

**Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko – biokemijski fakultet**

DIPLOMSKI RAD

Matej Barišić

Zagreb, 2022

Matej Barišić

**Optimizacija metode za određivanje transkripata
RNA i miRNA u uzorcima egzosoma pacijenata s
kolorektalnim karcinomom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc.dr.sc. Andrei Hulini Tomašković na izdvojenom vremenu, stručnom vodstvu te izuzetno korisnim, brzim i jasnim odgovorima i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima i braći na strpljenu i potpori pruženoj tijekom cijelog školovanja te na svim prilikama koje su mi omogućili zaključno sa ovom da studiranje, ali ne i učenje privedem kraju.

Zahvaljujem se i prijateljima koji su uz mene prolazili sve ispite i vježbe te cimeru koji mi je davao mir prije ispita. Uz njih je studiranje bilo zabavno.

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



SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 KOLOREKTALNI KARCINOM (CRC).....	1
1.2 ETIOLOGIJA CRC-a.....	1
1.3 MOLEKULARNE PROMJENE U CRC-u.....	2
1.4 DIJAGNOSTIKA CRC-a.....	4
1.5 TEKUĆA BIOPSIJA.....	5
1.6 EGZOSOMI.....	6
1.7 RNA I miRNA U EGZOSOMIMA.....	8
1.8 METODE ZA ODREĐIVANJE EKSPRESIJE RNA I miRNA.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	12
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1 VAĐENJE KRVI PACIJENTIMA SA POTVRĐENIM CRC-om.....	13
3.2 QIAGEN METODA ZA IZOLACIJU EGZOSOMA.....	13
3.3 IZOLACIJA RNA.....	14
3.4 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE I KVALITETE RNA.....	16
3.5 SINTEZA cDNA IZ mRNA.....	17
3.6 TAQMAN METODA ZA mRNA.....	18
3.7 DETEKCIJA miRNA IZ EGZOSOMA POMOĆU qPCR-a.....	19
3.7.1 REVERZNA TRANSKRIPCIJA.....	19
3.7.2. q PCR.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	23
4.1 KONCENTRACIJA I KVALITETA RNA.....	23
4.2 OPTIMIZACIJA ODREĐIVANJA EKSPRESIJE mRNA ZA C-MYC.....	25
4.3 OPTIMIZACIJA ODREĐIVANJA EKSPRESIJE miRNA.....	26
4.3.1. ODREĐIVANJE ULAZNOG VOLUMENA miRNA.....	26
4.3.2 REFERENTNI GENI ZA miRNA.....	27
4.3.3 EKSPRESIJA miRNA U UZORCIMA.....	29
5. ZAKLJUČCI.....	34
6. POPIS KRATICA I SIMBOLA.....	35
7. LITERATURA.....	37
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	41

8.1 SAŽETAK.....	41
8.2 SUMMARY.....	42

1. UVOD

1.1 KOLOREKTALNI KARCINOM (CRC)

Kolorektalni karcinom (rak debelog crijeva) treći je po učestalosti među svim zloćudnim tumorima u svijetu, dok u Hrvatskoj zauzima prvo mjesto i kod muškaraca i kod žena. U svijetu se godišnje otkrije oko 2 milijuna novih slučajeva, a umre oko 950 000 ljudi. Godišnja stopa oboljenja u Hrvatskoj iznosi 3600 osoba od čega je 60 % muškaraca, a umre 2100 ljudi, od čega također 60 % muškaraca (www.hzjz.hr). Karcinogeneza ovog karcinoma vrlo je komplicirana, a dosadašnja istraživanja mehanizama njegova nastanka i progresije pokazala su uključenost barem tri različita puta kao što su: kromosomska nestabilnost kao najčešći uzrok, zatim mikrosatelitska nestabilnost, epigenetska nestabilnost i dr. koje dovode do promjene epitelnih stanica kolona u invazivne i agresivne adenokarcinome (Colussi i sur. 2013). Genetička podloga CRC-a također je složena, ali novija istraživanja pokazuju kako različite RNA, miRNA i drugi genski produkti koji se mogu pronaći u egzosomima iz krvi pacijenata sa kolorektalnim karcinomom potencijalno mogu služiti kao predikcijski ličak terapijski biljezi ove visoko rasprostranjene bolesti (Danese i sur. 2017).

1.2 ETIOLOGIJA CRC-a

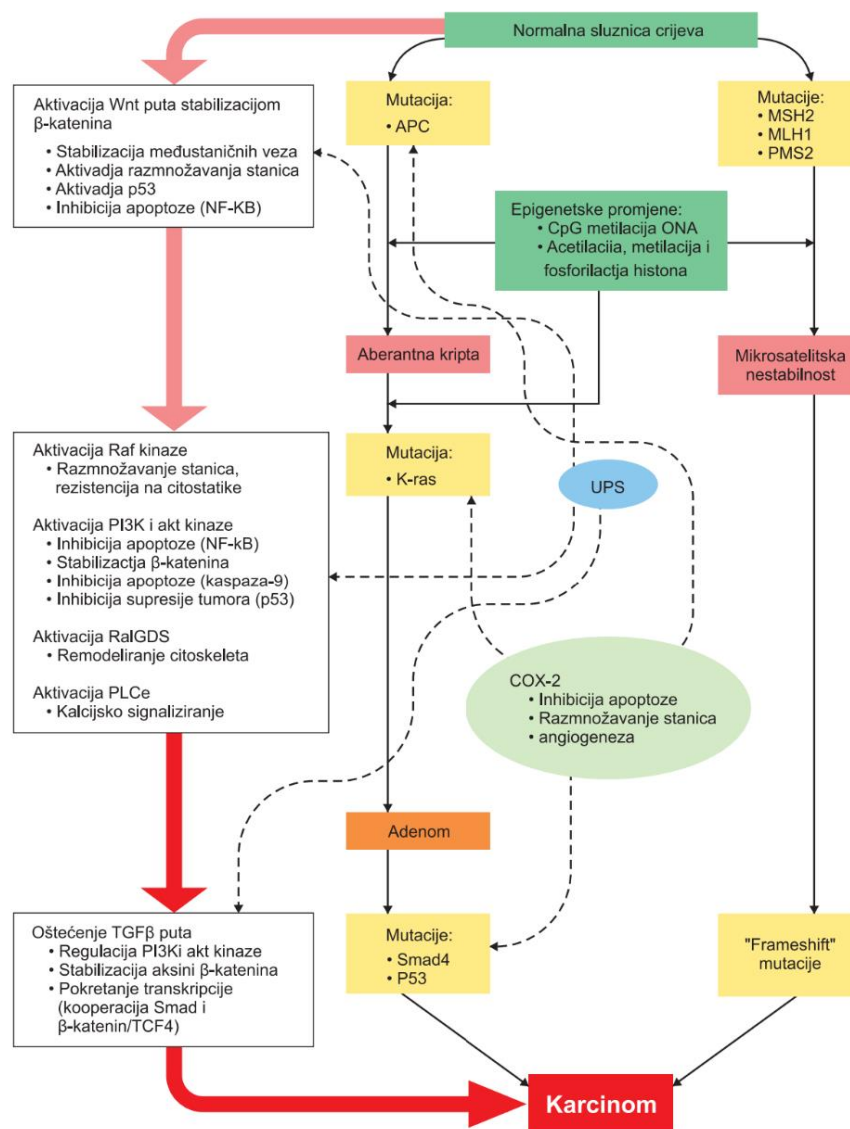
Budući da se radi o multifaktorskoj bolesti, etiologija CRC-a razlikuje se od bolesnika do bolesnika. U 70-90 % pacijenata kolorektalni karcinom nastaje sporadično mutacijama više gena kao što su *APC* (engl. *Adenomatous polyposis coli*), *KRAS* (engl. *Kirsten rat sarcoma virus*), *TP53* (engl. *Tumor protein 53*), *TGF- β* (engl. *transforming growth factor β*) i dr. U 10-30 % slučajeva nastaje nasljedno kod osoba s pozitivnom obiteljskom anamnezom na CRC ili adenome, dok je u 1-5 % pacijenata posljedica nasljednog polipoznog i nepolipoznog sindroma (engl. *FAP-Familial adenomatous polyposis* i *HNPCC* engl. *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) (Verbanac i sur. 2021). Postoje brojni čimbenici koji povećavaju rizik za nastanak CRC-a, a jedan od njih je i dob. Rizik raste nakon četrdesete godine sa značajnim porastom između 50. i 55. godine života, a svakim sljedećim desetljećem života rizik se udvostručuje te u konačnici doseže eksponencijalni rast (Brkić i Grgić, 2006). Od

vanjskih čimbenika koji povećavaju rizik za nastanak CRC-a u literaturi se spominje prehrana bogata mastima životinjskog podrijetla, fizička neaktivnost, alkohol i pušenje. Bez obzira jesu li nasljedni ili sporadični, većina kolorektalnih karcinoma nastaje iz, na početku benignih adenomatoznih polipa koji postaju maligni nakon niza genskih mutacija i promjena signalnih puteva u epitelnim stanicama kolona (Brkić,2012) .

1.3 MOLEKULARNE PROMJENE U CRC-u

Kako bi benigni polip postao tumor, potrebna je mutacija barem četiri ili pet različitih gena (Fearon i Vogelstein 1990). Jedan od bitnijih gena u patogenezi kolorektalnog karcinoma je ciklooksigenaza-2 (COX-2). Dobro je poznato da je u mnogim karcinomima, pa tako i u ovome pojačana ekspresija tog upalnog enzima u tumorskom tkivu. Uz pojačanu ekspresiju COX-2 posljedično se sintetizira mnoštvo proupalnih citokina koji uzrokuju niz unutarstaničnih procesa odgovornih za inhibiciju apoptoze, pojačavanje angiogeneze i pojačavanje invazivnosti tumorskih stanica (Badžek i sur, 2012). Hiperaktivacija WNT (engl. *wingless-related integration sites*) puta, kao jednog od bitnijih regulatora homeostaze i popravka tkiva, vrlo je česta kod CRC-a (Verbanac i sur. 2021). Mutacija APC gena koji je regulator WNT puta predstavlja najznačajniju promjenu u ovoj kaskadi. Mutacijama na tom putu i posljedičnom inhibicijom kinaze glikogen sintaze-3 β (*GSK3 β*) dolazi do stabilizacije i nakupljanja β -katenina u staničnoj jezgri što rezultira pojačanom transkripcijom dvadesetak gena uključenih u procese metastaziranja i stanične proliferacije te smanjenom transkripcijom gena zaduženih za apoptozu (Badžek i sur. 2012). Mutacije APC gena pronađene su uglavnom u ranim fazama nastanka adenoma i prelaska u karcinom (Fodde i sur. 2001). Aktivacija WNT puta uzrokuje i povišenu ekspresiju *C-MYC* gena kojeg su Toon i suradnici (2014.) odredili kao potencijalni prognostički biljeg za preživljavanje pacijenata s kolorektalnim karcinomom. Za prelazak iz adenoma u karcinom potrebne su dodatne mutacije. Jedna od tih je i aktivacija *KRAS* onkogeno koja se pojavljuje u 50 % sporadičnih slučajeva CRC-a (Fodde i sur 2001). Mutacijom ovog onkogeno pokreću se četiri dodatne kaskade uključene u procese razmnožavanja, inhibicije apoptoze te promocije angiogeneze (Badžek i sur. 2012). TGF- β put još je jedna bitna kaskada u karcinogenezi CRC-a u kojoj sudjeluje na nekoliko razina. On

djeluje kao tumor supresor, inhibirajući proliferaciju epitelnih stanica, a s druge strane može stimulirati malignu progresiju u kasnijim fazama inducirajući prijelaz iz epitelnih u mezenhimalne stanice (Iglesias i sur. 2000). Promjene na TGF- β putu povezane su sa kromosomskom nestabilnošću (CIN) i izostankom djelovanja tumor supresorskih gena *SMAD2* i *SMAD4* (Verbanac i sur. 2021). Konačno, kao kasni događaj u karcinogenezi kolorektalnog karcinoma dolazi do mutacije p53 proteina. To je transkripcijski čimbenik koji može pokrenuti i procese preživljavanja i procese apoptoze stanice, a put kojim će krenuti stanica ovisi o njegovoj fosforilaciji ili o kofaktorima koji se uz njega vežu na razini transkripcije. U karcinogenezi kolorektalnog karcinoma glavnu ulogu ima u kontroli β -kateninskog sustava (Badžek i sur. 2012). Navedene mutacije uglavnom uzrokuju karcinome u distalnom dijelu kolona koje karakterizira brz nastanak i razvoj. Karcinomi nastali u proksimalnom dijelu kolona uglavnom imaju diploidnu DNA, mikrosatelitske nestabilnosti te mutacije u genima zaduženim za popravak DNA kao što su *MSH2*, *MLH1* i *PMS2* (Slika 1). Takve mutacije su manje agresivne i pojavljuju se uglavnom u nasljednom nepolipoznom kolorektalnom karcinomu (engl. *HNPCC hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) (Lynch i de la Chapelle, 2003).



Slika 1. Unutarstanični signalni putevi u karcinogenezi CRC-a (preuzeto od Badžek i sur, 2012, <https://hrcak.srce.hr/87727>)

1.4 DIJAGNOSTIKA CRC-a

S obzirom na navedene unutarstanične signalne puteve u karcinogenezi kolorektalnog karcinoma može se zaključiti da se radi o multifaktorskoj bolesti čija učestalost i smrtnost i dalje raste. Negativni trendovi rasta incidencije i smrtnosti nameću potrebu za ranim otkrivanjem i po mogućnosti sprječavanjem razvoja ove bolesti. U Hrvatskoj je iz tog razloga u organizaciji Ministarstva zdravlja 2007. godine započeo nacionalni program ranog otkrivanja kolorektalnog karcinoma u kojem su na sudjelovanje

pozvani svi građani u dobi između 50. i 70. godine života. Program se sastoji od testiranja na okultno krvarenje u stolici metodama koje su se eksperimentalno dokazale kao, za sada najučinkovitija strategija u ranom otkrivanju ovog karcinoma. Postoje dvije glavne vrste testova na okultno krvarenje u stolici. To su gvajakov test koji se temelji na peroksidativnoj aktivnosti hemoglobina i njegovih razgradnih produkata koji oksidiraju fenolske gvajakove spojeve pri čemu nastaje plava boja, te imunokemijski test koji se temelji na reakciji antitijela sa globulinskim dijelom hemoglobina (Brkić i Grgić, 2006). Testovi na okultno krvarenje u stolici predstavljaju stratifikacijski korak za daljnju obradu ispitanika kojima se pronađu tragovi krvi u uzorku. Svi ispitanici s pozitivnim testom šalju se na kolonoskopiju. Unatoč brojnim nedostacima u vidu invazivnosti, skupocjenosti, neugodnosti i stresa za bolesnika te limitiranosti količine i reprezentativnosti uzorka, kolonoskopija je i dalje zlatni standard za potvrdu dijagnoze kolorektalnog karcinoma (Brkić i Grgić, 2006). Kako bi se izbjegli navedeni nedostaci, pojavljuje se potreba za pronalaskom metode koja bi bila pristupačna i ne invazivna te lako ponovljiva, a kao najbolje rješenje ističe se tekuća biopsija.

1.5 TEKUĆA BIOPSIJA

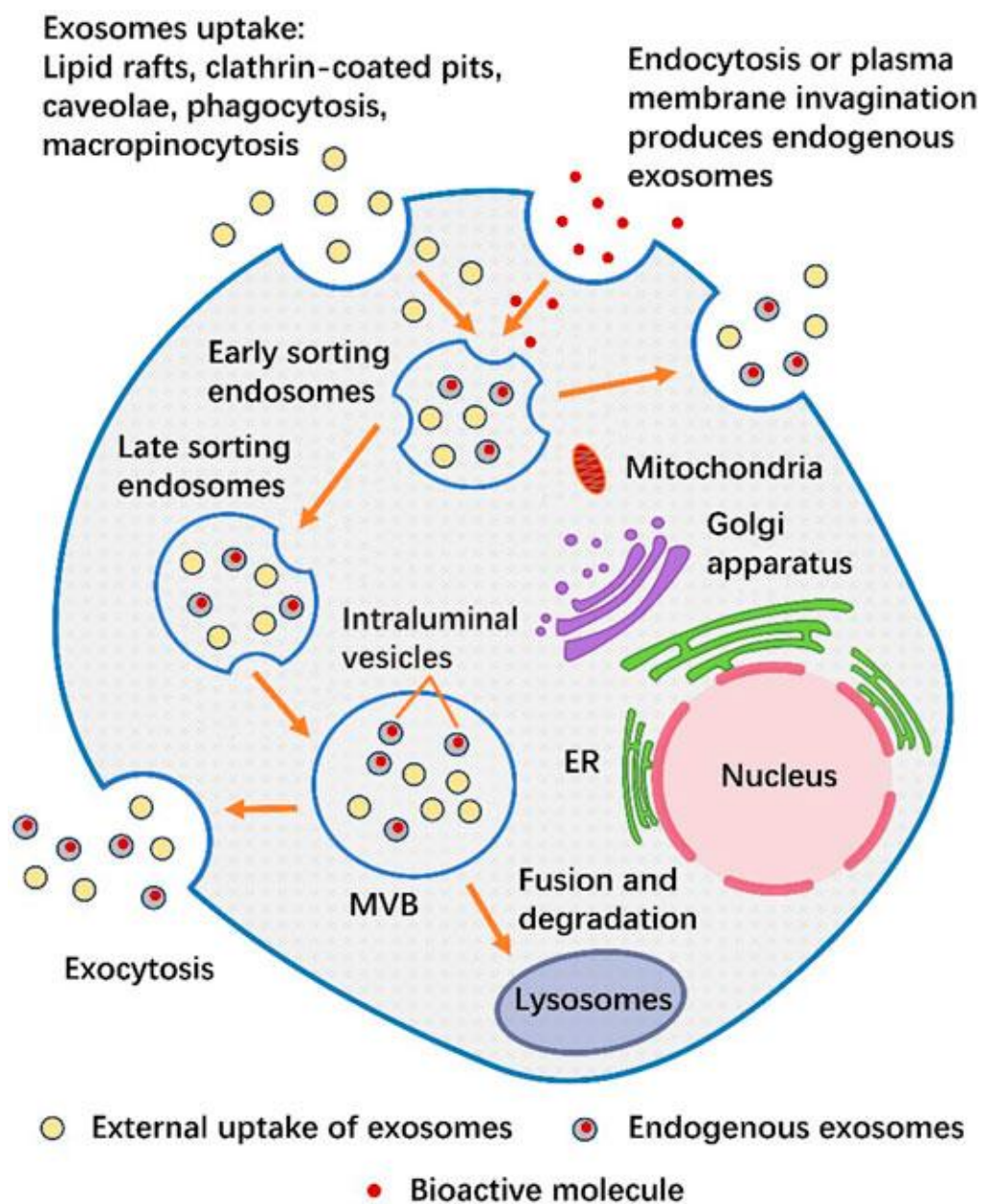
Tekuća biopsija neinvazivna je metoda kojom se mogu dobiti informacije o sveukupnom tumoru na molekularnoj razini koje se ne mogu dobiti biopsijom samo jednog dijela tumorskog tkiva. Razvila se iz potrebe za pronalaskom novih biomarkera u različitim tjelesnim tekućinama kao što su krv, slina, urin itd. (Verbanac i sur. 2021). Tekuća biopsija sve više se koristi u procjeni statusa bolesnika koji boluju od tumora zbog njezinih višestrukih prednosti nad biopsijom tkiva. Naime biopsija tkiva zahtijeva operativni postupak i uzimanje dijelova tkiva koji, ovisno o lokalizaciji tumora, mogu biti teško dostupni (Poulet i sur. 2019.). Nadalje, prisutnost različitih tumorskih sijela dodatno otežava karakterizaciju tumora iz samo jednog uzorka tkiva. Ponovno uzorkovanje uzrokuje stres za bolesnika i njegov organizam, a količina tkiva može biti nedostatna za daljnja istraživanja. Tekuća biopsija krvi jednostavan je i rutinski postupak vađenja krvi iz koje se kasnije izoliraju tražene komponente. Tumorsko tkivo heterogena je masa, a tekućom biopsijom u krvi možemo naći različite biološke materijale kao što su cirkulirajuće tumorske stanice, slobodne

nukleinske kiseline, egzosomi i ostali tumorski biljezi iz raznih dijelova karcinoma. Otkrićem egzosoma u krvi kao „komunikacijskih“ vezikula koje izlučuju sve, pa tako i tumorske stanice otvaraju se nove mogućnosti za dijagnozu i terapiju kolorektalnog karcinoma.

1.6 EGZOSOMI

Egzosomi su ekstracelularne, jednomembranske vezikule koje nastaju unutar endosomalnog sustava i promjera su između 30 i 200 nanometara (Pegtel i Gould, 2019). Zbog svoje topološke sličnosti sa staničnom membranom te malog i vrlo varijabilnog promjera znanstvenici su nailazili na probleme u njihovoj izolaciji i diferencijaciji. Bonucci (1967) i Anderson (1969) među prvima su, istražujući kalcifikaciju hrskavica, opisali male vezikule koje izlučuju hondrociti i koje imaju važnu ulogu kao inicijatori kristalizacije (Pegtel i Gould, 2019). Trams i sur. (1981) definirali su ih kao sekretorne vezikule koje „možda imaju fiziološku funkciju“. Daljnja istraživanja strukture i sastava egzosoma pokazala su da ove mikrovezikularne čestice imaju brojne i važne uloge u međustaničnoj komunikaciji, staničnoj signalizaciji, obnovi tkiva, imunološkom odgovoru, razvoju tumora i metastaziranju (Verbanac i sur., 2021). Glavna karakteristika egzosoma je njihova heterogenost u veličini i sastavu pa tako i funkcijama koja proizlazi iz načina njihova nastanka. Naime egzosomi nastaju procesom koji uključuje duplu invaginaciju stanične membrane (Kalluri i S. Lebleu, 2020). Njihov put započinje sa unutrašnje strane plazmatske membrane koja se uvija prema unutra i stvara lipidnu vezikulu endosom (Slika 2). Endosom potom invaginacijom svoje membrane može „pokupiti“ razne molekule iz staničnog citosola kao što su proteini i nukleinske kiseline (mRNA, miRNA, DNA itd.) koje tako postaju dio egzosoma. Potom se endosom ponovno spaja sa plazmatskom membranom i otpušta egzosome izvan stanice. Tako nastali egzosomi u svom sastavu, kako u unutrašnjosti, tako i na površini imaju razne molekule koje određuju njihovu funkciju. Neke od tih molekula pronađene u egzosomima su: tetraspanini (CD81, CD82, CD37 i CD63), EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*), VGFR-2 (engl. *vascular endothelial growth factor receptor type-2*), IGFR-2 (engl. *insulin-like growth factor I receptor*), citokinski receptori, TGF- β (engl. *transforming growth factor β*), TNF (engl. *tumor necrosis factor*), ERM (engl. *eZRin-*

radixin-moesin), *Hg* (engl. *Hedgehog*) i proteini toplinskog šoka (*HSP*), *ICAM-1* (engl. *intracellular adhesion molecule-1*), *IGSF8* (engl. *immunoglobulin superfamily member 8*), *PTGFRN* (engl. *prostaglandin F2 receptor negative regulator*), sindekani, ubikvitin, wnt proteini i drugi. Niti jedan egzosom ne sadrži sve navedene molekule, ali ovo su samo neke pronađene u dosadašnjim istraživanjima (Pegtel i Gould, 2019). Egzosomi izolirani iz stanica kolorektalnog karcinoma potiču proliferaciju, migraciju i invazivnost drugih tumorskih stanica za što su odgovorne različite RNA molekule poput mRNA i miRNA (miR-17-92a, miR-19a, miR-210, miR193a i dr.) koje se povezuju sa lošom prognozom CRC-a (Verbanac i sur., 2021).



Slika 2. Nastanak egzosoma (preuzeto od Li i sur. 2022)

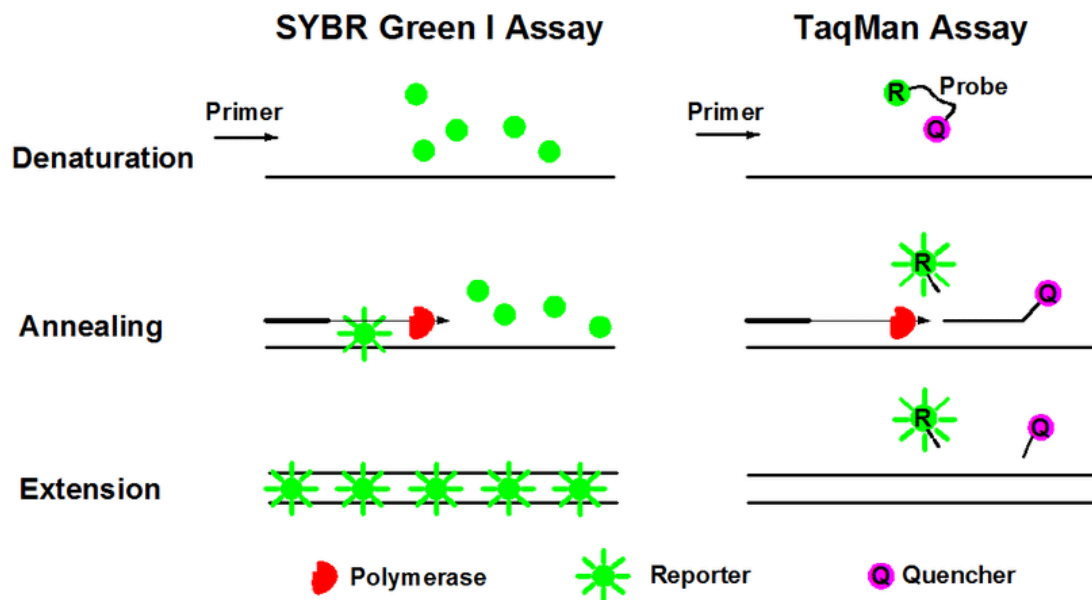
1.7 RNA i miRNA U EGZOSOMIMA

Osim već spomenutih mutacija gena odgovornih za nastanak kolorektalnog karcinoma, na proliferaciju stanica i opstanak karcinoma bitno utječu i RNA i micro RNA (miRNA) molekule koje prenose egzosomi. Tako su Teng i sur. (2017) pokazali kako stanice CRC-a pomoću egzosoma izbacuju iz svoje citoplazme tumor supresijsku miR-193a kako bi osigurale nesmetanu vlastitu proliferaciju. Nadalje, egzosomi iz ovih tumorskih stanica mogu poticati proliferaciju okolnih stanica prenoseći signale za prijelaz iz epitelnog u mezenhimalni tip stanice. Tim prijelazom stanice gube kontaktnu inhibiciju rasta te postaju potencijalno metastatske. Važnu ulogu u tom procesu vjerojatno ima miR-210 budući da je Bigagli sa suradnicima (2016) dokazala statistički značajni porast ove miRNA u egzosomima koje su izlučivale primarne stanice raka koje su u početku bile adherirane za podlogu, a nakon 7 dana krenule rasti u suspenziji. Wang i suradnici (2017) dokazali su povećanu ekspresiju još jedne tumor supresijske miRNA u egzosomima pacijenata sa CRC-om. Radi se o miR-125-3p koja inhibira proliferaciju i invazivnost tumora tako što inhibira TAZ (engl. *transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*) kinazu koja u kombinaciji sa YAP (engl. *Yes-associated protein*) kinazom djeluje kao onkogen (Yang i sur., 2019). Nadalje, Fu i sur. (2018) pronašli su povećanu ekspresiju miR-17-5p i miR-92a-3p u egzosomima te su ih povezali sa procesima tumorogeneze i metastaziranja kolorektalnog karcinoma. Još jedna miRNA čija se povišena ekspresija pronađena u egzosomima pacijenata sa CRC-om povezuje sa lošijom prognozom kod istih je i miR-19a (Matsumura i sur., 2015). Jedan od gena koji potencijalno igra važnu ulogu u tumorogenezi kolorektalnog karcinoma je i spomenuti *C-MYC*. U nekim istraživanjima poput onoga kojeg su proveli Sikora i sur. (1987) pronađena je povišena razina genskog produkta i mRNA nastalog transkripcijom *C-MYC* gena kod pacijenata sa visoko diferenciranim kolorektalnim karcinomom što može sugerirati da ovaj gen ima važnu ulogu u razvoju CRC-a. Bitno je naglasiti da su Sikora i sur. određivali ekspresiju gena u tkivu, a ne u egzosomima pacijenata s CRC-om. S druge strane Ling He i sur. (2018) proveli su meta analizu u kojoj su zaključili da se unatoč povećanoj ekspresiji kod velikog broja pacijenata sa kolorektalnim karcinomom ne može povezati sa prognozom kod istih što ostavlja prostor za daljnja istraživanja ovog gena i njegove ekspresije te uloga u tumorogenezi kolorektalnog karcinoma.

1.8 METODE ZA ODREĐIVANJE EKSPRESIJE RNA i miRNA

Postoji nekoliko različitih metoda za određivanje ekspresije RNA i miRNA kao što su Northern blotting, microarray tehnike, sekvenciranje sljedeće generacije (kao npr. NGS, engl. *Next generation sequencing*), RNA sekvenciranje (RNAseq), digitalna lančana reakcija polimeraze (PCR), SAGE (engl. *Serial Analysis of Gene Expression*), microarray tehnike, EST (engl. *comparative expressed sequence tag analysis*), MPSS (engl. *massively parallel signature sequencing*) i dr. (Fryer i sur., 2002). Ipak jedna od najčešće korištenih metoda je lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR) koji je korišten i u ovom radu. Ova metoda temelji se na amplifikaciji specifičnog dijela DNA od interesa pomoću enzima DNA polimeraze u ponavljajućim ciklusima. Kako bi se kvantificirali nastali produkti najčešće se koriste *TaqMan* i *SYBR green* tehnologije. *TaqMan* eseji baziraju se na 5' endonukleaznoj aktivnosti DNA polimeraze. Za provođenje *TaqMan* amplifikacije potrebna je dvolančana DNA koja sadrži gen koji želimo dokazati/amplificirati, specifična početnica, sonda koja na 5' kraju sadrži fluorescentni „reporter“, a na 3' kraju „quencher“ te DNA polimeraza. Dok je sonda cjelovita „quencher“ gasi fluorescenciju „reportera“ i ona se ne može detektirati. Početni korak procesa je zagrijavanje reakcijske smjese kako bi se lanci DNA razdvojili i postali dostupni za vezanje početnice i sonde. Nakon toga temperatura se snižava, a početnice i sonda vežu se na jednolančanu DNA. Potom se temperatura opet povisuje do optimalne za djelovanje DNA polimeraze koja stvara drugi lanac. Kada dođe do sonde, DNA polimeraza je svojom endonukleaznom aktivnošću kida i oslobađa „reporter“ od „quencher“ koji onda u otopini daje fluorescentni signal. Svakim novim ciklusom oslobađa se sve više „reportera“ te fluorescencija postaje sve jača i naposljetku doseže razinu koju uređaj može detektirati. Ovisno o količini početnog uzorka odnosno o količini izolirane RNA ili miRNA prevedene u cDNA razina detekcije koja se naziva i „threshold cycle“-Ct doseže se u određenom ciklusu, a usporedbom broja ciklusa potrebnih za dosezanje te razine, može se kvantificirati početna količina uzorka ako postoji referentni uzorak. SYBR green tehnologija radi na sličnom principu mjerenja fluorescencije i usporedbe sa referentnim uzorkom. Razlika od *Taqman* tehnologije sastoji se u tome da kod SYBR green nema sonde s „reporterom“ i „quencherom“ nego se fluorescentna boja ugrađuje u novonastalu dvostruku DNA tijekom amplifikacije s DNA polimerazom. Boja vezana za dvostruku DNA ima višestruko veću fluorescenciju nego kad je

slobodna te je tako omogućena njezina detekcija. Mana ovog procesa je činjenica da se boja veže nespecifično na svaku dvostruku DNA što potencijalno može dati lažne rezultate.



Slika 3. Princip Sybr green i TaqMan metode (preuzeto od: Cao i sur. 2020)

Preduvjet za izvođenje ovih tehnika je poznavanje gena kojeg želimo dokazati te istovremeno umnažanje nekog gena sa stabilnom ekspresijom u različitim uzorcima. Taj gen koji omogućuje kvantifikaciju ciljanog gena naziva se referentni ili „housekeeping“ gen. Kako bi neki gen bio referentni mora zadovoljavati određene uvjete. Najbitnije je da na njegovu ekspresiju ne utječu eksperimentalni faktori (Kozera i Rapacz, 2013). Također, kao što je već navedeno, njegova ekspresija trebala bi biti podjednaka u svim tkivima i u svim stanjima, a istovremeno varirati ovisno o eksperimentalnim pogreškama povezanim sa tehnikom izvođenja eksperimenta kako bi se te greške uklonile (Chervoneva i sur. 2010). Odabir referentnog gena ovisi i o ciljanom genu pa je tako poželjno da ta dva gena imaju slične Ct vrijednosti. Iako su se u akademskoj zajednici neki geni poput gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaze (*GAPDH*) i beta aktina (*ACTB*) ustalili kao univerzalni referentni geni, sve više literature pokazuje kako je prije odabira referentnog gena potrebno validirati i njegovu ekspresiju u tkivu ili stancima koje istražujemo. Za to je potrebno izolirati ukupnu RNA iz uzorka što predstavlja potencijalni problem kada su u pitanju male količine

RNA u uzorcima kao što su egzosomi. Također, poznato je da su egzosomi heterogena skupina molekula te je općenito teško obuhvatiti sve egzosome za izolaciju RNA i miRNA. Nadalje još jedan problem kod izbora referentnih gena u egzosomima je činjenica da se oni razlikuju od matične stanice iz koje su nastali tako da isti referentni geni ne moraju biti jednako eksprimirani u stanicama i egzosomima (Dai i Cao 2021) . Iako danas postoje brojni programi za izbor najboljeg referentnog gena poput onoga kojeg su osmislili Vandesompele i sur (2012.) mnoga istraživanja ekspresije gena koriste ustaljene referentne gene bez njihove prethodne validacije što potencijalno može dovesti u pitanje vjernost njihovih rezultata.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kolorektalni karcinom treći je u svijetu po učestalosti pojavljivanja, dok zauzima drugo mjesto po uzroku smrti od raka među svim ostalim karcinomima sa godišnjom stopom smrtnosti od preko pola milijuna. Odlikuje ga složena karcinogeneza u koju je uključeno puno različitih faktora uključujući nekoliko gena te miRNA molekula koje su se pokazale kao potencijalni biomarkeri u mnogim karcinomima pa tako i u ovome (Matsumura i sur. 2015). Tekuća biopsija neinvazivna je metoda određivanja elemenata koji odražavaju molekulsko stanje u tumorima kao što su cirkulirajuće tumorske stanice, cirkulirajuća slobodna DNA, egzosomi i RNA iz uzoraka krvi ili ostalih tjelesnih tekućina s velikim potencijalom u dijagnostici, praćenju progresije bolesti i terapije. Razna istraživanja pokazala su značajne razlike u ekspresiji miRNA i drugih genskih produkata kako u krvi tako i u egzosomima izoliranim od pacijenata sa kolorektalnim karcinomom u odnosu na one oduzete od zdravih pojedinaca. Geni koji pokazuju promjenjenu ekspresiju u uzorcima pacijenata sa CRC-om mahom su povezani sa njegovim nastankom, invazivnošću i metastaziranjem, a detekcija njihovih transkripata otvara mogućnosti pronalaska novih terapijskih, dijagnostičkih i prognostičkih rješenja za ovaj karcinom. Cilj ovog diplomskog rada bio je optimizirati metodu za detekciju transkripata RNA i miRNA iz egzosoma pacijenata sa CRC-om za koje je u literaturi pronađeno da sudjeluju u karcinogenezi kolorektalnog karcinoma te koji imaju potencijal postati biomarkeri za buduće rano otkrivanje i prevenciju ove visoko zastupljene bolesti (Tablica 1).

Tablica1. Ciljni i referentni geni

	CILJNI GEN	REFERENTNI GEN
RNA	<i>C-MYC</i>	<i>B2M, PPIA, GAPDH</i>
miRNA	miR-19a-3p, miR-92a-3p, miR-125-3p, miR-193a- 3p, miR-210-3p	mir-103a-3p, mir 1228-3p, mir-520d-3p

3. MATERIJALI I METODE

3.1 VAĐENJE KRVI PACIJENTIMA SA POTVRĐENIM CRC-om

Puna krv (10ml) uzeta je od bolesnika sa kolorektalnim karcinomom koji su informiranim pristankom sudjelovali u projektu IP-2019-04-4624 u *CellSave Preservative Tubes* (Menarini Silicon Biosystems Inc, SAD). Dobivena puna krv centrifugira se na 1900 g tijekom 10 minuta na + 4 °C u prethodno rashlađenoj centrifugi sa njišućim vjedorima (engl. *swinging-bucket* rotorom) unutar 1 h kako ne bi došlo do oslobađanja staničnog sadržaja *in vitro* što može utjecati na daljnje korake izolacije te interferirati sa konačnim uzorkom. Zatim se plazma prenosi u sterlinu epruvetu od 15 ml, pritom vodeći računa da se ne zahvati međusloj u kojem se nalaze leukociti koji mogu interferirati sa daljnjom izolacijom. Plazma se centrifugira na 3000 g tijekom 15 minuta na + 4 °C kako bi se uklonio stanični materijal, fragmenti trombocita i apoptotska tjelešca. Tako dobiven nadsloj (plazma) alikvotira se u epruvete od 2 ml koje ne sadrže RNazu. Uzorci se prije izolacije egzosoma mogu čuvati na +4°C tijekom 24 h ili na -20°C za duže čuvanje.

3.2 QIAGEN METODA ZA IZOLACIJU EGZOSOMA

Za izolaciju egzosoma korišten je komercijalno dostupni 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*

Od dodatnih materijala i opreme korišteni su:

- pipete i nastavci s filterom bez RNAze
- epruvete (s koničnim dnom) od 15 mL bez RNAze
- epruvete od 2 ml bez RNAze

- mikrocentrifuga za epruvete od 2 ml za centrifugiranje na sobnoj temperaturi
- vortex
- hladnjak
- led

Svi reagensi čuvaju se zaštićeni od svjetla na 2 - 8 °C. Liofilizirani *Thrombin* otopi se u 400 µl *Thrombin buffera* 1 minutu na sobnoj temperaturi te se nježno promiješa, alikvotira i čuva na -20°C. Ako je uzorak bio smrznut za daljnje rukovanje potrebno ga je otopiti na ledu ili na + 4 °C te vorteksirati nakon otapanja. Zatim se centrifugira 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 prenosi se u novu epruvetu od 2 ml. 600 µl plazme prebacuje se u novu epruvetu od 2 ml te se dodaje 1 % *Thrombina*, promiješa i inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi. Potom se centrifugira na 10000 g tijekom 10 minuta na 20°C. 0,5 ml supernatanta prenese se u novu epruvetu od 2 ml te se pomiješa sa 0,4 volumena *Precipitation buffera A* (200 µl), vorteksira 5 sekundi te inkubira sat vremena (može i preko noći) na +4 °C. Nakon toga centrifugira se na 500 g tijekom 5 minuta na 20 °C, ukloni se nadsloj i baci, a u preostalom talogu nalaze se egzosomi. Talog se kratko centrifugira kako bi se uklonio eventualni preostali nadsloj. Zatim se dodaje 270 µl *Resuspension buffera* i vorteksira kako bi se egzosomi resuspendirali. Konačni volumen egzosoma nakon ovog postupka iznosi oko 300 µl i može ih se čuvati na 2 - 8 °C do 2 dana ili na -20 °C (-65 °C) tijekom dužeg perioda. Međutim optimalno je odmah izolirati RNA kako bi se izbjeglo djelovanje uvijek prisutnih RNAza.

3.3 IZOLACIJA RNA

Za izolaciju ukupne RNA iz egzosoma uključujući i miRNA korišten je komercijalno dostupni Qiagen miRNAeasy Serum/Plasma Advanced kit (Qiagen, Njemačka, kat. br. 217204) koji sadrži:

- RNeasy® UCP MinElute® Spin Columns (pakirano u epruvete od 2 ml)
- Epruvete od 1.5 ml
- Epruvete od 2 ml

- Buffer RPL 20 ml
- Buffer RPP 8 ml
- Buffer RWT 15 ml
- Buffer RPE 11 ml
- Voda bez RNAza 10 ml

Od ostalih reagensa i pribora korišteni su:

- 100% Izopropanol
- 80% Etanol
- Sterilni nastavci s filterom bez RNAza
- Epruvete od 1.5 ml ili 2 ml
- Mikrocentrifuga za epruvete od 2 ml na sobnoj temperaturi
- Jednokratne rukavice

Izolacija se provodi iz 200 μ l ranije izoliranih egzosoma. Prije početka izolacije potrebno je apsolutnim etanolom razrijediti pufere RWT i RPE koji dolaze kao koncentracije. Svi koraci izolacije provode se na sobnoj temperaturi u prostoru steriliziranom UV svjetlom, a potrebno je raditi brzo kako bi se smanjila mogućnost djelovanja RNAza. U odmrznute uzorke egzosoma dodaje se 60 μ l pufera RPL koji sadrži gvanidin tiocijanat i deterđente kako bi se lizirali i denaturirali proteinski kompleksi i RNaze koje mogu oštetiti RNA, epruveta se vorteksira najmanje 5 sekundi te inkubira 3 minute. Zatim se dodaje 20 μ l pufera RPP koji precipitira ostatke proteina, vorteksira najmanje 20 sekundi i inkubira 3 minute. Potrebno je dobro promiješati epruvete kako bi se faze pravilno razdvojile. Sljedeći korak je centrifugiranje na 12000 g tijekom 3 minute kako bi se pelet precipitirao. Bezbojni i bistar supernatant prenese se u novu epruvetu i dodaje 1 volumen izopropanola koji osigurava prikladne uvjete za vezanje RNA molekula i zatim vorteksira. Potom se cijeli uzorak prenese u RNeasy UCP MinElute kolonu i centrifugira 30 sekundi na 8000 g, uzorak RNA veže se za kolonu, a tekućina koja prolazi kroz kolonu se baci. Zatim se na kolonu dodaje 700 μ l pufera RWT, centrifugira 30 sekundi na 8000 g, a tekućina koja je prošla kroz kolonu se ponovno baci. Ista epruveta za skupljanje koristi se i u sljedećem koraku u kojem se dodaje 500 μ l pufera RPE na kolonu te ponovi postupak centrifugiranja nakon kojeg se tekućina koja je prošla kroz kolonu ponovno

bača. Nakon toga dodaje se 500 µl etanola na kolonu koja se tada centrifugira 2 minute na 8000 g kako bi se membrana kolone isprala. RNeasy UCP MinElute spin kolona postavi se na novu epruvetu od 2 ml kojoj se poklopac otvori tijekom centrifugiranja na maksimalnoj brzini tijekom 5 minuta da se membrana dobro osuši kako zaostali etanol ne bi interferirao u daljnjim reakcijama određivanja ekspresije RNA. Posljednji korak je ispiranje izolirane RNA i miRNA s membrane. Provodi se tako da se kolona postavi u novu epruvetu za skupljanje od 1,5 ml, doda 20 µl vode bez RNAze izravno na centar membrane i inkubira 1 minutu, potom se zatvori poklopac i centrifugira 1 minutu na maksimalnoj brzini da se RNA ispere sa membrane. Tako pročišćene RNA i miRNA mogu se čuvati na -30°C do -15°C ili -90°C do -65°C do godinu dana bez degradacije. Mrtvi volumen RNeasy UCP MinElute spin column je 2 µl, te se dobije 18 µl otopine RNA.

3.4 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE I KVALITETE RNA

Nakon izolacije ukupne RNA i miRNA iz egzosoma pristupa se određivanju koncentracije i kvalitete izoliranih nukleinskih kiselina. Uobičajeno se provodi postupak mjerenja apsorbancije spektrofotometrijski na 260 nm na mikrovolumnom spektrofotometru DS-11 (Denovix, SAD) koji daje i omjer 260/280 i 260/230 čime se provjerava kontaminacija uzorka proteinima, drugim nukleinskim kiselinama i organskim otapalima korištenim za izolaciju RNA. Međutim, u ovom slučaju radi se o vrlo malim koncentracijama i malim molekulama RNA i miRNA pa je mjerenje apsorbancije nepouzdana metoda procjene kvalitete i koncentracije RNA. Stoga je u ovom istraživanju provedena i elektroforeza na uređaju Bioanalyzer 2100 koristeći RNA 6000 pico total RNA 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 vial, 10x concentrate).
- 4 filtera
- Epruvete za miješanje boje i gela
- 1 iglu

Od ostalog pribora korišteni su:

- Voda bez RNAza
- Pipete (10 μ L i 1000 μ L) sa odgovarajućim nastavcima
- Epruvete 0,5 mL bez RNAza
- Mikrocentrifuga
- Blok za zagrijavanje

Svi reagensi prethodno se trebaju odmrznuti i temperirati na sobnoj temperaturi barem 30 minuta, a elektrode Bioanalyzera 2100 isprati vodom bez RNAza. Čipovi se pune na način da se najprije 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. Nakon toga, 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.

3.5 SINTEZA cDNA IZ mRNA

Za sintezu cDNA iz ukupne RNA korišten je RevertAid First Strand cDNA Synthesis test paket (Thermo Fisher Scientific, SAD) koji sadrži:

- RevertAid RT enzim
- RiboLock RNase Inhibitor
- 5x Reaction Buffer u kojem su: 250mM Tris-HCL (pH 8.3), 250mM KCL, 20mM MgCl₂, 50mM DTT
- 10mM dNTP Mix
- Oligo(dT)₁₈ Primer, 100 μ M
- Random Hexamer Primer, 10 μ M

- Forward GAPDH Primer, 10 μ M
- Reverse GAPDH Primer, 10 μ M
- Control GAPDH RNA, 0.05 μ g/ μ L
- Voda bez nukleaza

Budući da su koncentracije RNA dobivene izolacijom iz egzosoma vrlo niske, početna količina RNA bazira se na volumenu, a ne na koncentraciji. Volumenu od 2 ili 4 μ l RNA dodaje se 1 μ l početnica Oligo(dT)₁₈, 1 μ l početnica od nasumičnih heksanukleotida, 1 μ l inhibitora RNaza, 4 μ l reakcijskog pufera, 2 μ l 10mM smjese dNTP-a i 1 μ l enzima reverzne transkriptaze te se smjesa dobro vorteksira, a uvjeti reakcije na uređaju GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD) postavi se prema tablici 2.

Tablica 2. Reakcijski uvjeti za reverznu transkripciju

KORAK	TEMPERATURA/ °C	VRIJEME/min
INKUBACIJA	25	5
STVARANJE LANCA	42	60
PREKID REAKCIJE	70	5

3.6 TAQMAN METODA ZA mRNA

Nakon prevođenja RNA u cDNA ona postaje uzorak za qPCR kojim određujemo ekspresiju ciljnih gena (*C-MYC*) u odnosu na referentne gene (*B2M*, *PPIA*, *GAPDH*). Reakcija se provodi na uređaju 7500 Real Time PCR System koristeći TaqMan Universal MasterMix i sljedeće TaqMan Gene Expression Assayse (Applied Biosystems SAD):

- Hs99999907_m1 za β_2 -mikroglobulin (B2M)

- Hs99999904_m1 za peptidil-prolil-izomerazu A (PPIA)
- Hs03929097_g1 za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (*GAPDH*)
- Hs00153408 m1 za *C-MYC*

Na pločicu sa 96 jažica u svaku se dodaje 5 μ l MasterMix-a, 0,5 μ l početnica koje sadrže i TaqMan sondu, 0,5 μ l cDNA i 4 μ l vode. Pločica se potom centrifugira 30 sekundi na 500g, a reakcijski uvjeti su: zagrijavanje na 50 °C tijekom 2 minute, zatim zagrijavanje na 95 °C tijekom 10 minuta te potom slijedi 40 ciklusa koji se sastoje od zagrijavanja na 95 °C 15 sekundi i na 60 °C 1 minutu u kojima se i vrši mjerenje fluorescencije

3.7 DETEKCIJA miRNA IZ EGZOSOMA POMOĆU qPCR-a

3.7.1 REVERZNA TRANSKRIPCIJA

Prije detekcije miRNA iz egzosoma potrebno je provesti reverznu transkripciju ukupne miRNA iz uzorka za što je korišten miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Njemačka kat.br. 339340) koji sadrži:

- 5x miRCURY RT SYBR® Green® Reaction Buffer uključujući Mg²⁺, SYBR® Green RT početnice i dNTPs
- 10x miRCURY RT Enzyme Mix
- UniSp6 RNA Spike-in Template, osušen
- Voda bez nukleaza

Od ostalog pribora korišteni su:

- Epruvete od 200 μ l bez nukleaza
- nastavici za pipete sa filterom
- Led
- PCR uređaj (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, SAD)
- Vortex

Kako su koncentracije izolirane RNA i miRNA iz egzosoma male, u ovom koraku istraživanja uvodi se sintetička RNA UniSp6 „Spike-in“ koja služi kao standard za normalizaciju i kvantifikaciju ekspresije ostalih miRNA. Iz istog razloga, početna količina miRNA za proces reverzne transkripcije bazira se na volumenu a ne koncentraciji uzorka. Predloženi volumeni od strane proizvođača reagenasa su npr. 2, 4, 6 µl ili izračunavanje ovisno o početnom volumenu egzosoma prije izolacije RNA (200 µl) te volumenu vode bez RNAza u kojem je otopljena RNA (20 µl) prema formuli:

$$\text{Template RNA } [\mu\text{l}] = \text{Elution volume } [\mu\text{l}] / \text{Original sample volume } [\mu\text{l}] * 16 [\mu\text{l}]$$

Prema ovoj formuli dobije se početni volumen miRNA za proces reverzne transkripcije od 1,6 µl. U reakcijsku smjesu dodaje se 6,5 µl razrijeđene miRNA, 2 µl *5x miRCURY RT SYBR® Green® Reaction Buffer*, 1 µl *10x miRCURY RT Enzyme Mixa*, 0,5 µl UniSp6 „spike-in“ kalupa te se reakcijska smjesa zatim dobro vorteksira. Reakcijski uvjeti su 1 h na 42°C i nakon toga 5 minuta na 95°C kako bi inaktivirali reverznu transkriptazu i zaustavili reakciju. Potom se dobivena cDNA hladi na 4°C. Reakcije se provode na uređaju za PCR (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, SAD).

3.7.2 q PCR

Nakon prevođenja u cDNA ona se koristi kao kalup u qPCR-u za umnažanje i kvantifikaciju miRNA od interesa (miR-19a-3p, miR-92a-3p, miR-125-3p, miR-193a-3p, miR-210-3p) te referentne miRNA (mir-103a-3p, mir 1228-3p, mir-520d-3p) koristeći pojedinačne miRCURY LNA miRNA PCR Assays:

- hsa-miR-19a-3p (YP00205862)
- hsa-miR-92a-3p (YP00204258)
- hsa-miR-125-3p (YP00204446)
- hsa- miR-193a-3p (YP00204591)
- hsa-miR-210-3p (YP00204333)
- hsa-miR-103a-3p (YP00204063)
- hsa-miR-1228-3p (YP02119681)

- hsa-miR-520d-3p (YP00204040)
- UNiSp6 (YP00203954)

Za qPCR koristi se miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Njemačka) koji sadrži:

1. 2x miRCURY SYBR® Green PCR Master Mix u kojem se nalaze:

- miRCURY SYBR® Green PCR Buffer
- dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)
- QuantiNova® DNA Polymerase

2. voda bez nukleaza

cDNA se razrjeđuje 1:30 za postupak qPCR-a dodavanjem 290 µl vode bez nukleaza u 10 µl ranije dobivene cDNA. Na ploču za qPCR s 96 jažica pipetira se reakcijska smjesa prema tablici 3.

Tablica 3. Izrada reakcijske smjese za qPCR

	VOLUMEN
2x miRCURY SYBR® Green Master Mix	5 µl
Resuspendirani PCR miRNA primer mix	1 µl
cDNA	3 µl (razrijedenje 1:30)
RNase-free voda	1 µl
Ukupni volumen reakcijske smjese	10 µl

Ekspresija miRNA određuje se na uređaju 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, SAD) uz uvjete navedene u tablici 4.

Tablica 4. Programiranje PCR uređaja za analizu ekspresije miRNA

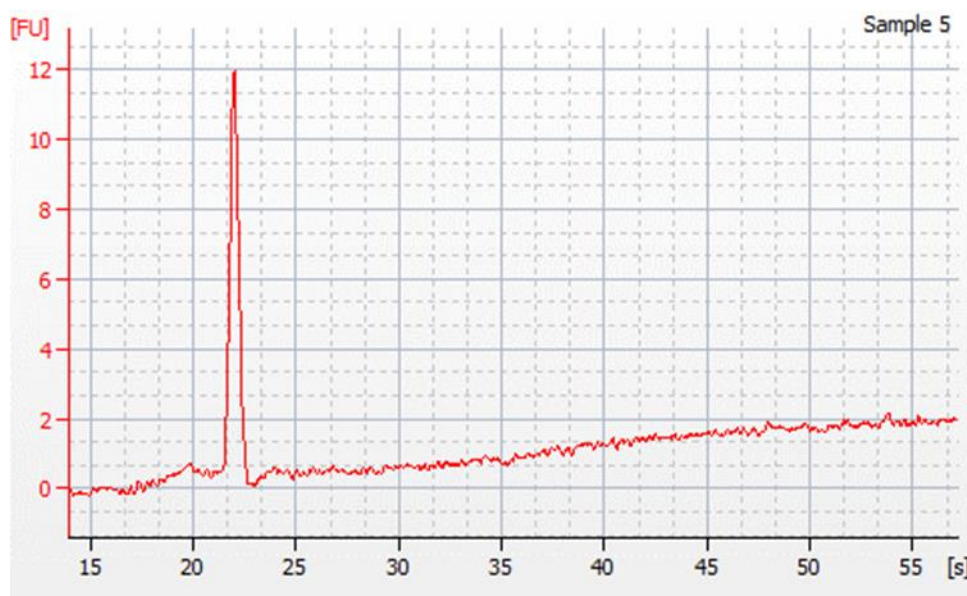
KORAK	VRIJEME	TEMPERATURA	KOMENTAR
PCR početna aktivacija	2 min	95 °C	
denaturacija	10s	95 °C	
Kombinirano vezanje/umnažanje	60s	56 °C	Prikupljanje podataka fluorescencije
Broj ciklusa	40		
Analiza krivulje taljenja		60-95 °C	

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju koristili su se uzorci krvi uzeti od pacijenata sa potvrđenim kolorektalnim karcinomom iz KBC Sestre Milosrdnice. Ukupno je bilo 18 uzoraka od čega 11 od muškaraca, a 7 od žena. RNA je izolirana iz egzosoma, određena je koncentracija spektrofotometrijskom metodom i provjerena kvaliteta dobivene RNA na uređaju Bioanalyzer 2100. Potom je usljedila optimizacija metode za određivanje transkripata *C-MYC* gena te miR-19a-3p, miR-92a-3p, miR-125-3p, miR-193a-3p i miR-210-3p

4.1 KONCENTRACIJA I KVALITETA RNA

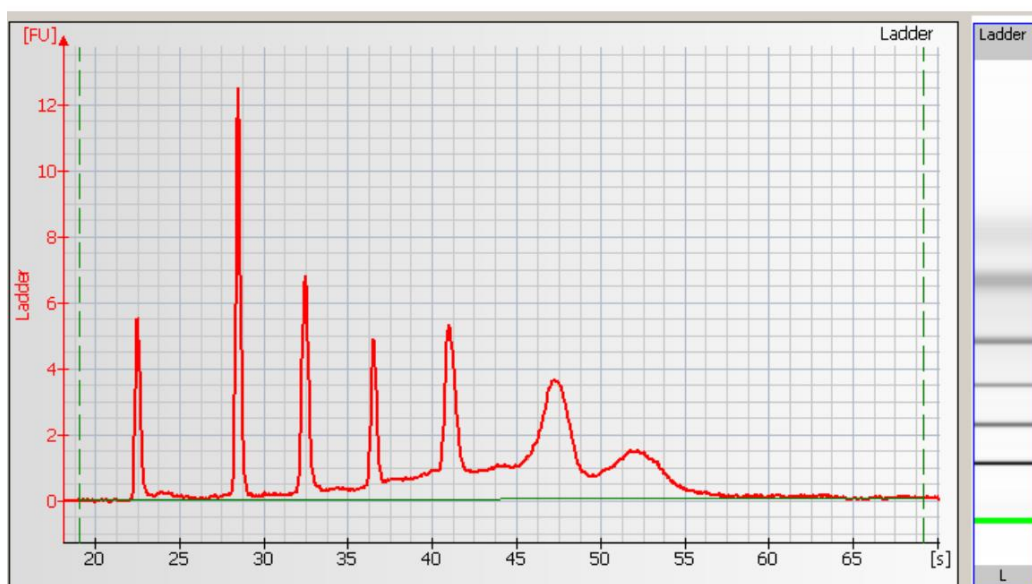
Koncentracija RNA određena na DS-11 mikrovolumnom spektrofotometru (DeNovix, SAD) kretala se u rasponu od 2,44 - 51,20 ng/ μ l, a medijan je 11,48 μ l. Kvaliteta izolirane RNA i miRNA iz egzosoma pacijenata sa kolorektalnim karcinomom određivana je elektroforezom na uređaju Bioanalyzer 2100 koristeći RNA 6000 Pico Total RNA kit (Agilent, SAD) i dobiveni su sljedeći rezultati (slika 4.)



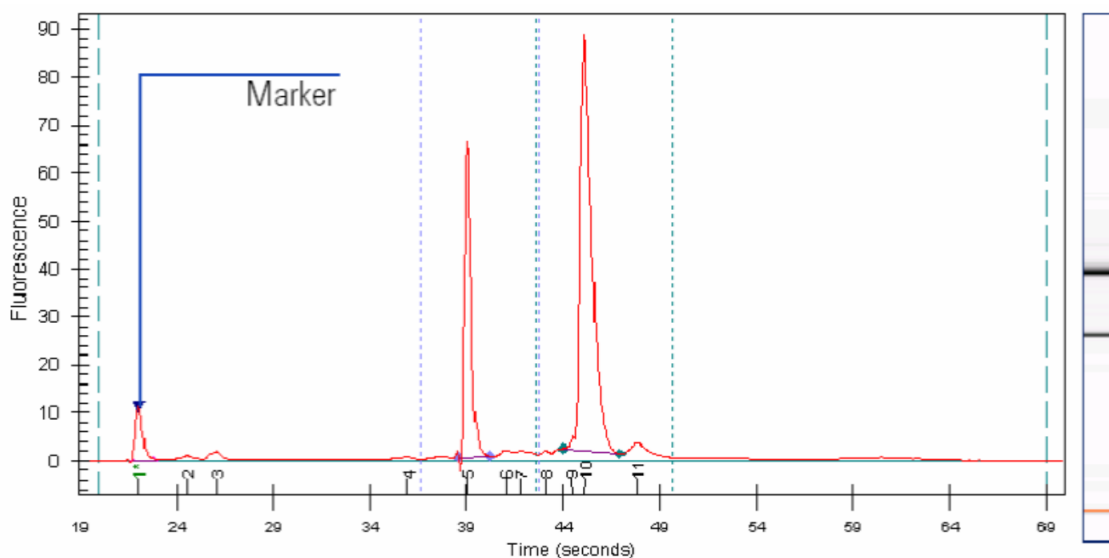
Slika 4. Elektroferogram RNA iz egzosoma dobiven na uređaju Bioanalyzer 2100

Koncentracija RNA i miRNA računa se kao ukupna površina ispod elektroferograma u usporedbi sa površinom ispod elektroferograma izmjenenog na standardu (slika 5).

No, kao što je i bilo očekivano, u uzorcima se nalaze uglavnom male molekule RNA te miRNA. Na dijagramu se jasno vidi samo pik od markera te nepravilna „base line“ koja dolazi od signala koje daju male molekule. Ne mogu se razaznati tipični pikovi za 18s i 28s RNA koji se obično izraze oko 40-e i 45-e sekunde (slika 6.). Iako je procjena integriteta RNA jedan od najvažnijih koraka za daljnje istraživanje ovih molekula, iz dobivenog dijagrama ne može se izračunati RIN (engl. *RNA integrity number*). Prije se integritet RNA procjenjivao prema subjektivnom dojmu istraživača iz dijagrama što je ostavljalo dosta mjesta za pogreške i različitu interpretaciju rezultata. „Agilent Technologies“ razvile su računalni sustav koji automatski procjenjuje i određuje integritet RNA kako bi se smanjila mogućnost ljudske pogreške. Međutim usprkos računalnom sustavu iz ovog dijagrama nije se mogao odrediti integritet RNA budući da uređaj pokazuje niske koncentracije RNA u uzorku (<1 ng/ul). Analiza regija na elektroferogramu (engl. *smear analysis*) pokazala je da je većina fragmenata RNA manja od 200 nukleotida.



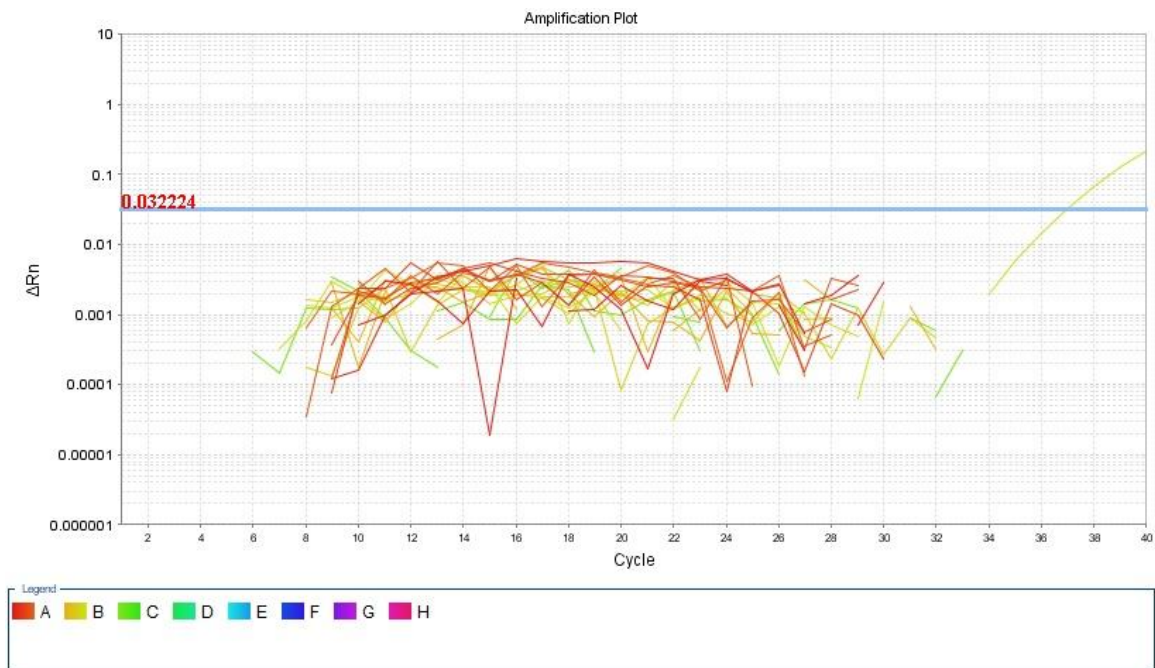
Slika 5. Elektroferogram RNA 6000 Pico standarda sa uređaja Bioanalyzer 2100



Slika 6. Primjer elektroferograma čiste RNA (preuzeto sa <https://www.umassmed.edu/globalassets/deep-sequencing-core/mbcl/how-to-assess-total-rna-quality.pdf>)

4.2 OPTIMIZACIJA ODREĐIVANJA EKSPRESIJE mRNA ZA C-MYC

Za optimizaciju određivanja ekspresije *C-MYC* gena korišteno je 10, 20 i 50 ng RNA za prevođenje u cDNA nakon čega se u svakom uzorku određivala ekspresija ciljnog gena i tri kandidata za referentne gene (*B2M*, *PPIA*, *GAPDH*) qPCR metodom uz primjenu sonde TaqMan na uređaju 7500 Real Time PCR System. Rezultati su prikazani na slici 7. Iz dobivenog dijagrama vidi se neuspješna amplifikacija ciljnog gena (*C-MYC*) i sva tri kandidata za referentne gene u svim uzorcima. Signali na grafu su mali i nepravilni te vjerojatno dolaze od pozadinskog šuma. Unatoč korištenju različitih ulaznih volumena cDNA, ni u jednom uzorku nije dosegnuta razina fluorescencije koju uređaj može zabilježiti. Razlog neuspješne detekcije gena može biti niska koncentracija izolirane RNA iz egzosoma, degradacija RNA prilikom rukovanja uzorkom ili jednostavno izostanak prisutnosti navedenih gena u egzosomima pacijenata. U istraživanju literature povišena ekspresija *C-MYC* kod pacijenata sa CRC-om pronađena je uglavnom u uzorcima tkiva pacijenata (Toon i sur., 2014; Sikora i sur., 1987), a ne u egzosomima što može značiti da su mRNA navedenih gena jednostavno prevelike za „pakiranje“ u egzosome.

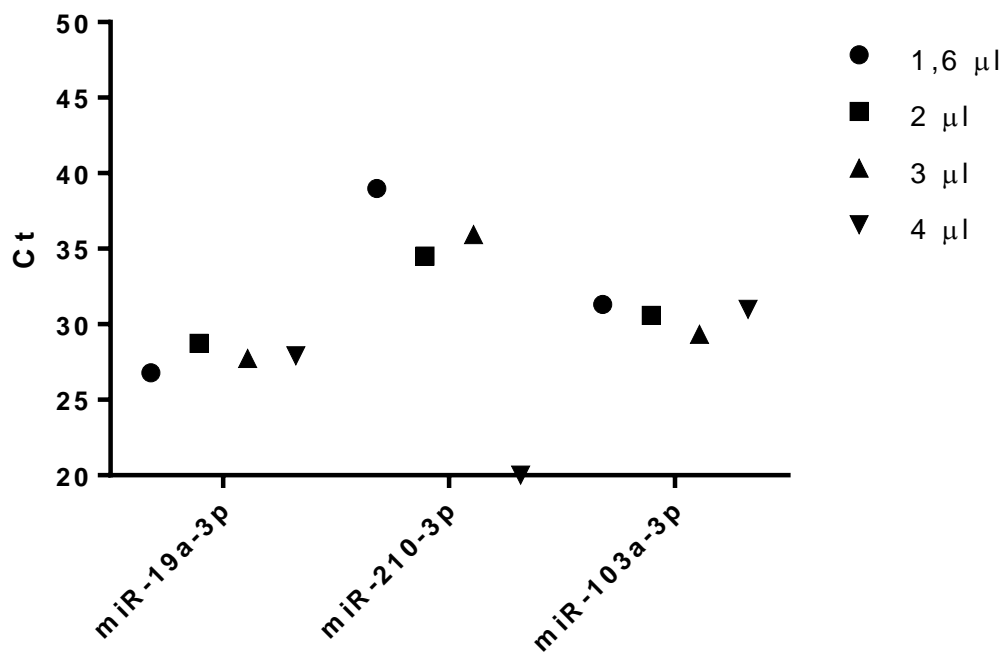


Slika 7. Amplifikacijska krivulja za ekspresiju *c-myc*, *GAPDH*, *B2M* i *PPIA* dobivena na uređaju 7300 Real Time PCR System

4.3 OPTIMIZACIJA ODREĐIVANJA EKSPRESIJE miRNA

4.3.1 ODREĐIVANJE ULAZNOG VOLUMENA miRNA

Budući da su koncentracije RNA izolirane iz egzosoma vrlo niske, ulazna količina RNA za određivanje ekspresije temelji se na volumenu, a ne koncentraciji. Prema preporuci proizvođača reagenasa miRCURY LNA SYBR® Green PCR korišteni su 1,6 μ l, 2 μ l, 3 μ l i 4 μ l uzorka za 3 miRNA: miR-19a-3p, miR-210-3p i miR-103a-3p (slika 8) za određivanje optimalnog volumena uzorka za daljnje pokuse.

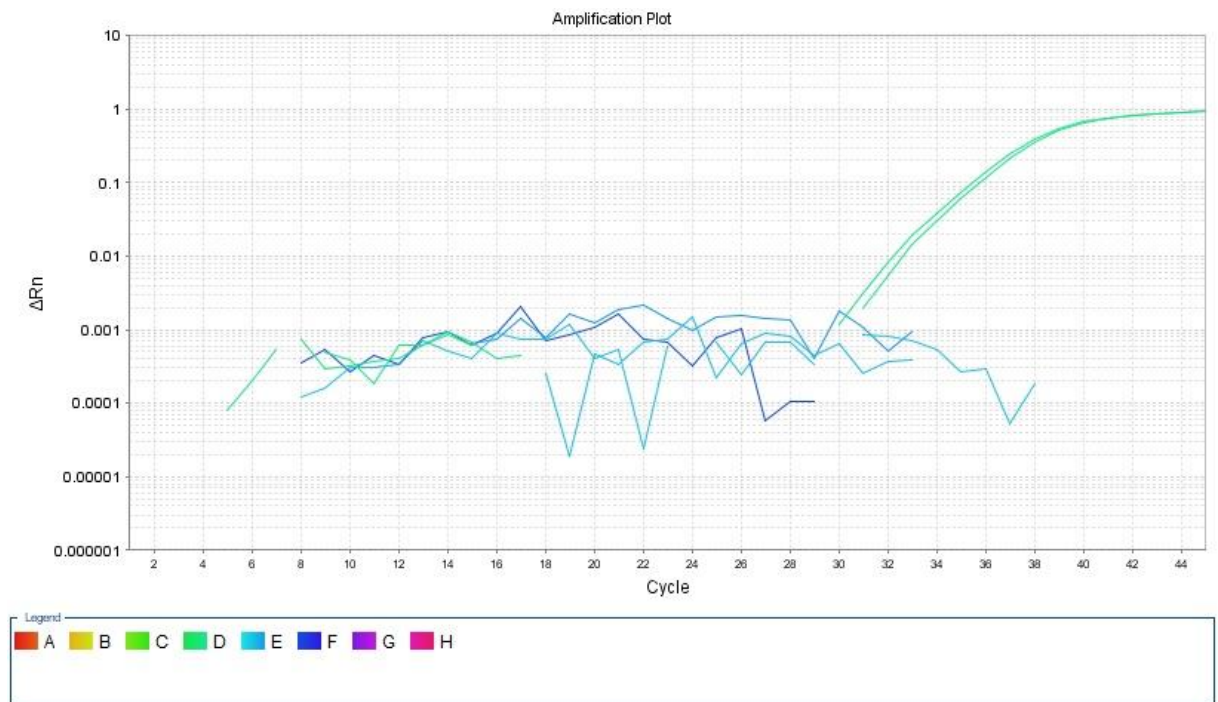


Slika 8. Ekspresija miRNA dobivena uz različite početne volumene uzoraka RNA izolirane iz egzosoma pacijenata sa CRC-om, izražena kao Ct vrijednost

Iz dobivenog grafa vidi se da nema značajne razlike u Ct pojedinačnih miRNA molekula s obzirom na različite volumene korištene u eksperimentu, pa se za daljnje istraživanje koristi 2 µl ulaznog volumena RNA.

4.3.2 REFERENTNI GENI ZA miRNA

Kao što je ranije navedeno, da bi se mogla kvantificirati ekspresija ciljnih gena, potrebno je odrediti ekspresiju referentnih gena čija je ekspresija stabilna u svim uzorcima, i prema kojoj se određuje relativna ekspresija ciljnih gena. Kandidati za referentne gene su: miR-103a-3p prema prijedlogu proizvođača reagensa te dodatno miR-1228-3p, miR-520d-3p koje su pronađene kao referentne miRNA u literaturi (Danese i sur. 2017) (Slika 9).



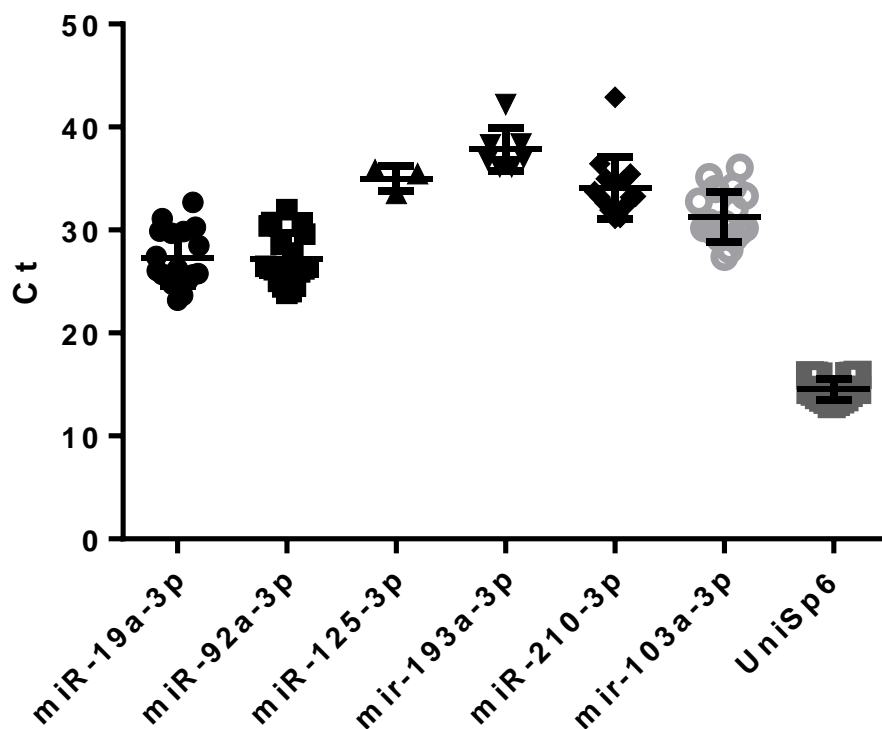
Slika 9. Ekspresija referentnih gena: miR-103a-3p (zeleno), miR-1228-3p i miR-520d-3p u uzorcima egzosoma pacijenata sa CRC-om

Od navedenih referentnih gena jedino je dobivena ekspresija miR-103a-3p kojeg proizvođač reagensa i preporučuje. Unatoč tome što su Duran-Sanchon i suradnici (2019.) odredili miR-1228-3p kao stabilnu cirkulirajuću miRNA u uzorcima pacijenata sa kolorektalnim karcinomom koja može služiti kao referentna, u ovom istraživanju ona nije pronađena u egzosomima. Danese i suradnici (2017) dokazali su stabilnu prisutnost i ekspresiju i miR-1228-3p i miR520d-3p u egzosomima pacijenata sa CRC-om, a zbog njihove za sada nepoznate povezanosti sa genima uključenim u karcinogenezu ove bolesti, odredili su ih kao prihvatljive referentne miRNA za normalizaciju ekspresije ostalih miRNA u egzosomima. Činjenica da ove miRNA nisu pronađene u ovom istraživanju može se tumačiti kao potvrda heterogenosti sastava i funkcija egzosoma u uzorcima različitih pacijenata koji boluju od iste bolesti te razlike njihovog sastava od sastava tjelesnih tekućina u kojima se nalaze. Budući da je dokazana prisutnost samo jedne odabrane referentne miRNA, u daljnjim pokusima kao referentni gen korištena je sintetička kontrola koja se nalazi u kitu i koju preporučuje proizvođač – UniSp6 RNA „*Spike-in*“ kontrola. „*Spike-in*“ kontrolna RNA dodana je sve uzorke u jednakoj koncentraciji tijekom reverzne transkripcije, što

znači da bi trebala biti jednako eksprimirana u svim pokusima (imati jednak Ct u svim uzorcima).

4.3.3 EKSPRESIJA miRNA U UZORCIMA

Ekspresija 7 miRNA od čega 2 referentne (miR-103a-3p i UniSp6) te 5 ciljnih (miR-19a-3p, miR-92a-3p, miR-125-3p, miR-193a-3p i miR-210-3p) određena je u 18 uzoraka miRNA izolirane iz egzosoma pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. Nakon provedene reverzne transkripcije i qPCR-a koristeći miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit dobiveni su sljedeći rezultati izraženi kao Ct u pojedinačnim uzorcima.



Slika 10. Ekspresija miRNA u uzorcima egzosoma bolesnika s kolorektalnim karcinomom. Rezultati su prikazani kao Ct vrijednosti i izraženi kao median \pm SEM, n=18

miR-19a-3p: detektirana u svih 18 uzoraka sa rasponom Ct od 23,20-32,67 te medijanom od 26,14

miR-92a-3p: detektirana u 18 uzoraka sa rasponom Ct od 23,87-31,96 i medijanom od 26,34

miR-125-3p: detektirana u 3 uzorka sa rasponom Ct od 33,58-35,86 te medijanom od 35,50.

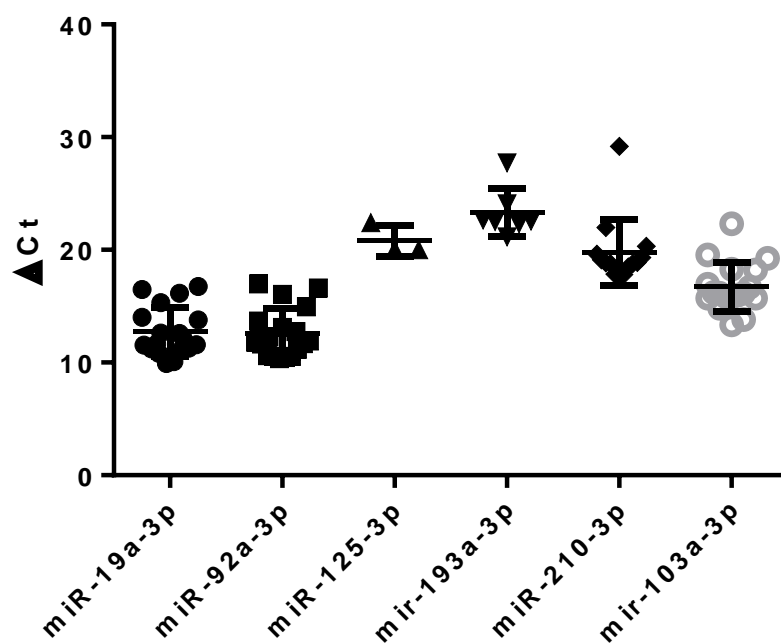
miR-193a-3p: detektirana u 7 uzoraka sa rasponom Ct od 36,13-42,17 te medijanom od 37,01.

miR-210-3p: detektirana u 14 uzoraka sa rasponom Ct od 31,15-42,91 te medijanom od 33,26

miR-103a-3p: detektirana u 18 uzoraka sa rasponom Ct od 27,40-36,05 i medijanom od 30,39

UniSp6: sintetička referentna miRNA detektirana je u svim uzorcima u vrlo uskom rasponu Ct od 13,9-15,92 te medijanom od 14,38

Potom je izračunat Δ Ct odnosno razlika između ciljne miRNA i kontrolne UniSp6 „*spike in*“ RNA za procjenu ekspresije ciljnih miRNA (slika 11.).



Slika 11. Ekspresija miRNA u uzorcima egzosoma bolesnika s kolorektalnim karcinomom. Rezultati su prikazani kao ΔCt vrijednosti u odnosu na UniSp6 „spike in“ i izraženi kao median \pm SEM, n=18.

Dobiveni rezultati prikazuju relativnu ekspresiju ciljnih miRNA u odnosu na sintetičku kontrolu te nam govore koliko puta je ekspresija tih miRNA veća ili manja u uzorcima u odnosu na UniSp6 (tablica 5.). ΔCt se računa prema formuli:

$$\Delta Ct = Ct(ciljna\ miRNA) - Ct(UniSp6)$$

Tablica 5. Δ Ct ciljnih miRNA u odnosu na UniSp6 spike in

miRNA	Δ Ct		
	MIN	MAX	MEDIJAN
miR-19a-3p	9,903	19,74	11,86
miR-92a-3p	10,35	16,97	11,85
miR-125-3p	20,01	22,40	20,01
miR-193a-3p	21,15	27,70	22,56
miR-210-3p	17,71	29,18	18,86
miR-103a-3p	13,36	22,31	16,14

Relativna ekspresija svih ciljnih miRNA pronađenih u uzorcima pacijenata s kolorektalnim karcinomom manja je u odnosu na UniSp6 koji smo dodali u istim količinama u sve uzorke. Matsumura i sur. (2016) dokazali su povišenu ekspresiju miR-19a i miR-92a kod pacijenata s kolorektalnim karcinomom i u ranoj i u kasnoj fazi što potvrđuje i činjenica da su u ovom diplomskom radu te dvije miRNA pronađene u svih 18 uzoraka s gotovo jednakim medijanom. Wang i suradnici (2016) uspjeli su pronaći stabilnu ekspresiju miR-125-3p u egzozomima pacijenata sa kolorektalnim karcinomom u ranoj fazi. Također, dokazali su da je ekspresija ove miRNA statistički značajno veća u pacijenata sa kolorektalnim karcinomom na lijevoj strani nego u onih sa desnim CRC-om što bi moglo biti potencijalno objašnjenje za pronalazak ove miRNA u samo 3 uzorka u ovom radu budući da nemamo detalje o fazi i lokalizaciji tumora kod ispitivanih bolesnika. Nadalje, Teng i suradnici (2016) dokazali su povišenu ekspresiju tumor supresorske miR-193a u egzozomima miševa i bolesnika sa CRC-om, a posebno u onih sa metastazama na jetri te su povezali ovu miRNA sa rizikom za razvoj jetrenih metastaza kod bolesnika sa kolorektalnim karcinomom. U ovom radu miR-193a-3p pronađena je u 7 od 18 uzoraka što može značiti da ostali pacijenti imaju manji rizik za razvoj metastaza od pacijenata kod kojih je pronađena ova miRNA. Liuqing Ge i sur (2021.) pronašli su značajno povišenu ekspresiju miR-

210-3p u egzosomima pacijenata s kolorektalnim karcinomom izoliranih iz stanica u hipoksiji u odnosu na one iz stanica sa dovoljnim koncentracijama kisika u mikrookolišu i dokazali su da ova miRNA potiče proliferaciju i prelazak staničnog ciklusa iz G1 u S fazu te inhibira apoptozu u stanicama u normoksiji do kojih dolaze ovi egzosomi. Budući da je hipoksija često obilježje tumorskih stanica nije iznenađujući pronalazak ove miRNA povezane sa hipoksijom u uzorcima 14 od 18 ispitivanih pacijenata. No, kako bi se iz dobivenih rezultata mogli donijeti zaključci o ekspresiji navedenih miRNA u bolesnika sa CRC-om, potrebno je imati kontrolnu skupinu pacijenata koji ne boluju od kolorektalnog karcinoma i kojima je određena ekspresija istih miRNA u egzosomima, što nije bio cilj ovog rada.

5. ZAKLJUČCI

- Koncentracije RNA izolirane iz egzosoma bolesnika sa kolorektalnim karcinomom kreću se u rasponu od 2,44 - 51,20 ng/ μ l , a medijan je 11,48 ng/ μ l
- U uzorcima nisu dokazane mRNA gena *C-MYC*, *B2M*, *PPIA* i *GAPDH* što može značiti da su njihove mRNA jednostavno prevelike za pakiranje u egzosome ili je došlo do degradacije RNA prilikom rukovanja uzorcima.
- Optimalna količina uzorka RNA iz egzosoma za provođenje reverzne transkripcije i analize ekspresije gena je 2 μ l
- Od referentnih gena za miRNA dokazana je jedino ekspresija miR-103a-3p u svih 18 uzoraka kojeg preporučuje i proizvođač reagensa. Ostali kandidati (miR-1228-3p i miR-520d-3p) nisu dokazani u ovim uzorcima. Razlog za to možemo tražiti u niskoj koncentraciji izolirane RNA te u malom broju uzoraka (n=18)
- Ekspresija miR-19a-3p i miR-92a-3p dokazana je u svih 18 uzoraka, miR-125-3p detektirana je u samo 3 uzorka, miR-193a-3p u 7 uzoraka, miR-210-3p u 14, a sintetička UniSp6 dokazana je u svih 18 uzoraka kako je i očekivano.
- Unatoč niskim koncentracijama, uzorci su dovoljno kvalitetni za određivanje većine miRNA od interesa, ali ne i za mRNA

6. POPIS KRATICA I SIMBOLA

- CRC- kolorektalni karcinom (engl. *Colorectal cancer*)
- RNA- ribonukleinska kiselina (engl. *Ribonucleic acid*)
- miRNA- mikro ribonukleinska kiselina (engl. *Micro ribonucleic acid*)
- APC- adenomatozna polipoza debelog crijeva (engl. *Adenomatous polyposis coli*)
- KRAS- Kirstenov virus štakorskog sarkoma (engl. *Kirsten rat sarcoma virus*)
- TP53- tumorski protein 53 (engl. *Tumor protein 53*)
- TGF- β - transformirajući čimbenik rasta β (engl. *transforming growth factor β*)
- FAP- obiteljska adenomatozna polipoza (engl. *Familial adenomatous polyposis*)
- HNPCC- nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (engl. *Hereditary nonpoliposis colorectal cancer*)
- COX-2- ciklooksigenaza 2 (engl. *Cyclooxygenase 2*)
- WNT- engl. *Wingless related integration sites*
- GSK3 β - kinaza glikogen sintaze 3 β (engl. *Glycogen synthase kinase 3 β*)
- MYC- mijelocitomatoza (engl. *Myelocytomatosis*)
- C-MYC – stanični MYC (engl. *Cellular myc*)
- CIN- kromosomska nestabilnost (engl. *Chromosomal instability*)
- SMAD- engl. *Suppressor of Mothers against decapentaplegic*
- DNA- deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*)
- MSH2- protein za popravak neusklađenosti DNA MSH2 (engl. *DNA mismatch repair protein 2* ili *MutS homolog 2*)
- MLH1- protein za popravak neusklađenosti DNA MLH1 (engl. *DNA mismatch repair protein 1* ili *MutL protein homolog 1*)
- PMS2- endonukleaza za popravak neusklađenosti PMS2 (engl. *mismatch repair endonuclease PMS2*)
- CD- klaster diferencijacije (engl. *Cluster of differentiation*)
- EGFR- receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)
- VGFR-2- receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta 2 (engl. *vascular endothelial growth factor receptor type-2*)
- IGFR-2- receptor faktora rasta sličnog inzulinu (engl. *insulin-like growth factor II receptor*)
- TNF- faktor tumorske nekroze (engl. *Tumor necrosis factor*)

ERM- erzin-radiksin-moesin (engl. *Erzin-radixin-moesin*)

HSP- protein toplinskog šoka (engl. *Heat shock protein*)

ICAM-1- unutarstanična adhezijska molekula 1 (engl. *Intracellular adhesion molecule-1*)

IGSF8- član imunoglobulinske superobitelji proteina 8 (engl. *Immunoglobulin superfamily member 8*)

PTGFRN- negativni regulator receptora prostaglandina F2 (engl. *prostaglandin F2 receptor negative regulator*)

TAZ- transkripcijski koaktivator sa PDZ- vezujućim motivom (engl. *transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*)

YAP- engl. *Yes associated protein*

NGS- sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *Next generation sequencing*)

RNAseq- RNA sekvenciranje (engl. *RNA sequencing*)

SAGE- serijska analiza ekspresije gena (engl. *Serial analysis of gene expression*)

EST- komparativna analiza kratke izražene sekvence (*comparative expressed sequence tag analysis*)

PCR- lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase chain reaction*)

qPCR- kvantitativni PCR (*quantitative PCR*)

Ct- razina detekcije (engl. *Threshold cycle*)

GAPDH- gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

ACTB- beta aktin (engl. *Beta actin*)

B2M- β_2 mikroglobulin

PPIA- peptidilprolil izomeraza A (engl. *Peptidylprolyl isomerase A*)

cDNA- engl. *Copy DNA*

RIN- razina integriteta RNA (engl. *RNA integrity number*)

7. LITERATURA

Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell Biol.*, 1969, 41:59–72.

Badžek, S., Lesko Kelović, V., Pleština, S., Prejac, J., Majerović, M. i Augustin, G. Unutarstanični signalni putevi u karcinogenezi kolorektalnog tumora. *Acta Chirurgica Croatica*, 2012, 9 (1), 25-34.

Bigagli E, Luceri C, Guasti D, Cinci L. Exosomes secreted from human colon cancer cells influence the adhesion of neighboring metastatic cells: role of microRNA-210. *Cancer. Biol. Ther.*, 2016, 72:1–8.

Bonucci, E. Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrastruct. Res.*, 1967, 20(1-2), 33–50.

Brkić, T. Colorectal Cancer Prevention Programmes, *Medicus*, 2012, 21(2_Gastroenterologija), 211-214.

Brkić, T., i Grgić, M. 'Colorectal Carcinoma', *Medicus*, 2006, 15(1_Gastroenterologija), 89-97

Cao, Y., Yu, M., Dong, G., Chen, B., & Zhang, B. Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation. *Molecules*, 2020, 25(3), 706.

Chervoneva, I., Li, Y., Schulz, S., Croker, S., Wilson, C., Waldman, S. A., & Hyslop, T. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. *BMC Bioinf.*, 2010 11(1), 253.

Colussi D, Brandi G, Bazzoli F and Ricciardiello L. Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, 14 16365–85

Dai, Y., Cao, Y., Köhler, J., Lu, A., Xu, S., & Wang, H. Unbiased RNA-Seq-driven identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analyses of pooled cancer exosomes. *BMC Genomics*, 2021, 22(1).

Danese, E., Minicozzi, A., Benati, M., Paviati E., Lima-Oliveira G., Gusella M., Pasini F., L Salvagno G., Montagnana M. & Lippi G. Reference miRNAs for colorectal cancer: analysis and verification of current data. *Sci Rep* 7, 2017, 8413.

Duran-Sanchon S, Vila-Navarro E, Marcuello M, Lozano J J, Muñoz J, Cubiella J, Diez M S, Bujanda L, Lanás A, Jover R, Hernández V, Quintero E, Herreros-Villanueva M, Martín A C, Pérez-Palacios R, Arroyo R, Castells A and Gironella M. Validation of miR-1228-3p as Housekeeping for MicroRNA Analysis in Liquid Biopsies from Colorectal Cancer Patients. *Biomolecules*, 2019, 10 16

Epidemiologija raka debelog crijeva u Hrvatskoj, 2022., <http://www.hzjz.hr>, pristupljeno 9. 9. 2022

Fearon, E. R., & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990, 61(5), 759–767.

Fodde, R., Smits, R., & Clevers, H. APC, Signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2001, 1(1), 55–67

Fryer R, M, Randall J, Yoshida T, Hsiao L, -L, Blumenstock J, Jensen K, E, Dimofte T, Jensen R, V, Gullans S, R: Global Analysis of Gene Expression: Methods, Interpretation, and Pitfalls. *Exp Nephrol*, 2002, 10:64-74.

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. *Transl. Oncol.*, 2018, 11(2), 221–232.

Ge, L., Zhou, F., Nie, J., Wang, X., & Zhao Q. Hypoxic colorectal cancer-secreted exosomes deliver miR-210-3p to normoxic tumor cells to elicit a protumoral effect. *Exp. Biol. Med.*, 2021, 246(17), 1895–1906.

He, W.-L., Weng, X.-T., Wang, J.-L., Lin, Y.-K., Liu, T.-W., Zhou, Q.-Y., Hu Y., Pan Y., Chen, X.-L. Association Between c-Myc and Colorectal Cancer Prognosis: A Meta-Analysis. *Front. Physiol.*, 2018, 9.

Iglesias M, Frontelo P, Gamallo C, Quintanilla M. Blockade of Smad4 in transformed keratinocytes containing a Ras oncogene leads to hyperactivation of the Ras-dependent Erk signalling pathway associated with progression to undifferentiated carcinomas. *Oncogene*, 2000, 19(36):4134-45.

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

Kozera, B., & Rapacz, M. Reference genes in real-time PCR. *J. Appl. Genet.*, 2013, 54(4), 391–406.

Li T, Li J, Wang H, Zhao J, Yan M, He H and Yu S. Exosomes: Potential Biomarkers and Functions in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front. Mol. Biosci.*, 2022, 9:881794

Lynch, H. T., & de la Chapelle, A. *Hereditary Colorectal Cancer*. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348(10), 919–932.

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.

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

Poulet, G., Massias, J., & Taly, V. Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta cytol.*, 2019, 1–7.

Sikora, K., Chan, S., Evan, G., Gabra, H., Markham, N., Stewart, J., & Watson, J. c-myc oncogene expression in colorectal cancer. *Cancer*, 1987, 59(7), 1289–1295.

Teng Y, Ren Y, Hu X, Mu J, Samykutty A, Zhuang X, et al. MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun.*, 2017, 8, 14448.

Toon CW, Chou A, Clarkson A, DeSilva K, Houang M, Chan JC, Sioson LL, Jankova L, Gill AJ. Immunohistochemistry for myc predicts survival in colorectal cancer. *PLoS One.*, 2014, 9 (2)

Trams EG, Lauter CJ, Salem N Jr., Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1981, 645,63–70

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. *Genome Biol.*, 2002, 3 (7)

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

Wang, J., Yan, F., Zhao, Q. *et al.* Circulating exosomal miR-125a-3p as a novel biomarker for early-stage colon cancer. *Sci Rep*, 2017, 7, 4150

Yang M., Tang X., Wang Z., Wu X., Tang D., Wang D. miR-125 inhibits colorectal cancer proliferation and invasion by targeting TAZ. *Biosci Rep*, 2019, 39 (12)

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1 SAŽETAK

Kolorektalni karcinom (CRC) multifaktorska je bolest složene etiologije i visoke prevalencije. U većini slučajeva nastaje iz na početku benignih adenoma koji postaju maligni nakon niza genskih mutacija u epitelnim stanicama kolona. Karakterizira ga spor razvoj i duga presimptomatska faza što predstavlja mogućnost za njegovo rano otkrivanje i liječenje. Tekuća biopsija neinvazivna je metoda za određivanje molekularnog profila tumora uključujući CRC, a egzosomalne RNA i miRNA obećavajući su biomarkeri za dijagnozu, prognozu i evaluaciju odgovora na terapiju u CRC-u. Cilj ovog rada bila je optimizacija metode za određivanje transkripata RNA i miRNA u egzosomima pacijenata sa CRC-om koji su u literaturi istaknuti kao potencijalni prognostički i terapijski biljezi ove bolesti. RNA je izolirana iz egzosoma iz plazme 18 bolesnika s potvrđenim CRC-om. Ekspresija *C-MYC* te referentnih gena *B2M*, *PPIA* i *GAPDH*, određena je pomoću qPCR tehnike i TaqMan eseja, a ekspresija miR-19a-3p, miR-92a-3p, miR-125-3p, miR-193a-3p, miR-210-3p te referentnih mir-103a-3p, mir 1228-3p i miR-520d-3p pomoću SYBR green tehnologije. Koncentracija RNA kretala se u rasponu od 2,44-51,20 ng/μl sa medijanom od 11,48 ng/μl. Gen *C-MYC* kao i ispitivani referentni geni nisu dokazani niti u jednom uzorku što može značiti da su te mRNA prevelike za pakiranje u egzosome. S druge strane, od predloženih referentnih miRNA dokazana je ekspresija jedino miR-103a-3p zbog čega je kao standard s kojim se uspoređivala ekspresija ciljnih miRNA korištena sintetička UniSp6. U najvećem broju uzoraka (svih 18) dokazane su miR-19a-3p i miR-92a-3p dok je u najmanjem broju uzoraka (3) dokazana miR-125-3p. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su uzorci unatoč niskim koncentracijama RNA dovoljno kvalitetni za određivanje većine miRNA od interesa u našem istraživanju ali ne i za mRNA.

8.2 SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is multifactorial disease with complex etiology and high prevalence among population. In most cases it arises from initially benign adenomas that become malignant after series of gene mutations in colon epithelial cells. It is characterized by slow development and long presymptomatic phase which gives opportunities for early detection and treatment. Liquid biopsy is non-invasive method for determination of cancer molecular profile including CRC, while exosomal RNAs and miRNAs are promising biomarkers for diagnosis, prognosis, and evaluation of therapy response in CRC patients. The goal of this research was to optimize the method for assessment of RNA and miRNA isolated from exosomes of CRC patients found to be promising potential prognostic and therapeutic markers of this disease.

RNA was isolated from exosomes from plasma of 18 patients diagnosed with CRC. Expression of *C-MYC* and reference *B2M*, *PPIA* and *GAPDH* genes was determined using qPCR and TaqMan assays, and expression of miR-19a-3p, miR-92a-3p, miR-125-3p, miR-193a-3p, miR-210-3p and three reference miRNAs: mir-103a-3p, mir 1228-3p and miR-520d-3p was determined using SYBR green technology.

Concentration of RNA ranged from 2,44 ng/μl to 51,20 ng/μl with median of 11,48 ng/μl. *C-MYC* gene and three reference genes weren't detected in any sample what can imply that these mRNAs are too big for packing in exosomes. On the other hand, only miR-103a-3p was detected of three potential reference genes, which is why UniSp6 was used as standard to normalise expression of target miRNAs. MiR-19a-3p and miR-92-a-3p were detected in most samples (18) while miR-125-3p was detected in lowest number of samples (3). We can conclude that despite low concentrations, our samples have sufficient quality for determination of the expression of most of the targeted miRNAs in this research, but the same cannot be said for mRNAs.

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

OPTIMIZACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE TRANSKRIPATA RNA I miRNA U UZORCIMA EGZOSOMA PACIJENATA SA KOLOREKTALNIM KARCINOMOM

Matej Barišić

SAŽETAK

Kolorektalni karcinom (CRC) multifaktorska je bolest složene etiologije i visoke prevalencije. U većini slučajeva nastaje iz na početku benignih adenoma koji postaju maligni nakon niza genskih mutacija u epitelnim stanicama kolona. Karakterizira ga spor razvoj i duga presimptomatska faza što predstavlja mogućnost za njegovo rano otkrivanje i liječenje. Tekuća biopsija neinvazivna je metoda za određivanje molekularnog profila tumora uključujući CRC, a egzosomalne RNA i miRNA obećavajući su biomarkeri za dijagnozu, prognozu i evaluaciju odgovora na terapiju u CRC-u. Cilj ovog rada bila je optimizacija metode za određivanje transkripata RNA i miRNA u egzosomima pacijenata sa CRC-om koji su u literaturi istaknuti kao potencijalni prognostički i terapijski biljezi ove bolesti. RNA je izolirana iz egzosoma iz plazme 18 bolesnika s potvrđenim CRC-om. Ekspresija *C-MYC* te referentnih gena *B2M*, *PPIA* i *GAPDH*, određena je pomoću qPCR tehnike i TaqMan eseja, a ekspresija miR-19a-3p, miR-92a-3p, miR-125-3p, miR-193a-3p, miR-210-3p te referentnih mir-103a-3p, mir 1228-3p i miR-520d-3p pomoću SYBR green tehnologije. Koncentracija RNA kretala se u rasponu od 2,44-51,20 ng/ μl sa medijanom od 11,48 ng/μl. Gen *C-MYC* kao i ispitivani referentni geni nisu dokazani niti u jednom uzorku što može značiti da su te mRNA prevelike za pakiranje u egzosome. S druge strane, od predloženih referentnih miRNA dokazana je ekspresija jedino miR-103a-3p zbog čega je kao standard s kojim se uspoređivala ekspresija ciljnih miRNA korištena sintetička UniSp6. U najvećem broju uzoraka (svih 18) dokazane su miR-19a-3p i miR-92a-3p dok je u najmanjem broju uzoraka (3) dokazana miR-125-3p. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su uzorci unatoč niskim koncentracijama RNA dovoljno kvalitetni za određivanje većine miRNA od interesa u našem istraživanju ali ne i za mRNA.

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

Rad sadrži: 42 stranice, 11 grafičkih prikaza, 5 tablica i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kolorektalni karcinom, tekuća biopsija, egzosomi, RNA, miRNA, PCR, qPCR

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. Kristina Radić, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2022.

Basic documentation card

OPTIMIZATION OF METHOD FOR DETERMINATION OF TRANSCRIPTS OF RNA AND miRNA IN EXOSOMES FROM COLORECTAL CANCER PATIENTS

Matej Barišić

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is multifactorial disease with complex etiology and high prevalence among population. In most cases it arises from initially benign adenomas that become malignant after series of gene mutations in colon epithelial cells. It is characterized by slow development and long presymptomatic phase which gives opportunities for early detection and treatment. Liquid biopsy is non-invasive method for determination of cancer molecular profile including CRC, while exosomal RNAs and miRNAs are promising biomarkers for diagnosis, prognosis, and evaluation of therapy response in CRC patients. The goal of this research was to optimize the method for assessment of RNA and miRNA isolated from exosomes of CRC patients found to be promising potential prognostic and therapeutic markers of this disease. RNA was isolated from exosomes from plasma of 18 patients diagnosed with CRC. Expression of *C-MYC* and reference *B2M*, *PPIA* and *GAPDH* genes was determined using qPCR and TaqMan assays, and expression of miR-19a-3p, miR-92a-3p, miR-125-3p, miR-193a-3p, miR-210-3p and three reference miRNAs: mir-103a-3p, mir 1228-3p and miR-520d-3p was determined using SYBR green technology. Concentration of RNA ranged from 2,44 ng/μl to 51,20 ng/μl with median of 11,48 ng/μl. *C-MYC* gene and three reference genes weren't detected in any sample what can imply that these mRNAs are too big for packing in exosomes. On the other hand, only miR-103a-3p was detected of three potential reference genes, which is why UniSp6 was used as standard to normalise expression of target miRNAs. MiR-19a-3p and miR-92-a-3p were detected in most samples (18) while miR-125-3p was detected in lowest number of samples (3). We can conclude that despite low concentrations, our samples have sufficient quality for determination of the expression of most of the targeted miRNAs in this research, but the same cannot be said for mRNAs.

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

Thesis includes: 42 pages, 11 figures, 5 tables and 35 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Colorectal cancer, liquid biopsy, exosomes, RNA, miRNA, PCR, qPCR

Mentor: **Andrea Hulina Tomašković, Ph.D.** Assistant 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
Kristina Radić, Ph.D. Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2022