJ DRÁHY TGF-β NEKÓDUJÚCIMI RNA

Gény, ktoré kódujú proteíny predstavujú menej ako 2 % celkového ľudského genómu, približne 90 % ľudského genómu tvoria nekódujúce RNA (ncRNA), ktoré sú aktívne prepisované z ľudského genómu, ale nekódujú proteíny. Nekódujúce RNA sú rozdelené do dvoch väčších skupín (Diamantopoulos a kol., 2018).

Do prvej patria „housekeeping“ ncRNA, vrátane veľmi hojnej ribozomálnej RNA (rRNA) a transferovej RNA (tRNA). Druhou skupinou sú regulačné ncRNA, vrátane dlhých ncRNA (lncRNA), mikroRNA (miRNA), kruhovej RNA (circRNA), RNA interagujúcej s PIWI, malej RNA odvodenej od tRNA (tRF), malej jadrovej RNA (snoRNA), siRNA a ďalších. Medzi najviac študované triedy ncRNA patria lncRNA, miRNA a circRNA. Tieto typy ncRNA veľmi významne regulujú alebo sú regulované signálnou dráhou TGF- β (Jia a kol., 2022).

lncRNA AKO REGULÁTORY V CRC

lncRNA sú RNA s dĺžkou viac ako 200 nukleotidov. Väčšina lncRNA je transkribovaná *polymerázou II* a má na 5'-konci čiapočku a na 3'-konci poly(A) chvostík a predpokladá sa, že sú transkribované a syntetizované rovnakým spôsobom ako mRNA, ale nenesú genetickú informáciu pre syntézu bielkovín (Statello a kol., 2021).

lncRNA ovplyvňujú génovú expresiu prostredníctvom niekoľkých mechanizmov, ako je umlčanie X chromozómu, modifikácia chromatinu, imprinting genómu, aktivácia transkripcie a jadrový transport. Jia kol.(2022) popisujú súvis medzi nerovnováhou v regulácii transkripcie lncRNA a proliferáciou, apoptózou, metastázami, inváziou, angiogenezou a liekovou rezistenciou CRC.

lncRNA CASC9 (cancer susceptibility candidate 9) a SNHG6 (small nucleolar RNA host gene 6) môžu pozitívne regulovať dráhu TGF- β v bunkách CRC. Luo a kol., (2019) vo svojej práci popisuje, že CASC9 zvyšuje stabilizáciu mRNA TGF- β 2, čo v konečnom dôsledku ovplyvní fosforyláciu SMAD a je upregulovaná až v 70% CRC a štúdia Zhanga a kol. (2022) ukazuje, že CASC9 inhibuje proliferáciu a inváziu CRC cez miRNA-542-3p a môže zvýšiť chemorezistenciu.

lncRNA SNHG6 (small nucleolar RNA host gene 6) ovplyvňuje miR-26a-5p a zvyšuje tak odolnosť buniek CRC voči 5-FU. Azizidoost a kol. (2022) popísali, že lncRNA NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1) sa podieľa na rozvoji a progresii CRC.

CTBP1-AS2 (CTBP1 antisense RNA 2) má dôležitú úlohu pri proliferácii a metastázovaní CRC. Li a kol. (2021) popísali, že CTBP1-AS2 podporuje aktiváciu dráhy TGF- β /SMAD2/3 inhibíciou miR-93-5p, čím urýchľuje vývoj CRC. Nadmerne exprimovaná miR-93-5p tak inhibíciou dráhy TGF- β /SMAD2/3 vykazuje protirakovinový účinok.

Ďalšou lncRNA, ktorá reguluje TGF- β dráhu v tkanive CRC je TUG1 (taurine upregulated 1). TUG1 napomáha EMT a tvorbe metastáz sprostredkovanvej TGF- β cez reguláciu expresie vimentínu a TWIST1 (Shen a kol., 2020).

miRNAs AKO REGULÁTORY V CRC

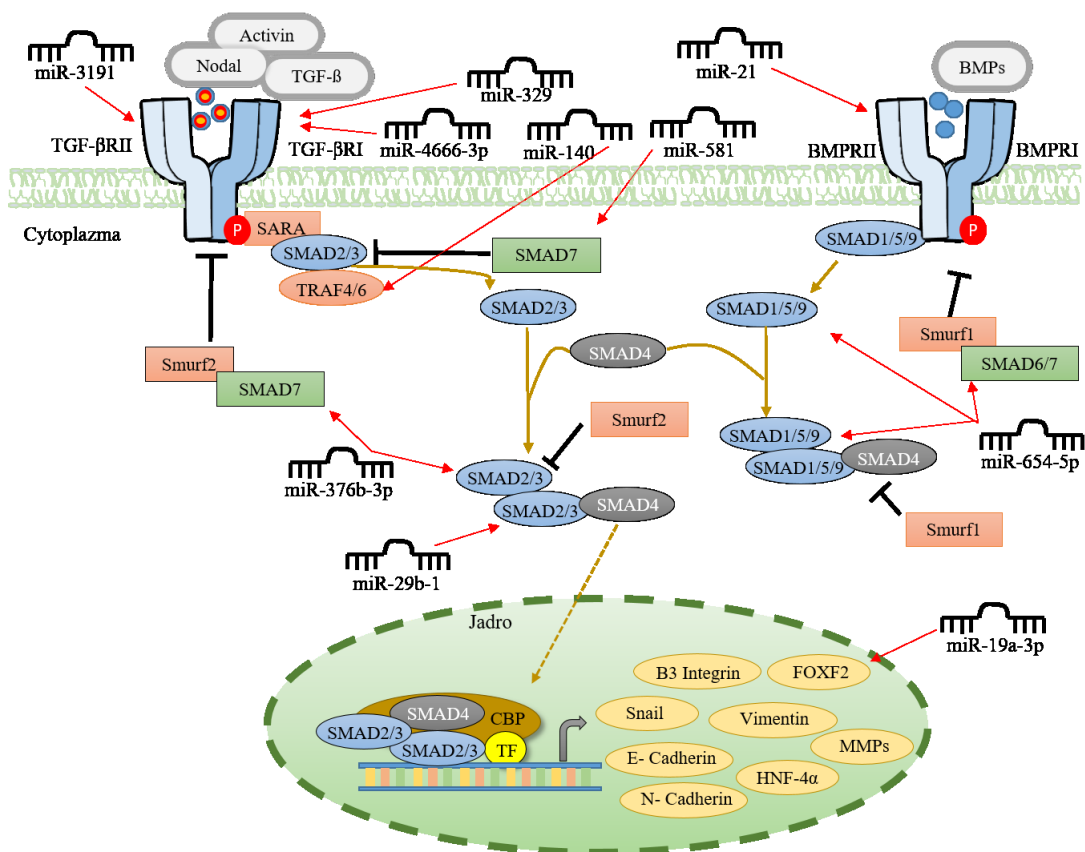
miRNA sú triedou malých jednovláknových nekódujúcich RNA zložených z približne 21–23 nukleotidov, ktoré hrajú kľúčovú úlohu vo fyziologických a patologických procesoch priamym naviazaním na komplementárne sekvencie umiestnené v cieľových oblastiach mRNA (Jung a kol., 2020). miRNA sú kompetitívne inhibované lncRNA (Zhang a kol., 2021).

miRNA môžu pôsobiť ako onkogény alebo supresory nádorov, v závislosti nielen od ich dráh, ktoré ovplyvňujú, ale aj od primárnej lokalizácie (hrubé črevo alebo konečník). miRNA-9 (Kim a kol., 2020) a miRNA-101 (Huang a kol., 2021) slúžia v CRC ako nádorové supresory, potláčajú migráciu buniek nádoru. miRNA-200 (Carter a kol., 2019), miRNA-17 (Knudsen a kol., 2015) a miR-141 (Ding a kol., 2017) sú všetky dobre známe onkogény v CRC, ktoré inhibujú rôzne nádor-supresorové gény alebo podporujú proliferáciu nádorových buniek.

Up-regulácia miRNA sa spája s bunkovými procesmi, ako je regulácia transkripcie, väzba na proteíny a aktivita *ubikvitínligázy*. Na druhej strane znížená regulácia miRNA bola popísaná pri regulácii SMAD proteínov a interakcii s DNA. Najviac ovplyvnenými dráhami molekulami miRNA sú PI3K-Akt a TGF- β (Ghafouri-Fard a kol., 2021).

Eneh a kol. (2020) popísali, že miRNA, ktoré boli detegované v tkanivách ľavostranných kolorektálnych karcinómov, ovplyvňujú signálne dráhy mTor, Wnt, PI3K-Akt. V pravostranných kolorektálnych karcinómoch boli detegované miRNA, ktoré regulujú signálnu dráhu TGF- β a to miR-625-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-625-5p, hsa-miR-31-5p a hsa-miR-330-5p.

miRNA regulujú rôzne zložky signálnej dráhy TGF- β , vrátane TGF- β 1, TGF- β 2, regulačných SMAD (SMAD1, 2, 3, 5 a 9), SMAD4, inhibičných SMAD (SMAD6 a 7), receptorov TGF- β a tým ovplyvňujú proliferáciu a migráciu buniek CRC (Obr. 7) (Moradi-Marjaneh a kol., 2018).



Obr. 7 Regulácia signálnej dráhy TGF- β rôznymi miRNA

Rezistencia na liečivá, využívané pri inhibícii činidiel poškodzujúcich DNA, je často spojená s aktiváciou signalizácie TGF- β prostredníctvom rôznych mechanizmov, najmä reguláciou signalizácie TGF- β sprostredkovanou miRNA (Zhang a kol., 2021). Cai a kol. (2017) detegovali zvýšené koncentrácie miR-128-3p v bunkových líniah NSCLC rezistentných na cisplatinu, ktoré inhibovali dva negatívne regulátory dráhy TGF- β , SMAD-špecifickú *E3 ubiquitínproteínligázu 2* (SMURF2) a *proteínfosfatázu 1c* (PP1c), čo viedlo k aktivácii dráhy TGF- β k EMT a vzniku rezistencie na cisplatinu.

Pri kolorektálnom karcinóme regulujú signalizáciu TGF- β napr. miR-423-5p, miR-552, miR-34a a miR-17-92 klaster (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a a miR-92a). miR-34a priamo interaguje s 3'-UTR SMAD4 a inhibuje tak signalizáciu TGF- β . U pacientov s CRC rezistentným na oxaliplatinu je miR-34a downregulované, a tak dochádza k zvýšeniu makroautofágie aktiváciou dráhy TGF- β /SMAD (Sun et al., 2017).

Barlett a kol. (2021) potvrdili regulačnú úlohu miR-155 a miR-22 expresie SMAD2, SMAD4 a TGF β -RII génov signalizácie TGF- β v bunkách kolorektálneho karcinómu. Tieto miRNA silne korelujú s nádorovými vlastnosťami, čo naznačuje potenciálne klinické využitie v imunoterapii.

He a kol. (2019) poukazujú na dôležitú úlohu miR-3191 v terapeuticknej stratégii liečby pacientov s CRC, keď „downreguláciou“ TGF β R-II ovplyvňuje migráciu a inváziu buniek CRC.

miR-4666-3p a miR-329 regulujú TGF- β R1, čím bránia aktivácii dráhy TGF- β 1/SMAD a pôsobia ako tumor supresorové gény (Chao a kol., 2022). Ning a kol. (2019) popisali, že v bunkách rakoviny hrubého čreva HCT116 a SW480 dochádza k nadmernej expresii miR-147, čo spôsobuje inhibíciu TGF- β /SMAD dráhy a následne blokovanie EMT.

circRNAs AKO REGULÁTORY V CRC

Kruhové RNA (circRNA) vznikajú spätným zostrihom lineárnej RNA a následným spojením kovalentnou väzbou. circRNA môžu naviazaním na miRNA inhibovať pripojenie miRNA k 3' UTR konkrétneho génu, a tak regulujú génovú expresiu štiepením mRNA alebo potlačením translácie mRNA (Vakhshiteh a kol., 2021).

Zheng a kol. (2022) detegovali zníženú hladinu circPTEN1 v bunkách kolorektálneho karcinómu a popisali, že jeho expresia pozitívne koreluje s prognózou pacienta. circPTEN1 sa viaže na MH2 doménu SMAD4 a narúša interakciu medzi SMAD4 a SMAD2/3, čo vedie k potlačeniu translokácie komplexu SMAD proteínov do jadra a následnej aktivácii transkripcie génov spojených s aktiváciou EMT.

circPACRGL zohráva dôležitú úlohu pri aktivácii expresie TGF- β 1, kedy naviazaním na komplex miR-142-3p/miR-506-3p podporuje proliferáciu, migráciu buniek CRC, ako aj diferenciáciu neutrofilov N1-N2. circPACRGL má teda onkogénnu úlohu, čo poskytuje dôvod na ďalšie štúdium rôznych typov circRNA pri liečbe CRC (Shang a kol., 2020).

Rengganaten a kol. (2020) detegovali u pacientov s CRC zvýšenú expresiu jadrových hsa-circ-0066631 a hsa-circ-0082096, účinkom ktorých dochádza k poklesu hladín miR-140-3p, miR-224, miR-382, miR-548c-3p a miR-579. Tak tieto circRNA regulujú transkripciu mRNA, ktorá kóduje proteíny TGF/SMAD signálnej dráhy (napr. SMAD2) a významne sa podieľajú na recidíve CRC a metastázovaní.

V porovnaní s inými ncRNA, ako sú miRNA a lncRNA, circRNA sú vhodnejšie diagnosticko-prognostické biomarkery kvôli ich vysokej stabilite, dlhému polčasu (> 48 h) a tkanivovo špecifickej expresii. Okrem toho sú circRNA hojne distribuované v rôznych tkanivách a telesných tekutinách, vrátane krvi, moču a slín, nachádzajú sa dokonca v exozómoch; sú teda sľubnými kandidátmi neinvazívnych biomarkerov.

Informácie o úlohe nekódujúcich RNA v CRC môžu viesť k novým prístupom v liečbe tohto ochorenia, avšak v súčasnosti je známy len obmedzený počet identifikovaných a

charakterizovaných lncRNA a circRNA s potvrdenou regulačnou úlohou v CRC. Preto existuje naliehavá potreba preskúmať úlohu ďalších lncRNA a circRNA, ktoré môžu uľahčiť prognózu, diagnostiku a liečbu CRC.

TGF- β SIGNÁLNA DRÁHA V LIEČBE CRC

Liečba CRC tradične zahŕňa chirurgický zákrok, chemoterapiu, rádioterapiu a imunoterapiu. Neexistuje žiadna akceptovaná neoadjuvantná (predoperačná) liečba rakoviny hrubého čreva. Pri rakovine konečníka sa však odporúča neoadjuvantná rádioterapia alebo chemorádioterapia pri strednom alebo pokročilom štádiu (Kuipers a kol., 2015). Základom chemoterapie u pacientov s kolorektálnym karcinómom je 5-Fluorouracil (5FU) (Ahmad a kol., 2021). Ďalším chemoterapeutikom je kyselina folínová (FA, leukovorín), ktorá sa stala štandardnou liečbou pre CRC pacientov s metastázami a jej podávanie predlžuje život pacientov približne o 8–9 mesiacov (Piawah a kol., 2019).

U pacientov s CRC je rezistencia na lieky kľúčovou príčinou zlyhania chemoterapie a následnej progresie ochorenia. U veľkej časti pacientov, ktorým bol podávaný 5-FU došlo k relapsu alebo tvorbe metastáz, preto sa začala zavádzať kombinácia chemoterapeutík (Che a kol., 2017, Kugimiya a kol., 2017).

Podávanie oxaliplatiny (analóg platiny) a irinotekanu (inhibitor *topoizomerázy*) s hlavnými chemoterapeutikami, fluorouracilom a kyselinou folínovou preukázalo vyššiu mieru odpovede a celkové prežívanie sa zvýšilo na 14–18 mesiacov.

Aktivácia signalizácie TGF- β je spojená s liekovou rezistenciou u rôznych druhov rakoviny, vrátane CRC (Zhang a kol., 2021). Fluorouracil (5-FU), protinádorové činidlo, ktoré patrí do kategórie antimetabolitov, sa široko používa na reguláciu metabolických dráh, ktoré sú nevyhnutné pre proliferáciu a prežívanie nádorových buniek. Predklinické štúdie ukázali, že 5-FU môže aktivovať dráhu TGF- β R1/SMAD3, čím sa bunky stávajú rezistentné na chemoterapeutikum. Inhibícia TGF- β R1 teda znižuje proliferáciu chemorezistentných rakovinových buniek a zvyšuje bunkovú smrť (Wang a kol., 2022). Účinok TGF- β na rezistenciu CRC buniek na chemoterapiu, môže vyžadovať reguláciu proteázou aktivovaného receptora 2 (PAR2), pretože aktivácia PAR2 eliminuje inhibíciu TGF- β (Quan a kol., 2019).

Maturácia receptora TGF- β R2 môže byť blokovaná podjednotkou 12 mediátorového proteínového komplexu (MED12), čo vedie k upregulácii expresie mezenchymálnych markerov a prispieva k rezistencii CRC buniek na chemoterapiu (Brunen a kol., 2013). V dôsledku toho potlačenie expresie MED12, nadmerná expresia receptora TGF- β alebo terapia rekombinantným TGF- β vedie k aktivácii signalizácie TGF- β . Brunen a kol. (2013) vo svojom

článku ďalej popisujú, že aktivácia TGF- β môže byť dobrým prediktorom tvorby metastáz v pečeni po kuratívnej resekcii kolorektálneho karcinómu.

Nedávny výskum naznačuje, že hladiny expresie SMAD4 korelujú s prognózou a odpoveďou na 5-FU a môžu pomôcť pri terapeutických rozhodnutiach týkajúcich sa jeho podávania (Lin a kol., 2019, Oyanagi a kol., 2019). Znížené hladiny SMAD3 alebo strata SMAD4 potláčajú expresiu nádorových supresorových génov indukovanú signálnou dráhou TGF- β , čo vedie k expresii antiapoptotických proteínov Bcl-2 a Bcl-W a zvýšenej rezistencii nádorových buniek voči 5-FU v bunkách kolorektálneho karcinómu (Vu a kol., 2020).

Romano a kol. (2016) odhalili, že podávanie 5-FU dramaticky zvýšilo translokáciu SMAD3 do jadra. Tejto translokácii SMAD3 zabránili aplikovaním LiCl spolu s 5-FU, čím potvrdili aktívne zapojenie dráhy TGF- β do chemorezistencie. V snahe odhaliť, ktoré molekuly by sa mohli podieľať na modulácii TGF- β signálnej dráhy pri rezistencii buniek CRC na chemoterapeutiká, vykonali profilovanie 84 génov TGF- β signálnej dráhy: bunky karcinómu hrubého čreva, ktoré dostávali 5-FU a boli naňho rezistentné, vykazovali zvýšenú expresiu 52 z 84 génov.

Szeglin a kol. (2022) vytvorili SMAD4 prognostický model na identifikáciu nízko a vysokorizikových skupín pacientov s CRC v štádiách II/III na základe expresie génov modulovaných SMAD4 proteínom. Tento génový profil má potenciál na prognostické využitie u vybraných pacientov s CRC.

Úloha signalizácie TGF- β /SMAD v rádioterapii nádorov je kontroverzná. V niektorých štúdiách bolo opísané, že po vystavení žiareniu dochádza k indukcii fibrózy cez „upreguláciu“ SMAD2/3. Reaktívne formy kyslíka (ROS) sa podieľajú na fibróze indukovanej ožiaréním (IR) prostredníctvom signalizácie TGF- β . TGF- β aktivuje molekuly SMAD, ktoré pozitívne regulujú produkciu ROS zvýšením regulácie *nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát oxidázy 4* (*NADP oxidázy 4*) (Dai a kol., 2019, Vu a kol., 2020).

Mutácie v niektorých génoch, ako je napríklad nádorový proteín p53, Ras, SMAD4 sú dôležité pri rádiorezistencii alebo rádiosenzibilizácii a môžu byť kontrolované dráhami TGF- β závislými od SMAD alebo nezávislými od SMAD (Cheng a kol., 2019).

Rezistencia na liečivá je často spojená s aktiváciou signalizácie TGF- β prostredníctvom rôznych mechanizmov, najmä prostredníctvom regulácie signalizácie TGF- β cez nekódujúce miRNA. V CRC miR-34a interaguje priamo s 3'-oblasťou SMAD4 a potláča signalizáciu TGF- β /SMAD4. U pacientov s CRC rezistentným na oxaliplatinu je miR-34a znížená, čím dochádza k zvýšeniu makroautofágie aktiváciou dráhy TGF- β /SMAD (Sun a kol., 2017, Chen a kol., 2020).

Hoci sa možnosti liečby pacientov s CRC zlepšili, na liečbu pokročilých štádií ochorenia sú potrebné účinnejšie činidlá, ktoré by cielene regulovali signálne dráhy aktivované v procese CRC s lepším výsledkom pre pacientov.

ANTI-TGF- β TERAPIA

Rôzne genetické a predklinické štúdie sa v poslednom období zamerali na signalizáciu TGF- β ako terapeutický prístup v liečbe rakoviny. V súčasnej dobe prebieha mnoho klinických štúdií zameraných na blokovanie signálnej dráhy TGF- β v liečbe kolorektálneho karcinómu (Obr.8) Tieto klinické štúdie môžeme zaradiť do niekoľkých skupín:

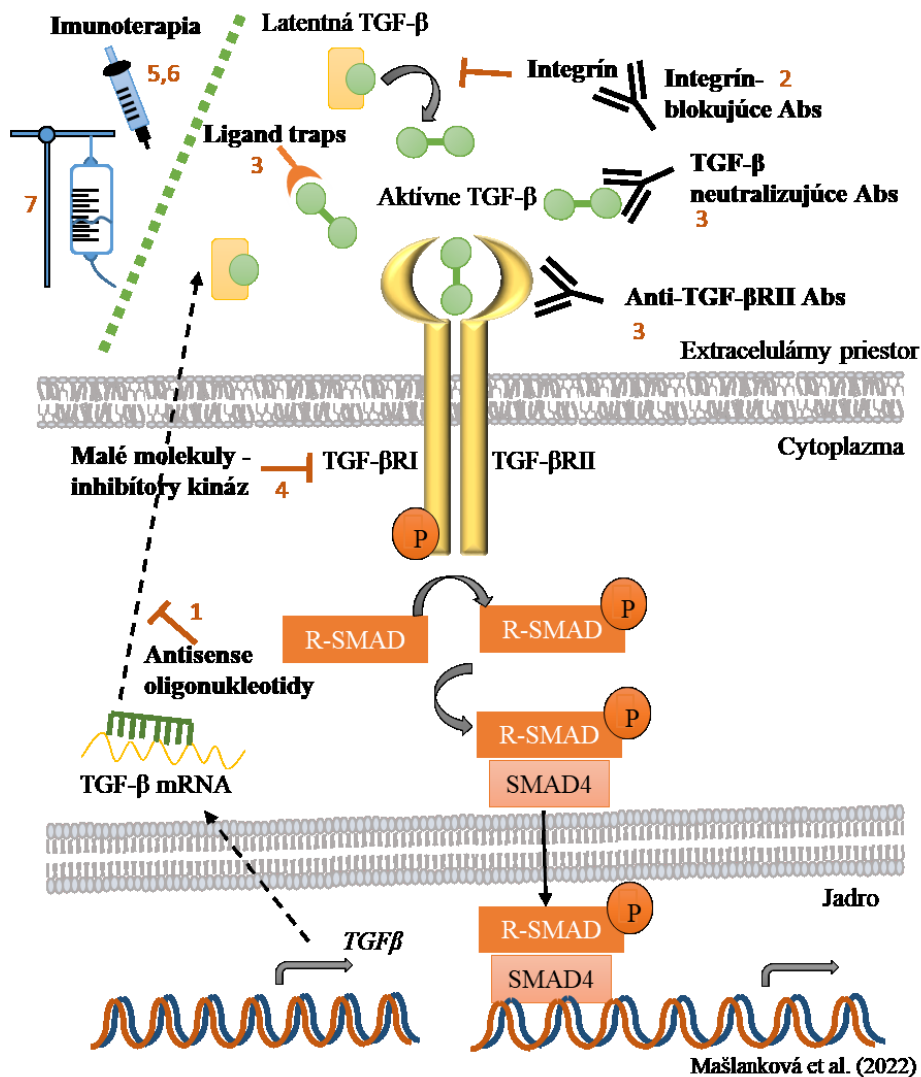
1. **“antisense“ oligonukleotidy“** (ASO; zrkadlová kópia krátkeho úseku mRNA, ktorá sa viaže na príslušnú mRNA, aby regulovala génovú expresiu), ktoré inhibujú TGF- β alebo expresiu jeho receptora (Jaschinski a kol., 2015). Jedným z takýchto oligonukleotidov je Trabedersen (AP12009), fosforotioátový oligodeoxynukleotid, ktorý je komplementárny k mRNA cytokínu TGF- β 2. Klinická štúdia v 2. fáze však nespĺnila očakávania a následná 3. fáza, bola ukončená predčasne z dôvodu slabého počtu pacientov (Berry-Candelario a kol., 2017).

Schlingensiepen a kol. v r. 2004 vykonali predklinickú štúdiu vplyvu oligonukleotidu AO 11014 na bunky kolorektálneho karcinómu, ktorý signifikantne redukoval expresiu TGF- β 1. Klinické štúdie tohto oligonukleotidu sa nevykonali.

V súčasnosti Lee a kol. (2022) skúmajú antisense oligonukleotid novej generácie – ngTASO, ktorý bol navrhnutý tak, aby došlo ku zvýšeniu jeho väzbovej afinity k mRNA a taktiež zvýšeniu stability v krvi modifikáciou molekulárnej štruktúry. Ich výsledky potvrdili, že podávanie protilátok anti PD-1 v kombinácii s ngTASO inhibuje rast nádoru a posilňuje protinádorovú imunitu, ktorá je sprostredkovaná cytotoxickými T bunkami.

2. **protilátky blokujúce integrín**, súťažia s ligandom TGF- β o väzbu na jeho receptor, sú schopné blokovat' aktiváciu latentného TGF- β .

264RAD, protilátka, ktorá blokuje integrín avp6 (kľúčová úloha pri aktivácii latentného TGF- β), znižuje rast nádoru a tvorbu metastázy *in vivo* (Eberlein a kol., 2013). Moore a kol. (2014) vo svojej publikácii popisujú, že aplikácia tejto protilátky samotnej alebo v kombinácii s trastuzumabom (monoklonálna protilátka IgG1, ktorá sa viaže na receptor ľudského epidermálneho rastového faktora 2 (EGFR), môže byť prospešná pre pacientov s karcinómami, ktorí sú rezistentní na liečbu trastuzumabom.



Obr. 8 Spôsoby inhibície TGF- β signalačnej dráhy

Ďalšou testovanou protilátkou je **SRK-181**, monoklonálna protilátka, ktorá inhibuje aktiváciu TGF- β 1 (naviazaním na latentnú formu TGF- β 1), ale nie izoformy TGF- β 2 a TGF- β 3 (Welsh a kol., 2021). Martin a kol. (2020) vo svojej práci popisali, že súbežné podávanie SRK-181-mIgG1 a protilátky anti-PD-1 u myši s nádormi, ktoré nereagujú na liečbu anti-PD-1, vyvolalo protinádorové reakcie a zlepšenie prežívania. Kombinovaná liečba SRK-181-mIgG1 a anti-PD-1 viedla k zvýšeniu intratumorálnych CD8⁺ T buniek a zníženiu imunosupresívnych myeloidných buniek. V 4-týždňovej toxikologickej štúdii SRK-181 na potkanoch sa nepozorovala žiadna srdcová valvulopatia, čo naznačuje, že selektívne blokovanie aktivácie TGF- β 1 môže zabrániť toxicite, ktorá sa predtým pozorovala pri týchto typoch inhibítorov. To viedlo k iniciácii štúdie, ktorej fáza I stále prebieha (štúdia DRAGON), ktorá hodnotí SRK-181 samostatne alebo v kombinácii s anti-PD-L1 inhibíciou, u pacientov s

lokálne pokročilými alebo metastatickými solídnymi nádormi. Jedno rameno tejto štúdie zahŕňa hodnotenie pacientov, ktorí mali predchádzajúcu anti-PD-1/PD-L1 terapiu a sú považovaní za „nereagujúcich“, aby sa posúdilo, či pridanie SRK-181 môže prekonať primárnu anti-PD-1 rezistenciu (Welsh a kol., 2021, Martin a kol., 2020).

3. **neutralizujúce protilátky**, ktoré inhibujú interakciu medzi TGF- β a jeho receptorom, **blokujúce protilátky**, ktoré naviazaním sa na receptor TGF- β RII ho zablokujú alebo „**ligand traps**“ (lapače ligandov – nasyntetizované rozpustné formy receptora, ktoré súťažia s receptorom na plazmatickej membráne bunky.

V súčasnosti stále prebieha klinické testovanie účinku a bezpečnosti **NIS793**, monoklonálnej IgG2 protilátky, ktorá sa viaže s vysokou afinitou na TGF- β 1 aj TGF- β 2 a s nízkou afinitou na TGF- β 3. Prvotné klinické dáta ukazujú, že NIS793 bol pacientmi s metastatickým kolorektálnym karcinómom dobre tolerovaný bez toxických účinkov (Segal a kol., 2022).

Ďalšou skúšanou protilátkou je **IMC-TR1**, monoklonálna IgG1 protilátka, ktorá sa naviaže a tým blokuje doménu na TGF β RII receptore. Testovanie tejto protilátky je zatiaľ v štádiu I, pretože stále nebola stanovená maximálna dávka, ktorá by bola pre pacienta toxická. Výsledky Tolchera a kol. (2017) popisujú, že zvyšovaním dávky nad 25 mg dochádzalo ku zhoršovaniu symptómov (nekontrolovateľné uvoľňovanie cytokínov) aj napriek profylaxii (kortikosteroidy, antihistaminiká).

M7824 (MSB0011359C- Bintrafusp alfa) je inovatívny bifunkčný fúzny proteín, prvý vo svojej triede zložený z protilátky IgG1 proti PD-L1 (programmed death-ligand) fúzovanej s extracelulárnou doménou TGF- β receptora II, ktorá slúži ako TGF- β „pasca“ (ligand trap). I. fáza štúdie sa uskutočnila na pacientoch s kolorektálnym karcinómom s potvrdenou mikrosatelitovou instabilitou (MSI) a metastázami v pečeni. Bintrafusp alfa je určený na neutralizáciu signalizácie TGF- β „zachytením“ a sekvestráciou všetkých izoform TGF- β a táto funkcia pasce je spojená s blokovaním PD-L1 v mikroprostredí nádoru (Doi a kol., 2020).

V roku 2022 Morris a kol. sledovali podávanie Bintrafusp alfa pacientom s metastatickým kolorektálnym karcinómom. Zatiaľ čo bintrafusp alfa bol u týchto pacientov celkovo dobre tolerovaný, rýchly nástup klinickej progresie a získanie nových mutácií vyvolali u výskumníkov obavy, čo viedlo k predčasnému ukončeniu štúdie.

Biologicky podobnou protilátkou, ako je bintrafusp alfa, ktorá je testovaná v klinických štúdiách je **SHR-1701**. Je to taktiež anti PD-L1 monoklonálna protilátka naviazaná na N koniec extracelulárnej domény TGF- β RII (Zhang a kol., 2020). SHR-1701 sa testuje v 19 rôznych

klinických štúdiách I. a II. fázy (zaregistrovaných na ClinicalTrials.gov od 16. septembra 2021) v rámci množstva lokálne pokročilých a metastatických solídnych nádorov. Z publikovaných výsledkov sa zdá, že SHR-1701 je dobre tolerovaná so zriedkavou toxicitou, so 46,9 % výskytom nežiaducich účinkov u pacientov s rôznymi typmi nádorov, ktoré súviseli s imunitou (Tschernia a kol., 2022).

4. **inhibítory kinázového receptora TGF- β RI**, malé molekuly, ktoré bránia prenosu signálu cez TGF- β receptor prostredníctvom väzby na ATP-väzbovú doménu TGF- β kinázy, inhibujú aktivitu *ATP kinázy*, a tak blokujú signálnu kaskádu TGF- β (Obr.8). Tieto inhibítory sú populárnejšie ako antisence oligonukleotidy a monoklonálne protilátky, pretože sú ekonomickejšie, ľahko sa vyrábajú, sú stabilné a môžu sa podávať perorálne. Prvotné podávanie inhibítorov kináz sa však spájalo s nežiaducimi kardiovaskulárnymi udalosťami u zvierat, a preto došlo k pribrzdeniu klinického vývoja týchto typov terapeutických liečiv (Rodon a kol., 2014).

Galunisertib (LY2157299) je nový inhibítor kinázy TGF- β 1, ktorého výsledkom je inhibícia SMAD2. 1.štúdia u ľudí ukázala, že galunisertib bol dobre tolerovaný a neboli pozorované žiadne nežiaduce kardiovaskulárne udalosti (Rodon a kol., 2014). Yamazaki a kol. (2022) vo svojej klinickej štúdii (fáza 2) popísali, že pridanie galunisertibu k neoadjuvantnej chemorádioterapii u pacientov s lokálne pokročilým rektálnym karcinómom zlepšilo mieru odpovede na 32 %, bol dobre tolerovaný a vyžaduje si ďalšie hodnotenie v randomizovanej štúdii. Galunisertib mení CD8⁺ T bunky tak, že majú lepšiu protinádorovú účinnosť so zvýšenou cytotoxicitou, a tak podávanie galunisertibu pred chemorádioterapiou môže zlepšiť odpoveď na terapiu.

Sľubnou stratégiou sa javí podávanie liečiv **vaktosertibu** a pembrolizumabu, kedy touto kombináciou dochádza k dvojitej inhibícii TGF- β signálnej dráhy (vaktosertib) a PD-1 (pembrolizumab), ktorá je sľubnou stratégiou na zvrátenie imunopresívneho nádorového mikroprostredia a slabých odpovedí na imunoterapiu (Lee a kol., 2020). Vaktosertib je vysoko selektívny, inhibítor aktivity proteín *serín/treonínkinázy* receptora transformujúceho rastového faktora (TGF)- β typu 1, ktorý inhibuje fosforyláciu SMAD2 a SMAD3, ako aj intracelulárnu signalizáciu TGF- β . Tento klinický výskum je zatiaľ iba v II. fáze, ale doposiaľ boli preukázané sľubné výsledky u pacientov s MSS kolorektálnym karcinómom, u ktorých nezabrala liečba samotným pembrolizumabom (Kim a kol., 2021). Jung a kol. (2020) sa vo svojej štúdii venovali farmakokinetike vaktosertibu a predpokladali, že na základe relatívne krátkeho

poľasu by sa mal podávať 2–3 krát denne, aby sa jeho koncentrácia udržala nad minimálnou hladinou.

V predklinickej fáze 1 je aj ďalšia štúdia, ktorá využíva vaktosertib v kombinácii s IL-2 a NK bunkami u pacientov s rakovinou rekta. Účelom tejto štúdie je ukázať, že podávanie dvoch liečiv (vaktosertib a IL-2) spolu s NK bunkami bude bezpečné a bude tieto darcovské NK bunky aktivovať. NK bunky a vaktosertib sú experimentálne, pretože nie sú schválené Food and Drug Administration (FDA). IL-2 bol schválený FDA na liečbu iných druhov nádorov, ale dávky použité v tejto štúdii sú nižšie ako schválené dávky (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05400122>).

Ďalšia aktívna klinická štúdia (vo fáze 2) je navrhnutá tak, aby identifikovala odporúčanú dávku 2. fázy kombinovaného podávania **LY3200882/kapecitabín** ako liečbu druhej línie u pacientov s CRC rezistentným na 5-FU alebo kapecitabín. LY 3200882 je vysoko selektívny inhibítor receptora TGF- β typu 1 (TGF β RI). Účinne inhibuje fosforyláciu SMAD sprostredkovanú TGF- β *in vitro* v nádorových a imunitných bunkách a *in vivo* v subkutánných nádoroch. V tejto klinickej štúdii dostali pacienti s aktivovanou TGF- β dráhou, ktorí sú rezistentní na chemoterapiu, fluórpyrimidín (5-FU alebo kapecitabín) v prvej línii chemoterapie, zvyčajne v kombinácii s oxaliplatinou a v závislosti od preferencií miestnej nemocnice tiež bevacizumab alebo cetuximab/ panitumumab, ak ide o nádor bez KRAS mutácie. Pridanie LY3200882 ku kapecitabínu by tak malo viesť k lepšej odpovedi na chemoterapeutickú liečbu. **Kapecitabín** sa v klinickej praxi normálne využíva pri pokročilom CRC, a preto je atraktívny pre tento koncept štúdie. Kapecitabín (N4-pentyloxykarbonyl-5'-deoxy-5-fluórocytidín) je fluórpyrimidínkarbamát, ktorý sa premieňa na 5-fluorouracil enzýmami lokalizovanými v nádorových bunkách. Je účinný pri kolorektálnom karcinóme a bol schválený ako paliatívna liečba pokročilého kolorektálneho karcinómu a adjuvantná chemoterapia; s relatívne menšou frekvenciou vedľajších účinkov a pohodlným perorálnym podávaním.

5. inhibítory imunitného kontrolného bodu (ICI) (Obr. 5) majú zásadnú úlohu pri modulácii imunitného systému. Táto skupina zahŕňa monoklonálne protilátky, ktoré vysielajú inhibičné signály T bunkám a zvyšujú protinádorovú imunitnú odpoveď T buniek. Okrem imunoregulačných buniek, ako sú Treg (regulačné T bunky), M2 makrofágy a MDSC (myeloidné odvodené supresorové bunky), má cytokín TGF- β tiež schopnosť kontrolovať a modulovať funkcie T buniek a to uvoľnením molekúl, ktoré sú schopné aktivovať špecifické inhibičné imunitné kontrolné body (ICI). Týmto spôsobom sa aktiváciou inhibičných

imunitných kontrolných bodov, ako je CTLA-4 (cytotoxický proteín-4 spojený s T-lymfocytmi), PD-1/PD-L1 (programovaná bunková smrť-1/ligand), LAG3 (gén aktivujúci lymfocyty 3) alebo TIM-3 (molekula obsahujúca T-bunkový imunoglobulín a mucínovú doménu-3) môže narušiť proliferáciu CTL (cytotoxických T-lymfocytov) v CRC a znížiť protinádorovú imunitnú odpoveď (Makaremi a kol., 2021).

Najznámejšie mAb, ktoré sa zameriavajú na inhibičné kontrolné body, sú **Ipilimumab a Tremelimumab**, ktoré pôsobia ako anti-CTLA-4 látky; **Nivolumab a Pembrolizumab**, ktoré pôsobia ako činidlá proti PD-1; a **Atezolizumab a Durvalumab**, ktoré sú anti-PD-L1 mAbs.

Nivolumab je humánna monoklonálna protilátka imunoglobulín G4 (IgG4), ktorá sa viaže na receptor programovanej smrti-1 (PD-1) a blokuje jeho interakciu s PD-L1 a PD-L2. Receptor PD-1 je negatívny regulátor aktivity T-buniek, pre ktorý je preukázané, že sa podieľa na kontrole imunitných odpovedí T buniek. Spojenie PD-1 s ligandmi PD-L1 a PD-L2 má za následok inhibíciu proliferácie T-buniek a sekréciu cytokínov. Nivolumab zosilňuje odpovede T buniek vrátane protinádorových odpovedí, prostredníctvom blokády PD-1 väzbou na ligandy PD-L1 a PD-L2. Nivolumab sa využíva ako monoterapia alebo v kombinácii s ipilimumabom u pacientov s mikrosatelitnou instabilitou-high/mismatch repair-deficient (MSI-H/dMMR) u pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom (mCRC), ktorý progredoval po liečbe fluórpyrimidínom, oxaliplatinou a irinotekanom. Lenz a kol. vo svojej štúdiu popisujú výsledky prvej štúdie podávania kombinácie nivolumabu a nízkej dávky **ipilimumabu**, ktoré preukázali robustný a trvalý klinický prínos u pacientov s MSI-H/dMMR mCRC (Lenz a kol., 2022, Lonardi a kol., 2022).

Tremelimumab je monoklonálna protilátka IgG2, ktorá sa viaže na CTLA-4, primárne exprimovaný na povrchu T lymfocytov, a tým zvyšuje aktiváciu a proliferáciu T buniek, čo má za následok zvýšenú diverzitu T buniek a zvýšenú protinádorovú aktivitu. Tak Tremelimumab blokuje väzbu bunkových ligandov prezentujúcich antigén B7.1 a B7.2 na CTLA-4, čo vedie k inhibícii B7-CTLA-4-sprostredkovanej downregulácie aktivácie T buniek; následne môže B7.1 alebo B7.2 interagovať s iným proteínom povrchového receptora T buniek, CD28, čo vedie k aktivácii T buniek sprostredkovanej B7-CD28 (Comin-Anduix a kol., 2016).

Durvalumab je selektívna, vysoko afinitná humánna monoklonálna protilátka IgG1, ktorá sa viaže na ligandy PD-L1 a PD-L2, a tak bráni naviazaniu týchto ligandov na ich receptory. Takáto inhibícia môže zabrániť inaktivácii T buniek a aktivovať imunitný systém, aby vyvolal cytotoxickú odpoveď T lymfocytov (CTL) proti nádorovým bunkám exprimujúcim PD-L1. Oh a kol. (2022) vo svojej štúdiu preukázali účinnosť **durvalumabu** u

pacientov s MSI-H/dMMR mCRC, u ktorých nebola účinná štandardná chemoterapeutická liečba.

Výsledky randomizovanej štúdie (Canadian Cancer Trials Group) Chena a kol. (2020) poukazujú na benefit podávania kombinácie **durvalumabu** a **tremelimumabu** v porovnaní s monoterapiou u pacientov s pokročilým kolorektálnym karcinómom. Bola prvou štúdiou, ktorá demonštruje účinnosť blokády imunitných kontrolných bodov u pacientov s kolorektálnym karcinómom, ktorí neboli vybraní, kvôli deficitu mismatch opravného mechanizmu. Táto kombinácia predĺžila celkové prežívanie pacientov o 2,5 mesiaca. Chen a kol., (2020) predpokladali, že zacielenie na PD-L1 durvalumabom a CTLA-4 tremelimumabom by malo mať aditívnu a/alebo synergickú aktivitu a dokázali, že túto kombináciu možno bezpečne podávať.

6. **vakcíny na moduláciu signalizácie TGF- β** sa používajú na uľahčenie deštrukcie nádorových buniek v mnohých rôznych typoch nádorov. Nádorové bunky, u ktorých dochádza k mutáciám DNA na svojom povrchu exprimujú peptidy, ktoré obsahujú tieto mutácie ako cudzie antigény. Nádor má schopnosť zabrániť aktivácii imunity „ukrytím“ týchto antigénov a tak schopnosť potlačiť imunitný systém. V liečbe sa využívajú neoantigénne vakcíny, ktoré sú špecifické pre daného jedinca, indukujú CD8⁺ T bunky schopné lýzy nádorovej bunky, a tak pomáhajú aktivovať a udržiavať protinádorovú imunitnú odpoveď. V súčasnosti sú testované napr. vakcína **GRT-C901**, ktorá využíva adenovírusový vektor, **GRT-R902**, ktorá je založená na samoamplifikujúcej sa mRNA (Hecht a kol., 2022), **polyPEPI1018**, multipeptidová vakcína, ktorá je zameraná na 7 rôznych antigénov exprimovaných na povrchu nádorovej bunky (Hubbard a kol., 2022), **Ad-CEA** adenovírusová vakcína schopná indukovať imunitnú odpoveď CD4⁺/CD8⁺ T buniek na CEA antigen (Redman a kol., 2022) a mnohé ďalšie.

7. **adoptívna bunková terapia** využíva bunky imunitného systému (CD4⁺ a CD8⁺ T bunky, ktoré sú súčasťou adaptívneho imunitného systému. T bunky môžu byť pripravené niekoľkými spôsobmi. 1. odoberajú sa z chirurgicky resektovaných nádorov. Po odbere môžu byť reaktivované *in vitro* a infúzne podané pacientovi. 2. odoberajú sa z periférnej krvi a geneticky sa modifikujú tak, aby vykazovali aktivitu proti antigénom nádorových buniek. Pre pacientov s CRC je bežne cieľovým antigénom karcinoembryonálny antigén (CEA), pretože je u týchto typov nádorov „upregulovaný“ (Juat a kol., 2022).

Tabuľka 3 Vybrané klinické testy liečiv v liečbe kolorektálneho karcinómu (U.S. National Library of Medicine; ClinicalTrials.gov)

Klinické skúšky (fáza)	Liečivo	Cieľ	Mechanizmus
“Antisense oligonukleotidy“			
NCT00844064 (I)	AP12009 (trabedersen)	TGF-βII	väzba na TGF-βII mRNA, dochádza k redukcii jeho expresie
Protilátky			
NCT04952753 (II)	NIS793	TGF-β	monoklonálna protilátka špecifická pre TGF-β, antagonista k IgG2 redukcia fosforylácie SMAD2/3 a expresie TGF-β
NCT02947165 (I)	NIS793	TGF-β	monoklonálna protilátka špecifická pre TGF-β, redukcia fosforylácie SMAD2/3 a expresie TGF-β
NCT01646203 (I)	IMC-TR1 (LY3022859)	TGF-βRII	redukcia fosforylácie SMAD2/3 a expresie TGF-β
NCT04291079 (I)	SRK-181	TGF-β1	monoklonálna protilátka špecifická pre TGF-β1
Ligand traps			
NCT03436563 (I/II)	M7824	TGF-βRII	bifunkčný anti-PD-L1/TGF-βRII ligand trap
NCT02517398 (I)	M7824 (Bintrafusp Alfa)	TGF-βRII	bifunkčný anti-PD-L1/TGF-βRII ligand trap
NCT04856787 (II/III)	SHR-1701	TGF-βRII	bifunkčný anti-PD-L1/TGF-βRII ligand trap
NCT05300269 (II)	SHR-1701	TGF-βRII	bifunkčný anti-PD-L1/TGF-βRII ligand trap
Inhibítory kinázového receptora TGF-βRI			
NCT04031872 (I/II)	LY3200882/ Capecitabine	TGF-βRI	inhibícia aktivity TGF-βRI
NCT05400122 (I)	Vaktosertib	TGF-βRI	inhibícia aktivity TGF-βRI
NCT03724851 (I/II)	Vaktosertib + Pembrolizumab	TGF-βRI	inhibícia aktivity TGF-βRI
NCT03470350 (I/II)	Galunisertib Capecitabine (LY2157299)	TGF-βRI	inhibícia aktivity TGF-βRI
Inhibítory imunitného kontrolného bodu			
NCT03981146 (II)	Nivolumab	receptor PD-1	blokuje interakciu receptora PD-1 s PD-L1 a PD-L2
NCT04730544 (II)	Nivolumab, Ipilimumab	receptor PD-1, CTLA-4	blokuje interakciu receptora PD-1 s PD-L1 a PD-L2, blokuje väzbu bunkových ligandov prezentujúcich antigén B7.1 a B7.2 na CTLA-4
NCT05310643 (II)	Nivolumab, Ipilimumab	receptor PD-1, CTLA-4	blokuje interakciu receptora PD-1 s PD-L1 a PD-L2, blokuje väzbu bunkových ligandov prezentujúcich antigén B7.1 a B7.2 na CTLA-4

NCT03693846 (pozastavená 10/2022- nedostatočná účinnosť)	Nivolumab, Ipilimumab	receptor PD- 1, CTLA-4	blokuje interakciu receptora PD-1 s PD-L1 a PD-L2 blokuje väzbu bunkových ligandov prezentujúcich antigén B7.1 a B7.2 na CTLA-4
NCT04540159 (ukončená)		TGF-β1	Meranie hladiny prietokovou cytometriou TGF-β1, CTLA-4, PD-L1, PD-1, Tim-3, LAG-3 a ďalších v intraabdominálnom ascite
NCT03007407 (II)	Tremelimumab Durvalumab,	CTLA-4, anti-PD-L1	blokuje väzbu bunkových ligandov prezentujúcich antigén B7.1 a B7.2 na CTLA-4
NCT02870920 (ukončená)	Tremelimumab Durvalumab,	CTLA-4, anti-PD-L1	blokuje väzbu bunkových ligandov prezentujúcich antigén B7.1 a B7.2 na CTLA-4
Vakcíny			
NCT05141721 (III)	GRT-C901/ GRT-R902	neoantigény	imunizácia proti neoantigénom nádorových buniek
NCT05130060	polyPEPI1018	7 neoantigénov	imunizácia proti neoantigénom nádorových buniek
Adoptívna bunková terapia			
NCT03431311 (ukončená)	adoptívna bunková terapia s radium-1 TCR ⁺ T bunkami zameranými anti TGFβRII	TGF-βII	imunoterapia T bunkami zameranými anti TGFβRII
NCT05040568 (I)	CB-NK-TGF- ÎR2-/NR3C1		imunoterapia CK-NK bunkami s odstránenými receptormi TGF-βR2 a NR3C1

MEDIKAMENTÓZNA LIEČBA, TERAPEUTICKÉ STRATÉGIE ZALOŽENÉ NA REGULÁCII SIGNÁLNEJ DRÁHY TGF-β/SMAD

Vznik a rozvoj CRC je vyvolaný kombináciou genetických a environmentálnych faktorov. Hoci väčšina hlavných génov v procese rozvoja CRC bola dobre charakterizovaná, vplyv environmentálnych faktorov na toto ochorenie zostáva nedefinovaný. V tejto súvislosti je potrebná hlbšia štúdia vzťahu medzi stravou, mikrobiotou a CRC. Výsledky tejto štúdie by mohli viesť k zavedeniu súboru zmien životného štýlu, ktoré by prispievali k zníženiu rizika vzniku CRC.

Boli opísané účinky niekoľkých potenciálnych molekúl, ktoré indukujú rast nádoru alebo inhibujú proliferáciu a metastázovanie buniek karcinómu prostredníctvom regulácie signálnej dráhy TGF-β/SMAD (Zhang T a kol., 2020).

Baicaleín je flavonoid, pôvodne extrahovaný z jedlých liečivých rastlín *Scutellaria baicalensis* (šišiak bajkalský) a *S. lateriflora*. Baicaleín má inhibičný účinok na signálnu dráhu

TGF- β /SMAD2/3 vo fibroblastoch *in vitro* aj *in vivo* cez zníženie hladín fosforylovaných SMAD2 a SMAD3, ale neovplyvňuje SMAD 1, 5 a 8 v BMP signálnej dráhe a neovplyvňuje hladiny celkového SMAD2 a SMAD3 (Zhang YF a kol., 2016).

Ženšen (*Panax ginseng*) je tradičná liečivá bylina, ktorá je v Číne široko používaná už tisíce rokov. Hlavnou zložkou ženšenu sú ginsenosidy. Ginsenosid Rg3 má inhibičný účinok na signálne dráhy TGF- β /SMAD a ERK v keloidných fibroblastoch a zvyšuje hladiny expície mRNA SMAD7 (Tang M. a kol., 2018). Dai a kol.(2019) potvrdili, že ginsenosid Rb2 môže inhibovať expresiu SMAD4 a fosforylovaného SMAD2/3 v bunkách CRC.

Kaempferol je prírodný flavanol, typ flavonoidu, ktorý sa nachádza v rôznych rastlinách a potravinách rastlinného pôvodu, vrátane kelu, fazule, čaju, špenátu a brokolice. Viaže sa na TGF- β RI, čo vedie k jeho inaktivácii. To má za následok zníženú fosforyláciu SMAD2/3 a inhibíciu signálnej dráhy TGF- β /SMAD (Li a kol., 2016).

Loureirin B, flavonoid extrahovaný z *Dracaena cochinchinensis* (dračí strom, dracéna), sa používa v tradičnej čínskej medicíne. Loureirin B upreguluje expresiu matrixových metaloproteináz MMP-1, MMP-3, MMP-9 a MMP-13, ktoré indukujú degradáciu extracelulárneho matrixu a účinne potláčajú dráhu TGF- β /SMAD inhibovaním fosforylácie SMAD2 a SMAD3 (Bai a kol., 2015).

Galangín je polyfenolová zlúčenina odvodená primárne z rôznych liečivých bylín, ktorej účinkom dochádza k zníženiu fosforylácie SMAD2 a SMAD3 bez zmeny expície celkového SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD6 a SMAD7 (Zhang Y a kol., 2016).

Celastrol je farmakologicky aktívna látka izolovaná z koreňových extraktov *Tripterygium wilfordii*, ktorá sa používa na liečbu rakoviny a iných zápalových ochorení (Shi a kol., 2020). Jiang a kol. (2019) ukázali, že celastrol znižuje hladiny SMAD4 a fosforylovaného SMAD2/3. Celastrol môže spoločne inhibovať CRC prostredníctvom TGF- β , čo je sľubná liečba pre pacientov s CRC (Shi a kol., 2020).

Qingjie Fuzheng granule sú pripravené zo zmesi 4 bylín – *Hedyotis diffusa Willd*, sladu, *Astragalus* a *Scutellaria barbata*. Významne inhibujú expresiu niekoľkých kľúčových proteínov v kanonickej dráhe TGF- β /SMAD, vrátane TGF- β , fosforylovaných SMAD2/3 a SMAD4. Táto inhibícia vedie k zníženiu pomeru N-kadherínu k E-kadherínu, čo sa považuje za dôkaz inhibície EMT (Zhang L. a kol., 2020).

ZÁVER

Protinádorová imunita je sprostredkovaná makrofágmi, prirodzenými zabíjačskými (NK) bunkami, granulocytmi (polymorfonukleárne leukocyty, PMN), T bunkami a protilátkami. V posledných rokoch sa detailne študuje úloha PMN pri regulácii adaptívnej imunity, v rôznych typoch nádorov. V nádorových ochoreniach majú PMN rôznorodé funkcie, niektorí autori popisujú ich protinádorovú aktivitu, ale narastá počet publikácií, v ktorých autori potvrdzujú ich negatívnu reguláciu imunitných odpovedí a ich prítomnosť u onkologických pacientov je spojená so zlou prognózou a terapeutickými výsledkami. Tieto bunky potláčajú fyziologickú úlohu T a B lymfocytov a prirodzených zabíjačských (NK) buniek a taktiež podporujú progresiu nádoru a metastázovania prostredníctvom neimunitných mechanizmov. Cytokíny produkované nádorovými bunkami (VEGF, TGF- β) tiež zohrávajú podobnú úlohu, keď inhibujú vývoj a funkciu T buniek. TGF- β ako imunosupresívny faktor významne ovplyvňuje proliferáciu, aktiváciu a diferenciaciu imunitných efektorových buniek. Epigenetické zmeny, ktoré môžu byť ovplyvnené dráhou TGF- β pri CRC, by sa mali starostlivo študovať, pretože mechanizmy liekovej rezistencie sú u pacientov v rôznych štádiách rakoviny odlišné a pre každého pacienta je účinnejšia personalizovaná liečba. Pre personalizovaný prístup je preto veľmi dôležitá znalosť aktivácie a inhibície faktorov, ktoré ovplyvňujú signálnu dráhu TGF- β .

LITERATÚRA

1. Ahmad R, Singh JK, Wunnava A, Al-Obeed O, Abdulla M, Srivastava SK. Emerging trends in colorectal cancer: Dysregulated signaling pathways (Review). *Int J Mol Med*. 2021 Mar;47(3):14. doi: 10.3892/ijmm.2021.4847. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33655327; PMCID: PMC7834960.
2. Alidoust M, Hamzehzadeh L, Khorshid Shamshiri A, Afzaljavan F, Kerachian MA, Fanipakdel A, Aledavood SA, Allahyari A, Bari A, Moosanen Mozaffari H, Goshayeshi L, Pasdar A. Association of SMAD7 genetic markers and haplotypes with colorectal cancer risk. *BMC Med Genomics*. 2022 Jan 11;15(1):8. doi: 10.1186/s12920-021-01150-3. PMID: 35016683; PMCID: PMC8753827.
3. Andre T, Amonkar M, Norquist JM, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt CJA, Smith D, Garcia-Carbonero R, Sevilla I, De La Fouchardiere C, Rivera F, Elez E, Diaz LA Jr, Yoshino T, Van Cutsem E, Yang P, Farooqui M, Le DT. Health-related quality of life in patients with microsatellite instability-high or mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer treated with first-line pembrolizumab versus chemotherapy (KEYNOTE-177): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021 May;22(5):665-677. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00064-4. Epub 2021 Apr 1. PMID: 33812497.
4. Azizidoost S, Ghaedrahmati F, Anbiyae O, Ahmad Ali R, Cheraghzadeh M, Farzaneh M. Emerging roles for lncRNA-NEAT1 in colorectal cancer. *Cancer Cell Int*. 2022 Jun 8;22(1):209. doi: 10.1186/s12935-022-02627-6. PMID: 35676702; PMCID: PMC9178824.
5. Baba AB, Rah B, Bhat GR, Mushtaq I, Parveen S, Hassan R, Hameed Zargar M, Afroze D. Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) Signaling in Cancer-A Betrayal Within. *Front Pharmacol*. 2022 Feb 28;13:791272. doi: 10.3389/fphar.2022.791272. PMID: 35295334; PMCID: PMC8918694.
6. Bartlett B, Gao Z, Schukking M, Menor M, Khadka VS, Fabbri M, Fei P, Deng Y. The miRNA Profile of Inflammatory Colorectal Tumors Identify TGF- β as a Companion Target for Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Oct 14;9:754507. doi: 10.3389/fcell.2021.754507. PMID: 34722540; PMCID: PMC8551827.
7. Bayat Z, Ghaemi Z, Behmanesh M, Soltani BM. Hsa-miR-186-5p regulates TGF β signaling pathway through expression suppression of SMAD6 and SMAD7 genes in colorectal cancer. *Biol Chem*. 2021 Jan 18;402(4):469-480. doi: 10.1515/hsz-2019-0407. PMID: 33938174.

8. Berry-Candelario J, Farber SH, Fecci PE. Chapter 2 - Immune Constitution of Patients With Brain Tumors, *Translational Immunotherapy of Brain Tumors*, Academic Press, 2017, Pages 13-32, ISBN 9780128024201.
9. Boulay JL, Mild G, Lowy A, Reuter J, Lagrange M, Terracciano L, Laffer U, Herrmann R, Rochlitz C. SMAD7 is a prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2003 Apr 20;104(4):446-9. doi: 10.1002/ijc.10908. PMID: 12584741.
10. Boye A. A cytokine in turmoil: Transforming growth factor beta in cancer. *Biomed Pharmacother*. 2021 Jul;139:111657. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111657. Epub 2021 May 13. PMID: 34243626.
11. Brunen D, Willems SM, Kellner U, Midgley R, Simon I, Bernards R. TGF- β : an emerging player in drug resistance. *Cell Cycle*. 2013 Sep 15;12(18):2960-8. doi: 10.4161/cc.26034. Epub 2013 Aug 12. PMID: 23974105; PMCID: PMC3875670.
12. Cafri G, Yossef R, Pasetto A, Deniger DC, Lu YC, Parkhurst M, Gartner JJ, Jia L, Ray S, Ngo LT, Jafferji M, Sachs A, Prickett T, Robbins PF, Rosenberg SA. Memory T cells targeting oncogenic mutations detected in peripheral blood of epithelial cancer patients. *Nat Commun*. 2019 Jan 25;10(1):449. doi: 10.1038/s41467-019-08304-z. PMID: 30683863; PMCID: PMC6347629.
13. Cai J, Fang L, Huang Y, Li R, Xu X, Hu Z, et al. Simultaneous Overactivation of Wnt/ β -Catenin and TGF β Signalling by miR-128-3p Confers Chemoresistance-Associated Metastasis in NSCLC. *Nat. Commun.* (2017), 8, 15870. doi:10.1038/ncomms15870.
14. Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llargo A, Espinet E, Hernando-Momblona X, Iglesias M, Sevillano M, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Byrom D, Cortina C, Morral C, Barceló C, Tosi S, Riera A, Attolini CS, Rossell D, Sancho E, Batlle E. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2015 Apr;47(4):320-9. doi: 10.1038/ng.3225. Epub 2015 Feb 23. PMID: 25706628.
15. Carter JV, O'Brien SJ, Burton JF, Oxford BG, Stephen V, Hallion J, et al. The microRNA-200 Family Acts as an Oncogene in Colorectal Cancer by Inhibiting the Tumor Suppressor RASSF2. *Oncol Lett.*, 2019, 18(4):3994– 4007. doi: 10.3892/ol.2019.10753.
16. Castriconi R, Dondero A, Bellora F, Moretta L, Castellano A, Locatelli F, Corrias MV, Moretta A, Bottino C. Neuroblastoma-derived TGF- β 1 modulates the chemokine receptor repertoire of human resting NK cells. *J Immunol*. 2013 May 15;190(10):5321-8. doi: 10.4049/jimmunol.1202693. Epub 2013 Apr 10. PMID: 23576682.
17. Codrich M, Dalla E, Mio C, Antoniali G, Malfatti MC, Marzinotto S, Pierobon M, Baldelli E, Di Loreto C, Damante G, Terrosu G, Pucillo CEM, Tell G. Integrated multi-omics

- analyses on patient-derived CRC organoids highlight altered molecular pathways in colorectal cancer progression involving PTEN. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021 Jun 21;40(1):198. doi: 10.1186/s13046-021-01986-8. PMID: 34154611; PMCID: PMC8215814.
18. Comin-Anduix B, Escuin-Ordinas H, Ibarrodo FJ. Tremelimumab: research and clinical development. *Onco Targets Ther.* 2016 Mar 23;9:1767-76. doi: 10.2147/OTT.S65802. PMID: 27042127; PMCID: PMC4809326.
 19. Cook DP, Vanderhyden BC. Context specificity of the EMT transcriptional response. *Nat Commun.* 2020 May 1;11(1):2142. doi: 10.1038/s41467-020-16066-2. PMID: 32358524; PMCID: PMC7195456.
 20. Dai YH, Li XQ, Dong DP, Gu HB, Kong CY, Xu Z. P27 Promotes TGF- β -Mediated Pulmonary Fibrosis via Interacting with MTORC2. *Can Respir J.* 2019 Sep 19;2019:7157861. doi: 10.1155/2019/7157861. PMID: 31641391; PMCID: PMC6770332.
 21. Dai G, Sun B, Gong T, Pan Z, Meng Q, Ju W. Ginsenoside Rb2 inhibits epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells by suppressing TGF- β /SMAD signaling. *Phytomedicine* 2019; 56: 126-135. doi: 10.1016/j.phymed.2018.10.025, PMID: 30668333;
 22. Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol Cell.* 2010 Aug 13;39(3):373-84. doi: 10.1016/j.molcel.2010.07.011. PMID: 20705240; PMCID: PMC2921543.
 23. De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De' Angelis N, Leandro G, Di Mario F, Gaiani F, Negri F. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed.* 2018 Dec 17;89(9-S):97-101. doi: 10.23750/abm.v89i9-S.7960. PMID: 30561401; PMCID: PMC6502181.
 24. D'Eliseo D, Di Rocco G, Loria R, Soddu S, Santoni A, Velotti F. Epitelial-to-mesenchimal transition and invasion are upmodulated by tumor-expressed granzyme B and inhibited by docosahexaenoic acid in human colorectal cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016 Feb 2;35:24. doi: 10.1186/s13046-016-0302-6. PMID: 26830472; PMCID: PMC4736710.
 25. de Ceuninck van Capelle C, Spit M, Ten Dijke P. Current perspectives on inhibitory SMAD7 in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2020 Dec;55(6):691-715. doi: 10.1080/10409238.2020.1828260. Epub 2020 Oct 20. PMID: 33081543.
 26. Dhatchinamoorthy K, Colbert JD, Rock KL. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Front Immunol.* 2021 Mar 9;12:636568. doi: 10.3389/fimmu.2021.636568. PMID: 33767702; PMCID: PMC7986854.

27. Diamantopoulos MA, Tsiakanikas P, Scorilas A. Non-coding RNAs: the riddle of the transcriptome and their perspectives in cancer. *Ann Transl Med.* 2018 Jun;6(12):241. doi: 10.21037/atm.2018.06.10. PMID: 30069443; PMCID: PMC6046292.
28. Ding L, Yu LL, Han N, Zhang BT. miR-141 Promotes Colon Cancer Cell Proliferation by Inhibiting MAP2K4. *Oncol Lett.* 2017, 13(3):1665–71. doi: 10.3892/ol.2017.5653.
29. Doi T, Fujiwara Y, Koyama T, Ikeda M, Helwig C, Watanabe M, Vugmeyster Y, Kudo M. Phase I Study of the Bifunctional Fusion Protein Bintrafusp Alfa in Asian Patients with Advanced Solid Tumors, Including a Hepatocellular Carcinoma Safety-Assessment Cohort. *Oncologist.* 2020 Sep;25(9):e1292-e1302. doi: 10.1634/theoncologist.2020-0249. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32324927; PMCID: PMC7485354.
30. Du D, Katsuno Y, Meyer D, Budi EH, Chen SH, Koeppen H, Wang H, Akhurst RJ, Derynck R. Smad3-mediated recruitment of the methyltransferase SETDB1/ESET controls *Snail1* expression and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Rep.* 2018 Jan;19(1):135-155. doi: 10.15252/embr.201744250. Epub 2017 Dec 12. PMID: 29233829; PMCID: PMC5757214.
31. Elkouris M, Kontaki H, Stavropoulos A, Antonoglou A, Nikolaou KC, Samiotaki M, Szantai E, Saviolaki D, Brown PJ, Sideras P, Panayotou G, Talianidis I. SET9-Mediated Regulation of TGF- β Signaling Links Protein Methylation to Pulmonary Fibrosis. *Cell Rep.* 2016 Jun 21;15(12):2733-44. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.051. Epub 2016 Jun 9. PMID: 27292644; PMCID: PMC4920893.
32. Eneh S, Heikkinen S, Hartikainen JM, Kuopio T, Mecklin JP, Kosma VM, Mannermaa A. MicroRNAs Associated With Biological Pathways of Left- and Right-sided Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2020 Jul;40(7):3713-3722. doi: 10.21873/anticancerres.14360. PMID: 32620610.
33. Farooqi AA, de la Roche M, Djamgoz MBA, Siddik ZH. Overview of the oncogenic signaling pathways in colorectal cancer: Mechanistic insights. *Semin Cancer Biol.* 2019 Oct;58:65-79. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.01.001. Epub 2019 Jan 8. PMID: 30633978.
34. Fleming NI, Jorissen RN, Mouradov D, Christie M, Sakthianandeswaren A, Palmieri M, Day F, Li S, Tsui C, Lipton L, Desai J, Jones IT, McLaughlin S, Ward RL, Hawkins NJ, Ruskiewicz AR, Moore J, Zhu HJ, Mariadason JM, Burgess AW, Busam D, Zhao Q, Strausberg RL, Gibbs P, Sieber OM. SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2013 Jan 15;73(2):725-35. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2706. Epub 2012 Nov 8. PMID: 23139211.

35. Fontana E, Eason K, Cervantes A, Salazar R, Sadanandam A. Context matters-consensus molecular subtypes of colorectal cancer as biomarkers for clinical trials. *Ann Oncol*. 2019 Apr 1;30(4):520-527. doi: 10.1093/annonc/mdz052. PMID: 30796810; PMCID: PMC6503627.
36. Frangiannis N. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *J Exp Med*. 2020 Feb 13;217(3):e20190103. doi: 10.1084/jem.20190103. PMID: 32997468; PMCID: PMC7062524.
37. Frey P, Devisme A, Schrempp M, Andrieux G, Boerries M, Hecht A. Canonical BMP Signaling Executes Epithelial-Mesenchymal Transition Downstream of SNAIL1. *Cancers (Basel)*. 2020 Apr 21;12(4):1019. doi: 10.3390/cancers12041019. PMID: 32326239; PMCID: PMC7226241.
38. Fricke F, Mussack V, Buschmann D, Hausser I, Pfaffl MW, Kopitz J, Gebert J. TGFBR2-dependent alterations of microRNA profiles in extracellular vesicles and parental colorectal cancer cells. *Int J Oncol*. 2019 Oct;55(4):925-937. doi: 10.3892/ijo.2019.4859. Epub 2019 Aug 19. PMID: 31432155.
39. Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem*. 2002 Nov 1;277(44):41361-8. doi: 10.1074/jbc.M204597200. Epub 2002 Aug 21. PMID: 12193595.
40. Gallois C, Laurent-Puig P, Taieb J. Methylator phenotype in colorectal cancer: A prognostic factor or not? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 Mar;99:74-80. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.11.001. Epub 2015 Dec 7. PMID: 26702883.
41. Germann M, Zangger N, Sauvain MO, Sempoux C, Bowler AD, Wirapati P, Kandalafi LE, Delorenzi M, Tejpar S, Coukos G, Radtke F. Neutrophils suppress tumor-infiltrating T cells in colon cancer via matrix metalloproteinase-mediated activation of TGF β . *EMBO Mol Med*. 2020 Jan 9;12(1):e10681. doi: 10.15252/emmm.201910681. Epub 2019 Dec 2. PMID: 31793740; PMCID: PMC6949488.
42. Ghafouri-Fard S, Hussen BM, Badrlou E, Abak A, Taheri M. MicroRNAs as important contributors in the pathogenesis of colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2021 Aug;140:111759. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111759. Epub 2021 Jun 3. PMID: 34091180.
43. Gomis RR, Alarcón C, Nadal C, Van Poznak C, Massagué J. C/EBP β at the core of the TGF β cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell*. 2006 Sep;10(3):203-14. doi: 10.1016/j.ccr.2006.07.019. PMID: 16959612.

44. Gough NR, Xiang X, Mishra L. TGF- β Signaling in Liver, Pancreas, and Gastrointestinal Diseases and Cancer. *Gastroenterology*. 2021 Aug;161(2):434-452.e15. doi: 10.1053/j.gastro.2021.04.064. Epub 2021 Apr 30. PMID: 33940008; PMCID: PMC8841117.
45. Grady WM. Polymerase Slippage Restoration of Frameshifted TGFBR2 in Colorectal Cancer: A Novel Paradigm. *Gastroenterology*. 2015 Jun;148(7):1276-9. doi: 10.1053/j.gastro.2015.04.023. Epub 2015 Apr 25. PMID: 25921376.
46. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Sonesson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Taberero J, Bernardis R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015 Nov;21(11):1350-6. doi: 10.1038/nm.3967. Epub 2015 Oct 12. PMID: 26457759; PMCID: PMC4636487.
47. Guo X, Waddell DS, Wang W, Wang Z, Liberati NT, Yong S, Liu X, Wang XF. Ligand-dependent ubiquitination of Smad3 is regulated by casein kinase 1 gamma 2, an inhibitor of TGF-beta signaling. *Oncogene*. 2008 Dec 11;27(58):7235-47. doi: 10.1038/onc.2008.337. Epub 2008 Sep 15. PMID: 18794808; PMCID: PMC2643063.
48. Haque S, Morris JC. Transforming growth factor- β : A therapeutic target for cancer. *Hum Vaccin Immunother*. 2017 Aug 3;13(8):1741-1750. doi: 10.1080/21645515.2017.1327107. Epub 2017 Jun 2. PMID: 28575585; PMCID: PMC5557219.
49. He H, Zhao X, Zhu Z, Du L, Chen E, Liu S, Li Q, Dong J, Yang J, Lei L. MicroRNA-3191 promotes migration and invasion by downregulating TGFBR2 in colorectal cancer. *J Biochem Mol Toxicol*. 2019 Jun; 33(6):e22308. doi: 10.1002/jbt.22308. Epub 2019 Feb 15. PMID: 30770602.
50. Hecht JR, Shergill A, Goldstein MG, Fang B, Cho MT, Lenz HJ, Berim LD, Oberstein PE, Safyan RA, Sawhney V, Soares HP, Spigel DR, Spira AI, Ferguson AR, Chauder B, and Starodub A. Phase 2/3, randomized, open-label study of an individualized neoantigen vaccine (self-amplifying mRNA and adenoviral vectors) plus immune checkpoint blockade as maintenance for patients with newly diagnosed metastatic colorectal cancer (GRANITE). *JCO*. 2022 40:16_suppl, TPS3635-TPS3635.

51. Herzig DO, Tsikitis VL. Molecular markers for colon diagnosis, prognosis and targeted therapy. *J Surg Oncol*. 2015 Jan;111(1):96-102. doi: 10.1002/jso.23806. Epub 2014 Oct 8. PMID: 25297801.
52. Hinck AP, Mueller TD, Springer TA. Structural Biology and Evolution of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 Dec 1;8(12):a022103. doi: 10.1101/cshperspect.a022103. PMID: 27638177; PMCID: PMC5131774.
53. Hosseini S, Rejali L, Pezeshkian Z, Malekian M, Fatemi N, Peyravian N, Hadizadeh M, Mohsenifar Z, Khanabadi B, Farzam M, Sherkat G, Asadzadeh Aghdai H, Nazemalhosseini Mojarad E, Ashrafiyan Bonab M. Oncogenic Role of Connective Tissue Growth Factor Is Associated with Canonical TGF- β Cascade in Colorectal Cancer. *Genes (Basel)*. 2022 Apr 14;13(4):689. doi: 10.3390/genes13040689. PMID: 35456495; PMCID: PMC9031605.
54. Huang Z, Wu X, Li J. miR-101 Suppresses Colon Cancer Cell Migration Through the Regulation of EZH2. *Rev Espanola Enfermedades Digestivas Organo Oficial La Sociedad Espanola Patol Digest*. 2021, 113(4):255–60. doi: 10.17235/reed.2020.6800/2019.
55. Hubbard JM, Tóke ER, Moretto R, Graham RP, Youssoufian H, Lőrincz O, Molnár L, Csiszovszki Z, Mitchell JL, Wessling J, Tóth J, Cremolini C. Safety and Activity of PolyPEPI1018 Combined with Maintenance Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: an Open-Label, Multicenter, Phase Ib Study. *Clin Cancer Res*. 2022 Jul 1;28(13):2818-2829. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-0112. PMID: 35472243; PMCID: PMC9365360.
56. Chao HM, Wang TW, Chern E, Hsu SH. Regulatory RNAs, microRNA, long-non coding RNA and circular RNA roles in colorectal cancer stem cells. *World J Gastrointest Oncol*. 2022 Apr 15;14(4):748-764. doi: 10.4251/wjgo.v14.i4.748. PMID: 35582099; PMCID: PMC9048531.
57. Che J, Pan L, Yang X, Liu Z, Huang L, Wen C, Lin A, Liu H. Thymidine phosphorylase expression and prognosis in colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based chemotherapy: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol*. 2017 Dec;7(6):943-952. doi: 10.3892/mco.2017.1436. Epub 2017 Oct 3. PMID: 29285354; PMCID: PMC5740914.
58. Chen N, Balasenthil S, Reuther J, Frayna A, Wang Y, Chandler DS, Abruzzo LV, Rashid A, Rodriguez J, Lozano G, Cao Y, Lokken E, Chen J, Frazier ML, Sahin AA, Wistuba II, Sen S, Lott ST, Killary AM. DEAR1 is a chromosome 1p35 tumor suppressor and master regulator of TGF- β -driven epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Discov*. 2013 Oct;3(10):1172-89. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0499. Epub 2013 Jul 9. PMID: 23838884; PMCID: PMC4107927.

59. Chen EX, Jonker DJ, Loree JM, Kennecke HF, Berry SR, Couture F, Ahmad CE, Goffin JR, Kavan P, Harb M, Colwell B, Samimi S, Samson B, Abbas T, Aucoin N, Aubin F, Koski SL, Wei AC, Magoski NM, Tu D, O'Callaghan CJ. Effect of Combined Immune Checkpoint Inhibition vs Best Supportive Care Alone in Patients With Advanced Colorectal Cancer: The Canadian Cancer Trials Group CO.26 Study. *JAMA Oncol.* 2020 Jun 1;6(6):831-838. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.0910. PMID: 32379280; PMCID: PMC7206536.
60. Chen L, Zhu Q, Lu L, Liu Y. MiR-132 inhibits migration and invasion and increases chemosensitivity of cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cells via targeting TGF- β 1. *Bioengineered.* 2020 Dec;11(1):91-102. doi: 10.1080/21655979.2019.1710925. PMID: 31906769; PMCID: PMC6961592.
61. Chen Y, Zheng X, Wu C. The Role of the Tumor Microenvironment and Treatment Strategies in Colorectal Cancer. *Front Immunol.* 2021 Dec 2;12:792691. doi: 10.3389/fimmu.2021.792691. PMID: 34925375; PMCID: PMC8674693.
62. Cheng Q, Li C, Yang CF, Zhong YJ, Wu D, Shi L, Chen L, Li YW, Li L. Methyl ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through the TGF- β 1/Smad and NOX4/ROS pathways. *Chem Biol Interact.* 2019 Feb 1;299:131-139. doi: 10.1016/j.cbi.2018.12.006. Epub 2018 Dec 11. PMID: 30543783.
63. Inoue Y, Itoh Y, Abe K, Okamoto T, Daitoku H, Fukamizu A, Onozaki K, Hayashi H. Smad3 is acetylated by p300/CBP to regulate its transactivation activity. *Oncogene.* 2007 Jan 25;26(4):500-8. doi: 10.1038/sj.onc.1209826. Epub 2006 Jul 24. PMID: 16862174.
64. Ishikawa S, Nishida N, Fujino S, Ogino T, Takahashi H, Miyoshi N, Uemura M, Satoh T, Yamamoto H, Mizushima T, Doki Y, Eguchi H. Comprehensive profiling of novel epithelial-mesenchymal transition mediators and their clinical significance in colorectal cancer. *Sci Rep.* 2021 Jun 3;11(1):11759. doi: 10.1038/s41598-021-91102-9. PMID: 34083586; PMCID: PMC8175715.
65. Itatani Y, Kawada K, Sakai Y. Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Colorectal Cancer and Its Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 20;20(23):5822. doi: 10.3390/ijms20235822. PMID: 31756952; PMCID: PMC6929101.
66. Jaschinski F, Korhonen H, Janicot M. Design and Selection of Antisense Oligonucleotides Targeting Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) Isoform mRNAs for the Treatment of Solid Tumors. *Methods Mol Biol.* 2015;1317:137-51. doi: 10.1007/978-1-4939-2727-2_9. PMID: 26072406.

67. Jia Z, An J, Liu Z, Zhang F. Non-Coding RNAs in Colorectal Cancer: Their Functions and Mechanisms. *Front Oncol.* 2022 Feb 2;12:783079. doi: 10.3389/fonc.2022.783079. PMID: 35186731; PMCID: PMC8847166.
68. Jiang HQ, Wang BL, Guo W.: Analysis of influencing factors of KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA gene mutation consistency in patients with advanced colorectal cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2021 Feb 9;101(6):400-404. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.cn112137-20200721-02176. PMID: 33611888.
69. Jiang Z, Cao Q, Dai G, Wang J, Liu C, Lv L, Pan J. Celestrol inhibits colorectal cancer through TGF- β 1/Smad signaling. *Onco Targets Ther.* 2019 Jan 9;12:509-518. doi: 10.2147/OTT.S187817. PMID: 30666129; PMCID: PMC6331187.
70. Juat DJ, Hachey SJ, Billimek J, Del Rosario MP, Nelson EL, Hughes CCW, Zell JA. Adoptive T-Cell Therapy in Advanced Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Oncologist.* 2022 Mar 11;27(3):210-219. doi: 10.1093/oncolo/oyab038. PMID: 35274719; PMCID: PMC8914488.
71. Jung B, Staudacher JJ, Beauchamp D. Transforming Growth Factor β Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2017 Jan;152(1):36-52. doi: 10.1053/j.gastro.2016.10.015. Epub 2016 Oct 20. PMID: 27773809; PMCID: PMC5550896.
72. Jung G, Hernández-Illán E, Moreira L, Balaguer F, Goel A. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020, Feb;17(2):111-130. doi: 10.1038/s41575-019-0230-y. Epub 2020 Jan 3. PMID: 31900466; PMCID: PMC7228650.
73. Jung SY, Hwang S, Clarke JM, Bauer TM, Keedy VL, Lee H, Park N, Kim SJ, Lee JI. Pharmacokinetic characteristics of vactosertib, a new activin receptor-like kinase 5 inhibitor, in patients with advanced solid tumors in a first-in-human phase 1 study. *Invest New Drugs.* 2020;38(3):812–20.
74. Kim H, Kim T, Jaygal G, Woo J, Kim CJ, Baek MJ, et al. Downregulation of miR-9 Correlates With Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Pathol Res Pract.* 2020 216(8):153044. doi: 10.1016/j.prp.2020.153044.
75. Kim TW, Lee KW, Ahn JB, Lee J, Ryu J, Oh B, Ock Ch-Y, Hwang S, Hahm KB, Kim SJ, Park YS. *JCO* 2021, 39:15 suppl, 3573-3573.
76. Knudsen KN, Nielsen BS, Lindebjerg J, Hansen TF, Holst R, Sørensen FB. microRNA-17 Is the Most Up-Regulated Member of the miR-17-92 Cluster During Early Colon Cancer Evolution. *PloS One* 2015 10(10):e0140503. doi: 10.1371/journal.pone.0140503.

77. Kugimiya N, Nishimoto A, Hosoyama T, Ueno K, Takemoto Y, Harada E, Enoki T, Hamano K. JAB1-STAT3 activation loop is associated with recurrence following 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in human colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2017 Nov;14(5):6203-6209. doi: 10.3892/ol.2017.6994. Epub 2017 Sep 18. PMID: 29113268; PMCID: PMC5661409.
78. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, van de Velde CJ, Watanabe T. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2015 Nov 5;1:15065. doi: 10.1038/nrdp.2015.65. PMID: 27189416; PMCID: PMC4874655.
79. Kume S, Haneda M, Kanasaki K, Sugimoto T, Araki S, Isshiki K, Isono M, Uzu T, Guarente L, Kashiwagi A, Koya D. SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *J Biol Chem.* 2007 Jan 5;282(1):151-8. doi: 10.1074/jbc.M605904200. Epub 2006 Nov 10. PMID: 17098745.
80. Laissue P. The forkhead-box family of transcription factors: key molecular players in colorectal cancer pathogenesis. *Mol Cancer.* 2019 Jan 8;18(1):5. doi: 10.1186/s12943-019-0938-x. PMID: 30621735; PMCID: PMC6325735.
81. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014;2014:149185. doi: 10.1155/2014/149185. Epub 2014 May 13. PMID: 24901008; PMCID: PMC4036716.
82. Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011 Oct 18;8(12):686-700. doi: 10.1038/nrgastro.2011.173. PMID: 22009203; PMCID: PMC3391545.
83. Lee SJ, Yang CS, Kim DD, Kang YN, Kwak SG, Park JB, Cho CH, Park KK. Microenvironmental interactions and expression of molecular markers associated with epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Nov 1;8(11):14270-82. PMID: 26823743; PMCID: PMC4713529.
84. Lee HK, Kim CW, Ahn D, Go RE, Choi Y, Choi KC. Next-Generation Antisense Oligonucleotide of TGF- β 2 Enhances T Cell-Mediated Anticancer Efficacy of Anti-PD-1 Therapy in a Humanized Mouse Model of Immune-Excluded Melanoma. *Cancers (Basel).* 2022 Oct 25;14(21):5220. doi: 10.3390/cancers14215220. PMID: 36358638; PMCID: PMC9654371.
85. Lee K, Park YS, Ahn JB, Lee K-W, Park YS, Ahn JB, Lee JK, Ryu J, Oh B, Ock Ch-Y, Hwang S, Hahm KB, Kim SJ and Kim TW. 332 Novel TGF- β signatures in metastatic

- colorectal cancer patients treated with vactosertib in combination with pembrolizumab, *JITC*. 2020;**8**:doi: 10.1136/jitc-2020-SITC2020.0332.
86. Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol*. 2016 Feb 7;22(5):1745-55. doi: 10.3748/wjg.v22.i5.1745. PMID: 26855534; PMCID: PMC4724606.
 87. Lenz HJ, Van Cutsem E, Luisa Limon M, Wong KYM, Hendlish A, Aglietta M, García-Alfonso P, Neyns B, Luppi G, Cardin DB, Dragovich T, Shah U, Abdullaev S, Gricar J, Ledezne JM, Overman MJ, Lonardi S. First-Line Nivolumab Plus Low-Dose Ipilimumab for Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: The Phase II CheckMate 142 Study. *J Clin Oncol*. 2022 Jan 10;40(2):161-170. doi: 10.1200/JCO.21.01015. Epub 2021 Oct 12. PMID: 34637336.
 88. Li W, Qiu T, Zhi W, Shi S, Zou S, Ling Y, Shan L, Ying J, Lu N. Colorectal carcinomas with KRAS codon 12 mutation are associated with more advanced tumor stages. *BMC Cancer*. 2015 May 1;15:340. doi: 10.1186/s12885-015-1345-3. PMID: 25929517; PMCID: PMC4423107.
 89. Li H, Yang L, Zhang Y, Gao Z. Kaempferol inhibits fibroblast collagen synthesis, proliferation and activation in hypertrophic scar via targeting TGF- β receptor type I. *Biomed Pharmacother* 2016; **83**: 967-974. PMID: 27522259 doi: 10.1016/j.biopha.2016.08.011.
 90. Li N. CircTBL1XR1/miR-424 axis regulates Smad7 to promote the proliferation and metastasis of colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2020 Oct;11(5):918-931. doi: 10.21037/jgo-20-395. PMID: 33209488; PMCID: PMC7657834.
 91. Li Q, Yue W, Li M, Jiang Z, Hou Z, Liu W, Ma N, Gan W, Li Y, Zhou T, Yue W, Chen S. Downregulating Long Non-coding RNAs CTBP1-AS2 Inhibits Colorectal Cancer Development by Modulating the miR-93-5p/TGF- β /SMAD2/3 Pathway. *Front Oncol*. 2021 Apr 14;11:626620. doi: 10.3389/fonc.2021.626620. PMID: 33937030; PMCID: PMC8079788.
 92. Liao X, Hao Y, Zhang X, Ward S, Houldsworth J, Polydorides AD, Harpaz N. Clinicopathological characterization of SMAD4-mutated intestinal adenocarcinomas: A case-control study. *PLoS One*. 2019 Feb 7;14(2):e0212142. doi: 10.1371/journal.pone.0212142. PMID: 30730996; PMCID: PMC6366887.
 93. Liang M, Melchior F, Feng XH, Lin X. Regulation of Smad4 sumoylation and transforming growth factor-beta signaling by protein inhibitor of activated STAT1. *J Biol*

- Chem. 2004 May 28;279(22):22857-65. doi: 10.1074/jbc.M401554200. Epub 2004 Mar 17. PMID: 15028714.
94. Lin C, Zhang J, Lu Y, Li X, Zhang W, Zhang W, Lin W, Zheng L, Li X. NIT1 suppresses tumour proliferation by activating the TGF β 1-Smad2/3 signalling pathway in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2018 Feb 15;9(3):263. doi: 10.1038/s41419-018-0333-3. PMID: 29449642; PMCID: PMC5833788.
 95. Lin Z, Zhang L, Zhou J, Zheng J. Silencing Smad4 attenuates sensitivity of colorectal cancer cells to cetuximab by promoting epithelial-mesenchymal transition. *Mol Med Rep.* 2019 Oct;20(4):3735-3745. doi: 10.3892/mmr.2019.10597. Epub 2019 Aug 21. PMID: 31485652; PMCID: PMC6755154.
 96. Liu RY, Zeng Y, Lei Z, Wang L, Yang H, Liu Z, Zhao J, Zhang HT. JAK/STAT3 signaling is required for TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. *Int J Oncol.* 2014 May;44(5):1643-51. doi: 10.3892/ijo.2014.2310. Epub 2014 Feb 21. PMID: 24573038.
 97. Liu L, Liu X, Ren X, Tian Y, Chen Z, Xu X, Du Y, Jiang C, Fang Y, Liu Z, Fan B, Zhang Q, Jin G, Yang X, Zhang X. Smad2 and Smad3 have differential sensitivity in relaying TGF β signaling and inversely regulate early lineage specification. *Sci Rep.* 2016 Feb 24;6:21602. doi: 10.1038/srep21602. PMID: 26905010; PMCID: PMC4764856.
 98. André T, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M, Morse MA, Van Cutsem E, McDermott R, Hill A, Sawyer MB, Hendlisz A, Neyns B, Abdullaev S, Memaj A, Lei M, Dixon M, Kopetz S, Overman MJ. Nivolumab plus low-dose ipilimumab in previously treated patients with microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer: 4-year follow-up from CheckMate 142. *Ann Oncol.* 2022 Oct;33(10):1052-1060. doi: 10.1016/j.annonc.2022.06.008. Epub 2022 Jun 25. PMID: 35764271.
 99. Luo K, Geng J, Zhang Q, Xu Y, Zhou X, Huang Z, Shi KQ, Pan C, Wu J. LncRNA CASC9 interacts with CPSF3 to regulate TGF- β signaling in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Jun 11;38(1):249. doi: 10.1186/s13046-019-1263-3. PMID: 31186036; PMCID: PMC6560732.
 100. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 24;22(1):130. doi: 10.3390/ijms22010130. PMID: 33374459; PMCID: PMC7794761.

101. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 19;18(1):197. doi: 10.3390/ijms18010197. PMID: 28106826; PMCID: PMC5297828.
102. Martin-Malpartida P, Batet M, Kaczmarek Z, Freier R, Gomes T, Aragón E, Zou Y, Wang Q, Xi Q, Ruiz L, Veá A, Márquez JA, Massagué J, Macías MJ. Structural basis for genome wide recognition of 5-bp GC motifs by SMAD transcription factors. *Nat Commun.* 2017 Dec 12;8(1):2070. doi: 10.1038/s41467-017-02054-6. PMID: 29234012; PMCID: PMC5727232.
103. Martin CJ, Datta A, Littlefield C, Kalra A, Chapron C, Wawersik S, Dagbay KB, Brueckner CT, Nikiforov A, Danehy FT Jr, Streich FC Jr, Boston C, Simpson A, Jackson JW, Lin S, Danek N, Faucette RR, Raman P, Capili AD, Buckler A, Carven GJ, Schürpf T. Selective inhibition of TGF β 1 activation overcomes primary resistance to checkpoint blockade therapy by altering tumor immune landscape. *Sci Transl Med.* 2020 Mar 25;12(536):eaay8456. doi: 10.1126/scitranslmed.aay8456. PMID: 32213632.
104. McCarthy AJ, Chetty R. *Smad4/DPC4*. *J Clin Pathol.* 2018 Aug;71(8):661-664. doi: 10.1136/jclinpath-2018-205095. Epub 2018 May 2. PMID: 29720405.
105. Mehrvarz Sarshekeh A, Advani S, Overman MJ, Manyam G, Kee BK, Fogelman DR, Dasari A, Raghav K, Vilar E, Manuel S, Shureiqi I, Wolff RA, Patel KP, Luthra R, Shaw K, Eng C, Maru DM, Routbort MJ, Meric-Bernstam F, Kopetz S. Association of SMAD4 mutation with patient demographics, tumor characteristics, and clinical outcomes in colorectal cancer. *PLoS One.* 2017 Mar 7;12(3):e0173345. doi: 10.1371/journal.pone.0173345. Erratum in: *PLoS One.* 2017 May 17;12(5):e0178275.
106. Meyer-Schaller N, Cardner M, Diepenbruck M, Saxena M, Tiede S, Lüönd F, Ivanek R, Beerenwinkel N, Christofori G. A Hierarchical Regulatory Landscape during the Multiple Stages of EMT. *Dev Cell.* 2019 Feb 25;48(4):539-553.e6. doi: 10.1016/j.devcel.2018.12.023. Epub 2019 Jan 31. PMID: 30713070.
107. Miyazawa K, Miyazono K. Regulation of TGF- β Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Mar 1;9(3):a022095. doi: 10.1101/cshperspect.a022095. PMID: 27920040; PMCID: PMC5334261.
108. Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF- β 1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 2001 Aug;108(4):601-9. doi: 10.1172/JCI12821. PMID: 11518734; PMCID: PMC209401.

109. Moore KM, Thomas GJ, Duffy SW, Warwick J, Gabe R, Chou P, Ellis IO, Green AR, Haider S, Brouillette K, Saha A, Vallath S, Bowen R, Chelala C, Eccles D, Tapper WJ, Thompson AM, Quinlan P, Jordan L, Gillett C, Brentnall A, Violette S, Weinreb PH, Kendrew J, Barry ST, Hart IR, Jones JL, Marshall JF. Therapeutic targeting of integrin $\alpha\beta6$ in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014 Jun 28; 106(8):dju169. doi: 10.1093/jnci/dju169. PMID: 24974129; PMCID: PMC4151855.
110. Moradi-Marjaneh R, Khazaei M, Ferns GA, Aghae-Bakhtiari SH. The Role of TGF- β Signaling Regulatory MicroRNAs in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Curr Pharm Des.* 2018;24(39):4611-4618. doi: 10.2174/1381612825666190110150705. PMID: 30636580.
111. Morén A, Raja E, Heldin CH, Moustakas A. Negative regulation of TGF β signaling by the kinase LKB1 and the scaffolding protein LIP1. *J Biol Chem.* 2011 Jan 7;286(1):341-53. doi: 10.1074/jbc.M110.190660. Epub 2010 Oct 25. PMID: 20974850; PMCID: PMC3012991.
112. Morikawa M, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH. Genome-wide mechanisms of Smad binding. *Oncogene.* 2013 Mar 28;32(13):1609-15. doi: 10.1038/onc.2012.191. Epub 2012 May 21. PMID: 22614010; PMCID: PMC3615190.
113. Morris VK, Overman MJ, Lam M, Parseghian CM, Johnson B, Dasari A, Raghav K, Kee BK, Huey R, Wolff RA, Shen JP, Li J, Zorrilla I, Tzeng CD, Tran Cao HS, Chun YS, Newhook TE, Vauthey N, Duose D, Luthra R, Haymaker C, Kopetz S. Bintrafusp alfa, an anti-PD-L1:TGF- β trap fusion protein, in patients with ctDNA-positive, liver-limited metastatic colorectal cancer. *Cancer Res Commun.* 2022 Sep;2(9):979-986. doi: 10.1158/2767-9764.crc-22-0194. Epub 2022 Sep 14. PMID: 36382087; PMCID: PMC9648419.
114. Murayama K, Kato-Murayama M, Itoh Y, Miyazono K, Miyazawa K, Shirouzu M. Structural basis for inhibitory effects of Smad7 on TGF- β family signaling. *J Struct Biol.* 2020 Dec 1;212(3):107661. doi: 10.1016/j.jsb.2020.107661. Epub 2020 Nov 7. PMID: 33166654.
115. Nabhan M, Louka ML, Khairy E, Tash F, Ali-Labib R, El-Habashy S. MicroRNA-181a and its target Smad 7 as potential biomarkers for tracking child acute lymphoblastic leukemia. *Gene.* 2017 Sep 10;628:253-258. doi: 10.1016/j.gene.2017.07.052. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28732737.

116. Najjar Sadeghi R, Saeedi N, Sahba N, Sadeghi A. SMAD4 mutations identified in Iranian patients with colorectal cancer and polyp. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2021 Fall;14(Suppl1):S32-S40. PMID: 35154600; PMCID: PMC8817749.
117. Nguyen HT, Duong HQ. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncol Lett.* 2018 Jul;16(1):9-18. doi: 10.3892/ol.2018.8679. Epub 2018 May 9. PMID: 29928381; PMCID: PMC6006272.
118. Ning X, Wang C, Zhang M, Wang K. Ectopic Expression of miR-147 Inhibits Stem Cell Marker and Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)-Related Protein Expression in Colon Cancer Cells. *Oncol Res.* 2019 Mar 29;27(4):399-406. doi: 10.3727/096504018X15179675206495. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29426374; PMCID: PMC7848281.
119. Oh CR, Kim JE, Hong YS, Kim SY, Ahn JB, Baek JY, Lee MA, Kang MJ, Cho SH, Beom SH, Kim TW. Phase II study of durvalumab monotherapy in patients with previously treated microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient or POLE-mutated metastatic or unresectable colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2022 Jun 15;150(12):2038-2045. doi: 10.1002/ijc.33966. Epub 2022 Mar 1. PMID: 35179785.
120. Oyanagi H, Shimada Y, Nagahashi M, Ichikawa H, Tajima Y, Abe K, Nakano M, Kameyama H, Takii Y, Kawasaki T, Homma KI, Ling Y, Okuda S, Takabe K, Wakai T. SMAD4 alteration associates with invasive-front pathological markers and poor prognosis in colorectal cancer. *Histopathology.* 2019 May;74(6):873-882. doi: 10.1111/his.13805. Epub 2019 Apr 1. PMID: 30636020; PMCID: PMC6849740.
121. Petritsch C, Beug H, Balmain A, Oft M. TGF-beta inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest. *Genes Dev.* 2000 Dec 15;14(24):3093-101. doi: 10.1101/gad.854200. PMID: 11124802; PMCID: PMC317138.
122. Piawah S, Venook AP. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer.* 2019 Dec 1;125(23):4139-4147. doi: 10.1002/ncr.32163. Epub 2019 Aug 21. PMID: 31433498.
123. Piersma B, Hayward MK, Weaver VM. Fibrosis and cancer: A strained relationship. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2020 Apr;1873(2):188356. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188356. Epub 2020 Mar 5. PMID: 32147542; PMCID: PMC7733542.

124. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2059-72. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.065. PMID: 20420946; PMCID: PMC4243705.
125. Qi J, Sun H, Zhang Y, Wang Z, Xun Z, Li Z, Ding X, Bao R, Hong L, Jia W, Fang F, Liu H, Chen L, Zhong J, Zou D, Liu L, Han L, Ginhoux F, Liu Y, Ye Y, Su B. Single-cell and spatial analysis reveal interaction of FAP⁺ fibroblasts and SPP1⁺ macrophages in colorectal cancer. *Nat Commun*. 2022 Apr 1;13(1):1742. doi: 10.1038/s41467-022-29366-6. PMID: 35365629; PMCID: PMC8976074.
126. Quan Q, Zhong F, Wang X, Chen K, Guo L. PAR2 Inhibition Enhanced the Sensitivity of Colorectal Cancer Cells to 5-FU and Reduced EMT Signaling. *Oncol Res*. 2019 Jul 12;27(7):779-788. doi: 10.3727/096504018X15442985680348. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30841957; PMCID: PMC7848255.
127. Razzaque MS, Atfi A. TGIF1-Twist1 axis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020 Sep 17;18:2568-2572. doi: 10.1016/j.csbj.2020.09.023. PMID: 33005315; PMCID: PMC7520386.
128. Rengganaten V, Huang CJ, Tsai PH, Wang ML, Yang YP, Lan YT, Fang WL, Soo S, Ong HT, Cheong SK, Choo KB, Chiou SH. Mapping a Circular RNA-microRNA-mRNA-Signaling Regulatory Axis That Modulates Stemness Properties of Cancer Stem Cell Populations in Colorectal Cancer Spheroid Cells. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 23;21(21):7864. doi: 10.3390/ijms21217864. PMID: 33114016; PMCID: PMC7672619.
129. Reynolds IS, Furney SJ, Kay EW, McNamara DA, Prehn JHM, Burke JP. Meta-analysis of the molecular associations of mucinous colorectal cancer. *Br J Surg*. 2019 May;106(6):682-691. doi: 10.1002/bjs.11142. Epub 2019 Apr 4. PMID: 30945755.
130. Ritterhouse LL, Wu EY, Kim WG, Dillon DA, Hirsch MS, Sholl LM, Agoston AT, Setia N, Lauwers GY, Park DY, Srivastava A, Doyle LA. Loss of SMAD4 protein expression in gastrointestinal and extra-gastrointestinal carcinomas. *Histopathology*. 2019 Oct;75(4):546-551. doi: 10.1111/his.13894. Epub 2019 Aug 13. PMID: 31054158.
131. Rodon J, Carducci MA, Sepulveda-Sánchez JM, Azaro A, Calvo E, Seoane J, Braña I, Sicart E, Gueorguieva I, Cleverly AL, Pillay NS, Desai D, Estrem ST, Paz-Ares L, Holdhoff M, Blakeley J, Lahn MM, Baselga J. First-in-human dose study of the novel transforming growth factor- β receptor I kinase inhibitor LY2157299 monohydrate in patients with advanced cancer and glioma. *Clin Cancer Res*. 2015 Feb 1;21(3):553-60. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1380. Epub 2014 Nov 25. PMID: 25424852; PMCID: PMC4337847.

132. Roelen BA, Cohen OS, Raychowdhury MK, Chadee DN, Zhang Y, Kyriakis JM, Alessandrini AA, Lin HY. Phosphorylation of threonine 276 in Smad4 is involved in transforming growth factor-beta-induced nuclear accumulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Oct;285(4):C823-30. doi: 10.1152/ajpcell.00053.2003. Epub 2003 Jun 11. PMID: 12801888.
133. Romano G, Santi L, Bianco MR, Giuffrè MR, Pettinato M, Bugarin C, Garanzini C, Savarese L, Leoni S, Cerrito MG, Leone BE, Gaipa G, Grassilli E, Papa M, Lavitrano M, Giovannoni R. The TGF- β pathway is activated by 5-fluorouracil treatment in drug resistant colorectal carcinoma cells. *Oncotarget.* 2016 Apr 19;7(16):22077-91. doi: 10.18632/oncotarget.7895. PMID: 26956045; PMCID: PMC5008345.
134. Sadeghi R, Saeedi N, Sahba N, Sadeghi A. SMAD4 mutations identified in Iranian patients with colorectal cancer and polyp. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2021; 14: S32-S40, PMID: 35154600.
135. Samanta D, Datta PK. Alterations in the Smad pathway in human cancers. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012 Jan 1;17(4):1281-93. doi: 10.2741/3986. PMID: 22201803; PMCID: PMC4281477.
136. Segal N, Rivera F, Tournigand C, Kasper S, Chen Y, Deshpande P, Messmann R, Kopetz S. P-23 Phase II study (daNIS-3) of the anti-TGF- β monoclonal antibody NIS793 and other new investigational drug combinations with standard-of-care therapy vs standard-of-care alone in patients with second-line metastatic colorectal cancer, *Annals of Oncology*, Volume 33, Supplement 4, 2022, Pages S254-S255, ISSN 0923-7534.
137. Seoane J, Gomis RR. TGF- β Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Dec 1;9(12):a022277. doi: 10.1101/cshperspect.a022277. PMID: 28246180; PMCID: PMC5710110.
138. Seong HA, Jung H, Ha H. Murine protein serine/threonine kinase 38 stimulates TGF-beta signaling in a kinase-dependent manner via direct phosphorylation of Smad proteins. *J Biol Chem.* 2010 Oct 1;285(40):30959-70. doi: 10.1074/jbc.M110.138370. Epub 2010 Jul 21. PMID: 20659902; PMCID: PMC2945587.
139. Shang A, Gu C, Wang W, Wang X, Sun J, Zeng B, Chen C, Chang W, Ping Y, Ji P, Wu J, Quan W, Yao Y, Zhou Y, Sun Z, Li D. Exosomal circPACRGL promotes progression of colorectal cancer via the miR-142-3p/miR-506-3p- TGF- β 1 axis. *Mol Cancer.* 2020 Jul 27;19(1):117. doi: 10.1186/s12943-020-01235-0. PMID: 32713345; PMCID: PMC7384220.

140. Shen X, Hu X, Mao J, Wu Y, Liu H, Shen J, Yu J, Chen W. The long noncoding RNA TUG1 is required for TGF- β /TWIST1/EMT-mediated metastasis in colorectal cancer cells. *Cell Death Dis.* 2020 Jan 27;11(1):65. doi: 10.1038/s41419-020-2254-1. PMID: 31988275; PMCID: PMC6985237.
141. Shi J, Li J, Xu Z, Chen L, Luo R, Zhang C, Gao F, Zhang J, Fu C. Celastrol: A Review of Useful Strategies Overcoming its Limitation in Anticancer Application. *Front Pharmacol* 2020; 11: 558741, PMID: 33364939 DOI: 10.3389/fphar.2020.558741.
142. Silva VR, Santos LS, Dias RB, Quadros CA, Bezerra DP. Emerging agents that target signaling pathways to eradicate colorectal cancer stem cells. *Cancer Commun (Lond)*. 2021 Dec;41(12):1275-1313. doi: 10.1002/cac2.12235. Epub 2021 Nov 17. PMID: 34791817; PMCID: PMC8696218.
143. Sinha A, Iyengar PV, Ten Dijke P. E3 Ubiquitin Ligases: Key Regulators of TGF β Signaling in Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 6;22(2):476. doi: 10.3390/ijms22020476. PMID: 33418880; PMCID: PMC7825147.
144. Song M, Sasazuki S, Camargo MC, Shimazu T, Charvat H, Yamaji T, Sawada N, Kemp TJ, Pfeiffer RM, Hildesheim A, Pinto LA, Rabkin CS, Tsugane S. Circulating inflammatory markers and colorectal cancer risk: A prospective case-cohort study in Japan. *Int J Cancer.* 2018 Dec 1;143(11):2767-2776. doi: 10.1002/ijc.31821. Epub 2018 Oct 9. PMID: 30132835; PMCID: PMC6235711.
145. Statello L, Guo C-J, Chen L-L, Huarte M. Gene Regulation by Long NonCoding RNAs and Its Biological Functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021 22 (2):96–118. doi: 10.1038/s41580-020-00315-9.
146. Stintzing S, Wirapati P, Lenz HJ, Neureiter D, Fischer von Weikersthal L, Decker T, Kiani A, Kaiser F, Al-Batran S, Heintges T, Lerchenmüller C, Kahl C, Seipelt G, Kullmann F, Moehler M, Scheithauer W, Held S, Modest DP, Jung A, Kirchner T, Aderka D, Tejpar S, Heinemann V. Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KKK-0306) trial. *Ann Oncol.* 2019 Nov 1;30(11):1796-1803. doi: 10.1093/annonc/mdz387. PMID: 31868905; PMCID: PMC6927316.
147. Stolfi C, De Simone V, Colantoni A, Franzè E, Ribichini E, Fantini MC, Caruso R, Monteleone I, Sica GS, Sileri P, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. A functional role for Smad7 in sustaining colon cancer cell growth and survival. *Cell Death Dis.* 2014 Feb 20;5(2):e1073. doi: 10.1038/cddis.2014.49. PMID: 24556688; PMCID: PMC3944263.

148. Sun C, Wang FJ, Zhang HG, Xu XZ, Jia RC, Yao L, Qiao PF. miR-34a mediates oxaliplatin resistance of colorectal cancer cells by inhibiting macroautophagy via transforming growth factor- β /Smad4 pathway. *World J Gastroenterol*. 2017 Mar 14;23(10):1816-1827. doi: 10.3748/wjg.v23.i10.1816. PMID: 28348487; PMCID: PMC5352922.
149. Szeglin BC, Wu C, Marco MR, Park HS, Zhang Z, Zhang B, Garcia-Aguilar J, Beauchamp RD, Chen XS, Smith JJ. A SMAD4-modulated gene profile predicts disease-free survival in stage II and III colorectal cancer. *Cancer Rep (Hoboken)*. 2022 Jan;5(1):e1423. doi: 10.1002/cnr2.1423. Epub 2021 Jun 10. PMID: 34114372; PMCID: PMC8789617.
150. Tang LY, Yamashita M, Coussens NP, Tang Y, Wang X, Li C, Deng CX, Cheng SY, Zhang YE. Ablation of Smurf2 reveals an inhibition in TGF- β signalling through multiple mono-ubiquitination of Smad3. *EMBO J*. 2011 Nov 1;30(23):4777-89. doi: 10.1038/emboj.2011.393. PMID: 22045334; PMCID: PMC3243605.
151. Tang CT, Gao YJ, Ge ZZ. NOX4, a new genetic target for anti-cancer therapy in digestive system cancer. *J Dig Dis*. 2018 Oct;19(10):578-585. doi: 10.1111/1751-2980.12651. Epub 2018 Oct 15. PMID: 30058122.
152. Tang M, Bian W, Cheng L, Zhang L, Jin R, Wang W, Zhang Y. Ginsenoside Rg3 inhibits keloid fibroblast proliferation, angiogenesis and collagen synthesis in vitro via the TGF β /SMAD and ERK signaling pathways. *Int J Mol Med* 2018; 41: 1487-1499. PMID: 29328420 DOI: 10.3892/ijmm.2018.3362.
153. Tecalco-Cruz AC, Ríos-López DG, Vázquez-Victorio G, Rosales-Alvarez RE, Macías-Silva M. Transcriptional cofactors Ski and SnoN are major regulators of the TGF- β /Smad signaling pathway in health and disease. *Signal Transduct Target Ther*. 2018 Jun 8;3:15. doi: 10.1038/s41392-018-0015-8. PMID: 29892481; PMCID: PMC5992185.
154. Timar J, Kashofer K. Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2020 Dec;39(4):1029-1038. doi: 10.1007/s10555-020-09915-5. PMID: 32725342; PMCID: PMC7680318.
155. Tolcher AW, Berlin JD, Cosaert J, Kauh J, Chan E, Piha-Paul SA, Amaya A, Tang S, Driscoll K, Kimbung R, Kambhampati SR, Gueorguieva I, Hong DS. A phase 1 study of anti-TGF β receptor type-II monoclonal antibody LY3022859 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017 Apr;79(4):673-680. doi: 10.1007/s00280-017-3245-5.

156. Tronccone E, Monteleone G. Smad7 and Colorectal Carcinogenesis: A Double-Edged Sword. *Cancers (Basel)*. 2019 May 1;11(5):612. doi: 10.3390/cancers11050612. PMID: 31052449; PMCID: PMC6563107.
157. Tronccone E, Marafini I, Stolfi C, Monteleone G. Involvement of Smad7 in Inflammatory Diseases of the Gut and Colon Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 10;22(8):3922. doi: 10.3390/ijms22083922. PMID: 33920230; PMCID: PMC8069188.
158. Tschernia NP, Gulley JL. Tumor in the Crossfire: Inhibiting TGF- β to Enhance Cancer Immunotherapy. *BioDrugs*. 2022 Mar;36(2):153-180. doi: 10.1007/s40259-022-00521-1. Epub 2022 Mar 30. PMID: 35353346; PMCID: PMC8986721.
159. Tzavlaki K, Moustakas A. TGF- β Signaling. *Biomolecules*. 2020 Mar 23;10(3):487. doi: 10.3390/biom10030487. PMID: 32210029; PMCID: PMC7175140.
160. Vacante M, Borzi AM, Basile F, Biondi A. Biomarkers in colorectal cancer: Current clinical utility and future perspectives. *World J Clin Cases*. 2018 Dec 6;6(15):869-881. doi: 10.12998/wjcc.v6.i15.869. PMID: 30568941; PMCID: PMC6288499.
161. van Dijk E, van Werkhoven E, Asher R, Mooi JK, Espinoza D, van Essen HF, van Tinteren H, van Grieken NCT, Punt CJA, Tebbutt NC, Ylstra B. Predictive value of chromosome 18q11.2-q12.1 loss for benefit from bevacizumab in metastatic colorectal cancer: A post hoc analysis of the randomized phase III-trial AGITG-MAX. *Int J Cancer*. 2022 Apr 30. doi: 10.1002/ijc.34061. Epub ahead of print. PMID: 35489024.
162. Vakhshiteh F, Hassani S, Momenifar N, Pakdaman F. Exosomal circRNAs: new players in colorectal cancer. *Cancer Cell Int*. 2021 Sep 14;21(1):483. doi: 10.1186/s12935-021-02112-6. PMID: 34521402; PMCID: PMC8439089.
163. Voutsadakis IA. The Landscape of PIK3CA Mutations in Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2021 Sep;20(3):201-215. doi: 10.1016/j.clcc.2021.02.003. Epub 2021 Feb 19. PMID: 33744168.
164. Vu T, Yang S, Datta PK. MiR-216b/Smad3/BCL-2 Axis Is Involved in Smoking-Mediated Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 13;12(7):1879. doi: 10.3390/cancers12071879. PMID: 32668597; PMCID: PMC7408725.
165. Wang J, Yang L, Yang J, Kuropatwinski K, Wang W, Liu XQ, Hauser J, Brattain MG. Transforming growth factor beta induces apoptosis through repressing the phosphoinositide 3-kinase/AKT/survivin pathway in colon cancer cells. *Cancer Res*. 2008 May 1;68(9):3152-60. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5348. PMID: 18451140.
166. Wang W, Wang GQ, Sun XW, Chen G, Li YF, Zhang LY, Qiu HB, Huang CY, Zhan YQ, Zhou ZW. Prognostic values of chromosome 18q microsatellite alterations in stage II

- colonic carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2010 Dec 21;16(47):6026-34. doi: 10.3748/wjg.v16.i47.6026. PMID: 21157981; PMCID: PMC3007106.
167. Wang G, Yu Y, Sun C, Liu T, Liang T, Zhan L, Lin X, Feng XH. STAT3 selectively interacts with Smad3 to antagonize TGF- β signalling. *Oncogene*. 2016 Aug 18;35(33):4388-98. doi: 10.1038/onc.2015.446. Epub 2015 Nov 30. Erratum in: *Oncogene*. 2016 Aug 18;35(33):4422. PMID: 26616859; PMCID: PMC4885808.
168. Wang W, Kandimalla R, Huang H, Zhu L, Li Y, Gao F, Goel A, Wang X. Molecular subtyping of colorectal cancer: Recent progress, new challenges and emerging opportunities. *Semin Cancer Biol*. 2019 Apr; 55:37-52. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.05.002. Epub 2018 May 18. PMID: 29775690; PMCID: PMC6240404.
169. Wang K, Song K, Ma Z, Yao Y, Liu C, Yang J, Xiao H, Zhang J, Zhang Y, Zhao W. Identification of EMT-related high-risk stage II colorectal cancer and characterisation of metastasis-related genes. *Br J Cancer*. 2020 Aug;123(3):410-417. doi: 10.1038/s41416-020-0902-y. Epub 2020 May 21. PMID: 32435058; PMCID: PMC7403418.
170. Wang Q, Shen X, Chen G, Du J. Drug Resistance in Colorectal Cancer: From Mechanism to Clinic. *Cancers (Basel)*. 2022 Jun 14;14(12):2928. doi: 10.3390/cancers14122928. PMID: 35740594; PMCID: PMC9221177.
171. Wiese KE, Walz S, von Eyss B, Wolf E, Athineos D, Sansom O, Eilers M. The role of MIZ-1 in MYC-dependent tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Dec 1;3(12):a014290. doi: 10.1101/cshperspect.a014290. PMID: 24296348; PMCID: PMC3839600.
172. Wang F, Xia X, Yang C, Shen J, Mai J, Kim HC, Kirui D, Kang Y, Fleming JB, Koay EJ, Mitra S, Ferrari M, Shen H. *SMAD4* Gene Mutation Renders Pancreatic Cancer Resistance to Radiotherapy through Promotion of Autophagy. *Clin Cancer Res*. 2018 Jul 1;24(13):3176-3185. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3435. Epub 2018 Mar 30. PMID: 29602802; PMCID: PMC6345154.
173. Welsh BT, Faucette R, Bilic S, Martin CJ, Schürpf T, Chen D, et al. Nonclinical development of SRK-181: an anti-latent TGF β 1 monoclonal antibody for the treatment of locally advanced or metastatic solid tumors. *Int J Toxicol*. 2021;40:226.
174. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol*. 2021 Oct;14(10):101174. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101174. Epub 2021 Jul 6. PMID: 34243011; PMCID: PMC8273208.

175. Xu J, Shao T, Song M, Xie Y, Zhou J, Yin J, Ding N, Zou H, Li Y, Zhang J. MIR22HG acts as a tumor suppressor via TGF β /SMAD signaling and facilitates immunotherapy in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2020 Mar 4;19(1):51. doi: 10.1186/s12943-020-01174-w. PMID: 32127004; PMCID: PMC7055097.
176. Yakymovych I, Ten Dijke P, Heldin CH, Souchelnytskyi S. Regulation of Smad signaling by protein kinase C. *FASEB J*. 2001 Mar;15(3):553-5. doi: 10.1096/fj.00-0474fje. Epub 2001 Jan 5. PMID: 11259364.
177. Yamazaki T, Gunderson AJ, Gilchrist M, Whiteford M, Kiely MX, Hayman A, O'Brien D, Ahmad R, Manchio JV, Fox N, McCarty K, Phillips M, Brosnan E, Vaccaro G, Li R, Simon M, Bernstein E, McCormick M, Yamasaki L, Wu Y, Drokin A, Carnahan T, To Y, Redmond WL, Lee B, Louie J, Hansen E, Solhjem MC, Cramer J, Urba WJ, Gough MJ, Crittenden MR, Young KH. Galunisertib plus neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer: a single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2022 Sep;23(9):1189-1200. doi: 10.1016/S1470-2045(22)00446-6. Epub 2022 Aug 8. PMID: 35952709.
178. Yan X, Zhang J, Sun Q, Tuazon PT, Wu X, Traugh JA, Chen YG. p21-Activated kinase 2 (PAK2) inhibits TGF- β signaling in Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells by interfering with the receptor-Smad interaction. *J Biol Chem*. 2012 Apr 20;287(17):13705-12. doi: 10.1074/jbc.M112.346221. Epub 2012 Mar 5. PMID: 22393057; PMCID: PMC3340196.
179. Yang L, Liu Z, Tan J, Dong H, Zhang X. Multispectral imaging reveals hyper active TGF- β signaling in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2018 Feb 1;19(2):105-112. doi: 10.1080/15384047.2017.1395116. Epub 2017 Dec 8. PMID: 29219668; PMCID: PMC5790339.
180. Yang X, Shao F, Guo D, Wang W, Wang J, Zhu R, Gao Y, He J, Lu Z. WNT/ β -catenin-suppressed FTO expression increases m⁶A of c-Myc mRNA to promote tumor cell glycolysis and tumorigenesis. *Cell Death Dis*. 2021 May 8;12(5):462. doi: 10.1038/s41419-021-03739-z. PMID: 33966037; PMCID: PMC8106678.
181. Yuan S, Tao F, Zhang X, Zhang Y, Sun X, Wu D. Role of Wnt/ β -Catenin Signaling in the Chemoresistance Modulation of Colorectal Cancer. *Biomed Res Int*. 2020 Mar 18;2020:9390878. doi: 10.1155/2020/9390878. PMID: 32258160; PMCID: PMC7109575.
182. Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- 2001 Jan 30;98(3):974-9. doi: 10.1073/pnas.98.3.974. PMID: 11158580; PMCID: PMC14694.
183. Zhang YF, Zhou SZ, Cheng XY, Yi B, Shan SZ, Wang J, Li QF. Baicalein attenuates hypertrophic scar formation via inhibition of the transforming growth factor- β /Smad2/3 signalling pathway. *Br J Dermatol* 2016; 174: 120-30. PMID: 26301336 DOI: 10.1111/bjd.14108.
184. Zhang Y, Shan S, Wang J, Cheng X, Yi B, Zhou J, Li Q. Galangin inhibits hypertrophic scar formation via ALK5/SMAD2/3 signaling pathway. *Mol Cell Biochem.* 2016; 413: 109-18 PMID: 26728998 DOI: 10.1007/s11010-015-2644-3.
185. Zhang J, Yi J, Zhou P. Development of bispecific antibodies in China: overview and prospects. *Antib Ther.* 2020 May 30;3(2):126-145. doi: 10.1093/abt/tbaa011. Erratum in: *Antib Ther.* 2022 Jan 19;5(1):84. PMID: 33928227; PMCID: PMC7990247.
186. Zhang L, Liu J, Lin S, Tan J, Huang B, Lin J. Qingjie Fuzheng Granule Inhibited the Migration and Invasion of Colorectal Cancer Cells by Regulating the lncRNA ANRIL/let-7a/TGF- β 1/SMAD Axis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020; 2020: 5264651. PMID: 32714407 DOI: 10.1155/2020/5264651.
187. Zhang T, Wang XF, Wang ZC, Lou D, Fang QQ, Hu YY, Zhao WY, Zhang LY, Wu LH, Tan WQ. Current potential therapeutic strategies targeting the TGF- β /SMAD signaling pathway to attenuate keloid and hypertrophic scar formation. *Biomed Pharmacother* 2020; 129: 110287 [PMID: 32540643 DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110287]
188. Zhang M, Zhang YY, Chen Y, Wang J, Wang Q, Lu H. TGF- β Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Nov 30;9:786728. doi: 10.3389/fcell.2021.786728. PMID: 34917620; PMCID: PMC8669610.
189. Zhang H, Wang J, Yu T, Wang J, Lu J, Yu Z. Silencing lncRNA CASC9 inhibits proliferation and invasion of colorectal cancer cells by MiR-542-3p/ILK. *PLoS One.* 2022 Apr 15;17(4):e0265901. doi: 10.1371/journal.pone.0265901. PMID: 35427373; PMCID: PMC9012350.
190. Zhao M, Mishra L, Deng CX. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci.* 2018 Jan 12;14(2):111-123. doi: 10.7150/ijbs.23230. PMID: 29483830; PMCID: PMC5821033.
191. Zhao W, Hao L, Jia L, Wang J, Wang B, Huang Y, Zhao Y. TAFs contributes the function of PTPN2 in colorectal carcinogenesis through activating JAK/STAT signaling pathway. *Am J Cancer Res.* 2021 Jun 15;11(6):3085-3097. PMID: 34249446; PMCID: PMC8263690.
192. Zheng L, Liang H, Zhang Q, Shen Z, Sun Y, Zhao X, Gong J, Hou Z, Jiang K, Wang Q, Jin Y, Yin Y. circPTEN1, a circular RNA generated from PTEN, suppresses cancer

- progression through inhibition of TGF- β /Smad signaling. *Mol Cancer*. 2022 Feb 8;21(1):41. doi: 10.1186/s12943-022-01495-y. PMID: 35135542; PMCID: PMC8822707.
193. Zhou R, Huang Y, Cheng B, Wang Y, Xiong B. TGFBR1*6A is a potential modifier of migration and invasion in colorectal cancer cells. *Oncol Lett*. 2018 Mar;15(3):3971-3976. doi: 10.3892/ol.2018.7725. Epub 2018 Jan 4. PMID: 29467907; PMCID: PMC5796273.
194. Zi Z. Molecular Engineering of the TGF- β Signaling Pathway. *J Mol Biol*. 2019 Jul 12;431(15):2644-2654. doi: 10.1016/j.jmb.2019.05.022. Epub 2019 May 21. PMID: 31121181.

**Nové poznatky v SMAD dependentnej dráhe transformujúceho rastového faktora
u pacientov s kolorektálnym karcinómom**

Vedecká monografia

Autorka: RNDr. Jana Mašlanková, PhD.

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
Vydavateľstvo ŠafárikPress

Rok vydania: 2023

Počet strán: 65

Rozsah: 4,13 AH

Vydanie: prvé

ISBN 978-80-574-0238-1 (e-publikácia)

