

„Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.“

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie (N1501)
Studijní obor: NGEMOVI (1515T010)



Bc. Alexandra Dolníková

**Faktory ovlivňující odpověď kolorektálního karcinomu na
chemoterapeutickou léčbu**

The study of the factors affecting colorectal cancer chemotherapy

Diplomová práce

Školitelka: Ing. Alena Opattová, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením Ing. Aleny Opattové, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 19.07. 2019

.....
Bc. Alexandra Dolníková

Pod'akovanie:

Na tomto mieste by som rada pod'akovala MUDr. Pavlovi Vodičkovi, CSc. za možnosť vypracovať predloženú diplomovú prácu na Oddelení molekulárnej biológie nádorov na Ústave experimentálnej medicíny AV ČR, v. v. i..

Ďalej by som veľmi rada pod'akovala svojej školiteľke a vedúcej diplomovej práce Ing. Alene Opattovej, Ph.D. za odborné vedenie, ochotu, trpezlivosť a čas venovaný nielen počas práce v laboratóriu, ale aj pri osobných konzultáciách. Zároveň by som chcela pod'akovať celému vedeckému kolektívu z Oddelenia molekulárnej biológie nádorov, ktorý ma medzi seba prijal a vytvoril mi priateľskú atmosféru pri spracovávaní diplomovej práce. Menovite by som ešte chcela pod'akovať MUDr. Josefovi Horákovi za pomoc a cenné rady pri osvojovaní si metodických postupov.

V neposlednom rade by som rada vyslovila najväčšie pod'akovanie svojej rodine za podporu počas celého priebehu štúdia.

Abstrakt

Aplikace cytotoxické chemoterapie nadále představuje základní strategii v léčbě pokročilých stádiích kolorektálního karcinomu. Přirozená či získaná rezistence nádoru představuje častou komplikaci chemoterapie nebo vede dokonce k jejímu selhání. Ukazuje se, že úlohu v terapeutické rezistenci nádorů sehrávají kromě jiného i dráhy zodpovědné za opravu poškozené DNA. Pozorování u řady nádorů odhalily vysokou frekvenci deregulované exprese u mnoha genů, které kódují DNA reparační proteiny. Příkladem takového proteinu u kolorektálního karcinomu je MRE11, senzorický protein dvouřetězcových zlomů DNA.

Na Oddělení molekulární biologie nádorů (ÚEM AV ČR, v. v. i.) byla roku 2016 publikována studie, která pojednává o vztahu genetických polymorfismů v místech vazby microRNA na mRNA reparačních proteinů, mezi nimi i MRE11, klinickým výstupem a úspěšností chemoterapie. Na základě těchto výsledků byla vypracována hypotéza, že konkrétně definované microRNA, které budou asociovat s mRNA reparačních proteinů, umožní nejen ovlivnit přežívání kolorektálních nádorových buněk, ale i citlivost vůči aplikované chemoterapii.

V praktické části předložené práce jsme pomocí *in silico* analýzy identifikovali miR-140 jako potencionální regulátor proteinu MRE11. Následně byl v *in vitro* funkčních analýzách testovaný vliv miR-140 na chování chemosenzitivních a chemorezistentních kolorektálních nádorových linií ve spojitosti s aplikací standardně používaného chemoterapeutika oxaliplatiny. Dosáhnutá pozorování byla následně validována na vzorcích získaných od 33 pacientů s kolorektálním karcinomem.

Získané výsledky naznačují možnou asociaci mezi hladinou testované miR-140, aktivitou proteinu MRE11 a chováním buněčných linií po aplikaci oxaliplatiny. Experimentální zvýšení hladiny miR-140 vedlo v kolorektálních nádorových buňkách ke snížené proliferaci, zvýšené cytotoxicitě a zároveň byl u chemosenzitivních prokázán vliv zvýšené miR-140 na pokles hladiny proteinu MRE11. Stejný výsledek se nakonec podařilo prokázat i při testování na patientských vzorcích.

Klíčová slova: kolorektální karcinom, oxaliplatina, terapeutická rezistence, poškození DNA a reparační dráhy, Mre11, nekódující krátké RNA, miR-140

Abstract

Application of cytotoxic chemotherapy still remains the essential treatment strategy in advanced colorectal cancer. The intrinsic and acquired drug resistance represents one of the reasons that may even lead to failure of cancer therapy. The DNA damage response pathways have been shown to play an important role in the development of chemoresistance. There is sufficient evidence showing the high-frequency deregulated expression of many DNA repair genes across multiple cancer types. An example of such gene in colorectal cancer is *MRE11*, which encodes protein known as a sensor of DNA double-strand breaks.

In year 2016, there was a substantial study published by our group at The Department of Molecular Biology of Cancer (IEM CAS, Prague), the study analysed the association of polymorphisms in predicted microRNA target sites of double-strand breaks (DSBs) repair genes, including *MRE11*, and clinical outcome and efficacy of chemotherapy in colorectal cancer. Our hypothesis, based on the mentioned study, is that specifically and exactly defined microRNAs with ability to regulate certain DNA repair proteins may not only affect the survival of colorectal cancer cells, but also the sensitivity to chemotherapy.

In practical part of the submitted thesis we have identified miR-140 as a potential regulator of MRE11 protein. The *in vitro* functional assays tested the effect of miR-140 on the behavior of chemosensitive and chemoresistant colorectal cancer cell lines before and after treatment with oxaliplatin, the standard chemotherapeutic agent for colorectal cancer. The obtained observations were finally validated in 33 patients with colorectal cancer.

According to our results, there is a possible association between level of miR-140 and the activity of MRE11 protein in colorectal cancer. We also found a significant effect of miR-140 on the behavior of chemosensitive colorectal cancer cells after treatment with oxaliplatin. Furthermore, the ectopic expression of miR-140 suppressed proliferation, increased cytotoxicity in colorectal cancer cells and at the same time the elevated level of miR-140 was associated with decreasing in *MRE11* expression. Finally, the same results were also confirmed on tumor samples obtained from patients with colorectal cancer.

Keywords: colorectal cancer, oxaliplatin, cancer therapeutic resistance, DNA damage and repair, Mre11, short non-coding RNAs, miR-140

Obsah

1. Úvod.....	11
2. Prehľad literatúry.....	12
2.1 Kolorektálny karcinóm.....	12
2.1.1 Epidemiológia.....	12
2.1.2 Etiológia a predispozícia.....	14
2.1.3 Exogénne rizikové faktory.....	17
2.1.4 Screeningové programy a diagnostika.....	17
2.1.5 Terapeutické stratégie.....	19
2.1.6 Účinok oxaliplatiny v liečbe kolorektálneho karcinómu.....	21
2.2 Bunkové mechanizmy zodpovedné za opravu DNA.....	23
2.2.1 Prehľad základných DNA reparačných dráh.....	23
2.2.2 DNA reparačné dráhy v odpovedi na protinádorovú terapiu.....	26
2.2.3 Vplyv MRN komplexu na rozvoj nádorov.....	28
2.3 MicroRNA v onkológii.....	31
2.3.1 Definícia a funkcia microRNA.....	31
2.3.2 Kanonický model biogenézy a maturácie.....	33
2.3.3 Deregulácia microRNA v nádoroch.....	34
2.3.4 Využitie v diagnostike a terapii nádorov.....	35
2.3.5 MicroRNA u kolorektálneho karcinómu.....	37
3. Hypotéza a ciele diplomovej práce.....	39
4. Materiál a metódy	40
4.1 <i>In silico</i> analýza microRNA asociujúcich s reparačnými proteínmi	40
4.2 <i>In vitro</i> funkčná analýza.....	41
4.2.1 Nádorové bunkové línie	41
4.2.2 Kultivácia, pasážovanie, počítanie a nasedenie buniek.....	42
4.2.3 Transfekcia a ošetrovanie buniek	44
4.2.4 Hodnotenie bunkovej proliferácie, viability a cytotoxicity	45
4.2.5 Kvantitatívna PCR v reálnom čase.....	47
4.2.6 Proteínová analýza.....	50
4.2.7 Analýza poškodenia DNA.....	53
4.2.8 Analýza bunkového cyklu.....	55
4.3 Validácia pozorovaných výsledkov na patientskych vzorkách.....	56
4.3.1 Súbor testovaných pacientov.....	56

4.3.2 Analýza expresie vybraných génov.....	57
4.4 Štatistické hodnotenie.....	58
5. Výsledky.....	59
5.1 <i>In silico</i> analýza microRNA asociujúcich s reparačnými proteínmi.....	59
5.2 Endogénna hladina miR-140 v kolorektálnych nádorových líniách.....	60
5.3 <i>In vitro</i> funkčná analýza miR-140 na DLD-1 línií.....	61
5.3.1 Optimalizácia transfekcie DLD-1 buniek.....	61
5.3.2 Hodnotenie vplyvu miR-140 na bunkovú proliferáciu.....	62
5.3.3 Hodnotenie vplyvu miR-140 na klonogénny potenciál.....	63
5.3.4 Hodnotenie vplyvu miR-140 na cytotoxicitu.....	63
5.3.5 Analýza vplyvu miR-140 na poškodenie molekúl DNA.....	64
5.3.6 Analýza vplyvu miR-140 na reguláciu bunkového cyklu.....	65
5.3.7 Hodnotenie expresie proteínu Mre11 vo vzťahu k miR-140.....	66
5.3.8 Proteínová analýza.....	67
5.4 <i>In vitro</i> funkčná analýza miR-140 na OxR línií.....	69
5.5 Validácia pozorovaných výsledkov na patientskych vzorkách.....	70
6. Diskusia.....	76
7. Zhrnutie a záver.....	82
8. Zoznam použitej literatúry.....	83

Zoznam použitých skratiek

5-FU	5-fluórouracil
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i> tumor-supresorový gén
APS	persíran amónny
ATCC	Americká zbierka tkanivových kultúr
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i> kináza homológna s PI3-kinázami
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated- and Rad3-related</i> kináza
BSA	bovinný sérový albumín
CA 50 / 72.4	<i>cancer antigen</i> nádorový marker
CEA	karcinoembryonálny antigén
CFA	test tvorby bunkových kolónií
CpG	cytozín-fosfát-guanín dinukleotidy
CRC	kolorektálny karcinóm
DACH	diaminocyklohexán
DDR	odpoveď na poškodenie DNA
DSBs	dvojreťazcové zlomy na molekulách nukleových kyselín
EGFR	receptor epidermálneho rastového faktora
FAP	familiárna adenomatózna polypóza
FDA	Americký úrad pre dohľad nad liekmi a potravinami
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
γ H2AX	histónový proteín z rodiny H2A (fosforylovaná forma)
HNPCC	hereditárny nepolypózny karcinóm hrubého čreva
HR	homologická rekombinácia
Chk1 / Chk2	<i>Checkpoint</i> kináza 1 / 2
IC50	letálna koncentrácia látky, pri ktorej umiera 50 % testovaných organizmov
mCRC	metastatický kolorektálny karcinóm
miRISC	umlčujúci komplex indukovaný miRNA

miRSNPs	jednonukleotidové polymorfizmy v miestach väzby miRNA na mRNA
MMR	<i>mismatch repair</i> oprava chybného párovania báz
MRE11	<i>Meiotic Recombination 11</i> nukleáza
MRN	MRE11-RAD50-NBS1 proteínový komplex
MSI	nestabilita mikrosatelitov
MTX	metotrexát
ncRNA	nekódujúca RNA
NHEJ	nehomologické spájanie koncov DNA
ORF	otvorený čítací rámec
p53	transkripčný faktor a tumor-supresorový proteín
PARP	poly (ADP-ribóza) polymeráza
PBS	fosfátový pufer
PFS	prežitie bez progresie
PIKK	rodina fosfatidylinozitol-3 príbuzných proteínkináz
PTEN	fosfatidylinozitol-3 fosfatáza
RAD51	rekombináza
RNU6B	malá jadierková RNA
ROS	reaktívne formy kyslíka
SSBs	jednoreťazcové zlomy na molekulách nukleových kyselín
ssDNA	jednoreťazcová DNA
TEMED	N,N,N', N'-tetrametylen-diamín
TME	totálna mezorektálna excízia
TNM	klasifikácia zhubných nádorov
UTR	netranslatovaná oblasť na mRNA
ÚZIS ČR	Ústav zdravotníckych informácií a štatistiky ČR
VEGF	vaskulárny endoteliálny rastový faktor
XPO5	gén kódujúci Exportín 5

1. Úvod

Kolorektálny karcinóm dlhodobo zaujíma popredné miesta v celosvetových štatistikách, ktoré hodnotia incidenciu a mortalitu malígnych nádorových ochorení. V rámci Českej republiky je ročne diagnostikovaných okolo 8 000 nových prípadov a zhruba polovica z nich v dôsledku tohto ochorenia umiera. K vysokej incidencii navyše negatívne prispieva tzv. „západný životný štýl“, ktorý súvisí so zlými stravovacími návykmi, nárastom obezity, nedostatkom fyzickej aktivity, konzumáciou alkoholu či fajčením. Samotnému karcinómu často predchádza prítomnosť adenomatóznych polypov v črevnej sliznici. Skorá detekcia a následne endoskopické odstránenie polypov je hlavným cieľom postupne zavádzaných screeningových programov. Hlavným problémom ochorenia v pokročilých štádiách je skutočnosť, že je aj po zdanlivo účinnej počiatočnej terapii zaťažené vysokým percentom rozvoja recidívy.

Štandardne podávané chemoterapeutiká pri liečbe kolorektálneho karcinómu sú najmä 5-fluórouracil a oxaliplatina, často podávané súčasne v rôznych kombináciách. Podstatou chemoterapie je navodiť nadmerné poškodenie genetickej informácie nádorových buniek, ktoré povedie až k ich apoptóze. Negatívnym vedľajším účinkom konvenčnej chemoterapie naďalej ostáva neselektívny účinok na určité typy zdravých buniek organizmu. Niektoré nádorové bunky navyše disponujú prirodzenou chemorezistenciou k podávanej terapii alebo dokážu vyvinúť mechanizmy k jej získaniu. Práve zlyhanie terapie v dôsledku chemorezistencie je hlavnou príčinou úmrtí spojených s nádorovými ochoreniami. Chemorezistencia býva u významnej časti nádorov podmienená mutáciami génov, ktoré kódujú proteíny podieľajúce sa na rozpoznávaní a oprave poškodenia DNA spôsobeného práve terapeutickými látkami.

Postupné poznávanie biológie nádorov a pochopenie mechanizmu kancerogenézy prispieva k určaniu konkrétnych molekulových cieľov, voči ktorým možno namieriť špecifickú terapiu. Jej potenciál spočíva v znížení rizika vedľajších efektov, vyššej účinnosti a do budúca možnej personalizácii protinádorovej terapie.

2. Prehľad literatúry

2.1 Kolorektálny karcinóm

Kolorektálny karcinóm (*colorectal cancer*, CRC) je nádorové ochorenie, ktoré vzniká malígnou transformáciou cylindrického epitelu hrubého čreva a konečníka. Podstatná časť nádorov hrubého čreva patrí medzi adenokarcinómy s rôznym stupňom morfolologickej diferenciácie žľazových buniek sliznice čreva. Na základe histologickej stavby možno odlíšiť mucinózny adenokarcinóm, karcinóm z prstencovitých buniek, skvamózny karcinóm, adenoskvamózny karcinóm, nediferencovaný karcinóm a neklasifikovateľný karcinóm (Diviš *et al.*, 2016). Nádory hrubého čreva a konečníka sa síce združujú pod spoločný názov – kolorektálny karcinóm, avšak existujú medzi nimi značné rozdiely, ktoré možno nájsť v etiológii a vývoji na molekulárnej úrovni, invazivite rastu primárneho nádoru, metastázovaní, odpovedi na liečbu či rozvoji rezistencie (Li *et al.*, 2009).

Vo všeobecnosti sa na vzniku nádorov podieľajú genetické a regulačné zmeny, výsledkom ktorých je funkčná deregulácia bunkovej proliferácie a apoptózy. Nádorové bunky sú relatívne nezávislé na fyziologických a rastových regulačných stimuloch prichádzajúcich z okolitého tkaniva a majú schopnosť pokračovať v replikácii nezávisle od mechanizmov regulujúcich prirodzenú obnovu a rast buniek (Evan *et al.*, 2001).

Prevažné percento CRC sa vyvíja z relatívne pomaly rastúcich adenomatóznych polypov. Termín polyp označuje ohraničený útvar vyčnievajúci nad okolitú sliznicu do lumen čreva. Podľa histológie môžu byť kolorektálne polypy klasifikované ako *non*-neoplastické (nenádorové) a neoplastické (nádorové). Z časového hľadiska môže vývoj adenómu v karcinóm trvať 7-10 rokov. Benígne polypy sa radia k premalígnym léziám, ktoré pokiaľ nie sú v rámci profylaxie odstránené môžu akumulovať početné mutácie a predstavovať prvotné štádium vývoja CRC. Riziko malígneho zvratu závisí na histologickej stavbe, veľkosti adenómov a stupni ich štruktúrnej a cytologickej nepravidelnosti (dysplázie) (Povýšil *et al.*, 2007).

2.1.1 Epidemiológia

Gastrointestinálne nádory v celosvetovej miere reprezentujú zhruba tretinu všetkých nádorových ochorení. CRC má najvyššiu prevalenciu medzi zhubnými nádormi tráviaceho ústrojenstva a patrí k nádorovým ochoreniam s vysokou mortalitou. V roku 2018 bol v rámci celosvetovej incidencie odhadovaný počet 1 849 518 novo diagnostikovaných prípadov

a CRC sa stal tretím najčastejším zhubným nádorovým ochorením (s výnimkou niektorých kožných nádorov). V Európe bolo v spomínanom roku odhadovaných 499 667 prípadov (Tab. č. 1). Celosvetová úmrtnosť zapríčinená CRC bola za rok 2018 odhadovaná na 880 792 prípadov a na 242 483 prípadov v Európe. Tým sa CRC zaradil na druhé miesto najčastejších úmrtí spôsobených nádorovým ochorením (s výnimkou niektorých kožných nádorov) (Ferlay *et al.*, 2018).

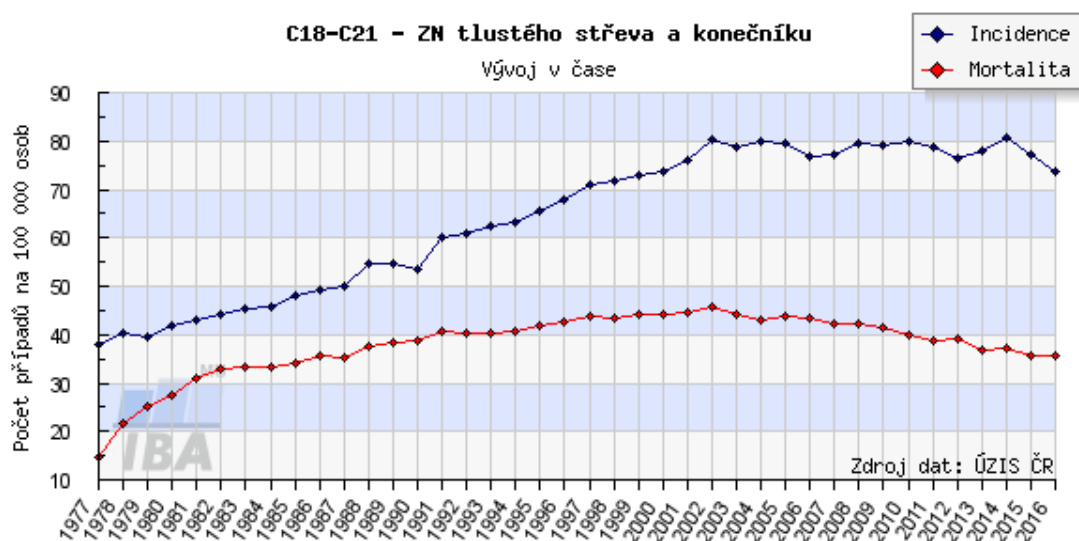
Tabuľka č. 1: Epidemiologické údaje o kolorektálnom karcinóme za rok 2018 v rámci Európy. (Prevzaté a upravené podľa: Ferlay *et al.*, 2018)

Parameter	Muži	Ženy	Celá populácia
Incidenca			
počet novotvarov	271 600	228 067	499 667
počet novotvarov na 100 000 osôb	75,5	59,4	67,2
poradie medzi zhubnými nádormi (s výnimkou niektorých kožných nádorov)	3.	2.	2.
Mortalita			
počet úmrtí	129 706	112 777	242 483
počet úmrtí na 100 000 osôb	36,1	29,3	32,6
poradie medzi zhubnými nádormi (s výnimkou niektorých kožných nádorov)	2.	3.	2.
Prevalencia (pacienti žijúci do 5 rokov od diagnostiky)			
počet pacientov	748 455	655 422	1 403 877
počet pacientov na 100 000 osôb	208,2	170,6	188,7
kumulatívne riziko vzniku nádoru do 75 rokov od narodenia	4,47 %	2,80 %	3,56 %

V štatistických hodnoteniach incidencie CRC patrí Česká republika na popredné miesta nielen v rámci krajín Európskej únie, ale aj celosvetovo. Ročne sa v ČR diagnostikuje okolo 8 000 nových prípadov (Obr. č. 1), čo dokazujú aj údaje zo Zdravotníckej ročenky ČR 2017 vydanéj Ústavom zdravotníckych informácií a štatistiky ČR. Podľa evidovaných údajov bolo v roku 2016 novo diagnostikovaných 3 028 prípadov u mužov a 4 582 prípadov u žien (ÚZIS ČR, 2017). Ešte v roku 2008 bola Česká republika v prvej trojici európskych krajín s najvyššou incidenciou CRC, hneď po Slovenskej republike a Maďarsku. Aj keď v posledných rokoch možno pozorovať výrazné zlepšenie štatistického postavenia ČR, česká populácia i naďalej zostáva nadmerne zaťažená týmto nádorovým ochorením. Podľa aktuálnych údajov v databáze GLOBOCAN zameraných na výskyt CRC v rámci štátov

Európy sa česká populácia mužov posunula na 14. miesto a populácia žien na 18.-19. miesto (Ferlay *et al.*, 2018).

CRC sa považuje za ochorenie rozvinutých krajín a spája sa s tzv. „západným štýlom života“ (*western lifestyle*). V krajinách ako USA, Austrália, Nový Zéland a západnej časti Európy sa uvádza výskyt viac ako 40 prípadov na 100 000 obyvateľov, zatiaľ čo v afrických a niektorých ázijských krajinách je to menej než 5 prípadov na 100 000 obyvateľov (Haggart *et Boushey*, 2009).



Obrázok č. 1: Časový vývoj incidence a mortality kolorektálneho karcinómu v Českej republike za obdobie rokov 1977-2016. (Prevzaté a upravené podľa: Dušek *et al.*, 2005)

2.1.2 Etiológia a predispozícia

CRC je považovaný za multifaktoriálne ochorenie, ktorého vznik možno označiť ako viacstupňový proces. Etiológiu CRC reprezentuje interakcia genetických faktorov a faktorov environmentálnych. Podľa miery zastúpenia endogénnych rizikových faktorov pri rozvoji CRC možno odlišiť dve základné formy CRC, sporadickú a hereditárnu (Kráľ *et al.*, 2016).

Sporadický kolorektálny karcinóm

Sporadická forma CRC predstavuje až 70-80 % prípadov, u ktorých nemožno identifikovať konkrétnu vrodenú mutáciu priamo zodpovednú za proces kancerogenézy. Hlavným rizikovým faktorom pri sporadickej forme je vek nad 50 rokov, pričom s narastajúcim vekom preukázateľne stúpa incidencia. Podľa aktuálnych dát, ktoré pravidelne uverejňuje American Cancer Society v spolupráci s National Cancer Institute je priemerný

vek v čase diagnózy u mužov 66 rokov a 69 rokov u žien (Miller *et al.*, 2019). Sporadický vývoj charakterizuje postupná akumulácia genetických a epigenetických mutácií, ktoré prispievajú k transformácii normálnej črevnej sliznice na invazívny karcinóm (Fearon *et Vogelstein*, 1990). Často ide o tzv. vývoj v sekvencii adenóm-karcinóm, keď karcinóm vznikne malígnou transformáciou existujúcich adenomatóznych polypov. Významne sa na tom podieľajú mutácie zodpovedné za inaktiváciu tumor-supresorových génov (napr. *APC*, *TP53*) a aktiváciu proto-onkogénov a onkogénov (napr. *KRAS*), ale tak isto mutácie v dráhach reparácie poškodenej DNA (*DNA damage response*, DDR), typicky v génoch *MMR* (*mismatch repair genes*) (Fearon *et Vogelstein*, 1990; Kinzler *et Vogelstein*, 1996). Dôsledkom spomínaných mutácií dochádza k poškodeniu signálnych dráh, ktoré kontrolujú proliferáciu a diferenciáciu epiteliálnych buniek črevnej sliznice. Epigenetické modifikácie sprostredkované aberantnou metyláciou promotórov a modifikáciou histónov taktiež zohrávajú podstatnú úlohu vo vývoji a progresii značnej časti sporadických foriem CRC (Vymetalkova *et al.*, 2019).

Hereditárne genetické syndrómy

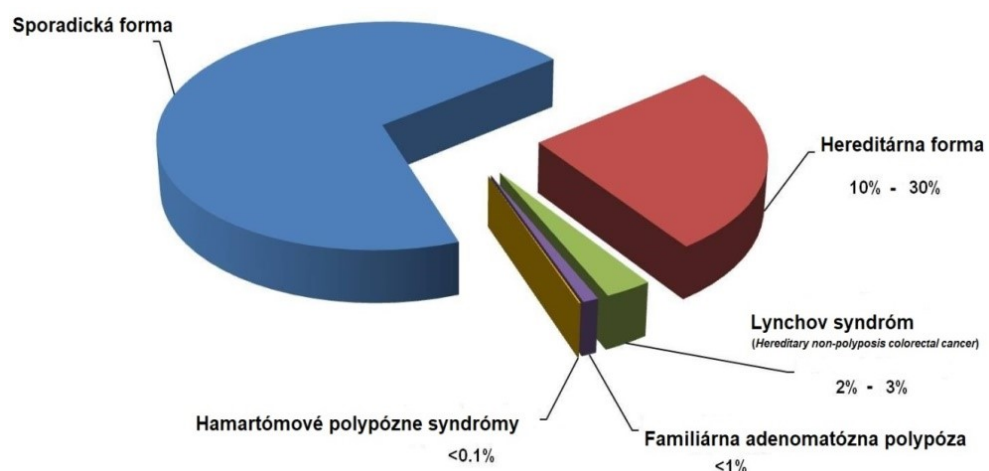
Populačné štúdie preukázali, že dedičné genetické faktory sú priamou príčinou rozvoja CRC až v 35 % prípadov (Lichtenstein *et al.*, 2000). V súčasnosti sa uvádza, že 2-5 % všetkých CRC vzniká na podklade dobre definovaných dedičných syndrómov s poruchami v konkrétnych génoch. Najvýznamnejšie z nich sú familiárna adenomatózna polypóza, Lynchov syndróm a syndrómy mnohopočetných hamartómov (Jasperson *et al.*, 2010).

Familiárna adenomatózna polypóza (FAP) je autozomálne dominantné dedičné ochorenie, charakteristické prítomnosťou mnohopočetných adenomatóznych polypov v hrubom čreve a konečníku. Vzniká dôsledkom zárodočnej mutácie tumor-supresorového génu *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), lokalizovaného v chromozómovej oblasti 5q21 (Kinzler *et al.*, 1991). Posunovými mutáciami v géne *APC* vzniká predčasný terminálny kodón a následne skrátenejší proteínový produkt s abnormálnou funkciou. Funkčný APC proteín má významnú úlohu v diferenciácii intestinálnych epiteliálnych buniek a obsahuje početné funkčné domény, čo mu dáva možnosť interakcie s ďalšími proteínmi. Zásadnú rolu zohráva vo Wnt signálnej dráhe pri regulácii proliferácie, morfológie a diferenciácie črevného epitelu (Segditsas *et Tomlinson*, 2006).

K významným syndrómom s mnohopočetnou polypózou patrí varianta FAP tzv. Gardnerov syndróm, Peutz-Jeghersov syndróm, syndróm juvenilnej polypózy či skupina *PTEN hamartoma tumor syndromes* (PTHS). Medzi PTHS sa radí napr. Cowdenov syndróm

(CS) alebo Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndróm (BRRS). Sú to vzácne syndrómy s autozomálne dominantnou dedičnosťou a relatívne vysokou penetráciou (približne 80 %). Príčinou je zárodočná mutácia tumor-supresorového génu *PTEN* dôležitého pri apoptóze, regulácii rastu buniek, a ktorý je pravdepodobne zapojený do bunkovej migrácie a adhézie. Z pozorovaní vyplýva, že nositelia mutácie *PTEN* vyvinú CRC pred dosiahnutím 50 rokov až v 13 % prípadoch (Heald *et al.*, 2010).

Lynchov syndróm (*Hereditary non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC) je dedičný syndróm s predispozíciou nielen k vzniku CRC, ale aj nádorov endometria, vaječníkov, tenkého čreva či pankreasu (Lynch *et al.*, 2015). Názov získal po americkom lekárovi Henry T. Lynchovi, ktorý v roku 1966 syndróm preštudoval a zadefinoval (Lynch *et al.*, 1966). Toto autozomálne dominantné ochorenie spôsobuje zárodočná mutácia v génoch, ktoré kódujú proteíny zodpovedné za opravu nesprávne spárovaných báz po replikácii DNA, tzv. reparačnej dráhy MMR (*mismatch repair*). Dva vedecké tímy nezávisle na sebe identifikovali mutácie génu *MSH2* v chromozómovej oblasti 2p16-21 u HNPCC pozitívnych rodín (Fishel *et al.*, 1993; Leach *et al.*, 1993). Okrem *MSH2* génu sú často prítomné defekty génu *HML1* v oblasti 3p21-23 (Bronner *et al.*, 1994). Mutácie génov *PMS1*, *PMS2* a *MSH6* sú vzácnejšie a v prípade mutácie *MSH3* zatiaľ nebola preukázaná spojitosť s HNPCC. Genetické analýzy u HNPCC odhalili zvýšenú frekvenciu inzerčných a delečných mutácií v krátkych repetitívnych sekvenciách, tzv. mikrosatelitoch. Ide o fenomén známy ako nestabilita mikrosatelitov (MSI), ktorý vzniká dôsledkom práve neadekvátnej funkcie MMR proteínov (Boland *et al.*, 2008).



Obrázok č. 2: Graf percentuálneho zastúpenia hereditárnych foriem kolorektálneho karcinómu. (Prevzaté a upravené podľa: Burt, 2000)

2.1.3 Exogénne rizikové faktory

Geografická variabilita výskytu CRC naznačuje, že faktory životného prostredia výrazne ovplyvňujú riziko vzniku tohto ochorenia. Z výsledkov početných epidemiologických štúdií a publikovaných metaanalýz vyplýva, že k hlavným z nich patrí nesprávne stravovanie a životný štýl či nedostatočná pohybová aktivita. Metaanalýza z roku 2011, ktorá hodnotila výsledky 13 štúdií preukázala signifikantnú závislosť medzi konzumáciou červeného a tepelne upravovaného mäsa a zvýšeným rizikom rozvoja CRC (Chan *et al.*, 2011). Strava bohatá na tuky (prevažne živočíšne), nízka fyzická aktivita, vysoký energetický príjem, obezita a diabetes mellitus II. typu sú ďalšie faktory, ktoré preukázateľne zvyšujú riziko CRC. V prípade vplyvu zvýšenej hodnoty BMI (*body mass index*) a abdominálnej obezity ide v prvom rade o podporu vývoja črevných adenómov, ktoré sú považované za prekursorové lézie pri rozvoji CRC (Donohoe *et al.*, 2010). Na druhej strane sa podľa niekoľkých epidemiologických štúdií zdá, že strava bohatá na ovocie a zeleninu by mohla mať ochranný charakter a viesť k zníženiu rizika CRC (Slattery *et al.*, 1998). Ochranný efekt pre rozvojom CRC je zrejme spôsobený vďaka vláknine, kyseline listovej, antioxidantom a vitamínom obsiahnutým v ovocí a zelenine. Predpokladaný priaznivý účinok vlákniny spočíva v znížení pH sigmoidea (esovitá kľučka hrubého čreva), skrátení času prechodu potravy hrubým črevom a zvyšovaní príjmu kyseliny listovej a mikronutrientov (Gandomani *et al.*, 2017).

Preukázaný bol aj vzťah nadmernej konzumácie alkoholu a vyššieho rizika vzniku CRC. Súhrnná analýza 57 štúdií z rokov 1986-2010 ukázala o 52 % vyššie riziko CRC u ťažkých konzumentov alkoholu (≥ 50 g etanolu / deň) v porovnaní s nealkoholikmi a príležitostnými konzumentmi (Fedirko *et al.*, 2011). Rovnako ako u iných typov nádorov má na rozvoj CRC výrazný vplyv nikotinizmus. Karcinogénne látky obsiahnuté v cigaretovom dyme totiž prispievajú k formovaniu a rastu adenomatózných polypov, čím zvyšujú riziko vzniku samotného CRC (Botteri *et al.*, 2008).

2.1.4 Screeningové programy a diagnostika

Zavádzanie populačných screeningových programov je príslubom postupnej stabilizácie a znížovania incidencie a mortality v dôsledku CRC. Cieľom je zvýšiť frekvenciu včasného záchytu pokročilých adenómov a zhubných karcinómov a tým zvýšiť pri diagnostike pomer včasných štádií oproti pokročilejším. Screening CRC je zameraný na asymptomatických jedincov v populácii starších ako 50 rokov. Vek je totiž považovaný za jeden z predispozičných faktorov, hlavne u osôb bez osobnej a rodinnej anamnézy CRC

či idiopatického črevného zápalu. V roku 2009 Ministerstvo zdravotníctva ČR zahájilo celorepublikový screeningový program kolorektálneho karcinómu. Program po metodickej stránke zahŕňa test okultného krvácania do stolice (TOKS) a primárnu screeningovú kolonoskopiu (Dušek *et al.*, 2019).

Prvou fázou pri diagnostike CRC je zistenie anamnézy zameranej na nádorové ochorenia v rodine pacienta. Vlastné klinické vyšetrenie potom zahŕňa palpačné a ultrazvukové vyšetrenie oblasti brucha, vyšetrenie konečníka *per rectum* a endoskopické metódy umožňujúce odber vzoriek tkaniva pre histologické vyšetrenie. Na analýzu rozsahu infiltrácie steny hrubého čreva nádorom a prípadného metastatického šírenia do regionálnych lymfatických uzlín a vzdialenejších orgánov sa využíva počítačová tomografia (*computerized tomography*, CT). V praxi sa dnes bežne kombinuje s pozitronovou emisnou tomografiou (*positron emission tomography*, PET) za účelom spresniť lokalizáciu malígnych buniek, čo sa uplatňuje hlavne pri detekcii recidívy CRC. Pre potvrdenie ochorenia pacienti často podstupujú vyšetrenie magnetickou rezonanciou (*magnetic resonance imaging*, MRI), ktorá sa taktiež uplatňuje pri určovaní *staging*-u (klinické štádium ochorenia) karcinómu konečníka, čím napomáha stanoviť adekvátne terapeutické postupy (Büchler *et al.*, 2017).

Moderný neinvasívny prístup predstavuje vyšetrenie špecifických proteínov v krvnej plazme, tzv. nádorových biomarkerov (nádorových antigénov), ktorých hladina sa v prítomnosti nádoru môže značne zvýšiť. Keďže vykazujú nízku senzitivitu v skorých štádiách nie sú využívané v rámci preventívnych vyšetrení. Pozitívne hodnoty sa berú do úvahy v korelácii s klinickým nálezom a pozitívnymi výsledkami zobrazovacích metód. U pacientov s preukázaným nádorom je dôležité sledovať dynamiku biomarkerov v čase, pretože pokles môže značiť úspešnosť liečby a naopak, vzostup môže byť prvým znakom recidívy. Hlavným biomarkerom CRC je karcinoembryonálny antigén (CEA), druhým často sledovaným je antigén CA 19.9 (Thomsen *et al.*, 2018). Existujú štúdie zamerané na analýzu antigénov CA 50, CA 72.4 či CO 29.11, ich výsledky však neboli dostatočne relevantné pre diagnostickú prax. Nádejne sa javia štúdie zamerané na identifikáciu autoprotílátok asociovaných s nádormi (*tumor-associated autoantibodies*, AAbs) ako potenciálnych biomarkerov CRC, napr. p53, p62, HER-2/neu, topoizomeráza II-alfa či ubikvitín L3 (Binefa *et al.*, 2014). AAbs totiž nie sú prítomné u zdravých jedincov a vďaka ich stabilite môžu byť detegované pomocou imunoesejí, takže ponúkajú sľubnú cestu pre ďalší výskum.

2.1.5 Terapeutické stratégie

Výber kvalitnej terapeutickej stratégie závisí na anatomickej lokalizácii primárneho nádoru a rozšírení ochorenia v tele pacienta. Prognóza u pacientov s CRC sa určuje na základe histologického typu nádoru (*typing*), stupňa diferenciácie (*grading*), hĺbky infiltrácie nádoru v stene čreva a prítomnosti metastáz (*staging*). Hodnotenie progresie CRC vychádza z medzinárodnej klasifikácie zhubných novotvarov TNM, ktorá posudzuje lokálnu progresiu primárneho nádoru (T), prítomnosť metastáz v regionálnych lymfatických uzlinách (N) a metastatické postihnutie iných orgánov (M). Správna klasifikácia má zásadný význam pri rozhodovaní o operatívnom zákroku, potrebe a type chemoterapie, rádioterapie či prípadne inom type liečby (Büchler *et al.*, 2017).

Základný terapeutický postup či už pri nádoroch hrubého čreva, alebo konečníka predstavuje radikálne chirurgické odstránenie nádorového ložiska. Odstránenie karcinómu hrubého čreva v sebe spája resekciu hrubého čreva s nádorom a lokálnym lymfatickým riečiskom, prípadne odstránenie postihnutých okolitých orgánov (multiviscerálna resekcia). Rozsah resekcie odpovedá lokalizácii nádoru a miere preukázaného či odhadovaného postihnutia lymfatického systému, preto je súčasťou každej resekcie je lymfadenektómia. To znamená odstránenie regionálnych lymfatických uzlín, pretože by mohli obsahovať lymfogénne metastázy. Typické zákroky sú pravostranná alebo ľavostranná hemikolektómia, resekcia transversa (*c. transversum*) a resekcia sigmoidea (*c. sigmoideum*). Štandardná chirurgická procedúra pri karcinóme konečníka využíva koncept totálnej mezorektálnej excízie (*total mesorectal excision*, TME), ktorý niekoľko rokov vyvíjal na základe chirurgickej hypotézy profesor Heald a chirurgovia z Basingstoke Colorectal Cancer Group (MacFarlane *et al.*, 1993). Pri TME sa exciduje celé mezorektum s príslušným tukovým tkanivom a lymfatickými uzlinami.

Rádioterapia býva indikovaná buď predoperačne (neoadjuvantne) za účelom redukovať veľkosť nádoru, alebo pooperačne (adjuvantne) k eliminácii reziduálnych nádorových buniek a to hlavne v kombinácii s chemoterapiou. V súčasnosti sa rádioterapia častejšie uplatňuje v liečbe karcinómu konečníka. Vzhľadom na jeho anatomické uloženie, vzťah k okolitým orgánom a štruktúram panvy totiž dochádza vo väčšine prípadov k lokálnej recidíve ochorenia. Podstúpenie neoadjuvantnej rádioterapie pred TME tak výrazne znižuje výskyt riziko recidívy (Van Gijn *et al.*, 2011).

Chemoterapia je od šesťdesiatych rokov 20. storočia jednou z hlavných metód liečby nádorových ochorení, pretože na rozdiel od lokoregionálnych metód má systémový účinok. Použitie konvenčných cytostatík je založené na vysokej mitotickej aktivite nádorových buniek

v porovnaní s bunkami zdravých tkanív. Sú tak náchylnejšie na proapoptotické stimuly, čo vedie k ich preferenčnej eliminácii. Štandardné širokospektrálne cytostatiká sa viažu na bunkové štruktúry ako DNA, RNA, proteíny cytoskeletu či proteazóm a tým inhibujú replikáciu DNA, transkripciu a transláciu RNA, degradáciu vybraných proteínov a nakoniec aj samotné delenie bunky (Klener Jr. *et Klener*, 2013).

Základ chemoterapie CRC predstavujú fluóropirimidíny, cytostatiká s antimetabolickým účinkom, ktorých hlavným zástupcom je 5-fluórouracil (5-FU). Po vstupe do bunky sa 5-FU aktivuje na 5-fluóro-2'-deoxyuridín 5'monofosfát (FdUMP), ktorý konkuruje endogénnemu deoxyuridín monofosfátu (dUMP). FdUMP spoločne s methylenetetrahydrofolátom (5,10-CH₂FH₄), ako produktom metabolizmu folátu, tvorí ternárny komplex s enzýmom tymidylát syntáza. Zablokovaním aktivity tymidylát syntázy sa nemôže tvoriť deoxytymidín monofosfát (dTMP) a syntetizovať pyrimidínové nukleotidy nevyhnutné pre syntézu DNA. Okrem toho je 5-FU premieňaný na 5-fluórouridín monofosfát (FUMP) a následne fosforylovaný na 5-fluórouridín 5'trifosfát (FUTP), ktorý sa priamo inkorporuje do RNA. V podobe 5-fluóro-2'-deoxyuridín 5'fosfátu zas dochádza k inkorporácii do DNA (Capitain *et al.*, 2008). V snahe opraviť nesprávne zaradené bázy vznikajú často zlomy v molekule DNA, ktoré vedú k zástave replikácie a v prípade nahromadenia veľkého množstva poškodenia napokon až k apoptóze. 5-FU od zavedenia v 50. rokoch minulého storočia ostáva štandardným terapeutikom v prvej línii liečby CRC. Odvtedy boli vyvinuté a Americkým úradom pre dohľad nad liekmi a potravinami (*Food and Drug Administration*, FDA) schválené ďalšie liečiva, ktoré sú dnes rutinne používané. Patrí k nim hlavne oxaliplatina, irinotekán, kapecitabín a trifluridín s tipiracilom. Všetky spomínané terapeutiká môžu byť indikované samostatne, avšak ich rôznou kombináciou dochádza k zvýšeniu účinku (McQuade *et al.*, 2017). Konvenčná liečba pokročilých štádií CRC odpovedá kombinácii 5-FU s leukovorínom a buď oxaliplatinou, alebo irinotekánom (De Gramont *et al.*, 2000; Saltz *et al.*, 2000).

Poznanie molekulárnej podstaty nádorovej transformácie a biológie malígnych buniek umožnilo definovať spoločné patofyziologické mechanizmy v rámci odlišných typov malignít ako aj špecifické molekulárne faktory. Ich štúdium viedlo k vývoju terapeutík, ktoré zasahujú konkrétne molekuly nádorových buniek bez poškodenia buniek zdravých, čím sa dosahuje vyššia efektívnosť liečby. Túto stratégiu predstavuje tzv. biologická liečba (*biological therapy*) monoklonálnymi protilátkami, ktorá sa v prípade metastatického CRC kombinuje s adjuvantnou chemoterapiou. Využíva hlavne inhibítory vaskulárneho endoteliálneho

rastového faktora (VEGF) bevacizumab a epidermálneho rastového faktora (EGFR) cetuximab a panitumumab (Meyerhardt *et al.*, 2005).

Napriek zlepšeniu miery odpovede vďaka modulácii liečebných stratégií akou je kombinácia monoklonálnych protilátok s chemoterapiou, zostáva 5-ročná miera prežitia v prípade pokročilého CRC s metastázami stále veľmi nízka. Jednou z hlavných prekážok je vznik chemorezistencie voči podaným liečivám. Uvádza sa, že takmer polovica pacientov s mCRC je rezistentná voči chemoterapii na báze 5-FU (Douillard *et al.*, 2000).

2.1.6 Účinok oxaliplatiny v liečbe kolorektálneho karcinómu

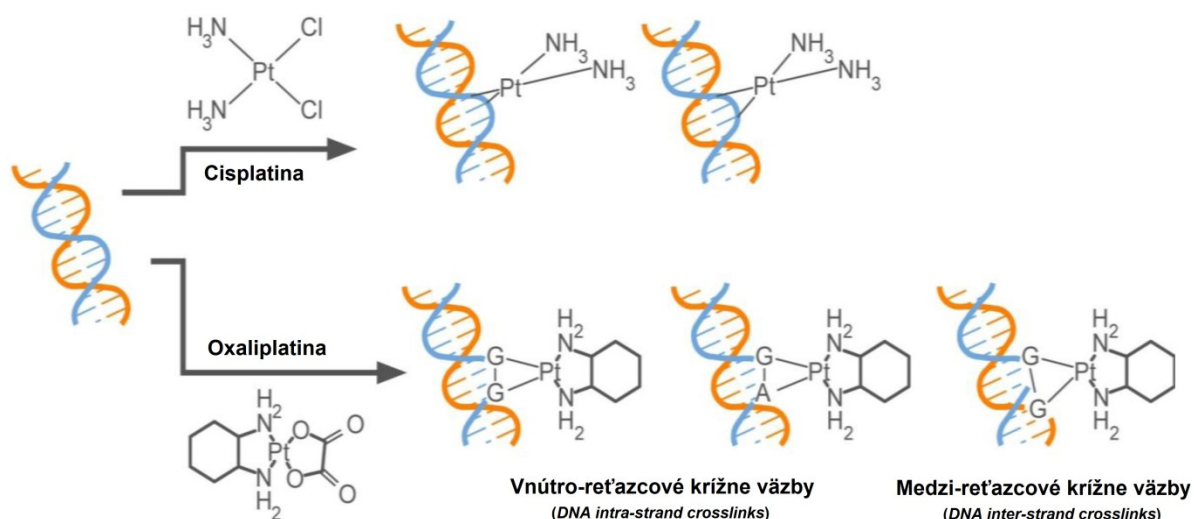
V prvej línii liečby metastatického CRC predstavuje oxaliplatina základné terapeutikum v kombinovanej chemoterapii spoločne s 5-FU a leurovorínom. Vysoká účinnosť kombinácie uvedených terapeutík v porovnaní s indikáciami v monoterapiách bola potvrdená viacerými klinickými skúškami a dnes je štandardne známa pod akronymom FOLFOX (De Gramond *et al.*, 2000).

Oxaliplatina (*oxaliplatin*) je genotoxické cytostatikum, ktoré priamo poškodzuje štruktúru DNA a tým indukuje apoptózu nádorových buniek. Ide o platínový derivát tretej generácie, ktorý vyvinul v roku 1976 profesor Yoshinori Kidani (Raymond *et al.*, 1998). Do klinickej praxe bola zavedená z dôvodu vysokej nefrotoxicity základnej látky – cisplatiny a jej nedostatočnej aktivity voči CRC. Odlišnosť oxaliplatiny spočíva v nahradení amínových funkčných skupín v molekule cisplatiny za diaminocyklohexán (DACH), ktorý je viazaný v komplexe s atómom platiny a oxalátovou skupinou (Obr. č. 3). Mechanizmus účinku cytostatík na báze platiny vedie k poškodeniu DNA, inhibícii replikácie a syntézy RNA a je podobný účinku alkylačných činidiel. Po intravenóznom podaní podstupuje oxaliplatina v krvnej plazme neenzymatickú transformáciu a konverziou oxalátovej skupiny vzniká niekoľko reaktívnych derivátov, z ktorých väčšina je farmakologicky neaktívna. Cytotoxický a protinádorový účinok podmieňuje vznik komplexov monochlór-, dichlór- a dihydrát-DACH zlúčenín platiny, ktoré vstupujú do jadra buniek. Tieto konjugáty vykazujú vysoký tropizmus k oblastiam DNA bohatým na GC bázové páry. Kovalentnou väzbou cez atóm dusíku v pozícii N7 na molekule guanínu sa na DNA formujú mono- a diadukty. V prevažnej miere vznikajú adukty cez prepojenie báz G-G, zriedka tiež G-A (Faivre *et al.*, 2003).

Oxaliplatina indukuje 3 typy krížnych väzieb DNA (Obr. č. 3):

- medzi-reťazcové (*DNA inter-strand crosslinks*)
- vnútro-reťazcové (*DNA intra-strand crosslinks*)
- krížne väzby DNA-proteín

Oxaliplatina je zatiaľ jediný derivát platiny aktívny v terapii CRC. V bunkách CRC po expozícii oxaliplatine dochádza k zástave bunkového cyklu na G2/M prechode a indukcii apoptózy. Apoptotická signálna dráha zahŕňa aktiváciu kaspázy 3, translokáciu proteínu Bax do mitochondrií a uvoľnenie cytochrómu C z mitochondrií do cytosólu (Arango *et al.*, 2004).



Obrázok č. 3: Typy krížnych väzieb medzi reťazcami DNA indukované cisplatinou a oxaliplatinou. (Prevzaté a upravené podľa: Kline *et al.*, 2013)

Významnou prekážkou účinnosti liečby je skutočnosť, že napriek počiatočnej citlivosti buniek CRC si časť z nich nakoniec vyvinie voči oxaliplatine rezistenciu. K bunkovým adaptáciám, ktoré k rozvoju chemorezistencie prispievajú, patrí znížený príjem cytostatika do bunky, inaktivácia glutatiónu a ďalších antioxidantných molekúl a tiež zvýšenie úrovne opráv poškodenej DNA (*DNA repair pathways*) (Martinez-Balibrea *et al.*, 2015).

2.2 Bunkové mechanizmy zodpovedné za opravu DNA

Ľudský organizmus je neustále vystavený spektru exogénnych fyzikálnych a chemických látok, potenciálne poškodzujúcich štruktúru DNA. Okrem environmentálnych a chemických polutantov, ionizujúceho a UV žiarenia významne prispievajú k poškodeniu DNA aj chyby pri replikácii a reaktívne formy kyslíka (*reactive oxygen species*, ROS), ktoré vznikajú ako vedľajší produkt v priebehu vlastného bunkového metabolizmu. Integrita a životaschopnosť buniek bezprostredne závisí od udržania konštantnej stability genómu. Akumulácia veľkého množstva poškodenia DNA často vedie k narušeniu tejto stability a iniciuje procesy súvisiace s kancerogénou (Hoeijmakers, 2009).

Ochranu genetickej informácie buniek zabezpečujú početné reparačné mechanizmy, špecifické podľa typu poškodenia. Mutácie v génoch, ktoré kódujú proteíny reparačných dráh, môžu priamo zodpovedať za rozvoj nádorového ochorenia, alebo prispievať k hromadeniu ďalších genetických zmien (Jackson *et al.*, 2009). Schopnosť nádorových buniek vo vyššej miere rozpoznať poškodenia DNA a aktivovať vybrané reparačné systémy predstavuje jeden z mechanizmov rozvoja terapeutickéj rezistencie a negatívne ovplyvňuje terapeutickú účinnosť (Rodrigues *et al.*, 2012). Avšak skutočnosť, že medzi nádorovými a zdravými bunkami existuje niekoľko rozličných aspektov v odpovedi na poškodenú DNA podporuje využitie konkrétnych štruktúr DNA reparačných systémov ako cieľov protinádorovej terapie (Gavande *et al.*, 2016).

2.2.1 Prehľad základných DNA reparačných dráh

V závislosti od rozsahu a typu poškodenia DNA, ako aj prítomnosti príslušných opravných proteínov, existuje v ľudských bunkách 5 hlavných dráh iniciujúcich opravu DNA:

1. **Priama obnova** (*direct reversal of DNA damage*, DR) poškodených báz alkyláciou je jednostupňový proces, ktorý je riadený O⁶-methylguanín-DNA-methyltransferázou (MGMT), označovanou aj O⁶-alkylguanín-DNA-alkyltransferáza (AGT). Proteín MGMT odstraňuje z modifikovaných báz alkylové skupiny, následne ich prenáša a kovalentne viaže priamo do svojho aktívneho miesta cez cysteínové zvyšky. Výsledkom je ireverzibilná inaktivácia proteínu MGMT a degradácia v proteazóme, takže v prípade opätovnej opravy je potrebná syntéza proteínu *de novo* (Esteller *et al.*, 1999). Ďalšie proteíny, ktoré sprostredkujú priamu obnovu sú ABH2 a ABH3,

homológy dioxygenázy AlkB z *E. coli*. Rovnako ako ich homológ riadia opravu 1-methyladenínových a 3-methylcytozínových rezíduí (Duncan *et al.*, 2002).

- 2. Oprava chybného párovania báz (*mismatch repair*, MMR)** predstavuje post-replikačnú korektúru nesprávne zaradených nukleotidov v molekule DNA. Rozpoznanie nesprávneho párovania zabezpečujú v cicavčích bunkách dva MutS komplexy s odlišnou substrátovou špecificitou. Heterodimér MutS α (MSH2-MSH6) rozpoznáva chybné zaradené bázy (*base-base mismatches*) a krátke inzercie/delécie, naopak heterodimér MutS β (MSH2-MSH3) je schopný rozpoznať len dlhšie inzercie/delécie postihujúce oblasť 2–10 nukleotidov. Druhým dôležitým komplexom je MutL, ktorý má v ľudských bunkách tri heterodimérne formy, MutL α (MLH1-PMS2), MutL β (MLH1-PMS1) a MutL γ (MLH1-MLH3). Rozpoznanie poškodenia komplexom MutS α alebo MutS β vedie v ľudských mitotických bunkách primárne k aktivácii heterodiméru MutL α . Väčšina modelov MMR predpokladá zostavenie komplexu MutS α -MutL α , ktorý napomáha väzbe exonukleázy EXO1 na 5'-koniec poškodenia a odstráneniu poškodeného úseku v smere 5'-3' (Li, 2008). Chýbajúci úsek dosyntetizuje DNA polymeráza δ v spolupráci s kofaktormi PCNA a RFC, ktoré zvyšujú jej procesivitu (Gu *et al.*, 1998). Reparačný proces je ukončený spojením zvyšných medzier DNA ligázou I.
- 3. Bázová excízna oprava (*base excision repair*, BER)** zodpovedá za reparáciu menších abnormalít a modifikácií báz DNA spôsobených alkyláciou, oxidáciou či jednoreťazcových zlomov (*single-strand breaks*, SSBs) (Hedge *et al.*, 2008). Oprava je zahájená rozpoznaním a vyštiepením poškodených báz pomocou proteínov zo skupiny DNA-glykozylázy. U človeka existuje niekoľko typov glykozyláz a každý typ je schopný rozpoznať len určitú formu poškodenia. Po štiepení N-glykozidovej väzby medzi poškodenou bázou a 2'-deoxyribózou vznikajú na molekule DNA apurínové či apyrimidínové miesta (AP-miesta). Fosfodiesterová kostra v AP-miestach je štiepená buď AP-lyázovou aktivitou bifunkčných glykozyláz, alebo AP-endonukleázami za vzniku jednoreťazcových zlomov (*single-strand breaks*, SSBs). Proteíny PARP1 a XRCC1 následne umožnia regrutovať do oblasti poškodenia ďalšie reparačné a chromatín remodelujúce komplexy. DNA polymeráza β vďaka lyázovej aktivite uvoľní 5'-koncový deoxyribofosfát v AP-mieste a zaplní medzeru

po vyštípenom nukleotide. Posledným krokom je spojenie reťazcov buď samotnou DNA ligázou I, alebo DNA ligázou III v komplexe s XRCC1 (Krokan, 2013).

- 4. Nuleotidová excízna oprava** (*nucleotide excision repair*, NER) odstraňuje rozsiahlejšie poškodenia, ktoré narúšajú helikálnu štruktúru DNA a interferujú so správnym párovaním báz. Takými sú diméry cyklopyrimidínu (*cyclobutane pyrimidine dimers*, CPD) a 6-4 fotoprodukty (*photoproducts*, 6-4PP) indukované UV žiarením, adukty aromatických amínov, adukty polycyklických aromatických uhl'ovodíkov či adukty utvorené terapeutickými látkami na báze platiny (Schärer, 2013). U eukaryot možno odlíšiť globálnu genómovú NER (*global genome repair*, GG-NER) a s transkripciou spojenú NER (*transcription-coupled repair*, TG-NER). GG-NER sa uplatňuje v priebehu celého bunkového cyklu a opravuje transkribované aj netranskribované reťazce aktívnych génov. TG-NER je zameraná na poškodenia, ktoré sa vyskytujú v aktívne transkribovaných oblastiach génov a blokujú elongačnú aktivitu RNA polymerázy. GG-NER a TG-NER sa odlišujú v spôsobe detekcie poškodenia, následne však obe aktivujú spoločnú cestu NER. Tá predstavuje vyštípenie 24-32 nukleotidov dlhého úseku pomocou endonukleáz XPG a ERCC1-XPF, zaplnenie ssDNA (*single-strand*) medzery reparačnými DNA polymerázami δ alebo ϵ za prítomnosti proteínov PCNA a RFC a nakoniec zacelenie reťazcov DNA ligázou I (Fagbemi *et al.*, 2011).
- 5. Opravu dvojreťazcových zlomov** (*double-strand break repair*, DSB repair) zabezpečujú v cicavčích bunkách dve významné dráhy:

Homologická rekombinácia (*homologous recombination*, HR) je proces, ktorý využíva homologický nepoškodený DNA reťazec intaktnej sesterskej chromatídy ako templát pre bezchybnú opravu DSBs. Preto k nej dochádza len v prítomnosti novo syntetizovanej sesterskej molekuly DNA, teda počas neskorej S a G2 fázy bunkového cyklu (Heyer *et al.*, 2010). Proces opravy je iniciovaný väzbou sensorického komplexu MRN, ktorý rozpoznáva koncové oblasti DSBs a umožňuje väzbu endonukleázy CtIP. Komplex MRN-CtIP katalyzuje resekciu oboch koncov zlomu tak, že na oboch stranách DSB vznikajú 3'-OH ssDNA presahy (Ciccia *et Elledge*, 2010). Stabilitu ssDNA zabezpečuje väzba proteínu RPA, ktorý je následne v štruktúre RPA-filamentu nahradený rekombinázou Rad51 a vzniká

nukleoproteínový filament. Štruktúra Rad51-filamentu umožňuje jednoreťazcu poškodenej DNA invadovať do homologickej oblasti sesterskej chromatídy druhej intaktnej molekuly DNA a vzniká dočasná triplex-DNA štruktúra označovaná *D-loop*. V konečnej fáze dochádza k syntéze poškodenej časti reťazca od 3'-konca pomocou DNA polymerázy, rozpadu *D-loop* štruktúry a spojeniu oboch koncov ssDNA enzýmom DNA ligáza (Pardo *et al.*, 2009).

Nehomologické spájanie koncov (*non-homologous end-joining*, NHEJ) sa považuje za primárny mechanizmus opráv DSBs v bunkách cicavcov, ktorý sa uskutočňuje hlavne v G0 a G1 fázach bunkového cyklu a nevyžaduje prítomnosť homologickej sesterskej molekuly DNA (Mahaney *et al.*, 2009). Podstata opravy spočíva v spracovaní koncov zlomu a priamej ligácii *end-to-end*, pri tom však môže dôjsť k strate alebo získaniu niekoľkých bázových párov a opravená sekvencia potom často neodpovedá pôvodnej. NHEJ je iniciované väzbou proteínového komplexu, heterodiméru Ku70/80, na oba konce zlomu DNA. Heterodimerný komplex vytvára okolo duplexu DNA kruhovú štruktúru a predpokladá sa, že slúži ako *scaffold* pre zostavovanie kľúčových faktorov NHEJ dráhy. Jedným z prvých je katalytická podjednotka DNA-dependentnej proteínkinázy (DNA-PK_{CS}) v komplexe s nukleázou Artemis, ktorá sa podieľa na úprave koncov. Doplnenie chýbajúcich nukleotidov katalyzujú DNA polymerázy Pol μ a Pol λ a konečnú fázu ligácie riadi komplex proteínov XLF-XRCC4-Lig 4 (Lieber, 2008).

2.2.2 DNA reparačné dráhy v odpovedi na protinádorovú terapiu

Systémy reparácie poškodenej DNA zásadne ovplyvňujú vývoj, progresiu a vo veľkej miere aj terapeutickú odpoveď u mnohých nádorových ochorení. S tým sa spája úsilie potvrdiť možnosť využitia reparačných proteínov a signálnych dráh reparácie ako vhodných terapeutických cieľov a vyvinúť proti nim účinné terapeutické látky (Gavande *et al.*, 2016).

Hlavnými mediátormi signalizácie pri poškodení DNA sú Ser/Thr proteínkinázy z rodiny PIKK (*phosphatidyl inositol 3' kinase-related kinases*). Z nich je kľúčová hlavne proteínkináza ATM, ktorej aktiváciu indukuje prítomnosť DSBs a proteínkináza ATR primárne aktivovaná po rozpoznaní SSBs (Lovejoy *et Cortez*, 2009). Aktiváciou ATM/ATR signalizácie dochádza k fosforylácii veľkého počtu transduktorových a efektorových proteínov, medzi nimi aj tzv. *checkpoint* proteínkináz Chk2 a Chk1. Obe *checkpoint* kinázy rôznymi spôsobmi vedú k obmedzeniu aktivity cyklín-dependentných kináz (CDK) a tým

k zástave bunkového cyklu a oprave poškodenia. Tieto procesy sú typicky výsledkom aktivácie transkripčného faktora p53. Zatiaľ čo v zdravých a prekancerózných bunkách tvorí uvedená signalizácia bariéru pred nekontrolovateľným rastom, vo väčšine nádorových buniek dochádza mutáciami k strate určitých signalizačných komponent a ich prežitie potom závisí od zvyšných nepoškodených reparačných dráh.

Závislosť nádorových buniek od konkrétnych reparačných dráh má terapeutický potenciál a je základom konceptu syntetickej letality. Syntetická letalita je definovaná ako situácia, keď izolovaná mutácia jedného z dvojice génov je kompatibilná so životaschopnosťou buniek, avšak kombinácia mutácií oboch génov je letálna. Terapeutické využitie sa zakladá na predpoklade, že nádorové bunky majú špecifickú mutáciu jedného z dvojice génov danú geneticky. Inaktivácia druhého génu z dvojice je potom docielená farmakologicky, podaním špecifických inhibítorov. Zacielenie génového produktu, ktorý povedie k syntetickej letalite len v bunkách s nádorovo špecifickými mutáciami a „ušetrí“ bunky zdravé predstavuje pre pacientov omnoho šetrnejší spôsob liečby (Reinhardt *et al.*, 2009). Príkladom využitia syntetickej letality v klinickej praxi je aplikácia inhibítorov enzýmu PARP, ktorý sa účastní bázovej excíznej opravy, skupine pacientov s nádormi s deficienciou tumor-supresorových génov *BRCA1* a *BRCA2*, ktoré kódujú proteíny podieľajúce sa na homologickej rekombinácii. Pozitívne výsledky klinických štúdií viedli v roku 2014 k oficiálnemu schváleniu olaparibu (PARP inhibítor) pre liečbu nádorov vaječníkov s mutáciou génov *BRCA* (Kim *et al.*, 2015). Olaparib bol testovaný aj u pacientov s CRC po zlyhaní štandardnej terapie, avšak bez preukázania klinickej účinnosti (Leichman *et al.*, 2016). Nádejné sa zdá byť použitie olaparibu u skupiny pacientov s metastatickým CRC, ktorí majú poruchy v opravách DNA homologickou rekombináciou (Ghiringhelli *et al.*, 2016). Sľubné výsledky tiež priniesla štúdia, ktorá odhalila zvýšenú citlivosť MSH2-deficientných buniek voči metotrexátu. Jeho selektívne letálny účinok spočíval v akumulácii oxidatívneho poškodenia DNA, na ktoré bunky s poruchou MRR (*mismatch repair*) dráhy reagovali horším prežívaním než bunky s funkčným génom *MSH2*. Mutácie v spomínanej reparačnej dráhe navyše súvisia s rezistenciou na 5-FU, ktorý sa používa v štandardnej terapii CRC. Testovanie látok indukujúcich oxidatívne poškodenie, akým je metotrexát, by tak mohlo zvýšiť účinnosť liečby práve u pacientov s MMR-deficientným CRC (Martin *et al.*, 2009).

Druhý terapeutický prístup predstavujú malé molekulárne inhibítory priamo blokujúce aktivitu reparačných proteínov, čím narúšajú základné fyziologické procesy buniek a prispievajú k zvýšenej citlivosti na poškodenie DNA. Účinnosť rady z nich sa dnes

experimentálne testuje a niektoré už dosiahli prvotné fázy klinického testovania (Brown *et al.*, 2017).

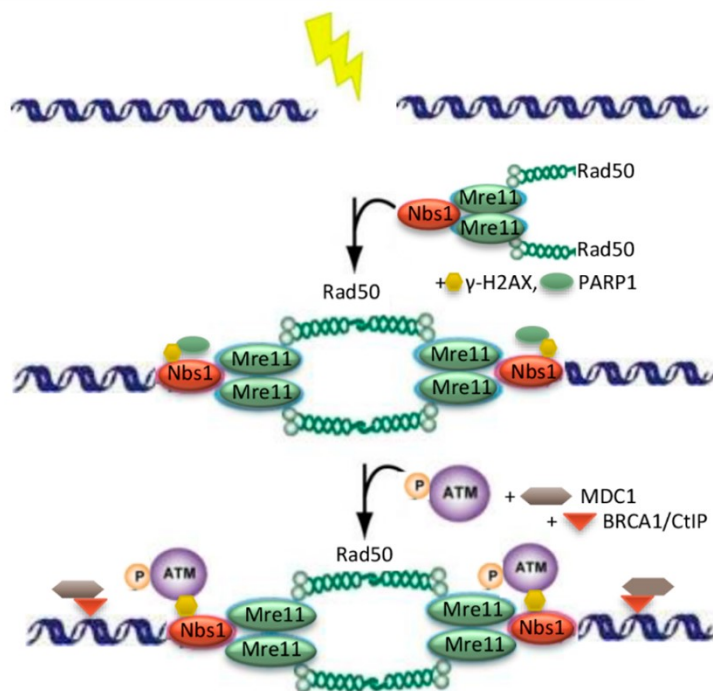
Keďže princíp štandardnej protinádorovej terapie spočíva v indukcii poškodenie DNA je nevyhnuté, aby nádorové bunky v záujme prežitia zvýšili aktivitu tých proteínov, ktoré zabezpečia opravu DNA a udržia stabilitu genómu. Aberantná aktivita reparačných proteínov má však negatívny dopad na terapeutickú odpoveď a je jedným z hlavných spôsobov ako nádorové bunky získavajú chemorezistenciu (Rodrigues *et al.*, 2013). Vyššie uvedené prístupy sú však príslubom nových stratégií, ktoré by mohli napomôcť nielen k prekonaniu chemorezistencie, ale aj celkovo skvalitniť liečbu nádorových ochorení.

2.2.3 Vplyv MRN komplexu na rozvoj nádorov

Heterotrimerný MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) komplex sa uplatňuje v bunkách cicavcov ako senzor DSBs a je dôležitou súčasťou signalizačných dráh vedúcich k oprave tohto typu poškodenia.

MRE11 (*Meiotic Recombination 11*) je vysoko konzervovaný 70-90 kDa proteín, obsahuje Mn^{2+}/Mg^{2+} -dependentnú fosfoesterázovú doménu a dve DNA-väzobné domény. Izolovaný proteín vytvára stabilné diméry, čo mu umožňuje väzbu na DNA a schopnosť prepájať konce DSBs ako aj vykonávať endo- a exonukleázovú aktivitu voči ssDNA a dsDNA. *In vivo* tvorí MRE11 tzv. *core* MRN komplexu spoločne s RAD50, $MRE11_2RAD50_2$. Naň sa potom viaže NBS1 cez MRE11-väzobnú doménu a dopĺňa celkové stechiometrické usporiadanie $MRE11_2RAD50_2NBS1_2$ komplexu. NBS1 zároveň obsahuje FHA doménu a dve BRCT domény, ktorými viaže fosforylované treonínové a serínové zvyšky v Ser-X-Thr motívoch vyskytujúcich sa u väčšiny reparačných proteínov a tým zabezpečuje proteín-proteínové interakcie v mieste DSBs (Lamarche *et al.*, 2010).

Hlavná dráha odpovede na DSBs začína lokalizáciou MRN komplexu do blízkosti poškodenia vďaka prítomnosti špecifickej fosforylovanej formy histónu H2AX, tzv. γ H2AX. Proteín-proteínové interakcie sprostredkované NBS1 umožnia naviazanie neaktívneho diméru proteínkináza ATM, ktorá sa následne autofosforyluje a disociuje ako aktívny monomér. Aktivovaná ATM fosforyluje proteín MDC1, ktorý regrutuje do oblasti zlomu ďalšie molekuly MRN komplexu a zabezpečuje amplifikáciu MRN/ATM signalizácie (Obr. č. 2). Výsledná ATM-dependentná signalizácia je kaskádou udalostí, ktorá vedie k veľkému počtu odpovedí, primárne však k dočasnej zástave bunkového cyklu, čím bunka získava čas na efektívnu opravu DSBs pred vstupom do ďalšej fázy (Lamarche *et al.*, 2010).



Obrázok č. 4: Schéma intermolekulárnych interakcií MRN komplexu v rámci odpovede na poškodenie molekuly DNA po exogénnej zásahu (symbol blesku). (Prenaté a upravené podľa: Situ *et al.*, 2019)

Výsledky štúdií na rôznych typoch nádorových línií naznačujú, že poruchy funkcie MRN komplexu prispievajú k zvýšenej genómovej nestabilite, akumulácii poškodenia DNA a samotnej malígnej transformácii. Kvôli aktívnej účasti pri opravách DSBs môže úroveň expície génov kódujúcich proteíny MRN komplexu ovplyvňovať odpoveď nádorových buniek na chemoterapiu, rádioterapiu a schopnosť podstúpiť apoptózu (Situ *et al.*, 2019).

Yuan *et al.* vo svojej práci preukázali súvislosť medzi vysokou expíciou *MRE11* a malígnym správaním buniek karcinómu prsníka. Vysoká úroveň expície prispievala k zvýšenej miere relapsu, metastázovaniu do okolitých lymfatických uzlín, rezistencii na rádioterapiu a chemoterapiu ako aj zhoršeniu prežívania pacientov. Analýza *in vitro* rovnako ukázala, že vysoká expícia *MRE11* podporovala proliferáciu, invazivitu a migráciu buniek (Yuan *et al.*, 2012). Obdobné výsledky v podpore metastázovania a horšieho prežívania pri zvýšenej expícii *MRE11* spoločne s *ATM* boli pozorované u pacientov s karcinómom konečníka (Ho *et al.*, 2016).

Ďalšie štúdie potvrdzujú, že mutácie *MRE11* zvyšujú náchylnosť na rozvoj CRC a sú časté v primárnych MMR-deficientných CRC. Poškodenie MMR dráhy má za následok mutácie repetitívnej oblasti poly(T)₁₁ v exóne 4 génu *MRE11*, čím dochádza k nesprávnemu zostrihu jeho mRNA a celkovému zníženiu expície (Giannini *et al.*, 2002). Ihara *et al.* sa

zamerali na odpoveď a prognózu pacientov s CRC po terapii oxaliplatinou v súvislosti s expresiou génov kódujúcich proteíny MRN komplexu. Ich záver bol, že pacienti so zníženou expresiou *MRE11* odpovedali citlivejšie na liečbu s vyššou mierou prežívania bez progresie (PFS) a zároveň bola u pacientov zo skupiny „Mre11-negatívni“ pozorovaná intenzívnejšia redukcia veľkosti nádorov (Ihara *et al.*, 2016).

Výraznú úlohu vo variabilite opravných schopnosti zohrávajú taktiež genetické polymorfizmy v génoch reparačných proteínov. Naccarati *et al.* vo svojej štúdií analyzovali jednonukleotidové polymorfizmy v 3' netranslatovanej oblasti mRNA, kam sa typicky viažu krátke regulačné microRNA (*single-nucleotide polymorphisms*, miRSNPs), proteínov aktívnych pri opravách DSBs. Podarilo sa im identifikovať 21 miRSNPs u génov zapojených do reparačných dráh NHEJ a HR v bunkách CRC. Významnú asociáciu odhalili medzi genotypom CC pre gén *MRE11* a zníženým rizikom rozvoja CRC. Z funkčnej štúdie vyplynulo, že nízko riziková alela C súvisí so znížením expresie *MRE11* pravdepodobne vďaka silnejšej väzbe regulačných microRNA (Naccarati *et al.*, 2016).

Vzhľadom na doterajšie dáta a preukázaný úzky vzťah CRC sa uvažuje o využití proteínov MRN komplexu ako potenciálnych cieľoch pre optimalizáciu liečby CRC, prípadne ako biomarkerov pri hodnotení progresie ochorenia a odpovede na liečbu.

2.3 MicroRNA v onkológii

Nekódujúce RNA transkripty (*non-coding RNA*, ncRNA) boli na počiatkoch štúdia považované za evolučne nahromadený genetický odpad, ktorý vznikol pri rannom zostavovaní génov a inzerciách mobilných genetických elementov. Ďalší výskum však odhalil zásadný význam ncRNA pri vývoji, fyziologických či patologických stavoch buniek. V niektorých prípadoch sa odlišná expresia ncRNA považuje za jeden zo znakov malígnej transformácie. V súčasnosti sa ncRNA pokladajú za sľubné diagnostické, prognostické a prediktívne biomarkery nádorových ochorení a zároveň sa uvažuje o ich využití v terapii (Sana *et al.*, 2012).

2.3.1 Definícia a funkcia microRNA

Rozvoj pokročilých čipových a sekvenačných technológií umožňujúcich vysokokapacitnú celogenómovú analýzu viedol k poznaniu, že ľudský transkriptom je komplexný systém, ktorý okrem súboru mRNA (*messenger RNA*) kódujúcich génov a ich zstrihových variant obsahuje aj množstvo *antisense* transkriptov a ďalších typov ncRNA.

NcRNA sa na základe dĺžky člení na dve skupiny (Ma *et al.*, 2013):

- dlhé ncRNA (*long ncRNA*, lncRNA) s dĺžkou nad 200 nukleotidov
- krátke ncRNA (*small ncRNA*, sncRNA) s dĺžkou pod 200 nukleotidov

Najlepšie charakterizovanú a evolučne konzervovanú rodinu krátkych ncRNA tvoria microRNA (miRNA). Podľa databázy miRBase (verzia 22.1 sprístupnená od októbra 2018) do tejto rodiny v súčasnosti patrí celkovo 1917 anotovaných ľudských prekursorových génov, z ktorých vzniká ~ 2654 maturovaných miRNA (Kozomara *et al.*, 2019).

MiRNA literatúra definuje ako krátke, 19-24 nukleotidov (najčastejšie 22 nukleotidov) dlhé nekódujúce endogénne jednoreťazcové RNA, ktoré sa významne podieľajú na regulácii génovej expresie (Slabý *et Sloboda et al.*, 2012). Zohrávajú úlohu pri mnohých bunkových procesoch ako vývoj, diferenciácia, proliferácia, apoptóza, regulácia kmeňových vlastností buniek a imunitného systému či nádorovej transformácii. Počet novo identifikovaných miRNA neustále rastie a vďaka bioinformatickým predikciám možno predpokladať, že miRNA majú v rámci ľudského genómu potenciál regulovať viac než polovicu kódujúcich génov (Friedman *et al.*, 2009). Každá miRNA môže cielene regulovať niekoľko rôznych mRNA a naopak, jednotlivé mRNA môžu byť regulované odlišnými miRNA. Experimentálne

potvrdenie priniesli Wut *et al.* na príklade proteínového inhibítora cyklín-dependentných kináz, p21^{Cip1/WAF1}. Použitím vysokokapacitnej luciferázovej reportérovej eseje preukázali, že sa na mRNA inhibítora môže viazať až 28 rôznych miRNA (Wu *et al.*, 2010).

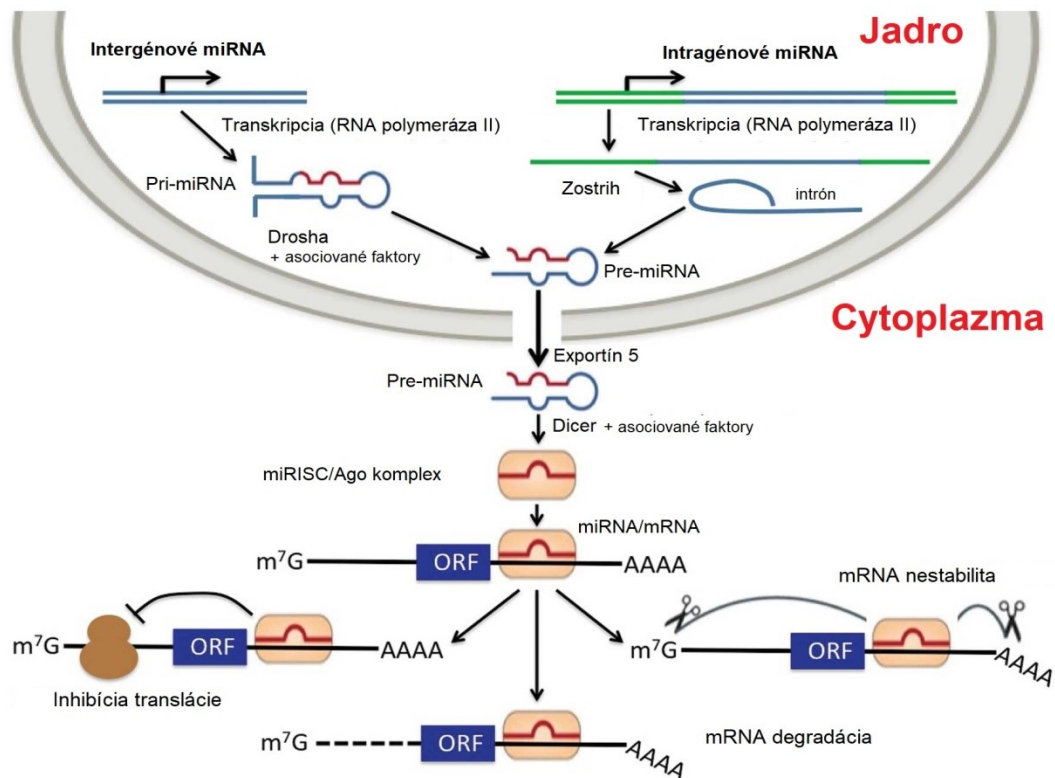
K represii génovej expresie na post-transkripčnej úrovni dochádza zvyčajne sa základe komplementárnej väzby danej miRNA do 3' netranslatovanej oblasti (3' *untranslated region*, 3' UTR) cieľovej mRNA. Interakcia je sprostredkovaná cez tzv. *seed* sekvenciu, ktorej zvyčajne odpovedá 2-7 nukleotidov na 5'-konci molekuly miRNA (Bartel, 2009). V prípade miRNA živočíšnych buniek však bolo experimentálne potvrdené, že sa môžu viazať do 5' UTR a dokonca aj do kódujúcich oblastí mRNA (Ørom *et al.*, 2008). Objav, že miR-373 indukuje génovú expresiu po väzbe do sekvenčnej oblasti promótoru génu pre E-kadherín a CSC2, preukázal schopnosť regulácie aj na úrovni samotnej DNA (Place *et al.*, 2008). Eiring *et al.* zároveň pri analýze miRNA-328 sledovali, že miRNA môže priamo inhibovať aktivitu RNA-väzobných proteínov (*RNA-binding proteins*, RBPs) a definovali tzv. *decoy* aktivitu miRNA. Vďaka oblasti bohatej na cytozín v *seed* sekvencii, miRNA-328 špecificky interaguje s translačným regulátorom hnRNP E2 (*poly(rC)-binding protein*), čím bráni jeho väzbe k cieľovým molekulám mRNA (Eiring *et al.*, 2010).

MiRNA gény sú lokalizované na všetkých ľudských autozómoch a pohlavnom chromozóme X. Prítomnosť na chromozóme Y aj napriek niekoľkým predikciám zatiaľ potvrdená nebola (Ghorai *et Ghosh*, 2014). Zhruba polovica miRNA génov sa v cicavčích bunkách vyskytuje v podobe génových klastrov. V rámci genómu sa môžu miRNA gény nachádzať v medzigénových oblastiach ako monocistronické alebo polycistronické so spoločným promótorom, prepisované do formy klastra transkriptov. Inou skupinou sú miRNA gény z intrónových oblastí kódujúcich génov a génov pre ncRNA. Mirtrony sú špecifické miRNA gény, keď celá intrónová oblasť odpovedá sekvencii vlásenkovej prekurzorovej miRNA a po transkripcii už zväčša nedochádza k žiadnej zostrihovej úprave. Exónové miRNA bývajú lokalizované na prechode exón/intrón, transkribované sú z promótoru hostiteľského génu a postupná maturácia miRNA vedie k inaktivácii transkriptu hostiteľského génu (Olena *et Patton*, 2010).

2.3.2 Kanonický model biogenézy a maturácie

Podľa kanonického modelu biogenézy obsahujú miRNA gény vlastné promótoary, na ktoré nasadá RNA polymeráza II a iniciuje proces transkripcie. Výsledkom sú dlhé primárne transkripty tzv. pri-miRNA, obsahujúce jednu alebo viacej vlásenkových štruktúr, 7-methyl-guanozínovú štruktúru na 5'-konci a polyadenylovaný 3'-koniec (Obr. č. 2). Pri-miRNA podliehajú v jadre enzymatickému štiepeniu, ktorým vznikajú krátke, približne 70 nukleotidov dlhé vlásenkové prekurzorové štruktúry, ozn. pre-miRNA. Štiepenie pri-miRNA je sprostredkované multiproteínovým komplexom, nazývaným mikroprocesor, tvoreným RNAázou III Drosha (*dsRNA specific ribonuclease*) a proteínom DGCR8 (*dsRNA-binding protein*) (Denli *et al.*, 2004). DGCR8 rozpoznáva na molekule pri-miRNA špecifické motívy, napr. GGAC s N6-methyladenozínom. Ribonukleáza Drosha následne štiepi duplex pri-miRNA na báze charakteristickej vlásenkovej štruktúry, čím na 3'-konci pre-miRNA vzniká presah 2 nukleotidov (Alarcón *et al.*, 2015). Tento presah následne rozpoznáva GTP-dependentný transportný proteín Exportín 5, ktorý pomocou proteínu Ran s GTPázovou aktivitou aktívne transportuje pre-miRNA z jadra do cytoplazmy (Okada *et al.*, 2009). Účinkom endonukleázy Dicer v komplexe s proteínom TRBP (*dsRNA-binding protein*) podlieha pre-miRNA v cytoplazme ďalšiemu štiepeniu do podoby maturovaných miRNA duplexov o dĺžke približne 22 nukleotidov. Pri tomto procese sa zároveň rozplieťa dvojreťazcová štruktúra miRNA, jeden z reťazcov interaguje s proteínmi rodiny Argonaute (AGO1-4) za vzniku multiproteínového komplexu miRISC (*miRNA-induced silencing complex*). Dominantný reťazec miRNA* inkorporovaný do komplexu miRISC sa nazýva *guide strand* a jeho výber závisí na termodynamickej stabilite 5'-konca reťazca, prípadne prítomnosti uracilu na 1. nukleotidovej pozícii od 5'-konca (Khvorova *et al.*, 2003). Druhý reťazec tzv. *passenger strand* po uvoľnení podlieha degradácii.

V prípade úplnej komplementarity medzi miRNA s cieľovou mRNA dochádza typicky k degradácii tejto mRNA, ktorú katalyzuje proteín AGO2 komplexu miRISC. Neúplná komplementarita býva spojená s inhibíciou translácie danej mRNA, čo predstavuje hlavný regulačný efekt miRNA v živočíšnych bunkách.



Obrázok č. 5: Schéma kanonickej biogenézy miRNA. (Prevzaté a upravené podľa: Piva *et al.*, 2013)

2.3.3 Deregulácia microRNA v nádoroch

Štúdium miRNA v súvislosti s nádorovými ochoreniami komplikuje genetická diverzita nádorov a nádorových bunkových línií ako aj skutočnosť, že v rámci určitého nádoru väčšinou dochádza k deregulácii viacerých miRNA naraz. V niektorých typoch nádorov môžu byť miRNA *up*-regulované a fungovať ako onkogénny a naopak, u iných dochádza k *down*-regulácii a v tomto prípade sú miRNA považované za tumor-supresory. Takto deregulované miRNA v spojitosti s nádormi sa nazývajú *oncomiRs* (Esquela-Kerscher *et Slack*, 2006).

Jeden z prvých dôkazov priniesol profesor Croce a jeho skupina pri snahe identifikovať tumor-supresory v chromozómovej oblasti 13q14 buniek B-chronickej lymfocytovej leukémie (CLL). Táto často deletovaná oblasť totiž obsahuje gény pre miR-15a a miR-16-1, ktoré sú vo väčšine klinických prípadov CLL *down*-regulované, prípadne úplne neprítomné (Calin *et al.*, 2002). Ďalšia štúdia odhalila, že tumor-supresorová funkcia miR-15a a miR-16-1 spočíva v indukcii apoptózy represiou Bcl-2, anti-apoptotického proteínu, ktorý býva nadmerne exprimovaný v malígnych nedeliacich sa B-bunkách, ako aj v rade solídnych nádorov (Cimmino *et al.*, 2005).

Zmenu expresie miRNA rovnako ako ďalších génov asociovaných s nádormi najčastejšie zapríčiňujú varianty v počte génových kópií a ich lokalizácie. Calin *et al.* preukázali, že sa viac ako polovica (52,5 %) anotovaných ľudských miRNA génov nachádza vo fragilných častiach chromozómov a v tzv. *cancer-associated* oblastiach genómu, podliehajúcich častým mutačným zmenám (Calin *et al.*, 2004).

Vplyv na regulačnú aktivitu miRNA nádorových buniek majú vo veľkej miere mutácie postihujúce miRNA-väzobné miesta na molekulách mRNA. Výskyt sekvenčných variant väzobných miest v 3'UTR oblasti génov je typickým znakom nádorových buniek (Ziebarth *et al.*, 2012). Jednonukleotidové polymorfizmy (*single-nucleotide polymorphisms*, SNP), krátke mutácie či delécie celých 3'UTR oblastí, ku ktorým dochádza pri procese zostrihu mRNA tak bránia väzbe príslušných miRNA (Naccarati *et al.*, 2016).

V nádoroch je celkové zníženie hladiny regulačných miRNA často zapríčinené poruchami biogenetickej dráhy, čo navyše prispieva k zhoršeniu prognózy (Lu *et al.*, 2005). Príkladom je inaktivačná mutácia génu *XPO5* v nádorových líniiach HCT-15 a DLD-1 odvodených od CRC. Dôsledkom mutácie vzniká skrátenejší proteín Exportín 5, ktorý nedokáže exportovať pre-miRNA do cytoplazmy a tak nemôže dôjsť k ich správnej maturácii (Melo *et al.*, 2010).

Deregulácia miRNA v nádoroch je zapríčinená aj epigeneticky, keďže značná časť miRNA génov asocjuje s genómovými oblasťami bohatými na CpG dinukleotidy, tzv. *CpG islands*, podliehajúcimi metylácii DNA (Weber *et al.*, 2007). Saito *et al.* pozorovali, že po simultánnom ošetrení buniek T24 odvodených z nádoru močového mechúra inhibítorami metylácie DNA a acetylácie histónov došlo k niekoľkonásobnej *up*-regulácii 17 z 313 miRNA. Signifikantne zvýšenú expresiu mala hlavne miR-127, ktorej expresia je obecné v nádorových bunkách veľmi nízka. Zvýšenie expresie bolo sprevádzané *down*-reguláciou proto-onkogénu *BCL6*, potenciálneho cieľa miR-127. Autori v závere zhodnotili, že demetylácia DNA a inhibícia histón deacetyláz môže aktivovať expresiu tumor-supresorových miRNA (Saito *et al.*, 2006).

2.3.4 Využitie microRNA v diagnostike a terapii nádorov

Jednotlivým typom nádorov odpovedajú charakteristické expresné profily miRNA, vďaka ktorým sa odlišujú nielen vzájomne, ale aj od zdravého tkaniva. Na základe vybraných profilov možno subklasifikovať väčšinu nádorových ochorení podľa pôvodu, histologického podtypu a prítomnosti onkogénnych mutácií. Z tohto pohľadu predstavujú miRNA

do budúca významný diagnostický a prognostického biomarker pri hodnotení prežívania a odpovede na liečbu (Lu *et al.*, 2005). Potvrdenie prítomnosti miRNA v telových tekutinách ako sérum, plazma a moč navyše umožňuje neinvazívny spôsob detekcie pri včasnej diagnostike nádorov. Navyše sa zdá, že značná tkanivová špecifickosť miRNA by mohla byť účinným nástrojom k identifikácii metastáz neznámeho pôvodu (Rosenfeld *et al.*, 2008).

Inhibícia pro-onkogénnych miRNA (inhibičná stratégia) a obnova funkcie tumor-supresorových miRNA (substitučná stratégia) sú základne princípy využitia miRNA v protinádorovej terapii. Syntézu, maturáciu a aktivitu miRNA možno modulovať použitím syntetických a chemicky modifikovaných oligonukleotidov (Van Rooij *et Kauppinen*, 2014). Za účelom potlačiť patologickú aktivitu endogénnych miRNA boli vytvorené tzv. antagonické miRNA, *anti-miRs*. Zväčša sa jedná o jednoreťazcové oligonukleotidy so sekvenčnou komplementaritou k cieľovej endogénnej miRNA. Ochrana pred nukleázami, zvýšenie afinity k cieľovej miRNA ako aj vylepšenie farmakokinetických vlastností sa dosahuje chemickou modifikáciou cukor-fosfátovej kostry molekúl *anti-miRs*. K stabilizujúcim modifikáciám patrí 2'-O-methylácia, 2'-fluóracia, fosforothioátová väzba či využitie tzv. *Lock Nucleic Acids anti-miRs*. Utlmenie vybraných miRNA možno dosiahnuť využitím tzv. *miRNA sponges*, dlhých transkriptov exprimovaných zo silných promótorov, ktoré obsahujú viacnásobné tandemovo usporiadané väzobné miesta pre požadovanú miRNA (Ebert *et al.*, 2007). Substitučná stratégia je zameraná na miRNA s nízkou hladinou v nádoroch a umožňuje terapeuticky substituovať ich funkciu. Využíva k tomu syntetické dvojreťazcové oligonukleotidy tzv. *miRNA mimics*, ktoré sú sekvenčne totožné a endogénnou miRNA a môžu regulovať identický súbor cieľov. V prípade terapie pacientov s CRC by mohli byť *miRNA mimics* využité k úprave hladiny *down*-regulovaných tumor-supresorových miRNA-26a, miRNA-33a, miRNA-34a či miRNA-145 (Ibrahim *et al.*, 2011). Tento predpoklad podporuje štúdia, v ktorej Ma *et al.* po aplikácii miRNA26a-*mimic* zaznamenali inhibíciu rastu a indukciu apoptózy buniek CRC *in vitro* a zároveň inhibíciu rastu nádorov *in vivo* u myších xenografov (Ma *et al.*, 2011).

Ďalšia významná štúdia riešila možnosť prekonať terapeutickú rezistenciu moduláciou aktivity vybraných miRNA. Cieľom bolo identifikovať rozdiely v expresných profiloch miRNA bunkových línií odvodených od cholangiokarcinómu a nemalígnych cholangiocytov. Bunky cholangiokarcinómu vykazovali vysokú expresiu génu pre miR-21 a miR-200b, ktorých inhibícia následne viedla k zvýšenej citlivosti na cytostatikum gemcitabín (Meng *et al.*, 2006). Predbežné výsledky teda naznačujú potenciál miRNA ako užitočný nástrojom v liečbe nádorových ochorení.

2.3.5 MicroRNA u kolorektálneho karcinómu

Zmeny v expresii génov pre miRNA sú dnes potvrdené aj v súvislosti s rozvojom, progresiou a terapeutickou odpoveďou CRC. Prvá štúdia, ktorá jednoznačne preukázala odlišnosti v expresných profiloch miRNA medzi nádorovým tkanivom a normálnou črevnou sliznicou bola publikovaná v roku 2003. Michael *et al.* v nej opísali *down*-reguláciu dvoch tumor-supresorových miRNA, miR-143 a miR-145 (Michael *et al.*, 2003).

Detekciu miRNA v telových tekutinách ako neinvazívny spôsob diagnostiky ochorenia možno využiť aj pri CRC. V sére pacientov s CRC bolo takto identifikovaných 69 miRNA, ktorých prítomnosť sa nepreukázala v zdravých kontrolách a zároveň sa odhalilo 14 unikátnych expresných profilov obsahujúcich napr. miR-485-5p, miR-361-3p, miR-326 či miR-487b (Chen *et al.*, 2008). Podobným spôsobom bolo odhalených niekoľko ďalších miRNA, ktoré majú špecifickú expresiu a reguláciu v bunkách CRC a do budúca by mohli predstavovať významné biomarkery tohto ochorenia (Hernández *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2018; Balacescu *et al.*, 2018).

V prípade CRC bolo taktiež publikovaných množstvo štúdií, ktoré odhalili vplyv vybraných miRNA na terapeutickú účinnosť a rezistenciu. Príkladom je miR-143, ktorej stabilne zvýšená hladina viedla v bunkách HCT116 k zníženej životaschopnosti a zvýšenej citlivosti na 5-FU (Borralho *et al.*, 2009). Regulácia miR-143 sa ukázala byť rovnako významným faktorom aj v odpovedi na oxaliplatinu. Po zvýšení expresie u línie SW1116 a následnom ošetrení oxaliplatinou bola pozorovaná znížená životaschopnosť buniek a zvýšená úroveň apoptózy (Qian *et al.*, 2013). Aktivita miRNA-203 tiež indikuje chemorezistenciu voči oxaliplatine. Vpravením pre-miR-203 oligonukleotidov do chemosenzitivnej línie HT29 sa zvýšila hladina miR-203 a tým aj odolnosť voči oxaliplatine. Na druhej strane vpravenie *anti*-miR-203 do buniek chemorezistentnej línie HT29-OxR viedlo k zvratu rezistencie a obnoveniu citlivosti na oxaliplatinu (Zhou *et al.*, 2014). Song *et al.* sa vo svojej štúdii zamerali na analýzu onkogénnej miR-140 vo vzťahu k chemorezistencii buniek CRC. Ektopicky zvýšená hladina miR-140 v líni HCT116 (*wt*-p53) viedla k zvýšenej rezistencii voči 5-FU a metotrexátu (MTX), avšak nižší účinok bol pozorovaný v prípade línie HCT116 (*null*-p53). Výsledky analýzy tak naznačili, že vplyv miR-140 na proliferáciu a kontrolu bunkového cyklu je závislý od prítomnosti funkčného proteínu p53 (Song *et al.*, 2009). Na chemorezistencii buniek CRC sa významne podieľajú aj miRNA regulujúce proteíny DNA reparačných dráh. Ako príklad možno uviesť proteín MSH2, kľúčový faktor MMR dráhy a jeho reguláciu prostredníctvom miRNA-21, ktorá indukuje rezistenciu voči 5-FU (Valeri *et al.*, 2010).

Chemorezistencia ostáva naďalej hlavným problémom klinickej liečby pacientov s CRC a je zásadnou príčinou recidívy tohto nádorového ochorenia. Je preto dôležité zvoliť vhodný terapeutický postup pre každého pacienta a predísť tak progresii ochorenia a minimalizovať nepriaznivé účinky. Pribúdajúce dáta podporujú možnosť využitia miRNA k predikcii odpovede na konvenčnú protinádorovú terapiu, čím by sa zároveň dalo predísť neefektívnemu podávaniu terapie pacientom, ktorí na liečbu neodpovedajú, tzv. *non-responders*. Terapia založená na miRNA zároveň môže priniesť nové stratégie, ktoré podporia individualizáciu protinádorovej liečby a tým zlepšia kvalitu života pacientov.

Tabuľka č. 2: MiRNA priamo regulujúce gény reparačných proteínov, ktoré sa podieľajú na opravách dvojreťazcových zlomov (*double-strand breaks*, DSBs). (Pevzaté a upravené podľa: Thapar, 2018)

MiRNA	Regulovaný gén	DNA reparačná dráha
miR-27a, miR-421, miR-101, miR-100, miR-18a, miR-181	<i>ATM</i>	HR
miR-101	<i>DNA-PKcs</i>	NHEJ
miR-124, miR-622	<i>Ku70</i>	NHEJ
miR-623, miR-526b, miR-622	<i>Ku80</i>	NHEJ
miR-1426	<i>LIG4</i>	NHEJ
miR-138, miR-24	<i>γH2AX</i>	HR, NHEJ
miR-182-5p, miR-146a, miR-146b-5p, miR-1255b, miR-148b, miR-193b, miR-99, miR-28, let-7	<i>BRCA1</i>	HR
miR-19a, miR-19b, miR-1255b, miR-148b, miR-193b, let-7	<i>BRCA2</i>	HR
miR-96, miR-193a-3p, miR-506, miR-155, miR-1255b, miR-148b, miR-193B, miR-222, miR-107	<i>RAD51</i>	HR
let-7	<i>FANCD2</i>	HR
miR-210	<i>RAD52</i>	HR
miR-335	<i>CTIP</i>	HR

3. Hypotéza a ciele diplomovej práce

Hypotéza

Hlavná hypotéza vychádza z výsledkov publikovaných v štúdiu Naccarati *et al.* 2016, ktorá pochádza z Oddelenia molekulárnej biológie nádorov na Ústave experimentálnej medicíny AV ČR, v. v. i.. V uvedenej štúdiu bolo identifikovaných niekoľko genetických polymorfizmov génov kódujúcich proteíny podieľajúce sa na oprave dvojreťazcových zlomov a to konkrétne v oblastiach, do ktorých sa viažu regulačné miRNA. Keďže aktivita DNA reparačných dráh má vplyv na terapeutickú odpoveď a prežívanie pacientov s CRC, predpokladáme, že nami identifikované miRNA, ktoré budú asociovať s mRNA určitých reparačných proteínov, umožnia nielen ovplyvniť prežívanie kolorektálnych nádorových buniek, ale aj ich terapeutickú odpoveď po aplikácii oxaliplatinu.

Ciele diplomovej práce

Predložená diplomová práca si kladie za ciele:

- identifikovať miRNA regulujúce expresiu senzorického proteínu MRE11
- určiť vplyv zvýšenej expresie miR-140 na prežívanie kolorektálnych nádorových buniek bez aplikácie a po aplikácii oxaliplatinu
- určiť vplyv zvýšenej expresie miR-140 v kolorektálnych nádorových bunkách so získanou rezistenciou na oxaliplatinu
- validovať získané výsledky na skupine pacientov s kolorektálnym karcinómom

4. Materiál a metódy

4.1 *In silico* analýza microRNA asociujúcich s reparačnými proteínmi

K predikcii microRNA (miRNA), ktorá by mohla cieľiť na mRNA proteínu MRE11 a regulovať jeho hladinu na post-transkripčnej úrovni, bol v rámci *in silico* analýzy použitý online server TargetScanHuman (verzia 7.2 sprístupnené od marca 2018) (Dostupné z WWW: http://www.targetscan.org/vert_72/.) (Agarwal *et al.*, 2015). Zároveň bol použitý online výpočtový model SMiR-NBI (*Small Molecule-miRNA Network-Based Inference model*) (Dostupné z WWW: <http://lmm.ecust.edu.cn/database/smir-nbi/>.), ktorý umožňuje predikovať asociáciu miRNA a malých molekúl používaných pri terapii nádorov, čo napomáha farmakogenetickým štúdiám pri hľadaní súvislosti medzi variabilitou terapeuticko-odpovede vybraných genetických markerov na úrovni DNA a zmenou expzie génov kódujúcich miRNA v nádorových tkanivách s následne možným ovplyvnením podávanej terapeuticko-odpovede látky (Li *et al.*, 2016).

4.2 *In vitro* funkčná analýza

4.2.1 Nádorové bunkové línie

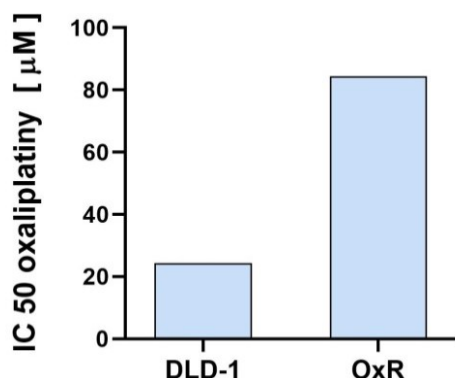
Na *in vitro* funkčnú analýzu študovanej miRNA boli použité nádorové bunkové línie DLD-1, HCT116 a HT29 odvodené od kolorektálneho karcinómu. Na sledovanie vplyvu zvýšenej expresie danej miRNA na rezistenciu voči chemoterapeutiku oxaliplatine bola použitá línia OxR vykazujúca získanú čiastočnú rezistenciu.

- DLD-1, HCT116, HT29

Ľudské nádorové bunkové línie (ATCC®, USA) odvodené od kolorektálneho adenokarcinómu dospelých mužských jedincov (DLD-1, HCT116) a 44-ročnej ženy (HT29). Línie majú jednotnú morfológiu epitelového typu. Z hľadiska rastových a kultivačných podmienok ide o adherentné bunkové línie. Línie pre experimentálne účely poskytol RNDr. Ladislav Anděra (BIOCEV, Praha).

- OxR – varianta línie DLD1 rezistentná voči oxaliplatine

Línia čiastočne rezistentná voči oxaliplatine bola vytvorená na Oddelení molekulárnej biológie nádorov (ÚEM AV ČR, v. v. i.) v spolupráci s Mgr. Janou Slyškovou, Ph.D. (Erasmus University Medical Center Rotterdam, Holandsko). OxR línia bola odvodená od štandardnej kolorektálnej bunkovej línie DLD-1 postupným zvyšovaním dávky oxaliplatiny podľa postupu Dr. Helen M. Coley (Coley, 2004). Rezistentná línia OxR má IC₅₀ 84,46 μM, zatiaľ čo DLD-1 línia len 24,28 μM (Obr. č. 6).



Obrázok č. 6: Hodnoty IC₅₀ oxaliplatiny u DLD-1 a OxR línie. U rezistentnej línie OxR odpovedá IC₅₀ hodnote 84,46 μM a v prípade línie DLD-1 hodnote 24,28 μM.

4.2.2 Kultivácia, pasážovanie, počítanie a nasedenie buniek

Kultivácia

Kultivácia buniek nádorových línií prebiehala v kultivačnom médiu, ktorého základ tvorilo tekuté DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) s fenolovou červeňou. Používané bolo DMEM (Sigma-Aldrich®, Anglicko) s glukózou v koncentrácii 4500 mg/l, L-glutamínom, pyruvátom sodným a hydrogénuhličitanom sodným. Keďže základné médium neobsahuje žiadne proteíny, rastové faktory či hormóny dôležité pre rast buniek a kultiváciu *in vitro*, bolo potrebné ich dodať v podobe fetálneho bovinného séra (FBS) (Biosera, Francúzsko). K prevencii bakteriálnej kontaminácie bolo kultivačné médium doplnené o beta-laktámové a aminoglykosidové antibiotiká Penicilín-Streptomycín (Biosera, Francúzsko) vo výslednej koncentrácii 1mM (Tab. č. 3).

Rutinná kultivácia buniek prebiehala v uzavretých Petriho miskách (priemer 10 cm) v termostate (Thermo Scientific Forma® 310 Direct Heat CO₂ Incubator, USA) pri teplote 37 °C a 5,5% CO₂.

Tabuľka č. 3: Reagencie a objemy použité k príprave kompletného kultivačného média.

Zloženie kompletného kultivačného média		Alikvoty na prípravu 50 ml média
Tekuté médium DMEM	450 ml	45 ml
FBS	50 ml	5 ml
Penicilín-Streptomycín	5 ml	0,5 ml

Pasážovanie

Pasážovaniu buniek predchádzala mikroskopická kontrola úrovne konfluencie (pokrytie kultivačného povrchu), ktorá v ideálnom prípade odpovedá 70-80 %.

Kompletné kultivačné médium, sterilný PBS pufer (Sigma-Aldrich®, USA) a 0,25% roztok Trypsin-EDTA (Biosera, Francúzsko) boli zohriate vo vodnom kúpeli (Memmert WNB 14, Nemecko) na teplotu 37 °C. Práca s bunkovými líniami prebiehala vždy v sterilnom laminárnom boxe (Thermo Scientific MSC-Advantage™ Class II Cabinet, USA). V prvom kroku bol z kultivačnej misky odsatý objem pôvodného média a povrch bol premytý 4 ml sterilného PBS pufru. Po odsatí pufru bol povrch misky premytý 1 ml 0,25% roztoku Trypsin-EDTA. Väčšina objemu trypsinu bola odsatá a zvyšný objem sa nechal pôsobiť na adherentné bunky po dobu 2-4 min v termostate. Po trypsinizácii boli uvoľnené bunky resuspendované

v 10 ml kompletného kultivačného média, čím sa zároveň inaktivoval zvyšný trypsín. Podľa hustoty buniek sa suspenzia riedila pre ďalšiu kultiváciu (nová pasáž), najčastejšie v pomere 3 ml bunkovej suspenzie k 7 ml kompletného média DMEM. Každá nová kultivačná miska bola riadne popísaná (typ bunkovej línie, dátum posledného pasážovania, poradie pasážovania, iniciály experimentátora).

Počítanie a nasadenie buniek

Jednotlivé funkčné testy vychádzali z konkrétnych koncentrácií použitej bunkovej suspenzie. Po pasážovaní bolo stanovené množstvo buniek na 1 ml základnej suspenzie pomocou počítania v Bürkerovej komôrke. Adherentné bunky boli spracované podľa postupu uvedeného v časti Pasážovanie. Následne bolo do mikroskúmavky prenesených 20 µl bunkovej suspenzie a premiešaných s 20 µl 0,4% roztoku trypanovej modrej (Sigma-Aldrich®, Nemecko), malé množstvo bunkovej suspenzie bolo nanosené na mriežky Bürkerovej komôrky a pod mikroskopom (Leica DMi1, Čína) spočítané. Roztok trypanovej modrej zároveň odfarbuje na modro mŕtve bunky, ktoré sa do výsledného množstva nezapočítavajú. Podľa počtu buniek bola vypočítaná ich koncentrácia v 1ml kultivačného média. Zo zistenej koncentrácie bolo vypočítané potrebné riedenie. Vhodne nariadená suspenzia bola nasadená v požadovaných objemoch do kultivačných platničiek (Tab. č. 4).

Tabuľka č. 4: Použité objemy a počet buniek pre jednotlivé funkčné testy.

Funkčný test	Kultivačná platnička	Objem suspenzie na jamku [µl]	Počet buniek na jamku
Analýza proliferácie pomocou WST-1 Reagent	96-jamková	100	40 000
Analýza proliferácie metódou CFA	6-jamková	2 000	500
Analýza poškodenia DNA	24-jamková	50	40 000
Analýza bunkového cyklu	6-jamková	2 000	1 000 000
Analýza expresie Mre11 a miR-140	6-jamková	2 000	500 000
Proteínová analýza	6-jamková	2 000	500 000

4.2.3 Transfekcia a ošetrovanie buniek

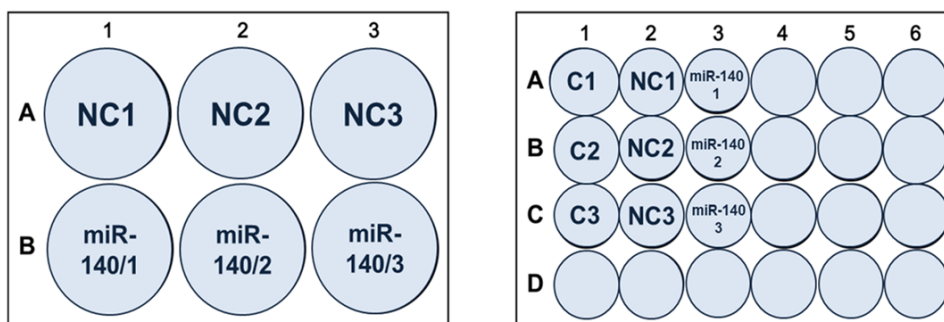
Tranzientná transfekcia pomocou lipofektamínu

Pre sledovanie vplyvu zvýšenej expzie miR-140 boli do DLD-1 a OxR buniek tranzientnou transfekciou pomocou Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen, Litva) vpravené oligonukleotidy hsa-miR-140-3p miRNA *mimic* (Ambion, USA). Ako kontrola (C) boli pri testovaní použité bunky bez ovplyvnenia, tzv. netransfekované. Zároveň bola pripravená negatívna kontrola (NC), keď sa časť buniek transfekovala Negative Control miRNA *mimic* (Ambion, USA), zmesou náhodných sekvencií miRNA molekúl, ktorá nemá vplyv na aktivitu endogénnych miRNA. NC slúžila k overeniu, či samotné transfekčné reagenty nemali vplyv na fenotyp buniek. Transfekcia bola vždy prevedená podľa štandardného protokolu doporučeného výrobcem, ktorý bol optimalizovaný na Oddelení molekulárnej biológie nádorov (ÚEM AV ČR, v. v. i., Praha). Podľa spôsobu kultivácie buniek boli stanovené odpovedajúce množstvá transfekčných reagentov (Tab. č. 5). Každá transfekcia bola vykonaná v troch nezávislých opakovaní (Obr. č. 7).

V jednej mikroskúmavke so základným médiom DMEM bolo nariadené transfekčné činidlo Lipofectamine® RNAiMAX a v druhej oligonukleotidy hsa-miR-140-3p *mimic* na výslednú koncentráciu 20 pmol. Postup bol zopakovaný pre Negative Control *mimic*. Obsah mikroskúmaviek s lipofektamínom bol prenesený do oboch skúmaviek s *miRNA mimic*. Nasledovala inkubácia transfekčných zmesí pri laboratórnej teplote po dobu 20 min, po ktorej bola transfekčná zmes v odpovedajúcich množstvách pridaná do média v kultivačných platničkách (Tab. č. 5). Úspešnosť transfekcie bola overená pomocou qPCR v reálnom čase podľa postupu uvedenom v časti **4.2.5. Kvantitatívna PCR v reálnom čase**.

Tabuľka č. 5: Použité množstvá transfekčných reagentov podľa kultivačných podmienok.

Kultivačná platnička	Objem transfekčnej zmesi na jamku [μl]	Zmes lipofektamínu		Zmes oligonukleotidov <i>miRNA mimic</i>	
		Médium DMEM [μl]	Lipofectamine® RNAiMAX [μl]	Médium DMEM [μl]	MiRNA <i>mimic</i> [μl]
6-jamková	~ 250	240	4,8	240	0,96
24-jamková	~ 50	50	1,0	50	0,2



Obrázok č. 7: Ilustračná schéma nasadzovania buniek do 6-jamkovej a 24-jamkovej kultivačnej platničky a spôsob transfekcie v troch nezávislých opakovaniach.

Ošetrovanie buniek oxaliplatinou

Za účelom analýzy odpovede chemosenzitivnej línie DLD-1 a chemorezistentnej línie OxR na oxaliplatinu bola na bunky po 24 hod od transfekcie *miRNA mimic* aplikovaná oxaliplatina. Základný roztok oxaliplatiny odpovedal koncentrácii 10 mM v 100% DMSO (Sigma-Aldrich®, USA). Ten sa riedil do kompletného kultivačného DMEM média, aby vo výslednom objeme pridávanom do jednotlivých jamiek bola koncentrácia oxaliplatiny 5 μ M. Daná koncentrácia zodpovedá IC₂₀, vypočítanej na základe IC₅₀ pomocou programu GraphPad Prism 8.1.2 (332) (verzia sprístupnená od mája 2019) (GraphPad Software, USA).

4.2.4 Hodnotenie bunkovej proliferácie, viability a cytotoxicity

Analýza bunkovej proliferácie pomocou WST-1 Reagent

Proliferácia buniek bola hodnotená pomocou WST-1 reagentu (Roche, Nemecko). Princípom metódy je, že metabolicky aktívne bunky dokážu na základe aktivity mitochondriálnych dehydrogenáz (EC 1.3.99.1) redukovať stabilnú tetrazóliovú soľ WST-1 na farebný produkt formazán rozpustný v kultivačnom médiu, čím sa mení zafarbenie média. Množstvo formazanového produktu potom priamo koreluje s počtom metabolicky aktívnych buniek v suspenzii.

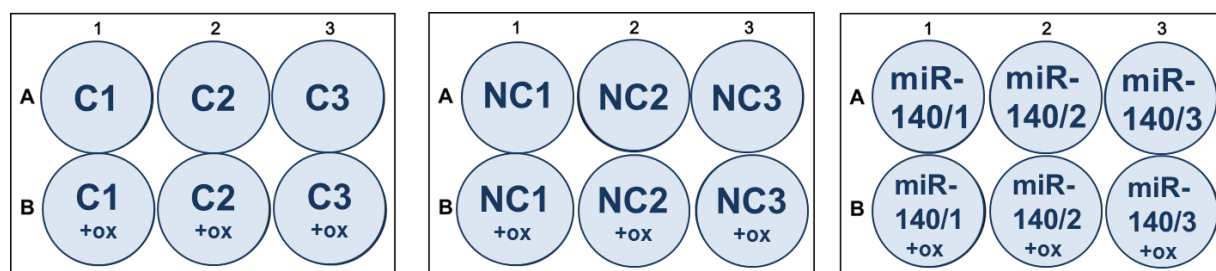
Bunková proliferácia bola hodnotená v čase 24, 48 a 72 hod. Do jamiek na 24-jamkovej doštičke bolo pridaných po 50 μ l WST-1 reagentu, tento objem odpovedal 1/10 objemu v jamkách. Nasledovala inkubácia buniek v termostate pri 37 °C po dobu 45 min. Po inkubácii bolo z každej jamky odobraných 3-krát po 100 μ l média a prenesených do 96-jamkovej platničky. Pripravená 96-jamková platnička bola vložená do absorbančného readra (BioTek ELx808, USA), ktorý meral absorbanciu vzoriek pri vlnovej dĺžke 450 nm

(max. absorbanca formazánu) a 690 nm (referenčná vlnová dĺžka, pri ktorej má WST-1 reagent a formazán rovnakú absorbanciu). K spracovaniu nameraných dát bol použitý program BioTek Gen5™ Data Analysis (BioTek, USA). Postup merania bol modifikovaný podľa Šána *et Slabý et al.*, 2017.

Hodnotenie viability buniek metódou CFA (*Colony forming assay*)

Klonogénna analýza sa používa k hodnoteniu úspešnosti dlhodobého prežívania buniek pri *in vitro* kultivácii bez a s analyzovanými terapeutikami. Je založená na schopnosti jednej bunky dať základ bunkovej kolónii s minimálnym počtom 50 buniek. Metódou sa teda hodnotí životnosť a klonogénny potenciál pôvodne jednotlivých buniek pri vytváraní kolónií.

Suspensia DLD-1 a OxR buniek bola kultivovaná na 6-jamkových kultivačných platničkách. Bunky oboch línií boli nasadené v troch nezávislých opakovaniach, takže každá línia bola samostatne nasadená na tri platničky (Obr. č. 8). Po 24 hod kultivácie v termostate boli bunky transfekované *miRNA mimic*. Po 24 hod od transfekcie bolo prevedené ošetrovanie časti buniek oxaliplatinou. Oba postupy sú uvedené v časti **4.2.3. Transfekcia a ošetrovanie buniek**. Druhý deň po ošetrovaní bolo vymenené kultivačné médium za nové kompletne kultivačné médium. Nasledovala 12-dňová kultivácia v termostate pri štandardných kultivačných podmienkach, počas ktorej rástli bunkové kolónie. Na 12. deň od ošetrovania bolo odsaté médium a povrch kultivačných doštičiek 2-krát premytý 1 ml PBS pufru. Adherentné kolónie boli fixované v 1 ml 3% roztoku formaldehydu (Penta, Czech Rep.) po dobu 20 min. Po odsatí formaldehydu nasledovalo 2-násobné premytie 1 ml PBS pufru. Fixované kolónie boli farbené v 1 ml 0,1% roztoku kryštálovej violete (Sigma-Aldrich®, USA) po dobu 20 min. Po odsatí farbiva nasledovalo posledné 2-násobné premytie 1 ml PBS pufru a manuálne počítanie kolónií.



Obrázok č. 8: Ilustračné schéma nasadenie buniek pri troch nezávislých opakovaniach. Zobrazeným spôsobom boli nasadené bunky línií DLD-1 a OxR pri klonogénnej analýze CFA.

Hodnotenie cytotoxicity meraním aktivity adenylát kinázy

Adenylát kináza (EC 2.7.4.3) je abundantný enzým zapojený do energetického metabolizmu a udržovania homeostázy adenínových nukleotidov v rozličných bunkových kompartmentoch. Vyskytuje sa v bunkovom jadre, cytosóle, medzimembránovom priestore a matrix mitochondrií. Bunková smrť a cytotoxicita sa štandardne hodnotí kvantifikáciou poškodenia plazmatickej membrány a mitochondrií buniek. V tomto prípade bola cytotoxicita analyzovaná prostredníctvom aktivity enzýmu adenylát kináza, ktorý je poškodenými bunkami uvoľňovaný do kultivačného média. Vplyv samotnej miR-140 ako aj jej kombinácie s oxalipaltinou na DLD-1 a OxR líniu sa meral pomocou Adenylate Kinase Assay Kit (Abcam, Anglicko).

K 50 μ l kultivačného média napipetovaného v bielej nepriesvitnej 96-jamkovej platničke bolo pridaných 50 μ l AK reagenta (Abcam, Anglicko). Nasledovala inkubácia v tme pri laboratórnej teplote po dobu 15 min. Po inkubácii bola meraná luminiscencia vzoriek (BioTek ELx808, USA).

4.2.5 Kvantitatívna PCR v reálnom čase

Na stanovenie endogénnej hladiny miR-140 v kolorektálnych líniiach DLD-1, HCT116, HT29, testovanie úspešnosti tranzientnej transfekcie a vplyvu zvýšenej hladiny miR-140 na expresiu génu študovaného proteínu MRE11 u DLD-1 a OxR línie bola využitá metóda reverznej transkripcie (RT) s následnou kvantifikáciou expresie pomocou kvantitatívnej PCR (qPCR) v reálnom čase. qPCR je založená na princípe jednoduchej polymerázovej reťazovej reakcie. Zásadnou výhodou je, že vďaka priebežnému hodnoteniu intenzity fluorescenčného signálu počas amplifikácie je možné kvantifikovať množstvo DNA v reakcii.

Izolácia RNA a reverzná transkripcia (RT)

Na stanovenie endogénnej hladiny expresie génu pre miR-140 v testovaných kolorektálnych nádorových líniiach bola RNA izolovaná pomocou miRNeasy® Mini Kit (50) (Qiagen, Nemecko), podľa protokolu doporučeného výrobcem. Použitý protokol umožnil izoláciu celkovej RNA vrátane miRNA.

Rovnaký postup bol využitý k izolácii miRNA pri testovaní úspešnosti tranzientnej transfekcie.

Pre analýzu expresie génu *MRE11* po experimentálnom navýšení hladiny miR-140 boli DLD-1 a OxR bunky nasadené na 6-jamkové kultivačné platničky a transfekované podľa

postupu uvedeného v časti **4.2.3. Transfekcia a ošetrovanie buniek**. Vplyv miR-140 na expresiu *MRE11* bol sledovaný v čase, preto boli vzorky postupne pripravené po 24 hod, 48 hod a 72 hod od transfekcie. Každá vzorka bola pripravená v troch nezávislých opakovaníach. RNA zo vzoriek bola izolovaná opäť pomocou miRNeasy® Mini Kit (50), podľa protokolu doporučeného výrobcom.

Výsledná koncentrácia a čistota vyizolovaných RNA bola meraná pomocou spektrofotometra (Thermo Scientific NanoDrop 2000, USA).

Za účelom reverznej transkripcie (RT) cieľových miRNA do podoby cDNA bol použitý High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems™, USA) spolu so špecifickými primermi pre miR-140 TaqMan® MiRNA Assays (Applied Biosystems™, USA). Pre stanovenie endogénnej hladiny miR-140 v bunkách DLD-1, HCT116 a HT29 boli vzorky vyizolovanej RNA nariadené Nuclease-free H₂O do objemu 5 µl. K nariadeným vzorkám RNA bolo pridaných po 5 µl pripravenej reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu (Tab. č. 6). Výsledný objem jednotlivých reakcií bol 10 µl s RNA v koncentrácii 40 ng/µl. K analýze úspešnosti tranzientnej transfekcie buniek a expresie *MRE11* bola vyizolovaná RNA všetkých vzoriek spracovaná rovnakým spôsobom ako vzorky pri stanovení endogénnej hladiny mir-140. Rozdiel bol len v celkovom objem reakcií, ktorý odpovedal 20 µl s RNA v koncentrácii 15 ng/µl. Pripravené vzorky boli umiestnené do termocykléra (MJ Research Gradient Thermal Cycler PTC-200, USA), v ktorom prebehol samotný proces reverznej transkripcie. Po reverznej transkripcii boli vzorky cDNA nariadené v pomere 1:1 s Nuclease-free H₂O.

Tabuľka č. 6: Reakčná zmes na reverznú transkripciu pre celkový objem reakcie 10 µl.

Reagencie	Objem na jednu reakciu [µl]
10x RT Buffer	1
dNTP Mix (100 mM)	0,4
TaqMan® MiRNA Assays primers	1
Nuclease-free H ₂ O	2,1
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)	0,5
Spolu	5
Celkový objem reakcie s riedenou RNA	10

Kvantitatívna PCR v reálnom čase

K všetkým prevádzaným analýzám pomocou qPCR v reálnom čase bol použitý TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™, USA) a technológia TaqMan® MiRNA Assays. K normalizácii výsledkov boli ako referenčný gén k miR-140 použité malé jadrové RNA, *RNU6B* a *RNU48*. Použitým referenčným génom k hodnoteniu expresie *MRE11* bol *GAPDH*.

Reakčné zmesi pre qPCR boli pripravené pre všetky analyzované gény rovnako, líšili sa len v použitých primeroch (Tab. č. 7). Pripravené reakčné zmesi boli do 96-jamkovej mikrotitračnej platničky rozpipetované po 18 µl a k nim boli pridané 2 µl cDNA testovaných vzoriek. Každá vzorka bola nanosená na platničku v triplicate. Celkový objem reakcie na jamku odpovedal 20 µl. Po napipetovaní všetkých vzoriek bola platnička prelepená adhezívnou fóliou, vložená do Real-Time PCR termocykléra (Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System, USA) a v programe 7500 Real-Time PCR System Sequence Detection Software (Applied Biosystems™, USA) boli nastavené podmienky amplifikácie a teplotného profilu (Tab. č. 8).

Tabuľka č. 7: Zloženie reakčnej zmesi pre qPCR v reálnom čase.

Reagencie	Objem na jednu reakciu [µl]
Universal PCR Master Mix	10
Primery	1
Nuclease-free H ₂ O	7
Spolu	18
Celkový objem reakcie s riedenou cDNA	20

Tabuľka č. 8: Teplotný profil qPCR v reálnom čase.

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklov
Stage 1	50	2	40 cyklov
Stage 2	95	10	
Stage 3	95	0,25	
	60	1	

4.2.6 Proteínová analýza

U buniek DLD-1 bolo sledované, či po experimentálnom zvýšení hladiny miR-140 dochádza k ovplyvneniu proteínov MRE11, RAD51, a γ H2AX. Ako endogénna kontrola bol použitý proteín GAPDH. Detekcia vybraných proteínov bola metodicky prevedená pomocou elektroforetickej separácie za denaturačných podmienok a techniky Western blot.

Izolácia proteínov a stanovenie ich koncentrácie

K izolácii proteínov z buniek bol použitý 10x RIPA lyzačný pufer (Sigma-Aldrich®, USA). Pred použitím boli k potrebnému objemu RIPA pufru pridané inhibítory proteáz (Roche, Nemecko) v pomere 20 μ l roztoku inhibítorov na 1 ml pufru. Po 48 hod od transfekcie bolo z kultivačného povrchu 6-jamkových platničiek, ktoré boli pripravené v troch nezávislých opakovaniach, odsaté médium a povrch bol premytý PBS pufrom. Platničky boli umiestnené na suchý ľad a do každej jamky bolo pridaných 60 μ l lyzačného pufru. Adherentné bunky boli šetrne zoškrabané z kultivačného povrchu, prenesené do mikroskúmaviek a na 15 min umiestnené do suchého ľadu. Obsah skúmaviek bol rozpustený pri laboratórnej teplote a skúmavky boli umiestnené na ľad po dobu ďalších 20 min, aby došlo k lýze bunkových membrán. Vzorky boli scentrifugované pri 20 000 \times g po dobu 20 min a 4 °C. Odobratý supernatant bol prenesený do čistých mikroskúmaviek. Takto pripravené proteínové vzorky mohli byť uchovávané pri -80 °C.

Koncentrácia vyizolovaných proteínov bola zistená metódou Bradford Protein Assay (Sigma-Aldrich®, USA). Tá je založená na reakcii proteínov s detekčným činidlom Bradford Reagent (Sigma-Aldrich®, USA), ktoré priamo reaguje s určitými aminokyselinami vo vzorkách. Výsledkom reakcie je farebný produkt, ktorého intenzitu možno určiť spektrofotometricky, meraním absorbancie pri vlnovej 630 nm. Koncentrácia proteínov bola určená tak, že spoločne s analyzovanými vzorkami bola prevedená reakcia so vzorkami (štandardmi) o známej koncentrácii, konkr. s riedenou radou roztoku bovinného sérového albumínu (BSA) (BioRad Quick Start™ BSA Standart Set, USA). Koncentrácia proteínov v analyzovaných vzorkách bola následne stanovená porovnaním hodnôt absorbancie jednotlivých vzoriek s kalibračnou krivkou zostavenou z hodnôt absorbancie štandardov.

Elektroforetická separácia

Proteíny boli rozdelené podľa elektroforetickej pohyblivosti pomocou diskontinuálnej elektroforézy za denaturačných podmienok v polyakrylamidovom géli (SDS-PAGE). Vlastnému deleniu proteínov predchádzala príprava zaostrovacieho (*stacking gel*)

a rozdeľovacieho gélu (*resolving gel*) (Tab. č. 9 a 10). Po zatuhnutí boli gély upevnené do elektroforetickej aparatury vo vertikálnom usporiadaní a zaliate elektródovým pufrom (1x EP) (Tab. č. 12).

Tabuľka č. 9: Zloženie rozdeľovacích gélov použitých pri SDS-PAGE.

Reagencie	Množstvo	
	10% PAA gél	12% PAA gél
H ₂ O	4.02 ml	3.4 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2.5 ml	2.5 ml
30% Acryl/Bis-acryl	3.33 ml	4.0 ml
10% SDS	100 µl	100 µl
10% APS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Spolu	10 ml	10 ml

Tabuľka č. 10: Zloženie zaostrovacieho gélu použitého pri SDS-PAGE.

Reagencie	Množstvo
H ₂ O	3.675 ml
1 M Tris-HCl, (pH 6,8)	0.625 ml
30% Acryl/Bis-acryl	0.65 ml
10% SDS	50 µl
10% APS	25 µl
TEMED	5 µl
Spolu	5 ml

Proteínové vzorky boli riedené v pomere 1:1 s 2x SDS-PAGE nanášacím pufrom (Tab. č. 11) a vložené do termobloku (Major Science Dry Bath Incubator, Taiwan) vyhriateho na 95 °C na 5 min, počas ktorých došlo k denaturácii sekundárnej štruktúry proteínov. Následne boli vzorky nanesené na gél v objemoch, ktoré odpovedali množstvu 40 µg proteínov. Elektroforetická separácia prebiehala pri konštantnom prúde 12 mA na gél po dobu približne 60 min.

Tabuľka č. 11: Príprava 4x SDS-PAGE nanášacieho pufra.

Reagencie	Množstvo	Výsledná koncentrácia
1,5 M Tris-HCl, (pH 6,8)	4 ml	300 mM
SDS	3 g	15%
Glycerol	9 ml	45%
β -Merkaptoethanol (14,2 M)	5ml	25%
Brómfenolová modrá	0.02g	0.1%
dH ₂ O	2ml	
Spolu	20 ml	

Western blot a vizualizácia proteínov

Proteíny boli po elektroforetickej separácii prenesené z rozdeľovacieho gélu na nitrocelulóзовú membránu technikou Western blot. Rozdeľovací gél z SDS-PAGE, nitrocelulóзовá membrána a filtračné papiere boli 15 min ekvilibrované v transferovom pufri (1x TP) (Tab. č. 12). Následne bola vyskladaná blotovacia kazeta, vložená do blotovacieho modulu v elektroforetickej komore a zaliata odpovedajúcim množstvom transferového pufra. Vlastný prenos proteínov z gélu na membránu prebiehal pri konštantnom napätí 80 V po dobu 90 min. Po vypnutí zdroja napätia bola blotovacia jednotka rozobraná a membrána s proteínmi prenesená do roztoku Ponceau S (Sigma-Aldrich®, USA) na overenie úspešnosti prenosu proteínov. Membrána bola premytá 3-krát po 5 min v TBS-T pufri (Tab. č. 12) a následne prenesená do blokovacieho 5% roztoku BSA (Sigma-Aldrich®, USA) v TBS-T po dobu 1 hod. Po uplynutí času potrebného na zablokovanie nešpecifických väzieb bola membrána inkubovaná s primárnymi protilátkami (Tab. č. 13) pri teplote 4 °C po dobu 12 hod. Nasledovala inkubácia so sekundárnymi protilátkami konjugovanými s chrenovou peroxidázou (Cell Signaling Technology®, riedenie 1:3000 v 5% roztoku BSA) po dobu 1 hod. Pred vizualizáciou bolo potrebné membránu inkubovať v roztokoch substrátu pre chrenovú peroxidázu Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Nemecko) podľa protokolu doporučeného výrobcom. K vizualizácii proteínov bol použitý chemiluminiscenčný detektor (Azure® Biosystems C600, USA).

Tabuľka č. 12: Zloženie pufov použitých pri proteínovej analýze.

Pufer	Zloženie	Množstvo	Poznámka
10x elektródový pufer (10x EP)	Glycín	144 g	
	Trizma® báza	30,3 g	
	dH ₂ O	1 000 ml	
1x elektródový pufer (1x EP)	10x EP	100 ml	
	10% SDS	10 ml	
	dH ₂ O	890 ml	
TBS-T	Trizma® báza	24,289 g	upraviť na pH 7,4
	NaCl	87,69 g	
	Tween® 20	10 ml	
	dH ₂ O	doplniť do 1000 ml	
5x transferový pufer (5x TP)	Trizma® báza	16,4 g	
	Glycín	72,1 g	
	dH ₂ O	1000 ml	
1x transferový pufer (1x TP)	5x TP	300 ml	
	Methanol	300 ml	
	dH ₂ O	900 ml	

Tabuľka č. 13: Použité primárne protilátky k detekcii študovaných proteínov.

Primárna protilátka	Veľkosť proteínu [kDa]	Izotyp	Dodávateľ
MRE11	81	anti-rabit IgG	Cell Signaling Technology®
RAD51	37	anti-rabit IgG	Cell Signaling Technology®
γH2AX	15	anti-rabit IgG	Cell Signaling Technology®
GAPDH	26	anti-mouse IgG	Abnova

4.2.7 Analýza poškodenia DNA

Poškodenie DNA v bunkách DLD-1 a OxR bolo analyzované metódou tzv. *in vitro* Comet Assay. Alkalická verzia Comet Assay je založená na jednobunkovej gélovej elektroforéze a štandardne sa používa k detekcii zlomov na molekulách DNA. V alkalickom prostredí sa DNA denaturuje a pri elektroforéze migruje z jadra buniek vo forme polyaniónu k anóde. Čím je počet zlomov na DNA väčší, tým viac DNA migruje z jadra a po ofarbení majú bunky kométam podobný tvar, pričom „hlava“ (*head*) kométy obsahuje intaktnú DNA a „chvost“ (*tail*) zas poškodenú DNA (Collins, 2004).

Po transfekcii DLD-1 a OxR buniek *miRNA mimic* a 24 hod od ošetrenia oxaliplatinou boli bunky uvoľnené z povrchu 24-jamkovej platničky, resuspendované v 1 ml vychladeného PBS pufru a spočítané v Bürkerovej komôrke. Nasledovala centrifugácia pri laboratórnej teplote a 700×g po dobu 10 min. Vytvorený supernatant bol zliaty a bunkové pelety nariadené na koncentráciu 200 000 buniek/ml vyhriatym 0,5% roztokom agarózy na 37 °C. Každá vzorka bola nanosená na vychladené sklíčka potiahnuté 1% agarózovým gélom v troch opakovaníach po 70 µl a prekrytá krycím sklíčkom. Sklíčka s nanesenými vzorkami boli umiestnené na 10 min do chladničky. Po stuhnutí agarózy s resuspendovanými bunkami boli opatrne stiahnuté krycie sklíčka a vzorky umiestnené do vychladeného lyzačného pufru (Tab. č. 14) na 1 hod pri teplote 4 °C. Po lýze boli sklíčka premývané po dobu 5 min vo vychladenom PBS pufri. Následne boli sklíčka v horizontálnom usporiadaní vyskladané do elektroforetického boxu, zaliate alkalickým pufrom (Tab. č. 14) a inkubované 40 min. Potom bol box pripojený k zdroju napätia a gélová elektroforéza prebiehala po dobu 30 min, pri napätí 33 V, prúde 300 mA a teplote 4 °C. Po skončení elektroforézy boli gély neutralizované premývaním sklíčok vo vychladenom PBS po dobu 10 min a vychladenej dH₂O po dobu ďalších 10 min pri teplote 4 °C. Sklíčka sa nechali vyschnúť cez noc pri teplote 4 °C a na ďalší deň boli farbené v roztoku SYBR™ Gold po dobu 30 min. Farbiaci roztok bol pripravený tesne pred použitím tak, že do 50 ml TE pufru (Tab. č. 14) bolo pridaných 5 µl SYBR™ Gold (Molecular Probes®, USA). V objeme 50 µl farbiaceho roztoku mohlo byť ofarbených naraz 8 sklíčok. Po farbení boli sklíčka 2-krát premyté dH₂O a po vyschnutí prekryté krycím sklíčkom a hodnotené pod fluorescenčným mikroskopom (Olympus BX63, Japonsko). Obrazová analýza bola prevedená v programe LUCIA Comet Assay™ Software.

Tabuľka č. 14: Zloženie pufrov použitých pri analýze poškodenia DNA.

Pufer	Zloženie	Množstvo	Poznámka
Lyzačný pufer	2,5 M NaCl	146,1 g	upraviť na pH 10
	100 mM EDTA	37,22 g	
	10 mM Trizma® báza	1,21 g	
	dH ₂ O	1000 ml	
Alkalický pufer	10 M NaOH	60 ml	
	200 mM EDTA	10 ml	
	vychladená dH ₂ O	1930 ml	
TE pufer	1 M Tris-HCl (pH 8)	10 ml	
	0,5 M EDTA-NaOH (pH 8)	2 ml	
	dH ₂ O	988 ml	

4.2.8 Analýza bunkového cyklu

Jednou z najčastejších metód využívaných pri analýze bunkového cyklu je prietoková cytometria. Princíp metódy spočíva v meraní obsahu DNA jednotlivých buniek vo vzorkách, preto je nevyhnutné dopredu naznačiť molekuly DNA. Rutinne používaným fluorescenčným farbivom je propídium jodid (PI). Ide o interkalačné činidlo, ktoré sa zabuduje do štruktúry dvojreťazcovej DNA a po ožiarení svetlom o vlnové dĺžke 488 nm emituje žiarenie (> 560 nm). Z analýzy fluorescenčného signálu propídium jodidu tak možno určiť obsah DNA v bunkách a tým aj fázu bunkového cyklu, v ktorej sa nachádzajú.

Bunky DLD-1 a OxR línie boli nasadené na 6-jamkové platničky, po 48 hod od transfekcie a 24 hod od ošetrenia časti buniek oxaliplatinou im bolo odsaté kultivačné médium, kultivačný povrch platničiek bol premytý 1 ml PBS pufru a bunky boli trypsinizované ako je uvedené v časti **4.2.2 Kultivácia, pasážovanie, počítanie a nasedenie buniek**. Po trypsinizácii boli bunky resuspendované v 1 ml PBS pufru a prenesené do centrifugačných skúmaviek. Centrifugácia buniek prebehla pri laboratórnej teplote a 1500×g po dobu 10 min. Supernatant bol zliaty a bunkové pelety na dne skúmaviek fixované v 500 µl vychladeného 70% ethanolu (Penta, Česká republika). Skúmavky boli postupne umiestňované na elektrickú trepačku (Biosan Vortex V-1 Plus, Nemecko) a počas miešania bolo pridávaných 4,5 ml vychladeného 70% ethanolu. Takto pripravené vzorky bolo možné skladovať pri -20 °C. Pred samotným farbením v roztoku propídium jodidu (PI) boli bunky v 70% ethanole scentrifugované pri laboratórnej teplote a 1500×g po dobu 10 min. Ethanol bol zliaty, k bunkovým peletám bol pridaný 1 ml PBS pufru a nasledovala ďalšia centrifugácia. Vytvorený supernatant bol zliaty, bunkové pelety boli resuspendované 1 ml farbiaceho roztoku propídium jodidu (Tab č. 15) a inkubované pri teplote 37 °C v termostate po dobu 30 min. Meranie prebiehalo na prietokovom cytometri (Apogee Systems A-50 Microflow Cytometer, Anglicko). Namerané dáta boli vyhodnotené v programe Flowlogic™ Software (Inivai Technologies, Austrália).

Tabuľka č. 15: Zloženie farbiaceho roztoku propídium jodidu.

Zloženie	Objem [µl]
Propídium jodid	25 ml
RNáza	0,25 ml
Triton X-100	12,5

4.3 Validácia pozorovaných výsledkov na patientskych vzorkách

Pre validáciu výsledkov *in vitro* funkčnej analýzy bola vybraná skupina pacientov s kolorektálnym karcinómom, u ktorých bola sledovaná expresia génov študovaného proteínu MRE11 a miR-140.

4.3.1 Súbor testovaných pacientov

Vybraná skupina predstavovala súbor RNA vzoriek získaných od 33 pacientov s kolorektálnym karcinómom, ktorí v rokoch 2011-2015 podstúpili chirurgickú resekciu vo Všeobecnej fakultnej nemocnici, Praha a Fakultnej nemocnici, Plzeň. Všetci pacienti podpísali informovaný súhlas o poskytnutí informácií zo zdravotnej dokumentácie a zaradení do vedecko-výskumných štúdií na oboch nemocniciach. Klinická charakteristika vybranej skupiny je uvedená v Tab. č. 16. Od každého pacienta bola získaná celková RNA vrátane miRNA vyizolovaná z kolorektálneho nádorového tkaniva a kolorektálneho nenádorového tkaniva pomocou miRNeasy® Mini Kit (50) (Qiagen, Nemecko). Spolu tak bolo otestovaných 66 vzoriek.

Tabuľka č. 16: Klinická charakteristika vybranej skupiny pacientov.

Klinický znak	Celkový počet pacientov (n = 33)
Pohlavie	
Ženy	16
Muži	17
Vek v čase diagnózy	
Medián	64
Fajčenie	
Fajčiar/ka	11
Nefajčiar/ka	10
Bývalý/á fajčiar/ka	12
TNM klasifikácia	
I	1
II	12
III	13
IV	7

4.3.2 Analýza expresie vybraných génov

K stanoveniu expresie génov pre MRE11 a miR-140 bola použitá metóda qPCR v reálnom čase. Príprava vzoriek, reverzná transkripcia a samotná qPCR boli prevedené podľa rovnakého postupu, ktorý je uvedený v kapitole **4.2.5 Kvantitatívna PCR v reálnom čase**.

4.4 Štatistické hodnotenie

Štatistické hodnotenie získaných výsledkov bolo spracované v programe GraphPad Prism 8.1.2 (332) (verzia sprístupnená od mája 2019) (GraphPad Software, USA). Štatistická významnosť bola posudzovaná pomocou párového Studentovho t-testu a Mannov-Whitneyho testu. Uvádzané výsledky predstavujú priemernú hodnotu troch nezávislých opakovaní so smerodajnou odchýlkou (\pm SD) a hladinou štatistickej signifikantnosti $p < 0,05$.

5. Výsledky

Praktická časť predloženej diplomovej práce bola zameraná na identifikáciu konkrétnej miRNA, ktorá potenciálne asociuje s mRNA senzorického proteínu dvojreťazcových zlomov MRE11. Predpokladáme, že regulácia MRE11 by mohla ovplyvniť životaschopnosť buniek kolorektálneho karcinómu a modulovať terapeutickú odpoveď voči oxaliplatine. Efekt vybranej miRNA bol sledovaný v *in vitro* funkčných testoch na bunkách kolorektálnych nádorových línií. Vybraná miRNA bola zároveň analyzovaná vo vzorkách nádorového a nenádorového tkaniva získaných od pacientov s kolorektálnym karcinómom.

5.1 *In silico* analýza microRNA asociujúcich s reparačnými proteínmi

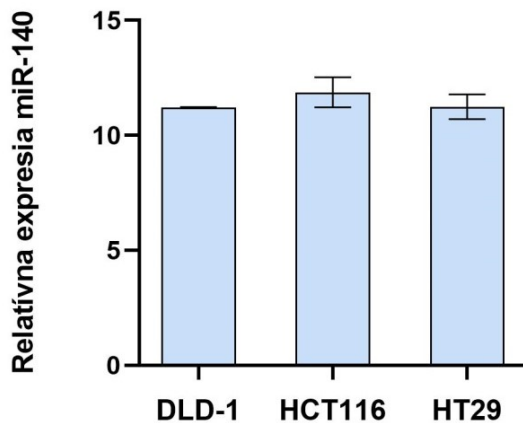
K predikcii miRNA, ktorej biologickým cieľom by mohol byť proteín MRE11 bol použitý online server TargetScanHuman (verzia 7.2 sprístupnené od marca 2018) (Agarwal *et al.*, 2015). Zároveň bol použitý online výpočtový model SMiR-NBI (*Small Molecule-miRNA Network-Based Inference model*), ktorý predikuje asociáciu miRNA a malých molekúl používaných pri terapii nádorov, čo napomáha farmakogenetickým štúdiám pri hľadaní súvislosti medzi variabilitou terapeutickej odpovede vybraných genetických markerov na úrovni DNA a zmenou expresie génov kódujúcich miRNA v nádorových tkanivách s následne možným ovplyvnením podávanej terapeutickej látky (Li *et al.*, 2016). Prevedenou *in silico* analýzou bola definovaná miR-140, ktorá sa ukázala ako potenciálny regulátor hladiny MRE11 (Tab. č. 17) a zároveň, že potenciálne existuje asociácia s molekulami oxaliplatiny.

Tabuľka č. 17: Predikovaná oblasť väzby miR-140 na 3'UTR MRE11 (Agarwal *et al.*, 2015).

Interakční partneri	Predikovaná sekvenčná komplementarita
Pozícia 4534-4510 v 3'UTR MRE11	5' ...AAAAGGAUAAUUAAUCUGUGGUG...
hsa-miR-140-3p.2	3' GGCACCAAGAUGGGACACCAU

5.2 Endogénna hladina miR-140 v kolorektálnych nádorových líniách

Po identifikácii miR-140 ako potenciálnej miRNA asociovej s proteínom MRE11, bolo potrebné definovať jej endogénnu hladinu expície v kolorektálnych nádorových líniách DLD-1, HCT116 a HT29. Tá bola stanovená metódou qPCR v reálnom čase. Hodnoty expície boli normalizované voči endogénnej kontrole *RNU6B* a *RNU48* pomocou vzťahu ΔCt . Rozdiely v expresii génu pre miR-140 medzi testovanými líniami neboli výrazné, avšak najnižšia úroveň sa preukázala u línie DLD-1 (Obr. č. 9). Línia DLD-1 bola vybraná na následné *in vitro* funkčné testy, pretože na základe nízkej endogénnej expície mohol byť dobre pozorovaný efekt po experimentálnom zvýšení hladiny miR-140. Zároveň bola od tejto línie odvodená línia vykazujúca čiastočnú rezistenciu voči oxaliplatine, OxR línia.

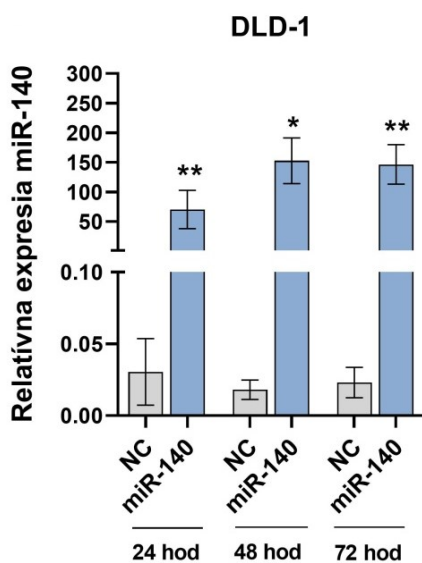


Obrázok č. 9: Relatívna expresia génu pre miR-140 v kolorektálnych nádorových líniách. Grafické zobrazenie reprezentuje priemernú hodnotu troch nezávislých opakovaní so smerodajnou odchýlkou ($\pm SD$). Hodnoty expície génu pre miR-140 boli normalizované k endogénnej kontrole *RNU6B* a *RNU48*. K výpočtu relatívnej expície bol použitý vzťah ΔCt .

5.3 *In vitro* funkčná analýza miR-140 na DLD-1 línii

5.3.1 Optimalizácia transfekcie DLD-1 buniek

Pre štúdium vplyvu miR-140 na kolorektálne nádorové bunky bola v bunkách DLD-1 línie experimentálne zvýšená hladina miR-140 pomocou oligonukleotidov hsa-miR-140-3p *miRNA mimic*. Na overenie úspešnosti tranzientnej transfekcie a zároveň na definovanie nárastu miR-140 bola hladina miR-140 sledovaná v časovom intervale 24, 48, 72 hodín od prevedenia transfekcie. Metódou qPCR v reálnom čase bol potvrdený výrazný nárast hladiny miR-140 vo vzorkách transfekovaných (miR-140) v porovnaní so vzorkami negatívnej kontroly (NC), ktoré predstavovali základnú hladinu expície. Hodnoty hladiny miR-140 boli normalizované voči endogénnej kontrole *RNU6B*. Hladiny relatívnej expície boli vypočítané pomocou vzťahu $2^{-\Delta Ct}$. Zvýšená hladina miR-140 bola stabilne udržiavaná počas celej doby pozorovania a to aj pri poslednom meraní v čase 72 hodín ($p = 0,022$) od experimentálneho zvýšenia, čím sa preukázala úspešnosť transfekcie (Obr. č. 10).

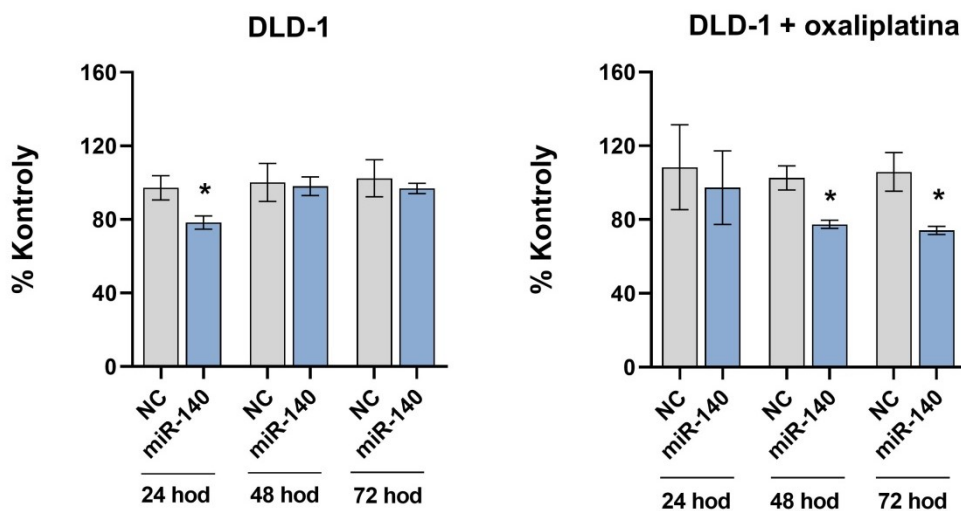


Obrázok č. 10: Hladiny miR-140 u DLD-1 buniek v časovom intervale troch dní od experimentálneho zvýšenia pomocou tranzientnej transfekcie. Hodnoty expície boli normalizované voči endogénnej kontrole *RNU6B*. Symboly „*“, „**“ znázorňujú štatistickú významnosť $p < 0,05$.

5.3.2 Hodnotenie vplyvu miR-140 na bunkovú proliferáciu

Ako prvý sa hodnotil vplyv zvýšenej hladiny miR-140 na bunkovú proliferáciu. Ten bol analyzovaný kolorimetrickou metódou s použitím WST-1 reagenta. Zmeny v proliferácii boli sledované v časových intervaloch 24, 48 a 72 hodín od transfekcie buniek DLD-1 línie. Negatívna kontrola (NC) predstavovala základnú úroveň proliferácie, ktorá bola považovaná za 100 %. Ku každej NC bola následne vzťahovaná úroveň proliferácie v odpovedajúcej vzorke so zvýšenou hladinou miR-140. Výsledné dáta predstavujú % z úrovne proliferácie NC a sú priemernou hodnotou troch nezávislých opakovaní. Už pri hodnotení samotného vplyvu zvýšenej hladiny miR-140 bolo pozorované zníženie bunkovej proliferácie oproti NC. V prípade merania po 24 hodinách bola proliferácia buniek znížená o viac ako 20 % ($p = 0,039$) (Obr. č. 11).

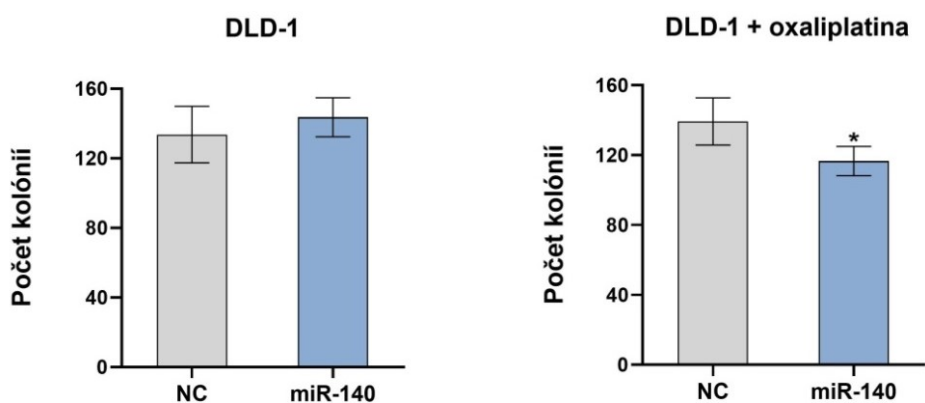
Následne bol hodnotený vplyv zvýšenej hladiny miR-140 na proliferáciu po aplikácii oxaliplatiny. Po aplikácii oxaliplatiny bola pozorovaná u DLD-1 buniek štatisticky významne znížená proliferácia. V čase meria po 48 hodinách od transfekcie bola proliferácia znížená o 23 % ($p = 0,031$) a po 72 hodinách až o 26 % ($p = 0,028$) (Obr. č. 11).



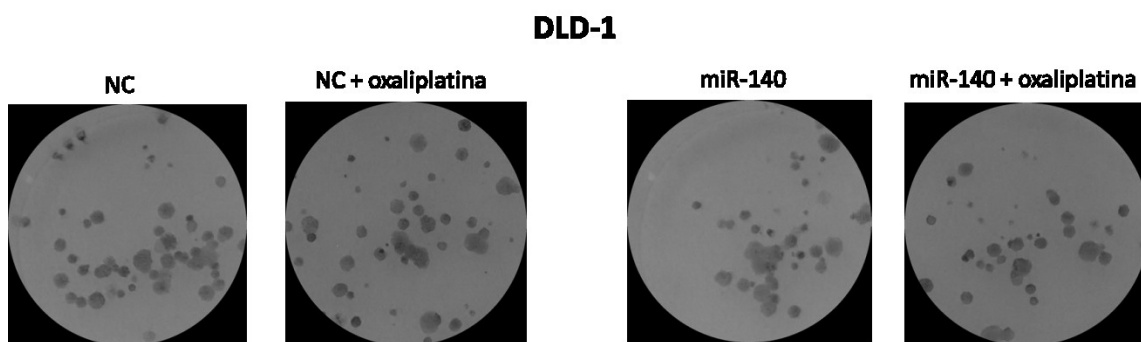
Obrázok č. 11: Vplyv zvýšenej hladiny miR-140 na proliferáciu DLD-1 buniek v čase. Hodnotenie pred (DLD-1) a po aplikácii oxaliplatiny (DLD-1 + oxaliplatina). Úroveň proliferácie negatívnych kontrol (NC) bola považovaná za 100 % (% Kontroly), ku ktorým bola vzťahovaná úroveň proliferácie v bunkách so zvýšenou miR-140 (miR-140). Symboly „*“ znázorňujú štatistickú významnosť $p < 0,05$.

5.3.3 Hodnotenie vplyvu miR-140 na klonogénny potenciál

Výsledný počet vytvorených kolónií po zvýšení hladiny miR-140 bol porovnávaný k počtu kolónií v odpovedajúcich vzorkách negatívnych kontrol (NC) (Obr. č. 13). Vzťah medzi zvýšenou hladinou miR-140 a klonogénnym potenciálom buniek DLD-1 nebol jednoznačne preukázaný. Významné zníženie klonogénneho potenciálu však bolo porozorané pri zvýšenej hladine miR-140 po aplikácii oxaliplatiny ($p = 0,032$) (Obr. č. 12).



Obrázok č. 12: Vplyv zvýšenej hladiny miR-140 na životaschopnosť a klonogénny potenciál DLD-1 buniek. Hodnotenie pred (DLD-1) a po aplikácii oxaliplatiny (DLD-1 + oxaliplatina). Symboly „*“ znázorňujú štatistickú významnosť $p < 0,05$.



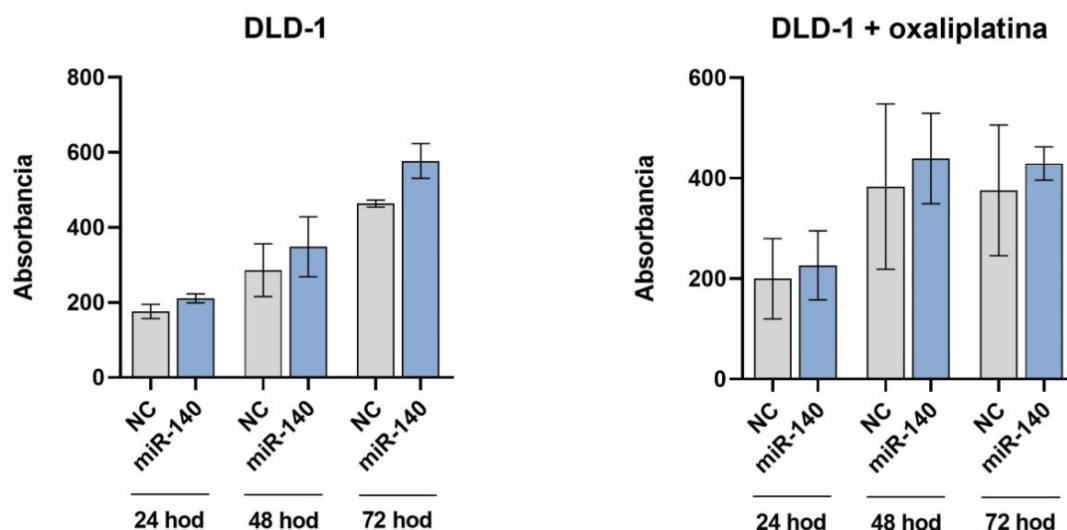
Obrázok č. 13: Vytvorené kolónie DLD-1 buniek na kultivačnom povrchu. Záznam z počítania bunkových kolónií v negatívnych kontrolách (NC) a po zvýšení hladiny miR-140 (miR-140), pred a po pôsobení oxaliplatiny (NC / miR-140 + oxaliplatina).

5.3.4 Hodnotenie vplyvu miR-140 na cytotoxicitu

U buniek DLD-1 línie bol v čase hodnotený vplyv zvýšenej hladiny miR-140 na cytotoxicitu. Výsledné dáta predstavujú hodnoty absorbancie, ktoré čím boli vyššie, tým

výššia bola aktivita adenylát kinázy, čo z princípu metódy vypovedalo o vyššom stupni poškodenia buniek a cytotoxicity.

Trend zvyšujúcej sa úrovne cytotoxicity bol v čase pozorovaný už pri samotnom zvýšení hladiny miR-140 oproti NC. Aplikácia oxaliplatiny viedla taktiež k zvýšeniu cytotoxického efektu v porovnaní s efektom na bunkách neošetrených (Obr. č. 14). Pozorovaný trend však nebol štatisticky významný.

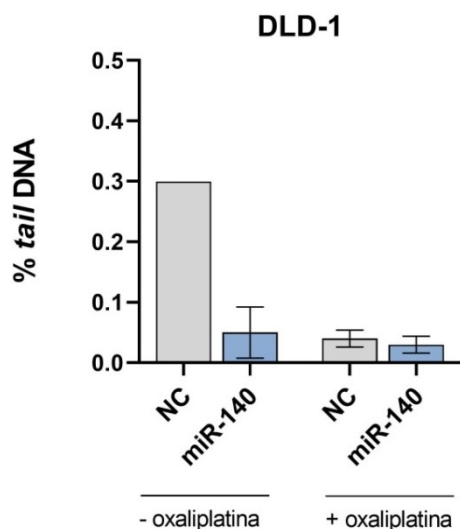


Obrázok č. 14: Analýza zmeny cytotoxicity v čase u buniek DLD-1 po zvýšení hladiny miR-140 (miR-140) a vplyv miR-140 na cytotoxický účinok oxaliplatiny (DLD-1 x oxaliplatina). Hodnoty absorbancií priamo korelujú so stupňom cytotoxicity.

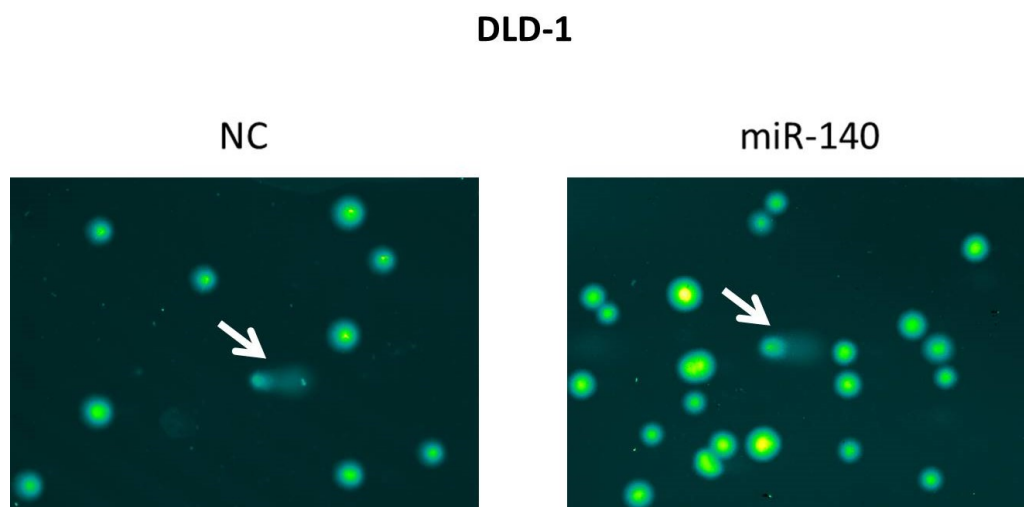
5.3.5 Analýza vplyvu miR-140 na poškodenie molekúl DNA

Po analýze zmien proliferácie a cytotoxicity vplyvom zvýšenia hladiny miR-140 sme sa zamerali na detekciu poškodenia DNA. K detekcii zlomov prítomných na molekulách DNA v bunkách DLD-1 bola použitá metóda *in vitro* Comet Assay. Čím bol počet zlomov na DNA väčší, tým viac DNA migrovalo pri elektroforéze z jadra. Po ofarbení, keď jednotlivé bunky pripomínali tvarom kométy, bol hodnotený obsah poškodenej DNA vo „chvoste“ (*tail*) jednotlivých komét (Obr. č. 16). Počas analýzy bol hodnotený vplyv zvýšenej hladiny miR-140 na množstvo zlomov DNA a to ako v prípade pred, tak po aplikácii oxaliplatiny.

Pri hodnotení výsledkov nebol pozorovaný výrazný rozdiel v množstve poškodenia DNA medzi vzorkami so zvýšenou hladinou miR-140 (miR-140) a ich negatívnymi kontrolami (NC). Rozdiel vždy odpovedal hodnotám pod 0,5 %. Rozdiely taktiež neboli ani pri porovnaní poškodenia DNA po aplikácii oxaliplatiny (+ oxaliplatina) (Obr. č. 15).



Obrázok č. 15: Porovnanie množstva zlomov na molekulách DNA u DLD-1 buniek. Množstvu zlomov odpovedá % DNA v „chvoste“ (% *tail* DNA). Úroveň poškodenia bola porovnávaná vždy medzi bunkami negatívnej kontroly (NC) a bunkami so zvýšenou hladinou miR-140 (miR-140). Zároveň bol porovnaní efekt pred aplikáciou oxaliplatinu (- oxaliplatin) a po aplikácii (+ oxaliplatin).



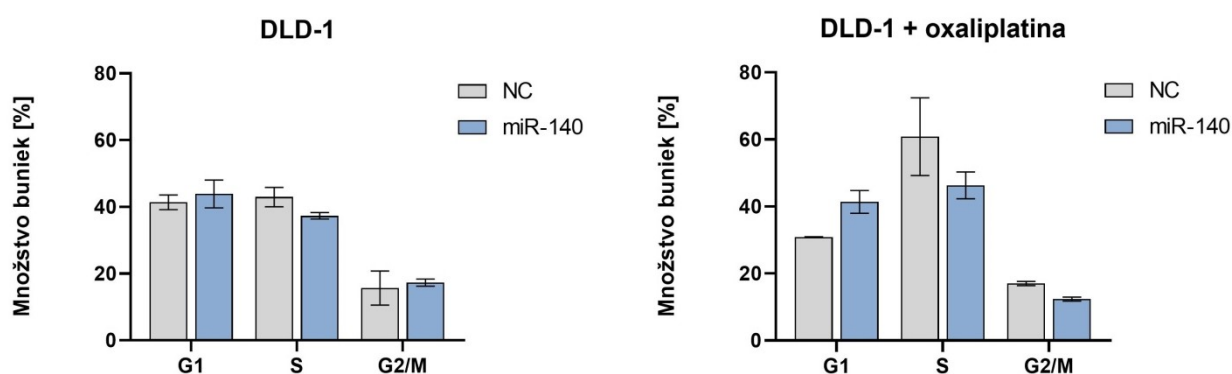
Obrázok č. 16: Výstup obrazovej analýzy pri hodnotení poškodenia DNA u DLD-1 buniek. Záznam znázorňuje intaktné bunky (jasný zelený signál) a bunky kométového tvaru s poškodenou DNA (symbol bielej šípky) v negatívnej kontrole (NC) a po zvýšení hladiny miR-140 (miR-140).

5.3.6 Analýza vplyvu miR-140 na reguláciu bunkového cyklu

Analýza experimentálne zvýšenej hladiny miR-140 na reguláciu bunkového cyklu buniek DLD-1 línie bola prevedená pomocou prietokovej cytometrie s využitím propídium

jodidu. Pri podmienkach, ktoré neumožňujú plynulý prechod fázami bunkového cyklu, ako napr. poškodenie DNA, dochádza k spomaleniu až zástave bunkového cyklu, ktorá sa odzrkadlí v zmene distribúcie buniek v jednotlivých fázach.

Po 48 hodinách od experimentálneho zvýšenia hladiny miR-140 bol u buniek DLD-1 pozorovaný pokles (6 %) počtu buniek vo fáze S a čiastočne navýšenie vo fázach G1 a G2/M, čo môže naznačovať spomalenie cyklu vo fáze G1 z dôvodu akumulácie poškodenia spôsobeného zvýšením hladiny miR-140 (Obr. č. 17). Výraznejší efekt bol pozorovaný po aplikácii oxaliplatinu na bunky so zvýšenou hladinou miR-140, kedy došlo k 16 % poklesu v S fáze a zároveň nárastu počtu buniek vo fáze G1, čo by mohlo znamenať zástavu cyklu na prechode G1/S a prípadnú aktiváciu dráh vedúcich k apoptóze, keďže práve v tomto prípade bolo preukázané významné zníženie bunkovej proliferácie (Obr. č. 11) a zvýšenie cytotoxicity (Obr. č. 14).



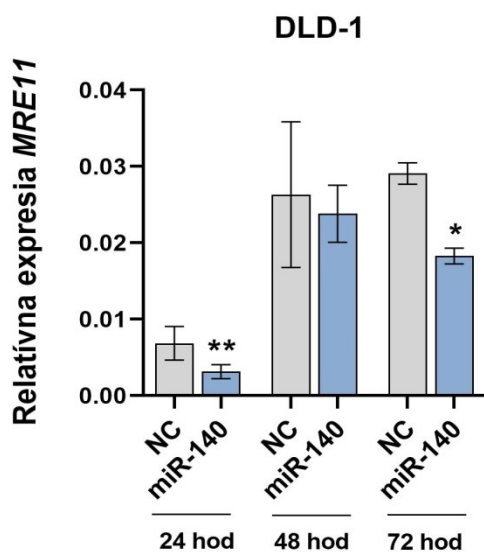
Obrázok č. 17: Distribúcia buniek DLD-1 línie v jednotlivých fázach bunkového cyklu (BC) pri zvýšenej hladine miR-140. Hodnotenie pred (DLD-1) a po aplikácii oxaliplatinu (DLD-1 + oxaliplatin). Negatívna kontrola (NC) odpovedala štandardnému zastúpeniu vo fázach BC, ku ktorému boli zrovnané pozorovania po zvýšení miR-140 (miR-140).

5.3.7 Hodnotenie expresie *MRE11* vo vzťahu k miR-140

Potenciálny vzťah medzi hladinou miR-140 a úrovňou expresie *MRE11* bol sledovaný pomocou metódy qPCR v reálnom čase. Bunkám DLD-1 línie bola experimentálne zvýšená hladina miR-140 a v časovom intervale 24, 48 a 72 hodín od transfekcie bola hodnotená relatívna expresia proteínu *MRE11*. Vzorky negatívnych kontrol (NC) odpovedali základnej hladine expresie *MRE11* v neovplyvnených bunkách. Hodnoty expresie *MRE11* boli

normalizované voči endogénnej kontrole *GAPDH*. Hodnoty relatívnej expresie boli vypočítané pomocou vzťahu $2^{-\Delta Ct}$.

U DLD-1 buniek sa preukázal významný pokles hladiny proteínu MRE11 za zvýšenej hladiny miR-140 a to vo všetkých sledovaných časoch (Obr. č. 18). Najvýraznejší efekt na zníženie MRE11 bol pozorovaný pri meraní po 24 hodinách ($p = 0,004$) a 72 hodinách ($p = 0,028$). Výsledné dáta tak naznačujú, že stabilne udržiavaná zvýšená hladina miR-140 môže negatívne ovplyvňovať hladinu proteínu MRE11.

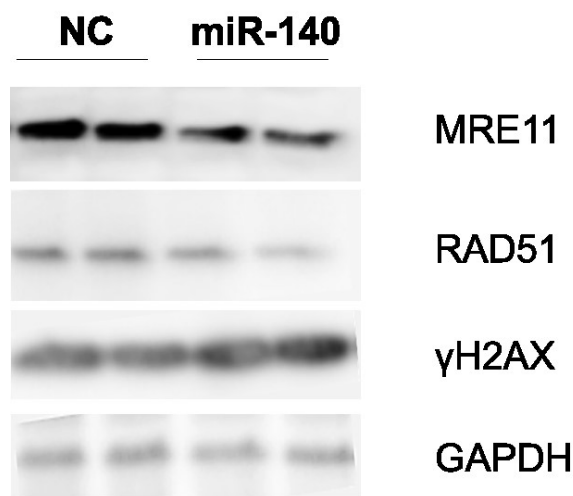


Obrázok č. 18: Relatívna expresia *MRE11* v čase pri zvýšenej hladine miR-140 u DLD-1 buniek. Negatívne kontroly (NC) predstavovali základnú hladinu expresie *MRE11* v neovplyvnených bunkách. Expresia *MRE11* bola normalizovaná voči kontrole *GAPDH* a relatívna expresia vypočítaná pomocou vzťahu $2^{-\Delta Ct}$. Štatistická významnosť $p < 0,05$ bola pozorovaná, keď pri zvýšenej hladine miR-140 výrazne poklesla expresia *MRE11*, grafické znázornenie symbolom „*“.

5.3.8 Proteínová analýza

Po analýze relatívnej expresie pomocou qPCR v reálnom čase sme následne analyzovali efekt zvýšenej hladiny miR-140 na MRE11 ako aj RAD51 a γ H2AX na proteínovej úrovni. Tým sme chceli zistiť, či zníženie aktivity MRE11 potenciálnym pôsobením zvýšenej hladiny miR-140 ovplyvní aj aktivitu iných proteínov zapojených do opráv dvojreťazcových zlomov. K analýze vybraných proteínov bola použitá metóda elektroforetickej separácie za denaturačných podmienok (SDS-PAGE) a technika Western blot.

Výsledné dáta ukazujú, že po 48 hodinách od zvýšenia miR-140 sa okrem hladiny proteínu MRE11 znižuje aj hladina RAD51 a naopak, že hladina γ H2AX stúpa (Obr. č. 19). Ten výsledok potvrdzuje očakávanie, že pri znížení hladiny MRE11 dochádza k DSBs poškodeniam DNA molekúl, ktoré budú v čase pribúdať, a preto sa akumuluje vyššie množstvo γ H2AX, ktorý je priamym markerom DSBs. A naopak, že hladina proteínu RAD51, ktorý je aktivovaný až po rozpoznaní poškodenia proteínom MRE11 a jeho aktivácii, bude nižšia z dôvodu poklesu aktivity MRN komplexu.



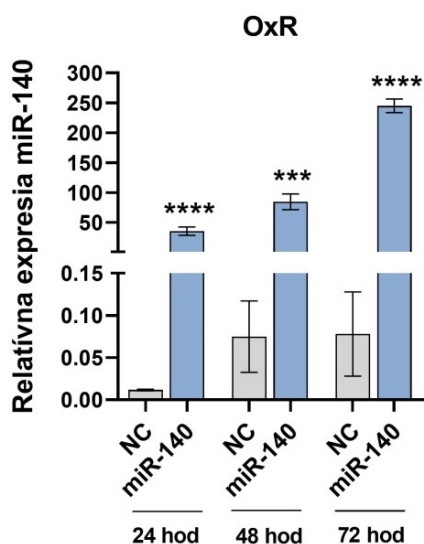
Obrázok č. 19: Vizualizácia hladín sledovaných proteínov MRE11, RAD51 a γ H2AX po experimentálnom zvýšení hladiny miR-140 u buniek DLD-1 línie. Pokles hladiny po zvýšení miR-140 bol pozorovaný v prípade proteínov MRE11 a RAD51, naopak zvýšená hladina bola pozorovaná u γ H2AX. Ako endogénna kontrola bola použitá hladina proteínu GAPDH.

5.4 *In vitro* funkčná analýza miR-140 na OxR línii

Na základe výsledkov vyplývajúcich z analýz zvýšenej hladiny miR-140 na správanie buniek chemosenzitívnej DLD-1 línie a ich odpoveď po aplikácii oxaliplatiny, kedy sme zistili významný efekt na zníženie proliferácie, zvýšenú cytotoxicitu a aktivitu MRE11, sme sa následne zamerali na analýzu vplyvu zvýšenej hladiny miR-140 na rezistenciu voči oxaliplatine. Za tým účelom bola prevedená rovnaká *in vitro* funkčná analýza aj na línii OxR.

Optimalizácia transfekcie buniek OxR línie

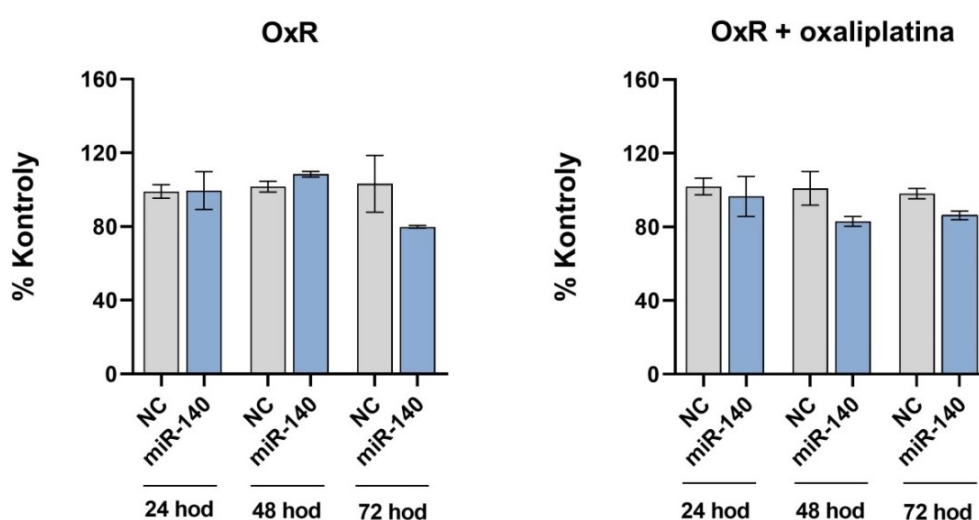
V bunkách OxR línie bola úspešnosť prevedenej tranzientnej transfekcie pomocou oligonukleotidov hsa-miR-140-3p *miRNA mimic* sledovaná v časovom intervale 24, 48 a 72 hodín po transfekcii. Nárast a stabilné udržiavanie zvýšenej hladiny miR-140 bolo potvrdené metódou qPCR v reálnom čase. Hladina miR-140 vo vzorkách transfekovaných (miR-140) bola posudzovaná vzhľadom k vzorkám negatívnej kontroly (NC), ktoré reprezentovali základnú hladinu expresie. Hodnoty hladiny miR-140 boli normalizované voči endogénnej kontrole *RNU6B* a relatívna expresia miR-140 vypočítaná pomocou vzťahu $2^{-\Delta Ct}$. Výrazne zvýšená hladina miR-140 bola stabilná počas celej doby pozorovania a to aj po 72 hodinách ($p < 0,0001$) od experimentálneho zvýšenia, čo preukázateľne potvrdilo úspešnosť tohto spôsobu transfekcie (Obr. č. 20).



Obrázok č. 20: Relatívna expresia miR-140 v bunkách OxR línie v časovom intervale troch dní od experimentálneho zvýšenia. Hodnoty expresie boli normalizované voči endogénnej kontrole *RNU6B*. Symboly „, * “ znázorňujú štatistickú významnosť $p < 0,05$.

Hodnotenie vplyvu miR-140 na bunkovú proliferáciu

Pri hodnotení vplyvu zvýšenej hladiny miR-140 na proliferáciu OxR buniek bolo rovnako ako u chemosenzitivnej línie v čase pozorované postupné, avšak miernejšie, znižovanie proliferácie pri samotnom zvýšení miR-140, tak aj pri kombinácii s oxaliplatinou (Obr. č. 21). Toto zníženie nepreukázalo ani v jednom prípade štatisticky významnú signifikanciu. Základnú úroveň proliferácie predstavovali bunky negatívnej kontroly (NC), táto úroveň bola pri hodnotení považovaná za 100 % (% Kontroly) a k nej boli vzťahované jednotlivé namerané hodnoty proliferácií v čase.

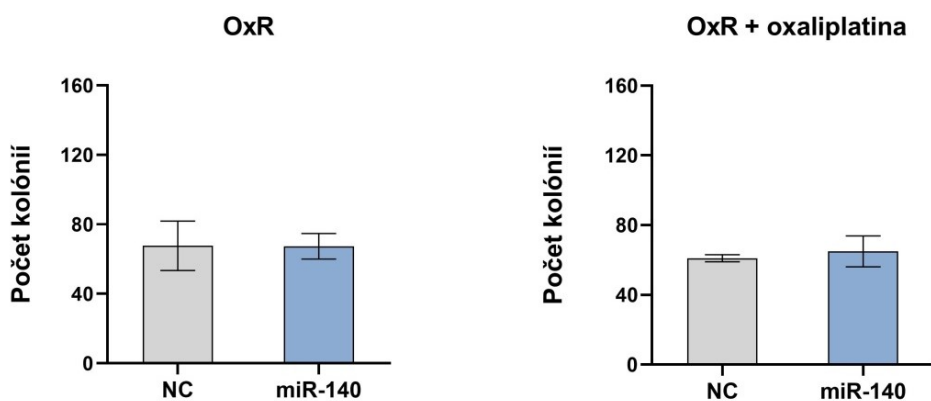


Obrázok č. 21: Vplyv zvýšenej hladiny miR-140 na proliferáciu OxR buniek v čase. Hodnotenie pred (OxR) a po aplikácii oxaliplatinu (OxR + oxaliplatina). Úroveň proliferácie negatívnych kontrol (NC) bola považovaná za 100 % (% Kontroly), ku ktorej bola vzťahovaná úroveň proliferácie v bunkách so zvýšenou miR-140 (miR-140).

Hodnotenie vplyvu miR-140 na klonogénny potenciál

Výsledný počet vytvorených kolónií po zvýšení hladiny miR-140 bol porovnávaný k počtu kolónií v odpovedajúcich vzorkách negatívnych kontrol (NC).

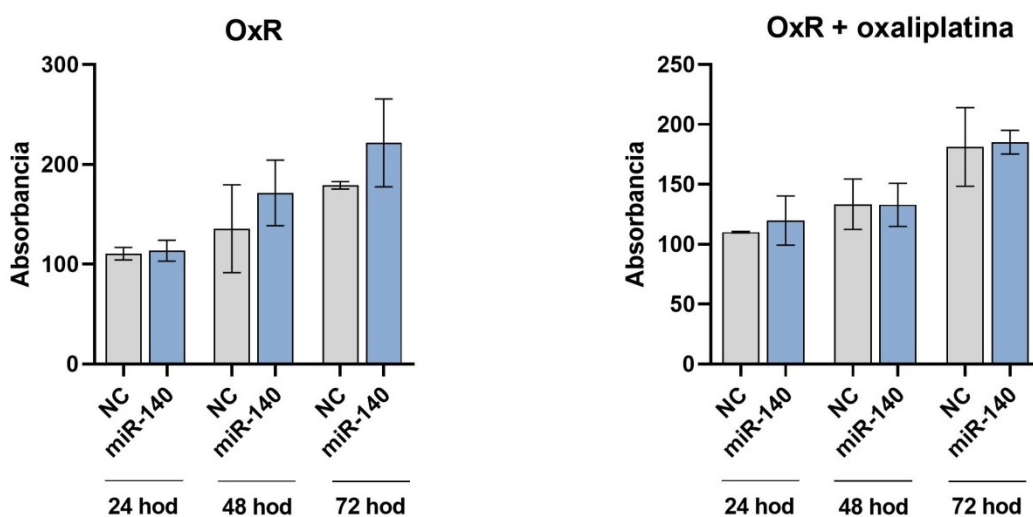
U chemorezistentnej OxR línie nebol preukázaný signifikantný efekt zvýšenej hladiny miR-140 na dlhodobé prežívanie a klonogénny potenciál buniek. Výsledné dáta nepreukázali nárast, ani pokles počtu kolónií po samotnom zvýšení hladiny miR-140 a ani po aplikácii oxaliplatinu (Obr. č. 22).



Obrázok č. 22: Vplyv zvýšenej hladiny miR-140 na životaschopnosť a klonogénny potenciál OxR buniek. Hodnotenie pred (OxR) a po aplikácii oxaliplatin (OxR + oxaliplatin). Počet vytvorených kolónií po zvýšení hladiny miR-140 (miR-140) bol porovnaný k počtu kolónií v negatívnych kontrolách (NC).

Hodnotenie vplyvu miR-140 na cytotoxicitu

Po tom ako sme pozorovali odlišný efekt miR-140 na profileráciu DLD-1 a OxR sme chceli zistiť, či bude odlišný aj vplyv na cytotoxicitu. Pri samotnom zvýšení hladiny miR-140 bol pozorovaný postupný nárast cytotoxicity, s najväčším efektom nameraným po 72 hodinách od transfekcie (Obr. č. 23). Avšak u chemorezistentnej línie OxR sa nepreukázal efekt zvýšenej hladiny miR-140 na nárast cytotoxickej aktivity oxaliplatin (Obr. 23) ako tomu bolo v prípade chemosenzítivnej DLD-1 línie.

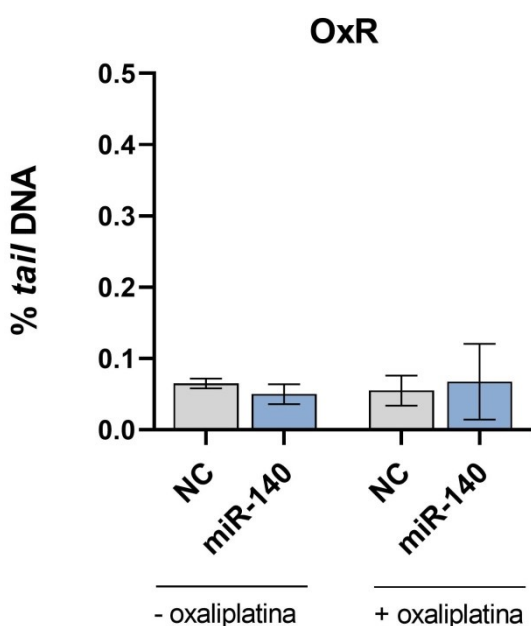


Obrázok č. 23: Analýza zmeny cytotoxicity v čase u buniek OxR. Hodnoty absorbancií priamo korelujú so stupňom cytotoxicity. Najvýraznejší efekt zvýšenej hladiny miR-140 (miR-140) na cytotoxicitu bol sledovaný u OxR po 72 hodinách. Vzťah medzi zvýšenou hladinou miR-140 a cytotoxického účinkom oxaliplatin sa v čase výrazne nemenil (OxR + oxaliplatin).

Analýza vplyvu miR-140 na poškodenie molekúl DNA

Cieľom prevedenej analýzy bolo posúdiť vplyv zvýšenej hladiny miR-140 v bunkách OxR línie na tvorbu a úroveň poškodenia DNA molekúl pred a po aplikácii oxaliplatiny.

Počas hodnotenia výsledkov však opäť nebol pozorovaný výrazný rozdiel v množstve poškodenia DNA medzi vzorkami so zvýšenou hladinou miR-140 (miR-140) a ich odpovedajúcimi negatívnymi kontrolami (NC). Ani v jednom hodnotenom prípade nebol rozdiel v poškodení väčší ako 0,1 %. Významné rozdiely sa taktiež nepreukázali ani pri porovnaní poškodenia DNA po aplikácii oxaliplatiny (OxR + oxaliplatina) (Obr. č. 24).

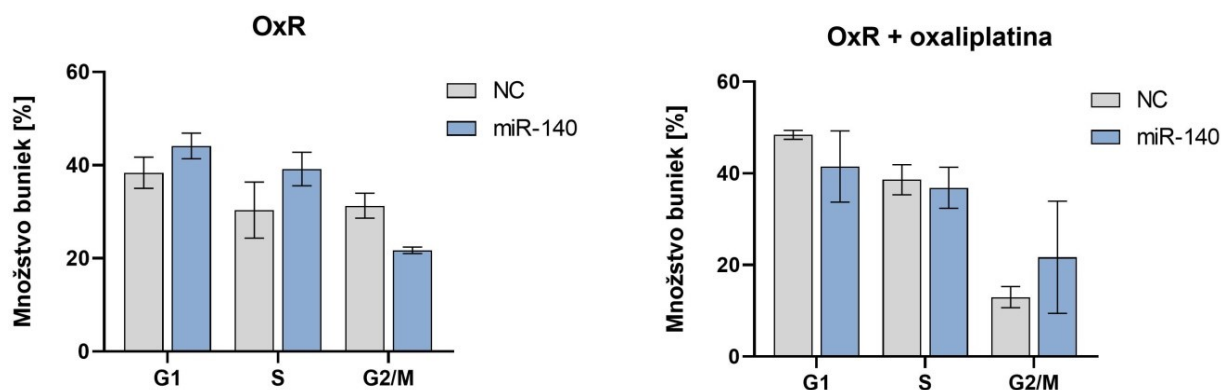


Obrázok č. 24: Porovnanie množstva zlomov na molekulách DNA buniek OxR línie. Množstvu zlomov odpovedá % DNA v „chvoste“ (% tail DNA). Úroveň poškodenia bola porovnávaná vždy medzi bunkami negatívnej kontroly (NC) a bunkami so zvýšenou hladinou miR-140 (miR-140). Zároveň bol porovnaný efekt pred aplikáciou oxaliplatiny (- oxaliplatina) a po aplikácii (+ oxaliplatina).

Analýza vplyvu miR-140 na reguláciu bunkového cyklu

Po zvýšení hladiny miR-140 v bunkách OxR línie bol po 48 hodinách pozorovaný 10 % pokles zastúpenia buniek vo fázach G2/M a naopak, akumulácia buniek v S fáze, čo naznačuje možnú zástavu cyklu v S fáze a problémy s replikáciou. V prípade, že bola na bunky aplikovaná oxaplatina bola sledovaná odlišná distribúcia v rámci bunkového cyklu

s výrazným nárastom zastúpenia buniek vo fázach G2/M a poklese v G1 fáze, ktorý mohol byť spôsobený zástavou bunkového cyklu v G2/M (Obr. č. 25).

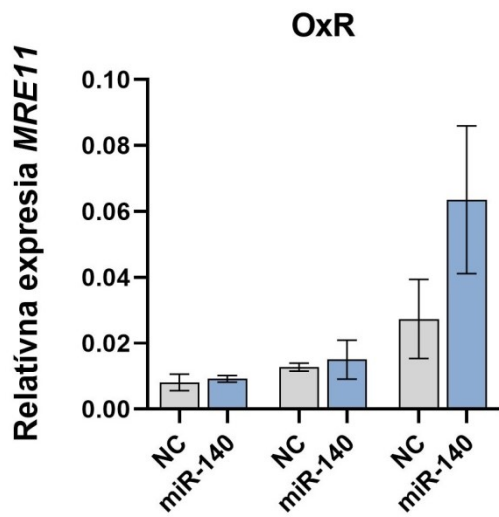


Obrázok č. 25: Distribúcia buniek OxR línie vo fázach bunkového cyklu (BC) pri zvýšenej hladine miR-140. Hodnotenie pred (OxR) a po aplikácii oxaliplatinu (OxR + oxaliplatin). Negatívna kontrola (NC) odpovedala štandardnému zastúpeniu vo fázach BC, ku ktorému boli zrovnané pozorovania po zvýšení miR-140 (miR-140).

Hodnotenie expresie *MRE11* vo vzťahu k miR-140

Potenciálny vplyv zvýšenej hladiny miR-140 na expresiu *MRE11* bol hodnotený v časovom intervale 24, 48 a 72 hodín od transfekcie pomocou metódy qPCR v reálnom čase. Hodnoty expresie *MRE11* boli normalizované voči endogénnej kontrole *GAPDH* a relatívna expresia vypočítaná vzťahom $2^{-\Delta Ct}$. Namerané hodnoty v negatívnych kontrolách (NC) odpovedali základnej hladine expresie *MRE11* v neovplyvnených bunkách.

Zaujímavosťou pri porovnávaní výsledných dát bol opačný efekt zvýšenej hladiny miR-140 na expresiu *MRE11* u OxR línie a chemosenzitivnej DLD-1 línie. V bunkách OxR nielenže úroveň expresie *MRE11* pri zvýšenej hladine miR-140 nepoklesla, ale po 72 hodinách od transfekcie bol dokonca zaznamenaný výrazný nárast (Obr. č. 26). Tento výsledok môže naznačovať existenciu odlišností v aktivite DNA reparačných mechanizmov, ako v hladinách expresie reparačných proteínov u rezistentných kolorektálnych nádorových buniek. Analýza regulácie oprav DNA a reparačných proteínov u OxR buniek ostáva cieľom pokračujúcich štúdií.



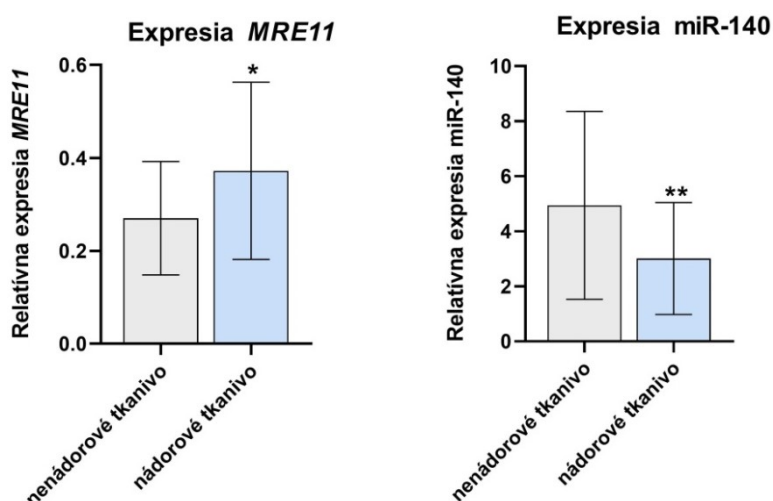
Obrázok č. 26: Relatívna expresia *Mre11* v čase pri zvýšenej hladine miR-140 v bunkách OxR línie. Negatívne kontroly (NC) predstavovali základnú hladinu expresie *MRE11* v neovplyvnených bunkách. Relatívna expresia *MRE11* bola vypočítaná pomocou vzťahu $2^{-\Delta Ct}$. K normalizácii bola použitá endogénna kontrola *GAPDH*.

5.5 Validácia pozorovaných výsledkov na patientských vzorkách

Výsledky *in vitro* funkčných testov na kolorektálnych nádorových líniách, ktoré odhalili potenciálny vplyv miR-140 na celkovú hladinu MRE11 ako aj vzťah medzi zvýšenou hladinou miR-140 a zníženou životaschopnosťou kolorektálnych nádorových buniek, viedli k snahe validovať získané výsledky na vzorkách pacientov s kolorektálnym karcinómom.

Párové vzorky od 33 pacientov predstavovali celkovú RNA vrátane miRNA, ktorá bola izolovaná z nádorového kolorektálneho tkaniva a zdravého okolitého tkaniva. Charakteristika skupiny pacientov je uvedená v kapitole 4.3 **Analýza patientských vzoriek** (Tab. č. 16).

Izolovaná RNA z nádorových a zdravých tkanív pacientov bola podrobená analýze qPCR v reálnom čase. Vo vzorkách bola hodnotená relatívna expresia *MRE11* a miR-140. Dáta z analýzy 66 patientských vzoriek potvrdili predpoklad, ktorý vyplynul z funkčných testov *in vitro*. V kolorektálnych nádorových tkanivách pacientov bola zistená na jednej strane preukázateľne zvýšená hladina MRE11 ($p = 0,027$), na strane druhej významne znížená expresia miR-140 ($p = 0,002$) oproti kontrolným zdravým tkanivám, v ktorých bol sledovaný opačný trend (Obr. č. 27). Na základe výsledku možno teda odhadovať, že miR-140 ako tumor-supresorová miRNA cieľi na mRNA proteínu MRE11, čím blokuje jeho zvýšenú hladinu v zdravých tkanivách a naopak, potlačenie aktivity miR-140 vedie v nádorových bunkách k zvýšenej hladine MRE11 a tým k zvýšenej aktivite DNA reparačných mechanizmov a lepšej životaschopnosti nádorových buniek.



Obrázok č. 27: Relatívna expresia *MRE11* a miR-140 v nádorovom a nenádorovom tkanive pacientov s kolorektálnym karcinómom. Expresia *MRE11* bola v nádorovom tkanive zvýšená v porovnaní s nenádorovým, naopak expresia miR-140 bola v nádorovom tkanive výrazne nižšia. Pozorovania mali štatistickú významnosť $p < 0,05$, graficky znázornenú symbolom „*“.

6. Diskusia

Nádorové ochorenia naďalej predstavujú veľký problém modernej medicíny a sú jednou z hlavných príčin úmrtí v rámci ľudskej populácie. Premena normálnych buniek organizmu v bunky nádorové je zložitý viacstupňový proces, v priebehu ktorého dochádza k postupnej akumulácii mutácií kritických génov, z ktorých najdôležitejšiu skupinu reprezentujú gény pre kontrolu a reguláciu bunkovej proliferácie a apoptózy (programovaná bunková smrť). Druhou nemenej dôležitou skupinou sú gény podieľajúce sa na kontrole stability genómu a opravách poškodenia genetickej informácie (*DNA damage response genes*, DDR) (O'Connor, 2015).

Správne fungovanie fyziologických procesov v bunkách závisí od udržiavania nukleotidovej sekvencie DNA v homeostatickej rovnováhe, pretože hromadenie poškodenia a poruchy DNA reparačných dráh prispievajú k nárastu mutácií, čo môže viesť k apoptóze. Skutočnosť, že chemosenzitivné nádorové bunky sú v porovnaní s bunkami zdravými náchylnejšie k cytotoxickým stimulom, umožnila zavedenie protinádorovej chemoterapie do klinickej praxe. Bežným spôsobom liečby je kombinovaná terapia, teda súčasné podávanie niekoľkých chemoterapeutík pre zvýšenie účinku ako je tomu v prípade liečby kolorektálneho karcinómu (*colorectal cancer*, CRC). V liečbe CRC je štandardne používaná kombinácia 5-fluórouracilu (5-FU), leukovorínu a oxaliplatiny (FOLFOX) alebo kapecitabínu s oxaliplatinou (CAPOX) (Panczyk, 2014).

Predložená diplomová práca vychádza z výsledkov získaných na Oddelení molekulárnej biológie nádorov (ÚEM AV ČR, v. v. i.). Tie boli publikované v štúdiu Naccarati *et al.* a popisovali genetické polymorfizmy v miestach väzieb regulačných miRNA (*single-nucleotide polymorphisms*, miRSNPs) na molekulách mRNA reparačných proteínov dvojreťazcových zlomov (*double-strand breaks*, DSBs), ich klinický význam a dopad na úspešnosť liečby CRC. Významným sa ukázal hlavne vplyv genotypových variant *MRE11* na riziko a prežívanie CRC (Naccarati *et al.*, 2016). Z tohto poznatku bola odvodená hypotéza predloženej diplomovej práce, ktorá predpokladá, že definíciou potenciálnych miRNA asociujúcich s proteínom MRE11 bude možné ovplyvniť nielen prežívanie kolorektálnych nádorových buniek, ale aj citlivosť voči aplikácii chemoterapeutika oxaliplatiny.

Hlavným cieľom práce bolo identifikovať a funkčne otestovať konkrétne miRNA, ktoré by mali schopnosť modulovať hladinu a aktivitu proteínu MRE11 v bunkách CRC línií. *In silico* analýzou bola ako možný post-transkripčný regulátor MRE11 predikovaná miR-140.

Z dostupných publikácií je známe, že pre-miR-140 je prepisovaná z lokusu 16q22.1 a pri procese maturácie vznikajú dve formy miR-140-3p a miR-140-5p, ktoré sa líšia vo svojej *seed* sekvencii (Rodriguez *et al.*, 2004). Ako potenciálny regulátor expresie *MRE11* bola v rámci tejto práce testovaná forma miR-140-3p.

Ďalšia časť diplomovej práce sa zamerala na *in vitro* funkčnú analýzu experimentálne zvýšenej hladiny miR-140 pomocou hsa-miR-140-3p *miRNA mimic* a jej vplyv na správanie buniek CRC línií a odpoveď na aplikáciu oxaliplatiny. Prvý funkčný test hodnotil vplyv miR-140 na úroveň bunkovej proliferácie. Získané dáta preukázali, že zvýšená hladina miR-140 v DLD-1 bunkách viedla po 24 hodinách k zníženiu proliferácie o 20 % ($p = 0,039$) pri porovnaní s negatívnou kontrolou (NC). Toto pozorovanie tak poukazuje na tumor-supresorovú aktivitu danej miRNA, čo je v súlade aj s dostupnými publikáciami, v ktorých autori popisovali zníženú reguláciu miR-140 v rade nádorov, vrátane CRC (Zhai *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016). V týchto publikáciách je taktiež zistená súvislosť medzi zníženou hladinou miR-140-5p a zvýšenou mierou epiteliálne-mezenchymálnej tranzície (EMT), bunkovej proliferácie, invazivity a metastázovania CRC. Prispievala k tomu hlavne zvýšená expresia niekoľkých priamych cieľom miR-140-5p, ku ktorým sa radí proteín Smad2, Smad3, HDAC4 či VEGF-A (Zhai *et al.*, 2015; Pais *et al.*, 2010; Song *et al.* 2009; Zhang *et al.*, 2015). Ešte výraznejší pokles proliferácie sa ukázal po aplikácii oxaliplatiny, ktorý dosiahol v bunkách so zvýšenou hladinou miR-140 po 48 hodinách od aplikácie 23 % ($p = 0,031$) a po 72 hodinách až 26 % ($p = 0,028$). Pozorovanie vplyvu zvýšenej hladiny miR-140 na účinnosť oxaliplatiny bolo navyše podporené signifikantným znížením klonogénneho potenciálu DLD-1 buniek z dlhodobého hľadiska. Konzistentne k tomu bol zistený narastajúci trend bunkovej cytotoxicity a to ako pri samotnom zvýšení miR-140, tak po aplikácii oxaliplatiny. Preukázaný nárast cytotoxicity však nevykazoval štatistickú významnosť. Obdobné výsledky zvýšenej expresie miR-140 na potlačenie bunkovej proliferácie boli zistené u línie U-2 OS odvodenej od osteosarkómu a HCT116 línie (Song *et al.*, 2009). Po zistení vplyvu na zvýšenú cytotoxicitu sme sa rozhodli analyzovať ako miR-140 vplýva na reguláciu bunkového cyklu a či bude jej účinkom dochádzať k zmenám distribúcie v jednotlivých fázach bunkového cyklu. Z nameraných hodnôt vyplýva, že po experimentálnom zvýšení miR-140 došlo u buniek DLD-1 k spomaleniu bunkového cyklu vo fáze G1, zrejme z dôvodu akumulácie poškodenia v dôsledku vyššej hladiny miR-140. Výraznejší efekt na zastúpenie buniek v jednotlivých fázach bunkového cyklu bol pozorovaný po aplikácii oxaliplatiny, keď došlo k poklesu vo fáze S a zároveň nárastu počtu buniek v G1, čo značí možnú zástavu cyklu na prechode G1/S a aktiváciu dráh vedúcich k apoptóze, keďže

práve v tomto prípade bolo zistené významné zníženie bunkovej proliferácie a zvýšenie cytotoxicity. Získané údaje možno zrovnat' z výsledkami štúdie Zhai *et al.*, ktorí na kolorektálnej nádorovej línii HCT116 po ektoptickej transfekcii hsa-miR-140-5p *miRNA mimic* rovnako preukázali zvýšené zastúpenie v G1 a pokles v S fáze. Z toho vyvodili, že zvýšená hladina miR-140-5p indukuje zástavu bunkového cyklu v G1 kontrolnom bode (G1 *checkpoint*) (Zhai *et al.*, 2015).

Dnes je už jednoznačne preukázané, že miRNA zohráva veľkú úlohu pri vývoji a progresii nádorových ochorení. Zároveň sa postupne začína uvažovať o terapeutickom potenciáli miRNA ako aj možnom využití k prekonávaniu rezistencie voči chemoterapeutikám prostredníctvom regulácie aberantne aktívnych proteínov. Z toho vyplýva dôležitosť štúdií, ktoré sa snažia identifikovať konkrétne miRNA a k nim aj špecifické ciele v rámci rozličných nádorových ochorení. Pre funkčné potvrdenie možnej regulácie proteínu MRE11 prostredníctvom miR-140 bolo v DLD-1 bunkách po experimentálnom zvýšení hladiny miR-140 sledované či sa bude v čase meniť úroveň expisie *MRE11*. Metódou qPCR v reálnom čase sa potvrdil významný pokles expisie *MRE11* pri zvýšenej hladine miR-140 v porovnaní s NC a tento pokles bol stabilný ešte 72 hodín po transfekcii ($p = 0,028$). Zhodný efekt bol potvrdený aj na úrovni proteínov. Mutácie a narušená regulácia proteínu MRE11 bývajú spojené s celkovým znížením aktivity MRN komplexu a nahromadením vyššieho množstva DNA, čo môže viesť k vyššej citlivosti voči látkam poškodzujúcim štruktúru DNA (Buis *et al.*, 2008). Preto sme sa v ďalšom kroku zamerali na detekciu poškodenia DNA u DLD-1 buniek so zvýšenou hladinou miR-140. Významný nárast poškodenia v porovnaní s NC však nebol pozorovaný a to ani po aplikácii oxaliplatiny. Rozdiely boli vo všetkých testovaných vzorkách vždy pod 0,5 %. Pozorované minimálne rozdiely v množstve poškodenia DNA však mohli byť spôsobené limitáciou metódy a to z dôvodu, že alkalická verzia Comet Assay primárne deteguje jednoreťazcové zlomy molekúl DNA (*single-strand breaks*, SSBs). Zároveň stabilné krížne väzby DNA indukované molekulami oxaliplatiny môžu oblasti zlomov chrániť a tým zabrániť prerušeniu cukor-fosfátovej kostry molekúl DNA (Chaney *et al.*, 2005). Preto bola pre overenie prítomnosti DSBs prevedená proteínová analýza, ktorá zisťovala hladinu proteínu γ H2AX, považovaného za marker DSBs (Bonner *et al.*, 2008), a zároveň aj proteínu RAD51, ktorý sa taktiež účastní pri oprave DSBs poškodenia. Metódou elektroforetickej separácie s následným prenosom separovaných proteínov na membránu a imunodetekciou pomocou špecifických protilátok bola analyzovaná úroveň proteínov MRE11, RAD51 a γ H2AX po 48 hodinách od transfekcie DLD-1 buniek. Výsledné dáta proteínovej analýzy ukázali, že po navýšení miR-140 nastal pokles hladiny

proteínu RAD51 na jednej strane a nárast γ H2AX na strane druhej. Potvrďuje to počiatočné očakávanie, že pri zníženej hladine MRE11 sa budú akumulovať DSBs poškodeniam DNA molekúl a tým pádom aj γ H2AX ako priamy marker DSBs (Kuo *et al.*, 2008). A zároveň, že hladina proteínu RAD51, ku ktorého aktivácii dochádza až potom, čo je poškodenie rozpoznané proteínom MRE11, bude znížená kvôli poklesu aktivity MRN komplexu. RAD51 je dôležitý faktor homologickej rekombinácie, ktorý je zároveň prediktívnym markerom odpovede na terapiu v rade nádorov (Tennstedt *et al.*, 2013). U nemalobunkového karcinómu pľúc (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) jeho zvýšená expresia prispieva k rezistencii voči chemoterapeutikám, ktoré tvoria medzi-reťazcové križne väzby DNA, ako napr. cisplatina (Takenaka *et al.*, 2007). Ihara *et al.* zas preukázali na testovanej skupine 78 pacientov s metastatickým a rekurentným CRC, že jedinci s negatívnou expresiou *MRE11* a *RAD51* lepšie reagovali na liečbu oxaliplatinou a mali signifikantne predĺžený čas prežívania bez progresie (*progression-free survival*, PFS). V závere svojej štúdie uviedli, že pacienti s CRC so zníženou až negatívnou expresiou génov, ktoré kódujú proteíny opráv DSBs budú vykazovať väčšiu citlivosť na liečbu oxaliplatinou, a že expresia spomínaných proteínov predstavuje významný prognostický indikátor liečby CRC (Ihara *et al.*, 2016).

Napriek zlepšeniu prognózy pacientov s CRC vďaka súčasným terapeutickým postupom je toto ochorenie naďalej zaťažené vysokou mierou recidívy s následným 5-ročným prežívaním len niečo málo cez 10 % prípadov (Brenner *et al.*, 2014). Zlyhanie liečby je často zapríčinené prirodzenou či získanou rezistenciou z dôvodu vysokej heterogenity nádorových buniek. Za účelom zistiť, či by mohla mať miR-140 podobný negatívny efekt na životaschopnosť nádorových buniek, ktoré vykazujú získanú chemorezistenciu a či by zároveň mala schopnosť túto rezistenciu ovplyvniť, bola rovnakou *in vitro* funkčnou analýzou otestovaná línia so získanou čiastočnou rezistenciou voči oxaliplatine. OxR chemorezistentná línia bola odvodená od štandardnej DLD-1 línie a vykazovala 3,5-krát nižšiu citlivosť na oxaliplatinu než chemosenzitivná DLD-1 línia. Z prezentovaných výsledných dát vyplýva, že efekt zvýšenej miR-140 na životaschopnosť chemorezistentných CRC buniek nie je tak jednoznačný ako tomu bolo u chemosenzitivnej DLD-1 línie. Bol síce pozorovaný mierny pokles proliferácie po zvýšení hladiny miR-140 v porovnaní s NC, ten však nemal štatistickú významnosť a to dokonca ani po aplikácii oxaliplatiny. Efekt miR-140 u rezistentnej línie OxR sa nepodarilo preukázať ani klonogénnou analýzou, keďže klonogénny potenciál buniek sa prakticky vôbec nezmenil a to ani v situácii, keď bola na bunky aplikovaná oxaliplatina. Úroveň cytotoxicity sa síce vplyvom zvýšenej hladiny miR-140 v čase zvyšovala, avšak pokiaľ boli v jednotlivých časoch porovnané navzájom vzorky so zvýšenou miR-140 a NC

rozdiely neboli opäť jednoznačné a ani pri kombinácii s oxaliplatinou nevykazovali štatistickú významnosť. Úplne odlišný výsledok v porovnaní s DLD-1 líniou bol zaznamenaný pri zisťovaní efektu zvýšenej hladiny miR-140 na expresiu *MRE11* u OxR línie. V bunkách OxR línie úroveň expresie *MRE11* pri zvýšenej hladine miR-140 v čase vôbec nepoklesla a po 72 hodinách od transfekcie bol dokonca zaznamenaný jej nárast. Tento výsledok však odpovedá vyššie zmieneným skutočnostiam, že zvýšená regulácia a expresie *MRE11* vedie k rezistencii CRC buniek a u pacientov bola dokonca korelovala s horším prežívaním (Ihara *et al.*, 2016). Dôvodom by mohla byť existencia odlišností v aktivite DNA reparačných mechanizmov, ako v hladinách expresie reparačných proteínov u rezistentných kolorektálnych nádorových buniek. Na základe predpokladu, že bunky OxR línie zrejme vykazujú odlišnú úroveň aktivity DNA reparačných mechanizmov a budú sa v odlišnej miere vyrovnávať s poškodením DNA, rozhodli sme sa toto poškodenie analyzovať. Ale ako v prípade DLD-1, tak ani u OxR sa nepodarilo zachytiť výrazne zmeny v poškodení DNA za situácie zvýšenej hladiny miR-140. Rozdiely pod 0,1% boli pozorované vo všetkých testovaných vzorkách, vrátane tých, na ktoré bola aplikovaná oxaliplatina. Konečnou analýzou bolo sledovanie vplyvu zvýšenej miR-140 na reguláciu bunkového cyklu u OxR línie. Tu sa podarilo preukázať, že po 48 hodinách od experimentálneho zvýšení miR-140 došlo k poklesu zastúpenia buniek vo fázach G2/M o 10 % a naopak akumulácii buniek v S fáze, čo môže značiť zástavu bunkového cyklu v S fáze kvôli problému s replikáciou. V prípade, ak bola na bunky aplikovaná oxaliplatina došlo k odlišnej distribúcii v rámci bunkového cyklu s nárastom zastúpenia buniek vo fázach G2/M a poklese v G1 fáze, čo mohlo byť dôsledkom zástavy bunkového cyklu v G2/M. Z uvedených dát vyplýva, že mnohé aspekty vývoja chemorezistencie ešte stále nie sú objasnené, preto analýza regulácie opráv DNA a reparačných proteínov u OxR buniek ostáva cieľom našich prebiehajúcich pokračujúcich štúdií.

V poslednej časti práce sme pozorované výsledky z CRC bunkových línií validovali na vzorkách získaných od 33 pacientov s CRC. Na vzorkách tkanív primárneho kolorektálneho karcinómu a nenádorových kolorektálnych tkanív bola prevedená analýza expresie génu pre miR-140. Výsledné dáta preukázali významne zníženú úroveň expresie génu pre miR-140 ($p = 0,002$) v kolorektálnom nádorom tkanive oproti kontrolnému zdravému tkanivu. To korelovalo s výsledkami publikovanými v štúdiu Li *et al.*, ktorí okrem zníženej expresie danej miRNA v 31 vzorkách primárnych kolorektálnych karcinómov preukázali ďalšie signifikantné zníženie v metastázach odvodených od týchto primárnych nádorov (Li *et al.*, 2018). Čím sa len opäť potvrdzuje úloha miR-140 vo vývoji

a metastázovaní CRC. Zároveň bola rovnakým spôsobom v testovaných patientskych vzorkách analyzovaná expresia *MRE11*. V prípade proteínu MRE11 bola naopak pozorovaná značne zvýšená hladina expzie ($p = 0,027$) vo vzorkách kolorektálneho nádorového tkaniva v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Tento fenomén možno prirovnať k výsledkom, ktoré boli zistené u karcinómu prsníka či pacientov s karcinómom konečníka. Kedy vysoká expresia *MRE11* podporovala malígnu fenotyp, prispievala k invazivite, metastázovaniu, zhoršenej prognóze a dokonca chemorezistencii (Yuan *et al.*, 2012, Ho *et al.*, 2016).

Z predložených výsledkov tejto diplomovej práce a po zhodnotení relevantných publikácií možno usudzovať, že miR-140 ako tumor-supresorová miRNA sa pravdepodobne podieľa na post-transkripčnej regulácii senzorického proteínu dvojreťazcových zlomov MRE11, blokuje jeho zvýšenú hladinu v zdravých tkanivách a naopak, pri zníženej regulácii v nádorových bunkách prispieva k zvýšenej hladine a aktivite MRE11 s čím by mohla súvisieť aj celkovo zvýšená aktivita DNA reparačných mechanizmov, ktorá by sa mohla odzrkadliť na lepšej životaschopnosti nádorových buniek a potenciálne byť jedným z mechanizmov vývoja chemorezistencie. Očakávame, že nadväzujúce funkčné štúdie na bunkách so získanou čiastočnou rezistenciou OxR ako aj pripravovanej *MRE11*-deficientnej línii nám prinesú ďalšie užitočné poznatky o možnom vzťahu tumor-supresorovej miR-140 s proteínom MRE11.

7. Zhrnutie a záver

Predložená diplomová práca sa zaoberá problematikou aktivity DNA reparačných mechanizmov v odpovedi kolorektálneho karcinómu na chemoterapeutickú liečbu a možnou moduláciou aktivity vybraných reparačných procesov prostredníctvom krátkych nekódujúcich RNA, tzv. microRNA. V rámci praktickej časti si práca kládla za cieľ definovať a funkčne otestovať konkrétne microRNA, ktoré by sa mohli podieľať na regulácii proteínu MRE11 ako senzora dvojreťazcových zlomov, a touto reguláciou by mohli ovplyvniť životaschopnosť kolorektálnych nádorových buniek ako aj senzitivitu voči oxaliplatine, štandardne používanému chemoterapeutiku pri liečbe kolorektálneho karcinómu.

Na základe naplnenia stanovených cieľov sa nám podarilo zistiť:

- *In silico* analýzou bola definovaná miR-140 ako potenciálny regulátor translácie a hladiny proteínu MRE11.
- *In vitro* funkčná analýza na chemosenzitivnej kolorektálnej nádorovej línii DLD-1 preukázala vplyv zvýšenej hladiny miR-140 na zníženie úrovne proliferácie a klonogénneho potenciálu ako aj zvýšenie cytotoxicity. Analýza expície génu *MRE11* u DLD-1 buniek preukázala, že po experimentálnom zvýšení miR-140 dochádzalo k poklesu expície aj celkovej hladiny proteínu MRE11.
- *In vitro* funkčná analýza na chemorezistentnej kolorektálnej nádorovej línii OxR odhalila odlišný spôsob regulácie ako tomu bolo u DLD-1. Zvýšená hladina miR-140 nevedla k výraznému poklesu proliferácie buniek ani expície *MRE11*.
- Analýza miR-140 a MRE11 v kolorektálnych nádorových tkanivách a zdravých kolorektálnych tkanivách 33 pacientov ukázala významne zvýšenú úroveň expície *MRE11* v nádorových tkanivách v porovnaní s nenádorovými, a naopak signifikantne zníženú expíciu miR-140 v nádorových tkanivách oproti nenádorovým.

Z prezentovaných dát vyplýva, že miR-140 ako tumor-supresorová miRNA potenciálne cieľi na mRNA proteínu MRE11, čím pri normálnej expícii v zdravých tkanivách bráni zvyšovaniu jeho hladiny. Znížená aktivita miR-140 v kolektálnych nádorových bunkách naopak môže viesť k zvýšenej úrovni MRE11 a podpore malígneho fenotypu. MiR-140 by tak do budúcnosti mohla nájsť uplatnenie v terapii vybranej skupiny pacientov s kolorektálnym karcinómom.

8. Zoznam použitej literatúry

Odborné články

Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.-W., Bartel D.P. (2015): Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 4:e050050.

Alarcón, C.R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., Tavazoie, S.F. (2015): N⁶-methyl-adenosine (m⁶A) marks primary microRNAs for processing. *Nature* 519: 482–485.

Arango, D., Wilson, A.J., Shi, Q., Corner, G.A., Aranes, M.J., Nicholas, C., Lesser, M., Mariadason, J.M., Augenlicht L.H. (2004): Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br. J. Cancer* 91: 1931-1946.

Balacescu, O., Sur, D., Cainap, C., Visan, S., Cruceriu, D., Manzat-Saplacan, R., Muresan, M.-S., Balacescu, L., Lisencu, C., Irimie, A. (2018): The impact of miRNA in colorectal cancer progression and its liver metastases. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 3711.

Bartel, D.P. (2009): MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215–233.

Binefa, G., Rodriguez-Moranta, F., Teule, A., Medina-Hayas, M. (2014): Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. *World J. Gastroenterol.* 20: 6786–6808.

Boland, C.R., Koi, M., Chang, D.K., Carethers, J.M. (2008): The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam. Cancer* 7: 41–52.

Borralho, P.M., Kren, B.T., Castro, R.E., Moreira Da Silva, I.B., Steer, C.J., Rodrigues, C.M.P. (2009): MicroRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *FEBS Journal* 276: 6689–6700.

Botteri, E., Iodice, S., Raimondi, S., Maisonneuve, P., Lowenfels, A.B. (2008): Cigarette smoking and adenomatous polyps: A meta-analysis. *Gastroenterology* 134: 388–395.

Bronner, C.E., Baker, S.M., Morrison, P.T., Warren, G., Smith, L.G., Lescoe, M.K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., Lindblom, A. *et al.* (1994): Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368: 258–261.

Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., Pommier, Y. (2008): γ H2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8: 957–967.

Brenner, H., Kloor, M., Pox, C.P. (2014): Colorectal cancer. *Lancet* 383: 1490-1502.

Brown, J.S., O’Carrigan, B., Jackson, S.P., Yap, T.A. (2017): Targeting DNA repair in cancer: Beyond PARP inhibitors. *Cancer Discov.* 7: 20–37.

Buis, J., Wu, Y., Deng, Y., Leddon, J., Westfield, G., Eckersdorff, M., Sekiguchi, J.M., Chang, S., Ferguson, D.O. (2008): Mre11 nuclease activity has essential roles in DNA repair and genomic stability distinct from ATM activation. *Cell* 135: 85–96.

- Burt, R.W. (2000): Colon cancer screening. *Gastroenterology* 119: 837–853.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K. *et al.* (2002): Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 15524–15529.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., Croce, C.M. (2004): Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 2999–3004.
- Capitain, O., Boisdron-Celle, M., Poirier, A.-L., Abadie-Lacourtoisie, S., Morel, A., Gamelin, E. (2008): The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J.* 8: 256–267.
- Ciccia, A., Elledge, S.J. (2010): The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40: 179–204.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M. *et al.* (2005): MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 13944–13949.
- Coley, H.M. (2004): Development of drug-resistant models. *Methods Mol. Med.* 88: 267-273.
- Collins, A.R. (2004): The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26: 249–261.
- De Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G. *et al.* (2000): Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 18: 2938–2947.
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., Hannon, G.J. (2004): Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature* 432: 231–235.
- Ding, L., Lan, Z., Xiong, X., Ao, H., Feng, Y., Gu, H., Yu, M., Cui, Q. (2018): The dual role of microRNAs in colorectal cancer progression. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 2791.
- Diviš, P., Divišová, K., Katolická, J., Rotnáglová, S. (2016): Kolorektální karcinom - současný pohled na diagnostiku a léčbu. *Med. praxi* 13: 34–38.
- Donohoe, C.L., Pidgeon, G.P., Lysaght, J., Reynolds, J.V. (2010): Obesity and gastrointestinal cancer. *Brit. J. Surg.* 97: 628–642.
- Douillard, J.Y., Cunningham, D., Roth, A.D., Navarro, M., James, R.D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M. *et al.* (2000): Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: A multicentre randomised trial. *Lancet* 355: 1041-1047.
- Duncan, T., Trewick, S.C., Koivisto, P., Bates, P.A., Lindahl, T., Sedgwick, B. (2002): Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 16660–16665.
- Ebert, M.S., Neilson, J.R., Sharp, P.A. (2007): MicroRNA sponges: Competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat. Methods* 4: 721-726.

- Eiring, A.M., Harb, J.G., Neviani, P., Garton, C., Oaks, J.J., Spizzo, R., Liu, S., Schwind, S., Santhanam, R., Hickey, C.J. *et al.* (2010): MiR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* 140: 652–665.
- Esquela-Kerscher, A., Slack, F.J. (2006): Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6: 259–269.
- Esteller, M., Hamilton, S.R., Burger, P.C., Baylin, S.B., Herman, J.G. (1999): Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 59: 793–797.
- Evan, G.I., Vousden, K.H. (2001): Limits to clonal autonomy of metazoan cells. *Nature* 411: 342–348.
- Fagbemi, A.F., Orelli, B., Scharer, O.D. (2011): Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 10: 722–729.
- Faivre, S., Chan, D., Salinas, R., Woynarowska, B., Woynarowski, J.M. (2003): DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 66: 225–237.
- Fearon, E.R., Vogelstein, B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759–767.
- Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., Negri, E., Straif, K., Romieu, I., La Vecchia, C. *et al.* (2011): Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann. Oncol.* 22: 1958–1972.
- Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Gather, J., Kane, M., Kolodner, R. (1993): The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75: 1027–1038.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., Bartel, D.P. (2009): Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19: 92–105.
- Gandomani, H.S., Yousefi, S.M., Aghajani, M., Mohammadian-Hafshejani, A., Tarazoj, A.A, Pouyesh, V., Salehiniya, H. (2017): Colorectal cancer in the world: incidence, mortality and risk factors. *Biomed. Res. Ther.* 4: 1656–1675.
- Gavande, N.S., VanderVere-Carozza, P.S., Hinshaw, H.D., Jalal, S.I., Sears, C.R., Pawelczak, K.S., Turchi, J.J. (2016): DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? *Pharmacol. Ther.* 160: 65–83.
- Ghiringhelli, F., Richard, C., Chevrier, S., Végran, F., Boidot, R. (2016): Efficiency of olaparib in colorectal cancer patients with an alteration of the homologous repair protein. *World J. Gastroenterol.* 22: 10680–10686.
- Ghorai, A., Ghosh, U. (2014): MiRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post-transcriptional processing of coding genes. *Front. Genet.* 5: 100.
- Giannini, G., Ristori, E., Cerignoli, F., Rinaldi, C., Zani, M., Viel, A., Ottini, L., Crescenzi, M., Martinotti, S., Bignami, M. *et al.* (2002): Human MRE11 is inactivated in mismatch repair-deficient cancers. *EMBO Rep.* 3: 248–254.
- Gu, L., Hong, Y., McCulloch, S., Watanabe, H., Li, G. M. (1998): ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic Acids Res.* 26: 1173–1178.

- Haggar, F.A., Boushey, R.P. (2009): Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin. Colon Rectal Surg.* 22: 191–197.
- Heald, B., Mester, J., Rybicki, L., Orloff, M.S., Burke, C.A., Eng, C. (2010): Frequent gastrointestinal polyps and colorectal adenocarcinomas in a prospective series of PTEN mutation carriers. *Gastroenterology* 139: 1927–1933.
- Hegde, M.L., Hazra, T.K., Mitra, S. (2008): Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* 18: 27–47.
- Hernández, R., Sánchez-Jiménez, E., Melguizo, C., Prados, J., Rama, A.R. (2018): Downregulated microRNAs in the colorectal cancer: diagnostic and therapeutic perspectives. *BMB Rep.* 51: 563–571.
- Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T., Liu J. (2010): Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 44: 113–139.
- Ho, V., Chung, L., Revoltar, M., Lim, S.H., Tut, T.-G., Abubakar, A., Henderson, C.J., Chua, W., Ng, W., Lee, M. *et al.* (2016): MRE11 and ATM expression levels predict rectal cancer survival and their association with radiotherapy response. *PLoS ONE* 11: e0167675.
- Hoeijmakers, J.H.J. (2009): DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* 361: 1475–1485.
- Chan, D.S.M., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D.C., Kampman, E., Norat, T. (2011): Red and processed meat and colorectal cancer incidence: Meta-analysis of prospective studies. *PLoS ONE* 6: e20456.
- Chaney, S.G., Campbell, S.L., Bassett, E., Wu, Y. (2005): Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 53: 3-11.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Gou, X. *et al.* (2008): Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 18: 997–1006.
- Ibrahim, A.F., Weirauch, U., Thomas, M., Gruñweller, A., Hartmann, R.K., Aigner, A. (2011): MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma. *Cancer Res.* 71: 5214–5224.
- Ihara, K., Yamaguchi, S., Ueno, N., Tani, Y., Shida, Y., Ogata, H., Domeki, Y., Okamoto, K., Nakajima, M., Sasaki, K. *et al.* (2016): Expression of DNA double-strand break repair proteins predicts the response and prognosis of colorectal cancer patients undergoing oxaliplatin-based chemotherapy. *Oncol. Rep.* 35: 1349–1355.
- Jackson, S.P., Bartek, J. (2009): The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071–1078.
- Jasperson, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., Burt, R.W. (2010): Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 138: 2044–2058.
- Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D. (2003): Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115: 209–216.
- Kim, G., Ison, G., McKee, A.E., Zhang, H., Tang, S., Gwise, T. *et al.* (2015): FDA approval summary: Olaparib monotherapy in patients with deleterious germline BRCA-mutated advanced ovarian cancer treated with three or more lines of chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 21: 4257–4261.

- Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Su, L.-K., Vogelstein, B., Bryan, T.M., Levy, D.B., Smith, K. J., Preisinger, A.C., Hedge, P., McKechnie, D. *et al.* (1991): Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253: 661–665.
- Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1996): Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159–170.
- Kline, C.L.B., El-Deiry, W.S. (2013): Personalizing colon cancer therapeutics: Targeting old and new mechanisms of action. *Pharmaceuticals* 6: 988–1038.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., Griffiths-Jones, S. (2019): MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 47: 155-162.
- Král, J., Slyšková, J., Vodička, P., Špičák, J. (2016): Molekulární genetiky kolorektálního karcinomu. *Klin. Onkol.* 29: 419–427.
- Krokan, H.E., Bjoras, M. (2013): Base excision repair. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 5: a012583.
- Kuo, L.J., Yang, L.-X (2008): γ -H2AX - A novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 22: 305–310.
- Lamarche, B.J., Orazio, N.I., Weitzman, M.D. (2010): The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett.* 584: 3682–3695.
- Leach, F.S., Nicolaidis, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomaki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L.A., Nystrom-Lahti, M. *et al.* (1993): Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75: 1215–1225.
- Leichman, L., Groshen, S., O'Neil, B.H., Messersmith, W., Berlin, J., Chan, E., Leichman, C. G., Cohen, S.J., Cohen, D., Lenz, H.-J. *et al.* (2016): Phase II study of olaparib (AZD-2281) after standard systemic therapies for disseminated colorectal cancer. *Oncologist* 21: 172–177.
- Li, F.-Y., Lai, M.-D. (2009): Colorectal cancer, one entity or three. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 10: 219–229.
- Li, G.M. (2008): Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 18: 85–98.
- Li, J., Lei, K.C., Wu, Z.R., Li, W.H., Liu, G.X., Liu, J.W., Cheng, F.X., Tang Y. (2016): Network-based identification of microRNAs as potential pharmacogenomic biomarkers for anticancer drugs. *Oncotarget* 7: 45584-45596.
- Li, J., Zou, K., Yu, L., Zhao, W., Lu, Y., Mao, J., Wang, B., Wang, L. Fan, S., Song, B., Li, L. (2018): MicroRNA-140 inhibits the epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acid* 10: 426–437.
- Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., Hemminki, K. (2000): Environmental and heritable factors in the causation of cancer. *N. Engl. J. Med.* 343: 78–85.
- Lieber, M.R. (2008): The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.* 283: 1–5.
- Liu, X., Wang, S., Yuan, A., Yuan, X., Liu, B. (2016): MicroRNA-140 represses glioma growth and metastasis by directly targeting ADAM9. *Oncol. Rep.* 36: 2329–2338.

- Lovejoy, C.A., Cortez, D. (2009): Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA Repair (Amst)* 8: 1004–1008.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A. *et al.* (2005): MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834–838.
- Lynch, H.T., Shaw, M.W., Magnuson, C.W., Larsen, A.L., Krush, A.J. (1966): Hereditary factors in cancer: study of two large midwestern kindreds. *Arch. Intern. Med.* 117: 206-212.
- Lynch, H.T., Snyder, C.L., Shaw, T.G., Heinen, C.D., Hitchins, M.P. (2015): Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat. Rev. Cancer* 15: 181–194.
- Ma, L., Bajic, V.B., Zhang, Z. (2013): On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biology* 10: 924–933.
- Ma, Y.-L., Zhang, P., Wang, F., Moyer, M.P., Yang, J.J., Liu, Z.H., Peng, J.-Y., Chen, H.-Q., Zhou, Y.-K., Liu, W.-J., Qin, H.-L. (2011): Human embryonic stem cells and metastatic colorectal cancer cells shared the common endogenous human microRNA-26b. *J. Cell. Mol. Med.* 15: 1941–1954.
- MacFarlane, J.K., Ryall, R.D., Heald, R.J. (1993): Mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet* 341: 457-460.
- Mahaney, B.L., Meek, K., Lees-Miller, S.P. (2009): Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem. J.* 417: 639–650.
- Martin, S.A., McCarthy, A., Barber, L.J., Burgess, D.J., Parry, S., Lord, C.J., Ashworth, A. (2009): Methotrexate induces oxidative DNA damage and is selectively lethal to tumour cells with defects in the DNA mismatch repair gene MSH2. *EMBO Mol. Med.* 1: 323–337.
- Martinez-Balibrea, E., Martínez-Cardús, A., Ginés, A., Ruiz de Porras, V., Moutinho, C., Layos, L., Manzano, J.L., Bugés, C., Bystrup, S., Esteller, M., Abad A. (2015): Tumor-related molecular mechanisms of oxaliplatin resistance. *Mol. Cancer Ther.* 14: 1767–1776.
- McQuade, R.M., Stojanovska, V., Bornstein, J.C., Nurgali, K. (2017): Colorectal cancer chemotherapy: The evolution of treatment and new approaches. *Curr. Med. Chem.* 24: 1–21.
- Melo, S.A., Moutinho, C., Ropero, S., Calin, G.A., Rossi, S., Spizzo, R., Fernandez, A.F., Davalos, V., Villanueva, A., Montoya, G. *et al.* (2010): A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell* 18: 303–315.
- Meng, F., Henson, R., Lang, M., Wehbe, H., Maheshwari, S., Mendell, J.T., Jiang, J., Schmittgen, T.D., Patel, T. (2006): Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 130: 2113–2129.
- Meyerhardt, J.A., Mayer, R.J. (2005): Systemic therapy for colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 352: 476-487.
- Michael, M.Z., O'Connor, S.M., van Holst Pellekaan, N.G., Young, G.P., James, R.J. (2003): Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.* 1: 882–891.
- Miller, K.D., Nogueira, L., Mariotto, A.B., Rowland, J.H., Yabroff, K.R., Alfano, C.M., Jemal, A., Kramer, J.L., Siegel, R.L. (2019): Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.* 0: 1-23.

- Naccarati, A., Rosa, F., Vymetalkova, V., Barone, E., Jiraskova, K., Di Gaetano, C., Novotny, J., Levy, M., Vodickova, L., Gemignani, F. *et al.* (2016): Double-strand break repair and colorectal cancer: gene variants within 3'UTRs and microRNAs binding as modulators of cancer risk and clinical outcome. *Oncotarget* 7: 23156-23169.
- O'Connor, M. J. (2015): Targeting the DNA damage response in cancer. *Mol. Cell* 60: 547–560.
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., Tsukihara T. (2009): A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* 326: 1275–1279.
- Olena, A.F., Patton, J.G. (2010): Genomic organisation of miRNAs. *J. Cell. Physiol.* 222: 540–545.
- Ørom, U.A., Nielsen, F.C., Lund, A.H. (2008): MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* 30: 460–471.
- Pais, H., Moulton, V., Nicolas, F.E., Soond, S.M., Swinger, T.E., Clark, I.M., Chantry, A., Moulton, V., Dalmay, T. (2010): Analyzing mRNA expression identifies Smad3 as a microRNA-140 target regulated only at protein level. *RNA* 16: 489–494.
- Panczyk, M. (2014): Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World J. Gastroenterol.* 20: 9775–9827.
- Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B., Aguilera, A. (2009): DNA double-strand break repair: How to fix a broken relationship. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 1039–1056.
- Piva, R., Spandidos, D.A., Gambari, R. (2013): From microRNA functions to microRNA therapeutics: Novel targets and novel drugs in breast cancer research and treatment. *Int. J. Oncol.* 43: 985–994.
- Place, R.F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E.J., Dahiya, R. (2008): MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 1608–1613.
- Qian, X., Yu, J., Yin, Y., He, J., Wang, L., Li, Q., Zhang, L.-Q., Li, Ch.-Y., Shi, Z.-M., Xu, Q. *et al.* (2013): MicroRNA-143 inhibits tumor growth and angiogenesis and sensitizes chemosensitivity to oxaliplatin in colorectal cancers. *Cell Cycle* 12: 1385–1394.
- Raymond, E., Chaney, S.G., Taamma, A., Cvitkovic, E. (1998): Oxaliplatin: A review of preclinical and clinical studies. *Ann. Oncol.* 9: 1053-1071.
- Reinhardt, H.C., Jiang, H., Hemann, M.T., Yaffe, M.B. (2009): Exploiting synthetic lethal interactions for targeted cancer therapy. *Cell Cycle* 8: 3112–3119.
- Rodrigues, A.S., Dinis, J., Gromicho, M., Martins, C., Laires, A., Rueff, J. (2012): Genomics and cancer drug resistance. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13: 651–673.
- Rodrigues, A.S., Gomes, B.C., Martins, C., Gromicho, M., Oliveira, N.G., Guerreiro, P.S., Rueff, J. (2013): DNA repair and resistance to cancer therapy. New research directions in DNA repair, Clark Chen. IntechOpen: 489–528.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., Bradley, A. (2004): Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 14: 1902–1910.

- Rosenfeld, N., Aharonov, R., Meiri, E., Rosenwald, S., Spector, Y., Zepeniuk, M., Benjamin, H., Shabes, N., Tabak, S., Levy, A. *et al.* (2008): MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat. Biotechnol.* 26: 462–469.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A., Jones, P.A. (2006): Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9: 435–443.
- Saltz, L.B., Cox, J.V., Blanke, C., Rosen, L.S., Fehrenbacher, L., Moore, M.J., Maroun, J.A., Ackland, S.P., Locker, P.K., Pirotta, N. *et al.* (2000): Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 343: 905–914.
- Sana, J., Faltejskova, P., Svoboda, M., Slaby, O. (2012): Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *J. Transl. Med.* 10: 103.
- Segditsas, S., Tomlinson, I. (2006): Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 25: 7531–7537.
- Schärer, O.D. (2013): Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5: a012609.
- Situ, Y., Chung, L., Lee, C.S., Ho, V. (2019): MRN (MRE11-RAD50-NBS1) complex in human cancer and prognostic implications in colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 816.
- Slattery, M.L., Boucher, K.M., Caan, B.J., Potter, J.D., Ma, K.-N. (1998): Eating patterns and risk of colon cancer. *Am. J. Epidemiol.* 148: 4-16.
- Song, B., Wang, Y., Xi, Y., Kudo, K., Bruheim, S., Botchkina, G.I., Gavin, E., Wan, Y., Formentini, A., Kornmann, M. *et al.* (2009): Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene* 28: 4065–4074.
- Takenaka, T., Yoshino, I., Kouso, H., Ohba, T., Yohena, T., Osoegawa, A., Shoji, F., Maehara, Y. (2007): Combined evaluation of Rad51 and ERCC1 expressions for sensitivity to platinum agents in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 121: 895–900.
- Tennstedt, P., Fresow, R., Simon, R., Marx, A., Terracciano, L., Petersen, C., Sauter, G., Dikomey, E., Borgmann, K. (2013): RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* 132: 2118-2126.
- Thapar, R. (2018): Regulation of DNA double-strand break repair by non-coding RNAs. *Molecules* 23: 2789.
- Thomsen, M., Skovlund, E., Sorbye, H., Bolstad, N., Nustad, K.J., Glimelius, B., Pfeiffer, P., Kure, E.H., Johansen, J.S., Tveit, K.M. *et al.* (2018): Prognostic role of carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in metastatic colorectal cancer: A BRAF-mutant subset with high CA 19-9 level and poor outcome. *Br. J. Cancer* 118: 1609–1616.
- Valeri, N., Gasparini, P., Braconi, C., Paone, A., Lovat, F., Fabbri, M., Sumani, K.M., Alder, H., Amadori, D., Patel, T. *et al.* (2010): MicroRNA-21 induces resistance to 5-fluorouracil by down-regulating human DNA MutS homolog 2 (hMSH2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 21098–21103.

Van Gijn, W., Marijnen, C.A., Nagtegaal, I.D., Meershoek-Klein Kranenbarg, E., Putter, H., Wiggers, T., Rutten, H.J.T., Pahlman, L., Glimelius, B., van de Velde, C.J.H (2011): Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol.* 12: 575-582.

Van Rooij, E., Kauppinen, S. (2014): Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol. Med.* 6: 851–864.

Vymetalkova, V., Vodicka, P., Vodenkova, S., Alonso, S., Schneider-Stock, R. (2019): DNA methylation and chromatin modifiers in colorectal cancer. *Mol. Aspects Med.* <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.04.002>.

Weber, B., Stresemann, C., Brueckner, B., Lyko, F. (2007): Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle* 6: 1001–1005.

Wu, S., Huang, S., Ding, J., Zhao, Y., Liang, L., Liu, T., Zhan, R., He, X. (2010): Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene* 29: 2302–2308.

Yuan, S.-S. F., Hou, M.-F., Hsieh, Y.-C., Huang, C.-Y., Lee, Y.-C., Chen, Y.-J., Lo, S. (2012): Role of MRE11 in cell proliferation, tumor invasion, and DNA repair in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 104: 1485–1502.

Zhai, H., Fesler, A., Ba, Y., Wu, S., Ju, J. (2015): Inhibition of colorectal cancer stem cell survival and invasive potential by hsa-miR-140-5p mediated suppression of Smad2 and autophagy. *Oncotarget* 6: 19735-46.

Zhang, W., Zou, C., Pan, L., Xu, Y., Qi, W., Ma, G., Hou, Y., Jiang, P. (2015): MicroRNA-140-5p inhibits the progression of colorectal cancer by targeting VEGFA. *Cell. Physiol. Biochem.* 37: 1123–1133.

Zhou, Y., Wan, G., Spizzo, R., Ivan, C., Mathur, R., Hu, X., Ye, X., Lu, J., Fan, F., Xia, L. *et al.* (2014): MiR-203 induces oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells by negatively regulating ATM kinase. *Mol. Oncol.* 8: 83–92.

Ziebarth, J.D., Bhattacharya, A., Cui, Y. (2012): Integrative analysis of somatic mutations altering microRNA targeting in cancer genomes. *PLoS ONE* 7: e47137.

Odborné knihy

Büchler, Tomáš *et al.* 2017. *Speciální onkologie*. 1. vyd. Praha : Maxdorf, s. r. o., 2017. 47-52 s. ISBN 978-80-7345-539-2.

Klener Jr., Pavel – Klener, Pavel 2013. *Principy systémovej protinádorové léčby*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, a. s., 2013. 32-35 s. ISBN 978-80-247-4171-0.

Povýšil, Ctibor – Šteiner, Ivo *et al.* 2007. *Speciální patologie*. 2. doplněné a prepracované vyd. Praha : Galén, Karolinum, 2007. 167-170 s. ISBN 978-80-7262-494-2.

Slabý, Ondřej – Svoboda, Marek *et al.* 2012. *MicroRNA v onkologii*. 1. vyd. Praha : Galén, 2012. 7-8 s. ISBN 978-80-7262-587-1.

Šána, Jiří – Slabý, Ondřej *et al.* 2017. *Úvod do molekulární medicíny. Cvičení (Biomarkerové studie)*. 1 vyd. Brno : Masarykova univerzita, 2017. 81-85 s. ISBN 978-80-210-8538-1.

Internetové databázy

Dušek, L., Mužík, J., Kubásek, M., Koptíková, J., Žaloudík, J., Vyzula, R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online].

Masarykova univerzita, [2005],

Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861. [cit. 2019-04-19].

Dušek, L., Zavoral, M., Májek, O., Suchánek, Š., Mužík, J., Pavlík, T., Šnajdrová, L., Gregor, J. Kolorektum.cz – Program kolorektálního screeningu v České republice [online]. Masarykova univerzita, Brno, 2019.

Dostupný z WWW: <http://www.kolorektum.cz>. ISSN 1804-0888. Verze 1.6f. [cit. 2019-04-19].

Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., Bray, F. (2018). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr>. [cit. 2018-10-04].

Zdravotnická ročenka České republiky 2017: Zdravotnická statistika ČR.

Vydává Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR.

Dostupné z WWW: <http://www.uzis.cz>. ISSN 1210-9991. [cit. 2019-03-19].