

Usporedba metoda za izolaciju RNA iz uzoraka egzosoma bolesnika s kolorektalnim karcinomom

Borović, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:683612>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Marko Borović

**Usporedba metoda za izolaciju RNA iz uzoraka
egzosoma bolesnika s kolorektalnim karcinomom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Andree Huline Tomašković.

Iskoristio bih ovu priliku da se zahvalim mentorici doc.dr.sc. Andrei Hulini Tomašković na stručnoj pomoći, zalaganju i prije svega strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Dragim prijateljima i kolegama neizmjereno hvala na divnim uspomnama.

Hvala ti što si bila uz mene.

Posebno bih se volio zahvaliti roditeljima koji su mi od prvog dana pružili potrebno povjerenje, podršku i poticali me da naučim slijediti svoje snove te mi nikada nisu dopustili da posustanem u tome. Bez vas ovo ne bi bilo moguće.

Rad je financiran sredstvima projekta IP-2019-04-4624 Hrvatske zaklade za znanost.



Rad je podržan sredstvima projekta FarmInova (KK.01.1.1.02.0021) financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	EGZOSOMI	1
1.2.	METODE IZOLACIJE EGZOSOMA.....	2
1.3.	RNA I miRNA U EGZOSOMIMA	3
1.4.	KOLOREKTALNI KARCINOM (CRC).....	4
1.5.	GENSKE MUTACIJE CRC-a.....	5
1.6.	DIJAGNOSTIKA CRC-a.....	8
1.7.	TEKUĆA BIOPSIJA.....	9
2.	OBRAZLOŽENJE TEME	10
3.	MATERIJALI I METODE	11
3.1.	VAĐENJE KRVI PACIJENTIMA I PRIPREMA ZA IZOLACIJU EGZOSOMA	11
3.2.	IZOLACIJA EGZOSOMA METODOM QIAGEN (Q).....	11
3.3.	IZOLACIJA EGZOSOMA METODOM THERMOFISHER INVITROGEN (TF)	12
3.4.	IZOLACIJA RNA METODOM QIAGEN.....	14
3.5.	IZOLACIJA RNA METODOM THERMOFISHER (INVITROGEN) (TF)	15
3.6.	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE I INTEGRITETA RNA.....	17
3.7.	ANALIZA EKSPRESIJE GENA ZA BB2M I PPIA U UZORCIMA RNA IZOLIRANE METODAMA Q I TF	18
3.8.	ANALIZA EKSPRESIJE miRNA U UZORCIMA RNA IZOLIRANE METODAMA Q I TF	20
3.8.1.	REVERZNA TRANSKRIPCija.....	20
3.8.2.	REAKCIJA qPCR-a	21
3.9.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	22
4.	REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1.	KONCENTRACIJA RNA IZOLIRANA IZ EGZOSOMA POMOĆU DVIJE RAZLIČITE METODE (Q I TF).....	23
4.2.	ANALIZA KVALITETE I INTEGRITETA RNA	24
4.3.	USPOREDBA EKSPRESIJE RNA REFERENTNIH GENA IZ UZORAKA IZOLIRANIH IZ EGZOSOMA METODAMA Q I TF.....	25
4.4.	USPOREDBA EKSPRESIJE miRNA U UZORCIMA RNA IZ EGZOSOMA IZOLIRANIH METODAMA Q I TF.....	27
4.5.	RASPRAVA.....	30
5.	ZAKLJUČAK	33
6.	POPIS KRATICA	35
7.	LITERATURA	37
8.	SAŽETAK/SUMMARY	41
8.1.	SAŽETAK.....	41
8.2.	SUMMARY	42

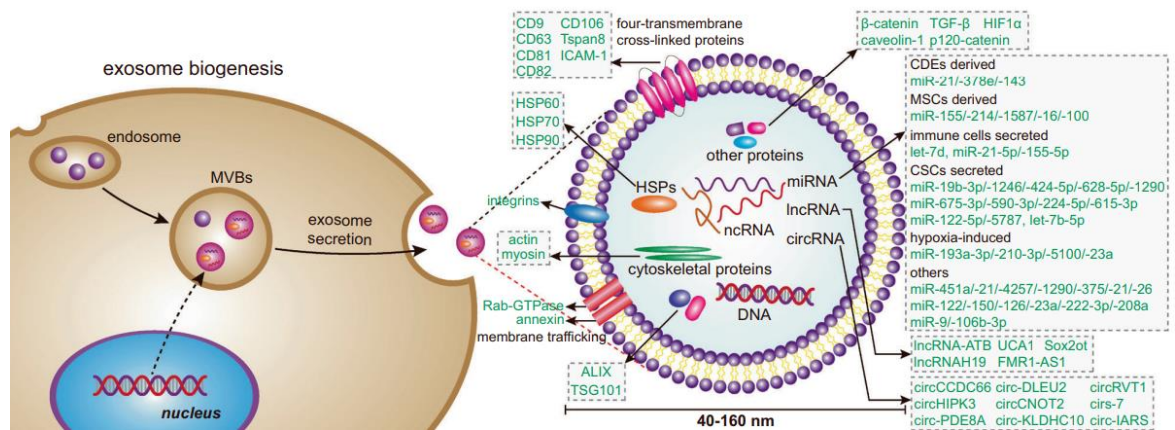
1. UVOD

1.1. EGZOSOMI

Proučavanje ekstracelularnih vezikula daje potencijal identificiranja nepoznatih molekularnih i staničnih mehanizama, kako u međustaničnoj komunikaciji, tako i u homeostazi organa i patoloških stanja. Upravo u skupinu ekstracelularnih jednomembranskih vezikula spadaju i egzosomi koji nastaju unutar endosomalnog sustava i čiji promjer varira između 30 i 200 nanometara (Pegtel i Gould, 2019). Daljnjim su istraživanjima ustanovljene njihove brojne i esencijalne fiziološke funkcije poput međustanične komunikacije, regeneracije tkiva, stanične signalizacije, razvoja tumora i metastaziranja te imunološkog odgovora (Verbanac i sur., 2021).

Biogeneza egzosoma započinje procesom koji uključuje dvostruku invaginaciju stanične membrane (Kalluri i S. LeBleu, 2020). Pritom se stvara lipidna vezikula, odnosno endosom koji invaginacijom svoje membrane može u sebe unijeti sadržaj staničnog citosola poput nukleinskih kiselina (DNA, RNA, miRNA, itd.) i proteina (Hsp70, Hsp60, itd.) koji postaju dio egzosoma. Slijedi spajanje endosoma s plazmatskom membranom i ekstracelularno otpuštanje egzosoma. Upravo biogeneza uvjetuje glavnu karakteristiku egzosoma, a to jest njihova heterogenost u veličini, sastavu i funkcijama. Metabolički su aktivni, što je ustanovljeno već u prvim opisima egzosoma kao osteogenske vezikule prepune enzima u ulozi koštane pregradnje. Neki od enzima unutar egzosoma su fosfataze, pirofosfataze, glukozidaze, glikotransferaze itd. Osim enzima, sadrže brojne molekule koje određuju njihovu funkciju poput citokinskih receptora, proteina toplinskog šoka (*Hsp*), *TNF* (engl. *Tumor necrosis factor*), *TGF-β* (engl. *Transforming growth factor β*), tetraspanina (*CD81*, *CD82*, *CD37*, *CD63*) i brojnih drugih (Pegtel i Gould, 2019) kako u unutrašnjosti tako i na površini.

Također, egzosomi eksprimiraju proteine iz skupine dipeptidil-peptidaza IV i matriks metaloproteinaza-9 koji su uključeni u remodeliranje ekstracelularnog matriksa te se povezuju s invazijom tumora i metastaziranjem. Osim u malignim stanicama, egzosomi se nalaze u brojnim tjelesnim tekućinama poput plazme, urina, sline, sinovijalne tekućine, majčinog mlijeka i sl. što dodatno naglašava njihovu važnost *in vivo* (Lässer i sur., 2011).



Slika 1. Biogeneza egzosoma (preuzeto od Dai i sur., 2020)

1.2. METODE IZOLACIJE EGZOSOMA

Izolacija egzosoma uvelike je stvarala probleme znanstvenicima naročito zbog njihove sličnosti sa staničnom membranom i heterogene prirode. Zbog razlike u veličini i afinitetu primjenjuju se brojne metode izolacije iz raznih tjelesnih tekućina ili supernatanta kulture stanica (Zhu i sur., 2020). Metode se razlikuju po njihovom ključnom mehanizmu te svaka prezentira određene prednosti i nedostatke. Neke od njih su ultracentrifugiranje i centrifugiranje, precipitacija, metode koje se temelje na gradijentu gustoće, imunoafinitetu, veličini i dr. (Doyle i Wang, 2019).

Ultracentrifugiranje je najkorištenija metoda izolacije koja učinkovito odvaja egzosome različitih veličina od staničnog debrisa iz različitih tjelesnih tekućina, no nedostatak metode leži u niskoj kvantiteti i kvaliteti prikupljenih egzosoma koji mogu biti oštećeni tijekom samog procesa. Ipak, centrifugiranje na temelju gradijenta gustoće predstavlja zlatni standard izolacije egzosoma zbog svoje jednostavnosti i veće količine izoliranih egzosoma visoke kvalitete. Njen nedostatak je dugotrajnost te značajna ovisnost o opremi (Zhu i sur., 2020).

Od ostalih metoda vrijedi spomenuti precipitaciju egzosoma polietilen-glikolom kao brzu i jednostavnu metodu te ELISA-u (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*) koja se temelji na imunokemijskoj reakciji specifičnog antitijela koje veže specifičan antigen na površini egzosoma. Naime, obje metode nisu klinički prihvaćene zbog duže predanalitike i manjka selektivnosti kod precipitacije polietilen-glikolom (Doyle i Wang, 2019). Idealna

metoda mora biti relativno jednostavna, efikasna, brza, ekonomična i reproducibilna. Daljnjom bi se optimizacijom izolacijskih protokola i kombinacijom tehnika prevladali nedostaci te bi se posljedično ubrzalo istraživanje kao i potencijalna klinička primjena.

1.3. RNA I miRNA U EGZOSOMIMA

Egzosomi izolirani iz stanica kolorektalnog karcinoma (CRC) sadrže mRNA (engl. *messenger ribonucleic acid*) i miRNA (engl. *micro ribonucleic acid*) molekule (*miR-17-92a*, *miR-19a*, *miR-210*, *miR193a* i dr.) te se povezuju s lošom prognozom kolorektalnog karcinoma tako što potiču proliferaciju, migraciju i invazivnost tumorskih stanica (Verbanac i sur. 2021). Prvenstveno su egzosomalne miRNA predmet najveće pažnje kao potencijalni biomarkeri za dijagnozu tumora zbog njihove stabilnosti protiv degradacije.

Valadi i sur. (2007) otkrili su egzosomalnu miRNA te su Taylor i Gercel-Taylor (2008) potvrdili kako je čak osam vrsta miRNA (*miR-21*, *miR-141*, *miR-200a*, *miR-200c*, *miR-200b*, *miR-203*, *miR-205* i *miR-214*) pronađeno u cirkulirajućim tumorskim egzosomima kod bolesnika koji boluju od tumora jajnika. Egzosomalne su miRNA iz mezenhimalnih stromalnih stanica i fibroblasta pokazale mogućnost direktne progresije tumora i induciranja otpornosti na terapiju u stanicama kolorektalnog karcinoma (Dai i sur., 2020). Matsumura i sur. (2015) detaljnije su proučavali *miR-19a* kao potencijalni biomarker relapsa kolorektalnog karcinoma. Utvrdili su kako *miR-19a* uistinu potiče proliferaciju i invazivnost tumorskih stanica, no sam signalni put još nije utvrđen, osim činjenice kako *miR-19a* ima bitnu ulogu tako što suprimira tumor-supresorski gen *PTEN* (engl. *Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10*). Također, visoka je ekspresija *miR-19a* povezana s lošom prognozom kod pacijenata s CRC-om kako u ranoj, tako i u kasnoj fazi karcinoma (Matsumura i sur., 2015).

Također, koncentracije egzosomalnog *miR-21* koreliraju s progresijom i agresivnošću tumora što može predstavljati koristan neinvazivni biomarker za dijagnozu i predikciju relapsa CRC-a. *miR-21* djeluje na način da inhibira negativnu regulaciju RAS/MEK/ERK (engl. *Rat sarcoma virus/Mitogen-activated protein kinase/Extracellular-signal-regulated kinase*) signalnog puta te suprimira proces apoptoze. Osim toga, djeluje i na ekspresiju *PTEN*, *PDCD4* (engl. *Programmed cell death protein 4*) i *TPM1* (engl. *Tropomyosin 1*) gena promovirajući proliferaciju stanica i progresiju tumora.

Nepobitna je činjenica kako je ekspresija *miR-21* povećana kod pacijenata s CRC-om te da ih prati loša prognoza (Tsukamoto i sur., 2017). Fu i sur. (2018) proučavali su *miR-17-5p* i *miR-92a-3p* te utvrđuju povećanu ekspresiju u egzosomima te značajnu korelaciju s patološkim stanjem i progresijom kod pacijenata s CRC-om. Navode iste miRNA kao obećavajuće potencijalne biomarkere karcinoma zajedno s činjenicom kako egzosomalne miRNA predstavljaju značajniji potencijal diferencijacije patološkog stanja od zdravih ispitanika, nego što je slučaj kod analize tkiva *in situ*. Upravo taj zaključak implicira veću specifičnost i osjetljivost neinvazivnih metoda baziranih na egzosomalnim miRNA od onih invazivnih te može predstavljati veliki napredak u ranoj dijagnostici karcinoma te u praćenju daljnje metastatske progresije.

1.4. KOLOREKTALNI KARCINOM (CRC)

Kolorektalni karcinom, zbog stalno rastuće prevalencije, predstavlja sve ozbiljniji dijagnostički i terapijski problem na globalnoj razini. Drugi je najčešći karcinom kod žena i treći kod muškaraca te je četvrti vodeći uzrok smrti od zloćudnih tumora u svijetu. Stopa incidencije i mortaliteta 25% je veća u muškaraca, nego u žena, ali je bitnije reducirana opsežnim probirom koji omogućava ranu detekciju (Li i sur., 2021).

U Republici Hrvatskoj, CRC najučestalija je zloćudna bolest te godišnje prosječno oboli oko 3600 osoba, te umire oko 2100 osoba, od čega je 60% muškaraca. Češći je kod osoba starije životne dobi, međutim gotovo petina oboljelih mlađa je od 60 godina (www.hzjz.hr). Rizik od razvoja ovisi o dobi, počinje rasti nakon četrdesetih godina života sa značajnijim porastom između 50. i 55. godine te u konačnici doseže i eksponencijalni rast. Od ostalih čimbenika koji povećavaju rizik ističu se prehrana bogata mesom i masnoćama životinjskog podrijetla, fizička neaktivnost, konzumacija alkoholnih pića i pušenje (Brkić i Grgić, 2006).

Brojne studije sugeriraju kako je za nastanak CRC-a potrebna interakcija nasljedne sklonosti i vanjskih čimbenika. Dolazi do akumulacije mnogih genetičkih i epigenetičkih promjena koje rezultiraju transformacijom epitelnih stanica kolona u invazivne i agresivne adenokarcinome. S obzirom da je riječ o multifaktorskoj bolesti, etiologija je specifična za svakog bolesnika. Kod čak 70-90% bolesnika, karcinom nastaje sporadično zbog mutacija brojnih gena poput *K-ras* (engl. *Kirsten rat sarcoma virus*), *APC* (engl. *Adenomatous*

polyposis coli), *TP53* (engl. *Tumor protein 53*) i *DCC* (engl. *Netrin receptor DCC*) gena. S druge strane, 10-30% bolesnika imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu s CRC-om te 1-5% karcinoma je posljedica nasljednog polipoznog i nepolipoznog sindroma (Verbanac i sur., 2021).

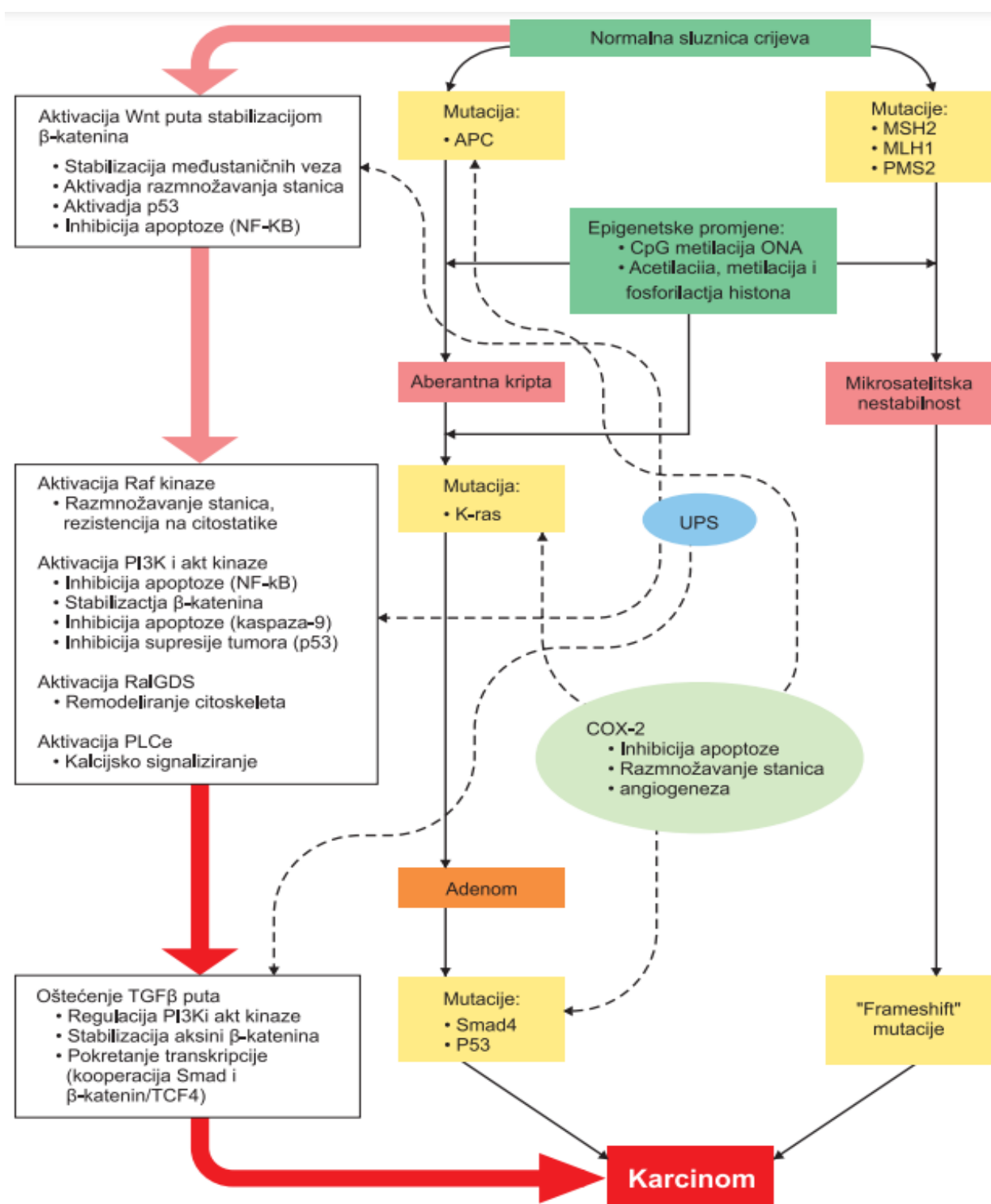
1.5. GENSKE MUTACIJE CRC-a

Naime, za staničnu preobrazbu od normalne sluznice do invazivnog karcinoma potrebna je serija genskih zbivanja tokom dužeg razdoblja koji uključuju brojne mutacije, delecije, amplifikacije ili poremećaje ekspresije (Brkić i Grgić, 2006).

Gotovo svi slučajevi CRC-a demonstriraju hiperaktivaciju *WNT* (engl. *Wingless-related integration site*) puta za koju je zaslužna mutacija *APC* gena, odnosno glavnog regulatora tog puta. Mutacija *APC* gena predstavlja najznačajniju genetsku promjenu jer upravo preko *WNT* signalnog puta regulira staničnu diferencijaciju i rast (Verbanac i sur., 2021). Posljedično, dolazi do pojačane ekspresije β -katenina i njegove akumulacije, translokacije u jezgru i vezanja na DNA što dovodi do pojačane transkripcije gena povezanih s razvojem CRC-a (Cheng i sur., 2019). Međutim, nijedan od dosad spomenutih gena ne predstavlja pouzdan biomarker za prognozu bolesti. Aktivacijom *WNT* signalnog puta dolazi i do povećane ekspresije *c-MYC* (engl. *Cellular myelocytomatosis oncogene*) gena koji predstavlja pouzdan prognostički biomarker metastaziranja i progresije same bolesti.

Česta je pojava i gubitak *17q-TP53* gena koji kodira za tumor supresorski protein p53, zaslužan za regulaciju staničnog ciklusa, ponajviše za procese preživljavanja i apoptoze stanice (Verbanac i sur., 2021). Mutacije *K-ras* onkogeni pojavljuju se u 40-50% slučajeva CRC-a te pokreću čak četiri intracelularne kaskade odgovorne za inhibiciju tumorskih supresora, promociju angiogeneze te inhibiciju apoptoze. Dobro je poznata i pojačana ekspresija upalnog enzima ciklooksigenaze-2 (*COX-2*) u tumorskom tkivu koja dovodi do sinteze proinflamatornih citokina okidajući pritom lavinu intracelularnih procesa bitnih za invazivnost tumorskih stanica, inhibiciju apoptoze te pojačavanje angiogeneze. Dodatno, povećana je sinteza matriks metaloproteinaza 1, 2, 3, 7 i 9 (*MMP-1, -2, -3, -7 i -9*) i smanjenom ekspresijom tkivnog inhibitora metaloproteinaza 1 (*TIMP-1*) koji se povezuju s povećanom invazivnošću karcinoma.

S obzirom da je riječ o multifaktorskoj bolesti, postoje još brojni poremećaji poput epigenetskih promjena, uključujući metilaciju promotorskih slijedova DNA kao i acetilaciju, metilaciju i fosforilaciju histona. Usko je povezan i ubikvitinsko-proteasomski sustav (UPS) koji je od osobite važnosti za proces karcinogeneze tako što dolazi do poremećaja regulacije apoptoze, ubivitinacije i razgradnje NF κ B (engl. *Nuclear factor- κ B*), β -katenina i dr. (Badžek i sur., 2012). Navedene mutacije i aktivacije puteva prikazane su slikom 2.



Slika 2. Mutacije intracelularnih signalnih puteva u karcinogenezi kolorektalnog karcinoma (preuzeto od Badžek i sur., 2012)

1.6. DIJAGNOSTIKA CRC-a

Zlatni standard dijagnosticiranja CRC-a predstavlja kolonoskopija. Međutim, standardna kolonoskopija ima brojne nedostatke i prema rezultatima studija čak četvrtina adenoma ostaje neotkrivena i posljedično tome, javlja se potreba za novim tehnikama koje mogu pružiti napredniju i efektivnu karakterizaciju kolorektalnih promjena kao i bolju detekciju adenoma (Majerović i sur., 2015). Kolonoskopijom se, u većini slučajeva, može pregledati cijelo debelo crijevo te omogućava uzimanje biopsičkih uzoraka za uspostavljanje patohistološke dijagnoze. Primarni nedostatak metode leži u pripremi samih pacijenata za pregled. Naime, pacijenti doživljavaju cijelo iskustvo dosta neugodnim, prolaze specifičnu pripremu, ključnu za adekvatan pregled uz rizik perforacije crijeva i, u slučaju sedacije, kardiopulmonarne komplikacije. Skladno tome, odlučuju se za druge, manje invazivne postupke.

Nove metode omogućuju razlikovanje neoplastičnih od ne-neoplastičnih lezija poput konvencionalne kromoendoskopije, virtualne kromoendoskopije, endocistoskopije i dr. (Majerović i sur., 2015). U dijagnosticiranju proširenosti bolesti koriste se endoskopski ultrazvuk i druge slikovne radiološke metode (Brkić i Grgić, 2006). Danas je imperativ što bolja optimizacija metoda za rani probir te općenito sprječavanje progresije bolesti kao i informiranje populacije na važnost rutinskog pregleda, naročito osoba visokog rizika.

Upravo iz navedenih razloga, odlukom Vlade Republike Hrvatske 2007. godine usvojen je Nacionalni program ranog otkrivanja kolorektalnog karcinoma. Namijenjen je osobama od 50. do navršene 74 godine te se provodi svake dvije godine. Ukoliko osoba ima pozitivan nalaz pregledanih stolica na skrivenu krv, pozivaju se na kolonoskopiju radi utvrđivanja uzroka. Primjerice, Republika Slovenija je uspjela kroz period od 5 godina smanjiti pojavnost karcinoma za 21% zahvaljujući visokom udjelu osoba koje su se odlučile podvrgnuti pregledu (www.hzjz.hr). Testiranje prikrivene krvi u stolici predstavlja osnovnu metodu probira kod osoba prosječnog ili visokog rizika. Baziraju se na peroksidativnoj aktivnosti hemoglobina i njegovih razgradnih produkata, koji oksidiraju fenolske gvajakove spojeve i tako stvaraju plavu boju. Jednostavni su i ekonomični te, općenito, dobro prihvaćeni od strane populacije, no ipak se odlikuju velikim brojem lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Enzim-imunokemijskim dodatnim testovima specifičnim za hemoglobin može se poboljšati ishod samih rezultata (Brkić i Grgić, 2006).

1.7. TEKUĆA BIOPSIJA

Tekuća biopsija predstavlja inovativnu i obećavajuću metodu u onkološkoj dijagnostici koja se može primijeniti za praćenje tijeka i progresije bolesti, praćenje odgovora na terapiju, ranog povratka bolesti ili u predikciji preživljavanja pacijenata s karcinomom.

Neinvazivna je metoda pomoću koje se izoliraju cirkulirajuće tumorske stanice, slobodna cirkulirajuća DNA, cirkulirajući egzosomi ili cirkulirajuća RNA iz uzorka krvi (Periša i sur., 2017). Navedene tvari su otpuštene u cirkulaciju od strane brojnih stanica, uključujući i tumorskih. Tekućom se biopsijom dobivaju informacije u stvarnom vremenu na cjelokupnoj molekularnoj razini i sveukupnom tumoru analizirajući perifernu krv, dok se biopsijom tkiva dobiva jedan fragment tumorskog tkiva. Nadalje, biopsija tkiva predstavlja invazivni postupak, zahtjevnu operaciju po pacijenta te može rezultirati nedostatnom količinom samog tkiva.

Tekuća biopsija, osim što predstavlja minimalno invazivnu metodu, kao prednost sadrži i brzo vrijeme obrade kao i analizu u seriji, odnosno praćenje u seriji s minimalnim vremenskim odmakom. Ipak, najznačajnija primjena odnosi se na razumijevanje heterogenosti samog tumora koji je jedan od glavnih razloga tumorske rezistencije i terapijskog neuspjeha. Heterogenost podrazumijeva razliku primarnog i metastatskog tumora kao i vremensku heterogenost promjene genetskog profila uzrokovane uglavnom antikancerogenima. Međutim, unatoč brojnim kliničkim studijama tekuće biopsije povezane s kolorektalnim karcinomom i obećavajućim preliminarnim rezultatima, uporaba je i dalje dosta ograničena unutar kliničke prakse. Razlozi uključuju razlike u metodama, ograničen broj uključenih pacijenata i nedostatak jasnog pokazatelja kliničke koristi (Yamada i sur., 2019).

Naime, za potencijalno uvođenje tekuće biopsije u kliničku praksu potrebne su puno veće kliničke studije te ispitivanja na većim uzorcima bolesnika. Također, potrebna je i optimalna standardizacija procesa počevši od predanalitike i uzimanja uzorka do same analize i obrade rezultata prije samog implementiranja.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kolorektalni karcinom jedan je od rijetkih tumora čija se pojava može na vrijeme prevenirati, no i dalje prednjači kao jedan od vodećih uzroka smrti od malignih tumora u svijetu. Potrebno je razviti potrebnu mjeru prevencije kojom bi se uvelike smanjila učestalost i stopa mortaliteta. Zlatni standard dijagnosticiranja kolorektalnog karcinoma predstavlja kolonoskopija koja i dalje sadrži broje nedostatke zbog čega se javlja potreba za inovativnijim i manje invazivnim metodama.

Tekuća biopsija predstavlja veliki napredak u onkološkoj dijagnostici zbog svoje neinvazivnosti i mogućnosti izolacije i određivanja brojnih elemenata koji pružaju informacije o molekulskom stanju tumora. Mogu se izolirati cirkulirajuće tumorske stanice, egzosomi, cirkulirajuća slobodna DNA kao i RNA iz uzorka krvi koji predstavljaju izniman potencijal u dijagnostici, praćenju bolesti i dr. Egzosomalna miRNA pokazala se kao potencijalni biljeg u dijagnostici tumora, uključujući kolorektalni karcinom zbog svoje razlike u ekspresiji kod zdrave populacije u odnosu na one koji boluju od karcinoma. Daljnja istraživanja otvaraju brojne mogućnosti otkrivanja novih dijagnostičkih i prognostičkih objašnjenja kolorektalnog karcinoma.

Metode koje se koriste u tekućoj biopsiji većinom nisu standardizirane te postoje potencijalne razlike u interpretaciji rezultata nakon korištenja različitih metoda za izolaciju egzosoma, RNA i sl. Javlja se potreba za njihovom standardizacijom te ispitivanjem mogu li se različite metode jednakovrijedno koristiti i jesu li one međusobno zamjenjive, a da rezultati ostanu jednake kvalitete te da su međusobno usporedivi.

Cilj ovog diplomskog rada je usporediti dvije metode za izolaciju RNA molekula iz egzosoma kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom, odnosno sljedeće kombinacije metoda za izolaciju egzosoma i RNA: metodu izolacije egzosoma – miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit (Qiagen, Njemačka) i miRNA – miRNAeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Njemačka) te metodu izolacije egzosoma – Total Exosome Isolation Kit (ThermoFisher – Invitrogen, SAD) i miRNA – Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (ThermoFisher – Invitrogen, SAD). Također, cilj je ispitati daju li ove metode istovjetne rezultate za ekspresiju miRNA *miR-19a-3p*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. VAĐENJE KRVI PACIJENTIMA I PRIPREMA ZA IZOLACIJU EGZOSOMA

Svakom se bolesniku uzima 10 mL pune krvi u epruvete sa stabilizatorima za očuvanje cirkulirajućih tumorskih stanica *CellSave Preservative Tubes* (Menarini Silicon Biosystems Inc, SAD). Ispitanici s potvrđenim kolorektalnim karcinomom (n=11) sudjeluju u projektu IP-2019-04-4624 informiranim pristankom.

Nakon vađenja, puna krv se centrifugira na 1900 g tijekom 10 minuta na 4 °C u prethodno rashlađenoj centrifugi s njišućim vjedrima (engl. *swinging-bucket* rotorom) unutar jednog sata kako ne bi došlo do oslobađanja staničnog sadržaja *in vitro* te u uzorku nikako ne smije biti prisutna hemoliza. Dobivena plazma se prenosi u sterilnu epruvetu od 15 mL uz oprez da se ne zahvati međusloj (engl. *buffy coat*), odnosno leukociti koji su najčešći izvor kontaminacije s miRNA i genomskom DNA. Plazma se dalje centrifugira na 3000 g tijekom 15 minuta na 4 °C kako bi se uklonili stanični materijal, fragmenti trombocita i apoptotska tjelešca. Dobiveni se nadsloj, u ovom slučaju plazma, alikvotira u epruvete od 2 mL koje ne sadrže enzim RNazu za daljnju izolaciju egzosoma te se pohranjuju na 4 °C tijekom 24h ili zamrzavaju na -20 °C na duži period.

3.2. IZOLACIJA EGZOSOMA METODOM QIAGEN (METODA – Q)

Za izolaciju egzosoma korišten je komercijalno dostupan miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit (Qiagen, Njemačka, kat. br. 76603) koji sadrži:

- 10 mL *Precipitation Buffer A*
- 10 mL *Resuspension Buffer*
- 200 U *Thrombin* (liofiliziran)
- 500 µL *Thrombin Buffer*

Dodatni materijali i oprema koji se koriste:

- Pipete i nastavci bez RNaze
- Epruvete (s koničnim dnom) od 15 mL

- Epruvete od 2 mL bez RNaze
- Mikrocentrifuga za epruvete od 2 mL za centrifugiranje na 20 °C
- Vortex
- Hladnjak
- Led

Svi reagensi se čuvaju zaštićeni od svjetla na 2-8 °C. Liofilizirani *Thrombin* otopi se u 400 µL *Thrombin buffera* 1 minutu na sobnoj temperaturi uz nježno miješanje nakon čega se alikvotira i čuva na 20 °C. Uzorci se odmrznu ukoliko su bili zamrznuti te se centrifugiraju na 3000 g tijekom 5-10 minuta na 4 °C kako bi se uklonile preostale stanice i stanični debris uključujući trombocite i fibrin, a preostali supernatant se prenosi u novu epruvetu od 2 mL. U 600 µL plazme dodaje se 1% *Thrombina* (6 µL), promiješa i inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi. Slijedi centrifugiranje na 10 000 g tijekom 10 minuta na 20 °C. Zatim se 0,5 mL supernatanta prenosi u novu epruvetu od 2 mL te se pomiješa s 0,4x volumena *Precipitation Buffera A* (200 µL), vorteksira 5 sekundi te inkubira tijekom 1h (može i preko noći) na 4 °C. Idući korak je ponovno centrifugiranje na 500 g tijekom 5 minuta na 20 °C, uklanja se supernatant i baca, dok se u preostalom talogu na dnu epruvete nalaze egzozomi. Talog se kratko centrifugira kako bi se uklonio eventualni preostali supernatant. Dodaje se 270 µL *Resuspension Buffer* talogu egzozoma i vorteksira se da se egzozomi resuspendiraju.

Konačni volumen egzozoma iznosi oko 300 µL te je optimalno odmah izolirati RNA da se izbjegnu RNaze ili čuvati do 24h na 4 °C, a mogu se i zamrznuti na -20 ili -65 °C tijekom dužeg perioda. Od same predanalitike važno je napomenuti kako se koristi EDTA antikoagulans (može i citrat), ali nikako ne heparin te se strogo izbjegava korištenje hemoliziranih uzoraka.

3.3 IZOLACIJA EGZOSOMA METODOM THERMOFISHER INVITROGEN (METODA – TF)

Kao druga metoda za izolaciju egzozoma korišten je i Total Exosome Isolation Kit (ThermoFisher – Invitrogen, SAD, kat. br. 4484450) te sadrži:

- *Exosome Precipitation Reagent (from plasma)*

- *Proteinase K*

Proteinaza K se koristi opcionalno te uklanja većinu plazmatskih proteina i tako povećava čistoću uzorka egzosoma te se čuva na -20 °C. Međutim, može dijelom i razgraditi proteine na površini egzosoma. Dodatni materijali i oprema koji se koriste:

- 1x *PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4)*
- Pipete i nastavci bez RNaza
- Epruvete od 2 mL
- Mikrocentrifuga za epruvete od 2 mL za centrifugiranje na 20 °C
- Termoblok za inkubaciju epruveta od 2 mL na 37 °C
- Vortex
- Hladnjak
- Led

Ukoliko je uzorak plazme smrznut, potrebno ga je otopiti na 25 °C ili u vodenoj kupelji na 37 °C dok nije potpuno u tekućem stanju. Centrifugira se na 2000 g tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi čime se uklanjaju stanice i debris. Supernatant se prenosi u novu epruvetu te ponovno slijedi centrifugiranje, ali na 10 000 g tijekom 20 minuta na istoj temperaturi radi uklanjanja preostalog debrisa. Supernatant se prenosi u novu epruvetu od 2 mL i čuva na ledu do same izolacije. Prije same izolacije potrebno je razrijediti koncentrat pufera *PBS. OmniPur 10x PBS Liquid Concentrate, Sterile* (Calbiochem, br. 6507-4L) pH 7,4, bez DNaza i RNaza razrjeđuje se 10 puta na način da se u pripremi koristi 45 mL *HyClone Water* (Fisher Scientific, br. 10307052) i 5 mL 10x *PBS*-a kako bi se u konačnici dobilo 50 mL 1x *PBS*-a. U epruvetu od 2 mL dodaje se 1 mL plazme i 0,5 mL *PBS*-a te se vorteksira. Dodaje se 50 µL *Proteinase K*, vorteksira se i inkubira na 37 °C tijekom 10 minuta. Dodaje se 300 µL *Exosome Precipitation Reagent (from plasma)*, dobro promiješa vorteksiranjem ili okretanjem epruvetice dok otopina ne postane homogena (trebala bi biti mutnog, tj. „oblačnog“ izgleda) i inkubira na 2-8 °C tijekom 30 minuta. Potom se centrifugira na 10 000 g tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Supernatant se uklanja pipetiranjem i baca, dok se egzosomi nalaze u preostalom talogu na dnu epruvete. Opcionalno je dodatno centrifugirati na 10 000g tijekom 30 sekundi kako bi se skupio preostali reagens te se ostatak supernatanta pažljivo uklanja pipetiranjem.

Dobivenom talogu potrebno je dodati po izboru 100-500 μ L 1x *PBS*-a ili 300 μ L *Exosome Resuspension Buffer* (iz kita Total Exosome RNA and Protein Isolation, ThermoFisher – Invitrogen, kat. br. 4478545), ostaviti 5 do 10 minuta na sobnoj temperaturi i vorteksirati kako bi se u konačnici egzosomi resuspendirali i bili spremni za daljnje analize. Izolirani se egzosomi mogu čuvati na ledu do 10 minuta, na 2-8 °C do tjedan dana ili na -20 °C tijekom dužeg perioda.

3.4. IZOLACIJA RNA METODOM QIAGEN (METODA – Q)

Za izolaciju ukupne egzosomalne RNA korišten je miRNAeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Njemačka, kat. br. 217204) koji sadrži:

- *RNeasy® UCP MinElute® Spin Columns* (u epruvetama od 2 mL)
- Epruvete od 1.5 mL
- Epruvete od 2 mL
- Pufer *RPL* (20 mL)
- Pufer *RPP* (8 mL)
- Pufer *RWT* (15 mL)
- Pufer *RPE* (11 mL)
- Voda, bez RNaza

Ostali reagensi i pribor:

- 100% Izopropanol
- 80% Etanol
- Sterilni nastavci bez RNaza
- Mikrocentrifuga za epruvete od 2 mL na sobnoj temperaturi
- Jednokratne rukavice

Izolacija se provodi iz 200 μ L izoliranih egzosoma. Prije početka izolacije, potrebno je razrijediti pufer *RWT* i *RPE* apsolutnim etanolom kako bi se dobila radna otopina. Također, svi se koraci izvode i puferi ekvilibriraju na sobnoj temperaturi te se postupak radi brzo kako

ne bi došlo do djelovanja RNaza. Uzorke je potrebno odmrznuti te se dodaje 60 μL pufera *RPL* kako bi se uklonile RNaze i proteinski kompleksi. Epruveta se vorteksira najmanje 5 sekundi i inkubira 3 minute na 15-25 $^{\circ}\text{C}$. Slijedi dodavanje 20 μL pufera *RPP* koji precipitira ostatke proteina, vorteksiranje najmanje 20 sekundi i inkubacija 3 minute. Potrebno je dobro miješanje za separaciju faza nakon čega slijedi centrifugiranje na 12 000 g tijekom 3 minute na sobnoj temperaturi da se pelet precipitira.

Bezbojan i bistar supernatant (otprilike 230 μL) prenosi se u novu epruvetu i dodaje 1 volumen izopropanola. Uzorak se vorteksira i prenosi u *RNeasy UCP MinElute* kolonu te se centrifugira na 8000 g tijekom 30 sekundi. Uzorak RNA veže se na kolonu, a tekućina koja prolazi (engl. *flow-through*) se baca. Na kolonu se dodaje 700 μL pufera *RWT*, centrifugira se na 8000 g tijekom 30 sekundi i ponovno baca tekućina koja prolazi kroz kolonu. U istu se epruvetu za skupljanje dodaje 500 μL pufera *RPE* te se ponavlja postupak centrifugiranja i bacanja tekućine. Dodaje se 500 μL 80% etanola na kolonu te se centrifugira na 8000 g tijekom 2 minute kako bi se membrana kolone isprala. *RNeasy UCP MinElute* kolona se postavlja na novu epruvetu od 2 mL. poklopac ostaje otvoren te se centrifugira na punoj brzini tijekom 5 minuta kako bi se membrana posušila i otklonila mogućnost interferencije etanola u daljnjim reakcijama. Kolona se postavlja u novu epruvetu za skupljanje od 1,5 mL i dodaje se 20 μL vode bez RNaze na sredinu membrane i inkubira 1 minutu. Poklopac se zatvara i centrifugira se 1 minutu na maksimalnoj brzini kako bi se RNA eluirala s kolone.

Pročišćena RNA može se čuvati na -30 $^{\circ}\text{C}$ do -15 $^{\circ}\text{C}$ ili -90 $^{\circ}\text{C}$ do -65 $^{\circ}\text{C}$ u vodi bez RNaze. Pod tim uvjetima ne događa se degradacija RNA i do godinu dana. Mrtvi volumen *RNeasy UCP MinElute* kolone je 2 μL , tako da elucija s 20 μL vode bez RNaza rezultira s 18 μL eluata.

3.5. IZOLACIJA RNA METODOM THERMOFISHER (INVITROGEN) (METODA – TF)

Kao druga metoda za izolaciju ukupne egzosomalne RNA korišten je Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (ThermoFisher – Invitrogen, SAD) koji sadrži:

- Otopina za ispiranje miRNA 1
- Otopina za ispiranje 2/3
- Epruvete (10 mL)

- Filter
- Pufer za resuspendiranje egzosoma
- 2x otopina za denaturaciju
- Kloroform
- Otopina za eluiranje

Od ostalog pribora koristi se:

- 2-merkaptioetanol ($14,3 \text{ mol/dm}^3$)
- 100% Etanol
- Pufer *PBS*
- Mikrocentrifuga za najmanje 10 000g
- Termoblok za 95 °C do 100 °C
- Polipropilenske epruvetice, pipete i nastavci bez RNaza

Prije postupka izolacije RNA, potrebno je pripremiti otopine i reagense za korištenje. Dodaje se 375 μL 2-merkaptioetanolu u otopinu za denaturaciju, 21 mL 100%-tnog etanola u otopinu za ispiranje miRNA 1 i 40 mL istog etanola u otopinu za ispiranje 2/3. Nakon izolacije egzosoma slijedi njihovo resuspendiranje hladnim puferom za resuspendiranje egzosoma ili *PBS*-om nakon čega se uzorak inkubira 5 do 10 minuta na sobnoj temperaturi i resuspendira pipetom. Za izolaciju RNA, uzorak se može čuvati u puferu na -20 °C ili nižoj temperaturi.

U uzorak egzosoma dodaje se *PBS* u epruveticu bez RNaza tako da ukupni volumen bude 200 μL i nakon jedan volumen 2x otopine za denaturaciju te je potrebno dobro promiješati. Inkubira se na ledu 5 minuta i dodaje jedan volumen kloroforma. Volumen kloroforma trebao bi biti jednak zbroju volumena uzorka i 2x otopine za denaturaciju. Uzorak se vorteksira 30 do 60 sekundi i centrifugira tijekom 5 minuta na maksimalnoj brzini ($>10\,000 \text{ g}$) na sobnoj temperaturi kako bi se odvojile dvije faze, organska i vodena. Ukoliko interfaza nije kompaktna, centrifugiranje se ponavlja. Pažljivo se odvaja gornja, odnosno vodena faza i prebacuje u čistu epruvetu.

RNA se izolira iz vodene faze kiselom ekstrakcijom fenolom i kloroformom. Prije daljnjih koraka, potrebno je zagrijati otopinu za eluiranje ili vodu bez nukleaza na 95 °C za eluiranje RNA iz filtera i 100%-tni etanol mora biti sobne temperature. Dodaje se 1,25x volumena 100%-tnog etanola vodenoj fazi i dobro miješa te za svaki uzorak staviti filter na epruvetu za skupljanje uzorka. Pipetira se 700 µL smjese uzorka i etanola na filter i centrifugira tijekom 15 sekundi na 10 000 g ili dok smjesa ne prođe kroz filter. Tekućina koja prolazi se baca i postupak se ponavlja sve dok sva smjesa ne prođe kroz filter. Epruveta za skupljanje se čuva za korak ispiranja. Na filter se dodaje 700 µL miRNA otopine za ispiranje 1 i centrifugira tijekom 15 sekundi na 10 000 g kako bi smjesa prošla kroz filter nakon čega se tekućina koja prolazi baca. Dodaje se 500 µL otopine za ispiranje 2/3 i provlači kroz filter kao i u prethodnom koraku. Tekućina se baca, filter se vraća u epruvetu za skupljanje i centrifugira tijekom 1 minute na 10 000 g kako bi se uklonio ostatak tekućine iz filtera. Filter se premješta u novu epruvetu za skupljanje i dodaje se 50 µL prethodno zagrijane otopine za eluiranje ili vode bez nukleaza na sredinu filtera. Centrifugira se 30-ak sekundi kako bi se dobila RNA i ponavlja elucija radi što bolje iskoristivosti. Eluat se skuplja i stavlja na led ako se odmah koristi ili se čuva na -20 °C ili nižoj temperaturi.

3.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE I INTEGRITETA RNA

Idući korak, nakon same izolacije RNA i miRNA iz egzosoma, je određivanje koncentracije i integriteta, odnosno kvalitete istih nukleinskih kiselina. Koncentracija RNA inače se određuje spektrofotometrijski na 260 nm na mikrovolumnom spektrofotometru DS-11 (Denovix, SAD) koji daje omjer 260/280 i 260/230, odnosno omjere apsorbancija na istim valnim duljinama kako bi se procijenila čistoća samih nukleinskih kiselina, u ovom slučaju RNA koja ima apsorpcijski maksimum upravo na 260 nm.

Međutim, nakon izolacije dobivene su vrlo male koncentracije RNA i miRNA te su sami omjeri nepouzdana za takve niske koncentracije. Za pouzdano određivanje integriteta koristi se elektroforeza na uređaju Bioanalyzer 2100 koristeći RNA 6000 Pico Kit (Agilent, SAD) koji sadrži:

- 25 RNA Pico čipova
- 3 *Electrode Cleaners*
- (plavi) *RNA 6000 Pico* koncentrat boje

- (zeleni) *RNA 6000 Pico Marker* (4 epruvete)
- (bijeli) *RNA 6000 Pico Conditioning Solution*
- (crveni) *RNA 6000 Pico Gel Matrix* (2 epruvete)
- (žuti) *RNA 6000 Pico Standard* (1 epruveta, 10x koncentrat)
- 4 filtera
- Epruvete za miješanje boje i gela
- 1 igla

Od ostalog pribora koristi se:

- Voda, bez RNaza
- Pipete (10 μ L i 1000 μ L) s odgovarajućim nastavcima
- Epruvete 0,5 mL bez RNaza
- Mikrocentrifuga
- Termoblok za zagrijavanje

Čipovi se pune na način da se u njih dodaje 9 μ L mješavine gela i boje te raspoređi po čipu pomoću igle za nanošenje. Zatim se u odgovarajuće jažice dodaju po 1 μ L *Conditioning Solution*, markera, standarda i uzoraka. Čip se vorteksira 1 minutu na 2400 rpm, postavi na nosač čipa u uređaju Bioanalyzer 2100 te se analiza vrši u programu Eukaryote Total RNA Pico Series Assay. Također, preporučeno je prije samog određivanja denaturirati RNA grijanjem 2 minute na 70 °C te nakon hladiti na ledu do uporabe te svi reagensi trebaju biti odmrznuti i sobne temperature, a elektrode uređaja isprane vodom bez RNaza.

3.7. ANALIZA EKSPRESIJE GENA ZA BB2M I PPIA U UZORCIMA RNA IZOLIRANE METODAMA Q I TF

Za analizu ekspresije, potrebno je sintetizirati cDNA iz ukupne izolirane RNA. Za sintezu korišten je RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, SAD) koji sadrži:

- *RevertAid RT*

- *RiboLock RNase Inhibitor*
- *5x Reaction Buffer* (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT)
- 10 mM *dNTP Mix*
- *Oligo(dT)₁₈ Primer*, 100 μM
- *Random Hexamer Primer*, 100 μM
- Voda, bez nukleaza

Za svaku se reakciju dodaje 1 μL *Oligo(dT)₁₈* početnica, 1 μL početnica od nasumičnih heksanukleotida, 1 μL inhibitora RNaza, 4 μL reakcijskog pufera, 2 μL 10 mM smjese dNTP, 1 μL *RevertAid M-MuLV* reverzne transkriptaze, 20 ili 50 ng ukupne RNA i voda bez nukleaza kako bi konačan volumen bio 20 μL te se smjesa dobro vorteksira.

Reakcijski uvjeti za sintezu podrazumijevaju prvotnu inkubaciju tijekom 5 minuta na 25 °C koju prati inkubacija tijekom 60 minuta na 42 °C kako bi se postigli optimalni uvjeti za sintezu lanca. Reakcija se terminira zagrijavanjem na 70 °C tijekom 5 minuta te se dobiveni reakcijski produkti mogu čuvati na -20 °C do tjedan dana ili na -70 °C na duže razdoblje. Uvjeti se postižu na uređaju GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD). Nakon prevođenja RNA u cDNA ona se koristi kao uzorak u qPCR metodi uz primjenu sonde *TaqMan*.

TaqMan sonda je oligonukleotid koji je obilježen na svojem 5'-kraju fluorescentnom bojom, *reporterom* (FAM), dok je na 3'-kraju obilježen prigušivačem (engl. *quencher*). Količina PCR produkta mjeri se na principu prijenosa energije fluorescentnom rezonancijom, odnosno FRET (engl. *Fluorescence energy resonance transfer*) i 5'-egzonukleaznoj aktivnosti DNA polimeraze u ponavljajućim ciklusima. Naime, *TaqMan* sonde i početnice vežu se na cDNA, a prije same elongacije početnice još nema fluorescencije zbog blizine fluorescentne boje i *quencher*a koji prigušuje fluorescenciju *reportera*. Kako se početnice elongiraju, istovremeno DNA polimeraza razgrađuje *TaqMan* sondu zbog svoje 5'-egzonukleazne aktivnosti i tada dolazi do fluorescencije jer se *quencher* više ne nalazi u blizini fluorescentne boje. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je količini nastalog PCR produkta, odnosno ovisno o količini početnog uzorka razina detekcije (C_t – engl. *Threshold Cycle*) se postiže u određenom ciklusu i dolazi do kvantifikacije početne količine ako postoji referentni uzorak.

qPCR napravljen je na uređaju 7500 Real Time PCR System uz korištenje TaqMan Universal MasterMix-a i TaqMan Gene Expression Assay-a (Applied Biosystems, SAD):

- Hs99999907_m1 za β_2 -mikroglobulin (*B2M*)
- Hs99999904_m1 za peptidil-prolil-izomerazu A (*PPIA*)

Na pločicu s 96 jažica za qPCR dodaje se 5 μ L MasterMix-a, 0,5 μ L početnice s *TaqMan* sondom, 0,5 μ L cDNA i 4 μ L vode po jažici. Pločice se centrifugiraju 30 sekundi na 500g, a reakcijski uvjeti su idući: zagrijavanje na 50 °C tijekom 2 minute, zatim zagrijavanje na 95 °C tijekom 10 minuta te 40 ciklusa koji se sastoje od zagrijavanja na 95 °C tijekom 15 sekundi i na 60 °C tijekom 1 minute u kojima se vrši i mjerenje fluorescencije.

3.8. ANALIZA EKSPRESIJE miRNA U UZORCIMA RNA IZOLIRANE METODAMA Q I TF

3.8.1. REVERZNA TRANSKRIPCija

Prvi korak u analizi ekspresije miRNA podrazumijeva reverznu transkripciju, odnosno sintezu cDNA iz ukupne izolirane miRNA te je korišten miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Njemačka, kat. br. 339340) koji sadrži:

- 5x *miRCURY RT SYBR[®] Green[®] Reaction Buffer* (koji uključuje Mg^{2+} , SYBR[®] Green RT početnice i dNTP)
- 10x *miRCURY RT Enzyme Mix*
- UniSp6 *RNA Spike-In Template* (osušen)
- Voda, bez nukleaza

Primarna svrha UniSp6 *spike-in* RNA i odgovarajućih početnica leži upravo u kontroli kvalitete izolacije RNA, reakciji sinteze cDNA i amplifikaciji PCR-a. Izolacije RNA mogu varirati od dobivenih koncentracija, čistoće i integriteta što može rezultirati različitom učinkovitosti reverzne transkripcije ili PCR-a između uspoređivanih uzoraka.

Upravo korištenje *spike-in* RNA u ovom radu zbog vrlo male koncentracije dobivene RNA služi u kontroli na svakoj eksperimentalnoj razini. Nakon provođenja PCR-a,

uspoređuju se jažice koje detektiraju *spike-in* RNA, a uzorci koji se izdvajaju kao stršeće vrijednosti (engl. *outlieri*) mogu se identificirati i uzeti u obzir za isključivanje iz daljnje analize podataka. Točnije, koristi se UniSp6 *spike-in* RNA kao sintetički transkript, odnosno standard za kvantifikaciju ekspresije ostalih miRNA i za uspješno praćenje reakcije. Reakcijsku smjesu čine: 2 μ L 5x *miRCURY RT SYBR[®] Green[®] Reaction Buffer*, 1 μ L 10x *miRCURY RT Enzyme Mix*, 0,5 μ L UniSp6 *RNA Spike-In*, 4,5 μ L vode bez RNaza, i 2 μ L uzorka RNA kako bi smjesa ukupno sadržavala 10 μ L.

Nakon vorteksiranja, slijedi PCR reakcija na uređaju GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD) pri idućim reakcijskim uvjetima: 60 minuta na 42 °C nakon kojih slijedi 5 minuta na 95 °C kako bi se enzim reverzne transkriptaze inaktivirao, odnosno kako bi se zaustavila reakcija. Sintetizirana cDNA hladi se na 4 °C te se uzorci mogu čuvati do 4 dana na istoj temperaturi ili 5 tjedana na -20 °C.

3.8.2 REAKCIJA qPCR-a

Slijedi reakcija qPCR-a u kojoj se kao kalup za umnažanje i kvantifikaciju koristi cDNA dobivena reverznom transkripcijom početnog uzorka miRNA od interesa (*miR-19a-3p*) i referentne miRNA (*miR-103a-3p*). Korišteni su *miRCURY LNA miRNA Assays*:

- hsa-miR-19a-3p (YP00204063)
- hsa-miR-103a-3p (YP00205862)
- UniSp6 *RNA Spike-In Template* (YP00203954)

Za reakciju qPCR koristi se *miRCURY LNA SYBR[®] Green PCR Kit* (Qiagen, Njemačka, kat. br. 339345, 339346 i 339347) koji sadrži:

- 2x *miRCURY SYBR[®] Green Master Mix*
- *ROX Reference Dye*
- *Resuspended PCR Primer Mix*
- Voda, bez RNaza

Prije početka reakcije, potrebno je razrijediti cDNA u omjeru 1:30 dodavanjem 29 μL vode bez RNaze u 1 μL dobivene cDNA iz reakcije reverzne transkripcije. U reakcijsku smjesu za qPCR dodaje se: 5 μL *SYBR[®] Green Master Mix*, 0,05 μL *ROX Reference Dye*, 1 μL *Resuspended PCR Primer Mix*, 3 μL cDNA (razrijeđene 1:30) i 1 μL vode bez RNaza. *SYBR[®] Green Master Mix* i *ROX Reference Dye* može se i unaprijed pomiješati, dok se pohrana razrijeđene cDNA ne preporuča. Analiza ekspresije miRNA određuje se na uređaju 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, SAD) prema idućim uvjetima:

Tablica 1. Programiranje qPCR uređaja za analizu ekspresije miRNA

KORAK	VRIJEME	TEMPERATURA
PCR početna aktivacija	2 min	95 °C
Denaturacija	10 s	95 °C
Kombinirano vezanje/umnažanje	60 s	56 °C (očitavanje fluorescencije)
Broj ciklusa	40	
Analiza krivulje taljenja		60-95 °C

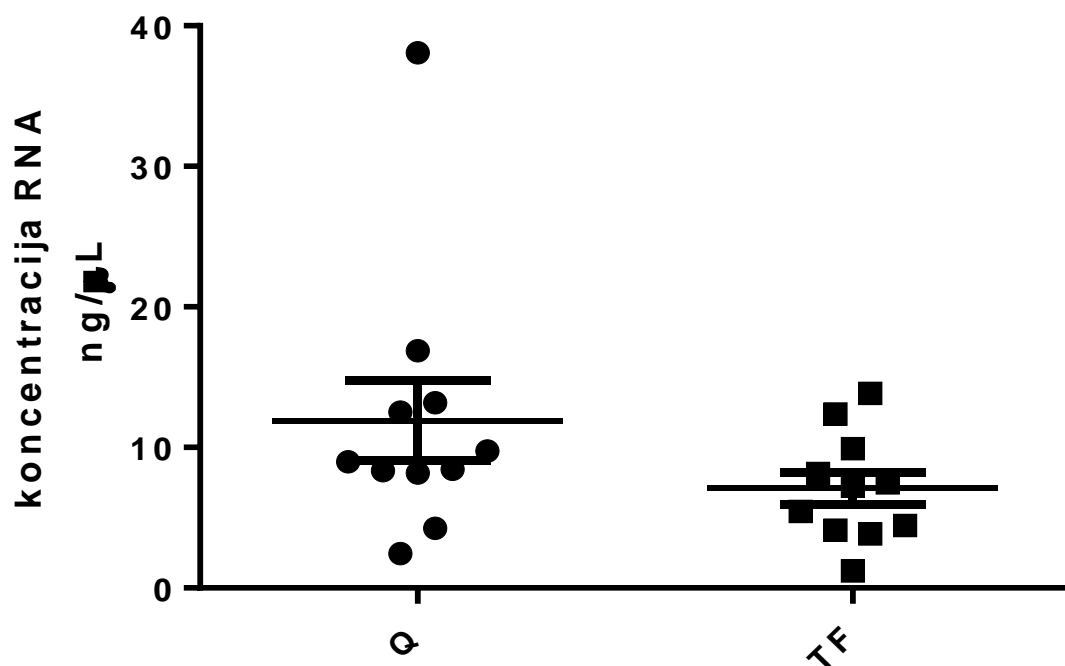
3.9. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statističku obradu dobivenih podataka koristi se Wilcoxonov test u programu GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., SAD). Služi kako bi procijenili usporedivost, odnosno međusobnu razliku dviju metoda te mogu li se koristiti istovremeno u znanstvenim studijama ili kliničkim ispitivanjima. Wilcoxonov test (engl. *Wilcoxon Signed Rank Test*) neparametrijski je test kojim se uspoređuju podaci koji su u zavisnom odnosu. Točnije, ispituje se postoji li statistički značajna razlika između međusobno zavisnih uzoraka i koristi kao alternativa t-testu kada skupovi podataka ne prate normalnu distribuciju (www.sciencedirect.com). Postavlja se i testira nulta hipoteza koja navodi kako između dvije varijable, u ovom slučaju metode, ne postoji značajna statistička razlika. Ukoliko je P vrijednost manja od 0,05, smatra se kako se razlika između skupova podataka statistički razlikuje od 0, odnosno da postoji statistički značajna razlika između dvije varijable (www.medcalc.org).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. KONCENTRACIJA RNA IZOLIRANA IZ EGZOSOMA POMOĆU DVIJE RAZLIČITE METODE (Q I TF)

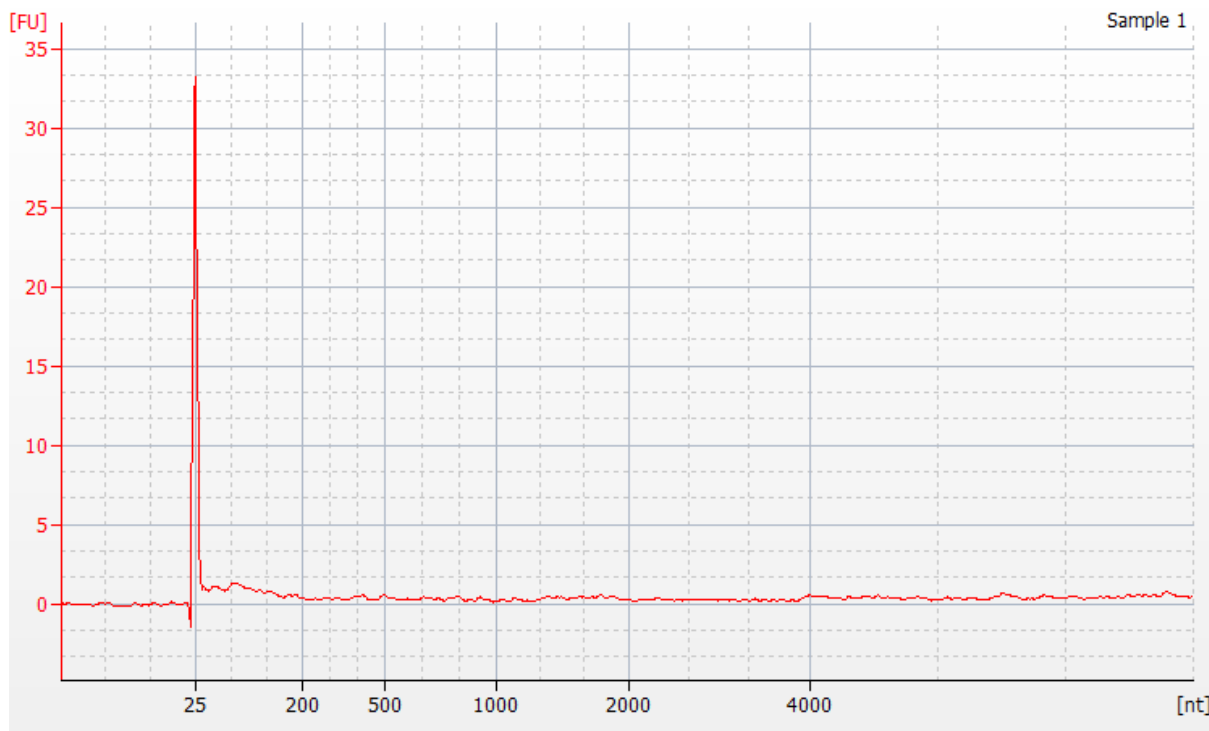
Nakon izolacije miRNA, određena je koncentracija na mikrovolumnom spektrofotometru DS-11 (DeNovix, SAD). Srednja vrijednost koncentracija RNA za metodu Q iznosi 11,92 ng/μL s rasponom 2,43 – 38,08 ng/μL, dok je za metodu TF srednja vrijednost 7,11 ng/μL s rasponom 1.20 - 13.48 ng/μL (Slika 3.). Usporedbom rezultata koncentracija dobivenih metodama Q i TF može se zaključiti kako ne postoji statistički značajna razlika između korištenih metoda ($P = 0,1016$).



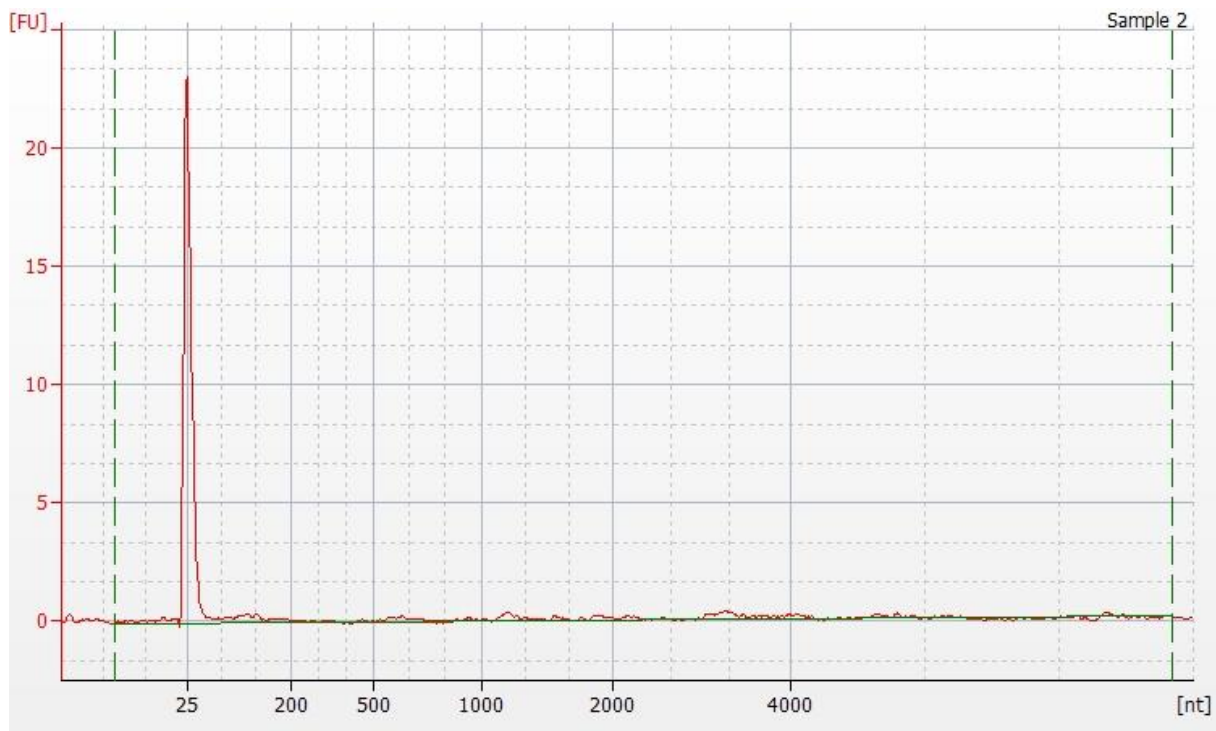
Slika 3. Koncentracije RNA izolirane iz egzosoma metodama Q i TF. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD, $n=11$.

4.2. ANALIZA KVALITETE I INTEGRITETA RNA

Kvaliteta izolirane RNA iz egzosoma bolesnika s kolorektalnim karcinomom analizirana je na uređaju Bioanalyzer 2100 koristeći RNA 6000 Pico Total RNA Kit (Agilent, SAD) metodom kapilarne elektroforeze. Na dobivenom elektroferogramu je vidljivo kako nisu dobivene pravilne krivulje iz razloga jer je većina uzorka miRNA ili degradirana RNA, odnosno riječ je o manjim fragmentima. Analizom fragmenata RNA (engl. *smear RNA analysis*) ustanovljeno je da je većina fragmenata manja od 200 nukleotida. Sukladno s veličinom fragmenata i niskom dobivenom koncentracijom RNA, teško je ispravno odrediti integritet RNA.



Slika 4. Elektroferogram RNA izolirane Q metodom dobiven na uređaju Bioanalyzer 2100 na primjeru jednog uzorka.

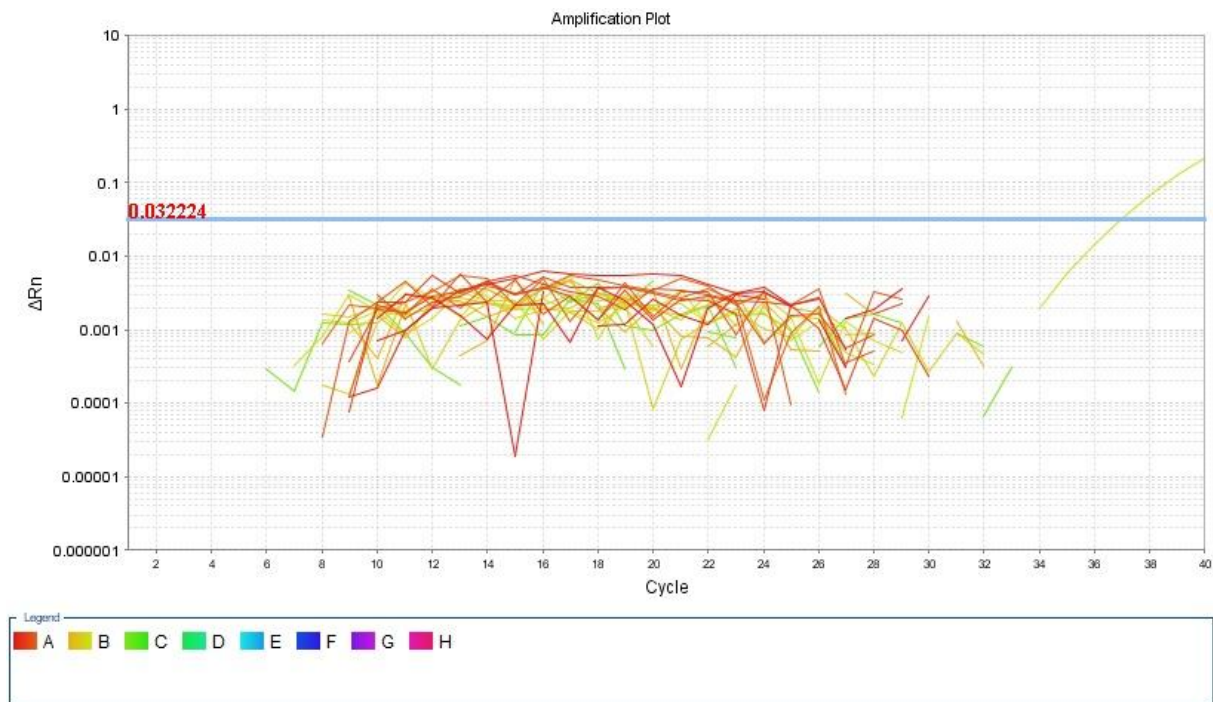


Slika 5. Elektroferogram RNA izolirane TF metodom dobiven na uređaju Bioanalyzer 2100 na primjeru jednog uzorka.

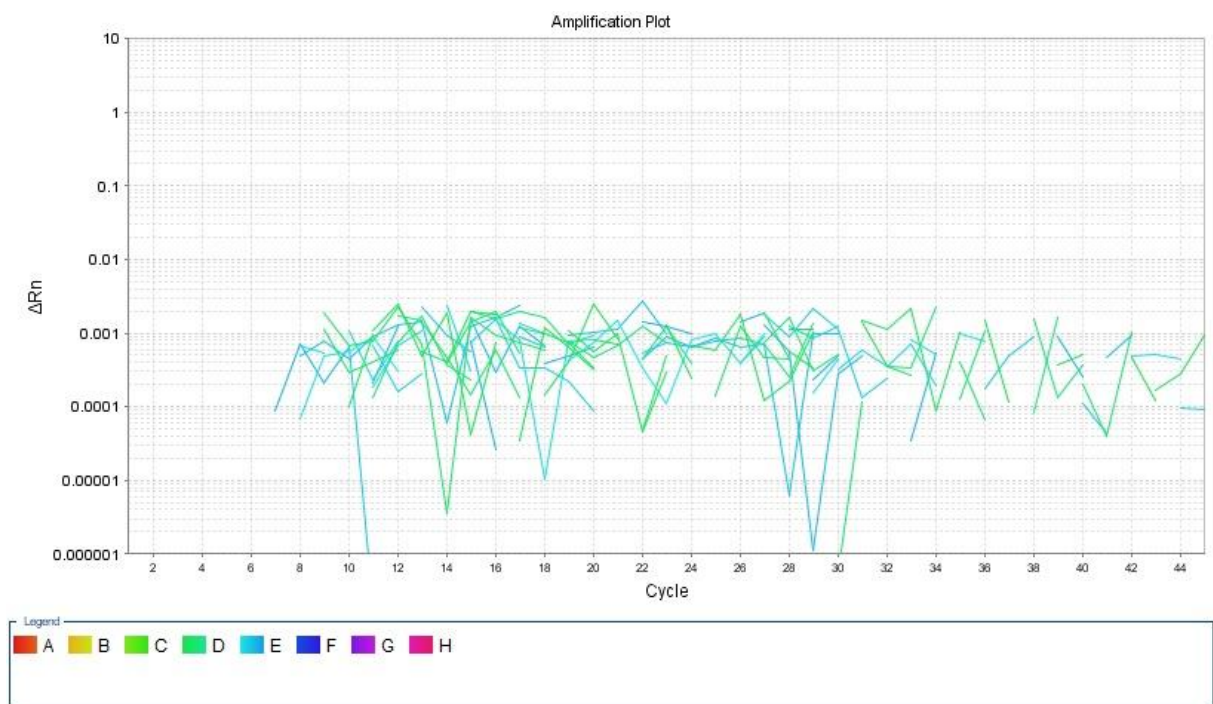
4.3. USPOREDBA EKSPRESIJE RNA REFERENTNIH GENA IZ UZORAKA IZOLIRANIH IZ EGZOSOMA METODAMA Q I TF

Ekspresija referentnih gena beta-2 mikroglobulina (*B2M*) i peptidilprolil izomeraze A (*PPIA*) određena je metodom Taqman qPCR u uzorcima RNA izolirane iz egzosoma metodama Q i TF.

B2M i *PPIA* su geni čija je ekspresija stabilna i konstantna u svim stanicama pa tako i u svim uzorcima prema kojoj se određuje relativna ekspresija ciljnih gena. Dobiveni rezultati (Slika 6. i 7.) ukazuju na činjenicu kako nije dobivena amplifikacija nakon 40 ciklusa. Razlog toga je prisutnost samo miRNA ili manje, odnosno degradirane RNA u uzorku.



Slika 6. Amplifikacijska krivulja ekspresije gena za beta-2 mikroglobulin i peptidilprolil izomerazu A dobivena Taqman metodom u uzorcima RNA izolirane iz egzosoma metodom Q.



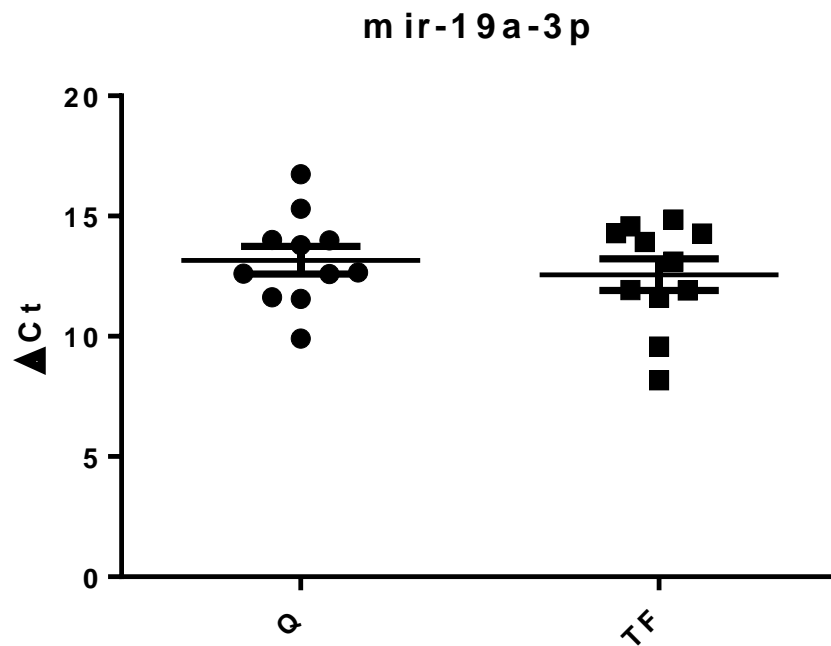
Slika 7. Amplifikacijska krivulja ekspresije gena za beta-2 mikroglobulin i peptidilprolil izomerazu A dobivena Taqman metodom u uzorcima RNA izolirane iz egzosoma metodom TF.

4.4. USPOREDBA EKSPRESIJE miRNA U UZORCIMA RNA IZ EGZOSOMA IZOLIRANIH METODAMA Q I TF

Određivana je ekspresija *miR-19a-3p* za čiju se ekspresiju pretpostavlja da bi trebala biti povišena, odnosno mora biti detektabilna u uzorcima egzosoma bolesnika s kolorektalnim karcinomom prema podacima iz literature (Matsumura i sur., 2015). Koristi se i *miR-103a-3p* kao referentna miRNA za uzorke egzosoma prema preporuci proizvođača i UniSp6 „*spike-in*“ RNA koju dodajemo u koraku reverzne transkripcije i trebala bi biti jednako eksprimirana u svim uzorcima te služi kao unutarnja kontrola. Također, koristi se za upravljanje potencijalnim predanalitičkim i analitičkim pogreškama tokom ekstrakcije RNA ili reverzne transkripcije. Računa se ΔC_t , tj. razlika između ciljane miRNA (*miR-19a-3p* i *miR-103a-3p*) i kontrolne UniSp6 „*spike-in*“ RNA zbog procjene ekspresije ciljane miRNA.

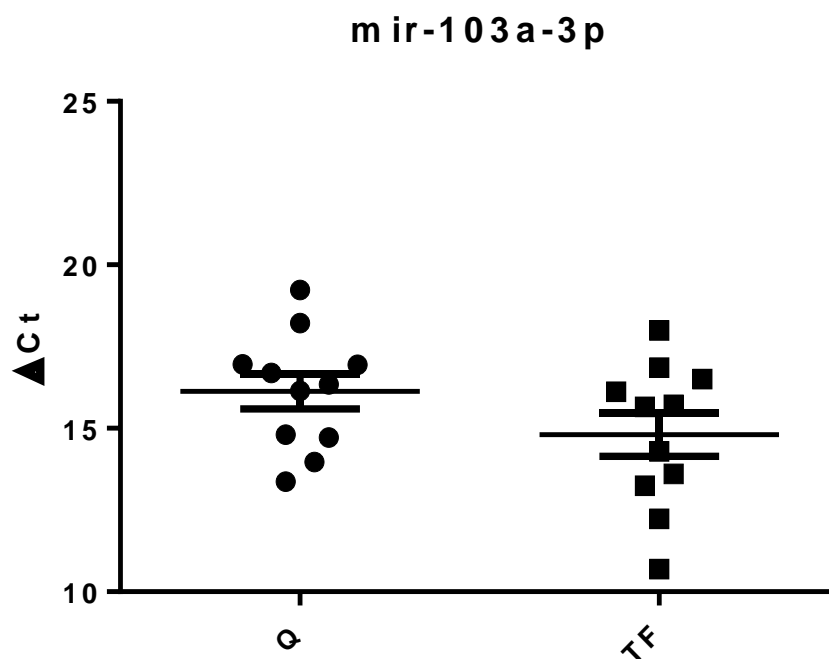
$$\Delta C_t = C_t (\text{ciljna miRNA}) - C_t (\text{UniSp6 ili referentni gen})$$

U svim uzorcima je detektirana *miR-19a-3p* kao što je i očekivano. Za metodu Q srednja vrijednost ΔC_t iznosi 13,17 s rasponom 9,90 - 16,74, dok je za metodu TF srednja vrijednost 12,56 s rasponom 8,17 - 14,85. Statistički gledano nije bilo značajne razlike između ekspresije miRNA određene ovim dvjema metodama ($P = 0,4131$).



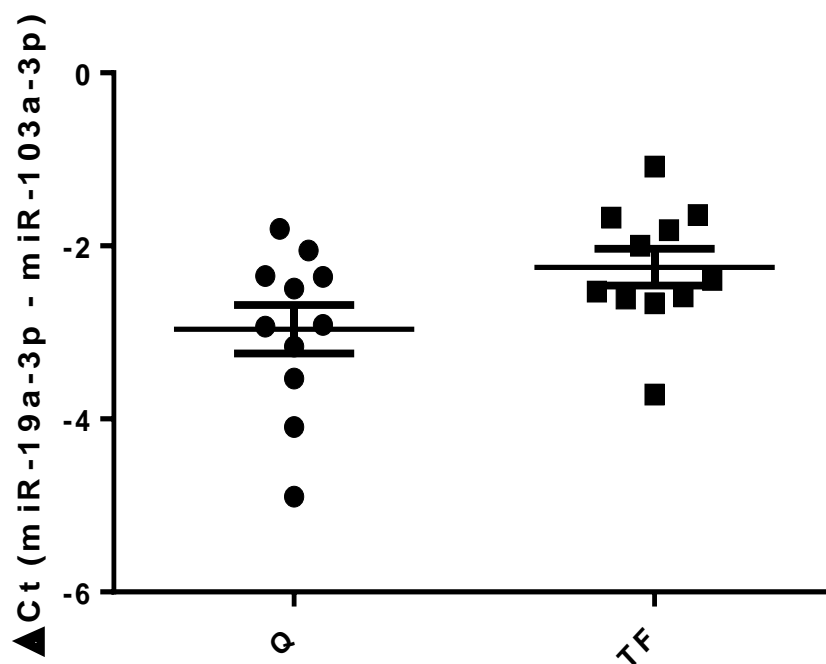
Slika 8. ΔC_t vrijednosti za *miR-19a-3p* korigirano na UniSp6 „*spike-in*“ RNA određene metodama Q i TF. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD, n=11.

Također, referentna miRNA *miR-103a-3p* detektirana je u svim uzorcima kao što je i očekivano. Za metodu Q srednja vrijednost ΔC_t iznosi 16,13 s rasponom 13,36 - 19,24, dok za metodu TF srednja vrijednost iznosi 14,81 s rasponom 10,70 - 17,99. Zaključak je kako ne postoji statistički značajna razlika između ekspresije miRNA određene dvjema metodama Q i TF ($P = 0,1230$).



Slika 9. ΔC_t vrijednosti za *miR-103a-3p* korigirano na UniSp6 „*spike-in*“ RNA određene metodama Q i TF. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD, n=11.

Kao posljednji korak, ekspresija *miR-19a-3p* izražava se u odnosu na ekspresiju *miR-103a-3p* kao referentnu miRNA. Za metodu Q srednja vrijednost ΔC_t iznosi -2,96 s rasponom od -4,90 do -1,80, dok za metodu TF srednja vrijednost iznosi -2,25 s rasponom od -3,72 do -1,08. Kao ni u prijašnjim slučajevima, ne postoji statistički značajna razlika između ekspresije miRNA određene ovim dvjema metodama ($P = 0,0830$).



Slika 10. Usporedba ΔC_t vrijednosti *miR-19a-3p* korigiranih za vrijednosti *miR-103a-3p* kao referentne miRNA određene metodama Q i TF. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD, n=11.

4.5. RASPRAVA

Egzosomi, kao skupina ekstracelularnih jednomembranskih vezikula, predstavljaju obećavajući dijagnostički i terapijski potencijal, no nedostatak dovoljno standardiziranih metoda za njihovu izolaciju i analizu ograničava uvođenje istih u kliničku praksu. Izolacija egzosoma naročito nije bila lagan zadatak znanstvenicima ponajviše zbog njihove heterogene prirode i sličnosti sa staničnom membranom (Zhu i sur., 2020). Metode su brojne i razlikuju se po ključnom mehanizmu svaka sa svojim određenim prednostima i nedostacima. Ipak, ne postoji idealna metoda za izolaciju egzosoma, ali daljnjom optimizacijom protokola, istraživanjima i kombinacijom tehnika bi se riješili određeni problemi s mogućom kliničkom primjenom kao krajnjim ciljem.

Općenito, miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Njemačka) omogućuje jednostavnu izolaciju ukupne RNA principom adsorpcije na kolonice, uključujući i miRNA bez upotrebe fenola, odnosno uklanja potrebu za odvajanjem faza, čineći metodu prikladnom za automatizaciju, bez ikakvog utjecaja na kvalitetu i prinos ukupne RNA. Uz već spomenutu

jednostavnost i kratko trajanje ekstrakcije pruža dodatnu prednost u usporedbi s kitovima drugih proizvođača. S druge strane, Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (ThermoFisher – Invitrogen, SAD) omogućuje izolaciju i ukupne RNA i proteina iz egzosoma precipitacijom. Prednost metode je visoki prinos ultra-čiste RNA koja se dobiva u kratkom vremenskom roku. Metode imaju različite principe pomoću kojih vrše potrebnu izolaciju, ali prednost kod obje metode podrazumijeva mogućnost izolacije RNA iz manje količine izoliranih egzosoma, što je u ovom slučaju bilo 200 μ L zbog ograničenih količina uzoraka.

Primarni zadatak ovog diplomskog rada bio je usporediti dvije metode (Qiagen i ThermoFisher) u svrhu standardizacije i optimizacije izolacije RNA iz egzosoma kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom. Općenito, potrebna je optimizacija protokola kako bi se dobila visokokvalitetna miRNA s visokim prinosom iz malih količina početnih uzoraka na ponovljiv način. Uspoređujući dvije metode od dva različita proizvođača ustanovljeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između metoda te da su metode jednakovrijedne. Točnije, uspoređivali su se rezultati dobivenih koncentracija izolirane RNA, kvaliteta i integritet te ekspresija referentne i ciljne miRNA, odnosno *miR-103a-3p* i *miR-19a-3p*. Zaključuje se kako se u svrhu određivanja ekspresije miRNA mogu koristiti obje metode bez značajne razlike u dobivenim rezultatima.

Uspoređujući metodu izolacije miRNAeasy Serum/Plasma Advanced Kit s ostalim metodama koje nisu bile korištene u ovom radu, metoda proizvođača Qiagen pokazuje najbolje rezultate. Za razliku od ostalih kitova, miRNAeasy Serum/Plasma Advanced Kit izolira ukupnu RNA obogaćenu i s RNA populacijom manjom od 200 nukleotida, dok ostale metode poput PureLink RNA, Monarch Total RNA i dr. omogućavaju izolaciju ukupne RNA populacije bez obogaćivanja za male RNA ili frakciju populacije RNA (Wright i sur., 2020). Osim prinosa, prednjači u nizu subjektivnih operativnih čimbenika poput jednostavnosti upotrebe i količine utrošenog vremena. Također, pokazuje manje varijacije između svježih i smrznutih uzoraka plazme, za razliku od drugih metoda poput Qucik-cfRNA koji pokazuje znatno lošije rezultate kada se primjenjuje na uzorke smrznute plazme (Wright i sur., 2020). Patel i sur. (2019) određivali su ukupni prinos egzosoma procjenom proteina iz intaktnih egzosoma te zaključuju kako kit koji se temelji na precipitaciji (Invitrogen) ima najveći prinos nakon kojeg slijedi gel-filtracijska kromatografija (iZON, qEVSsingle), komplet PureExo (101Bio) i diferencijalno ultracentrifugiranje. Također, metoda izolacije egzosoma MagCapture temeljena na afinitetu dala je najmanju količinu egzosoma.

Kolorektalni karcinom predstavlja jedan od ozbiljnijih globalnih problema zbog stalno rastućeg mortaliteta i prevalencije. Za staničnu preobrazbu do invazivnog karcinoma potrebna je složena interakcija između nasljedne sklonosti i vanjskih čimbenika i karakterizira ju dugotrajna i postupna presimptomatska faza. Riječ je o jednom od rijetkih tumora čiju se pojavu može na vrijeme spriječiti, ali i dalje se nalazi na trećem mjestu po učestalosti među svim zloćudnim novotvoreninama u svijetu (Brkić i Grgić, 2006). Postavlja se pitanje postoji li mogućnost razvoja učinkovite i strateške mjere prevencije kako bi uspjeli na vrijeme spriječiti razvoj karcinoma.

Tekuća biopsija predstavlja inovativnu i neinvazivnu metodu kojom se dobivaju informacije u stvarnom vremenu o sveukupnom tumoru analizirajući perifernu krv. Najznačajnija prednost metode odnosi se na razumijevanje heterogenosti tumora, no i dalje je čvrsto ograničena primjena unutar kliničke prakse.

Određivana je ekspresija ciljne miRNA *miR-19a-3p* za čiju se ekspresiju očekuje da će biti povišena u uzorcima bolesnika s kolorektalnim karcinomom prema podacima iz literature (Matsumura i sur., 2015). Koristi se i UniSp6 *spike-in* RNA koja služi kao unutarnja kontrola i treba biti jednako ekspimirana u svim uzorcima. S obzirom na određivanje ciljne miRNA, potrebno je odrediti ekspresiju i referentne miRNA, *miR-103a-3p* koja treba biti jednako ekspimirana i u zdravih populacije i kod populacije s kolorektalnim karcinomom. U svim uzorcima su detektirane obje miRNA, no uspoređujući međusobnu ekspresiju i same vrijednosti ΔC_t , vidljivo je kako je *miR-19a-3p* ekspimirana u većoj mjeri od *miR-103a-3p*. S obzirom na činjenicu da nije bilo uzoraka zdrave populacije kao kontrolne skupine te da procjena ekspresije miRNA kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom nije bio cilj ovog rada, ne mogu se donijeti prikladni i vjerodostojni zaključci na tu temu.

Unatoč svemu, egzosomalna miRNA predstavlja značajnu budućnost u ranoj dijagnostici i praćenju progresije kolorektalnog karcinoma te je pitanje vremena kada će službeno biti odrađena pravilna optimizacija i standardizacija izolacije egzosoma i miRNA iz periferne krvi i posljedično dospjeti u kliničku primjenu i rutinu rada.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih korištenjem metoda Qiagen i ThermoFisher može se zaključiti sljedeće:

- srednja vrijednost dobivenih koncentracija RNA za metodu Q iznosi 11,92 ng/ μ L s rasponom 2,43 – 38,08 ng/ μ L, dok za metodu TF srednja vrijednost iznosi 7,11 ng/ μ L s rasponom 1,20 – 13,48 ng/ μ L
- usporedbom rezultata koncentracija RNA dobivenih metodama Q i TF ustanovljeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između korištenih metoda
- analiza fragmenata RNA ukazuje na činjenicu da je većina fragmenata manja od 200 nukleotida; s obzirom na nisku koncentraciju RNA i veličinu fragmenata iste, teško je ispravno odrediti integritet RNA
- određivanjem ekspresije referentnih gena B2M i PPIA metodom Taqman qPCR u uzorcima RNA izolirane iz egzosoma metodama Q i TF može se zaključiti kako nije dobivena amplifikacija nakon 40 ciklusa; razlog je prisutnost isključivo miRNA ili manje, odnosno degradirane RNA u uzorku
- u svakom je uzorku detektirana ciljna miRNA, odnosno *miR-19a-3p* za čiju se ekspresiju pretpostavljalo da bi trebala biti povišena kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom
- srednja vrijednost ΔC_t za metodu Q iznosi 13,17 s rasponom 9,90 – 16,74, dok je za metodu TF srednja vrijednost ΔC_t 12,56 s rasponom 8,17 – 14,85 te se zaključuje kako nema statistički značajne razlike između ekspresije ciljne miRNA *miR-19a-3p* određene ovim dvjema metodama
- potvrđena je i prisutnost referentne miRNA *miR-103a-3p* koja je detektirana u svim uzorcima; srednja vrijednost za metodu Q iznosi 16,13 s rasponom 13,36 – 19,24, dok za metodu TF srednja vrijednost iznosi 14,81 s rasponom 10,70 – 17,99 te se

zaključuje kako ne postoji statistički značajna razlika između ekspresije referentne miRNA određene ovim dvjema metodama

- uspoređujući razliku ΔC_t za metodu Q srednja vrijednost iznosi -2,96 s rasponom od -4,90 do -1,80, dok je za metodu TF srednja vrijednost -2,25 s rasponom od -3,72 do -1,08 te kao ni u prijašnjim slučajevima, ne postoji statistički značajna razlika između ekspresije miRNA određene ovim dvjema metodama
- iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se u svrhu određivanja ekspresije miRNA može koristiti bilo koja od ove dvije metode bez značajnog utjecaja na rezultate, odnosno značajne razlike rezultata između dvije metode

6. POPIS KRATICA

APC	engl. <i>Adenomatous polyposis coli</i>
B2M	β -2 mikroglobulin (engl. <i>β-2 microglobulin</i>)
CD	engl. <i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>)
c-MYC	engl. <i>Cellular myelocytomatosis oncogene</i>
COX-2	ciklooksigenaza-2 (engl. <i>Cyclooxygenase-2</i>)
CRC	kolorektalni karcinom (engl. <i>Colorectal cancer</i>)
C _t	engl. <i>Threshold cycle</i>
DCC	engl. <i>Netrin receptor DCC</i>
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoksinukleozid trifosfat (engl. <i>Deoxynucleoside triphosphate</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ELISA	engl. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FRET	engl. <i>Fluorescence energy resonance transfer</i>
Hsp	protein toplinskog šoka (engl. <i>Heat shock protein</i>)
K-ras	engl. <i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
miRNA	mikro ribonukleinska kiselina (engl. <i>Micro ribonucleic acid</i>)
MMP	matriks metaloproteinaza
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>Messenger ribonucleic acid</i>)
NF κ B	nuklearni faktor κ B (engl. <i>Nuclear factor-κB</i>)
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PDCD4	engl. <i>Programmed cell death protein 4</i>

PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PPIA	peptidil-prolil-izomeraza A
PTEN	engl. <i>Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10</i>
Q	metoda Qiagen
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. <i>Quantitative polymerase chain reaction</i>)
RAS/MEK/ERK	engl. <i>Rat sarcoma virus/Mitogen-activated protein kinase/Extracellular-signal-regulated kinase</i>
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>Ribonucleic acid</i>)
TF	metoda ThermoFisher
TGF- β	engl. <i>Transforming growth factor β</i>
TIMP-1	tkivni inhibitor metaloproteinaza 1
TNF	faktor tumorske nekroze (engl. <i>Tumor necrosis factor</i>)
TP53	engl. <i>Tumor protein 53</i>
TPM1	engl. <i>Tropomyosin 1</i>
UPS	ubikvitinsko-proteasomski sustav
WNT	engl. <i>Wingless-related integration site</i>

7. LITERATURA

Badžek, S., Lesko Kelović, V., Pleština, S., Prejac, J., Majerović, M., Augustin, G. Unutarstanični signalni putevi u karcinogenezi kolorektalnog tumora. *Acta Chirurgica Croatica*, 2020, 9 (1), 25-34

Brkić, T., Grgić, M. 'Kolorektalni karcinom'. *Medicus*, 2006, 15(1_Gastroenterologija), 89-97

Cheng X., Xu X., Chen D., Zhao F., Wang W. Therapeutic potential of targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in colorectal cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 473-481

Dai J., Su Y., Zhong S., Cong L., Liu B., Yang J., Jiang, Y. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5(1).

Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 2019, 15;8(7):727

Epidemiologija raka debelog crijeva u Hrvatskoj, 2022., <http://www.hzjz.hr>, pristupljeno 26.9.2022.

Fu F., Jiang W., Zhou L., Chen Z. Circulating Exosomal miR-17-5p and miR-92a-3p Predict Pathologic Stage and Grade of Colorectal Cancer. *Translational Oncology*, 2018, 11(2), 221–232

Kalluri R., LeBleu V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020, 367(6478)

Lässer C., Seyed Alikhani V., Ekström K., Eldh M., Torregrosa Paredes P., Bossios A., Valadi H. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal of Translational Medicine*, 2011, 9(1), 9

Li J, Ma X, Chakravarti D, Shalapour S, DePinho RA. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes Dev*, 2021, 35(11-12):787-820

Majerović M., Opačić M., Rustemović N., Opačić D. Endoskopske inovacije u dijagnostici i liječenju kolorektalnog karcinoma. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti*, 2015, (522=41), 144-144

Matsumura T, Sugimachi K, Iinuma H, Takahashi Y, Kurashige J, Sawada G, Ueda M, Uchi R, Ueo H, Takano Y, Shinden Y, Eguchi H, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Ochiya T, Mimori K. Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2015, 113(2):275-81

Patel G.K., Khan M.A., Zubair H. *et al.* Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Sci Rep*, 2019, 9, 5335

Pegtel, D. M., & Gould, S. J. Exosomes. *Annu. Rev. Biochem.*, 2019, 88(1), 487–514

Periša J., Bulić P., Špacir Prskalo Z., Gaće M. i Mayer Lj. Mogućnost tekuće biopsije u kliničkoj praksi. *Libri Oncologici*, 2017, 45 (1), 23-0

Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(1):13-21

Tsukamoto M, Iinuma H, Yagi T, Matsuda K, Hashiguchi Y. Circulating Exosomal MicroRNA-21 as a Biomarker in Each Tumor Stage of Colorectal Cancer. *Oncology*, 2017, 92(6):360-370

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6):654-9

Verbanac D., Čeri A., Hlapčić I., Shakibaei M., Brockmueller A., Krušlin B., Ljubičić N., Baršić N., Detel D., Batičić L., Rumora L., Somborac-Baćura A., Štefanović M., Čelap I., Demirović A., Petlevski R., Petrik J., Grdić Rajković M., Hulina-Tomašković A., Rako I., Saso L., Barišić K. Profiling Colorectal Cancer in the Landscape Personalized Testing - Advantages of Liquid Biopsy. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9), 4327

Wilcoxon Signed Ranks Test, 2022., <https://www.statisticssolutions.com>, pristupljeno 25.10.2022.

Wilcoxon test (paired samples), 2022., <https://www.medcalc.org>, pristupljeno 25.10.2022.

Wright K., de Silva K., Purdie A.C., Plain K.M. Comparison of methods for miRNA isolation and quantification from ovine plasma. *Sci Rep*, 2020, 10, 825

Yamada T, Matsuda A, Koizumi M, Shinji S, Takahashi G, Iwai T, Takeda K, Ueda K, Yokoyama Y, Hara K, Hotta M, Matsumoto S, Yoshida H. Liquid Biopsy for the Management of Patients with Colorectal Cancer. *Digestion*, 2019, 99:39-45

Zhu L., Sun HT, Wang S., Huang SL, Zheng Y., Wang CQ, Hu BY, Qin W., Zou TT, Fu Y., Shen XT, Zhu WW, Geng Y., Lu L., Jia HL, Qin LX, Dong QZ. Isolation and characterization of exosomes for cancer research. *J Hematol Oncol*, 2020, 10;13(1):152

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1. SAŽETAK

Kolorektalni karcinom (CRC) predstavlja ozbiljan dijagnostički i terapijski problem na globalnoj razini zbog stalno rastuće prevalencije. Multifaktorska je bolest, specifične etiologije za svakog bolesnika te je potrebna serija genskih mutacija tokom dužeg razdoblja za razvoj invazivnog karcinoma.

Egzosomi koji potječu iz stanica kolorektalnog karcinoma sadrže molekule miRNA koje se povezuju s lošom prognozom tako što potiču proliferaciju, migraciju i invazivnost tumorskih stanica te predstavljaju potencijalan biomarker pokazujući značajnu korelaciju s patološkim stanjem i progresijom kolorektalnog karcinoma. Tekuća biopsija je neinvazivna metoda kojom se mogu izolirati cirkulirajući egzosomi i miRNA iz uzorka krvi što može voditi velikom napretku u ranoj dijagnostici karcinoma kao i u njegovom praćenju.

Cilj diplomskog rada je usporediti metode Qiagen i ThermoFisher za izolaciju molekula RNA iz egzosoma kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom. Početni je uzorak puna krv iz čije se plazme izolira egzosomalna RNA metodom precipitacije i organske ekstrakcije. Koncentracija dobivene RNA određuje se spektrofotometrijski, dok se kvaliteta i integritet određuju metodom kapilarne elektroforeze. Ekspresija referentnih gena *B2M* i *PPIA* određena je metodom Taqman qPCR prema kojoj se određuje relativna ekspresija ciljnih gena. Također, uspoređuje se ekspresija ciljne miRNA (*miR-19a-3p*) za čiju se ekspresiju pretpostavlja da bi trebala biti povišena kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom te referentne miRNA *miR-103a-3p* u odnosu na „spike-in“ miRNA UniSp6.

Iz dobivenih se rezultata može zaključiti kako ne postoji statistički značajna razlika između metoda Qiagen i ThermoFisher, odnosno metode su jednakovrijedne i može se koristiti bilo koja od dvije metode za određivanje ekspresije miRNA bez značajne razlike u rezultatima. Unatoč niskoj koncentraciji izolirane RNA, uzorci su dovoljno kvalitetni za određivanje ekspresije miRNA. Sukladno tome, potvrđuje se prisutnost referentne (*miR-103a-3p*) i ciljne (*miR-19a-3p*) miRNA u svim uzorcima.

8.2. SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) represents a serious diagnostic and therapeutic problem at the global level due to its ever-increasing prevalence. It is a multifactorial disease, with a specific etiology for each patient, and a series of gene mutations over a longer period is required for the development of invasive cancer.

Exosomes from colorectal cancer cells contain miRNA molecules that are associated with poor prognosis by promoting the proliferation, migration, and invasiveness of tumor cells. Furthermore, they represent a potential biomarker showing a significant correlation with the pathological state and progression of colorectal cancer. Liquid biopsy is a non-invasive method that can isolate circulating exosomes and miRNAs from a blood sample, which could lead to great progress in the early diagnosis of cancer as well as in its monitoring.

The aim of this thesis is to compare the Qiagen and ThermoFisher methods for the isolation of RNA molecules from exosomes in patients with colorectal cancer. The initial sample is whole blood where exosomal RNA is isolated by precipitation and organic extraction from plasma exosomes. The concentration of the obtained RNA is determined spectrophotometrically, while the quality and integrity are determined by the capillary electrophoresis method. The expressions of reference genes B2M and PPIA were determined by the Taqman qPCR method, which determines the relative expression of the target genes. Additionally, the expression of the target miRNA (*miR-19a-3p*) is compared, as it is supposed to be elevated in patients with colorectal cancer and reference miRNA *miR-103a-3p* relative to “spike-in” miRNA UniSp6.

In conclusion, there was no statistically significant difference between the Qiagen and ThermoFisher methods, therefore, the methods could be considered equivalent and either of the two can be used to determine miRNA expression without a significant difference in results. Despite the low concentration of isolated RNA, the samples are of sufficient quality to determine miRNA expression. Accordingly, the presence of reference (*miR-103a-3p*) and target (*miR-19a-3p*) miRNA is confirmed within all samples.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

USPOREDBA METODA ZA IZOLACIJU RNA IZ UZORAKA EGZOSOMA BOLESNIKA S KOLOREKTALNIM KARCINOMOM

Marko Borović

SAŽETAK

Kolorektalni karcinom (CRC) predstavlja ozbiljan dijagnostički i terapijski problem na globalnoj razini zbog stalno rastuće prevalencije. Multifaktorska je bolest, specifične etiologije za svakog bolesnika te je potrebna serija genskih mutacija tokom dužeg razdoblja za razvoj invazivnog karcinoma. Egzosomi koji potječu iz stanica kolorektalnog karcinoma sadrže molekule miRNA koje se povezuju s lošom prognozom tako što potiču proliferaciju, migraciju i invazivnost tumorskih stanica te predstavljaju potencijalan biomarker pokazujući značajnu korelaciju s patološkim stanjem i progresijom kolorektalnog karcinoma. Tekuća biopsija je neinvazivna metoda kojom se mogu izolirati cirkulirajući egzosomi i miRNA iz uzorka krvi što može voditi velikom napretku u ranoj dijagnostici karcinoma kao i u njegovom praćenju. Cilj diplomskog rada je usporediti metode Qiagen i ThermoFisher za izolaciju molekula RNA iz egzosoma kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom. Početni je uzorak puna krv iz čije se plazme izolira egzosomalna RNA metodom precipitacije i organske ekstrakcije. Koncentracija dobivene RNA određuje se spektrofotometrijski, dok se kvaliteta i integritet određuju metodom kapilarne elektroforeze. Ekspresija referentnih gena *B2M* i *PPIA* određena je metodom Taqman qPCR prema kojoj se određuje relativna ekspresija ciljnih gena. Također, uspoređuje se ekspresija ciljne miRNA (*miR-19a-3p*) za čiju se ekspresiju pretpostavlja da bi trebala biti povišena kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom te referentne miRNA *miR-103a-3p* u odnosu na „spike-in“ miRNA UniSp6. Iz dobivenih se rezultata može zaključiti kako ne postoji statistički značajna razlika između metoda Qiagen i ThermoFisher, odnosno metode su jednakovrijedne i može se koristiti bilo koja od dvije metode za određivanje ekspresije miRNA bez značajne razlike u rezultatima. Unatoč niskoj koncentraciji izolirane RNA, uzorci su dovoljno kvalitetni za određivanje ekspresije miRNA. Sukladno tome, potvrđuje se prisutnost referentne (*miR-103a-3p*) i ciljne (*miR-19a-3p*) miRNA u svim uzorcima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 44 stranica, 10 grafičkih prikaza, 1 tablica i 22 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kolorektalni karcinom, egzosomi, miRNA, Qiagen, ThermoFisher

Mentor: **Dr. sc. Andrea Hulina Tomašković**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Andrea Hulina Tomašković**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Anita Somborac Bačura, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Lidija Bach Rojecky, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: travanj, 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

COMPARISON OF METHODS FOR THE ISOLATION OF RNA FROM EXOSOME SAMPLES OF PATIENTS WITH COLORECTAL CARCINOMA

Marko Borović

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) represents a serious diagnostic and therapeutic problem at the global level due to its ever-increasing prevalence. It is a multifactorial disease, with a specific etiology for each patient, and a series of gene mutations over a longer period is required for the development of invasive cancer. Exosomes from colorectal cancer cells contain miRNA molecules that are associated with poor prognosis by promoting the proliferation, migration, and invasiveness of tumor cells. Furthermore, they represent a potential biomarker showing a significant correlation with the pathological state and progression of colorectal cancer. Liquid biopsy is a non-invasive method that can isolate circulating exosomes and miRNAs from a blood sample, which could lead to great progress in the early diagnosis of cancer as well as in its monitoring. The aim of this thesis is to compare the Qiagen and ThermoFisher methods for the isolation of RNA molecules from exosomes in patients with colorectal cancer. The initial sample is whole blood where exosomal RNA is isolated by precipitation and organic extraction from plasma exosomes. The concentration of the obtained RNA is determined spectrophotometrically, while the quality and integrity are determined by the capillary electrophoresis method. The expressions of reference genes B2M and PPIA were determined by the Taqman qPCR method, which determines the relative expression of the target genes. Additionally, the expression of the target miRNA (*miR-19a-3p*) is compared, as it is supposed to be elevated in patients with colorectal cancer and reference miRNA *miR-103a-3p* relative to “spike-in” miRNA UniSp6. In conclusion, there was no statistically significant difference between the Qiagen and ThermoFisher methods, therefore, the methods could be considered equivalent and either of the two can be used to determine miRNA expression without a significant difference in results. Despite the low concentration of isolated RNA, the samples are of sufficient quality to determine miRNA expression. Accordingly, the presence of reference (*miR-103a-3p*) and target (*miR-19a-3p*) miRNA is confirmed within all samples.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 44 pages, 10 figures, 1 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Colorectal carcinoma, exosomes, miRNA, Qiagen, ThermoFisher

Mentor: **Andrea Hulina Tomašković, Ph.D.** /Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor,
University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Andrea Hulina Tomašković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Anita Somborac Bačura, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lidija Bach Rojecky, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April, 2023.

