

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Kateřina Balounová

Cirkadiánní regulace miRNA a hodinami řízených genů v kolorektální tumorigenezi

Circadian regulation of miRNAs and clock-controlled genes in colorectal tumorigenesis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Jiří Pácha, DrSc.

Praha 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.08.2016

Podpis :

Ráda bych poděkovala prof. RNDr. Jiřímu Páchovi, DrSc za vlídné vedení mé diplomové práce, pečlivost a neskonalou trpělivost, kterou měl se mnou po celý tento čas. Dále bych chtěla poděkovat všem na oddělení Funkce epitelu ve Fyziologickém ústavu Akademie Věd za jejich ochotu pomoci mi s jakýmkoli problémem a milou atmosféru a humor, co kolem sebe šíří.

Zvláštní poděkování náleží inženýru Peteru Ergangovi a doktoru Matúši Sotákovi za jejich nedocenitelnou pomoc při konzultacích, za trpělivost s jakou mě vždy vyslechli, podporu, co mi nabízeli, a ochotu pomoci i na velkou vzdálenost.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za jejich ohromnou podporu a vřelou náruč, která vždy nabízela uklidnění a ujištění.

Abstrakt

Cirkadiánní hodiny generují cirkadiánní rytmus, jenž se podílí na regulaci většiny signalizačních drah organismu, včetně buněčného cyklu a apoptózy. Narušení mechanismu cirkadiánních hodin vede ke zvýšenému riziku vzniku a progresu tumoru. Při neoplastické transformaci kolonu byla prokázána změněná regulace klíčových procesů souvisejících s proliferací, diferenciací a apoptózou. Dalším regulačním mechanismem zasahujícím do regulace klíčových drah souvisejících s tumorigenezí jsou miRNA.

Cílem této diplomové práce bylo metodou kvantitativní RT-PCR zjistit existenci cirkadiánního rytmu exprese hodinami přímo kontrolovaných genů (*Tef*, *Dbp*), miRNA (miR-1-3p, miR-16-5p, miR-34a-5p, miR-155-5p, miR-192-3p) a genů buněčného cyklu (*Ccnd1*, *Ccne1*, *Ccna1*, *Ccnb1*) a apoptózy (*Casp3*, *Bcl2*, *Bad*) v kolonu myši a následně porovnat změny cirkadiánní rytmicity během stárnutí a při neoplastické transformaci kolonu.

Naší analýzou byla detekována cirkadiánní rytmicita exprese *Tef*, *Dbp*, *Ccne1*, *Ccna1*, *Ccnb1*, *Casp3* a *Bcl2* v kolonu mladé myši, *Tef*, *Dbp*, miR-1-3p, *Ccne1* a *Ccna1* v kolonu staré myši a *Tef* a *Dbp* v kolorektálním tumoru.

Zjistili jsme, že cirkadiánní rytmus exprese hodinami přímo kontrolovaných genů je utlumen, ale zachován během neoplastické transformace kolonu. Naproti tomu cirkadiánní rytmicita miRNA a genů buněčného cyklu a apoptózy je během neoplastické transformace vymizelá. S přibývajícím věkem se cirkadiánní rytmus genů buněčného cyklu a apoptózy oslabuje. Na cirkadiánní expresi analyzovaných genů je patrný silnější efekt věku než efekt neoplastické transformace.

Klíčová slova

cirkadiánní hodiny, cirkadiánní rytmus, kolon, kolorektální karcinom, rakovina, microRNA, buněčný cyklus, apoptóza

Abstract

The circadian clock generates circadian rhythms, which participate on regulation of a number of signalling pathways. Disruption of the circadian regulatory mechanism is linked to a development and a progression of certain types of cancer including colorectal tumorigenesis. Progression of tumorigenesis depends on the cell cycle machinery related to cell proliferation and apoptosis. MiRNAs play a role in initiation and progression of tumorigenesis because they interfere in regulatory pathways associated with tumorigenesis.

The aim of the thesis was to determinate existence of circadian rhythms in clock controlled genes (*Tef*, *Dbp*), miRNAs (miR-1-3p, miR-16-5p, miR-34a-5p, miR-155-5p, miR-192-3p) and genes of the cell cycle machinery (*Ccnd1*, *Ccne1*, *Ccna1*, *Ccnb1*) and apoptosis (*Casp3*, *Bcl2*, *Bad*). Further, to compare detected circadian rhythms during aging and neoplastic transformation of colon by quantitative RT-PCR.

We have observed circadian expression of *Tef*, *Dbp*, *Ccne1*, *Ccna1*, *Ccnb1*, *Casp3* and *Bcl2* in young mice colon, *Tef*, *Dbp*, miR-1-3p, *Ccne1*, *Ccna1* in old mice colon and *Tef* and *Dbp* in colorectal tumors.

In summary, circadian expression of clock controlled genes varied but was maintained in mice colorectal tumors. In aging we demonstrated weakening of circadian rhythms of the genes of the cell cycle machinery and apoptosis. The larger effect on circadian expression of the cell cycle and apoptosis genes has been observed in aging compared with neoplastic transformation.

Key words

circadian clock, circadian rhythm, colorectal carcinoma, cancer, colon, cell cycle, microRNA, apoptosis

Obsah

1	Seznam zkratk.....	3
2	Úvod	6
3	Literární přehled	7
3.1	Cirkadiánní rytmus.....	7
3.1.1	Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin u savců.....	7
3.1.2	Hierarchie cirkadiánních hodin u savců.....	10
3.1.3	Periferní cirkadiánní hodiny ve střevě.....	12
3.2	Tumorigeneze kolorektálního karcinomu	13
3.2.1	Závislost vývoje CRC na dynamické rovnováze buněčného cyklu a apoptózy	15
3.2.1.1	Buněčný cyklus	15
3.2.1.2	Buněčný cyklus a kolorektální tumorigeneze	17
3.2.1.3	Apoptóza.....	18
3.2.1.4	Apoptóza a kolorektální tumorigeneze	20
3.2.2	Závislost vývoje CRC na miRNA.....	21
3.2.2.1	MiRNA a jejich regulace.....	21
3.2.2.2	MiRNA a kolorektální tumorigeneze	23
3.3	Interakce mezi cirkadiánními hodinami, buněčným cyklem, apoptózou a miRNA	24
3.3.1	Cirkadiánní regulace a buněčný cyklus.....	24
3.3.2	Cirkadiánní regulace a apoptóza	26
3.3.3	Cirkadiánní regulace a miRNA	27
3.4	Tumorigeneze CRC a narušení cirkadiánního rytmu	28
4	Cíle diplomové práce	29
5	Materiál a metody	30
5.1	Materiál	30
5.1.1	Použité chemikálie.....	30
5.1.2	Použitá zvířata	31
5.2	Metody	31
5.2.1	Indukce kolorektálního tumoru a odběr tkání pro mRNA kvantifikaci.....	31
5.2.2	Indukce kolorektálního karcinomu a odběr tkání pro miRNA kvantifikaci.....	32
5.2.3	Izolace totální RNA	32
5.2.3.1	Izolace totální RNA pro kvantifikaci mRNA.....	32
5.2.3.2	Izolace totální RNA pro kvantifikaci miRNA.....	33
5.2.4	Reverzní transkripce	33

5.2.4.1	Reverzní transkripce totální RNA pro kvantifikaci mRNA	33
5.2.4.2	Reverzní transkripce miRNA pro kvantifikaci miRNA	34
5.2.5	Kvantitativní RT-PCR	35
5.2.5.1	Kvantitativní RT-PCR pro kvantifikaci mRNA	35
5.2.5.2	Kvantitativní RT-PCR pro kvantifikaci miRNA	35
5.2.6	Statistika	36
6	Výsledky	37
6.1	Změna cirkadiánního rytmu exprese mRNA vybraných CCG genů při stárnutí a během neoplastické transformace kolonu	37
6.2	Existence cirkadiánní rytmicity u vybraných genů buněčného cyklu a apoptózy a porovnání zjištěné cirkadiánní exprese mRNA v makroskopicky zdravě vypadajícím epitelu s expresí dané mRNA kolorektálního tumoru a v epitelu mladších zvířat	39
6.2.1	Existence cirkadiánní rytmicity u vybraných genů buněčného cyklu a porovnání zjištěné cirkadiánní exprese mRNA v makroskopicky zdravě vypadajícím epitelu s expresí dané mRNA kolorektálního tumoru a v epitelu mladších zvířat	39
6.2.2	Existence cirkadiánní rytmicity u vybraných genů apoptózy a porovnání zjištěné cirkadiánní exprese mRNA v makroskopicky zdravě vypadajícím epitelu s expresí dané mRNA kolorektálního tumoru a v epitelu mladších zvířat	42
6.3	Zjištění cirkadiánní rytmicity u vybraných miRNA v kolonu a její změna při neoplastické transformaci	45
7	Diskuze	47
8	Závěr	54
9	Použitá literatura	55
10	Dodatky	76
10.1	Dodatek č. 1 – Souhrnná tabulka všech provedených analýz u mRNA	76
10.2	Dodatek č. 2 – Souhrnná tabulka všech provedených analýz u miRNA	77

1 Seznam zkratek

4E-BP1	eIF4E vazebný protein 1
ABC	ATP Binding Cassette
Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B member 1A
Abcc1	ATP binding cassette subfamily C member 1
AE	iontový výměník
AMP	adenosin monofosfát
AMPK	adenosin monofosfát aktivovaná proteinkináza
AOM	azoxymetan
AOM/DSS	skupina myší s indukovaným kolorektálním karcinomem
APAF1	apoptotic protease activating factor 1
APC	Adenomatous polyposis coli
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATP	adenosin 5'-trifosfát
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
AVP	arginin vazopresin
BAD	BCL2 associated agonist of cell death
BAG	BCL2-associated athanogene
BAK	BCL2-antagonist/killer
BAX	BCL2-associated X protein
BCL2	B cell leukemia/lymphoma 2
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large, BCL2L1
bHLH	basic helix-loop-helix
BID	BH3 interacting-domain death agonist
BIK	BCL2 interacting killer
BMAL1	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
BOK	BCL2-related ovarian killer
CCG	hodinami kontrolované geny
CCN	cyklin
CDK	cyklin dependentní kináza
cFLIP	cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein
<i>Cftr</i>	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CG	hodinové geny
C-JUN	cellular jun proto-oncogene
CK1	kasein kináza 1
CK2	kasein kináza 2
CLOCK	clock circadian regulator
C-MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
CRC	kolorektální karcinom
CRE	c-AMP response element
CREB	c-AMP response element-binding protein
CRY	cryptochrome circadian clock
<i>Dbp</i>	D site albumin promoter binding protein
DGCR8	Di-Georgův syndrom kritického regionu genu 8
DISC komplex	death inducing signaling complex
DRA	výměník chloridových iontů, downregulated-in-adenoma

DSS	dextranulfát sodný
E2F	E2F transcription factor
EGF	epidermal growth factor
EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
EMT	epiteliálně-mezenchymální přechod
ENaC	epiteliální sodný kanál
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FAS	Fas cell surface death receptor
GLUT2	glukózový přenašeč 2
GLUT5	fruktózový přenašeč 5
GSK-3 β	glycogen synthase kinase 3 beta
hn RNP D/Q	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D/Q
CHK1/2	checkpoint kinase 1/2
IAP	inhibitor apoptotických proteinů
IGF-1	insulin like growth factor 1
ipRGC	intrinsically photosensitive retinal ganglion cells
IRES	internal ribosomal entry site
miRNA	microRNA
<i>Mlh1</i>	mutL homolog 1
MMR	oprava záměn bází, mismatch repair
<i>Msh2</i>	mutS homolog 2
MYT1	myelin transcription factor 1
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase
NHE3	Na ⁺ /H ⁺ výměník
NONO	non-POU domain containing, octamer-binding
NOXA	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
PABP	polyA vazebné proteiny
PAS	Period-Arnt-Single-Minded
PEPT1	H ⁺ /peptid kotransportér 1
PER	period circadian clock
PP1/5	protein fosfatáza 1/5
pRB	retinoblastomový protein
pre-miRISC	miRNA indukujícího umlčujícího komplexu
pre-miRNA	prekurzor microRNA
pri-miRNA	primární transkript microRNA
PTB	polypyrimidine tract-binding protein, hn RNP I
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RBM4	RNA binding motif protein 4
RBS14	Ribozomální protein S14
RBS3	Ribozomální protein S3
REV-ERB	orphan nuclear receptor
RIPK1	receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
ROR	RAR-related orphan receptor
RORE	Retinoic-acis-related Orphan receptor Response Element
SCN	suprachiasmatická jádra

SGLT1	Na ⁺ /glukózový kotransportér
SIRT1	NAD ⁺ -dependentní deacetylázová aktivita sirtuinu 1
SMAC	diablo IAP-binding mitochondrial protein
TEF	thyrotroph embryonic factor
LEF	lymphoid enhancer-binding factor
TGF-β	transforming growth factor, beta
TNF	tumor necrosis factor
TOSO	Fc fragment of IgM receptor
TRADD	tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
UTR	nepřekládaná oblast, untranslated region
VIP	vazoaktivní intestinální peptid
WDR5	WD repeat-containing <i>protein</i> 5
WNT	wingless-type MMTV integration site family

2 Úvod

Většina organismů si v reakci na periodicky se měnící podmínky okolního prostředí vytvořila vnitřní časový systém cirkadiánních hodin, jež prostřednictvím transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky generuje cirkadiánní rytmus s periodou 24 hodin, a tak synchronizuje klíčové procesy probíhající v těle (Reppert and Weaver, 2002). Vnější vlivy mohou poškodit cirkadiánní rytmicitu, což jak se ukazuje v poslední době, může vést k narušení klíčových signalizačních drah a vyústit v patofyziologický stav. Epidemiologické studie vnějších vlivů narušujících cirkadiánní rytmicitu představují důležitý fenomén uplatňující se mimo jiné při neoplastických transformacích v řadě tkání.

Kolorektální karcinom je jednou z nejčastějších forem nádorového onemocnění s celkovou mortalitou kolem 700 000 lidí/rok a vzrůstající incidencí ve vyspělých státech světa. V mezinárodním srovnání se Česká republika pravidelně umísťuje na nejvyšších příčkách statistiky incidence kolorektálního karcinomu na 100 000 obyvatel (Ferlay et al., 2013). Vznik a vývoj tumoru, pozdějšího karcinomu, je úzce spojen se změnou regulace proliferace, diferenciací a kontrolované buněčné smrti v zasažené tkáni. Zároveň byla v tumorigenezi identifikována změna exprese řady microRNA, jež ovlivňují klíčové signalizační dráhy související s nádorovým bujením (Croce, 2009).

V posledních letech se řada studií zabývá problematikou zvýšené incidence některých karcinomů v povoláních pracujících na směny. Práce na směny je nepřírozený stav, kdy organismus je nucen fungovat v nestandardních hodinách a to vede k narušení cirkadiánních rytmů. Narušení molekulárního mechanismu cirkadiánních hodin v tumorech bylo prokázáno jak na úrovni exprese hodinových genů, tak i u některých hodinami kontrolovaných genů (Mazzoccoli et al., 2016; Schernhammer et al., 2003; Soták et al., 2013). Konkrétní microRNA a geny buněčného cyklu a apoptózy s cirkadiánní expresí deregulovanou v nádorové tkáni však ještě zbývá ve většině případů identifikovat.

Další zvýšené riziko výskytu kolorektálního karcinomu je spojeno s přibývajícím věkem, který současně ovlivňuje endogenní cirkadiánní rytmicitu včetně regulace cirkadiánních hodin (Banks et al., 2016; Ferlay et al., 2013). Jakou měrou se vliv věku projevuje na cirkadiánní expresi konkrétních genů buněčného cyklu a apoptózy je další otázka teprve čekající na zodpovězení.

3 Literární přehled

3.1 Cirkadiánní rytmus

Od počátku svého vývoje jsou živé organismy nuceny se přizpůsobovat neustále se měnícím životním podmínkám okolního prostředí. Řada z těchto změn má periodický charakter a je způsobena obíháním Země kolem Slunce a rotací Země kolem své osy. Patří k nim například periodické střídání světla a teploty způsobené střídáním dne a noci či existencí různých ročních období.

Reakcí většiny organismů na periodicky se opakující změny v životním prostředí bylo vytvoření vnitřního mechanismu, který by umožňoval předvídat tyto změny a koordinovat příslušné behaviorální a fyziologické odpovědi, tedy vnímat běh času, tzv. cirkadiánní hodiny (z latinského *circa diem* - přibližně jeden den). Cirkadiánní hodiny generují vnitřní 24h periodický rytmus a regulují tak značné množství procesů v organismu, včetně cyklu spánku/bdění, teploty těla, tepové frekvence, renální aktivity, sekrece hormonů a enzymové aktivity (Fuller et al., 1989; Golombek and Rosenstein, 2010; Hastings et al., 2003; Reppert and Weaver, 2001). Na základě údajů převážně z microarray experimentů vyplývá, že až 10% mRNA v každé buňce je regulováno cirkadiánními hodinami (Akhtar et al., 2002; Duffield et al., 2002; Panda et al., 2002; Storch et al., 2002).

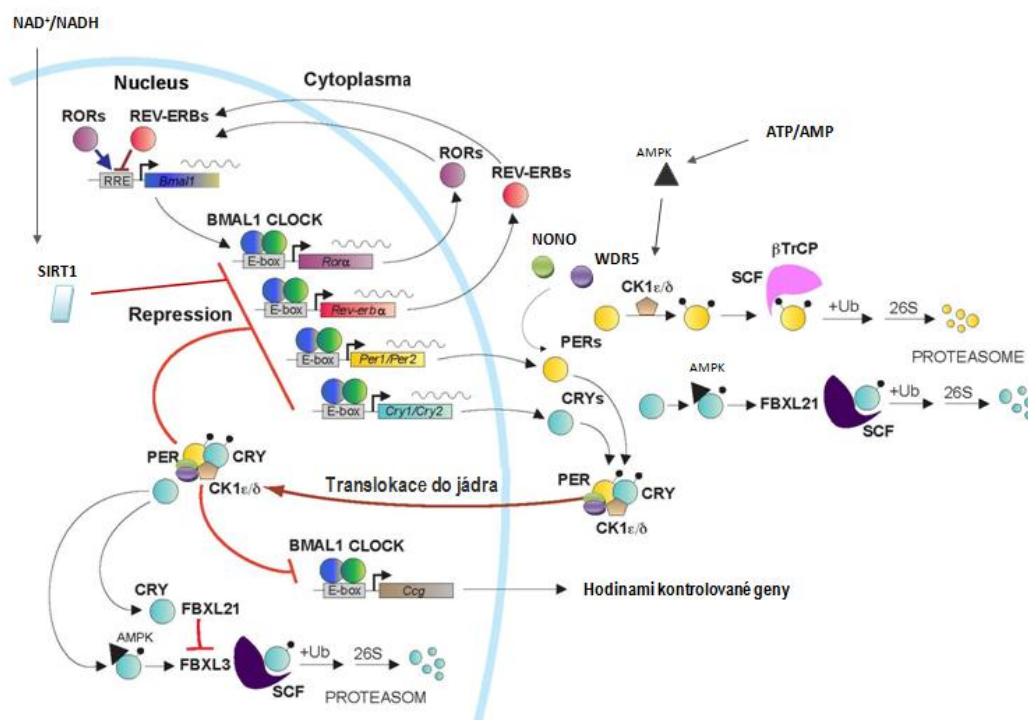
3.1.1 Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin u savců

U savců je molekulární mechanismus cirkadiánních hodin tvořen systémem autoregulačních pozitivně a negativně transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček vyskytujících se ve většině buněk v těle (Obrázek 3.1). Cirkadiánní hodiny se objevují již u prokaryot, ale až s eukaryoty se ustálil základní mechanismus těchto zpětnovazebných smyček, u kterého byla během evoluce druhů zvýšena komplexita, došlo k duplikaci genů, apod. Geny zastoupené v těchto zpětnovazebných smyčkách nazýváme hodinové geny (Dunlap, 1999; Kume et al., 1999).

Základními pozitivními komponentami savčí cirkadiánní smyčky jsou hodinové geny *Bmal1* a *Clock* kódující transkripční faktory s bHLH (basic-helix-loop-helix) a PAS (Period-Arnt-Single-minded) doménami, jež vzájemně formují heterodimer BMAL1:CLOCK. Heterodimer BMAL1:CLOCK aktivuje transkripci hodinových genů (CG) a hodinami kontrolovaných genů (CCG) vazbou na E-box v jejich promotoru (Gekakis et al., 1998; Takahata et al., 1998). Mezi geny, které jsou součástí zpětnovazebné smyčky, patří i hodinové geny *Per* (*Per 1*, *Per2*, *Per3*), *Cry* (*Cry1*, *Cry2*), *Rev-erb*

(*Rev-erba*, *Rev-erbβ*), *Ror* (*Rora*, *Rorβ*, *Rory*) a další (*Tef*, *Hlf*, *Dbp*, *Avp*, *apod.*) (Emery and Reppert, 2004; Guillaumond et al., 2005; Reppert and Weaver, 2001). Během dne dochází k tvorbě mRNA a k akumulaci CG a CCG proteinů v cytoplasmě. Díky vysoké koncentraci vzniklých PER a CRY proteinů se na konci světlé části dne v cytoplasmě tvoří heterodimer PER:CRY, který je poté translokován do jádra. Prostřednictvím PER1 proteinu se na vzniklý komplex navazují další pomocné proteiny, cirkadiálně nerytmický NONO a WDR5 (Brown et al., 2005). Následně se heterodimer PER:CRY váže na aktivační komplex BMAL1:CLOCK a inhibuje ho. Tím inhibuje i vlastní transkripci, což vede během noci k snížení koncentrace mRNA a proteinů (CG a CCG). Koncem noci dochází k degradaci inhibičního komplexu vázaného na heterodimeru BMAL1:CLOCK a tím k uvolnění transkripce (Buhr and Takahashi, 2013; Reppert and Weaver, 2002; Takahashi et al., 2008). Další způsob regulace heterodimeru BMAL1:CLOCK je kompetice sirotčích receptorů ROR (*RORα*, *RORβ*, *RORγ*) a REV-ERB (*REV-ERBα*, *REV-ERBβ*) o vazebné místo RORE (Retinoic-acid-related Orphan receptor Response Element) v promotoru *Bmal1* a v prvním intronu *Clock*. Proteiny ROR iniciují *Bmal1* transkripci, zatímco REV-ERB jí inhibují. K inhibici transkripce genu *Bmal1* dochází již během dne, díky samovolné translokaci REV-ERB do jádra (Crumbley and Burris, 2011; Emery and Reppert, 2004; Guillaumond et al., 2005).

Z cirkadiální molekulární smyčky vyplývá, že CG a CCG s E-box specifickou sekvencí (5'-CACGTG-3') mají zvýšenou hladinu koncentrace ve dne, na rozdíl od CG a CCG s RORE elementem, jež kulminují v noci.



Obrázek 3.1 Molekulární mechanismus cirkadiálních hodin a jejich regulace. Upraveno z (Takahashi, 2015).

Délku trvání periody ~24h a tvar cirkadiánní smyčky zaručují post-transkripční a post-translační modifikace. Pokud by k těmto modifikacím nedocházelo, celý cirkadiánní mechanismus by byl mnohem kratší a nikdy by nedosáhl délky periody 24h.

Stabilita mRNA některých CG a rychlost jejich degradace se během cirkadiánní periody mění. V rostoucí fázi cirkadiánního rytmu je rychlost degradace nižší než ve fázi klesající. V myších genech *Per2*, *Per3* a *Cry1* byla prokázána post-transkripční regulace degradace mRNA. Degradace jejich mRNA je ovlivněna vazbou na 3'UTR mRNA těchto genů. Degradace *Per2* mRNA je spojená s PTB proteinem (polypyrimidine tract-binding protein, hnRNP I), zatímco degradace *Cry1* mRNA je spjatá s hnRNP D (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) a degradace *Per3* mRNA s hnRNP Q (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q). Snížení hladiny těchto proteinů vede ke stabilizaci *Per2*, *Per3* a *Cry1* mRNA, čímž se zvyšuje amplituda jejich cirkadiánního rytmu, a naopak (Kim et al., 2011; Woo et al., 2009, 2010). Stejnou roli jako 3'UTR oblast hraje v destabilizaci *Per3* mRNA i oblast 5'UTR (Kim et al., 2011).

Zároveň hnRNP Q a I ovlivňují časovou regulaci translace PER1 a REV-ERB α , a to pomocí vazby na IRES (internal ribosomal entry site) v 5'UTR. Tyto ribonukleoproteiny nemají vliv na stabilitu *Rev-erba* a *Per1* mRNA, ale rytmicky regulují jejich translaci. Inhibice hnRNP Q a I vede k narušení cirkadiánní rytmicity REV-ERB α a PER1 (Kim et al., 2010; Lee et al., 2012). Ribonukleoprotein hnRNP D se účastní regulace aktivace translace, ale váže se na 3'UTR *Cry1* mRNA a interaguje s translačním iniciačním faktorem 3 a ribozomálními proteiny RPS3 a RPS14 (Lee et al., 2014). Další možností post-transkripční regulace translace je vazba proteinu RBM4 (RNA binding motif protein 4) na 3'UTR *Per1* mRNA, což vede ke zvýšení proteinu PER1. Zvýšení exprese RBM4 vede k prodloužení periody (Kojima et al., 2007). Samotná aktivita translačního komplexu, konkrétně eIF4E vazebného proteinu 1 (4E-BP1) je pod cirkadiánní kontrolou, ale současně hodiny sama reguluje pomocí represe translace vazoaktivního intestinálního peptidu (VIP) (viz kapitola 3.1.2) (Cao et al., 2013). Zapojení miRNA do post-transkripční modifikace cirkadiánních hodin a cirkadiánní regulací miRNA je věnována pozornost v kapitole 3.3.3.

Mezi nejdůležitější a nejrozšířenější post-translační modifikace patří fosforylace hodinových proteinů. Řada komponent cirkadiánních hodin je rytmicky fosforylována, čehož je dosaženo pomocí dynamické rovnováhy mezi kinázami a fosfatázami (Virshup et al., 2007). Nejznámější regulační kinázou cirkadiánních hodin je kasein kináza 1 (CK1), jejíž izoformy CK1 δ a CK1 ϵ byly zaznamenány v souvislosti s regulací cirkadiánních hodin. CK1 specifická fosforylace PER proteinů, jež je rozpoznávána F-box proteiny z E3 ubiquitin ligázového komplexu, vede k degradaci PER proteinů v proteasomu. Mezi další substráty CK1 δ/ϵ patří CRY1, CRY2 a BMAL1 (Akashi et al., 2002;

Eide et al., 2002). CK1 může být sama regulována fosforylací. Fosforylace CK1 pomocí AMP-aktivované proteinkinázy (AMPK) vede ke zvýšení aktivity CK1 ϵ . AMPK je senzor poměru ATP/AMP, tedy senzor energetického stavu buňky. AMPK přímo fosforyluje další proteiny, CRY a PER2, čímž způsobuje jejich degradaci (Lamia et al., 2009; Um et al., 2007). Další možnou fosforylační kinázou zasahující do regulace cirkadiálních hodin je kasein kináza 2 (CK2). Substrátem CK2 je PER2. Účel fosforylace PER2 je zatím nejasný. Existují práce podporující stabilizaci PER2 a jiné dokládají destabilizaci PER2 po fosforylaci podobně jako u CK1 (Maier et al., 2009; Tsuchiya et al., 2009). Navíc izoforma CK2 α inhibuje fosforylaci proteinu BMAL1 na Ser90 a zároveň je její aktivita inhibována hodinovým proteinem CRY (Tamaru et al., 2015). Do rytmické fosforylace hodinových genů zasahují také fosfatázy, konkrétně protein fosfatáza 1 (PP1) a protein fosfatáza 5 (PP5). PP1 defosforyluje PER2 a možná se účastní jeho stabilizace a ovlivňuje jeho lokalizaci (Gallego et al., 2006; Schmutz et al., 2011). PP5 defosforyluje neaktivní CK1 δ a tím ho aktivuje. PP5 může být sama inhibována proteinem CRY2 (Partch et al., 2006).

Další možností post-translační modifikace cirkadiálních hodin je acetylace. Hodinový protein CLOCK má acetyltransferázovou aktivitu, jež specificky cílí na histon H3 a H4. Ovlivňuje tak remodelaci chromatinu a aktivitu transkripce heterodimeru BMAL1:CLOCK. BMAL1 zvyšuje acetyltransferázovou aktivitu CLOCK proteinu a zároveň může být sám acetylován (Doi et al., 2006). Transkripční aktivita BMAL1:CLOCK je silně ovlivněna poměrem NAD⁺/NADH, který se často považuje za senzor metabolického stavu buňky (Rutter et al., 2001). NAD⁺-dependentní deacetylázová aktivita sirtuinu 1 (SIRT1) je protiváhou k acetyltransferázové aktivitě CLOCK. SIRT1 se váže na heterodimer BMAL1:CLOCK, kde reguluje acetyltransferázovou aktivitu CLOCK (Asher et al., 2008; Nakahata et al., 2008). Aktivita SIRT1 je zpětně regulována cirkadiální transkripcí enzymu NAMPT, klíčového faktoru pro tvorbu SIRT1 kofaktoru NAD⁺ (Fulco et al., 2008).

Na hodinovém proteinu CLOCK byly v periferních cirkadiálních hodinách zaznamenány ještě poly(ADP)-ribosylace (Asher et al., 2010) a BMAL1 indukovaná SUMOylace vedoucí ke zvýšení transkripční aktivity CLOCK (Cardone et al., 2005; Li et al., 2013).

3.1.2 Hierarchie cirkadiálních hodin u savců

U savců jsou cirkadiální hodiny uspořádány hierarchicky. Centrální cirkadiální hodiny zajišťují generování samotného rytmu, jeho seřizování s vnějším geofyzikálním časem a ovlivňují periferní hodiny umístěné v ostatních tkáních a buňkách (Dunlap, 1999).

Hlavní oscilátor cirkadiálních hodin je umístěný v párových suprachiasmatických jádrech (SCN) v předním hypotalamu u optického chiasmatu (Ralph et al., 1990). Každé z jader SCN se u

člověka skládá z cca 50 000 neuronů, u myši z cca 10 000 neuronů, které generují cirkadiánní rytmus (Abrahamson and Moore, 2001; Swaab et al., 1985). Jednotlivé neurony generují cirkadiánní rytmus se širokou škálou délky periody, který je poté synchronizovaný jak na úrovni těsných spojů, tak na úrovni synaptické komunikace (van den Pol and Dudek, 1993).

Vzhledem k tomu, že hodiny neběží s přesnou periodou 24h, ale jak u myši, tak u lidí je jejich perioda mírně pod/nad 24h, je nutné tento vnitřní mechanismus pravidelně seřizovat. Hlavní faktorem zajišťujícím seřizování hodin je světlo. Světlo dopadá na retinu, kde je pomocí non-image forming receptorů (ipRGC, intrinsically photosensitive retinal ganglion cells) obsahujících pigment melanopsin elektrický signál přenášen retinohypotalamickým traktem do SCN (Fu et al., 2005; Moore et al., 1995). Informace z retiny mohou být do SCN přenášeny také genikulohypotalamickým traktem nebo přes nucleus raphe (Meyer-Bernstein and Morin, 1996; Reppert and Weaver, 2001).

Mezi další faktory ovlivňující centrální cirkadiánní hodiny patří změna pohybové aktivity, chemické podávání metamfetaminu či časově omezená hypokalorická strava (Caldelas et al., 2005; Honma et al., 1988). Periferní cirkadiánní hodiny jsou při seřizování kromě výstupních signálů z SCN citlivé na změnu tělesné teploty, změnu dostupnosti potravy či změnu hladiny kortikosteroidů (Balsalobre et al., 2000; Brown et al., 2002; Sabath et al., 2014). Periferní cirkadiánní hodiny v různých tkáních odpovídají na seřizování rozdílnou rychlostí. Například na jídlem indukované resetování fáze odpovídají periferní cirkadiánní hodiny jater rychleji než periferní hodiny v ledvinách, srdci či pankreatu (Damiola et al., 2000).

Role SCN v udržení cirkadiánních rytmů a jejich seřizování byla ještě před několika lety vnímána jako nezastupitelná. Vycházelo se z experimentů na zvířatech s lézí SCN, jež ztratí cirkadiánní rytmy ve své lokomoční aktivitě, melatoninu a kortikosteronu, kde je po transplantaci SCN jejich cirkadiánní rytmicita obnovena (Moore and Eichler, 1972; Stephan and Zucker, 1972). Navíc při transgenotypické transplantaci SCN příjemce SCN vykazuje cirkadiánní rytmicitu dárce (Ralph et al., 1990). Nedávné studie (Husse et al., 2014; Tahara et al., 2012) prokázaly, že samotná existence periferních cirkadiánních hodin je nezávislá na centrálních cirkadiánních hodinách. Při absenci centrálních cirkadiánních hodin v SCN jsou ztraceny rytmy přímo indukované SCN (lokomoční aktivita, exprese melatoninu, apod.), ale je zachována periferní cirkadiánní rytmicita, ve které může být snížena amplituda a ovlivněna perioda (Tahara et al., 2012).

Informace o cirkadiánním rytmu generovaném v SCN je z centrálních cirkadiánních hodin přenášena kombinací neurálních, humorálních a systémových výstupních signálů do ostatních částí mozku a celého organismu a na periferní cirkadiánní hodiny (Takahashi et al., 2008). Pro přenos

informace jsou klíčové dva neurotransmitery, na jejichž expresi se podílí CCG. Jedná se o vazoaktivní intestinální peptid (VIP) a arginin vazopresin (AVP). VIP hraje důležitou roli již v synchronizaci disociovaných buněk SCN, zajišťuje jejich komunikaci a také se podílí na regulaci spánku (Aton et al., 2005; Stopa et al., 1984). AVP rozvádí cirkadiánní rytmus do ostatních částí mozku, hlavně do paraventriculárních a dorzomediálních jader hypotalamu, mediální pre-optické oblasti a subparaventriculární oblasti (Mieda et al., 2015; Reghunandanan et al., 1998). Komunikace SCN s periferií probíhá přes autonomní nervový systém, sympatikus a parasympatikus, nebo pomocí humorálních signálů vysílaných SCN regulovanými oblastmi mozku. Mezi nejznámější humorální cirkadiánní regulace patří cirkadiánní rytmus uvolňování melatoninu či cirkadiánní rytmicita hypotalamoadrenokortikální osy (shrnutí v Kalsbeek et al., 2011).

Zvyšující se věk organismu ovlivňuje mechanismus cirkadiánních hodin a přenos generovaného cirkadiánního rytmu. S rostoucím věkem dochází ke snížení hlavních cirkadiánních neuropřenašečů VIP a AVP, snižuje se exprese hodinových genů i citlivost na seřizování světlem a na periférii seřizování příjmem potravy (Banks et al., 2016; Soták et al., 2013).

3.1.3 Periferní cirkadiánní hodiny ve střevě

Periferní cirkadiánní hodiny byly již identifikované téměř ve všech tkáních, včetně jater, kosterních svalů, pankreatu, srdci, plicích, retině, ledvin, tukové tkáni a střevě (Mohawk et al., 2012).

Již v 80. letech byly provedeny epidemiologické studie poukazující na rozdílnou aktivitu střeva ve dne a v noci u zdravých lidí, ale samotná existence cirkadiánních hodin ve střevě byla prokázána až v roce 2007 (Hoogerwerf et al., 2007; Narducci et al., 1987; Sládek et al., 2007). Následně bylo zjištěno, že ~ 3,7 % genů distálního kolonu je transkribováno s cirkadiánní rytmitou. Řada z těchto genů se účastní buněčné signalizace, proliferace, diferenciací, sekrece či motility probíhající ve střevě (Hoogerwerf et al., 2008).

Periferní cirkadiánní hodiny ve střevě je možné seřizovat pomocí dostupnosti příjmu potravy. Při pravidelném příjmu potravy dochází před očekávanou dobou k procesům připravujícím se na přijetí potravy. Například dochází ke zvýšené proliferaci enterocytů, což způsobí zvětšení objemu jejunu, apod. Při podávání potravy v neaktivní fázi dne dochází k seřízení periferních cirkadiánních hodin ve střevě a aktivaci některých fyziologických procesů, včetně aktivace lokomoční aktivity, zvýšení tělesné teploty, sekrece kortikosteronů (Damiola et al., 2000; Mendoza, 2007; Mistlberger and Antle, 2011).

Do regulace střevní motility jsou zapojené CG. Střevní motilita se obvykle u zdravých jedinců objevuje převážně během aktivní fáze dne a je utlumena v neaktivní fázi. Cirkadiánní rytmus byl změřen ve hladké svalovině zapojené do střevní kontraktility, svalovině tlustého střeva i konečníku (Hoogerwerf et al., 2010). Posilovat střevní kontraktilitu v aktivní fázi dne dále může cirkadiánní regulace acetylcholinu či neurální NO syntézy (Hoogerwerf, 2010; Hoogerwerf et al., 2010).

Cirkadiánní profil exprese byl zjištěn v aktivitě některých střevních enzymů, transportérů a kanálů. V jejunu potkana jsou mezi zaznamenanými střevními enzymy s cirkadiánním rytmem maltáza, laktáza, sacharáza, trehaláza, leucin aminopeptidáza, γ -glutamyltransferáza a alkalická fosfatáza (Saito et al., 1975; Stevenson et al., 1975). Ve střevě se na apikální straně slizničního epitelu nachází dva cirkadiánně regulované glukózové transportéry, Na^+ /glukózový kotransportér (SGLT1) a fruktózový přenašeč GLUT5. Na bazolaterální straně, která uvolňuje vstřebanou glukózu do krevního oběhu, se pod cirkadiánní kontrolou nachází glukózový transportér GLUT2. Cirkadiánní regulace glukózového transportu zapříčiňuje cirkadiánní rytmicitu hladiny glukózy ve střevě (Castelló et al., 1995; Corpe and Burant, 1996; Rhoads et al., 1998; Tavakkolizadeh et al., 2001). Cirkadiánní regulace zasahuje i do vstřebávání proteinů ve formě malých peptidů. Peptidy jsou transportovány do enterocytů H^+ /peptid kotransportérem 1 (PEPT1), jenž vykazuje cirkadiánní profil exprese (Pan et al., 2002; Qandeel et al., 2009). Aktivitu absorpce Na^+ a Cl^- odráží aktivita jejich cirkadiánně regulovaných přenašečů, Na^+/H^+ výměníku (NHE3), sodného kanálu ENaC a hlavních $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ výměníků v kolonu (DRA, AE1) (Hoogerwerf et al., 2008; Sládek et al., 2007; Soták et al., 2011). Mezi ABC (ATP Binding Cassette) přenašeče se zaznamenaným cirkadiánním rytmem patří *Abcb1a* (Mdr1a), *Abcc1* a *Cftr* (Ballesta et al., 2011; Hayashi et al., 2010; Murakami et al., 2008; Soták et al., 2011).

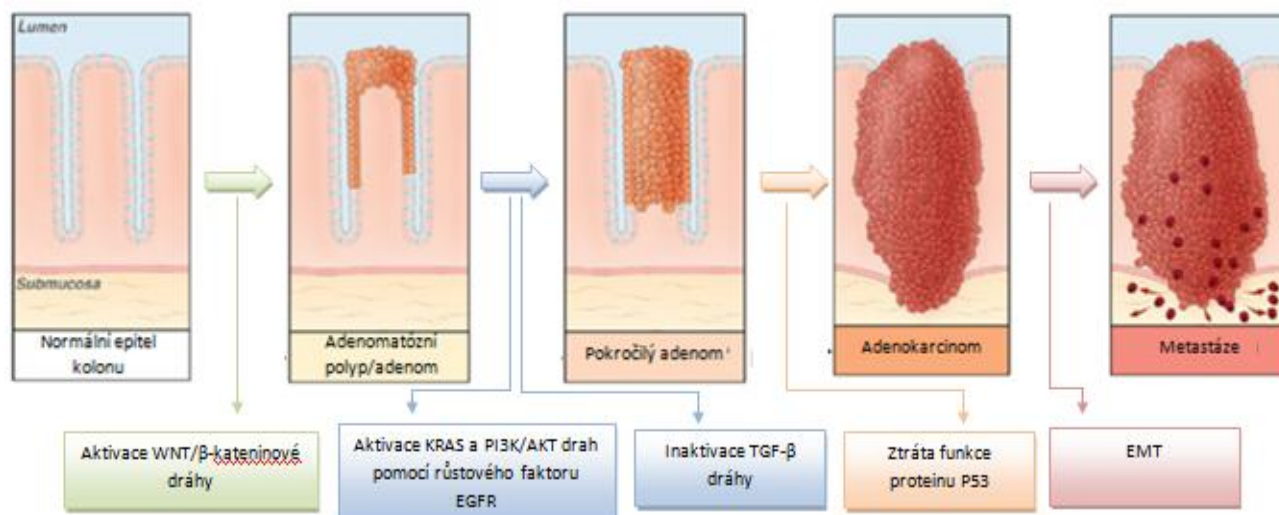
3.2 Tumorigeneze kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom (CRC) patří mezi nejrozšířenější typy rakoviny na světě. Podle posledních odhadů studie z roku 2012 zveřejněné Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC/WHO) je CRC třetím nejčastějším typem rakoviny na světě u mužů (druhým u žen) s celkovou mortalitou blížící se k 700 000 lidí/rok (Ferlay et al., 2013).

Vznik kolorektálního karcinomu není dosud objasněn. Pouze zhruba 15-30% případů CRC má primární příčinu v genetické dědičnosti, z nichž část trpí syndromy s predispozicemi k CRC spojenými se specifickými mutacemi genů *Apc*, *Pten*, *Msh2*, *Mlh1* a jiné (Guttmacher et al., 2003).

Vyšší riziko incidence bývá také často spojované s chronickými záněty kolorekta (Lutgens et al., 2014).

Ve většině případů se kolorektální karcinom vyvine z benigního adenomatózního polypu (Fearon and Vogelstein, 1990). Výskyt adenomatózního polypu se s přibývajícím věkem zvyšuje. V 50 letech je riziko zhruba 25%, ale v 70 letech je riziko výskytu již 50% (Rex et al., 1993). Vznik adenomatózního polypu může mít souvislost s inaktivací proteinu APC (Adenomatous polyposis coli), mutací genu *Apc* či ztrátou úseku chromozomu 5p. V adenomatózním polypu a v časných fázích kolorektálního adenomu je až u 60 % případů typická inaktivace APC zapojeného do WNT/ β -kateninové dráhy, a to jak u obvyklých, tak některých sporadických forem CRC (Kim et al., 2003; Powell et al., 1992). K další progresi kolorektálního tumoru je zapotřebí akumulace genetických a epigenetických změn ovlivňujících klíčové signální dráhy proliferace, diferenciace, apoptózy, epiteliálně-mezenchymálního přechodu, aj. (Obrázek 3.2). Nahromadění potřebných genetických alterací může trvat roky i desítky let. Vyšší výskyt mutací některých genů je spojený s konkrétními fázemi vývoje CRC (Fearon and Vogelstein, 1990; Goel and Boland, 2012).



Obrázek 3.2 Vývoj kolorektálního karcinomu spojený se změnou regulace klíčových signálních drah.

Upraveno z (Goel and Boland, 2012).

Asi v 15 % případů se CRC vyvine z přisedlých serátních adenomů na střevě (SSA). Ke vzniku SSA pravděpodobně dochází při narušení procesu opravy záměn bází (mismatch repair, MMR), což vede k mikrosatelitní nestabilitě na sliznici kolorekta. Porucha MMR může být způsobena hypometylací promotorů MMR genů *Msh2* a *Mlh1* nebo mutací těchto genů (Bettington et al., 2013; Thibodeau et al., 1993; Vilar and Gruber, 2010). Mutace MMR genů je jedním z projevů syndromu dědičného nepolypózního kolorektálního karcinomu (Guttmacher et al., 2003).

Vývoj CRC v obou případech dále probíhá postupně přes benigní adenom až k malignímu adenokarcinomu a jeho metastázám (Obrázek 3.2) (Fearon a Vogelstein, 1990; Lieberman, 2010).

3.2.1 Závislost vývoje CRC na dynamické rovnováze buněčného cyklu a apoptózy

Epitel kolonu se řadí mezi tkáň s nejvyšší proliferací. Proliferací kmenových buněk v epitelu vznikají progenitorové buňky, které se dále diferencují a migrují. Vysoká proliferace buněk musí být kompenzována odpovídající měrou apoptózou, čímž dochází k neustálé obměně epitelu. Celý epitel kolonu může být obnoven během 2-3 dnů (Barker et al., 2008).

Pokud dojde k narušení této dynamické rovnováhy mezi buněčným cyklem a apoptózou, buňka unikne apoptóze a pokračuje v proliferaci, vzniká na epitelu aberantní ložisko, což může vést až ke vzniku CRC (Bird, 1995; Kiedrowski and Mroz, 2014).

3.2.1.1 Buněčný cyklus

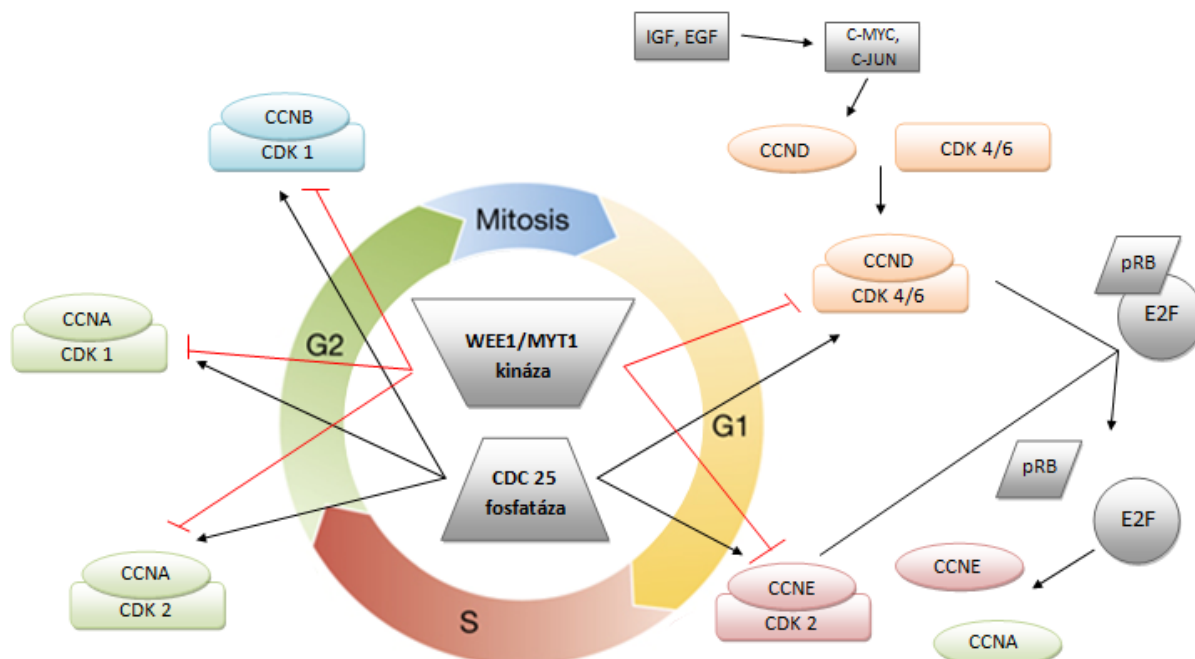
Bezproblémový průběh buněčného cyklu je cílem každého mnohobuněčného organismu a je zásadní pro správný vývoj organismu, obnovu jeho tkání a senescenci. (Evan and Vousden, 2001).

Vývoj buněčného cyklu se odvíjí od přísně regulovaných dynamických změn genové exprese. Buněčný cyklus se skládá ze dvou kritických fází, S fáze, kdy dochází k replikaci buněčné DNA, a M fáze, kdy dojde k samotnému dělení buňky. Tyto dvě kritické fáze jsou doplňovány přípravnými růstovými fázemi G1 a G2, eventuálně u nedělících se buněk klidovou fází G0. Každá z fází je regulována komplexem specifického cyklinu (CCN) a odpovídající cyklin dependentní kinázy (CDK). Postupná regulační kaskáda aktivace různorodých CDK/CCN komplexů je klíčová k iniciaci jednotlivých buněčných odpovědí vedoucích k samotnému dělení buňky. Proto je exprese, stejně jako degradace jednotlivých cyklinů v určitých fázích buněčného cyklu striktně regulována a cyklické změny aktivity CCN/CDK mohou být chápány jako možný biologický oscilátor (Obrázek 3.3) (Draetta, 1994; Elledge and Harper, 1994).

Vazba příslušného cyklinu na CDK je podmíněna defosforylací Thr14 a Tyr15 v N-terminálním konci CDK CDC25 fosfatázou. Celý proces je zpětně regulován komplexem WEE1/MYT1 kináz. Přísná regulace exprese, aktivace a degradace CDC25 fosfatázy a WEE1 tvoří jeden z bezpečnostních mechanismů běhu buněčného cyklu (Perry and Kornbluth, 2007).

CDK jsou obecně navzájem zastupitelné. Jednotlivé delece CDK sice vyvolají deficiencie, ale jsou slučitelné se životem. Výjimkou je delece CDK1, která je fatální. Vícečetné mutace CDK či CCN jsou také fatální (Malumbres and Barbacid, 2009).

Aktivita CDK je dále regulována inhibitory, které rozdělujeme do dvou skupin – na proteiny INK4 (P15, P16, P18, P19), jež inhibují CDK4 a CDK6, a na proteiny KIP/CIP (P21, P27, P57), jež jsou schopny inhibovat celou škálu CDK (Sherr and Roberts, 1999).



Obrázek 3.3 Zapojení cyklinů a cyklin-dependentních kináz do regulace buněčného cyklu.

Vstup do buněčného cyklu je závislý na stimulaci růstovými faktory a kontaktu s extracelulární matrix. Na počátku G1 fáze růstové faktory (IGF-1, EGF) stimulují pomocí transkripčních faktorů (C-MYC, C-JUN, N-MYC) přes různé signální dráhy expresi cyklinu D (*Ccnd1*, *Ccnd2*, *Ccnd3*). Zvýšená koncentrace CCND vede k asociaci s CDK4 nebo CDK6 a vzniku komplexů CDK4/CCND a CDK6/CCND (Balmanno and Cook, 1999; Furlanetto et al., 1994; Perry et al., 1998). CCND/CDK4/6 komplexy fosforylují retinoblastomový protein (pRB), čímž částečně uvolňují a aktivují transkripční faktor E2F. E2F řídí expresi mnoha genů nutných k replikaci DNA a regulátorů buněčného cyklu, včetně genů cyklinu E (*Ccne1*, *Ccne2*) a cyklinu A (*Ccna*). Začíná se formovat komplex CDK2/CCNE, který hyperfosforylací pRB plně aktivuje E2F, a tím zpětně zvyšuje koncentraci CCNE. Přejed G1/S je iniciován akumulací CCNE vázaném v komplexu CDK2/CCNE (Lundberg and Weinberg, 1998).

V S fázi stále probíhá transkripce řízená proteiny E2F, postupně se zvyšuje koncentrace CCNA a formuje se nový aktivační komplex CDK2/CCNA (Rosenblatt et al., 1992). Během S fáze dochází k replikaci DNA. Před samotným procesem replikace probíhá na konci mitózy a v počátku G1 fáze tzv. licencování DNA pomocí topoizomerázy II., kdy se do budoucích míst replikace navážou proteiny potřebné k iniciaci replikace (Nishitani and Lygerou, 2002). Při iniciaci samotné

replikace DNA se na stabilizování iniciačního replikačního komplexu podílí heterodimer CDK2/CCNE. U kontinuálně proliferujících buněk je CCNE důležitý pro aktivaci replikace. U buněk z G0 fáze hraje CCNE důležitou roli i v licencování DNA, kde se přímo váže na licencované místo a pomáhá vazbě iniciačního replikačního komplexu (Geng et al., 2007; Shiama, 1997; Wei et al., 2013; Wu et al., 2014). Na konci S fáze a začátku G2 fáze je zabráněno re-licencování DNA inaktivací iniciačního replikačního komplexu pomocí komplexu CDK2/CCNA (Méndez et al., 2002). Přechod S/G2 fází iniciují nově vytvořené komplexy CDK1/CCNA (Arellano and Moreno, 1997). Během G2 fáze probíhá reparace replikačních chyb a buňka se připravuje na vstup do mitózy (Stark and Taylor, 2006). Vstup do mitózy je tlumen, pokud probíhá replikace DNA nebo je poškozena DNA.

Vstup do mitózy a její průběh je regulován komplexem CDK1/CCNB a CDK1/CCNA. CCNA je degradován při rozpadu jaderné membrány a slovo přebírá komplex CDK1/CCNB (Malumbres and Barbacid, 2009). Regulace komplexů CDK1/CCNB a CDK1/CCNA se účastní především fosfatázy CDC25 (isoformy CDC25A, CDC25B, CDC25C) a WEE1/MYT1 kinázy. Během replikace DNA je CDK1 inaktivována fosforylací WEE1/MYT1 kinázami. Při přechodu G2/M jsou MYT1 a WEE1 inaktivovány a fosfatáza CDC25B defosforyluje centrosomální komplex CDK1/CCNB. Společně s ním se translokuje do jádra, kde CDK1 fosforylací stabilizuje CDC25A fosfatázu, která zpětně aktivuje komplexy CDK1/CCNB (Lindqvist et al., 2005; Mailand et al., 2002; Timofeev et al., 2010). CDK1 se aktivně účastní buněčného dělení (Malumbres and Barbacid, 2009). Přechod do anafáze je iniciován degradací CCNB (Dimova et al., 2012).

Jednou z hlavních signálních drah podílejících se na regulaci buněčného cyklu v řadě tkání včetně střevního epitelu je Wnt/ β -kateninová dráha. Aktivovanou signální drahou je uvolňován volný β -katenin, který je poté translokován do jádra, kde vazbou na transkripční faktory TEF/LEF aktivuje expresi řady genů, mezi jinými *c-myc*, *c-jun* a *Ccnd1*. Zároveň je inhibován konstitutivně aktivní GSK-3 β , která fosforyluje β -katenin a iniciuje tím jeho degradaci. Aktivaci Wnt/ β -kateninové dráhy negativně reguluje APC protein (adenomatous polyposis coli), jež vyvazuje volný β -katenin z cytoplasmy (Kim et al., 2003; Reguart et al., 2005).

3.2.1.2 Buněčný cyklus a kolorektální tumorigeneze

Narušení regulace buněčného cyklu souvisí s nekontrolovatelnou proliferací buněk a patří k charakteristickým znakům kolorektální tumorigeneze (Evan and Vousden, 2001; Risio et al., 1988).

Změny exprese některých CCN a CDK byly detekovány v různých nádorových tkáních, včetně kolorektálního nádoru. CCNE asi nejlépe odráží zapojení cyklinů do kolorektální tumorigeneze. V závislosti na vývojových stádiích CRC bylo zaznamenáno postupné zvyšování hladiny exprese CCNE. V adenomu a časných stádiích adenokarcinomu bylo změřeno až 50 % zvýšení exprese CCNE oproti hladině exprese v normálním kolorektálním epitelu. V pozdních stádiích adenokarcinomu dochází k nepatrnému snížení exprese CCNE, míra exprese CCNE v metastázích je závislá na umístění metastáze (Corin et al., 2010; Ioachim, 2008; Li et al., 2001; Yasui et al., 1996). Postupně se zvyšující exprese během vývoje CRC, s výjimkou metastáz lymfatických uzlin, je typická i pro CCNB1 (Korenaga et al., 2002; Wang et al., 1997). Inhibice CCNB1 v CRC vede k narušení proliferace CRC buněk in vitro a potlačení růstu tumoru in vivo, ale zároveň potlačení CCNB1 zvyšuje migraci CRC buněk a riziko metastáz pravděpodobně prostřednictvím snížení exprese E-kadherinu (Fang et al., 2014a, 2015). Zvýšená exprese některých CCN (CCNE, CCNB1, CCNA1, CCND1) a CDK (CDK4, CDK2, CDK1) koreluje s nepříznivou prognózou u pacientů trpících CRC (Fang et al., 2014a; Ioachim, 2008; Li et al., 2001, 2003; Nozoe et al., 2004; Zhao et al., 2003; Zhou et al., 2011).

Regulace vývoje CRC se mohou účastnit také izoformy fosfatázy CDC25. In vitro fosfatázy CDC25A a CDC25B působí jako onkogeny. Zároveň existuje vzájemný vztah mezi zvýšenou hladinou exprese CDC25B a sníženou šancí na přežití pacientů s CRC (Hernández et al., 2001; Takemasa et al., 2000).

Další nálezy pozměněné regulace v kolorektální tumorigenezi se týkají například CDK inhibitorů P16, P21, P27, P57, transkripčního faktoru C-MYC nebo proteinu APC (Dai et al., 2007; Ioachim, 2008; McKay et al., 2002; Zhao et al., 2003).

3.2.1.3 Apoptóza

Apoptóza je jedním z kontrolovaných procesů programované buněčné smrti, jež se podílí na regulaci počtu buněk organismu a zachovává tak tkáňovou homeostázu. Zároveň apoptóza chrání organismus před šířením buněčných mutací a eventuálním vznikem rakoviny a jiných nemocí (Cotter, 2009).

Protože rozpoznání a odstranění chybně proliferujících buněk je klíčové pro homeostázu, musí být procesy buněčného dělení a buněčné smrti spřaženy a v kontrolním bodě musí být rozhodnuto, zda je nutné iniciovat buněčnou smrt. Proto existuje síť kontrolních bodů, které se ujišťují o bezchybném proběhnutí fází buněčného cyklu a zajišťují kontrolu integrity DNA. Obecně je můžeme rozdělit do 2 skupin na konstitutivně aktivní a na aktivující se při poškození DNA.

Konstitutivně aktivní kontrolní body jsou umístěny v kritických krocích buněčného cyklu, na přechodu mezi G1/S fází, G2/M fází a na konci M fáze (Arellano and Moreno, 1997). Při poškození DNA jsou aktivovány sensorové kinázy ATM a ATR. Dochází k aktivaci kontrolních kináz CHK1 a/nebo CHK2, které společně s ATM a ATR inhibují aktivitu CDK a CDC25 fosfatáz. Aktivace dráhy pro poškození DNA vyústí v zastavení buněčného cyklu v G1/S, S či M/G2 fázi, kdy dojde k opravě DNA či je indukovaná apoptóza. ATR/CHK1 dráha je aktivována pomocí replikační vidličky během S/G2 fáze, zatímco ATM/CHK2 je aktivována modifikací chromatinu při poškození DNA v interfázi (Jones and Petermann, 2012; Massagué, 2004). Součástí ATM/CHK2 dráhy v G1 fázi buněčného cyklu je stabilizace transkripčního faktoru P53. Různé typy poškození vyvolávají různé změny v oscilaci P53. P53 může aktivovat proteinový inhibitor cyklin-dependentních kináz P21, jenž inhibuje CDK2/CCNE komplex a způsobí zastavení buněčného dělení v G1 fázi, či může iniciovat apoptózu (Vogelstein et al., 2000).

Apoptóza je zprostředkována dvěma hlavními signalizačními drahami v cytoplasmě, vnější a vnitřní (Obrázek 3.4). V obou dráhách apoptózy hrají klíčovou úlohu kaspázy. Kaspázy jsou proteázy štěpící proteiny za aspartátem. V průběhu apoptotického procesu jsou aktivovány iniciační kaspázy štěpící exekutivní kaspázy, které indukují samotný proces degradace buňky (Nagata, 1999; Thornberry, 1998).

Vnitřní apoptotická dráha je úzce spjatá s mitochondriemi a je aktivovaná buněčným stresem, jež může být způsoben například metabolickým nebo hypoxickým stresem, poškozením DNA, virovou infekcí, toxickými látkami, radiací, narušenou rovnováhou Ca^{2+} či akumulací nesprávně složených proteinů v endoplasmatickém retikulu (Stoian et al., 2014). Intenzivní buněčný stres způsobí pokles membránového potenciálu mitochondrie, což vede k otevření permeabilních mitochondriálních pórů a uvolnění pro-apoptotických mitochondriálních proteinů, včetně cytochromu c, SMAC a endonukleázy G (Er et al.). SMAC protein potlačuje inhibitory apoptotických proteinů (IAP proteiny) (Srinivasula et al., 2000). Cytochrom c interaguje s proteinem APAF1, váže se na pro-kaspázu 9 a vzniká tzv. apoptosom, který iniciuje signalizační kaskádu kaspáz. Vzniká kaspáza 9, která aktivuje kaspázu 3 (Zou et al., 1999).

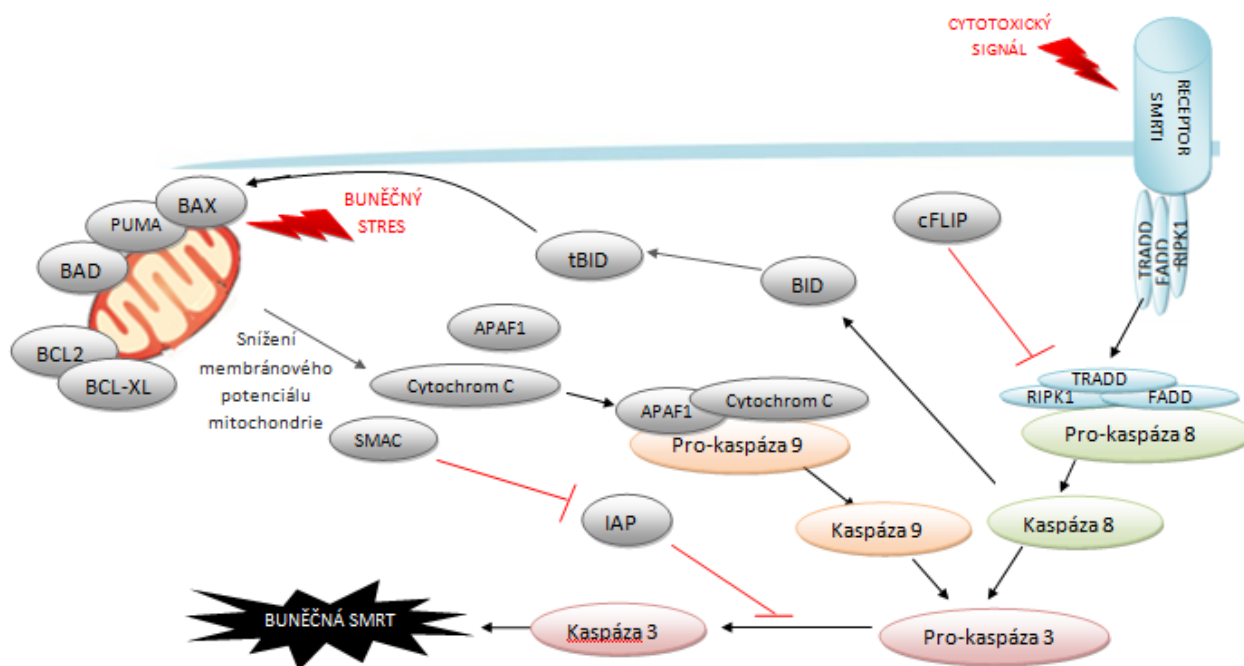
Iniciace vnitřní apoptotické dráhy je závislá na výsledné rovnováze pro-apoptotických a anti-apoptotických proteinů z rodiny BCL2 proteinů a tumor supresorového proteinu P53. Mezi proteiny z rodiny BCL2 se řadí pro-apoptické proteiny BID, BIK, BAK, BAX, BOK, PUMA, BAD, NOXA a anti-apoptotické proteiny BCL2, BCL-XL, BAG (Kirkin et al., 2004).

Vnější apoptotická dráha je aktivována vazbou extracelulárních ligandů na tzv. receptory smrti (FAS, TNF a TRAIL receptory), což iniciuje ligaci adaptorových proteinů FADD, TRADD a RIPK1

(Nagata, 1999). Dochází k navázání pro-kaspázy 8 a formování tzv. DISC komplexu (death inducing signaling complex), který aktivuje kaspázu 8 (Scaffidi et al., 1999a). Kaspáza 8 následně stimuluje kaspázu 3. Kaspáza 8 dále štěpí pro-apoptotický protein BID na jeho zkrácenou verzi tBID, jenž je translokován do mitochondrie, kde se váže na BAX a snižuje potenciál mitochondriální membrány, čímž aktivuje vnitřní apoptotickou dráhu (Madash et al., 2002; Nagata, 1999).

Aktivace kaspázy 3 je společným krokem pro obě apoptotické dráhy. Kaspáza 3 společně s dalšími exekučními kaspázami 6 a 7 aktivují cytoplasmatické endonukleázy a další protézy. Postupně dojde ke kondenzaci chromatinu, fragmentaci DNA, rozpadu jaderné membrány, degradaci jaderných a cytoskeletálních proteinů, expresi ligandů pro receptory fagocytujících buněk a pohlcení fagocytující buňkou (Thornberry, 1998).

Apoptotická kaskáda může být regulována pomocí IAPs (inhibitory apoptózy; cFLIP, cIAP2, survivin) (LaCasse et al., 1998). Vnější apoptotická dráha může být dále inhibována vazbou proteinu cFLIP na pro-kaspázu 8 nebo proteinem TOSO inhibujícím kaspázu 8 (Scaffidi et al., 1999b; Song and Jacob, 2005).



Obrázek 3.4 Vnitřní a vnější apoptotická signalizační dráha.

3.2.1.4 Apoptóza a kolorektální tumorigeneze

V různých typech rakoviny bylo detekováno potlačení apoptotického procesu (Bedi et al., 1995; Cotter, 2009). V kolorektálním karcinomu jsou tumorem modifikované signalizační dráhy (Balounová, 2014) hlavní příčinou narušení apoptózy (Huang and Yu, 2015). Obecným jevem

deregulace apoptotických drah je snížení exprese apoptotických kaspáz (Anguiano-Hernandez et al., 2007; Leonardos et al., 1999)

Změny exprese řady anti-apoptotických a pro-apoptotických proteinů z rodiny BCL jsou častým průvodním jevem vývoje většiny tumorů. Například v CRC byly zaznamenány zvýšení exprese anti-apoptotických proteinů BCL2 a BCL-XL a snížení exprese pro-apoptotických proteinů BAK a BAX. BCL2 má zvýšenou expresi až v 90 % případů kolorektálního karcinomu (Liu et al., 2003; Pryczynicz et al., 2014).

Odolnost CRC buněk ke vnější apoptotické dráze je pravděpodobně spojená s markantně zvýšenou expresí inhibitoru vnější apoptotické dráhy cFLIP. S vývojem CRC se exprese cFLIP postupně zvyšuje (Ryu et al., 2001). Další IAP protein survivin se aktivně účastní epiteliálně mezenchymálního přechodu adenomu na adenokarcinom. Zvýšená exprese survivinu inverzně koreluje s incidencí apoptózy a je spjatá se zhoršenou prognózou CRC (Kawasaki et al., 2001; LaCasse et al., 1998). Zároveň je v kolorektální tumorigenezi potlačena exprese SMAC proteinu inhibujícího IAPs (Anguiano-Hernandez et al., 2007).

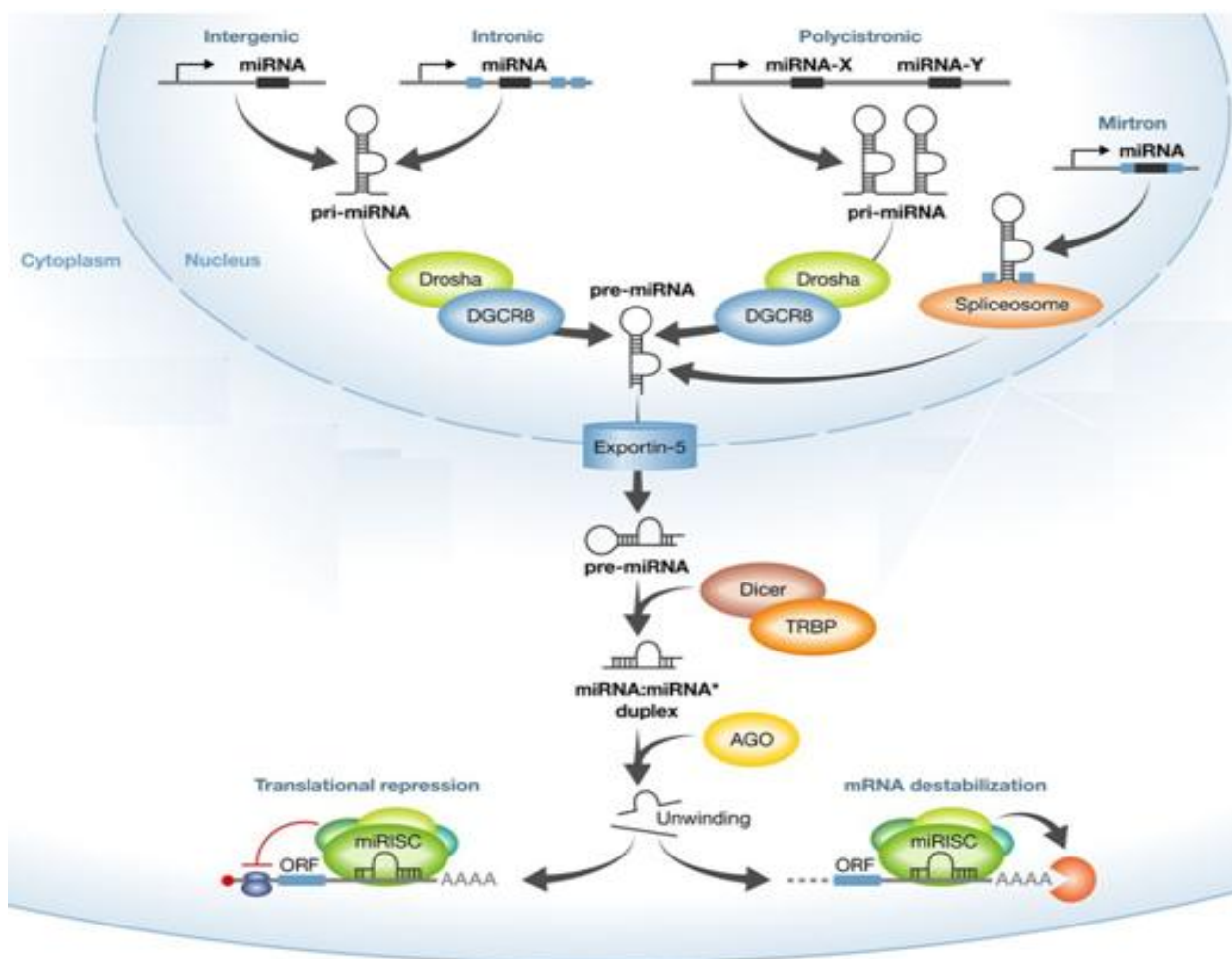
V CRC dochází k deregulaci dráhy reagující na poškození DNA a změnu aktivity konstitučně aktivních kontrolních bodů. Jedním z charakteristických znaků CRC je inaktivace proteinu P53, nejčastěji ztrátou úseku chromozomu 17p a mutací genu *p53*. Mutace *p53* byla nalezena ve více jak 60 % CRC (Fearon, 2011; López et al., 2012; Vogelstein et al., 2000). Navíc snížené exprese CHK1 a CHK2 spojené s inhibiční fosforylací CHK2 byly naměřeny v časných stádiích CRC (Stawinska et al., 2008).

3.2.2 Závislost vývoje CRC na miRNA

3.2.2.1 MiRNA a jejich regulace

MiRNA jsou ~22nt dlouhé jednořetězcové RNA řadí se do skupiny malých, nekódujících RNA (Lagos-Quintana et al., 2001; Rodriguez et al., 2004). Geny miRNA jsou umístěny napříč celým genomem, v intronech i exonech. Velmi často se miRNA formují do clusterů, dokonce některé clustery miRNA jsou již z genomu transkribovány v polycistronních primárních transkriptech. Ostatní miRNA jsou transkribovány společně se svými cílenými geny nebo samostatně s vlastními promotory (Saini et al., 2007). Transkripce miRNA je ve většině případů řízena RNA polymerázou II (Obrázek 3.5) (Lee et al., 2004). Transkripce vzniká tzv. pri-miRNA, vlásenková struktura ze stovek až tisíců nukleotidů s 3'polyA koncem a 5' methylguanosinovou čepičkou (Lee et al., 2002). Pri-miRNA je detekována proteinovým komplexem mikroprocesor, který obsahuje RNázu III Drosha a její kofaktor DGCR8. Mikroprocesor štěpí pri-miRNA na pre-miRNA, ~60nt prekurzor

miRNA (Gregory et al., 2004; Lee et al., 2002). Za pomoci proteinu Exportinu 5 dochází k translokaci pre-miRNA z jádra do cytoplasmy (Yi et al., 2003). V cytoplasmě je pre-miRNA navázána do proteinového komplexu Dicer. Dicer štěpí pre-miRNA na duplex miRNA/miRNA*. Hlavní vlákno z duplexu není předem na pre-miRNA určené, ale závisí na menší relativní termodynamické stabilitě 5'UTR (Krol et al., 2010; Lee et al., 2003). Celý komplex Diceru s duplexem miRNA/miRNA* agreguje s Argonaut proteinem a formuje se pre-miRISC (prekurzor miRNA indukujícího umlčujícího komplexu). Duplex se naváže na Argonaut protein a uvolňuje se Dicer. Vzniká tak miRISC komplex, který vklíněním N-terminální domény aktivně oddělí hlavní vlákno miRNA od vedlejšího. Vedlejší vlákno miRNA* je uvolněno do cytoplasmy, kde je degradováno nebo navázáno do nového miRISC komplexu (Carthew and Sontheimer, 2009; Kawamata et al., 2009; Okamura et al., 2008).



Obrázek 3.5 Syntéza miRNA. Upraveno z (van Rooij et al., 2014).

MiRNA se vážou 2-8 nukleotidy umístěnými na svém 5'konci zpravidla na 3'UTR mRNA cílového proteinu, ale existují i případy vazby miRNA v kódující sekvenci nebo 5'UTR (Duursma et al., 2008; Lewis et al., 2005; Tsai et al., 2009).

MiRNA dokážou negativně regulovat translaci cílených proteinů pomocí degradace či translační represe mRNA (Bartel, 2004). V posledních letech byl z velké části objasněn způsob regulace u miRNA řízené degradace mRNA. MiRNA zprostředkovaná degradace mRNA je iniciovaná miRISC komplexem navázaným na cílové mRNA. MiRISC komplex asociuje s TNRC6 proteinem, který umožní disociaci polyA vazebných proteinů (PABP) a navázání deadenylačních komplexů a dalších proteinů. Dochází k odstranění 5' methylguanositové čepičky, následované degradací mRNA pomocí exonukleáz (Fabian and Sonenberg, 2012; Fabian et al., 2011; Moretti et al., 2012; Zipprich et al., 2009). Více otázek stále přetrvává v miRNA zprostředkované translační represí mRNA. Většina studií translační represe podporuje zapojení miRISC komplexu při iniciaci translace mRNA (zabráněním interakce mezi PABP a EIF4E, navázáním translačních inhibitorů nebo zablokováním 5' methylguanositové čepičky), ale existují názory podporující možnost post-iniciační translační modifikace miRISC komplexem (předčasným ukončením translace) (Fukao et al., 2014; Humphreys et al., 2005; Moretti et al., 2012; Nottrott et al., 2006; Zekri et al., 2013).

Síla regulace translace mRNA závisí na míře komplementarity miRNA a zároveň může souviset s počtem vazebných míst v mRNA a jejich vzdáleností od sebe (Saetrom et al., 2007). Vzhledem k tomu, že molekuly miRNA se vážou převážně nepřesně, s výdutěmi, mohou se miRNA vázat na stovky až tisíce cílů a prostřednictvím translační represe či degradace mRNA regulovat expresi proteinů z rozmanitých buněčných drah a tím zasahovat do biochemických, fyziologických i behaviorálních drah organismu (Carthew and Sontheimer, 2009). Čím vyšší je komplementarita miRNA s cílovou mRNA, tím menší je stabilita miRNA (Pasquinelli, 2012).

3.2.2.2 MiRNA a kolorektální tumorigeneze

Různé miRNA jsou oproti zdravé tkáni rozdílně exprimované v neoplastické tkáni. Změna exprese miRNA může mít příčiny genetické, epigenetické, ve změně biogeneze miRNA nebo v expresi transkripčních faktorů. Změna exprese miRNA vede k deregulaci klíčových drah souvisejících s vývojem CRC (Croce, 2009; Farazi et al., 2011; Goel and Boland, 2012; Iorio and Croce, 2012).

MiRNA zasahují do celého procesu vývoje CRC, od adenomatózního polypu po samotný CRC. V raných fázích CRC souvisejících se vznikem adenomatózního polypu byla prokázána zvýšená exprese miR-135a, miR-135b, miR-141 a miR-142-3p, jež negativně regulují aktivitu APC proteinu (Aslam et al., 2015; Bandrés et al., 2006; Nagel et al., 2008). Dalším příkladem miRNA zapojených do rané fáze vývoje CRC jsou miR-9 a miR-34a, které se pozitivně a negativně účastní regulace Wnt/ β -kateninové dráhy (Cha et al., 2012; Ma et al., 2010).

MiR-34a/b/c hrají důležitou roli v iniciaci vnitřní apoptotické dráhy a zastavení buněčného cyklu. Iniciaci jejich transkripce je regulována transkripčním faktorem P53. Zvýšená exprese miR-34a, která ovlivňuje expresi proteinů regulujících buněčný cyklus E2F5, E2F3, CDK4, CDK6, CCNE2, inhibuje buněčnou proliferaci a indukuje zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (Lu et al., 2015; Tazawa et al., 2007). Podobně zasahují do dynamické rovnováhy proliferace a apoptózy miR-34b a miR-34c, které regulují expresi genů *c-myc*, *Cdk6*, *E2f3*, *Ccnd1* a *Bcl2* (Cannell and Bushell, 2010; Raver-Shapira et al., 2007). V CRC byla zjištěna snížená exprese těchto miRNA, což inverzně koreluje se zhoršenou prognózou CRC (Lu et al., 2015; Toyota et al., 2008). Protein P53 dále indukuje expresi minimálně 4 miRNA, miR-16, miR-192, miR-194 a miR-215, které negativně regulují progresi CRC prostřednictvím apoptózy a buněčného cyklu (Braun et al., 2008; Liu et al., 2010; Ma et al., 2013).

Mezi miRNA regulující buněčný cyklus a apoptózu se řadí i miR-1, miR-21, miR-126, miR-129, miR-143, miR-145, miR-155, miR-181a a let-7. Tyto miRNA regulují buněčný cyklus a apoptózu nepřímo přes signalizační dráhy MEK/ERK a PI3K/AKT (Akao et al., 2006; Graziano et al., 2010; Reid et al., 2012; Wu et al., 2010). Většina z nich působí jako tumor supresory a v CRC byla zaznamenána jejich snížená exprese. Výjimku tvoří miR-21, miR-155 a miR-181a, jež působí jako onkogeny a jejich exprese je v CRC zvýšená (Bakirtzi et al., 2011; Meng et al., 2007; Nishimura et al., 2012; Shibuya et al., 2010).

V pokročilých fázích kolorektální tumorigeneze dochází k přechodu adenomu na karcinom přes epiteliálně-mezenchymální přechod (EMT) a vzniku metastáz (Zavadil and Böttinger, 2005). Cluster miR-17-92 a miR-155 ovlivněním signalizační dráhy TGF- β podporují angiogenezi a fibrózu v CRC a zároveň tlumí odpověď imunitního systému (Dews et al., 2010; Louafi et al., 2010). Navíc se miR-155 účastní EMT, kde podporuje narušení těsných tkáňových spojů a aktivuje buněčnou invazi (Kong et al., 2008). MiR-9, miR-21, miR-132 a miR-191 negativně regulují EMT a vznik metastáz CRC pomocí snížení translace MMP2, MMP3, MMP9 a VEGF (Park et al., 2016; Qin et al., 2014; Xiong et al., 2013; You et al., 2014).

3.3 Interakce mezi cirkadiánními hodinami, buněčným cyklem, apoptózou a miRNA

3.3.1 Cirkadiánní regulace a buněčný cyklus

Intenzivní proliferace kmenových buněk v epitelu je časově regulovaným procesem (Al-Nafussi and Wright, 1982; Potten et al., 1977). Regulace buněčného cyklu je závislá na cyklických oscilacích proteinů, kde S a M fáze buněčného cyklu jsou u denních živočichů vázané na světlo

část dne (Bjarnason et al., 1999). Interakce mezi těmito cyklickými oscilacemi a oscilacemi cirkadiálních hodin se řadí mezi intenzivně zkoumané problémy dnešní vědy (Feillet et al., 2015).

Cirkadiální rytmus reguluje řadu komponent buněčného cyklu. Mezi nejznámější regulace patří heterodimerem BMAL1:CLOCK zprostředkovaná regulace cirkadiální exprese CCN. Heterodimer BMAL1:CLOCK iniciuje cirkadiální expresi *c-Myc* a *Wee1*, čímž nepřímo reguluje expresi *Ccnd1*, *Ccnd2* a ovlivňuje aktivitu komplexu CDK1/CCNB1 (Fu et al., 2002a; Matsuo et al., 2003; Miller et al., 2007). Negativní regulace BMAL1 v buňkách CRC vede ke zvýšení hladiny CCNB1, CCND1 a CCNE, což vede k akceleraci růstu tumoru (Zeng et al., 2010). Zvýšená exprese komplexu BMAL1:CLOCK způsobí inhibici vstupu buněk CRC do S fáze (Sakamoto and Takenoshita, 2015). Do cirkadiální exprese CCN zasahují i PER1, PER2 a CK1 ϵ . PER1 zasahuje do exprese *c-Myc*, PER2 ovlivňuje expresi *Ccnd1* a *Ccna* a delece CK1 ϵ má vliv na snížení hladiny CCNB1 a CCNA1 (Fu et al., 2002a; Gery et al., 2006; Yang and Stockwell, 2008).

Dalším příkladem vztahu mezi cirkadiálními rytmy a regulací buněčného cyklu jsou proteiny P21 a P16. CDK inhibitor P21 je regulovaný kompeticí proteinů ROR α/γ a REV-ERB α/β o vazebné místo. Podobně jako u *Bmal1* pozitivně a negativně regulují expresi *p21* obsahující RORE sekvenci. Pokud je P21 aktivní, iniciuje G1 fázi buněčného cyklu (Gréchez-Cassiau et al., 2008). Zároveň byla na genu *p21* nalezena E-box sekvence, což ukazuje na možnost regulace *p21* BMAL1:CLOCK komplexem (Alhopuro et al., 2010). Cirkadiální oscilace exprese genu *p16* je regulována komplexem NONO a PER proteinů, tím cirkadiální hodiny mohou zasahovat do zastavení buněčného dělení v G1 fázi. Význam NONO proteinu v interakci buněčného cyklu a cirkadiálních hodin je nastíněn jeho funkční inhibicí. Inaktivaci NONO proteinu způsobí rozpřažení oscilací cirkadiálních hodin a buněčného cyklu (Kowalska et al., 2013; Maier and Kramer, 2013).

Nepřímá pozitivní i negativní cirkadiální regulace buněčného cyklu byla zaznamenána v souvislosti s Wnt/ β -kateninovou dráhou. Kasein kinázy CK1 δ a CK1 ϵ fosforylují proteiny APC a GSK3 β , čímž pozitivně regulují stabilitu β -kateninu v cytoplasmě (Gao et al., 2002; Lee et al., 2001). Negativní regulace buněčného cyklu byla prokázána u hodinového genu PER2 snižujícího hladinu volného β -kateninu v cytoplasmě. Zároveň zvýšení β -kateninu destabilizuje PER2 přes E3 ubiquitin ligázový komplex. V intestinální mukóze myši s APC mutací je snížení hladiny PER2 spjaté se změnou cirkadiálního rytmu buněčného cyklu (Wood et al., 2008; Yang et al., 2009).

Nejenom, že je buněčný cyklus regulovaný cirkadiálními hodinami, ale může hodiny sám ovlivňovat. Nedávná studie prokázala zapojení komplexu CDK2/CCNE do regulace buněčného cyklu, kdy CK1 δ je fosforylována vazbou komplexu CDK2/CCNE (Ianes et al., 2015).

3.3.2 Cirkadiánní regulace a apoptóza

Již v 80. letech byl ukázán vliv narušení cirkadiánních rytmů na indukci apoptózy u kmenových buněk v epitelu kolonu. Při obrácení světelného stimulu došlo ke zvýšení apoptózy v epitelu kolonu (Ijiri and Potten, 1988).

Cirkadiánní regulace zasahuje do vnější i vnitřní apoptotické dráhy, včetně regulace exekutivních kaspáz. Hodinový protein PER3 částečně reguluje expresi kaspázy 3 a kaspázy 8 (Hong et al., 2014). Proteiny vnitřní apoptotické dráhy cytochrom c a APAF1 mají zvýšenou expresi při deleci hodinového proteinu PER1 (Wiebking et al., 2013). Receptor smrti TNF α účastní se vnější apoptotické dráhy je cirkadiánně rytmický a zároveň dokáže zpětně regulovat expresi hodinových genů *Per* a hodinami kontrolovaných transkripčních faktorů *Dbp*, *Tef* a *Hlf* přes inhibici heterodimeru BMAL1:CLOCK (Cavadini et al., 2007; Paladino et al., 2014; Suzuki et al., 2008).

Podobným způsobem jako je kladem důraz na iniciační regulaci apoptózy pomocí pro-apoptotických a anti-apoptotických proteinů rodiny BCL2 v tumorigenezi kolorektálního karcinomu, je apoptotický proces regulovaný cirkadiánními hodinami. PER1, PER2 a PER3 hodinové proteiny zastávají roli pro-apoptotického faktoru, který zvyšuje expresi pro-apoptotického genu *Bax* a snižuje expresi anti-apoptotických genů *Bcl2*, *Bcl-XL* (Hong et al., 2014; Hua et al., 2006; Oda et al., 2009; Sato et al., 2009). Funkční mutace v hodinovém proteinu CLOCK je spjatá s poklesem exprese anti-apoptotického genu *Bcl2* (Miller et al., 2007). Navíc vede pozitivní regulace exprese *Clock* k inhibici apoptózy a k utlumení exprese pro-apoptotických genů *Bax* a *Bid*. Potlačená exprese *Clock* nemá na expresi *Bax* a *Bid* signifikantní účinek (Wang et al., 2015).

Na iniciaci apoptózy má zásadní vliv buněčný stres. Hodinové proteiny PER1 a PER2 pozitivně regulují buněčnou odpověď na hypoxický stres (Magnone et al., 2014). Zároveň bylo prokázáno, že zvyšují citlivost buněk na radiaci v mozku (Zhanfeng et al., 2015)

Mezi další geny s prokázanou cirkadiánní aktivitou se řadí apoptotický inhibitor survivin (Siffroi-Fernandez et al., 2014).

Zatím nejvíce známých cirkadiánních regulací proliferačních a apoptotických procesů je lokalizováno v kontrolních bodech reagujících na poškození DNA. CRY1 pozitivně reguluje ATR-zprostředkovanou dráhu poškození DNA (Kang and Leem, 2014). PER1 interaguje s kinázami ATM a CHK2 a jeho zvýšená exprese zvyšuje náchylnost rakovinných buněk k indukované apoptóze (Fu et al., 2002a; Gery et al., 2006). Transkripční faktor P53 může být pozitivně regulován pomocí hodinového proteinu BMAL1 a současně zvýšená exprese PER proteinu pozitivně koreluje s expresí P53 (Hua et al., 2006; Jiang et al., 2016). P53 může zpětně negativně regulovat expresi hodinového genu *Per2* pomocí vazby P53 na E-box v *Per2* promotoru (Miki et al., 2013).

3.3.3 Cirkadiánní regulace a miRNA

V posledních letech je objevována stále širší a komplexnější síť zapojení miRNA do různých regulačních drah v organismu. Jedním z vláken této sítě je vztah mezi cirkadiánními hodinami a miRNA. U řady miRNA již byla ověřena či predikována cirkadiánní rytmicita nebo byla ukázána posttranskripční modifikace cirkadiánních hodin pomocí miRNA (Cheng and Obrietan, 2007; Na et al., 2009).

Různé miRNA posttranskripčně modifikují pomocí translační represe klíčové proteiny molekulární cirkadiánní zpětnovazebné smyčky. Příkladem regulace exprese hodinového proteinu BMAL1 jsou cirkadiánně rytmické miR-142-3p a miR-27b-3p, jež jsou zároveň samy regulovány heterodimerem BMAL1:CLOCK. Je to ukázka další pozitivní zpětnovazebné interakce hodin (Shende et al., 2013; Tan et al., 2012; Zhang et al., 2016). Další miRNA, která může regulovat hladinu BMAL1 je miR-155, jejíž hladina inverzně koreluje s hladinou BMAL1 a delece miR-155 zkrátí cirkadiánní periodu (Curtis et al., 2015). V epifýze byla objevena miR-182, která cílí na 3'UTR *Clock* mRNA (Ding et al., 2015). Další miRNA regulující cirkadiánní hodiny je miR-185, jejíž cirkadiánní aktivita ovlivňuje cirkadiánní amplitudu *Cry1* (Lee et al., 2013). MiR-29a/b/c a cluster miR-192/194 posttranskripčně regulují expresi *PER1*, *PER2* a *PER3* (Nagel et al., 2009; Zhao et al., 2014). Při vysoké expresi clusteru dojde ke zkrácení periody CC (Nagel et al., 2009).

Funkci cirkadiánních hodin lze regulovat také nepřímo pomocí miR-34a. MiR-34a se váže na mRNA *Sirt1* a inhibuje její translaci. Exprese miR-34a může být aktivována transkripčním faktorem P53 (Chang et al., 2007; Yamakuchi et al., 2008).

Odlišnou regulaci cirkadiánní exprese má miR-132. Cirkadiánní exprese miR-132 je regulovaná světlem, které indukuje MAPK signalizační dráhu stimulující protein CREB, jenž se váže na CRE vazebnou sekvenci v 3'UTR miR-132. MiR-132 negativně reguluje translaci genů účastnících se remodelace chromatinu a genů ovlivňujících translaci *PER*. Zvýšená exprese miR-132 vede ke snížení translace *PER* proteinů a tlumí reakci na světelné seřizování hodin v SCN (Alvarez-Saavedra et al., 2011; Cheng and Obrietan, 2007).

Význam zapojení miRNA do cirkadiánní regulace střeva nám nastiňuje cirkadiánní rytmus miR-16 v kryptách jejunu, kde pravděpodobně koordinuje proliferaci enterocytů a zároveň je podobný cirkadiánnímu rytmu proliferace buněk zaznamenaném v lidské gastrointestinální mukóze (Balakrishnan et al., 2010; Buchi et al., 1991). Další miRNA s cirkadiánní expresí objevené v jejunu jsou miR-20a a miR-141 (Balakrishnan et al., 2010).

Mezi miRNA s cirkadiánním rytmem objevenými v játrech patří miR-181d, miR-191 a miR-122. Exprese miR-181d a miR-191 je regulována pomocí BMAL1:CLOCK. U miR-122 nebyla

změřena cirkadiánní exprese, ale u jejích prekurzorů pri-miR-122 a pre-miR-122 byla nalezena regulace prostřednictvím REV-ERB α . Potlačená exprese miR-122 vede k deregulaci exprese stovek genů souvisejících s metabolismem cholesterolu a lipidů (Gatfield et al., 2009; Na et al., 2009).

Iniciace cirkadiánní exprese miRNA může probíhat i za pomoci hodinového proteinu ROR α . Ve fotoreceptorech retiny byly detekovány miR-96 a miR-182 regulované ROR α , které se účastní diferenciací retinálních promotorů a regulace funkce retiny (Xu et al., 2007).

3.4 Tumorigeneze CRC a narušení cirkadiánního rytmu

V posledních letech je věnována velká pozornost zvýšenému riziku vzniku, progresu a zhoršené prognózy některých typů nádorů v souvislosti s narušenými cirkadiánními rytmy (Fritschi et al., 2011; Savvidis and Koutsilieris, 2012). Moderní doba se stále více opírá o umělé osvětlení a zajištění nepřerušovaných služeb u některých profesí je přirozeným důsledkem našeho životního stylu. Práce na směny lékařského personálu, policistů, skladníků a mnoha jiným profesí může vést k narušení přirozených cirkadiánních rytmů (Haus and Smolensky, 2006; Opperhuizen et al., 2015). V prosinci 2007 byla práce na směny uznána jako rizikový faktor Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC)(IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2010). Mezi rizikové typy rakoviny při práci na směny se řadí i kolorektální karcinom. Studie z roku 2003 u zdravotních sester prokázala zvýšenou incidenci CRC u žen dlouhodobě pracujících na směny (Schernhammer et al., 2003).

Narušení periferních cirkadiánních hodin v kolorektálním karcinomu bylo prokázáno na modelech myší s chemicky indukovaným CRC. V porovnání se zdravou tkání měla tkáň CRC sníženou cirkadiánní rytmicitu u hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Rev-erba* a u genu *Bmal1* cirkadiánní rytmus vymizel. Hladina *Bmal1* mRNA byla srovnatelná s minimální hladinou zaznamenanou v tkáni zdravých myší (Soták et al., 2013). Vymizení cirkadiánních rytmů bylo zaznamenáno také v metastázích kolorektálního karcinomu v játrech, kde s výjimkou *Cry1* došlo ke ztrátě cirkadiánní rytmicity u *Rev-Erba*, *Per1*, *Per2* a *Bmal1* (Huisman et al., 2015). Zároveň *in vivo* byla zaznamenaná zvýšená exprese CRY1 a CRY2 v CRC spjatá se zhoršenou prognózou CRC (Mazzoccoli et al., 2016; Yu et al., 2013).

4 Cíle diplomové práce

U klíčových procesů spojených s proliferací buněk, apoptotickým procesem a buněčným cyklem byla prokázána změněná regulace při tumorigenezi a karcinogenezi. Jak jsem již předem nastínila, je úzký vztah mezi tumorigenezí a karcinogenezí, včetně vývoje kolorektálního karcinomu, a narušenými cirkadiánními rytmy předmětem řady studií z posledních let. Narušení cirkadiánních rytmů může být jedním z faktorů ovlivňujících vznik a vývoj nádoru. Existence cirkadiánního rytmu je zaznamenána jak v apoptotickém procesu, tak v dráze buněčného cyklu.

V literárním přehledu jsem poukázala na možnou roli změněné exprese miRNA ve vývoji CRC. Zároveň již byly detekovány miRNA, které vykazují rytmickou expresi či zasahují do regulace molekulárního mechanismu cirkadiánních hodin.

S ohledem na uvedená fakta bylo proto cílem diplomové práce určit, zda dochází během stárnutí a při neoplastické transformaci střevního epitelu ke změně cirkadiánní rytmicity na úrovni výstupu hodinového oscilátoru a na úrovni oscilátorů buněčného cyklu a apoptózy. Konkrétně byly řešeny tyto otázky:

- 1) Určit, zda cirkadiánní rytmicita exprese mRNA u vybraných CCG genů je změněna při stárnutí a během neoplastické transformace kolonu
- 2) Zjistit existenci cirkadiánní rytmicity u vybraných genů buněčného cyklu a apoptózy a v pozitivním případě porovnat zjištěnou cirkadiánní expresi mRNA v makroskopicky zdravě vypadajícím epitelu s expresí dané mRNA kolorektálního tumoru a v epitelu mladších zvířat
- 3) Zjistit, zda existuje u vybraných miRNA v kolonu cirkadiánní rytmus a zda je změněn při neoplastické transformaci

5 Materiál a metody

5.1 Materiál

5.1.1 Použité chemikálie

Během experimentů byly použity tyto chemikálie:

- Na indukci kolitidy a vznik CRC:
 - azoxymethan (AOM) (Sigma-Aldrich, USA)
 - dextransulfát sodný (DSS; M.W. 40000 - 50000)(MP Biomedicals, USA)
- Na stabilizaci RNA: RNAlater (Sigma-Aldrich)
- Na izolaci RNA:
 - GeneElute Mammalian total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)
 - miRNeasy Mini Kit (Qiagen, USA)
- Na UV spektroskopii: etanol (Penta Ing. Petr Švec, Česká republika)
- Na reverzní transkripci:
 - High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, USA)
 - TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Life Technologies)
- Na kvantitativní RT-PCR:
 - 5x HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (Solis Biodyne, Estonsko)
 - TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Life Technologies)
 - fluorescenčně značené sondy TaqMan Assays (Tab 5.1.; Life Technologies)
 - TaqMan® Advanced miRNA Assays (Tab 5.2.; Life Technologies)

Tabulka 5.1 Seznam použitých Taqman sond

Gen	Katalogové číslo	NCBI RefSeq
<i>Tef</i>	Mm00432042_m1	NM_017376.3
<i>Dbp</i>	Mm01194021_m1	NM_016974.3
<i>Ccnd1</i>	Mm00432359_m1	NM_007631.2
<i>Ccne1</i>	Mm00432367_m1	NM_007633.2
<i>Ccna1</i>	MM00432337_m1	NM_001305221.1
<i>Ccnb1</i>	Mm03053893_gH	NM_172301.3
<i>Casp3</i>	Mm01195085_m1	NM_001284409.1
<i>Bcl2</i>	Mm00477631_m1	NM_009741.5
<i>Bad</i>	Mm00432042_m1	NM_001285453.1

Tabulka 5.2 Seznam použitých TaqMan® Advanced miRNA Assays

Gen	Katalogové číslo	MiRBASE
<i>mmu-miR-1-3p</i>	477820_mir	MIMAT0000123
<i>mmu-miR-16-5p</i>	477860_mir	MIMAT0000527
<i>mmu-miR-34a-5p</i>	mmu481304_mir	MIMAT0000542
<i>mmu-miR-155-5p</i>	477927_mir	MIMAT0000165
<i>mmu-miR-192-3p</i>	478741_mir	MIMAT0017012

5.1.2 Použitá zvířata

K experimentům byly využívány 20ti týdenní (20W; 25-35g) a 10ti týdenní (10W; 20g) myši kmene CD-1 (ICR), které byly dodány firmou Charles River z Německa. Zvířata byla krmena standardní dietou *ad libitum* a chována ve standardních podmínkách při teplotě 22°C na standardním denním režimu 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Začátek světelné fáze byl nastaven na 6:00 (CT0) a ukončen v 18:00 (CT12). Po celou dobu experimentu byla zvířata ustájena v zvěřinci Fyziologického ústavu AV ČR. Všechny experimenty byly vykonány v souladu s platnými zákony a nařízeními ČR a EU a schváleny příslušnou etickou komisí.

5.2 Metody

5.2.1 Indukce kolorektálního tumoru a odběr tkání pro mRNA kvantifikaci

Myši kmene ICR staré 20 týdnů byly náhodně rozděleny do dvou skupin skupin po 30 jedincích, jedna zdravá kontrolní skupina a jedna experimentální pro indukci kolorektálního karcinomu.

Experimentální skupině staré 21 týdnů byl indukován kolorektální karcinom dle 6měsíčního modifikovaného protokolu (Tanaka et al., 2003) používaného v naší laboratoři. Myším byla intraperitoneálně podána dávka azoxymethanu v množství 10mg·kg⁻¹ rozpuštěná ve fyziologickém roztoku. O týden později bylo zahájeno podávání dextransulfátu sodného v šesti třítýdenních cyklech (6x po 3 týdnech). Jeden cyklus představoval týdenní pití 2 % roztoku DSS, následované dvoutýdenním pitím pitné vody. Kontrolní zdravé skupině myší byl intraperitoneálně podán fyziologický roztok v den podávání AOM experimentální skupině myší.

Po 3 měsících po skončení cyklů DSS (v experimentální skupině) byly obě skupiny myší, experimentální i kontrolní, usmrceny isofluranovou anestézií ve 4hodinových intervalech během 24h.

Pro každý časový bod (CT0, CT4, CT8, CT12, CT16, CT20) bylo usmrceno vždy 5 náhodně vybraných myší z každé skupiny. Ze zdravých myší byly odebrány vzorky mukózy distálního epitelu (Soták et al., 2013). Z experimentální skupiny byly odebrány vzorky kolorektálního tumoru. Vzorky kolorektálního tumoru byly klasifikované jako intraepiteliální neoplázie v rozsahu lehké až těžké

dysplázie infiltrující do submukózy (Svec et al., 2010). Odebrané vzorky byly vkládány do předem označených zkumavek naplněných 0,5 ml roztoku RNAlater a umístěny do -80°C.

Pro porovnání starých (52 týdnů) a mladých (10 týdnů) myší byla usmrcena skupina 30 myší starých 10 týdnů. Způsob usmrcení, odebírání a skladování vzorků byl totožný.

5.2.2 Indukce kolorektálního karcinomu a odběr tkání pro miRNA kvantifikaci

Myším kmene ICR (20 týdnů) byl indukován kolorektální karcinom dle 6měsíčního modifikovaného protokolu (Tanaka et al., 2003) totožně jako v kapitole 5.2.1. Po 3 měsících po skončení cyklů DSS byly myši usmrceny v 4hodinových intervalech během 24h isofluranovou anestézií.

Pro každý časový bod (CT0, CT4, CT8, CT12, CT16, CT20, CT24) bylo usmrceno vždy 5 náhodně vybraných myší z každé skupiny. Z každé myši byl odebrán kolorektální tumor a jako kontrolní tkáň makroskopicky zdravá okolní tkáň. Odebrané vzorky byly uchovávány v tekutém dusíku.

5.2.3 Izolace totální RNA

5.2.3.1 Izolace totální RNA pro kvantifikaci mRNA

Totální RNA byla vyizolována pomocí GeneElute Mammalian total RNA Miniprep Kitu dle návodu výrobce (Sigma Aldrich). Odebrané vzorky tkání uchovávané v RNAlateru byly mírně osušeny buničinou a umístěny do předem připravených označených homogenizačních zkumavek pro MagNA Lyser (max 50mg tkáně). Pomocí MagNA Lyseru (2x 7 000 ot./10 s) byla tkáň homogenizována a poté byl homogenát přemístěn na filtrační kolonku a centrifugován (10 000 g/1 min). Do filtrátu byl přidán ekvivalentní objem 70 % etanolu a celé směs byla důkladně protřepána. Poté byla směs přepipetována na kolonku vázající nukleovou kyselinu a centrifugována (10 000 g/1 min). Filtrát byl vylit a kolonka osušena o buničinu. Následně bylo do kolonky přidáno 500 µl Wash Solution 1 a kolonka byla centrifugována (10 000 g/1 min). Opětovně byl filtrát vylit, kolonka osušena, do ní napipetováno 500 µl Wash Solution 2 a následovala centrifugace (10 000 g/1 min). Promývání pomocí Wash Solution 2 bylo následně zopakováno. Po vylití filtrátu byla kolonka ještě nasucho centrifugována (10 000 g/2 min). Po centrifugaci bylo na dno kolonky pipetováno 30 µl PCR vody. Byla provedena poslední centrifugace (10 000 g/1 min). Po procesu izolace totální RNA následovala reverzní transkripce.

5.2.3.2 Izolace totální RNA pro kvantifikaci miRNA

Totální RNA by vyizolována za pomoci miRNeasy Mini Kitu dle návodu výrobce (Qiagen). Vzorky uchovávané v tekutém dusíku byly přemístěny do homogenizačních zkumavek pro MagNA Lyser (max. 50 mg tkáně) a bylo k nim přidáno 700 μ l QIAzol Lysis Reagent. Pomocí MagNA Lyseru (2x 7000ot./10s) byla tkáň homogenizována. Po 5 min bylo k homogenátu přidáno 140 μ l chloroformu a celá směs byla důkladně protřepána. Poté byla směs centrifugována při teplotě 4°C (12 000 g/15 min). Vodní fáze byla přepipetována do nové zkumavky, bylo k ní přidáno 1,5 objemu 100 % etanolu a směs byla promíchána. Poté bylo 700 μ l směsi pipetováno na RNeasy Mini stáček kolonku a centrifugováno při teplotě 22°C (10 000 g/1 min). Filtrát byl vylit a kolonka osušena o buničinu. Poté bylo do kolonky přidáno 700 μ l pufru RWT a kolonka byla centrifugována (10 000 g/1 min). Opětovně byl filtrát vylit, kolonka osušena, do ní napipetováno 500 μ l pufru RPE a následovala centrifugace (10 000 g/1 min). Promývání pomocí pufru RPE bylo následně zopakováno. Po vylití filtrátu byla kolonka ještě nasucho centrifugována (10 000 g/2 min). Po centrifugaci bylo na dno kolonky pipetováno 30 μ l PCR vody. Byla provedena poslední centrifugace (10 000 g/1 min). Po procesu izolace totální RNA následovala reverzní transkripce.

5.2.4 Reverzní transkripce

5.2.4.1 Reverzní transkripce totální RNA pro kvantifikaci mRNA

Pomocí přístroje NanoDrop (ND-1000) byla zjištěna čistota a kvantita izolované totální RNA. S ohledem na výsledky z NanoDropu bylo spočítané a poté i provedené potřebné ředění totální RNA PCR vodou na výslednou koncentraci 1 μ g/10 μ l reakci. Pomocí nespecifické reverzní transkripce byla totální RNA přepsána do cDNA pomocí High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu v celkovém objemu reakční směsi 20 μ l. Bylo postupováno dle návodu výrobce. Na 1 vzorek reagenční směsi byly použity 2 μ l 10xRT pufru, 0,8 μ l 25x dNTP Mix, 2 μ l 10x RT Random Primers, 1 μ l MultiScribe Reverse Transcription, 1 μ l RNase Inhibitor, 3,2 μ l injekční vody. Do zkumavky bylo pipetováno 10 μ l reakční směsi a 10 μ l naředěné totální RNA. Vzorky byly krátce stočeny na stolní centrifuze a umístěny do MasterCycleru (Eppendorf), kde byl nastaven 4kroký program s LID 100°C (viz Tab 5.3). Získaná cDNA byla ve zkumavkách skladována při -20°C.

Tabulka 5.3 Program MasterCycleru na reverzní transkripci totální RNA

Postup	Teplota (°C)	Čas (min)
1.	25	10
2.	37	120
3.	85	5
4.	4	hold

5.2.4.2 Reverzní transkripce miRNA pro kvantifikaci miRNA

Pomocí přístroje NanoDrop (ND-1000) byla zjištěna čistota a koncentrace izolované totální RNA. Přesně dle návodu výrobce (Life Technologies) byla provedena nespecifická reverzní transkripce miRNA s využitím TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kitu. Celý proces sestával ze 4 kroků: poly-A tailing, ligace, reverzní transkripce a miR-amplifikace.

V prvním kroku byly do označené zkumavky přidány 2 µl vzorku izolované totální RNA a 3 µl připravené reakční poly-A směsi (0,5 µl 10x Poly(A) pufru, 0,5 µl ATP, 0,3 µl Poly A Enzymu, 1,7 µl injekční vody). Směs byla promíchána a krátce centrifugována na stolní centrifuze. Poté byla umístěna do MasterCycleru a byl nastaven odpovídající program, viz Tab 5.4.

Tabulka 5.4 Program MasterCycleru pro Poly-A tailing

Postup	Teplota (°C)	Čas (min)
Polyadenylace	37	45
Zastavení reakce	65	10
Udržování teploty	4	hold

V druhém kroku bylo ke vzorkům přidáno 10 µl připravené reakční ligační směsi (3 µl 5x DNA Ligase pufru, 4,5 µl 50 % PEG 8000, 0,6 µl 25x Ligation Adaptor, 1,5 µl RNA Ligase, 0,4 µl injekční vody). Směs byla promíchána a centrifugována na stolní centrifuze. Poté byla umístěna do MasterCycleru a byl nastaven odpovídající program, viz Tab 5.5.

Tabulka 5.5 Program MasterCycleru pro Ligaci

Postup	Teplota (°C)	Čas (min)
Ligace	16	60
Udržování teploty	4	hold

Ve třetím kroku bylo ke vzorkům přidáno 15 µl připravené reverzní reakční směsi (6 µl RT pufru, 1,2 µl dNTP Mix, 1,5 µl 20x Universal RT Primer, 3 µl 10x RT Enzyme Mix, 3,3 µl injekční vody). Směs byla promíchána a centrifugována na stolní centrifuze. Poté byla umístěna do MasterCycleru a byl nastaven odpovídající program, viz Tab 5.6.

Tabulka 5.6 Program MasterCycleru pro Reverzní transkripci

Postup	Teplota (°C)	Čas (min)
Reverzní transkripce	42	15
Zastavení reakce	85	5
Udržování teploty	4	hold

Ve čtvrtém kroku bylo do nově označených zkumavek přepipetováno 5 µl RT směsi, ke které bylo napipetováno 45 µl připravené miR-amplifikační reakční směsi (25 µl 2x miR-Amp

Master Mix, 2,5 µl 20x miR-Amp Primer Mix, 17,5 µl injekční vody). Směs byla promíchána a centrifugována na stolní centrifuze. Poté byla umístěna do MasterCycleru a byl nastaven odpovídající program, viz Tab 5.7.

Tabulka 5.7 Program MasterCycleru pro miR-Amplifikaci

	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Aktivace enzymů	95	5 min	1
Denaturace	95	3 sec	14
Nasedání a Elongace	60	30 sec	
Zastavení reakce	99	10 min	1
Udržování teploty	4	hold	1

Získaná cDNA byla skladována při -20°C.

5.2.5 Kvantitativní RT-PCR

5.2.5.1 Kvantitativní RT-PCR pro kvantifikaci mRNA

Pro kvantifikaci genů byla jako templát použita připravená cDNA knihovna. Na PCR analýzu byly použity vytipované Taqman sondy (Tab 2.2). Měření byla provedena na ViiA 7 Real-Time PCR System na MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate v celkovém objemu 20 µl, kde každá reakční jamka obsahovala 1 µl 4x zředěné připravené cDNA a 19 µl MasterMixu připraveného přesně dle návodu výrobce 5x HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (4 µl 5x Hot FIREPol Probe qPCR MIX, 0,3 µl FAM próba, 0,9 µl VIC próba, 13,8 µl PCR voda) a destička byla překryta MicroAmp optickým adhezivním filmem. Před PCR analýzou byla destička krátce centrifugována (1250 g/1 min). Samotná PCR analýza běžela dle univerzálního programu viz Tab 5.8.

Pro normalizaci transkriptů byl použit *Gapdh*. Množství transkriptů bylo kvantifikováno metodou kalibrační křivky, jež byla vyrobena sérií ředění standardního vzorku (1x, 4x, 16x, 64x, 256x). Výsledné hladiny studovaných transkriptů byly normalizovány ke *Gapdh*.

Tabulka 5.8 Program PCR termocycleru použitý ke kvantifikaci mRNA

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Aktivace enzymů	95	20	1
Denaturace	95	1	55
Nasedání a Elongace	60	20	55

5.2.5.2 Kvantitativní RT-PCR pro kvantifikaci miRNA

Pro kvantifikaci miRNA pomocí RT-PCR byl nasyntetizovaný cDNA templát zředěn injekční vodou v poměru 1:10. Měření byla provedena na ViiA 7 Real-Time PCR System za použití 5x TaqMan® Advanced miRNA Assays (Tab 5.2) a TaqMan® Fast Advanced Master Mixu při celkovém objemu 20 µl podle návodu výrobce (Life Technologies). Do každé jamky bylo nepipetováno 5 µl zředěné cDNA a 15 µl připravené reakční směsi (10 µl 2x Fast Advanced Master mix, 1 µl TaqMan®

Advanced miRNA Assays a 4 μ l injekční vody). Destička byla překryta MicroAmp optickým adhezivním filmem a krátce centrifugována (1250g/1min). Samotná PCR analýza byla nastavena i vyhodnocena stejně jako v kapitole 5.2.5.1 pouze s jiným referenčním genem, a to U6 snRNA.

5.2.6 Statistika

Získaná normalizovaná data expresí mRNA a miRNA byly zpracovány pomocí několika statistických metod. Všechny analýzy probíhaly na hladině významnosti 5 %, tedy zamítnutí nulové hypotézy při $p \leq 0,05$.

Ze získaných dat byly statisticky vyloučeny odlehlé hodnoty pomocí Dean-Dixonova testu (DD-test, Q-test). Zbylé normalizované relativní exprese genů v jednotlivých vzorcích byly zprůměrovány na základě jednotlivých dob odběrů (CT0, CT4, CT8, CT12, CT16 a CT20) \pm SEM (střední chyba průměru).

Samotná cirkadiánní rytmicita byla zjišťována pomocí kosinorové analýzy, která nám dokázala určit základní parametry pravděpodobné cirkadiánní křivky s nastavenou fixní periodou 24h. Protože kosinorová analýza představuje postup, kdy je časový průběh experimentálních hodnot fitován sinusoidou, byla jako předběžná podmínka použití této analýzy stanovena podmínka, že naměřená časová řada hodnot vykazuje signifikantní efekt času. Tento efekt byl zjišťován pomocí jednorozměrné analýzy rozptylu (one-way ANOVA). Existence cirkadiánního rytmu daného transkriptu byla akceptována v případě signifikantního výsledku jak jednorozměrné analýzy rozptylu, tak i kosinorové analýzy. Pro analýzu vlivu věku a neoplastické transformace na hladiny studovaných transkriptů byla použita dvourozměrná ANOVA (2-way ANOVA). Individuální rozdíly mezi skupinami v časových bodech byly zjištěny pomocí post hoc Fisherova LSD testu.

Jednorozměrná ANOVA a DD-test byly spočítány pomocí programu Excel. Výpočty pro dvourozměrnou ANOVU a post hoc Fisherův LSD test byly provedeny ve statistickém programu STATISTICA a kosinorová analýza v programu Graphpad Prism. Naměřená data byla porovnána podle matematického modelu v programu Graphpad Prism na základě rovnice:

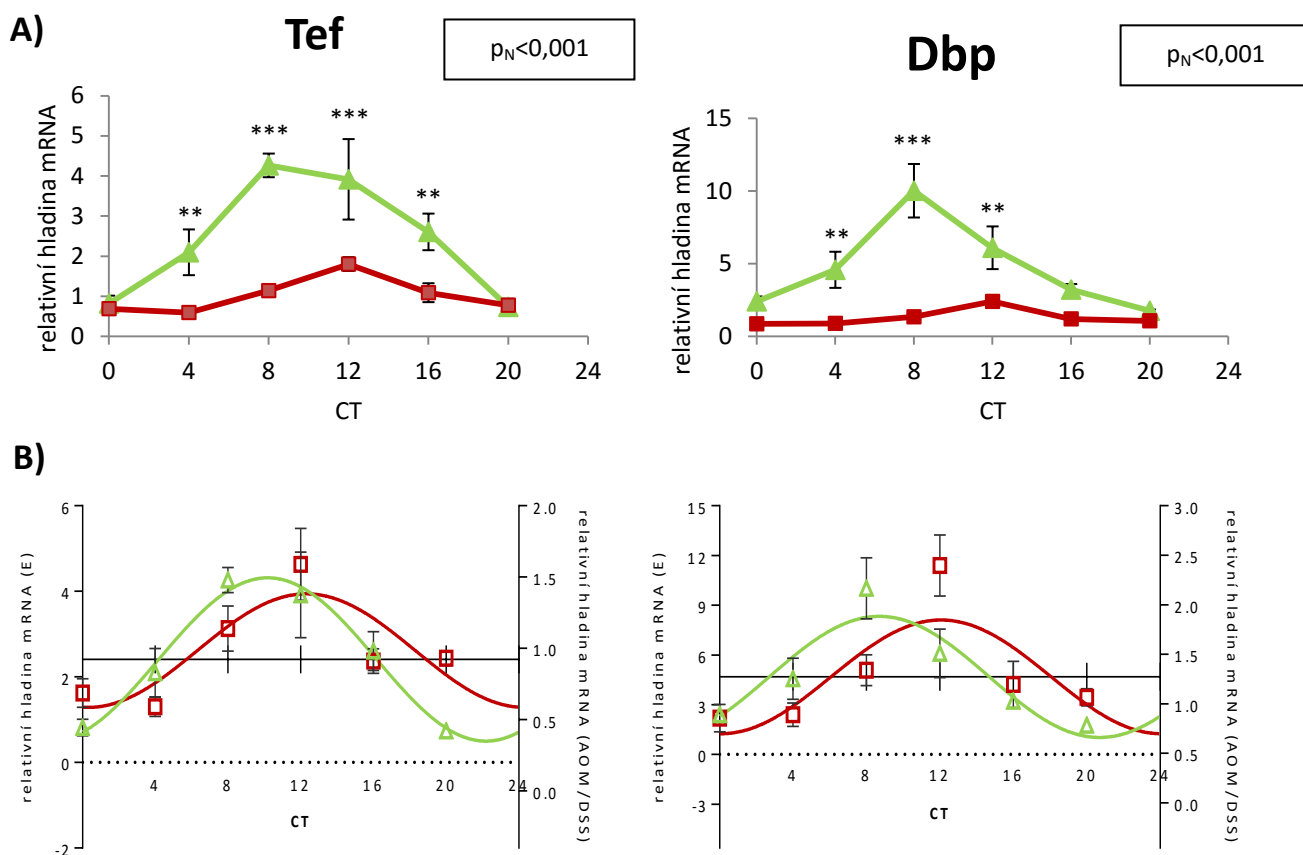
$f(t) = M + A \cdot \cos\left(\frac{2\pi \cdot t}{T} + \varphi\right)$, kde M je mesor (hodnota, kolem které křivka osciluje), A je amplituda (vzdálenost mezi největším a nejmenším kmitem křivky), T je délka periody a φ je akrofáze (uplynutá doba do dosažení maxima křivky). Délka periody T byla striktně určena na 24h. Výsledky kosinorové analýzy jsou uváděny v 95 % intervalech spolehlivosti.

6 Výsledky

6.1 Změna cirkadiálního rytmu exprese mRNA vybraných CCG genů při stárnutí a během neoplastické transformace kolonu

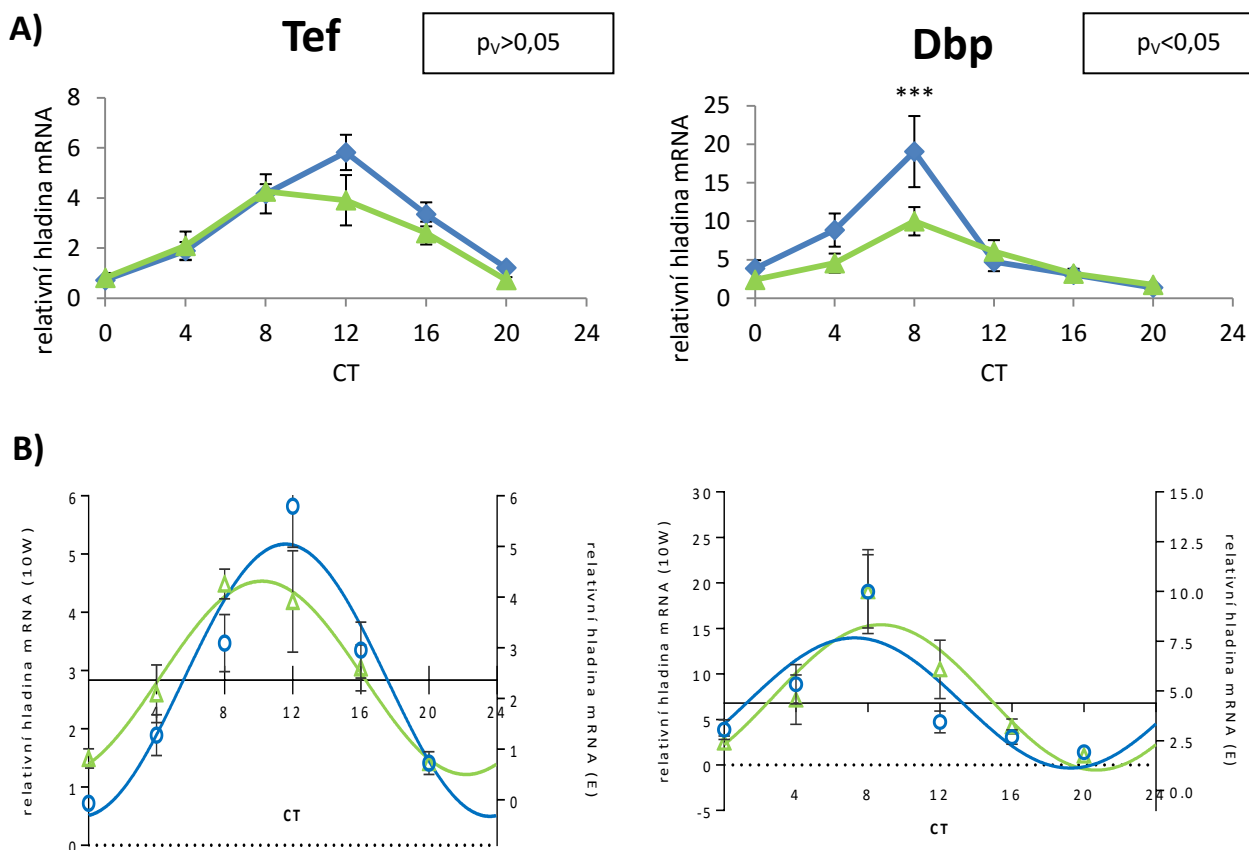
Pro potvrzení existence výstupních cirkadiálních rytmů v slizničním epitelu kolonu myši pomocí metody kvantitativní RT-PCR byly vybrány dva hodinami přímo kontrolované geny *Tef* a *Dbp*, jejichž exprese mRNA je přímo regulována heterodimerem BMAL1:CLOCK (Fonjallaz et al., 1996). Detailní výsledky všech provedených analýz jsou k nahlédnutí v Dodatku č. 1.

V epitelu kolonu zdravé myši (52 týdnů; E) byl změřen cirkadiální rytmus exprese transkriptů *Tef* a *Dbp*. Existence signifikantní rytmicity u obou mRNA genů byla prokázána jak na základě jednorozměrné analýzy rozptylu ($p < 0,001$; 1-way ANOVA), tak na základě kosinorové analýzy ($p < 0,001$) s maximální hladinou exprese v CT 8 (Obrázek 6.1).



Obrázek 6.1 Cirkadiální exprese mRNA hodinových výstupních genů *Tef* a *Dbp* v kolorektálním tumoru myši AOM/DSS (■) a v epitelu kolonu stejně staré zdravé myši E (▲). Myši byli chováni v režimu LD 12:12 (6:00 = CT0) a krmeny standardní dietou *ad libitum*. Usmrcení myši a odběr tkání probíhal během 24h ve 4h intervalech (5 myši na 1 časový bod). A) V grafech jsou znázorněny průměrné hodnoty relativní exprese mRNA s jejich střední chybou průměru. P_N hodnota je výsledkem analýzy vlivu neoplastické transformace na expresi mRNA. Individuální rozdíly mezi skupinami v časovém bodě na základě post hoc testu jsou znázorněny *** ($p < 0,001$) ** ($p < 0,01$) * ($p < 0,05$). B) Matematické modely cirkadiálního rytmu mRNA u genů se zjištěnou cirkadiální expresí.

Během neoplastické transformace kolonu došlo ke změně cirkadiánní regulace (Obrázek 6.1). V porovnání s expresí transkriptů *Tef* a *Dbp* v slizničním epitelu kolonu zdravé myši byla u myši s indukovaným kolorektálním karcinomem (AOM/DSS) signifikantně snižená amplituda cirkadiánního rytmu (pro *Tef*: 1,92 (1,32;2,51) → 0,40 (0,21;0,60); pro *Dbp*: 3,66 (2,29;5,01) → 0,59 (0,31;0,86)), což také potvrdila dvourozměrná ANOVA ($p_N < 0,001$; 2-way ANOVA). Zároveň došlo k fázovému posunu cirkadiánního rytmu *Dbp* myši AOM/DSS (φ : 8,71 (7,25;10,16) → 12,06 (10,33;13,8)).



Obrázek 6.2 Cirkadiánní exprese mRNA hodinových výstupních genů *Tef* a *Dbp* v kolonu staré (52týdnů; E) (▲) a mladé myši (10týdnů; 10W) (●). Myši byli chováni v režimu LD 12:12 (6:00 = CT0) a krmeni standardní dietou *ad libitum*. Usmrcení myši a odběr tkání probíhal během 24h ve 4h intervalech (5 myši na 1 časový bod). A) V grafech jsou znázorněny průměrné hodnoty relativní exprese mRNA s jejich střední chybou průměru. P_V hodnota je výsledkem analýzy vlivu stáří na expresi mRNA. Individuální rozdíly mezi skupinami v časovém bodě na základě post hoc testu jsou znázorněny *** ($p < 0,001$) ** ($p < 0,01$) * ($p < 0,05$). B) Matematické modely cirkadiánního rytmu mRNA u genů se zjištěnou cirkadiánní expresí.

Kolon zdravých mladých myši (10 týdnů; 10W) vykazoval cirkadiánní rytmicitu v obou genech, *Tef* a *Dbp*, ale pro každý gen byla odlišná reakce cirkadiánního rytmu na stárnutí (Obrázek 6.2). Porovnání cirkadiánních rytmů exprese mRNA v kolonu mladých myši (10W) s epitelem kolonu zdravých starých myši (E) neprokázalo žádnou signifikantní změnu v amplitudě či fázi cirkadiánní křivky u obou genů. Hladina cirkadiánní exprese *Tef* mRNA nebyla signifikantně

změněna (2-way ANOVA: $p_v > 0,05$). Naopak u exprese *Dbp* mRNA byla prokázána vyšší exprese *Dbp* u mladých myší (2-way ANOVA: $p_v < 0,001$) a čas maximální exprese zůstal nezměněn.

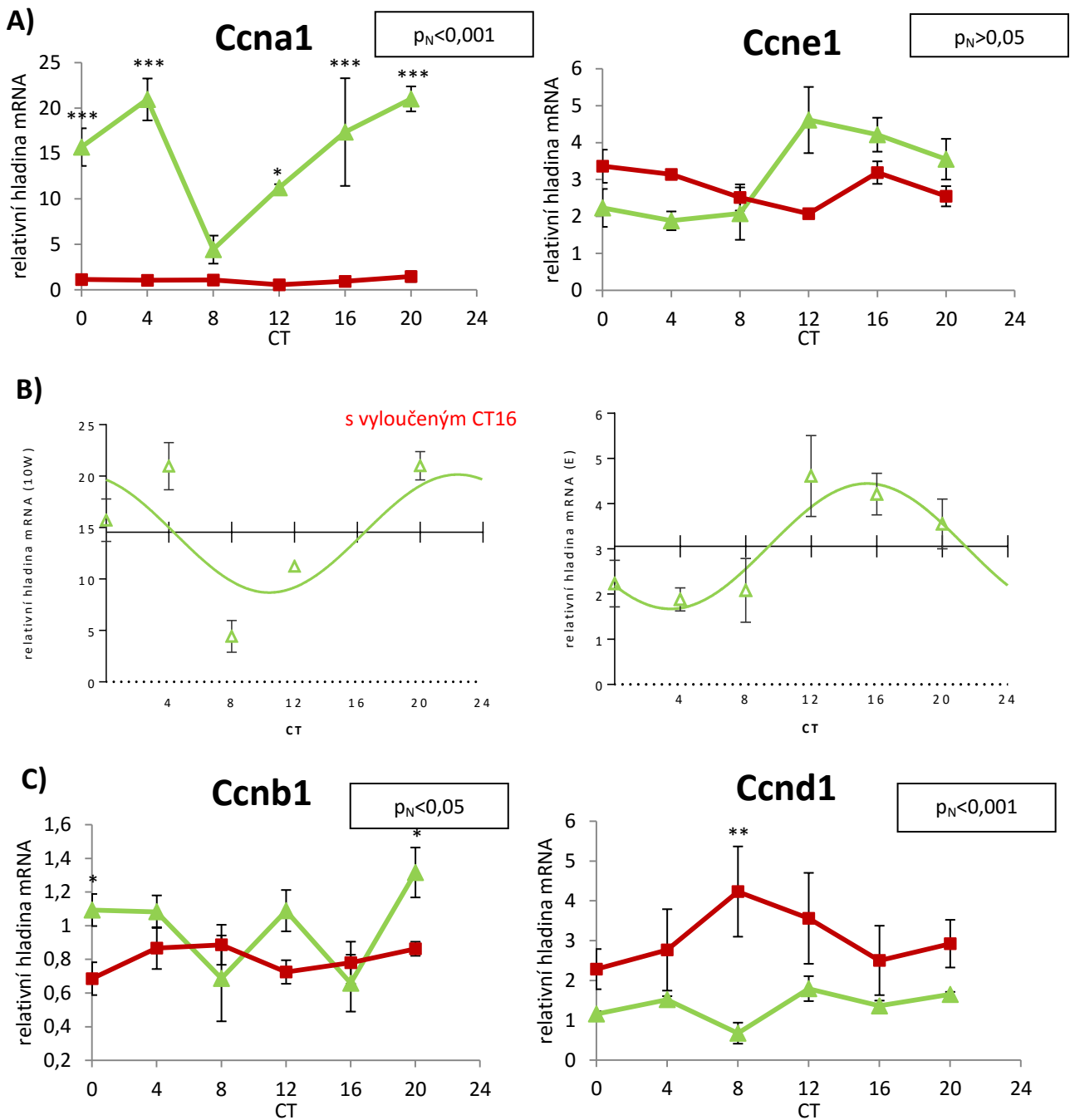
6.2 Existence cirkadiánní rytmicity u vybraných genů buněčného cyklu a apoptózy a porovnání zjištěné cirkadiánní exprese mRNA v makroskopicky zdravě vypadajícím epitelu s expresí dané mRNA kolorektálního tumoru a v epitelu mladších zvířat

6.2.1 Existence cirkadiánní rytmicity u vybraných genů buněčného cyklu a porovnání zjištěné cirkadiánní exprese mRNA v makroskopicky zdravě vypadajícím epitelu s expresí dané mRNA kolorektálního tumoru a v epitelu mladších zvířat

Ze složitého mechanismu regulace buněčného cyklu jsme pro analýzu cirkadiánní exprese mRNA metodou kvantitativní RT-PCR zvolily 4 cykliny (*Ccnd1*, *Ccne1*, *Ccna1* a *Ccnb1*), jež jsou zastoupeny v komplexech CCN/CDK a každý z komplexů zasahuje do regulace jedné z fází buněčného cyklu (Draetta, 1994). Cirkadiánní exprese mRNA cyklínů byly měřeny ve vzorcích epitelu kolonu zdravých myší (E), v kolorektálním tumoru myší AOM/DSS a v kolonu mladých myší (10W). Detailní výsledky všech provedených analýz jsou k nahlédnutí v Dodatku č. 1.

V epitelu kolonu zdravé myši (E) byla zjištěna cirkadiánní rytmicita pouze v expresi *Ccne1* mRNA (1-way ANOVA: $p < 0,05$; kosinorová analýza: $p < 0,05$) s amplitudou v CT16. Exprese *Ccna1* mRNA nevykazovala cirkadiánní rytmus (1-way ANOVA: $p < 0,05$; kosinorová analýza: $p > 0,05$), ale pokud byl vyloučen časový bod CT16, tedy bod s trojnásobnou střední chybou průměru ve srovnání s ostatními chybami CT, objevil se cirkadiánní rytmus potvrzený jak 1-way ANOVOU, tak kosinorovou analýzou (1-way ANOVA: $p < 0,001$; kosinorová analýza: $p < 0,05$). U *Ccnd1* byly prokázány signifikantní rozdíly mezi časovými body 1-way ANOVOU ($p < 0,01$), ale kosinorová analýza cirkadiánní rytmus nepotvrdila ($p > 0,05$). Cirkadiánní rytmicita nebyla nalezena v expresi *Ccnb1* v epitelu kolonu zdravých myší (E) a v expresi *Ccnd1*, *Ccne1*, *Ccna1* a *Ccnb1* v kolorektálním tumoru myší AOM/DSS (1-way ANOVA: $p > 0,05$; kosinorová analýza: $p > 0,05$) (Obrázek 6.3).

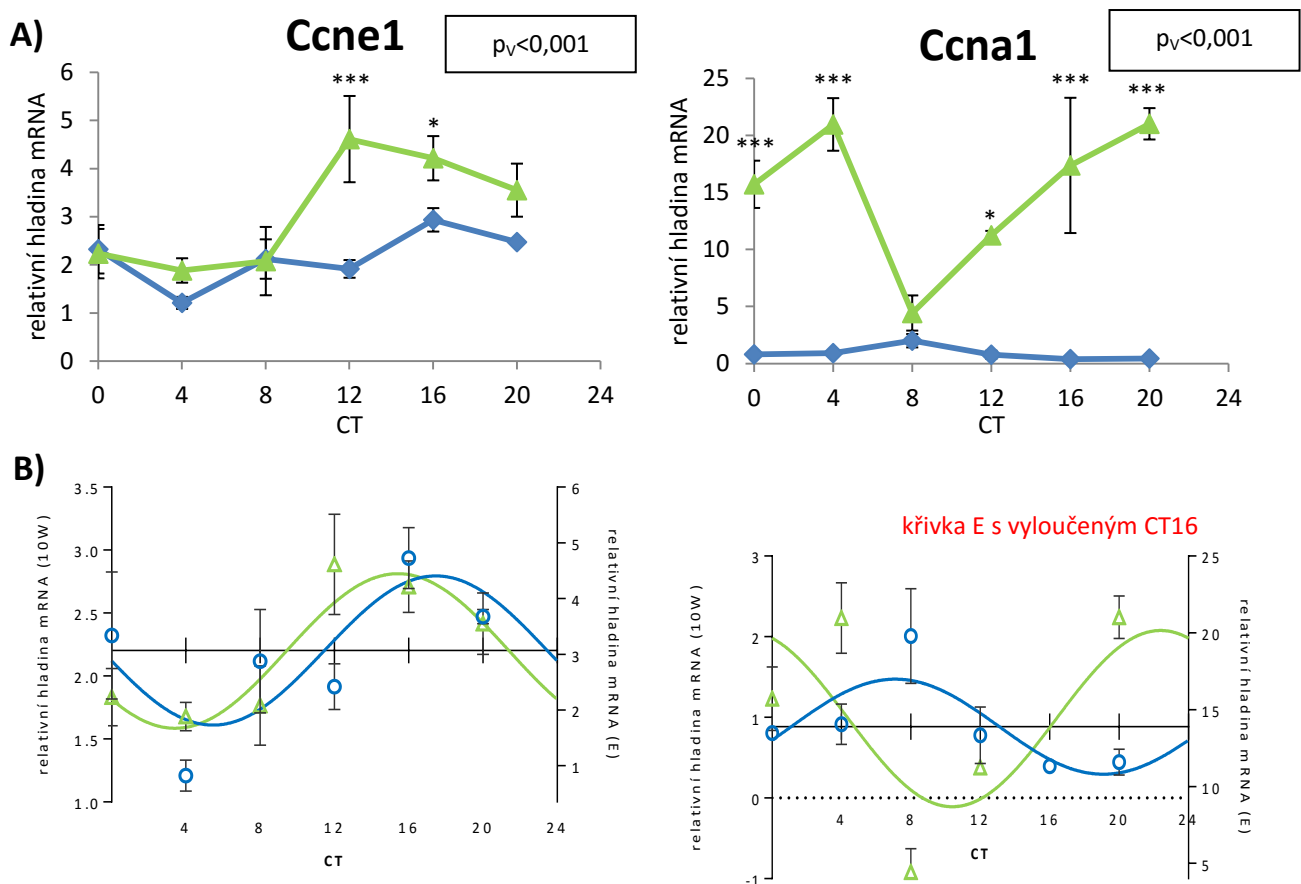
Ve všech analyzovaných cyklinech s výjimkou *Ccne1* (2-way ANOVA pro *Ccne1*: $p_N > 0,05$) byla prokázána změna exprese mRNA v tkáni kolorektálního tumoru oproti zdravému slizničnímu epitelu. Efekt neoplastické transformace se projevil ve snížené expresi mRNA v kolorektálním tumoru u *Ccna1* a *Ccnb1* (2-way ANOVA pro *Ccna1*: $p_N < 0,001$; 2-way ANOVA pro *Ccnb1*: $p_N < 0,05$) a ve zvýšené expresi *Ccnd1* mRNA (2-way ANOVA: $p_N < 0,001$).



Obrázek 6.3 Cirkadiánní exprese mRNA genů buněčného cyklu *Ccna1*, *Ccne1*, *Ccnb1* a *Ccnd1* v kolorektálním tumoru myši AOM/DSS (■) a v epitelu kolonu stejně staré zdravé myši (52týdnů; E) (▲). Myši byli chováni v režimu LD 12:12 (6:00 = CT0) a krmeni standardní dietou *ad libitum*. Usmrcení myši a odběr tkání probíhal během 24h ve 4h intervalech (5 myši na 1 časový bod). A)/C) V grafech jsou znázorněny průměrné hodnoty relativní exprese mRNA s jejich střední chybou průměru. P_N hodnota je výsledkem analýzy efektu neoplastické transformace. Individuální rozdíly mezi skupinami v časovém bodě na základě post hoc testu jsou znázorněny *** ($p < 0,001$) ** ($p < 0,01$) * ($p < 0,05$). B) Matematický model cirkadiánního rytmu mRNA pro gen se zjištěnou cirkadiánní expresí (*Ccne1*).

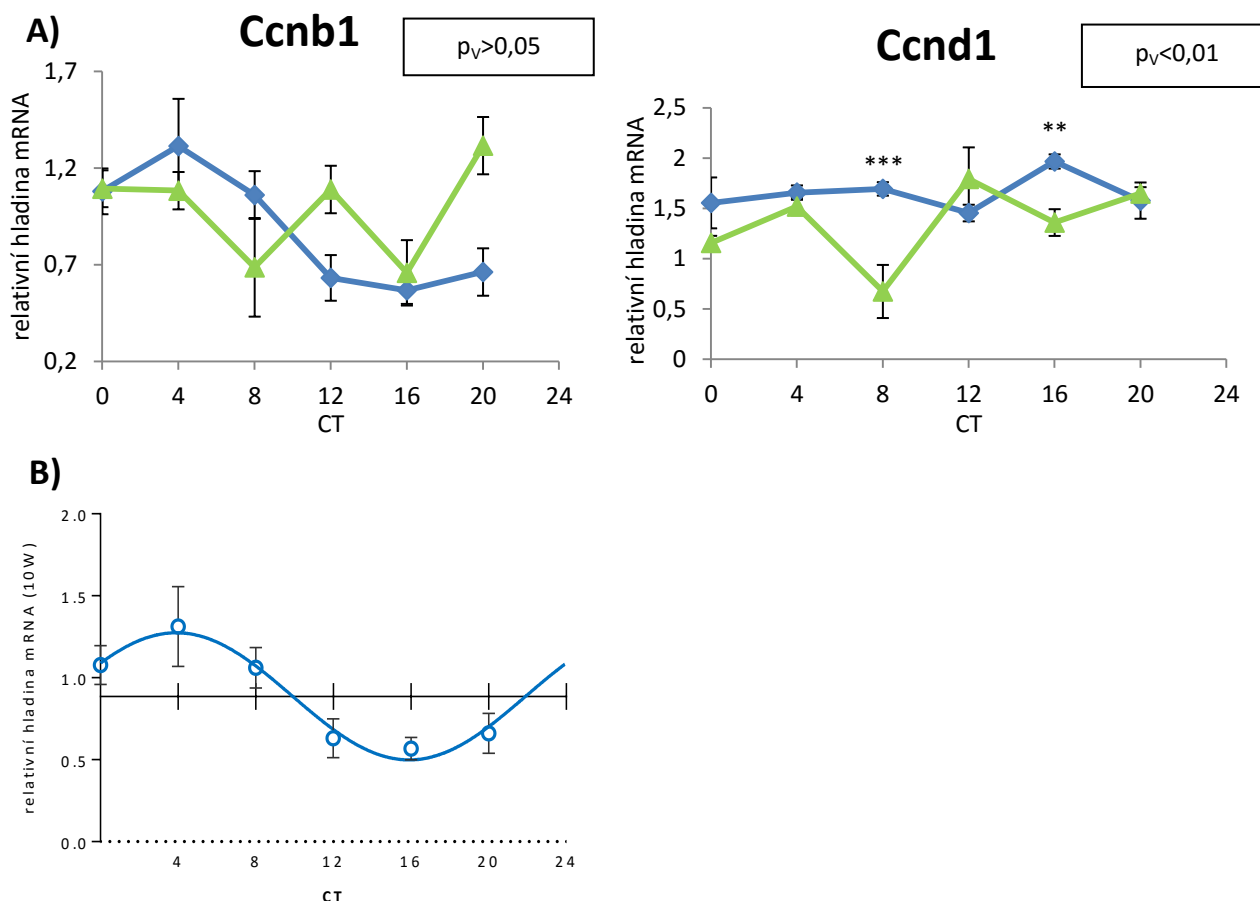
Při porovnání hladin exprese mRNA jednotlivých cyklinů u věkově rozdílných myši 10W a E byl zjištěn signifikantní efekt věku u *Ccne1*, *Ccnd1* a *Ccna1* (2-way ANOVA pro *Ccne1* a *Ccna1*: $p_v < 0,001$; 2-way ANOVA pro *Ccnd1*: $p_v < 0,01$). U mladých myši byla snižená hladina mRNA *Ccna1* a *Ccne1* a naopak zvýšená hladina *Ccnd1*.

Z analyzovaných cyklinů byl *Ccne1* jediným, ve kterém byl detekovaný cirkadiální rytmus jak v kolonu zdravých mladých myší (10W) (1-way ANOVA: $p < 0,01$; kosinorová analýza: $p < 0,001$), tak v epitelu kolonu zdravých starých myší (E) (1-way ANOVA: $p < 0,05$; kosinorová analýza: $p < 0,05$) (Obrázek 6.4). Na průběhu cirkadiálních křivek nebyla prokázána signifikantní změna amplitudy nebo fázový posun. Nejvyšší změřená hladina exprese *Ccne1* v epitelu kolonu myší (E) byla zaznamenána při CT12 a až o 4 hodiny později v kolonu mladých myší (10W). *Ccna1* měl prokázaný cirkadiální rytmus exprese v kolonu mladých myší (10W) (1-way ANOVA a kosinorová analýza: $p < 0,05$) a po vyloučení CT16 byla signifikantní cirkadiální exprese zjištěna také v kolonu starých myší (E) (1-way ANOVA: $p < 0,001$; kosinorová analýza: $p < 0,05$). Cirkadiální křivka exprese *Ccna1* v kolonu mladých myší měla nižší amplitudu a detekovaný fázový posun v porovnání s expresí *Ccna1* v kolonu starých myší (A: 5,74 (1,83;9,77) \rightarrow 0,59 (0,23;0,95); φ : 22,39 (18,79;25,39) \rightarrow 7,1 (4,58;9,61)) (Obrázek 6.4). U *Ccnb1* byla nalezena cirkadiální exprese jeho



Obrázek 6.4 Cirkadiální exprese mRNA genů buněčného cyklu *Ccne1* a *Ccna1* v kolonu staré (52týdnů; E) (▲) a mladé myši (10týdnů; 10W) (●). Myši byli chováni v režimu LD 12:12 (6:00 = CT0) a krmeny standardní dietou *ad libitum*. Usmrcení myší a odběr tkání probíhal během 24h ve 4h intervalech (5 myší na 1 časový bod). A) V grafech jsou znázorněny průměrné hodnoty relativní exprese mRNA s jejich střední chybou průměru. P_v hodnota je výsledkem analýzy vlivu stáří na expresi mRNA. Individuální rozdíly mezi skupinami v časovém bodě na základě post hoc testu jsou znázorněny *** ($p < 0,001$) ** ($p < 0,01$) * ($p < 0,05$). B) Matematické modely cirkadiálního rytmu mRNA u genů se zjištěnou cirkadiální expresí.

mRNA pouze v kolonu mladých myší (10W) (1-way ANOVA: $p < 0,01$; kosinorová analýza pro *Ccnb1*: $p < 0,001$) (Obrázek 6.5). Na rozdíl od cirkadiánní křivky *Ccne1*, jež vykazovala maximum v odpoledních hodinách, cirkadiánní rytmy *Ccna1* a *Ccnb1* kulminovaly v brzkých ranních hodinách. Nejvyšší hladiny změřené exprese dosahoval *Ccna1* v CT8 a *Ccnb1* v CT4. Exprese mRNA *Ccnd1* nevykazovala signifikantní cirkadiánní rytmus v kolonu ani mladých ani starých jedinců (Obrázek 6.5).



Obrázek 6.5 Cirkadiánní exprese mRNA genů buněčného cyklu *Ccnb1* a *Ccnd1* v kolonu staré (52týdnů; E) (▲) a mladé myši (10týdnů; 10W) (●). Myši byli chováni v režimu LD 12:12 (6:00 = CT0) a krmeny standardní dietou ad libitum. Usmrcení myši a odběr tkání probíhal během 24h ve 4h intervalech (5 myši na 1 časový bod). A) V grafech jsou znázorněny průměrné hodnoty relativní exprese mRNA s jejich standardní chybou průměru. p_v hodnota je výsledkem analýzy vlivu stáří na expresi mRNA. Individuální rozdíly mezi skupinami v časovém bodě na základě post hoc testu jsou znázorněny *** ($p < 0,001$) ** ($p < 0,01$) * ($p < 0,05$). B) Matematické modely cirkadiánního rytmu mRNA u genů se zjištěnou cirkadiánní expresí.

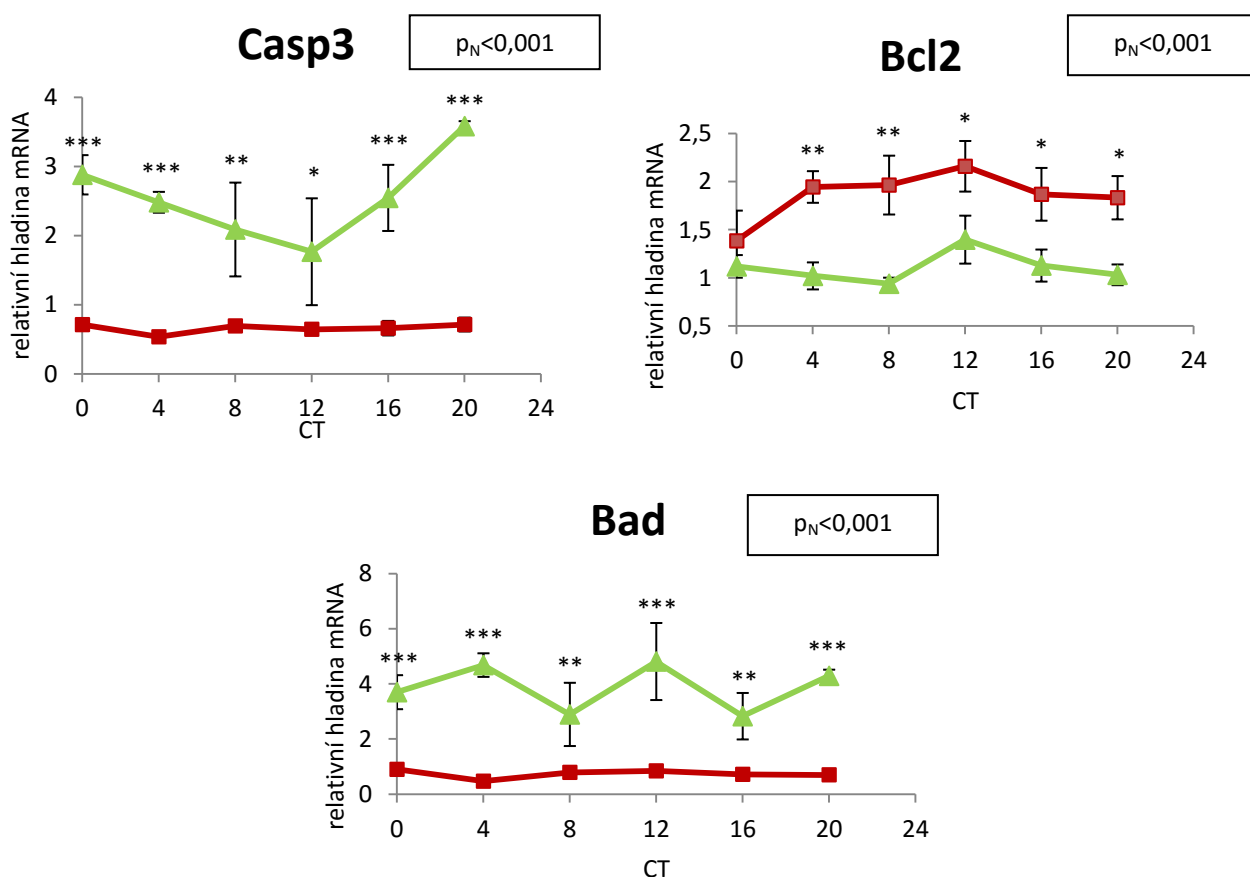
6.2.2 Existence cirkadiánní rytmicity u vybraných genů apoptózy a porovnání zjištěné cirkadiánní exprese mRNA v makroskopicky zdravě vypadajícím epitelu s expresí dané mRNA kolorektálního tumoru a v epitelu mladších zvířat

Z apoptotických signalizačních drah byly pro zjištění cirkadiánní rytmicity vybrány geny anti-apoptotických a pro-apoptotických proteinů *Bcl2* a *Bad* a gen exekutivní kaspázy *Casp3*. Ve

vzorcích epitelu kolonu zdravých myší (E), v kolorektálním tumoru myší AOM/DSS a v kolonu mladých myší (10W) byly cirkadiánní exprese jejich mRNA měřeny metodou kvantitativní RT-PCR. Detailní výsledky všech provedených analýz jsou k nahlédnutí v Dodatku č. 1.

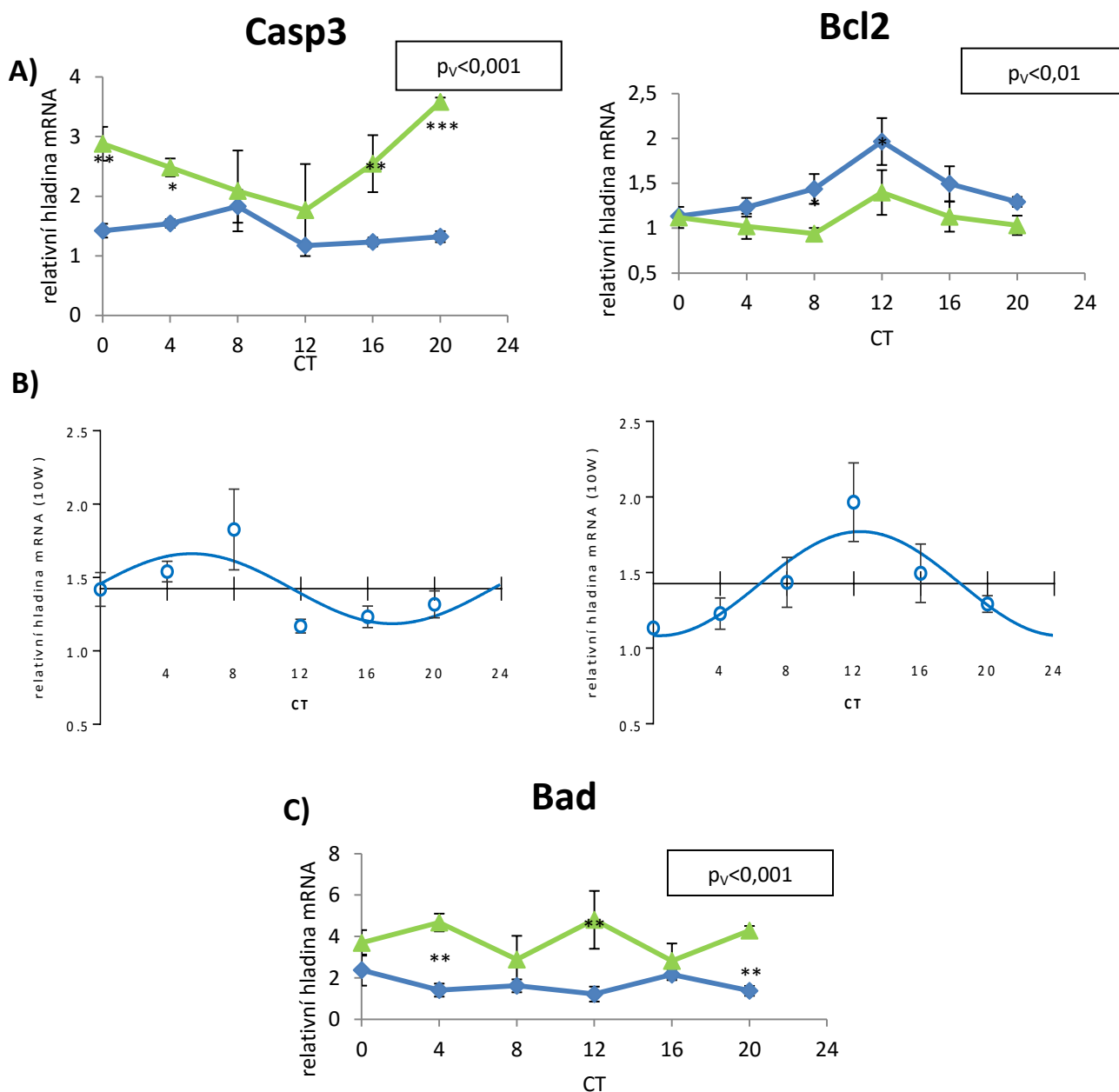
Cirkadiánní exprese nebyla zjištěna ani u jednoho apoptotického genu v epitelu kolonu zdravých myší (E) nebo v kolorektálním tumoru myší AOM/DSS (1-way ANOVA: $p > 0,05$; kosinorová analýza: $p > 0,05$) (Obrázek 6.6).

V porovnání s epitelem kolonu zdravých myší (E) proběhla v kolorektálním tumoru myší AOM/DSS změna regulace exprese mRNA u všech měřených apoptotických genů. Efekt neoplastické transformace se projevil snížením hladiny exprese *Casp3* a *Bad* (2-way ANOVA pro *Casp3*: $p_N < 0,001$; 2-way ANOVA pro *Bad*: $p_N < 0,001$), a to dle post hoc analýzy signifikantně v každém časovém bodě. U *Bcl2* byl zaznamenán opačný efekt neoplastické transformace, došlo ke zvýšení exprese *Bcl2* mRNA (2-way ANOVA: $p_N < 0,001$) (Obrázek 6.6). Rozdíl v expresi *Bcl2* byl detekovaný kromě CT0 ve všech časových bodech.



Obrázek 6.6 Cirkadiánní exprese mRNA genů apoptózy *Casp3*, *Bcl2* a *Bad* v kolorektálním karcinomu myší AOM/DSS (■) a v epitelu kolonu stejně staré zdravé myší (52týdnů; E) (▲). Myši byli chováni v režimu LD 12:12 (6:00 = CT0) a krmeny standardní dietou ad libitum. Usmrcení myší a odběr tkání probíhal během 24h ve 4h intervalech (5 myší na 1 časový bod). V grafech jsou znázorněny průměrné hodnoty relativní exprese mRNA s jejich střední chybou průměru. P_N hodnota je výsledkem analýzy efektu neoplastické transformace. Individuální rozdíly mezi skupinami v časovém bodě na základě post hoc testu jsou znázorněny *** ($p < 0,001$) ** ($p < 0,01$) * ($p < 0,05$).

Oproti cirkadiánně nerytmické expresi apoptotických genů *Casp3*, *Bcl2* a *Bad* v epitelu kolonu staré zdravé myši (E) byl cirkadiánní rytmus v kolonu mladých myší (10W) prokázán v expresi *Casp3* a *Bcl2* (1-way ANOVA a kosinorová analýza: $p < 0,05$). Průběh cirkadiánního rytmu *Casp3* vrcholil v ranních hodinách, nejvyšší hladiny mRNA *Casp3* dosahovala v CT8 (Obrázek 6.7). Cirkadiánní křivka *Bcl2* kulminovala při CT12.



Obrázek 6.7 Cirkadiánní exprese mRNA genů apoptózy *Casp3*, *Bcl2* a *Bad* v kolonu staré (52týdnů; E) (▲) a mladé myši (10týdnů; 10W) (●). Myši byli chováni v režimu LD 12:12 (6:00 = CT0) a krmeny standardní dietou ad libitum. Usmrčení myši a odběr tkání probíhal během 24h ve 4h intervalech (5 myši na 1 časový bod). A)/C) V grafech jsou znázorněny průměrné hodnoty relativní exprese mRNA s jejich střední chybou průměru. P_v hodnota je výsledkem analýzy vlivu stáří na expresi mRNA. Individuální rozdíly mezi skupinami v časovém bodě na základě post hoc testu jsou znázorněny *** ($p < 0,001$) ** ($p < 0,01$) * ($p < 0,05$). B) Matematické modely cirkadiánního rytmu mRNA u genů se zjištěnou cirkadiánní expresí.

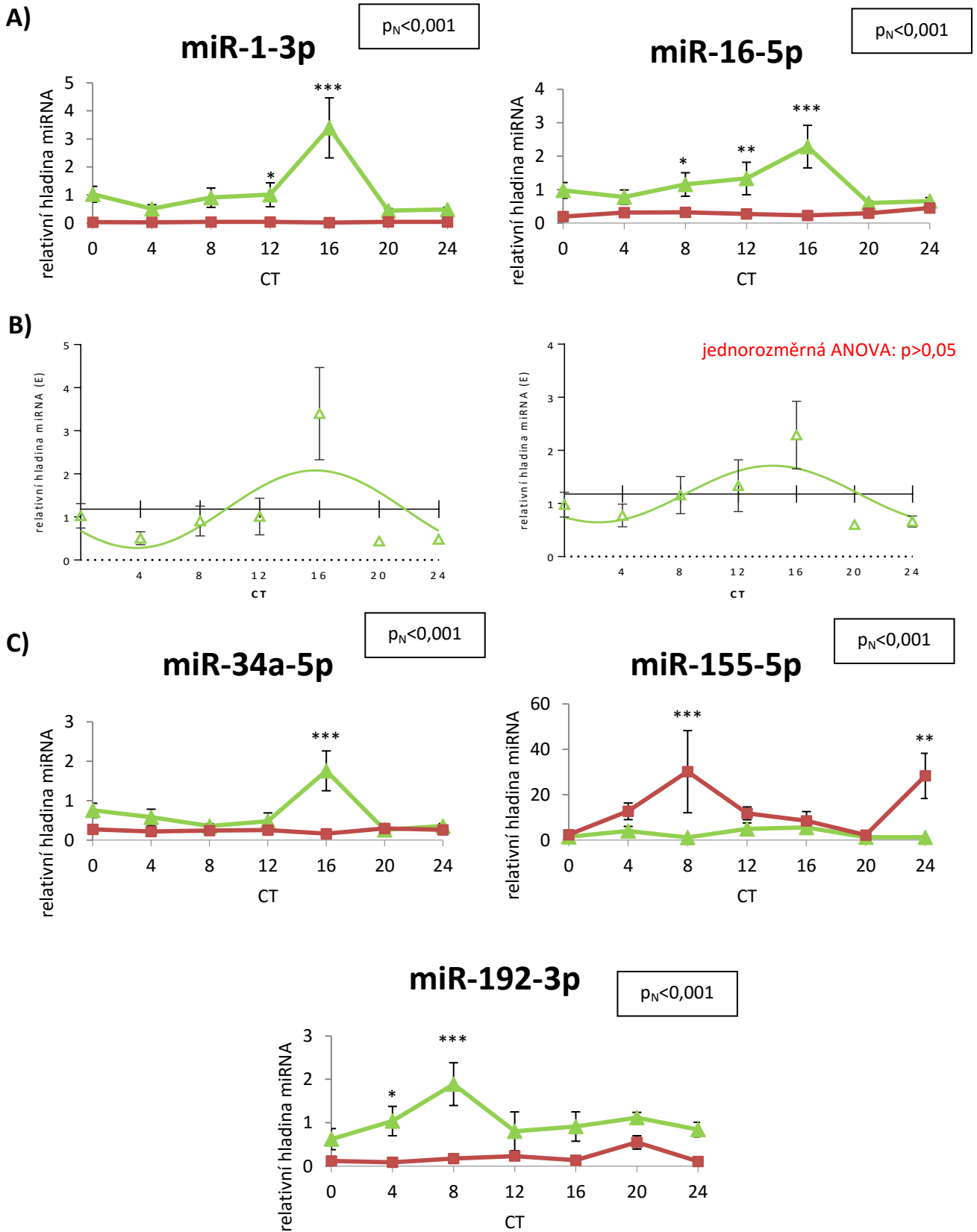
Pro všechny analyzované geny apoptotické dráhy byla v porovnání s epitelem kolonu starých myší (E) zjištěna odlišná exprese mRNA v kolonu mladých myší (10W) (2-way ANOVA: $p_v < 0,001$; pro *Bcl2* $p_v < 0,01$). Konkrétně byla v kolonu mladých myší (10W) nalezena nižší hladina exprese mRNA *Casp3* a *Bad* a vyšší hladina exprese *Bcl2*.

6.3 Zjištění cirkadiánní rytmicity u vybraných miRNA v kolonu a její změna při neoplastické transformaci

Ze široké škály existujících miRNA bylo na základě literatury a miRNA databází (Balounová, 2014; Dweep and Gretz, 2015) zvoleno 5 miRNA (miR-1-3p, miR-16-5p, miR-34a-5p, miR-155-5p a miR-192-3p), jež mají prokázanou či predikovanou účast na regulaci cirkadiánní rytmicity a kolorektální tumorigenezi. Cirkadiánní exprese miRNA byla měřena metodou kvantitativní RT-PCR ve vzorcích kolorektálního tumoru a v makroskopicky zdravě vypadajícím kolonu (E) myší AOM/DSS. Detailní výsledky všech provedených analýz jsou k nahlédnutí v Dodatku č. 2.

MiR-1-3p vykazovala cirkadiánní rytmus v makroskopicky zdravě vypadajícím kolonu (E) s amplitudou v CT16 (1-way ANOVA: $p < 0,001$; kosinorová analýza: $p < 0,01$). V kolorektálním tumoru nebyl cirkadiánní rytmus miR-1-3p zaznamenán (Obrázek 6.8). V expresi miR-16-5p (Obrázek 6.8) kosinorová analýza zjistila teoretický cirkadiánní rytmus ($p < 0,05$), ale jednorozměrná ANOVA byla na hladině pravděpodobnosti 95% zamítnuta ($p = 0,07$). Vzhledem k námi stanovené podmínce, že existence cirkadiánní rytmu bude podmíněna signifikantním výsledkem jednorozměrné ANOVY, byl cirkadiánní rytmus miR-16-5p nepotvrzen. Další miRNA miR-34a-5p měla prokazatelně signifikantní efekt času (1-way ANOVA: $p < 0,001$), ale kosinorová analýza cirkadiánní rytmicitu nepotvrdila ($p > 0,05$). Cirkadiánní exprese nebyla detekována ani v jedné tkáni (E a N) u miR-155-5p a miR-192-3p.

Během neoplastické transformace proběhla ve všech analyzovaných miRNA signifikantní změna jejich exprese (2-way ANOVA: $p_N < 0,001$). Všechny miRNA kromě miR-155-5p měly sníženou hladinu exprese v kolorektálním tumoru. MiR-155-5p vykazovala při neoplastické transformaci opačný trend (Obrázek 6.8).



Obrázek 6.8 Cirkadiánní exprese miR-1-3p, miR-16-6p, miR-34a-5p, miR-155-5p a miR-192-3p v kolorektálním tumoru (■) a v makroskopicky zdravě vypadajícím kolonu myši (▲). Myši byli chováni v režimu LD 12:12 (6:00 = CT0) a krmeni standardní dietou ad libitum. Usmrcení myši a odběr tkání probíhal během 24h ve 4h intervalech (5 myši na 1 časový bod). A)/C) V grafech jsou znázorněny průměrné hodnoty relativní exprese miRNA s jejich střední chybou průměru. P_N hodnota je výsledkem analýzy vlivu neoplastické transformace na expresi miRNA. Individuální rozdíly mezi skupinami v časovém bodě na základě post hoc testu jsou znázorněny *** ($p < 0,001$) ** ($p < 0,01$) * ($p < 0,05$). B) Matematické modely cirkadiánního rytmu pro miRNA se zjištěnou cirkadiánní expresí.

7 Diskuze

Existence cirkadiánních hodinových genů tvořících pozitivní a negativní transkripčně-translační zpětnovazebnou smyčku periferních cirkadiánních hodin ve střevě byla již několikrát potvrzena (Hoogerwerf et al., 2007; Sládek et al., 2007). Ale existence samotné cirkadiánní smyčky ještě nemusí znamenat funkční výstupní cirkadiánní rytmus ve střevě. Mnohé studie upozornily na geny, jejichž exprese je přímo kontrolována heterodimerem BMAL1:CLOCK. Nejčastěji zmiňovanými geny jsou tzv. geny kódující PAR bZip skupinu transkripčních faktorů TEF, HLF a DBP. Exprese *Tef*, *Dbp* a *Hlf* regulovaná prostřednictvím BMAL1:CLOCK heterodimeru byla nalezena například v SCN (Mitsui et al., 2001), v játrech (Ripperger et al., 2000), v ledvinách (Zuber et al., 2009), v srdci (Young et al., 2001), v retině (Sakamoto et al., 2000) nebo v pankreatu (Damiola et al., 2000). V této práci jsme metodou kvantitativní RT-PCR potvrdily existenci výstupního cirkadiánního rytmu ve střevě na základě cirkadiánní exprese genů *Tef* a *Dbp* v kolonu 10 a 52 týdnů starých myší. Signifikantní cirkadiánní rytmicitu se shodovala s cirkadiánní expresí *Tef* a *Dbp* publikovanou v jiných studiích (Soták et al., 2013; Young et al., 2001).

V roce 2008 bylo na základě microarray studie Hoogerwerfa a kol. detekováno přibližně 3,7 % genů distálního kolonu s predikovanou cirkadiánní rytmicitou (Hoogerwerf et al., 2008). Vzhledem k intenzivní obměně buněk v epitelu kolonu není překvapivé, že mezi predikovanými cirkadiánně exprimovanými geny v kolonu byla řada genů spjatých s proliferací, diferenciací a apoptotickými drahami.

Pokud se budeme dívat na buněčný cyklus jako na dynamický proces, kde změny jednotlivých fází buněčného cyklu jsou závislé na dynamické expresi komplexů CDK/CCN, tak lze proces buněčného cyklu označit jako buněčný oscilátor. V buňce tedy najednou koexistuje buněčný a cirkadiánní oscilátor. Hypotéza reciprokého vztahu mezi oběma oscilátory byla postavena na detekci cirkadiánní rytmicity řady genů buněčného cyklu a jejich regulátorů (*c-Myc*, *n-Myc*, *Wee1*, *p21*, *p16*, *Cdk4*, aj.) a na zjištění, že také samotný buněčný cyklus může regulovat cirkadiánní hodiny prostřednictvím fosforylace CK1δ (Gréchez-Cassiau et al., 2008; Ianes et al., 2015; Matsuo et al., 2003). *In vitro* se obecným vztahem mezi oběma oscilátory zabývaly vědecké skupiny kolem Bielera a Feilletové. Na savčích fibroblastech bez vnějšího seřízení buněčného cyklu nebo cirkadiánních hodin analyzovaly dynamický průběh oscilací metodou fluorescenčního značení. Výsledkem analýz bylo zjištění spřažení obou cyklů. Synchronní průběh obou oscilačních křivek byl zřetelný hlavně v G1 fází buněčného cyklu. Buněčné dělení probíhalo s větší intenzitou v konkrétní fázi cirkadiánního rytmu a bylo spojeno se zkrácením cirkadiánní periody.

K prodloužení cirkadiánní periody naopak došlo při indukovaném zastavení buněčného cyklu (Bieler et al., 2014; Feillet et al., 2014, 2015). Další pohled na propojení buněčného a cirkadiánního oscilátoru ukázali Kowalska a Maier, jež detekovali možný klíčový protein pro spřažení obou oscilátorů. Funkční inhibicí NONO proteinu došlo k rozpřažení synchronizovaných oscilací buněčného cyklu a cirkadiánních hodin (Kowalska et al., 2013; Maier and Kramer, 2013). Ve vztahu cirkadiánního a buněčného oscilátoru ale stále zůstává mnoho neobjasněno. Například existence cirkadiánního rytmu v dynamické expresi cyklinů ve střevě. Proto bylo jedním z cílů diplomové práce objasnit existenci cirkadiánního rytmu mRNA u *Ccnd1*, *Ccne1*, *Ccna1* a *Ccnb1* v kolonu.

Povedlo se nám prokázat cirkadiánní expresi mRNA u všech měřených cyklinů s výjimkou *Ccnd1* v kolonu mladých myší (10 týdnů). Cirkadiánní exprese *Ccna1* a *Ccnb1* kulminovala během dopoledne, zatímco exprese *Ccne1* mRNA dosahovala svého maxima v noci. CCNA1 a CCNB1 jsou spjatí s indukci a průběhem mitotické fáze buněčného cyklu. Obdobných výsledků v detekci cirkadiánní rytmicity cyklinů dosáhl Bjarnason a kol. na úrovni proteinů CCNE1, CCNA1 a CCNB1 v mukózní sliznici mužů s průměrným věkem 34 let (Bjarnason et al., 1999). Na základě microarray studií byl cirkadiánní rytmus *Ccnd1* detekován v 11 různých tkáních, včetně kolonu (Soták et al., 2014). Metodou Northern blotu byl cirkadiánní rytmus *Ccnd1* detekován v lidských játrech (Fu et al., 2002b) a v lidském střevě byl imunohistochemickou metodou nalezen cirkadiánní rytmus proteinu CCND1 (Griniatsos et al., 2006). Naší analýzou pomocí kvantitativní RT-PCR nebyla prokázána cirkadiánní rytmicita *Ccnd1* v kolonu. Je možné, že cirkadiánní rytmus *Ccnd1* v kolonu je příliš slabý na signifikantní detekci metodou kvantitativní RT-PCR nebo je cirkadiánní rytmicita CCND1 daná posttranskripčními modifikacemi a regulátory. Exprese *Ccnd1* je indukovaná transkripčním faktorem c-MYC. C-MYC obsahuje E-box sekvenci, na kterou se může vázat heterodimer BMAL1:CLOCK (Fu et al., 2002b). Nález cirkadiánní exprese c-MYC se různí. V játrech byla publikována jak existence cirkadiánního rytmu *c-Myc* (Kita et al., 2002), tak nerytmická exprese *c-Myc* (Wu et al., 2004). V SCN byla zjištěna cirkadiánní rytmicita *c-Myc* na základě microarray studie (Panda et al., 2002). V kolonu nebyl zatím cirkadiánní rytmus *c-MYC* signifikantně prokázán. Zapojení cirkadiánních hodin do regulace exprese cyklinů přibližují knock-out a knock-down studie myší s deficiencí genu *Bmal1* nebo *Per1*. U myší s inhibiční mutací *Per1* došlo ke snížení exprese *Ccnd1* a *Ccnb1* (Yang and Stockwell, 2008). Oproti tomu deficience *Bmal1* vedla ke zvýšení exprese CCNB1 a CCND1 (Zeng et al., 2010).

Podobně jako buněčný cyklus může být i apoptotický proces chápán jako dynamická rovnováha mezi pro-apoptotickými a anti-apoptotickými faktory, kde v případě převahy pro-apoptotických faktorů dojde k aktivaci samotné apoptotické kaskády s exekutivními

kaspázami. Do regulace procesu zasahují cirkadiánní hodiny. My jsme v kolonu mladé myši (10W) zjistili cirkadiánní regulaci exprese mRNA *Casp3*. Pokud je nám známo, tak cirkadiánní exprese *Casp3* byla dosud v kolonu detekována pouze na základě microarray studie (Soták et al., 2014). V roce 2004 Ralston potvrdil cirkadiánní rytmus exprese *Casp3* v retině zebřičky (*Danio rerio*) imunohistochemickou metodou (Ralston et al., 2004). *In vitro* bylo ukázáno zapojení PER2 do regulace exprese *Casp3* v buňkách rakoviny prsu (Mitchell and Engelbrecht, 2015) a podobné zapojení PER3 v buňkách kolorektálního karcinomu (Hong et al., 2014). V kolonu mladých myší jsme zároveň prokázali existenci cirkadiánního rytmu *Bcl2*. Z dosavadních studií vyplývalo, že anti-apoptotický gen *Bcl2* je negativně regulovaný PER proteiny, ale dosud byla jeho cirkadiánní rytmicita v kolonu zaznamenána pouze u microarray studií (Hong et al., 2014; Hua et al., 2006). Cirkadiánní rytmus proteinu BCL2 byl zatím zjištěn pouze v kostní dřeni myši (Granda et al., 2005). Také dosud nebyla objasněna existence cirkadiánní rytmicity v kolonu u pro-apoptotického genu *Bad*. Naší analýzou jsme nezjistili žádnou cirkadiánní rytmicitu exprese *Bad* mRNA v kolonu.

Při zkoumání narušení cirkadiánní rytmicity v souvislosti se zvýšeným rizikem vzniku patofyziologickým stavů se často zanedbává efekt věku. Přitom s přibývajícím věkem se zvyšuje riziko incidence těchto patofyziologií. Většina dosavadních experimentů zaměřených na zjištění cirkadiánní rytmicity je prováděna na mladých jedincích myší starých 10 - 20 týdnů. Studie zabývající se cirkadiánními hodinami a vlivem věku buď nenašli signifikantní změnu v expresi hodinových genů, nebo prokázaly zachování cirkadiánního rytmu hodinových genů spojené se snížením cirkadiánní amplitudy (Banks et al., 2016). Naproti tomu ovlivnění cirkadiánních expresí hodinami kontrolovaných genů věkem není dosud definováno. Proto byly v diplomové práci porovnávány cirkadiánní exprese zjištěné v kolonu mladých myší (10W; 10 týdnů staré) s expresemi zjištěnými v kolonu starých myší (E; 52 týdnů staré). Cirkadiánní křivka exprese *Tef* nebyla u starých myší signifikantně změněna v porovnání s expresí u mladých myší. Naproti tomu cirkadiánní křivka exprese *Dbp* ukázala signifikantní snížení cirkadiánní amplitudy u starých myší. Snížení cirkadiánní exprese *Dbp* je v souladu se studiemi změn exprese *Dbp* během stárnutí v mozku a v játrech. Naopak v srdci nebyla změna cirkadiánní exprese *Dbp* zaznamenána (Oishi et al., 2011). Vzhledem k tomu, že oba geny se řadí mezi přímo kontrolované hodinové geny, odpovídala změna průběhu jejich cirkadiánní exprese během stárnutí publikovaným obdobným reakcím jejich regulátorů, hodinových genů. Oproti tomu cirkadiánní exprese genů buněčného cyklu a apoptózy byla v kolonu starých myší zachována pouze u *Ccne1* a *Ccna1* (za předpokladu vyloučené CT16 na základě velkých rozptylů naměřených hodnot). Navíc byl v expresi *Ccna1* detekován fázový posun cirkadiánní křivky u starých myší. Z uvedených dat tak vyplývá, že během

stárnutí dochází k oslabení cirkadiánních oscilátorů ve střevě a postupně se se zvyšujícím věkem snižuje amplituda cirkadiánního rytmu. Zároveň by ztráta cirkadiánního rytmu genu mohla vypovídat o míře cirkadiánní kontroly genu. Dalším možným vysvětlením by mohlo být zapojení více regulátorů do kontroly exprese genu, které v součtu vede k nerytmické expresi genu. V kolonu starých myší byla zjištěna zvýšená hladina exprese cyklinů souvisejících se vstupem buňky do replikace DNA a buněčného dělení s maximální expresí mezi CT12 a CT24, což se shoduje s předpokládanou inklinací S a M fází buněčného cyklu k aktivní fázi dne živočicha (Scheving et al., 1986). Hladina *Ccnd1*, klíčového cyklinu pro iniciaci G1 fáze buněčného cyklu, byla snižena u starých myší. U analyzovaných apoptotických genů *Casp3*, *Bad*, a *Bcl2* byla v kolonu starých myší posílena exprese pro-apoptotických genů a oslabena exprese anti-apoptotického genu. Obdobný trend zesílení exprese pro-apoptotických genů a snížení exprese anti-apoptotických genů objevil Park a kol. v roce 2014 v lidských svalových buňkách různých věkových skupin (Park et al., 2014).

Epidemiologické studie prokázaly zvýšené riziko incidence kolorektálního karcinomu při narušení mechanismu cirkadiánních hodin (Schernhammer et al., 2003). V kolorektálním karcinomu byla zjištěna signifikantní změna hodinového oscilátoru na periférii (Soták et al., 2013). Protože kolorektální karcinom má zvýšenou incidenci spojenou s přibývajícím věkem (Ferlay et al., 2013), zaměřily jsme se v této práci na porovnání exprese v kolonu starých myší s expresí v kolorektálním tumoru stejně starých myší (AOM/DSS). Na modelech myší s indukovaným kolorektálním karcinomem již byla prokázána výrazně utlumená, až vymizelá rytmicita hodinových genů *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Rev-erba* v porovnání se zdravou tkání kolonu (Huisman et al., 2015; Soták et al., 2013). Podobný trend jsme my zaznamenaly u exprese přímo hodinami kontrolovaných genů *Tef* a *Dbp* v kolorektálním tumoru. Zachovaný cirkadiánní rytmus s robustně sníženou periodou oproti kolonu stejně starých zdravých myší byl společný pro cirkadiánní křivku obou genů. Zjištění se shoduje se studii exprese PAR bZip genů v kolorektálních metastázích v játrech a v kolorektálním tumoru (Huisman et al., 2015; Soták et al., 2013).

Vznik a vývoj kolorektálního tumoru je spjat s deregulací buněčného cyklu a apoptotických drah. S ohledem na existenci dynamické rovnováhy mezi proliferací a apoptózou, spřažení cirkadiánního a buněčného oscilátoru a prokázané závislosti apoptózy na cirkadiánních hodinách dochází při narušení jednoho z těchto molekulárního mechanismů k ovlivnění ostatních. Neoplastická transformace je ve studiích často spojovaná se změnou exprese cyklinů. Naproti tomu publikovaná cirkadiánní rytmicita cyklinů je spíše ojedinělým jevem. Zachovaný cirkadiánní rytmus byl prokázán u exprese *Ccnb1* a *Ccnd1* v karcinomu bukální sliznice zlatého křečka a u exprese *Ccnd1* v melanomu zebřičky (Hamilton et al., 2015; Tan et al., 2015). V obou zmíněných

případech měly cirkadiánní křivky *Ccnb1* a *Ccd1* zvýšenou celkovou expresí, ale sníženou cirkadiánní amplitudu. Naší analýzou nebyla v kolorektálním tumoru, oproti zjištěné cirkadiánní expresi *Ccne1* a *Ccna1* v kolonu, prokázána cirkadiánní rytmicita ani *Ccne1* ani *Ccna1*. Vymizení cirkadiánního rytmu cyklinů během neoplastické transformace kolonu odpovídá teorii potlačení cirkadiánních hodin v tumorigenezi.

V provedeném měření bylo potvrzeno zvýšení hladiny exprese *Ccnd1* mRNA v kolorektálním tumoru. Podobný trend změny exprese *Ccnd1* byl prokázán v lidském CRC jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu (Arber et al., 1996; Dai et al., 2007). Zároveň jsme nezjistili žádnou signifikantní změnu hladiny exprese mRNA *Ccne1*. Sice ve vývoji kolorektálního karcinomu bylo prokázáno postupné zvyšování hladiny exprese CCNE1, ale pouze kolem 20 % karcinomů mělo detekovanou zvýšenou transkripci genu *Ccne1* (Corin et al., 2010; Fearon, 2011; Li et al., 2001). Zvýšení hladiny CCNE1 v kolorektální tumoru tak může být způsobeno inhibicí ubiquitin ligázového komplexu degradujícího CCNE1 (Fearon, 2011). Poměrně překvapivé bylo naměřené snížení hladiny exprese cyklinů *Ccnb1* a *Ccna1* v nádorové tkáni. V kolorektálním karcinomu lidí totiž studie prokázaly zvýšenou expresi proteinů CCNB1 a CCNA1 (Fang et al., 2014b; Korenaga et al., 2002; Wang et al., 1997). Odlišné exprese mohou být dány mezidruhovými rozdíly, rozdílnými stádii vývoje kolorektálního tumoru nebo detekcí na úrovni mRNA.

Vzhledem k předchozí neprokázané cirkadiánní expresi apoptotických genů v kolonu starých myší nebylo s překvapením, že jsme neprokázali cirkadiánní rytmus exprese *Casp3*, *Bcl2* a *Bad* mRNA ani v kolorektálním tumoru. Signifikantní změny exprese apoptotických genů byly v souladu s dosud publikovanými studiemi (Bukholm and Nesland, 2000). Během neoplastické transformace došlo ke snížení exprese pro-apoptických genů a ke zvýšení exprese anti-apoptického genu.

Poměrně nově objeveným regulačním mechanismem v organismu jsou miRNA. MiRNA prostřednictvím translační represe či degradace mRNA regulují expresi proteinů a tím zasahují do většiny signalizačních drah a procesů probíhajících v organismu (Stroynowska-Czerwinska et al., 2014). Několik studií se zabývá propojením mezi miRNA a cirkadiánními hodinami. V játrech a SCN myší byly detekovány miRNA, jež mohou vytvářet další autoregulační zpětnovazebnou smyčku molekulárního mechanismu cirkadiánních hodin, miR-142-3p a miR-27b-3p přes *Bmal1* mRNA a miR-185 přes *Cry1* mRNA (Lee et al., 2013; Shende et al., 2013; Zhang et al., 2016). V posledních letech byly vytvořeny detailní bioinformatické databáze predikující cirkadiánní rytmicitu konkrétních miRNA (Griffiths-Jones, 2010), ale jen zlomek z cirkadiánních rytmů byl dosud ověřen.

Nám se povedlo metodou kvantitativní RT-PCR detekovat cirkadiánní rytmus miR-1-3p v kolonu starých myší. Pokud je nám známo, je naše analýza první, která potvrzuje existenci cirkadiánního rytmu miR-1-3p. Mezi miRNA s prokázanou cirkadiánní rytmitou patří miR-16. Cirkadiánní exprese miR-16 byla zjištěna v jejunu potkana a v lidských lymfocytech a mateřském mléce (Balakrishnan et al., 2010; Figueredo et al., 2015; Floris et al., 2015). Naše analýza sice signifikantně nepotvrdila cirkadiánní rytmus miR-16-5p v kolonu, ale jak z grafického znázornění měnících se hladin exprese, tak z výsledků kosinorovy analýzy vyplývá jeho pravděpodobná existence. Nesignifikantní výsledek jednorozměrné analýzy rozptylu ($p=0,07$) mohl být zapříčiněn malými rozdíly mezi jednotlivými časovými body a velkými rozptyly středních chyb průměru. Cirkadiánní rytmus nebyl detekován u miR-34a-5p, miR-155-5p a miR-192-3p, což jsou miRNA s prokázanou účastí na regulaci molekulárního mechanismu cirkadiánních hodin (Curtis et al., 2015; Nagel et al., 2009; Yamakuchi et al., 2008). Han a spol. v roce 2016 detekovali cirkadiánní expresí miR-34a-5p, ale jejich studie byla prováděna *in vitro* na lidských buňkách karcinomu žlučových cest (Han et al., 2016). Zároveň exprese těchto tří miRNA může být indukována proteinem P53, který je sice ovlivňován hodinovými geny, ale sám cirkadiánní rytmus nevykazuje (Braun et al., 2008; Corney et al., 2007; Jiang et al., 2016).

U žádné z analyzovaných miRNA nebyla prokázána cirkadiánní rytmita v kolorektálním tumoru. Ztráta cirkadiánní rytmicity miRNA v kolorektálním tumoru koresponduje s dosavadními studiemi změn cirkadiánního rytmu během neoplastické transformace (Soták et al., 2013).

Jedním z nejběžnějších témat miRNA studií je zapojení miRNA do vzniku a vývoje tumoru prostřednictvím změny exprese určitých miRNA. My jsme prokázali robustní změny hladin expresí všech měřených miRNA během neoplastické transformace kolonu. Vzhledem k tomu, že miR-1-3p působí jako tumorsupresor přes MAPK signalizační dráhu, a tak negativně reguluje proliferaci a epiteliálně mezenchymální přechod tumoru, byla v souladu s publikovanými studiemi na lidských vzorcích CRC (Reid et al., 2012; Xu et al., 2014; Zhu et al., 2015) zjištěna snížená exprese miR-1-3p během neoplastické transformace kolonu myší. Stejný trend byl zaznamenán i u ostatních analyzovaných tumorsupresorů, miR-16-5p, miR-34a-5p a miR-192-3p. Obdobné výsledky poklesu hladiny exprese miR-16-5p, miR-34a-5p a miR-192-3p byly zjištěny v lidském kolorektálním karcinomu (Chiang et al., 2012; Ma et al., 2013; Thorstensen et al., 2000; Tsikitis et al., 2014). Jedinou miRNA, u které jsme detekovali zvýšení exprese v kolorektálním tumoru, byla miR-155-5p. MiR-155-5p patří kvůli svým prokázaným onkogenním vlastnostem mezi nejvíce prostudované miRNA. Bylo prokázáno její zapojení do regulace PI3K/AKT a TGF β signalizačních drah a imunitního systému (Bakirtzi et al., 2011; Louafi et al., 2010; O'Connell et al., 2009). Zvýšená exprese

miR-155-5p je spjatá s progresí kolorektálního tumoru u lidí (Qu et al., 2015) a v souladu s našimi výsledky. Naše analýza exprese miRNA potvrdila obdobné změny exprese v kolorektálním tumoru myši jako v kolorektálním karcinomu lidí.

Souhrnně z dat vyplývá, že během neoplastické transformace kolonu je změněn, ale zachován molekulární mechanismus cirkadiálních hodin. Nicméně naše výsledky naznačují, že narušení cirkadiálních hodin by mohlo vést k rozpřažení cirkadiálního a buněčného oscilátoru, podobně jako k rozpřažení cirkadiálních hodin a regulaci apoptotických procesů a reciprokého vztahu miRNA s cirkadiálními hodinami. Riziko rozpřažení oscilátorů by mohlo souviset s přibývajícím věkem. Odpovídalo by to epidemiologickým studiím zvýšeného rizika nádorového bujení při dlouhodobé práci na směny a stárnutí (Ferlay et al., 2013; Fritschi et al., 2011). V naší době se nedá předpokládat omezení prací na směny nebo zamezení stárnutí, ale pokud bychom v budoucnu byli schopni farmakologicky zabránit rozpřažení procesů s cirkadiálním oscilátorem, mohli bychom přispět ke snížení rizika tumorigeneze.

8 Závěr

Potvrdily jsme existenci cirkadiánního rytmu v kolonu mladých (10 týdnů) i starých (52 týdnů) myši na úrovni genů *Tef* a *Dbp* přímo řízených hodinovým oscilátorem. Cirkadiánní rytmus exprese *Tef* a *Dbp* v kolonu byl během neoplastické transformace utlumen, což se na cirkadiánní křivce exprese projevilo snížením amplitudy případně doplněné fázovým posunem. Na změnu cirkadiánního rytmu *Tef* a *Dbp* mělo vliv také stárnutí, kdy byla s věkem prodloužena akrofáze nebo snížena amplituda cirkadiánní křivky.

Ukázaly jsme propojení mezi hodinovým oscilátorem a oscilátorem buněčného cyklu prostřednictvím cirkadiánně rytmických oscilací klíčových regulátorů buněčného cyklu, cyklinů. V kolonu mladých myši byla detekována cirkadiánní exprese *Ccne1*, *Ccna1* a *Ccnb1*. U starších myši byl cirkadiánní rytmus zachován pouze u *Ccne1* a po vyloučení změřeného časového bodu s velkým rozptylem naměřených hodnot CT16 i v *Ccna1*. Žádný cirkadiánní rytmus nebyl prokázán v kolorektálním tumoru.

Podobné tendence změn exprese v souvislosti s cirkadiánními hodinami byly zjištěny u apoptotických genů *Casp3*, *Bcl2* a *Bad*. Detekovaná cirkadiánní rytmicita *Casp3* a *Bcl2* v kolonu mladých jedinců nebyla prokázána v kolonu starších myši nebo v kolorektálním tumoru.

Byl prokázán cirkadiánní rytmus u miR-1-3p v makroskopicky zdravém kolonu myši, jenž vymizel v tumoru. Během neoplastické transformace byly změněny hladiny exprese miRNA s ohledem na jejich onkogenní či tumorsupresorové vlastnosti. Onkogenní miR-155-5p byla v tumoru zvýšená, zatímco převážně tumorsupresorové miR-1-3p, miR-16-5p, miR-34a-5p a miR-192-3p byly tlumeny.

Závěrem lze shrnout klíčové výsledky diplomové práce do následujících bodů:

- U genů, jejichž exprese je přímo kontrolována heterodimerem BMAL1:CLOCK, je cirkadiánní rytmus v kolorektálním tumoru utlumen, ale zachován.
- Během neoplastické transformace dochází ke změně cirkadiánních rytmů genů spjatých s buněčným cyklem a apoptózou.
- S přibývajícím věkem se cirkadiánní rytmus genů buněčného cyklu a apoptózy oslabuje.
- Na cirkadiánním rytmu studovaných genů buněčného cyklu a apoptózy je patrný silnější efekt věku než efekt neoplastické transformace.
- Konkrétní miRNA mohou vykazovat cirkadiánní rytmicitu, která není zachována v kolorektálním tumoru.

9 Použitá literatura

- Abrahamson, E.E., and Moore, R.Y. (2001). **Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections.** *Brain research* 916, 172–191.
- Akao, Y., Nakagawa, Y., and Naoe, T. (2006). **MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers.** *Oncology Reports* 16, 845–850.
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., and Nishida, E. (2002). **Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I ϵ (CKI ϵ) and CKI δ in cultured cells.** *Molecular and cellular biology* 22, 1693–1703.
- Akhtar, R.A., Reddy, A.B., Maywood, E.S., Clayton, J.D., King, V.M., Smith, A.G., Gant, T.W., Hastings, M.H., and Kyriacou, C.P. (2002). **Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus.** *Current biology* 12, 540–550.
- Alhopuro, P., Bjorklund, M., Sammalkorpi, H., Turunen, M., Tuupanen, S., Bistrom, M., Niittymaki, I., Lehtonen, H.J., Kivioja, T., Launonen, V., et al. (2010). **Mutations in the Circadian Gene CLOCK in Colorectal Cancer.** *Molecular Cancer Research* 8, 952–960.
- Al-Nafussi, A.I., and Wright, N.A. (1982). **Circadian rhythm in the rate of cellular proliferation and in the size of the functional compartment of mouse jejunal epithelium.** *Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology* 40, 71–79.
- Alvarez-Saavedra, M., Antoun, G., Yanagiya, A., Oliva-Hernandez, R., Cornejo-Palma, D., Perez-Iratxeta, C., Sonenberg, N., and Cheng, H.-Y.M. (2011). **miRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of the circadian clock.** *Human molecular genetics* 20, 731–751.
- Anguiano-Hernandez, Y.M., Chartier, A., and Huerta, S. (2007). **Smac/DIABLO and colon cancer.** *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 7, 467–473.
- Arber, N., Hibshoosh, H., Moss, S., Sutter, T., Zhang, Y., Begg, M., Wang, S., Weinstein, I., and Holt, P. (1996). **Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis.** *Gastroenterology* 110, 669–674.
- Arellano, M., and Moreno, S. (1997). **Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle.** *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 29, 559–573.
- Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., and Schibler, U. (2008). **SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation.** *Cell* 134, 317–328.
- Asher, G., Reinke, H., Altmeyer, M., Gutierrez-Arcelus, M., Hottiger, M.O., and Schibler, U. (2010). **Poly(ADP-ribose) polymerase 1 participates in the phase entrainment of circadian clocks to feeding.** *Cell* 142, 943–953.
- Aslam, M.I., Hussein, S., West, K., Singh, B., Jameson, J.S., and Pringle, J.H. (2015). **MicroRNAs associated with initiation and progression of colonic polyp: a feasibility study.** *International journal of surgery* 13, 272–279.
- Aton, S.J., Colwell, C.S., Harmar, A.J., Waschek, J., and Herzog, E.D. (2005). **Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons.** *Nature neuroscience* 8, 476–483.
- Bakirtzi, K., Hatziapostolou, M., Karagiannides, I., Polytarchou, C., Jaeger, S., Iliopoulos, D., and Pothoulakis, C. (2011). **Neurotensin signaling activates microRNAs-21 and -155 and Akt, promotes tumor growth in mice, and is increased in human colon tumors.** *Gastroenterology* 141, 1749–1761.e1.

- Balakrishnan, A., Stearns, A.T., Park, P.J., Dreyfuss, J.M., Ashley, S.W., Rhoads, D.B., and Tavakkolizadeh, A. (2010). **MicroRNA mir-16 is anti-proliferative in enterocytes and exhibits diurnal rhythmicity in intestinal crypts.** *Experimental cell research* 316, 3512–3521.
- Ballesta, A., Dulong, S., Abbara, C., Cohen, B., Okyar, A., Clairambault, J., and Levi, F. (2011). **A combined experimental and mathematical approach for molecular-based optimization of irinotecan circadian delivery.** *PLoS computational biology* 7, e1002143.
- Balmanno, K., and Cook, S.J. (1999). **Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells.** *Oncogene* 18, 3085–3097.
- Balounová, K. (2014). **Bakalářská práce** Školitel: prof. RNDr. Jiří Pácha, DrSc. Praha, 2014.
- Balsalobre, A., Brown, S.A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., Schütz, G., and Schibler, U. (2000). **Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling.** *Science* 289, 2344–2347.
- Bandrés, E., Cubedo, E., Agirre, X., Malumbres, R., Zárata, R., Ramirez, N., Abajo, A., Navarro, A., Moreno, I., Monzó, M., et al. (2006). **Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues.** *Molecular cancer* 5, 29.
- Banks, G., Nolan, P.M., and Peirson, S.N. (2016). **Reciprocal interactions between circadian clocks and aging.** *Mammalian genome* 27, 332–340.
- Barker, N., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2008). **The intestinal stem cell.** *Genes & development* 22, 1856–1864.
- Bartel, D.P. (2004). **MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function.** *Cell* 116, 281–297.
- Bedi, A., Pasricha, P.J., Akhtar, A.J., Barber, J.P., Bedi, G.C., Giardiello, F.M., Zehnbauser, B.A., Hamilton, S.R., and Jones, R.J. (1995). **Advances in Brief Inhibition of Apoptosis during Development of Colorectal Cancer1 Carcinoma.** *Cancer research* 55, 1811–1816.
- Bettington, M., Walker, N., Clouston, A., Brown, I., Leggett, B., and Whitehall, V. (2013). **The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges.** *Histopathology* 62, 367–386.
- Bieler, J., Cannavo, R., Gustafson, K., Gobet, C., Gatfield, D., and Naef, F. (2014). **Robust synchronization of coupled circadian and cell cycle oscillators in single mammalian cells.** *Molecular systems biology* 10, 739.
- Bird, R.P. (1995). **Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer.** *Cancer letters* 93, 55–71.
- Bjarnason, G.A., Jordan, R.C., and Sothorn, R.B. (1999). **Circadian variation in the expression of cell-cycle proteins in human oral epithelium.** *The American journal of pathology* 154, 613–622.
- Braun, C.J., Zhang, X., Savelyeva, I., Wolff, S., Moll, U.M., Schepeler, T., Ørntoft, T.F., Andersen, C.L., and Dobbstein, M. (2008). **p53-Responsive micrnas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest.** *Cancer research* 68, 10094–10104.
- Brown, S.A., Zumbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., and Schibler, U. (2002). **Rhythms of Mammalian Body Temperature Can Sustain Peripheral Circadian Clocks.** *Current biology* 12, 1574–1583.
- Brown, S.A., Ripperger, J., Kadener, S., Fleury-Olela, F., Vilbois, F., Rosbash, M., and Schibler, U. (2005). **PERIOD1-associated proteins modulate the negative limb of the mammalian circadian oscillator.** *Science* 308, 693–696.
- Buhr, E.D., and Takahashi, J.S. (2013). **Molecular components of the Mammalian circadian clock.** *Handbook of experimental pharmacology* 3–27.

- Buchi, K.N., Moore, J.G., Hrushesky, W.J., Sothorn, R.B., and Rubin, N.H. (1991). **Circadian rhythm of cellular proliferation in the human rectal mucosa.** *Gastroenterology* 101, 410–415.
- Bukholm, I.K., and Nesland, J.M. (2000). **Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), Bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas.** *Virchows Archiv* 436, 224–228.
- Caldelas, I., Feillet, C.A., Dardente, H., Eclancher, F., Malan, A., Gourmelen, S., Pévet, P., and Challet, E. (2005). **Timed hypocaloric feeding and melatonin synchronize the suprachiasmatic clockwork in rats, but with opposite timing of behavioral output.** *The European journal of neuroscience* 22, 921–929.
- Cannell, I., and Bushell, M. (2010). **Regulation of Myc by miR-34c: A mechanism to prevent genomic instability?** *Cell Cycle* 9, 2798–2802.
- Cao, R., Robinson, B., Xu, H., Gkogkas, C., Khoutorsky, A., Alain, T., Yanagiya, A., Nevarko, T., Liu, A.C., Amir, S., et al. (2013). **Translational control of entrainment and synchrony of the suprachiasmatic circadian clock by mTOR/4E-BP1 signaling.** *Neuron* 79, 712–724.
- Cardone, L., Hirayama, J., Giordano, F., Tamaru, T., Palvimo, J.J., and Sassone-Corsi, P. (2005). **Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1.** *Science* 309, 1390–1394.
- Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). **Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs.** *Cell* 136, 642–655.
- Castelló, A., Gumá, A., Sevilla, L., Furriols, M., Testar, X., Palacín, M., and Zorzano, A. (1995). **Regulation of GLUT5 gene expression in rat intestinal mucosa: regional distribution, circadian rhythm, perinatal development and effect of diabetes.** *The Biochemical journal* 309 (Pt 1, 271–277.
- Cavadini, G., Petrzilka, S., Kohler, P., Jud, C., Tobler, I., Birchler, T., and Fontana, A. (2007). **TNF- α suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12843–12848.
- Corin, I., Larsson, L., Bergström, J., Gustavsson, B., and Derwinger, K. (2010). **A study of the expression of Cyclin E and its isoforms in tumor and adjacent mucosa, correlated to patient outcome in early colon cancer.** *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 49, 63–69.
- Corney, D.C., Flesken-Nikitin, A., Godwin, A.K., Wang, W., and Nikitin, A.Y. (2007). **MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth.** *Cancer research* 67, 8433–8438.
- Corpe, C.P., and Burant, C.F. (1996). **Hexose transporter expression in rat small intestine: effect of diet on diurnal variations.** *The American journal of physiology* 271, G211–G216.
- Cotter, T.G. (2009). **Apoptosis and cancer: the genesis of a research field.** *Nature reviews Cancer* 9, 501–507.
- Croce, C.M. (2009). **Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer.** *Nature reviews. Genetics* 10, 704–714.
- Crumbley, C., and Burris, T.P. (2011). **Direct regulation of CLOCK expression by REV-ERB.** *PLoS One* 6, e17290.
- Curtis, A.M., Fagundes, C.T., Yang, G., Palsson-McDermott, E.M., Wochal, P., McGettrick, A.F., Foley, N.H., Early, J.O., Chen, L., Zhang, H., et al. (2015). **Circadian control of innate immunity in macrophages by miR-155 targeting Bmal1.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 7231–7236.
- Dai, W.-B., Ren, Z.-P., Chen, W.-L., DU, J., Shi, Z., and Tang, D.-Y. (2007). **Expression and significance of APC,**

β -catenin, C-myc, and Cyclin D1 proteins in colorectal carcinoma. *Ai Zheng* 26, 963–966.

Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., and Schibler, U. (2000). **Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus.** *Genes & development* 14, 2950–2961.

Dews, M., Fox, J.L., Hultine, S., Sundaram, P., Wang, W., Liu, Y.Y., Furth, E., Enders, G.H., El-Deiry, W., Schelter, J.M., et al. (2010). **The myc-miR-17~92 axis blunts TGF β signaling and production of multiple TGF β -dependent antiangiogenic factors.** *Cancer research* 70, 8233–8246.

Dimova, N. V., Hathaway, N.A., Lee, B.-H., Kirkpatrick, D.S., Berkowitz, M.L., Gygi, S.P., Finley, D., and King, R.W. (2012). **APC/C-mediated multiple monoubiquitylation provides an alternative degradation signal for cyclin B1.** *Nature cell biology* 14, 168–176.

Ding, X., Sun, B., Huang, J., Xu, L., Pan, J., Fang, C., Tao, Y., Hu, S., Li, R., Han, X., et al. (2015). **The role of miR-182 in regulating pineal CLOCK expression after hypoxia-ischemia brain injury in neonatal rats.** *Neuroscience letters* 591, 75–80.

Doi, M., Hirayama, J., and Sassone-Corsi, P. (2006). **Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase.** *Cell* 125, 497–508.

Draetta, G.F. (1994). **Mammalian G1 cyclins.** *Current Opinion in Cell Biology* 6, 842–846.

Duffield, G.E., Best, J.D., Meurers, B.H., Bittner, A., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2002). **Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells.** *Current biology* 12, 551–557.

Dunlap, J.C. (1999). **Molecular Bases for Circadian Clocks.** *Cell* 96, 271–290.

Duursma, A.M., Kedde, M., Schrier, M., le Sage, C., and Agami, R. (2008). **miR-148 targets human DNMT3b protein coding region.** *RNA* 14, 872–877.

Dweep, H., and Gretz, N. (2015). **miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions.** *Nature Methods* 12, 697–697.

Eide, E.J., Vielhaber, E.L., Hinz, W.A., and Virshup, D.M. (2002). **The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I ϵ .** *The Journal of biological chemistry* 277, 17248–17254.

Elledge, S.J., and Harper, J.W. (1994). **Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development.** *Current Opinion in Cell Biology* 6, 847–852.

Emery, P., and Reppert, S.M. (2004). **A rhythmic Ror.** *Neuron* 43, 443–446.

Er, E., Oliver, L., Cartron, P.-F., Juin, P., Manon, S., and Vallette, F.M. **Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax.** *Biochimica et biophysica acta* 1757, 1301–1311.

Evan, G.I., and Vousden, K.H. (2001). **Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.** *Nature* 411, 342–348.

Fabian, M.R., and Sonenberg, N. (2012). **The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC.** *Nature structural & molecular biology* 19, 586–593.

Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F., et al. (2011). **miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT.** *Nature structural & molecular biology* 18, 1211–1217.

Fang, Y., Yu, H., Liang, X., Xu, J., and Cai, X. (2014a). **Chk1-induced CCNB1 overexpression promotes cell**

proliferation and tumor growth in human colorectal cancer. *Cancer biology & therapy* 15, 1268–1279.

Fang, Y., Liang, X., Jiang, W., Li, J., Xu, J., and Cai, X. (2015). **Cyclin B1 suppresses colorectal cancer invasion and metastasis by regulating e-cadherin.** *PLoS one* 10, e0126875.

Farazi, T.A., Spitzer, J.I., Morozov, P., and Tuschl, T. (2011). **miRNAs in human cancer.** *The Journal of Pathology* 223, 102–115.

Fearon, E.R. (2011). **Molecular Genetics of Colorectal Cancer.** *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6, 479–507.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). **A genetic model for colorectal tumorigenesis.** *Cell* 61, 759–767.

Feillet, C., Krusche, P., Tamanini, F., Janssens, R.C., Downey, M.J., Martin, P., Teboul, M., Saito, S., Lévi, F.A., Bretschneider, T., et al. (2014). **Phase locking and multiple oscillating attractors for the coupled mammalian clock and cell cycle.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 9828–9833.

Feillet, C., van der Horst, G.T.J., Levi, F., Rand, D.A., and Delaunay, F. (2015). **Coupling between the Circadian Clock and Cell Cycle Oscillators: Implication for Healthy Cells and Malignant Growth.** *Frontiers in Neurology* 6, 96.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2013). **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet].** Lyon, Fr. Int. Agency Res. Cancer.

Figueredo, D. de S., Gitaí, D.L.G., and Andrade, T.G. de (2015). **Daily variations in the expression of miR-16 and miR-181a in human leukocytes.** *Blood cells, molecules & diseases* 54, 364–368.

Floris, I., Billard, H., Boquien, C.-Y., Joram-Gauvard, E., Simon, L., Legrand, A., Boscher, C., Rozé, J.-C., Bolaños-Jiménez, F., and Kaeffer, B. (2015). **MiRNA Analysis by Quantitative PCR in Preterm Human Breast Milk Reveals Daily Fluctuations of hsa-miR-16-5p.** *PLoS one* 10, e0140488.

Fonjallaz, P., Ossipow, V., Wanner, G., and Schibler, U. (1996). **The two PAR leucine zipper proteins, TEF and DBP, display similar circadian and tissue-specific expression, but have different target promoter preferences.** *The EMBO journal* 15, 351–362.

Fritschi, L., Glass, D.C., Heyworth, J.S., Aronson, K., Girschik, J., Boyle, T., Grundy, A., and Erren, T.C. (2011). **Hypotheses for mechanisms linking shiftwork and cancer.** *Medical Hypotheses* 77, 430–436.

Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P., and Lee, C.C. (2002a). **The Circadian Gene Period2 Plays an Important Role in Tumor Suppression and DNA Damage Response In Vivo.** *Cell* 111, 41–50.

Fu, Y., Zhong, H., Wang, M.-H.H., Luo, D.-G., Liao, H.-W., Maeda, H., Hattar, S., Frishman, L.J., and Yau, K.-W. (2005). **Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102, 10339–10344.

Fukao, A., Mishima, Y., Takizawa, N., Oka, S., Imataka, H., Pelletier, J., Sonenberg, N., Thoma, C., and Fujiwara, T. (2014). **MicroRNAs trigger dissociation of eIF4A1 and eIF4AII from target mRNAs in humans.** *Molecular cell* 56, 79–89.

Fulco, M., Cen, Y., Zhao, P., Hoffman, E.P., McBurney, M.W., Sauve, A.A., and Sartorelli, V. (2008). **Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt.** *Developmental cell* 14, 661–673.

Fuller, C.A., Murakami, D.M., and Sulzman, F.M. (1989). **Gravitational biology and the mammalian**

circadian timing system. *Advances in space research : the official journal of the Committee on Space Research* 9, 283–292.

Furlanetto, R.W., Harwell, S.E., and Frick, K.K. (1994). **Insulin-like growth factor-I induces cyclin-D1 expression in MG63 human osteosarcoma cells in vitro.** *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 8, 510–517.

Gallego, M., Kang, H., and Virshup, D.M. (2006). **Protein phosphatase 1 regulates the stability of the circadian protein PER2.** *The Biochemical journal* 399, 169–175.

Gao, Z.-H., Seeling, J.M., Hill, V., Yochum, A., and Virshup, D.M. (2002). **Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the β -catenin degradation complex.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1182–1187.

Gatfield, D., Le Martelot, G., Vejnar, C.E., Gerlach, D., Schaad, O., Fleury-Olela, F., Ruskeepää, A.-L., Oresic, M., Esau, C.C., Zdobnov, E.M., et al. (2009). **Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression.** *Genes & development* 23, 1313–1326.

Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S., and Weitz, C.J. (1998). **Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism.** *Science* 280, 1564–1569.

Geng, Y., Lee, Y.-M., Welcker, M., Swanger, J., Zagozdzon, A., Winer, J.D., Roberts, J.M., Kaldis, P., Clurman, B.E., and Sicinski, P. (2007). **Kinase-independent function of cyclin E.** *Molecular cell* 25, 127–139.

Gery, S., Komatsu, N., Baldjyan, L., Yu, A., Koo, D., and Koeffler, H.P. (2006). **The circadian gene *per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells.** *Molecular cell* 22, 375–382.

Goel, A., and Boland, C.R. (2012). **Epigenetics of colorectal cancer.** *Gastroenterology* 143, 1442–1460.e1.

Golombek, D.A., and Rosenstein, R.E. (2010). **Physiology of circadian entrainment.** *Physiological reviews* 90, 1063–1102.

Graziano, F., Canestrari, E., Loupakis, F., Ruzzo, A., Galluccio, N., Santini, D., Rocchi, M., Vincenzi, B., Salvatore, L., Cremolini, C., et al. (2010). **Genetic modulation of the Let-7 microRNA binding to KRAS 3'-untranslated region and survival of metastatic colorectal cancer patients treated with salvage cetuximab-irinotecan.** *The pharmacogenomics journal* 10, 458–464.

Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). **The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs.** *Nature* 432, 235–240.

Gréchez-Cassiau, A., Rayet, B., Guillaumond, F., Teboul, M., and Delaunay, F. (2008). **The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21WAF1/CIP1 expression and hepatocyte proliferation.** *The Journal of biological chemistry* 283, 4535–4542.

Griffiths-Jones, S. (2010). **miRBase: microRNA sequences and annotation.** *Current protocols in bioinformatics* Chapter 12, Unit 12.9.1–10.

Griniatsos, J., Michail, O.P., Theocharis, S., Arvelakis, A., Papaconstantinou, I., Felekouras, E., Pikoulis, E., Karavokyros, I., Bakoyiannis, C., Marinos, G., et al. (2006). **Circadian variation in expression of G1 phase cyclins D1 and E and cyclin-dependent kinase inhibitors p16 and p21 in human bowel mucosa.** *World journal of gastroenterology* 12, 2109–2114.

Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., and Cermakian, N. (2005). **Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors.** *Journal of biological rhythms* 20, 391–403.

Guttmacher, A.E., Collins, F.S., Lynch, H.T., and de la Chapelle, A. (2003). **Hereditary Colorectal Cancer.** *New*

England Journal of Medicine 348, 919–932.

Hamilton, N., Diaz-de-Cerio, N., and Whitmore, D. (2015). **Impaired light detection of the circadian clock in a zebrafish melanoma model.** *Cell Cycle* 14, 1232–1241.

Han, Y., Meng, F., Venter, J., Wu, N., Wan, Y., Standeford, H., Francis, H., Meininger, C., Greene, J., Trzeciakowski, J.P., et al. (2016). **miR-34a-dependent overexpression of Per1 decreases cholangiocarcinoma growth.** *Journal of hepatology* 64, 1295–1304.

Hastings, M.H., Reddy, A.B., and Maywood, E.S. (2003). **A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease.** *Nature reviews. Neuroscience* 4, 649–661.

Haus, E., and Smolensky, M. (2006). **Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects.** *Cancer Causes Control* 17, 489–500.

Hayashi, Y., Ushijima, K., Ando, H., Yanagihara, H., Ishikawa, E., Tsuruoka, S.-I., Sugimoto, K.-I., and Fujimura, A. (2010). **Influence of a time-restricted feeding schedule on the daily rhythm of abcb1a gene expression and its function in rat intestine.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 335, 418–423.

Hernández, S., Bessa, X., Beà, S., Hernández, L., Nadal, A., Mallofré, C., Muntane, J., Castells, A., Fernández, P.L., Cardesa, A., et al. (2001). **Differential expression of cdc25 cell-cycle-activating phosphatases in human colorectal carcinoma.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 81, 465–473.

Hong, Z., Feng, Z., Sai, Z., and Tao, S. (2014). **PER3, a novel target of miR-103, plays a suppressive role in colorectal cancer in vitro.** *BMB reports* 47, 500–505.

Honma, S., Honma, K., Shirakawa, T., and Hiroshige, T. (1988). **Rhythms in behaviors, body temperature and plasma corticosterone in SCN lesioned rats given methamphetamine.** *Physiology & behavior* 44, 247–255.

Hoogerwerf, W.A. (2010). **Role of clock genes in gastrointestinal motility.** *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 299, G549–G555.

Hoogerwerf, W.A., Hellmich, H.L., Cornélissen, G., Halberg, F., Shahinian, V.B., Bostwick, J., Savidge, T.C., Cassone, V.M., Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., et al. (2007). **Clock Gene Expression in the Murine Gastrointestinal Tract: Endogenous Rhythmicity and Effects of a Feeding Regimen.** *Gastroenterology* 133, 1250–1260.

Hoogerwerf, W.A., Sinha, M., Conesa, A., Luxon, B.A., Shahinian, V.B., Cornélissen, G., Halberg, F., Bostwick, J., Timm, J., and Cassone, V.M. (2008). **Transcriptional profiling of mRNA expression in the mouse distal colon.** *Gastroenterology* 135, 2019–2029.

Hoogerwerf, W.A., Shahinian, V.B., Cornélissen, G., Halberg, F., Bostwick, J., Timm, J., Bartell, P.A., and Cassone, V.M. (2010). **Rhythmic changes in colonic motility are regulated by period genes.** *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 298, G143–G150.

Hua, H., Wang, Y., Wan, C., Liu, Y., Zhu, B., Yang, C., Wang, X., Wang, Z., Cornelissen-Guillaume, G., and Halberg, F. (2006). **Circadian gene mPer2 overexpression induces cancer cell apoptosis.** *Cancer science* 97, 589–596.

Huang, C.-Y., and Yu, L.C.-H. (2015). **Pathophysiological mechanisms of death resistance in colorectal carcinoma.** *World journal of gastroenterology* 21, 11777–11792.

Huisman, S.A., Oklejewicz, M., Ahmadi, A.R., Tamanini, F., Ijzermans, J.N.M., van der Horst, G.T.J., and de Bruin, R.W.F. (2015). **Colorectal liver metastases with a disrupted circadian rhythm phase shift the**

peripheral clock in liver and kidney. *International Journal of Cancer* 136, 1024–1032.

Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I.K., and Preiss, T. (2005). **MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16961–16966.

Husse, J., Leliavski, A., Tsang, A.H., Oster, H., and Eichele, G. (2014). **The light-dark cycle controls peripheral rhythmicity in mice with a genetically ablated suprachiasmatic nucleus clock.** *The FASEB journal* 28, 4950–4960.

Cha, Y.H., Kim, N.H., Park, C., Lee, I., Kim, H.S., and Yook, J.I. (2012). **MiRNA-34 intrinsically links p53 tumor suppressor and Wnt signaling.** *Cell Cycle* 11, 1273–1281.

Chang, T.-C., Wentzel, E.A., Kent, O.A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K.H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C.J., et al. (2007). **Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis.** *Molecular cell* 26, 745–752.

Cheng, H.-Y.M., and Obrietan, K. (2007). **Revealing a Role of MicroRNAs in the Regulation of the Biological Clock.** *Cell Cycle* 6, 3034–3038.

Chiang, Y., Song, Y., Wang, Z., Liu, Z., Gao, P., Liang, J., Zhu, J., Xing, C., and Xu, H. (2012). **microRNA-192, -194 and -215 are frequently downregulated in colorectal cancer.** *Experimental and therapeutic medicine* 3, 560–566.

Ianes, C., Xu, P., Werz, N., Meng, Z., Henne-Bruns, D., Bischof, J., and Knippschild, U. (2015). **CK1δ activity is modulated by CDK2/E- and CDK5/p35-mediated phosphorylation.** *Amino Acids*.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2010). **Painting, firefighting, and shiftwork.** *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* 98, 9–764.

Ijiri, K., and Potten, C.S. (1988). **Circadian rhythms in the incidence of apoptotic cells and number of clonogenic cells in intestinal crypts after radiation using normal and reversed light conditions.** *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* 53, 717–727.

Ioachim, E. (2008). **Expression patterns of cyclins D1, E and cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1, p27kip1 in colorectal carcinoma: correlation with other cell cycle regulators (pRb, p53 and Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features.** *International Journal of Clinical Practice* 62, 1736–1743.

Iorio, M. V, and Croce, C.M. (2012). **MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review.** *EMBO molecular medicine* 4, 143–159.

Jiang, W., Zhao, S., Jiang, X., Zhang, E., Hu, G., Hu, B., Zheng, P., Xiao, J., Lu, Z., Lu, Y., et al. (2016). **The circadian clock gene Bmal1 acts as a potential anti-oncogene in pancreatic cancer by activating the p53 tumor suppressor pathway.** *Cancer letters* 371, 314–325.

Jones, R.M., and Petermann, E. (2012). **Replication fork dynamics and the DNA damage response.** *The Biochemical journal* 443, 13–26.

Kalsbeek, A., Yi, C.-X., Cailotto, C., la Fleur, S.E., Fliers, E., and Buijs, R.M. (2011). **Mammalian clock output mechanisms.** *Essays In Biochemistry* 49, 137–151.

Kang, T.-H., and Leem, S.-H. (2014). **Modulation of ATR-mediated DNA damage checkpoint response by cryptochrome 1.** *Nucleic acids research* 42, 4427–4434.

Kawamata, T., Seitz, H., and Tomari, Y. (2009). **Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding.** *Nature structural & molecular biology* 16, 953–960.

- Kawasaki, H., Toyoda, M., Shinohara, H., Okuda, J., Watanabe, I., Yamamoto, T., Tanaka, K., Tenjo, T., and Tanigawa, N. (2001). **Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis.** *Cancer* 91, 2026–2032.
- Kiedrowski, M., and Mroz, A. (2014). **The effects of selected drugs and dietary compounds on proliferation and apoptosis in colorectal carcinoma.** *Contemporary oncology (Poznań, Poland)* 18, 222–226.
- Kim, D.-Y., Woo, K.-C., Lee, K.-H., Kim, T.-D., and Kim, K.-T. (2010). **hnRNP Q and PTB modulate the circadian oscillation of mouse Rev-erb via IRES-mediated translation.** *Nucleic acids research* 38, 7068–7078.
- Kim, D.-Y., Kwak, E., Kim, S.-H., Lee, K.-H., Woo, K.-C., and Kim, K.-T. (2011). **hnRNP Q mediates a phase-dependent translation-coupled mRNA decay of mouse Period3.** *Nucleic acids research* 39, 8901–8914.
- Kim, J.C., Koo, K.H., Roh, S.A., Cho, Y.K., Kim, H.C., Yu, C.S., Kim, H.J., Kim, J.S., and Cho, M.K. (2003). **Genetic and epigenetic changes in the APC gene in sporadic colorectal carcinoma with synchronous adenoma.** *International journal of colorectal disease* 18, 203–209.
- Kirkin, V., Joos, S., and Zörnig, M. (2004). **The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis.** *Biochimica et biophysica acta* 1644, 229–249.
- Kita, Y., Shiozawa, M., Jin, W., Majewski, R.R., Besharse, J.C., Greene, A.S., and Jacob, H.J. (2002). **Implications of circadian gene expression in kidney, liver and the effects of fasting on pharmacogenomic studies.** *Pharmacogenetics* 12, 55–65.
- Kojima, S., Matsumoto, K., Hirose, M., Shimada, M., Nagano, M., Shigeyoshi, Y., Hoshino, S. -i., Ui-Tei, K., Saigo, K., Green, C.B., et al. (2007). **LARK activates posttranscriptional expression of an essential mammalian clock protein, PERIOD1.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 1859–1864.
- Kong, W., Yang, H., He, L., Zhao, J., Coppola, D., Dalton, W.S., and Cheng, J.Q. (2008). **MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA.** *Molecular and cellular biology* 28, 6773–6784.
- Korenaga, D., Takesue, F., Yasuda, M., Honda, M., Nozoe, T., and Inutsuka, S. (2002). **The relationship between cyclin B1 overexpression and lymph node metastasis in human colorectal cancer.** *Surgery* 131, S114–S120.
- Kowalska, E., Ripperger, J.A., Hoegger, D.C., Bruegger, P., Buch, T., Birchler, T., Mueller, A., Albrecht, U., Contaldo, C., and Brown, S.A. (2013). **NONO couples the circadian clock to the cell cycle.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 1592–1599.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). **The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay.** *Nature reviews. Genetics* 11, 597–610.
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., and Reppert, S.M. (1999). **mCRY1 and mCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop.** *Cell* 98, 193–205.
- LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G., and MacKenzie, A.E. (1998). **The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer.** *Oncogene* 17, 3247–3259.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). **Identification of novel genes coding for small expressed RNAs.** *Science* 294, 853–858.
- Lamia, K.A., Sachdeva, U.M., DiTacchio, L., Williams, E.C., Alvarez, J.G., Egan, D.F., Vasquez, D.S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R.J., et al. (2009). **AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation.** *Science* 326, 437–440.

- Lee, E., Salic, A., and Kirschner, M.W. (2001). **Physiological regulation of β -catenin stability by Tcf3 and CK1 ϵ .** *The Journal of cell biology* 154, 983–993.
- Lee, K.-H., Woo, K.-C., Kim, D.-Y., Kim, T.-D., Shin, J., Park, S.M., Jang, S.K., and Kim, K.-T. (2012). **Rhythmic Interaction between Period1 mRNA and hnRNP Q Leads to Circadian Time-Dependent Translation.** *Molecular and cellular biology*. 32, 717–728.
- Lee, K.-H., Kim, S.-H., Lee, H.-R., Kim, W., Kim, D.-Y., Shin, J.-C., Yoo, S.-H., and Kim, K.-T. (2013). **MicroRNA-185 oscillation controls circadian amplitude of mouse Cryptochrome 1 via translational regulation.** *Molecular biology of the cell* 24, 2248–2255.
- Lee, K.-H., Kim, S.-H., Kim, H.-J., Kim, W., Lee, H.-R., Jung, Y., Choi, J.-H., Hong, K.Y., Jang, S.K., and Kim, K.-T. (2014). **AUF1 contributes to Cryptochrome1 mRNA degradation and rhythmic translation.** *Nucleic acids research* 42, 3590–3606.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). **MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization.** *The EMBO journal* 21, 4663–4670.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). **The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.** *Nature* 425, 415–419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *The EMBO journal* 23, 4051–4060.
- Leonardos, L., Butler, L., Hewett, P., Zalewski, P., Cowled, P., Potten, C.S., Wilson, J.W., Booth, C., Ikenaga, M., Takano, Y., et al. (1999). **The activity of caspase-3-like proteases is elevated during the development of colorectal carcinoma.** *Cancer letters* 143, 29–35.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). **Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.** *Cell* 120, 15–20.
- Li, J.Q., Miki, H., Ohmori, M., Wu, F., and Funamoto, Y. (2001). **Expression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 correlates with metastasis and prognosis in colorectal carcinoma.** *Human pathology* 32, 945–953.
- Li, J.-Q., Kubo, A., Wu, F., Usuki, H., Fujita, J., Bandoh, S., Masaki, T., Saoo, K., Takeuchi, H., Kobayashi, S., et al. (2003). **Cyclin B1, unlike cyclin G1, increases significantly during colorectal carcinogenesis and during later metastasis to lymph nodes.** *International journal of oncology* 22, 1101–1110.
- Li, S., Wang, M., Ao, X., Chang, A.K., Yang, C., Zhao, F., Bi, H., Liu, Y., Xiao, L., and Wu, H. (2013). **CLOCK is a substrate of SUMO and sumoylation of CLOCK upregulates the transcriptional activity of estrogen receptor- α .** *Oncogene* 32, 4883–4891.
- Lindqvist, A., Källström, H., Lundgren, A., Barsoum, E., and Rosenthal, C.K. (2005). **Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome.** *The Journal of cell biology* 171, 35–45.
- Liu, L., Chen, L., Xu, Y., Li, R., and Du, X. (2010). **microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells.** *Biochemical and biophysical research communications* 400, 236–240.
- Liu, W., Bulgaru, A., Haigentz, M., Stein, C.A., Perez-Soler, R., and Mani, S. (2003). **The BCL2-family of protein ligands as cancer drugs: the next generation of therapeutics.** *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents* 3, 217–223.
- López, I., P Oliveira, L., Tucci, P., Alvarez-Valín, F., A Coudry, R., and Marín, M. (2012). **Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer.** *Gene* 499, 81–87.

- Louafi, F., Martinez-Nunez, R.T., and Sanchez-Elsner, T. (2010). **MicroRNA-155 targets SMAD2 and modulates the response of macrophages to transforming growth factor β** . *The Journal of biological chemistry* 285, 41328–41336.
- Lu, G., Sun, Y., An, S., Xin, S., Ren, X., Zhang, D., Wu, P., Liao, W., Ding, Y., and Liang, L. (2015). **MicroRNA-34a targets FMNL2 and E2F5 and suppresses the progression of colorectal cancer**. *Experimental and molecular pathology* 99, 173–179.
- Lundberg, A.S., and Weinberg, R.A. (1998). **Functional Inactivation of the Retinoblastoma Protein Requires Sequential Modification by at Least Two Distinct Cyclin-cdk Complexes**. *Molecular and cellular biology* 18, 753–761.
- Lutgens, M., van Oijen, M., Mooiweer, E., van der Valk, M., Vleggaar, F., Siersema, P., and Oldenburg, B. (2014). **A risk-profiling approach for surveillance of inflammatory bowel disease-colorectal carcinoma is more cost-effective: a comparative cost-effectiveness analysis between international guidelines**. *Gastrointestinal endoscopy* 80, 842–848.
- Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D., Teruya-Feldstein, J., Reinhardt, F., Onder, T.T., Valastyan, S., et al. (2010). **miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis**. *Nature cell biology* 12, 247–256.
- Ma, Q., Wang, X., Li, Z., Li, B., Ma, F., Peng, L., Zhang, Y., Xu, A., and Jiang, B. (2013). **microRNA-16 represses colorectal cancer cell growth in vitro by regulating the p53/survivin signaling pathway**. *Oncology Reports* 29, 1652–1658.
- Madesh, M., Antonsson, B., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., and Hajnóczky, G. (2002). **Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization**. *The Journal of biological chemistry* 277, 5651–5659.
- Magnone, M.C., Langmesser, S., Bezdek, A.C., Tallone, T., Rusconi, S., and Albrecht, U. (2014). **The Mammalian circadian clock gene per2 modulates cell death in response to oxidative stress**. *Frontiers in Neurology* 5, 289.
- Maier, B., and Kramer, A. (2013). **A NONO-gate times the cell cycle**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 1565–1566.
- Maier, B., Wendt, S., Vanselow, J.T., Wallach, T., Reischl, S., Oehmke, S., Schlosser, A., and Kramer, A. (2009). **A large-scale functional RNAi screen reveals a role for CK2 in the mammalian circadian clock**. *Genes & development* 23, 708–718.
- Mailand, N., Podtelejnikov, A. V, Groth, A., Mann, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2002). **Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability**. *The EMBO journal* 21, 5911–5920.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). **Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm**. *Nature reviews. Cancer* 9, 153–166.
- Massagué, J. (2004). **G1 cell-cycle control and cancer**. *Nature* 432, 298–306.
- Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F., and Okamura, H. (2003). **Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo**. *Science* 302, 255–259.
- Mazzoccoli, G., Colangelo, T., Panza, A., Rubino, R., De Cata, A., Tiberio, C., Valvano, M.R., Paziienza, V., Merla, G., Augello, B., et al. (2016). **Deregulated expression of cryptochrome genes in human colorectal cancer**. *Molecular cancer* 15, 6.
- McKay, J.A., Douglas, J.J., Ross, V.G., Curran, S., Loane, J.F., Ahmed, F.Y., Cassidy, J., McLeod, H.L., and

- Murray, G.I. (2002). **Analysis of key cell-cycle checkpoint proteins in colorectal tumours.** *The Journal of Pathology* 196, 386–393.
- Méndez, J., Zou-Yang, X.H., Kim, S.-Y., Hidaka, M., Tansey, W.P., and Stillman, B. (2002). **Human Origin Recognition Complex Large Subunit Is Degraded by Ubiquitin-Mediated Proteolysis after Initiation of DNA Replication.** *Molecular cell* 9, 481–491.
- Mendoza, J. (2007). **Circadian clocks: setting time by food.** *Journal of neuroendocrinology* 19, 127–137.
- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S.T., and Patel, T. (2007). **MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer.** *Gastroenterology* 133, 647–658.
- Meyer-Bernstein, E.L., and Morin, L.P. (1996). **Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 2097–2111.
- Mieda, M., Ono, D., Hasegawa, E., Okamoto, H., Honma, K.-I., Honma, S., Sakurai, T., Aida, R., Moriya, T., Araki, M., et al. (2015). **Cellular clocks in AVP neurons of the SCN are critical for interneuronal coupling regulating circadian behavior rhythm.** *Neuron* 85, 1103–1116.
- Miki, T., Matsumoto, T., Zhao, Z., and Lee, C.C. (2013). **p53 regulates Period2 expression and the circadian clock.** *Nature communications* 4, 2444.
- Miller, B.H., McDearmon, E.L., Panda, S., Hayes, K.R., Zhang, J., Andrews, J.L., Antoch, M.P., Walker, J.R., Esser, K.A., Hogenesch, J.B., et al. (2007). **Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 3342–3347.
- Mistlberger, R.E., and Antle, M.C. (2011). **Entrainment of circadian clocks in mammals by arousal and food.** *Essays In Biochemistry* 49, 119–136.
- Mitchell, M.I., and Engelbrecht, A.-M. (2015). **Circadian Rhythms and Breast Cancer: The Role of Per2 in Doxorubicin-Induced Cell Death.** *Journal of toxicology* 2015, 392360.
- Mitsui, S., Yamaguchi, S., Matsuo, T., Ishida, Y., and Okamura, H. (2001). **Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism.** *Genes & development* 15, 995–1006.
- Mohawk, J.A., Green, C.B., and Takahashi, J.S. (2012). **Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals.** *Annual Review of Neuroscience* 35, 445–462.
- Moore, R.Y., and Eichler, V.B. (1972). **Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat.** *Brain Research* 42, 201–206.
- Moore, R.Y., Speh, J.C., and Card, J.P. (1995). **The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells.** *The Journal of comparative neurology* 352, 351–366.
- Moretti, F., Kaiser, C., Zdanowicz-Specht, A., and Hentze, M.W. (2012). **PABP and the poly(A) tail augment microRNA repression by facilitated miRISC binding.** *Nature structural & molecular biology* 19, 603–608.
- Murakami, Y., Higashi, Y., Matsunaga, N., Koyanagi, S., Ohdo, S., Lévi, F., Hrushesky, W.J., Lis, C.G., Grutsch, J.F., Wood, P., et al. (2008). **Circadian clock-controlled intestinal expression of the multidrug-resistance gene *mdr1a* in mice.** *Gastroenterology* 135, 1636–1644.e3.
- Na, Y.J., Sung, J.H., Lee, S.C., Lee, Y.J., Choi, Y.J., Park, W.Y., Shin, H.S., and Kim, J.H. (2009). **Comprehensive analysis of microRNA-mRNA co-expression in circadian rhythm.** *Experimental & molecular medicine* 41, 638–647.

- Nagata, S. (1999). **Fas ligand-induced apoptosis**. *Annual review of genetics* 33, 29–55.
- Nagel, R., le Sage, C., Diosdado, B., van der Waal, M., Oude Vrielink, J. a F., Bolijn, A., Meijer, G. a, and Agami, R. (2008). **Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer**. *Cancer research* 68, 5795–5802.
- Nagel, R., Clijsters, L., and Agami, R. (2009). **The miRNA-192/194 cluster regulates the Period gene family and the circadian clock**. *FEBS journal* 276, 5447–5455.
- Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., Chen, D., Guarente, L.P., and Sassone-Corsi, P. (2008). **The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control**. *Cell* 134, 329–340.
- Narducci, F., Bassotti, G., Gaburri, M., and Morelli, A. (1987). **Twenty four hour manometric recording of colonic motor activity in healthy man**. *Gut* 28, 17–25.
- Nishimura, J., Handa, R., Yamamoto, H., Tanaka, F., Shibata, K., Mimori, K., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikeda, M., Sekimoto, M., et al. (2012). **microRNA-181a is associated with poor prognosis of colorectal cancer**. *Oncology Reports* 28, 2221–2226.
- Nishitani, H., and Lygerou, Z. (2002). **Control of DNA replication licensing in a cell cycle**. *Genes Cells* 7, 523–534.
- Nottrott, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). **Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes**. *Nature structural & molecular biology* 13, 1108–1114.
- Nozoe, T., Inutsuka, S., Honda, M., Ezaki, T., and Korenaga, D. (2004). **Clinicopathologic significance of cyclin A expression in colorectal carcinoma**. *Journal of experimental & clinical cancer research* 23, 127–133.
- O’Connell, R.M., Chaudhuri, A.A., Rao, D.S., and Baltimore, D. (2009). **Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106, 7113–7118.
- Oda, A., Katayose, Y., Yabuuchi, S., Yamamoto, K., Mizuma, M., Shirasou, S., Onogawa, T., Ohtsuka, H., Yoshida, H., Hayashi, H., et al. (2009). **Clock gene mouse period2 overexpression inhibits growth of human pancreatic cancer cells and has synergistic effect with cisplatin**. *Anticancer research* 29, 1201–1209.
- Oishi, K., Koyanagi, S., and Ohkura, N. (2011). **Circadian mRNA expression of coagulation and fibrinolytic factors is organ-dependently disrupted in aged mice**. *Experimental gerontology* 46, 994–999.
- Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y., and Lai, E.C. (2008). **The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3’ UTR evolution**. *Nature structural & molecular biology* 15, 354–363.
- Opperhuizen, A.-L., van Kerkhof, L.W.M., Proper, K.I., Rodenburg, W., and Kalsbeek, A. (2015). **Rodent models to study the metabolic effects of shiftwork in humans**. *Frontiers in pharmacology* 6, 50.
- Paladino, N., Mul Fedele, M.L., Duhart, J.M., Marpegan, L., and Golombek, D.A. (2014). **Modulation of mammalian circadian rhythms by tumor necrosis factor- α** . *Chronobiology international* 31, 668–679.
- Pan, X., Terada, T., Irie, M., Saito, H., Inui, K.-I., Adibi, S., Ahmad, A., Guzder, R., Wallace, A., Thomas, J., et al. (2002). **Diurnal rhythm of H⁺-peptide cotransporter in rat small intestine**. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 283, G57–G64.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., and Hogenesch, J.B. (2002). **Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian**

Clock. *Cell* 109, 307–320.

Park, S.Y., Lee, J.H., Kim, H.Y., Yoon, K.H., Park, S.K., and Chang, M.S. (2014). **Differential expression of apoptosis-related factors induces the age-related apoptosis of the gracilis muscle in humans.** *International journal of molecular medicine* 33, 1110–1116.

Park, Y.R., Lee, S.T., Kim, S.L., Liu, Y.C., Lee, M.R., Shin, J.H., Seo, S.Y., Kim, S.H., Kim, I.H., Lee, S.O., et al. (2016). **MicroRNA-9 suppresses cell migration and invasion through downregulation of TM4SF1 in colorectal cancer.** *International journal of oncology* 48, 2135–2143.

Partch, C.L., Shields, K.F., Thompson, C.L., Selby, C.P., and Sancar, A. (2006). **Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10467–10472.

Pasquinelli, A.E. (2012). **MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship.** *Nature reviews. Genetics* 13, 271–282.

Perry, J.A., and Kornbluth, S. (2007). **Cdc25 and Wee1: analogous opposites?** *Cell division* 2, 12.

Perry, J.E., Grossmann, M.E., and Tindall, D.J. (1998). **Epidermal growth factor induces cyclin D1 in a human prostate cancer cell line.** *Prostate* 35, 117–124.

van den Pol, A.N., and Dudek, F.E. (1993). **Cellular communication in the circadian clock, the suprachiasmatic nucleus.** *Neuroscience* 56, 793–811.

Potten, C.S., Al-Barwari, S.E., Hume, W.J., and Searle, J. (1977). **Circadian rhythms of presumptive stem cells in three different epithelia of the mouse.** *Cell and tissue kinetics* 10, 557–568.

Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1992). **APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis.** *Nature* 359, 235–237.

Pryczynicz, A., Gryko, M., Niewiarowska, K., Cepowicz, D., Ustymowicz, M., Kemon, A., and Guzińska-Ustymowicz, K. (2014). **Bax protein may influence the invasion of colorectal cancer.** *World journal of gastroenterology* 20, 1305–1310.

Qandeel, H.G., Duenes, J.A., Zheng, Y., and Sarr, M.G. (2009). **Diurnal expression and function of peptide transporter 1 (PEPT1).** *The Journal of surgical research* 156, 123–128.

Qin, S., Zhu, Y., Ai, F., Li, Y., Bai, B., Yao, W., and Dong, L. (2014). **MicroRNA-191 correlates with poor prognosis of colorectal carcinoma and plays multiple roles by targeting tissue inhibitor of metalloprotease 3.** *Neoplasia* 61, 27–34.

Qu, Y.-L., Wang, H.-F., Sun, Z.-Q., Tang, Y., Han, X.-N., Yu, X.-B., and Liu, K. (2015). **Up-regulated miR-155-5p promotes cell proliferation, invasion and metastasis in colorectal carcinoma.** *International journal of clinical and experimental pathology* 8, 6988–6994.

Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., and Menaker, M. (1990). **Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period.** *Science* 247, 975–978.

Ralston, R.D., Bilotta, J., and Petry, H.M. (2004). **Circadian Cycles of Caspase-3 Activation in Zebrafish Cone Photoreceptors.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45, 5287–5287.

Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bentwich, Z., and Oren, M. (2007). **Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis.** *Molecular cell* 26, 731–743.

Reghunandanan, V., Reghunandanan, R., and Mahajan, K.K. (1998). **Arginine vasopressin as a neurotransmitter in brain.** *Indian journal of experimental biology* 36, 635–643.

- Reguart, N., He, B., Taron, M., You, L., Jablons, D.M., and Rosell, R. (2005). **The role of Wnt signaling in cancer and stem cells.** *Future oncology* 1, 787–797.
- Reid, J.F., Sokolova, V., Zoni, E., Lampis, A., Pizzamiglio, S., Bertan, C., Zanutto, S., Perrone, F., Camerini, T., Gallino, G., et al. (2012). **miRNA profiling in colorectal cancer highlights miR-1 involvement in MET-dependent proliferation.** *Molecular Cancer Research* 10, 504–515.
- Reppert, S., and Weaver, D. (2001). **Molecular analysis of mammalian circadian rhythms.** *Annual Review of Physiology* 63, 647–676.
- Reppert, S.M., and Weaver, D.R. (2002). **Coordination of circadian timing in mammals.** *Nature* 418, 935–941.
- Rex, D.K., Lehman, G.A., Ulbright, T.M., Smith, J.J., Pound, D.C., Hawes, R.H., Helper, D.J., Wiersema, M.J., Langefeld, C.D., and Li, W. (1993). **Colonic neoplasia in asymptomatic persons with negative fecal occult blood tests: influence of age, gender, and family history.** *The American journal of gastroenterology* 88, 825–831.
- Rhoads, D.B., Rosenbaum, D.H., Unsal, H., Isselbacher, K.J., and Levitsky, L.L. (1998). **Circadian Periodicity of Intestinal Na⁺/Glucose Cotransporter 1 mRNA Levels Is Transcriptionally Regulated.** *The Journal of biological chemistry* 273, 9510–9516.
- Ripperger, J.A., Shearman, L.P., Reppert, S.M., and Schibler, U. (2000). **CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP.** *Genes & development* 14, 679–689.
- Risio, M., Coverlizza, S., Ferrari, A., Candelaresi, G.L., and Rossini, F.P. (1988). **Immunohistochemical study of epithelial cell proliferation in hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the large bowel.** *Gastroenterology* 94, 899–906.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). **Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units.** *Genome research* 14, 1902–1910.
- van Rooij, E., Kauppinen, S., Aalbers, C., Tak, P., Vervoordeldonk, M., Ambros, V., Babar, I., Cheng, C., Booth, C., Liang, X., et al. (2014). **Development of microRNA therapeutics is coming of age.** *EMBO molecular medicine* 6, 851–864.
- Rosenblatt, J., Gu, Y., and Morgan, D.O. (1992). **Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 2824–2828.
- Rutter, J., Reick, M., Wu, L.C., and McKnight, S.L. (2001). **Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors.** *Science* 293, 510–514.
- Ryu, B.K., Lee, M.G., Chi, S.G., Kim, Y.W., and Park, J.H. (2001). **Increased expression of cFLIP(L) in colonic adenocarcinoma.** *The Journal of Pathology* 194, 15–19.
- Sabath, E., Salgado-Delgado, R., Guerrero-Vargas, N.N., Guzman-Ruiz, M.A., del Carmen Basualdo, M., Escobar, C., and Buijs, R.M. (2014). **Food entrains clock genes but not metabolic genes in the liver of suprachiasmatic nucleus lesioned rats.** *FEBS Letters* 588, 3104–3110.
- Saetrom, P., Heale, B.S.E., Snøve, O., Aagaard, L., Alluin, J., and Rossi, J.J. (2007). **Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity.** *Nucleic acids research* 35, 2333–2342.
- Saini, H.K., Griffiths-Jones, S., and Enright, A.J. (2007). **Genomic analysis of human microRNA transcripts.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17719–17724.

- Saito, M., Murakami, E., Nishida, T., Fujisawa, Y., and Suda, M. (1975). **Circadian rhythms in digestive enzymes in the small intestine of rats. I. Patterns of the rhythms in various regions of the small intestine.** *Journal of biochemistry* 78, 475–480.
- Sakamoto, W., and Takenoshita, S. (2015). **Overexpression of both CLOCK and BMAL1 inhibits entry to S phase in human colon cancer cells.** *Fukushima journal of medical science* 61, 111–124.
- Sakamoto, K., Oishi, K., Shiraishi, M., Hamano, S., Otsuka, H., Miyake, Y., and Ishida, N. (2000). **Two circadian oscillatory mechanisms in the mammalian retina.** *Neuroreport* 11, 3995–3997.
- Sato, F., Nagata, C., Liu, Y., Suzuki, T., Kondo, J., Morohashi, S., Imaizumi, T., Kato, Y., and Kijima, H. (2009). **PERIOD1 is an anti-apoptotic factor in human pancreatic and hepatic cancer cells.** *Journal of biochemistry* 146, 833–838.
- Savvidis, C., and Koutsilieris, M. (2012). **Circadian rhythm disruption in cancer biology.** *Molecular medicine* 18, 1249–1260.
- Scaffidi, C., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999a). **Isolation and analysis of components of CD95 (APO-1/Fas) death-inducing signaling complex.** *Methods* 17, 287–291.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999b). **The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis.** *The Journal of biological chemistry* 274, 1541–1548.
- Shende, V.R., Neuendorff, N., and Earnest, D.J. (2013). **Role of miR-142-3p in the post-transcriptional regulation of the clock gene Bmal1 in the mouse SCN.** *PLoS one* 8, e65300.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). **CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.** *Genes & development* 13, 1501–1512.
- Shiama, N. (1997). **The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin.** *Trends in cell biology* 7, 230–236.
- Shibuya, H., Iinuma, H., Shimada, R., Horiuchi, A., and Watanabe, T. (2010). **Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer.** *Oncology* 79, 313–320.
- Schernhammer, E.S., Laden, F., Speizer, F.E., Willett, W.C., Hunter, D.J., Kawachi, I., Fuchs, C.S., and Colditz, G.A. (2003). **Night-Shift Work and Risk of Colorectal Cancer in the Nurses' Health Study.** *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 95, 825–828.
- Scheving, L.A., Tsai, T.H., and Scheving, L.E. (1986). **Effect of thioacetamide on the incorporation of [3H]-thymidine into DNA of 13 tissues and on the mitotic index of the corneal epithelium of BD2F1 in male mice while taking into consideration circadian variation.** *Chronobiology international* 3, 1–15.
- Schmutz, I., Wendt, S., Schnell, A., Kramer, A., Mansuy, I.M., and Albrecht, U. (2011). **Protein phosphatase 1 (PP1) is a post-translational regulator of the mammalian circadian clock.** *PLoS one* 6, e21325.
- Siffroi-Fernandez, S., Dulong, S., Li, X.-M., Filipski, E., Gréchez-Cassiau, A., Peteri-Brünback, B., Meijer, L., Lévi, F., Teboul, M., and Delaunay, F. (2014). **Functional genomics identify Birc5/survivin as a candidate gene involved in the chronotoxicity of cyclin-dependent kinase inhibitors.** *Cell Cycle* 13, 984–991.
- Sládek, M., Rybová, M., Jindráková, Z., Zemanová, Z., Polidarová, L., Mrnka, L., O'Neill, J., Pácha, J., Sumová, A., Scheving, L.A., et al. (2007). **Insight Into the Circadian Clock Within Rat Colonic Epithelial Cells.** *Gastroenterology* 133, 1240–1249.
- Song, Y., and Jacob, C.O. (2005). **The mouse cell surface protein TOSO regulates Fas/Fas ligand-induced apoptosis through its binding to Fas-associated death domain.** *The Journal of biological chemistry* 280, 9618–9626.

- Soták, M., Polidarová, L., Musílková, J., Hock, M., Sumová, A., and Pácha, J. (2011). **Circadian regulation of electrolyte absorption in the rat colon.** *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 301, G1066–G1074.
- Soták, M., Polidarová, L., Ergang, P., Sumová, A., and Pácha, J. (2013). **An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors.** *International Journal of Cancer* 132, 1032–1041.
- Soták, M., Sumová, A., and Pácha, J. (2014). **Cross-talk between the circadian clock and the cell cycle in cancer.** *Annals of medicine* 1–12.
- Srinivasula, S.M., Datta, P., Fan, X.J., Fernandes-Alnemri, T., Huang, Z., and Alnemri, E.S. (2000). **Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway.** *The Journal of biological chemistry* 275, 36152–36157.
- Stark, G.R., and Taylor, W.R. (2006). **Control of the G2/M transition.** *Molecular biotechnology* 32, 227–248.
- Stawinska, M., Cygankiewicz, A., Trzcinski, R., Mik, M., Dziki, A., and Krajewska, W.M. (2008). **Alterations of Chk1 and Chk2 expression in colon cancer.** *International journal of colorectal disease* 23, 1243–1249.
- Stephan, F.K., and Zucker, I. (1972). **Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69, 1583–1586.
- Stevenson, N.R., Ferrigni, F., Parnicky, K., Day, S., and Fierstein, J.S. (1975). **Effect of changes in feeding schedule on the diurnal rhythms and daily activity levels of intestinal brush border enzymes and transport systems.** *Biochimica et biophysica acta* 406, 131–145.
- Stoian, M., State, N., Stoica, V., and Radulian, G. (2014). **Apoptosis in colorectal cancer.** *Journal of medicine and life* 7, 160–164.
- Stopa, E.G., King, J.C., Lydic, R., and Schoene, W.C. (1984). **Human brain contains vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide neuronal subpopulations in the suprachiasmatic region.** *Brain Research* 297, 159–163.
- Storch, K.-F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F.C., Wong, W.H., and Weitz, C.J. (2002). **Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart.** *Nature* 417, 78–83.
- Stroynowska-Czerwinska, A., Fiszer, A., and Krzyzosiak, W.J. (2014). **The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells.** *Cellular and molecular life sciences*
- Suzuki, T., Sato, F., Kondo, J., Liu, Y., Kusumi, T., Fujimoto, K., Kato, Y., Sato, T., and Kijima, H. (2008). **Period is involved in the proliferation of human pancreatic MIA-PaCa2 cancer cells by TNF- α .** *Biomedical research* 29, 99–103.
- Svec, J., Ergang, P., Mandys, V., Kment, M., and Pácha, J. (2010). **Expression profiles of proliferative and antiapoptotic genes in sporadic and colitis-related mouse colon cancer models.** *International journal of experimental pathology* 91, 44–53.
- Swaab, D.F., Fliers, E., and Partiman, T.S. (1985). **The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and senile dementia.** *Brain Research* 342, 37–44.
- Tahara, Y., Kuroda, H., Saito, K., Nakajima, Y., Kubo, Y., Ohnishi, N., Seo, Y., Otsuka, M., Fuse, Y., Ohura, Y., et al. (2012). **In Vivo Monitoring of Peripheral Circadian Clocks in the Mouse.** *Current biology* 22, 1029–1034.
- Takahashi, J.S. (2015). **Molecular components of the circadian clock in mammals.** *Diabetes, Obesity and*

Metabolism 17, 6–11.

Takahashi, J.S., Hong, H.-K., Ko, C.H., and McDearmon, E.L. (2008). **The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease.** *Nature reviews. Genetics* 9, 764–775.

Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N., and Fujii-Kuriyama, Y. (1998). **Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1 α , HLF, and clock.** *Biochemical and biophysical research communications* 248, 789–794.

Takemasa, I., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Ohue, M., Noura, S., Miyake, Y., Matsumoto, T., Aihara, T., Tomita, N., Tamaki, Y., et al. (2000). **Overexpression of CDC25B phosphatase as a novel marker of poor prognosis of human colorectal carcinoma.** *Cancer research* 60, 3043–3050.

Tamaru, T., Hattori, M., Honda, K., Nakahata, Y., Sassone-Corsi, P., van der Horst, G.T.J., Ozawa, T., and Takamatsu, K. (2015). **CRY Drives Cyclic CK2-Mediated BMAL1 Phosphorylation to Control the Mammalian Circadian Clock.** *PLoS biology* 13, e1002293.

Tan, X., Zhang, P., Zhou, L., Yin, B., Pan, H., and Peng, X. (2012). **Clock-controlled mir-142-3p can target its activator, Bmal1.** *BMC molecular biology* 13, 27.

Tan, X., Ye, H., Yang, K., Chen, D., and Tang, H. (2015). **Circadian rhythm variation of the clock genes Per1 and cell cycle related genes in different stages of carcinogenesis of buccal mucosa in animal model.** *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 50, 392–398.

Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., and Mori, H. (2003). **A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate.** *Cancer science* 94, 965–973.

Tavakkolizadeh, A., Berger, U. V, Shen, K.R., Levitsky, L.L., Zinner, M.J., Hediger, M.A., Ashley, S.W., Whang, E.E., Rhoads, D.B., Bellinger, L., et al. (2001). **Diurnal rhythmicity in intestinal SGLT-1 function, V(max), and mRNA expression topography.** *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 280, G209–G215.

Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M., and Nakagama, H. (2007). **Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 15472–15477.

Thibodeau, S.N., Bren, G., and Schaid, D. (1993). **Microsatellite instability in cancer of the proximal colon.** *Science* 260, 816–819.

Thornberry, N. a. (1998). **Caspases: Enemies Within.** *Science* (80-.). 281, 1312–1316.

Thorstensen, L., Qvist, H., Heim, S., Liefers, G.J., Nesland, J.M., Giercksky, K.E., and Lothe, R.A. (2000). **Evaluation of 1p losses in primary carcinomas, local recurrences and peripheral metastases from colorectal cancer patients.** *Neoplasia* 2, 514–522.

Timofeev, O., Cizmecioglu, O., Settele, F., Kempf, T., and Hoffmann, I. (2010). **Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition.** *The Journal of biological chemistry* 285, 16978–16990.

Toyota, M., Suzuki, H., Sasaki, Y., Maruyama, R., Imai, K., Shinomura, Y., and Tokino, T. (2008). **Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer.** *Cancer research* 68, 4123–4132.

Tsai, N.-P., Lin, Y.-L., & Wei, L.-N. (2009). **MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression.** *Biochemical Journal*, 424(3), 411–418.

- Tsikitis, V.L., White, I., Mori, M., Potter, A., Bhattacharyya, A., Hamilton, S.R., Buckmeier, J., Lance, P., and Thompson, P. (2014). **Differential expression of microRNA-320a, -145, and -192 along the continuum of normal mucosa to high-grade dysplastic adenomas of the colorectum.** *American journal of surgery* 207, 717–722; discussion 722.
- Tsuchiya, Y., Akashi, M., Matsuda, M., Goto, K., Miyata, Y., Node, K., and Nishida, E. (2009). **Involvement of the protein kinase CK2 in the regulation of mammalian circadian rhythms.** *Science signaling* 2, ra26.
- Um, J.H., Yang, S., Yamazaki, S., Kang, H., Viollet, B., Foretz, M., and Chung, J.H. (2007). **Activation of 5'-AMP-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase Iepsilon (CKIε)-dependent degradation of clock protein mPer2.** *The Journal of biological chemistry* 282, 20794–20798.
- Vilar, E., and Gruber, S.B. (2010). **Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence.** *Nature reviews. Clinical oncology* 7, 153–162.
- Virshup, D.M., Eide, E.J., Forger, D.B., Gallego, M., and Harnish, E.V. (2007). **Reversible Protein Phosphorylation Regulates Circadian Rhythms.** *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 72, 413–420.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). **Surfing the p53 network.** *Nature* 408, 307–310.
- Wang, A., Yoshimi, N., Ino, N., Tanaka, T., and Mori, H. (1997). **Overexpression of cyclin B1 in human colorectal cancers.** *Journal of cancer research and clinical oncology* 123, 124–127.
- Wang, Y., Qian, R., Sun, N., Lu, C., Chen, Z., and Hua, L. (2015). **Circadian gene hClock enhances proliferation and inhibits apoptosis of human colorectal carcinoma cells in vitro and in vivo.** *Molecular medicine* 11, 4204–4210.
- Wei, Q., Li, J., Liu, T., Tong, X., and Ye, X. (2013). **Phosphorylation of minichromosome maintenance protein 7 (MCM7) by cyclin/cyclin-dependent kinase affects its function in cell cycle regulation.** *The Journal of biological chemistry* 288, 19715–19725.
- Wiebking, N., Maronde, E., and Rami, A. (2013). **Increased neuronal injury in clock gene Per-1 deficient-mice after cerebral ischemia.** *Current neurovascular research* 10, 112–125.
- Woo, K.C., Kim, T.D., Lee, K.H., Kim, D.Y., Kim, W., Lee, K.Y., and Kim, K.T. (2009). **Mouse period 2 mRNA circadian oscillation is modulated by PTB-mediated rhythmic mRNA degradation.** *Nucleic acids research* 37, 26–37.
- Woo, K.-C., Ha, D.-C., Lee, K.-H., Kim, D.-Y., Kim, T.-D., and Kim, K.-T. (2010). **Circadian Amplitude of Cryptochrome 1 Is Modulated by mRNA Stability Regulation via Cytoplasmic hnRNP D Oscillation.** *Molecular and cellular biology* 30, 197–205.
- Wood, P.A., Yang, X., Taber, A., Oh, E.-Y., Ansell, C., Ayers, S.E., Al-Assaad, Z., Carnevale, K., Berger, F.G., Pena, M.M.O., et al. (2008). **Period 2 Mutation Accelerates ApcMin/+ Tumorigenesis.** *Molecular Cancer Research* 6, 1786–1793.
- Wu, J., Qian, J., Li, C., Kwok, L., Cheng, F., Liu, P., Perdomo, C., Kotton, D., Vaziri, C., Anderlind, C., et al. (2010). **miR-129 regulates cell proliferation by downregulating Cdk6 expression.** *Cell Cycle* 9, 1809–1818.
- Wu, L., Liu, Y., and Kong, D. (2014). **Mechanism of chromosomal DNA replication initiation and replication fork stabilization in eukaryotes.** *Science China. Life sciences* 57, 482–487.
- Wu, M.-W., Xian, L.-J., Li, X.-M., Pasquale, I., and Francis, L. (2004). **Circadian expression of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, c-myc and p53 mRNA in mouse liver tissue.** *Ai Zheng* 23, 235–242.

- Xiong, B., Cheng, Y., Ma, L., and Zhang, C. (2013). **MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells.** *International journal of oncology* 42, 219–228.
- Xu, S., Witmer, P.D., Lumayag, S., Kovacs, B., and Valle, D. (2007). **MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster.** *The Journal of biological chemistry* 282, 25053–25066.
- Yamakuchi, M., Ferlito, M., and Lowenstein, C.J. (2008). **miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 13421–13426.
- Yang, W.S., and Stockwell, B.R. (2008). **Inhibition of casein kinase 1 ϵ induces cancer-cell-selective, PERIOD2-dependent growth arrest.** *Genome biology* 9, R92.
- Yang, X., Wood, P.A., Ansell, C.M., Ohmori, M., Oh, E.-Y., Xiong, Y., Berger, F.G., Peña, M.M.O., and Hrushesky, W.J.M. (2009). **β -catenin induces β -TrCP-mediated PER2 degradation altering circadian clock gene expression in intestinal mucosa of ApcMin/+ mice.** *Journal of biochemistry* 145, 289–297.
- Yasui, W., Kuniyasu, H., Yokozaki, H., Semba, S., Shimamoto, F., and Tahara, E. (1996). **Expression of cyclin E in colorectal adenomas and adenocarcinomas: correlation with expression of Ki-67 antigen and p53 protein.** *Virchows Archive* 429, 13–19.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). **Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs.** *Genes & development* 17, 3011–3016.
- You, J., Li, Y., Fang, N., Liu, B., Zu, L., Chang, R., Li, X., and Zhou, Q. (2014). **MiR-132 suppresses the migration and invasion of lung cancer cells via targeting the EMT regulator ZEB2.** *PloS one* 9, e91827.
- Young, M.E., Razeghi, P., and Taegtmeier, H. (2001). **Clock genes in the heart: characterization and attenuation with hypertrophy.** *Circulation research* 88, 1142–1150.
- Yu, H., Meng, X., Wu, J., Pan, C., Ying, X., Zhou, Y., Liu, R., and Huang, W. (2013). **Cryptochrome 1 Overexpression Correlates with Tumor Progression and Poor Prognosis in Patients with Colorectal Cancer.** *PloS one* 8, e61679.
- Zavadil, J., and Böttinger, E.P. (2005). **TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions.** *Oncogene* 24, 5764–5774.
- Zekri, L., Kuzuoğlu-Öztürk, D., and Izaurralde, E. (2013). **GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation.** *The EMBO journal* 32, 1052–1065.
- Zeng, Z.-L., Wu, M.-W., Sun, J., Sun, Y.-L., Cai, Y.-C., Huang, Y.-J., and Xian, L.-J. (2010). **Effects of the biological clock gene Bmal1 on tumour growth and anti-cancer drug activity.** *Journal of biochemistry* 148, 319–326.
- Zhanfeng, N., Yanhui, L., Zhou, F., Shaocai, H., Guangxing, L., and Hechun, X. (2015). **Circadian genes Per1 and Per2 increase radiosensitivity of glioma in vivo.** *Oncotarget* 6, 9951–9958.
- Zhang, W., Wang, P., Chen, S., Zhang, Z., Liang, T., and Liu, C. (2016). **Rhythmic expression of miR-27b-3p targets the clock gene Bmal1 at the posttranscriptional level in the mouse liver.** *The FASEB journal*
- Zhao, P., Hu, Y.-C., and Talbot, I.C. (2003). **Expressing patterns of p16 and CDK4 correlated to prognosis in colorectal carcinoma.** *World journal of gastroenterology* 9, 2202–2206.
- Zhao, X., Zhu, X., Cheng, S., Xie, Y., Wang, Z., Liu, Y., Jiang, Z., Xiao, J., Guo, H., and Wang, Y. (2014). **MiR-29a/b/c regulate human circadian gene hPER1 expression by targeting its 3'UTR.** *Acta biochimica et biophysica Sinica* (Shanghai). 46, 313–317.

Zhou, Y.J., Xie, Y.T., Gu, J., Yan, L., Guan, G.X., Liu, X., Rim, S.H., Seeff, L., Ahmed, F., al., et, et al. (2011). **Overexpression of cyclin E isoforms correlates with poor prognosis in rectal cancer.** *European journal of surgical oncology* 37, 1078–1084.

Zipprich, J.T., Bhattacharyya, S., Mathys, H., and Filipowicz, W. (2009). **Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression.** *RNA* 15, 781–793.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). **An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9.** *The Journal of biological chemistry* 274, 11549–11556.

Zuber, A.M., Centeno, G., Pradervand, S., Nikolaeva, S., Maquelin, L., Cardinaux, L., Bonny, O., and Firsov, D. (2009). **Molecular clock is involved in predictive circadian adjustment of renal function.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16523–16528.

10 Dodatky

10.1 Dodatek č. 1 – Souhrnná tabulka všech provedených analýz u mRNA

Výsledky	1-way ANOVA			kosinorová analýza					
	10W	E	N	10W	E	N			
<i>Tef</i>	0,016	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001			
<i>Dbp</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001			
<i>Ccnd1</i>	0,255	0,003	0,705		0,239				
<i>Ccne1</i>	0,033	0,010	0,083	0,023	0,001				
<i>Ccna1</i>	0,015	0,079	0,745	0,011					
<i>Ccnb1</i>	0,006	0,064	0,582	0,000					
<i>Casp3</i>	0,035	0,259	0,645	0,029					
<i>Bcl2</i>	0,016	0,402	0,471	0,003					
<i>Bad</i>	0,297	0,367	0,227						
Výsledky	2-way ANOVA: E vs. N			post hoc Fisherův LSD test: E vs N					
	čas	tkáň	interakce	0	4	8	12	16	20
<i>Tef</i>	0,000	0,000	0,000	ns	**	***	***	**	ns
<i>Dbp</i>	0,000	0,000	0,000	ns	**	***	**	ns	ns
<i>Ccnd1</i>	0,796	0,000	0,510	ns	ns	**	ns	ns	ns
<i>Ccne1</i>	0,031	0,270	0,001	ns	ns	ns	**	ns	ns
<i>Ccna1</i>	0,015	0,000	0,021	***	***	ns	*	***	***
<i>Ccnb1</i>	0,073	0,019	0,055	*	ns	ns	ns	ns	*
<i>Casp3</i>	0,070	0,000	0,113	***	***	**	*	***	***
<i>Bcl2</i>	0,090	0,000	0,252	ns	**	**	*	*	*
<i>Bad</i>	0,352	0,000	0,234	***	***	**	***	**	***
Výsledky	2-way ANOVA: 10W vs. E			post hoc Fisherův LSD test: 10W vs E					
	čas	tkáň	interakce	0	4	8	12	16	20
<i>Tef</i>	0,000	0,136	0,313	ns	ns	ns	**	ns	ns
<i>Dbp</i>	0,000	0,037	0,042	ns	ns	***	ns	ns	ns
<i>Ccnd1</i>	0,027	0,003	0,003	ns	ns	***	ns	**	ns
<i>Ccne1</i>	0,000	0,001	0,053	ns	ns	ns	***	*	ns
<i>Ccna1</i>	0,036	0,000	0,009	***	***	ns	*	***	***
<i>Ccnb1</i>	0,008	0,284	0,023	ns	ns	ns	ns	ns	**
<i>Casp3</i>	0,140	0,000	0,060	**	*	ns	ns	**	***
<i>Bcl2</i>	0,007	0,002	0,588	ns	ns	*	*	ns	ns
<i>Bad</i>	0,725	0,000	0,127	ns	**	ns	**	ns	**

10.2 Dodatek č. 2 – Souhrnná tabulka všech provedených analýz u miRNA

Výsledky	1-way ANOVA		kosinorová analýza		2-way ANOVA: E vs. N		
	E	N	E	N	čas	tkáň	interakce
miR-1-3p	0,001	0,783	0,014		0,031	0,000	0,028
miR-16-5p	0,065	0,097	0,036		0,253	0,000	0,091
miR-34a-5p	0,002	0,634	0,091		0,015	0,000	0,000
miR-155-5p	0,325	0,182			0,144	0,001	0,067
miR-192-3p	0,256	0,007		0,102	0,334	0,000	0,449
post hoc Fisherův LSD test: E vs N							
Výsledky	0	4	8	12	16	20	24
miR-1-3p	ns	ns	ns	*	***	ns	ns
miR-16-5p	ns	ns	*	**	***	ns	ns
miR-34a-5p	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns
miR-155-5p	ns	ns	***	ns	ns	ns	**
miR-192-3p	ns	*	***	ns	ns	ns	ns