

## KIỂM SOÁT TẾ BÀO UNG THƯ ĐẠI TRÀNG TĂNG SINH THÔNG QUA ỨC CHẾ PROTEIN THAM GIA SỬA CHỮA TỔN THƯƠNG DNA

Đỗ Quỳnh Chi<sup>1</sup>, Bùi Khắc Cường<sup>1,2,\*</sup>

### Tóm tắt

**Mục tiêu:** Sửa chữa tổn thương DNA đóng vai trò quan trọng trong sự tồn tại và phát triển của tế bào. Ức chế sửa chữa tổn thương DNA là mục tiêu của một số liệu pháp điều trị ung thư. Nghiên cứu này được tiến hành để đánh giá tác dụng ức chế tế bào ung thư đại tràng của CB5083, chất ức chế đặc hiệu của p97 - một protein tham gia vào quá trình sửa chữa DNA. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu sử dụng CB5083, chất ức chế đặc hiệu p97 và dòng tế bào ung thư đại tràng HCT116. Các thử nghiệm được sử dụng bao gồm thử nghiệm tăng sinh tế bào, di trú tế bào, thử nghiệm chu kỳ tế bào bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy. **Kết quả:** CB5083 ức chế tăng sinh tế bào HCT116 *in vitro*. CB5083 cũng ảnh hưởng đến quá trình di trú tế bào và phân bố tế bào ở các pha khác nhau trong chu kỳ tế bào. **Kết luận:** Ức chế đặc hiệu protein tham gia sửa chữa tổn thương DNA p97 bằng CB5083 có tác dụng kìm hãm tăng sinh tế bào ung thư đại tràng *in vitro*.

**Từ khoá:** Sửa chữa tổn thương DNA; Ung thư đại tràng; p97.

## CONTROLLING THE PROLIFERATION OF COLON CANCER CELLS THROUGH THE INHIBITION OF PROTEIN INVOLVED IN DNA DAMAGE REPAIR

### Abstract

**Objectives:** DNA damage repair plays an important role in cell survival and development. The inhibition of DNA damage repair is the target of several therapeutic treatments. This study evaluated the inhibitory effect of CB5083 on colon cancer cells, a specific inhibitor of p97 - a protein involved in DNA damage repair.

---

<sup>1</sup>Trung tâm nghiên cứu động vật thực nghiệm, Học viện Quân y

<sup>2</sup>Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện quân y

\*Tác giả liên hệ: Bùi Khắc Cường (buikhaccuong@gmail.com)

Ngày nhận bài: 12/01/2024

Ngày được chấp nhận đăng: 29/01/2024

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v49i2.689>

**Methods:** The study used CB5083, a specific p97 inhibitor, and the colon cancer cell line HCT116. Experimental assays were used, including cell proliferation assay, cell migration assay, and cell cycle assay by flow cytometry. **Results:** CB5083 inhibited HCT116 cell proliferation *in vitro*. CB5083 also affects cell migration and cell distribution at different phases of the cell cycle. **Conclusion:** The inhibition of p97, a protein involved in DNA damage repair by CB5083, has a proliferative suppression on colon cancer cells *in vitro*.

**Keywords:** DNA damage repair; Colon cancer; p97.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Đứt gãy chuỗi kép DNA không được sửa chữa làm mất ổn định của bộ gen, dẫn đến chết tế bào hoặc biến đổi ác tính. Khi tổn thương DNA xảy ra, các tế bào huy động các protein sửa chữa đến vị trí tổn thương. Các nghiên cứu cho thấy p97 tham gia điều phối việc lắp ráp các phức hợp tín hiệu và sửa chữa tổn thương DNA. p97 tham gia sửa chữa tổn thương DNA bằng cách kết hợp với nhiều protein khác trong đó có 53BP1, BRCA1 và RAD51, ba yếu tố quan trọng đối với sửa chữa DNA và đảm bảo sự toàn vẹn của bộ gen. Suy giảm hoạt động của p97 làm giảm mức độ sửa chữa DNA ảnh hưởng đến sự sống sót của tế bào sau khi có tổn thương DNA [1]. Các dữ liệu gần đây cũng cho thấy p97 có vai trò quan trọng trong các quá trình phân hủy protein liên quan đến nhiễm sắc thể, p97 đóng vai trò như một yếu tố chăm sóc bộ gen [2]. p97 cũng tham gia cùng với UFD1 để loại bỏ CDT1

và SET8 khỏi chất nhiễm sắc liên quan đến quá trình sửa chữa nhiễm sắc thể [3]. Suy giảm chức năng của một số protein như RNF168 ảnh hưởng đến khả năng tập trung p97 trên nhiễm sắc thể khi có tổn thương DNA. Hoạt động của p97 thúc đẩy giải phóng protein L3MBTL1 từ chất nhiễm sắc, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc tuyển dụng 53BP1 trong sửa chữa tổn thương DNA [4]. Ngoài ra, hoạt động của p97 phụ thuộc vào ubiquitin liên kết với Lys48, RNF8 tại các vị trí tổn thương DNA. Quá trình này cần thiết cho sự luân chuyển protein theo không gian và điều chỉnh cả hai nhánh chính của sửa chữa DNA [5]. Do đó, tác động vào p97 có thể ảnh hưởng đến quá trình sửa chữa DNA trong các tế bào ung thư, có thể nhắm đến như một mục tiêu điều trị ung thư. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm: *Đánh giá tác dụng ức chế tế bào ung thư đại tràng của CB5083, một chất ức chế có thể sử dụng bằng đường uống, có tính chọn lọc và đặc hiệu cao với p97.*

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng CB5083 (10mM, Selleckchem) là một chất phân tử nhỏ ức chế đặc hiệu p97, có tác dụng sinh học mạnh, tính chọn lọc cao và có sử dụng được qua đường uống với IC50 là 11nM. Dòng tế bào ung thư đại tràng HCT116 (mã: CCL-247, ATCC).

### 2. Phương pháp nghiên cứu

\* *Đánh giá tác dụng ức chế tăng sinh của CB5083 đối với tế bào ung thư đại trực tràng HCT116:* Tế bào được gieo trên đĩa 96 giếng, nồng độ 1000 tế bào/giếng. Sau 24 giờ, kiểm tra tế bào dưới kính hiển vi, thay môi trường nuôi cấy và cho tiếp xúc với CB-5083 với dải nồng độ 0 $\mu$ M, 0,125 $\mu$ M, 0,25 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M. Sau đó, sử dụng WST-1 để xác định lượng tế bào sống ở mỗi nồng độ bằng cách so sánh mật độ quang giữa các nhóm điều trị so với nhóm chứng (%).

\* *Đánh giá tác dụng ức chế di trú của CB-5083 trên tế bào ung thư đại trực tràng HCT116:* Hoạt tính chống ung thư của CB-5083 được đánh giá dựa trên thí nghiệm di trú tế bào để xem xét khả năng kết nối và di trú của tế bào ung thư dưới ảnh hưởng của chất ức chế. Tế bào HCT116 được nuôi cấy trong đĩa 12 giếng, mỗi giếng 2,5 x 10<sup>5</sup> tế bào. Sau khi mật độ tế bào

trong các giếng đạt 80%, một vết rạch được tạo ra ở giữa giếng bằng đầu tip 200 $\mu$ L. Tế bào ngay lập tức được tiếp xúc với CB-5083 chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau (0,125 $\mu$ M; 0,25 $\mu$ M) và nhóm đối chứng là tế bào được nuôi cấy bình thường, không tiếp xúc với CB-5083. Sau đó, tế bào được chụp lại ở các mốc thời gian 0, 24, và 48 giờ sau khi cho thuốc thử. Diện tích của vùng tổn thương được đo lường trên phần mềm ImageJ. Chỉ số di trú của tế bào được tính theo công thức:

$$\text{Chỉ số di trú (\%)} = \frac{W_0 - W_t}{W_0} \times 100$$

W<sub>0</sub>: Diện tích vết rạch tại thời điểm 0 giờ.

W<sub>t</sub>: Diện tích vết rạch tại thời điểm t giờ.

\* *Đánh giá ảnh hưởng của CB-5083 đối với chu kỳ tế bào ung thư đại trực tràng HCT116:* PI là một loại thuốc nhuộm nhân tế bào, hoạt động bằng cách xen kẽ vào rãnh chính của DNA sợi kép tạo ra một tín hiệu huỳnh quang cao khi bị kích thích ở bước sóng 488nm với phát xạ rộng tập trung xung quanh 600nm. Thuốc nhuộm PI giúp xác nhận các pha khác nhau trong chu kỳ tế bào của quần thể tế bào dựa trên hàm lượng nhân tồn tại trong tế bào. Máy đếm tế bào dòng chảy sẽ phân tích dữ liệu và lập biểu đồ từ những dữ liệu tế bào thu được. Tế bào

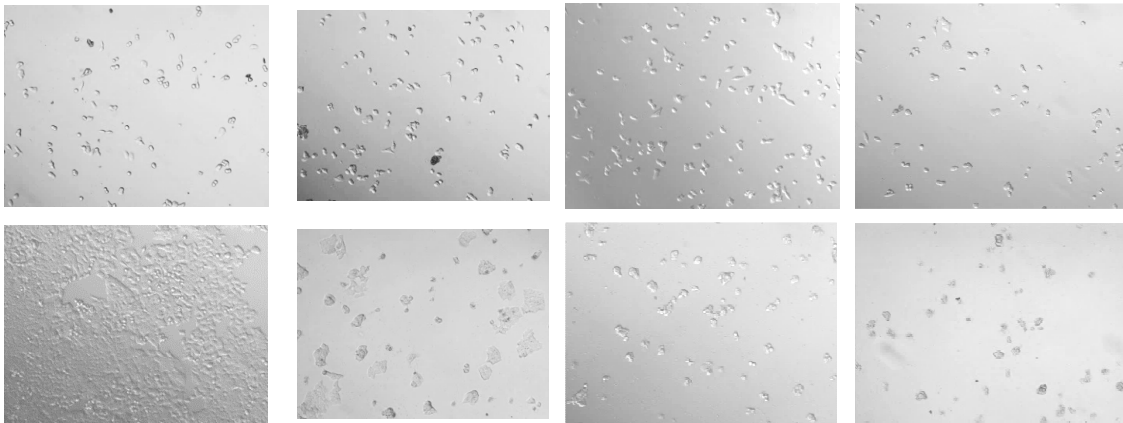
## CHÀO MỪNG 75 NĂM NGÀY TRUYỀN THỐNG HỌC VIỆN QUÂN Y

được nuôi cấy trong đĩa 6 giếng, mỗi giếng  $2 \times 10^5$  tế bào. Sau 24 giờ, tế bào được tiếp xúc với CB-5083 được chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau ( $0.125\mu\text{M}$ ;  $0.25\mu\text{M}$ ) và nhóm đối chứng là tế bào được nuôi cấy bình thường, không tiếp xúc với CB-5083. Tế bào được chụp lại ở các mốc thời gian 0, 24, 48 giờ sau khi cho thuốc thử. Sau 48 giờ, tế bào được thu lại và phân tích trên thiết bị Flow Cytometry (FACS BD Lyric) và phần mềm chạy FACS.

\* *Xử lý số liệu:* Để phân tích số liệu, chúng tôi dùng các thuật toán xử lý hình ảnh được viết trên phần mềm ImageJ; xử lý số liệu bằng phần mềm Microsoft Excel 2016; thống kê, vẽ đồ thị bằng phần mềm GraphPad Prism 9. Sử dụng phép kiểm định T-test để so sánh giá trị trung bình giữa 2 nhóm, phép kiểm định One-Way ANOVA để kiểm định sự khác nhau của giá trị trung bình khi so sánh nhiều hơn 2 nhóm. Khác biệt có ý nghĩa thống kê khi  $p < 0,05$ .

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 1. Kết quả ức chế tăng sinh của CB-5083 trên tế bào ung thư đại trực tràng bằng thử nghiệm WST-1



(1)

(2)

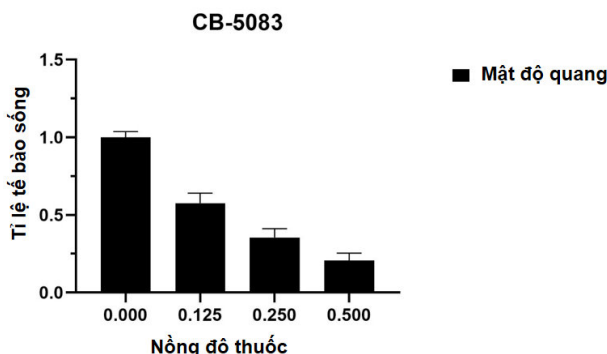
(3)

(4)

**Hình 1. Ảnh tế bào ở thời điểm 0 giờ (trên) và 72 giờ (dưới) sau khi tiếp xúc với CB-5083.**

(1) Nhóm chứng; (2) Nhóm  $0,125\mu\text{M}$ ; (3) Nhóm  $0,25\mu\text{M}$ ; (4) Nhóm  $0,5\mu\text{M}$

Dưới kính hiển vi quang học, tế bào HCT116 là các tế bào ung thư đại trực tràng bám đáy, phát triển đơn lớp, có nhiều hình dạng khác nhau: Hình bầu dục, hình đa giác, hình thoi, đường kính khoảng  $20\mu\text{m}$ . Nhân tế bào rất lớn, chiếm gần hết phần tế bào chất. Trước điều trị mật độ tế bào ở các giếng tương đồng nhau, sau khi điều trị, hình ảnh cho thấy nồng độ CB-5083 càng cao, càng ức chế tế bào tăng sinh (Hình 1).

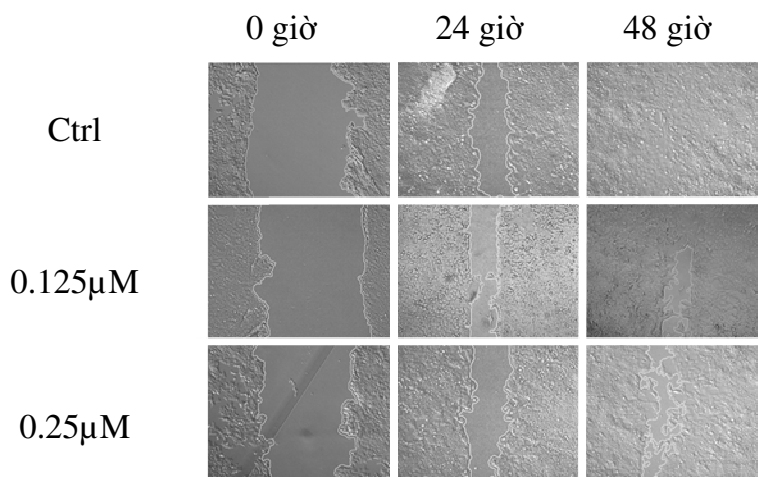


**Hình 2.** Ảnh hưởng của nồng độ điều trị CB-5083 ở các nhóm điều trị trên dòng tế bào HCT116.

(Tế bào HCT 116 được gieo lên đĩa với nồng độ 1000 tế bào/giếng, gieo vào đĩa 96 giếng. Sau 72 giờ kể từ khi cho tế bào tiếp xúc với thuốc ở các nồng độ khác nhau, cơ chất WST-1 được thêm vào để đánh giá sự tăng sinh của tế bào.)

Theo sự tăng dần nồng độ thuốc, lượng tế bào sống sót giảm rõ rệt. Ở nồng độ 0,125μM, ức chế được khoảng 45% quần thể. Ở nồng độ 0,25μM, ức chế được khoảng 65% quần thể. Ở nồng độ 0,5μM, tỷ lệ tế bào sống thấp hơn hẳn, ức chế 75% quần thể (Hình 2).

## 2. Kết quả đánh giá khả năng ức chế di trú tế bào của CB-5083 trên tế bào ung thư đại trực tràng



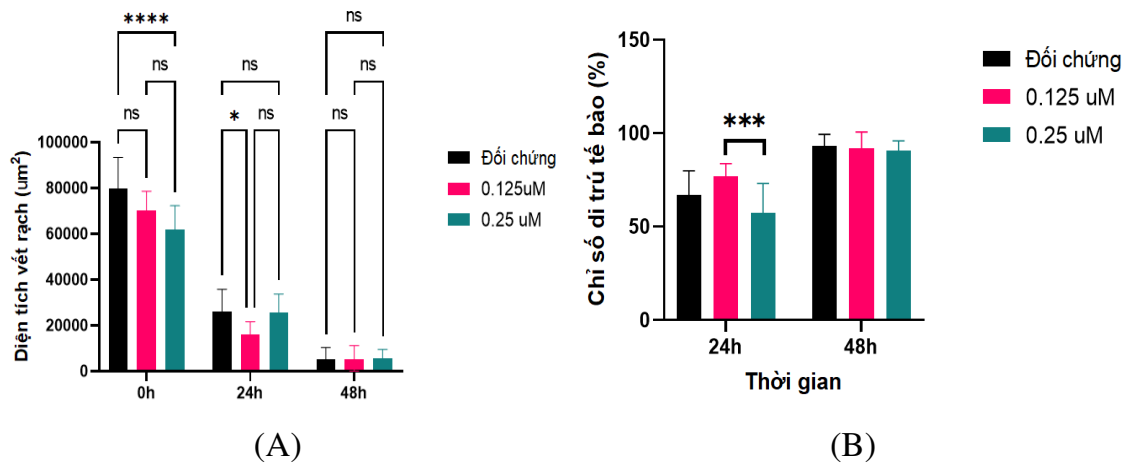
**Hình 3.** Điều trị CB-5083 ức chế di trú tế bào HCT116 ở các nồng độ khác nhau.

(Tế bào được gieo trong đĩa 12 giếng, sau 48 giờ, tạo đường rạch thẳng giữa giếng, và tế bào được tiếp xúc với CB-5083 ở các nồng độ khác nhau. Sau đó, chụp lại hình ảnh ở các thời điểm 0, 24, 48 giờ kể từ khi điều trị.)

## CHÀO MỪNG 75 NĂM NGÀY TRUYỀN THỐNG HỌC VIỆN QUÂN Y

Từ hình 3 cho thấy tác động của CB-5083 lên sự liền lại của vết thương. Khu vực biểu thị cho vùng rạch là khu vực trống nằm ở giữa hiển vi trường. Ở thời điểm 24 giờ, vết rạch liền lại hơn một nửa so với thời điểm 0 giờ. Tại thời điểm 48 giờ, ở nhóm chứng hầu như không còn thấy đường rạch; nhóm điều trị 0,125 $\mu$ M và 0,25 $\mu$ M vẫn còn tương đối nhiều vị trí chưa liền hẳn.

Dữ liệu được phân tích với kiểm định ANOVA test, thu được biểu đồ như hình 4.



**Hình 4.** Phân tích tương quan giữa nồng độ điều trị.

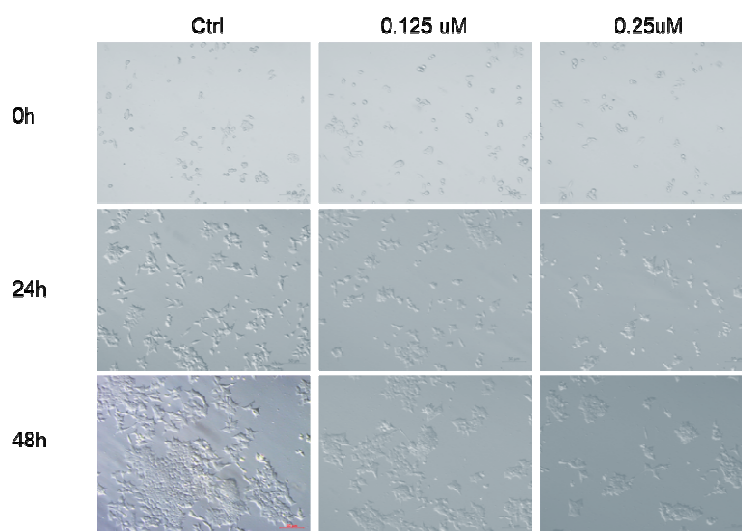
với diện tích vết rạch ở các nồng độ khác nhau trong các thời điểm khác nhau.

(A) Dữ liệu diện tích vết rạch được đưa vào phân tích;

(B) Tương quan giữa nồng độ và thời gian điều trị với dữ liệu sau khi hiệu chỉnh theo nhóm chứng.

Kết quả chỉ ra có sự liên quan tương đối chặt chẽ với giá trị p lần lượt là  $*p = 0,0116$ ,  $**p = 0,0020$ ,  $***p < 0,0001$ , so với nhóm chứng. Tuy nhiên, theo biểu đồ thu được, diện tích vết rạch tại thời điểm 24 giờ ở nhóm điều trị 0,125 $\mu$ M thấp hơn so với nhóm chứng và nhóm điều trị 0,25 $\mu$ M. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm điều trị sau 48 giờ.

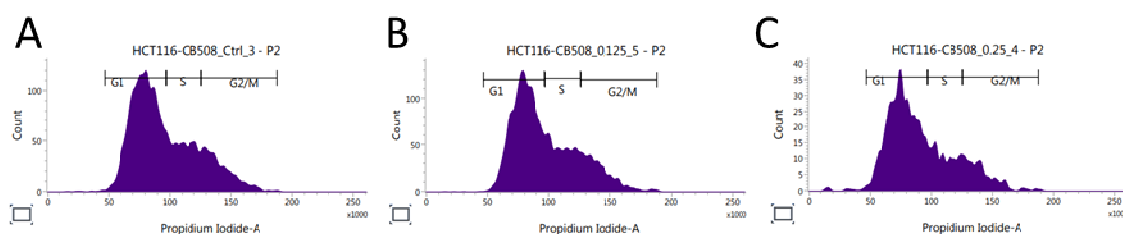
### 3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CB-5083 đối với chu kỳ tế bào trên tế bào ung thư đại trực tràng



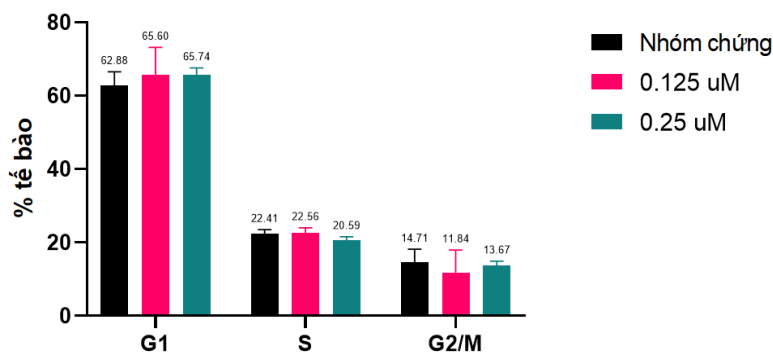
**Hình 5.** CB-5083 tăng cường sự ngừng chu kỳ tế bào ở dòng tế bào HCT116.

(Tế bào được gieo trong đĩa 6 giếng, sau 24 giờ, tế bào được tiếp xúc với CB-5083 ở các nồng độ điều trị  $0\mu\text{M}$ ,  $0,125\mu\text{M}$ ,  $0,25\mu\text{M}$ . Tế bào sau đó được chụp hình ở các thời điểm 0, 24, 48 giờ).

Tại thời điểm 24 giờ, có thể nhận thấy sự tăng sinh rất ít ở nhóm điều trị  $0,25\mu\text{M}$ . Tại thời điểm 48 giờ, có sự khác biệt tương đối rõ giữa 3 nhóm điều trị. Các tế bào ở nhóm chứng mọc thành mảng lớn và dàn trải trên bề mặt nuôi cấy; trong khi nhóm điều trị  $0,125\mu\text{M}$  co thành từng mảng rời rạc; còn nhóm điều trị  $0,25\mu\text{M}$  mọc thành từng cụm nhỏ và xa nhau (Hình 5). Sau 48 giờ, tế bào được thu lại và cố định bằng ethanol 80%, rồi được đưa vào phân tích trên máy đếm tế bào dòng chảy vào ngày hôm sau với chất chỉ thị PI, mỗi lần phân tích  $10^4$  tế bào. Kết quả đo được thể hiện ở hình 6. Kết quả phân tích được thể hiện ở hình 7.



**Hình 6.** Biểu đồ đếm tế bào dòng chảy cho nhóm chứng (A), nồng độ  $0,125\mu\text{M}$  (B), nồng độ  $0,25\mu\text{M}$  (C)



**Hình 7.** Kết quả phân tích dòng chảy tế bào cho chu kỳ tế bào của dòng tế bào ung thư đại trực tràng người HCT116.

Tỷ lệ tế bào bị bắt giữ trong các pha ở các nhóm điều trị thay đổi không đáng kể: Kết quả bắt giữ pha G1 ở các nhóm điều trị đều cao hơn so với nhóm chứng (nhóm 0,125 $\mu$ M là 65,60%, nhóm 0,25 $\mu$ M là 65,74% so với nhóm chứng là 62,88%). Kết quả ở pha S: Nhóm 0,125 $\mu$ M có tỷ lệ bắt giữ xấp xỉ nhóm chứng, nhóm 0,25 $\mu$ M lại thấp hơn so với nhóm chứng (nhóm 0,125 $\mu$ M là 22,56%, nhóm 0,25 $\mu$ M là 20,59% so với nhóm chứng là 22,41%). Tại pha G2/M, tỷ lệ tế bào bắt giữ ở các nhóm điều trị đều thấp hơn so với nhóm chứng; nhóm 0,125 $\mu$ M có tỷ lệ bắt giữ thấp nhất (nhóm 0,125 $\mu$ M là 11,84%, nhóm 0,25 $\mu$ M là 13,67% so với nhóm chứng là 14,71%).

## BÀN LUẬN

Ung thư đại trực tràng là một trong những bệnh ung thư được chẩn đoán phổ biến nhất trên toàn thế giới. Mặc dù phẫu thuật là phương pháp điều trị chính cho ung thư đại tràng giai đoạn đầu, nhưng hóa trị vẫn có một vai trò quan trọng, vì nhiều bệnh nhân có khối u di căn đi xa tại thời điểm chẩn đoán. Phần lớn thất bại trong điều trị hóa chất ở các giai đoạn xâm lấn và di căn liên quan đến tình trạng kháng thuốc [6]. Do đó, việc tìm kiếm các loại thuốc hóa trị hiệu quả và khắc phục tình trạng kháng thuốc là một vấn đề

khó khăn. p97 là một protein điều chỉnh quan trọng đối với sửa chữa tổn thương DNA, kiểm soát chất lượng protein và cân bằng nội môi, đồng thời có mặt và biểu hiện cao trong nhiều bệnh ung thư [7]; vì vậy, việc ức chế chức năng p97 có thể là một mục tiêu trong điều trị ung thư. Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện ra CB-5083, một chất ức chế p97 đường uống, có thể ức chế đáng kể sự phát triển của tế bào ung thư đại trực tràng *in vitro*, điều này cho thấy CB-5083 có thể là một chất chống ung thư tiềm năng. Thử nghiệm di trú tế bào là một kỹ thuật được sử



dụng để nghiên cứu sự di chuyển của tế bào và tương tác giữa các tế bào. Kết quả của chúng tôi cho thấy có xu hướng sự ức chế xâm lấn tế bào ở các nồng độ điều trị khác nhau. Tuy nhiên, sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

Chu kỳ tế bào là một loạt các bước tăng trưởng và phát triển mà một tế bào trải qua trong quá trình phân chia tế bào. Việc bắt giữ chu kỳ tế bào trong các tế bào ung thư thường đi kèm với sự ức chế tăng sinh tế bào. Sự tăng sinh tế bào không kiểm soát là một đặc điểm sinh học quan trọng giúp phân biệt tế bào khối u với tế bào soma thông thường. Việc mất kiểm soát chu kỳ tế bào đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển, tăng sinh khối u và là một dấu hiệu đặc trưng của bệnh ung thư [8]. Zhao Z và CS đã chỉ ra CB-5083 có thể gây ra sự bắt giữ chu kỳ tế bào G1 trong các tế bào ung thư xương và do đó ức chế sự tăng sinh tế bào [9]. Ở một nghiên cứu khác trên tế bào ung thư buồng trứng, điều trị CB-5083 làm tăng bắt giữ pha G1 và giảm pha S [10]. Những kết quả này cho thấy rằng các chất ức chế p97 gây ra sự bắt giữ chu kỳ tế bào G1. Chúng tôi đã thực hiện đếm tế bào dòng chảy để kiểm tra tác động của CB-5083 đối với chu kỳ tế bào và nhận thấy lượng tế bào bắt giữ ở các pha thay đổi không đáng kể, trong đó pha G1 tăng lên ở cả

hai nhóm điều trị; trong khi đó sự giảm bắt giữ pha S chỉ thấy ở nhóm điều trị 0,25 $\mu$ M.

### **KẾT LUẬN**

Ức chế protein tham gia sửa chữa tổn thương DNA p97 có tác dụng kìm hãm tăng sinh trên tế bào ung thư đại tràng HCT116.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.02-2019.324. Chúng tôi cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Meerang M, Ritz D, Paliwal S, et al. The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* Oct 23 2011; 13(11):1376-1382. DOI:10.1038/ncb2367.
2. Vaz B, Halder S, Ramadan K. Role of p97/VCP (Cdc48) in genome stability. *Front Genet.* 2013; 4:60. DOI:10.3389/fgene.2013.00060.
3. Raman M, Havens CG, Walter JC, Harper JW. A genome-wide screen identifies p97 as an essential regulator of DNA damage-dependent CDT1 destruction. *Mol Cell.* Oct 7 2011; 44(1):72-84. DOI:10.1016/j.molcel.2011.06.036.

4. Acs K, Luijsterburg MS, Ackermann L, Salomons FA, Hoppe T, Dantuma NP. The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol*. Nov 27 2011; 18(12):1345-1350. DOI:10.1038/nsmb.2188.
5. Ramadan K. p97/VCP- and Lys48-linked polyubiquitination form a new signaling pathway in DNA damage response. *Cell Cycle*. Mar 15 2012; 11(6):1062-1069. DOI:10.4161/cc.11.6.19446.
6. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull*. Sep 2017; 7(3):339-348. DOI:10.15171/apb.2017.041.
7. Wang X, Wen T, Miao H, Hu W, Lei M, Zhu Y. Discovery of a new class of valosine containing protein (VCP/P97) inhibitors for the treatment of colorectal cancer. *Bioorg Med Chem*. Nov 15 2022; 74:117050. DOI:10.1016/j.bmc.2022.117050.
8. Dominguez-Brauer C, Thu KL, Mason JM, Blaser H, Bray MR, Mak TW. Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies. *Mol Cell*. Nov 19 2015; 60(4):524-536. DOI:10.1016/j.molcel.2015.11.006.
9. Zhao Z, Wu M, Zhang X, et al. CB-5083, an inhibitor of P97, suppresses osteosarcoma growth and stem cell properties by altering protein homeostasis. *Am J Transl Res*. 2020; 12(6):2956-2967.
10. Bastola P, Neums L, Schoenen FJ, Chien J. VCP inhibitors induce endoplasmic reticulum stress, cause cell cycle arrest, trigger caspase-mediated cell death and synergistically kill ovarian cancer cells in combination with Salubrinal. *Mol Oncol*. Dec 2016; 10(10):1559-1574. DOI:10.1016/j.molonc.2016.09.005.