

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**Klinicko-patologická charakteristika kolorektálního  
karcinomu produkujícího mucin**

**Clinico-pathological characteristics of mucin-producing  
colorectal carcinoma**

MUDr. Ladislav Sojka

Listopad 2022

**Doktorské studijní programy v biomedicíně**  
*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc.

Školící pracoviště: Chirurgická klinika 1.LF UK a Fakultní  
Thomayerovy nemocnice

Školitel: MUDr. Miroslav Levý Ph.D., MBA.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## **Obsah**

1. Úvod.....	8
2. Vymezení cílů práce a stanovení hypotéz.....	10
2.1. Cíle práce.....	10
2.2. Hypotéza.....	10
3. Materiál a metodika.....	11
4. Výsledky.....	14
4.1: Klinické vzorky.....	14
4.2. Výzkum založený na buněčných liniích...	15
5. Diskuze.....	16
6. Závěr.....	20
7. Literatura.....	22
8. Seznam publikací.....	24

## Abstrakt

Kolorektální karcinom (CRC) patří celosvětově k nejčastějším malignitám s přetrvávající vysokou mortalitou. Z toho důvodu jsou kladeny vysoké nároky na výzkum tohoto onemocnění. Cílem naší práce bylo zhodnocení epidemiologie CRC v České republice v porovnání se světem. Zaměřili jsme se na zhodnocení nejnovějších poznatků ve screeningu, diagnostice, zkoumali jsme prognostické faktory a v neposlední řadě terapeutické možnosti u CRC. Dále jsme podrobněji popsali karcinomy produkující mucin a samotný mucin jako rizikový faktor pro prognózu pacientů s CRC.

V experimentální části práce jsme se zabývali genem mucinu *MUC13* a osou *MUC13* – miR-4647, které jsou právě spojeny s horší prognózou u pacientů s CRC.

V naší práci jsme použili vzorky CRC a okolní tkáň bez karcinomu odebraných od pacientů, kteří podstoupili chirurgický zákrok ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze, ve Fakultní Thomayerově nemocnici v Praze a ve Fakultní nemocnici v Plzni. Odběr proběhl v letech 2011 až 2015. Bylo odebráno 187 vzorků od pacientů se sporadickým kolorektálním karcinomem. Subjekty studie poskytly informace o svých životních návycích, body mass index (BMI), cukrovce a rodinném či osobním výskytu rakoviny v anamnéze.

Pacienti s kolorektálním karcinomem s vyšší hladinou exprese genu *MUC13* v nádorové tkáni měli horší prognózu a kratší přežití v porovnání s pacienty s nižší hladinou exprese (Gupta, 2012, Chauhan, 2009 a 2012). V experimentu na buněčných liniích jsme stanovili, že hladina exprese *MUC13* poklesla po ektopické nadměrné expresi miR-4647 pomocí RT-qPCR.

Mucinózní tumory v naší studii exprimovaly MUC13 s nižší intenzitou, v porovnání s adenokarcinomy (25 % vs. 34 %).

*In vitro* jsme potvrdili, že při vyšším stupni exprese *MUC13* mají buňky delší přežívání a vyšší schopnost migrace a naopak, buňky kolorektálního karcinomu se zvýšenou expresí miR-4647 tvořily významně méně kolonií a projevovaly nižší schopnost migrace. Tato pozorování potvrdila, že horší přežívání pacientů s kolorektálním karcinomem může být asociováno s genem *MUC13*.

Je zajímavé, že jsme pozorovali i vyšší hladiny exprese miR-4647 v asociaci s horším přežíváním pacientů, což je v rozporu s naším pozorováním negativní korelace mezi hladinami miR-4647 a *MUC13*. Zjevně je vliv na prognózu složitějšího charakteru a mohou zde hrát roli další faktory. Až další studie prokáží přesnější vztah mezi expresí *MUC13*, stádiem tumoru a prognózou maligního procesu.

MUC13 uvolněný z povrchu nádorových buněk a jeho hodnoty hladiny v séru u pacientů s gastrointestinálními karcinomy by mohly být důležitým diagnostickým cílem. Vzhledem k uvedeným výsledkům se osa *MUC13* – miR-4647 u kolorektálního karcinomu zdá být velice nadějná s ohledem na nové terapeutické přístupy. Předpokládáme, že gen *MUC13* by mohl představovat signifikantní potenciál pro screening, diagnózu a léčbu rakoviny.

## Abstract

Colorectal carcinoma (CRC) is one of the most common malignancies worldwide with persistently high mortality. As a consequence, high demands are placed on research into this disease. The aim of this study was to evaluate the epidemiology of colorectal carcinoma in the Czech Republic in comparison with worldwide data. We focused on the evaluation of the latest findings in screening and diagnosis, investigated prognostic factors, and also focused on the therapeutic options of CRC. Furthermore, mucin-producing carcinomas are described in detail and mucin itself was confirmed as a risk factor for the prognosis of CRC patients.

The experimental part of the study focused on gene mucin *MUC13* and the *MUC13* – miR-4647 axis, which is associated with adverse prognosis in CRC patients.

Samples of CRC and samples of adjacent non-malignant mucosa tissue were used. The samples were collected from patients who underwent surgery at the General University Hospital in Prague, at the Thomayer University Hospital in Prague and at the University Hospital in Pilsen (Czech Republic). The collection of samples took place between 2011 and 2015. The total of 187 samples were collected from patients with sporadic colorectal cancer. The subjects of the study all provided information on their lifestyle habits, body mass index (BMI), diabetes, and family or personal history of cancer.

CRC patients with higher levels of gene *MUC13* expression in tumor tissue showed a worse prognosis and shorter survival compared to patients with lower levels of expression (Gupta, 2012, Chauhan, 2009 a 2012,). In a cell line experiment, we

determined that *MUC13* expression levels decreased after ectopic overexpression of miR-4647 by RT-qPCR. In the present study mucinous tumors expressed MUC13 at a lower level compared to adenocarcinomas (25 % vs. 34 %).

*In vitro*, we confirmed that higher levels of *MUC13* expression were associated with longer survival and higher migration ability of the cancer cells, and conversely, colorectal cancer cells with increased miR-4647 expression formed significantly fewer colonies and exhibited decreased migration ability. These observations confirmed that the decreased survival of CRC patients may be associated with the gene *MUC13* and with decreased miR-4647 expression. Interestingly, also higher expression levels of miR-4647 were associated with shorter patient survival, which is in contrast to our observations of a negative correlation between miR4647 and *MUC13* levels. Clearly the effect on prognosis is of a more complex nature, where other factors may play a role. Further research should clarify the relationship between *MUC13* expression, tumor stage, and prognosis of the malignant process.

MUC13 released from the surface of tumor cells and its serum levels in patients with gastrointestinal carcinomas may be an important diagnostic tool. Given these results, the *MUC13* – miR-4647 axis in colorectal cancer seems very promising with regards to novel therapeutic approaches. We believe that gene *MUC13* might have a significant potential for screening, diagnosis, and treatment of cancer.

## 1. Úvod

Kolorektální karcinom (CRC) je nádorové onemocnění tlustého střeva. CRC představují závažný zdravotní problém s celosvětovým výskytem.

V teoretickém úvodu práce jsme se zabývali incidencí CRC v ČR a ve světě. CRC je v ČR dle ÚZIS druhá nejčastější malignita (ÚZIS, 2018), celosvětově se jedná o třetí nejčastější malignitu (GCO, 2021). Převažuje nález CRC u mužů mezi 65-79 rokem (Dušek, 2022).

Zkoumali jsme rizikové faktory rozvoje CRC. Podrobněji jsme se v dostupné literatuře zaměřili na možnosti screeningových vyšetření, která jsme blíže popsali. Zabývali jsme se stanginem onemocnění, možnými onkomarkery a biomarkery pro stanovení prognózy a nejlepšího terapeutického postupu. CRC jsme rozdělili podle etiologie jeho vzniku, i dle místa vzniku. Teorie vzniku CRC jsme podrobně popsali. V závěru naší teoretické části jsme se zaměřili na možné klinické příznaky a terapeutické možnosti u CRC.

Podrobněji jsme se věnovali mucinům a nádorům produkujícím mucin. Muciny jsou komplexy buněčného povrchu, glykoproteiny, které jsou vylučovány buňkami epitelu. Funkce mucinu je chránit a zvlhčovat povrch tkání sliznic či epitelů. Rodina lidského mucinu (MUC) se skládá z mnoha členů (MUC1 až MUC21). Vyskytují se v gastrointestinálním a dýchacím traktu, ale i uvnitř orgánů, jako je prs, pankreas, játra a jiné (Kufe, 2009).

Nádory secernující mucin, mají horší prognózu. Mají vyšší rychlost růstu. Ve vyšším procentu se u nich nacházelo postižení lymfatických uzlin, mají vyšší metastatický potenciál a tím pádem i nižší míru pětiletého přežití (Sasaki, 1987).



Agresivnější chování koreluje s množstvím mucinózní složky, bez ohledu na histologický stupeň diferenciaci (Kufe, 2009). Nacházíme je více u pacientů v nižším věku a pravé části tračnicku (Suma, 1992).

Úloha mucinu v rakovinových buňkách je pravděpodobně zvýšení rezistence epitelu a odolnost oproti toxickému působení látek na povrch tkání. Muciny byly právě z tohoto důvodu označeny jako markery špatné prognózy pacienta (Jonckheere, 2014) a stávají se tak atraktivním terapeutickým cílem u různých typů rakoviny (Kufe, 2009). Výzkum se zabývá vývojem protilátek, vakcín a lékových inhibitorů. Tyto látky jsou stále ve fázi klinických výzkumů (Kufe, 2009).

Naše práce se zabývala genem mucinu MUC13. MUC13 je mucin buněčného povrchu, který je ve vyšší míře nacházen u nádorů kolorekta (Gupta, 2012), ale i u jiných nádorových onemocnění (Chauhan, 2012, Khan, 2014). Ve zdravé tkáni je tento protein produkován na apikální hranici buněčného epitelu střeva a jeho produkce se zvyšuje jako reakce na infekci (Sheng, 2011) či zánět (Sheng, 2011). Obsahuje proteinkinasu C, která může hrát roli v buněčných signalizačních drahách a regulovat tak proliferaci a přežívání buněk (Chauhan, 2009)

Bylo zjištěno, že zvýšená cytoplazmatická exprese *MUC13* je nacházena u pokročilého a metastatického CRC. MUC13 zvyšuje aktivitu buněčného faktoru  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), který tak působí proti apoptóze (Sheng, 2011) a podporuje vznik zánětu (Williamns, 2001). Molekulární mechanismy zodpovědné za zvýšenou sekreci MUC13 nejsou dobře známé. Jako jedna z možností je zvažována deregulace microRNAs (miRNAs), která reguluje mRNA *MUC13*. V předchozích studiích vypracovaných na Ústavu experimentální medicíny AV ČR,

týkajících se polymorfismu ve vazebných místech miRNAs v mucinových genech, zjistili signifikantní souvislost mezi homozygotní variantou rs1532602 v genu *MUC13* a zvyšujícím se rizikem kolorektálního karcinomu (Schmith, 2015). Genetická variace v 3'UTRs cílových genů může ovlivnit miRNA vazby, což vede k funkční variabilitě mRNA a expresi proteinů. Přidatná exprese i funkce miRNA je často pozorována u kolorektálního karcinomu.

## **2. Vymezení cílů práce a stanovení hypotézy**

### **2.1. Cíle práce**

1. Všeobecná charakteristika CRC - v teoretické části práce se zabýváme etiologií, screeningem, rizikovými a prognostickými faktory, stagingem, průběhem onemocnění a terapií.
2. Podrobnější popis CRC produkujícího mucin a samotného mucinu.
3. Role *MUC13* v nádorové tkáni oproti tkáni bez tumoru se zaměřením na jeho vliv na prognózu a celkové přežití pacientů.
4. Exprese miR-4647 a osy *MUC13* – miR-4647 jako možný terapeutický a prognostický cíl u CRC.

### **2.1. Hypotéza**

V současné době se výzkum zaměřuje na zkoumání nádorových markerů (biomarkerů, onkomarkerů) karcinomů a možnost jejich využití v screeningu, diagnostice, pro stanovení prognózy i v terapii karcinomu. *MUC13* a osa *MUC13* – miR-4647 by mohly představovat jeden takový slibný marker u CRC s prognostickým a terapeutickým potenciálem.

### 3. Materiál a metodika

Do studie byl použit CRC odebraný pacientům v letech 2011 až 2015, kteří podstoupili chirurgický zákrok ve Všeobecné fakulní nemocnici v Praze, ve Fakultní Thomayerově nemocnici v Praze a ve Fakultní nemocnici Plzni. Byly odebrány vzorky tumoru a okolní tkáně bez tumoru, následně byly vzorky hluboce zmrazeny. Všechny subjekty s kolorektální karcinomem byly monitorovány do 31.března 2021, bylo u nich sledováno OS.

Sběr dat a vzorků tkáně CRC a okolní tkáně bez tumoru byl prováděn i na chirurgické klinice 1. LF UK a Fakultní Thomayerovy nemocnice. Vzorky tumoru byly použity k experimentu na myších. Bohužel ten neměl relevantní výsledek.

Experimentální část probíhala na Ústavu experimentální medicíny AV ČR pod vedením MUDr. Pavla Vodičky, CSc. a Ing. Veroniky Vymetálkové, Ph.D. za mé aktivní účasti v jednotlivých fázích experimentu. Histologické zpracování vzorů tkání probíhalo ve spolupráci s patologií Fakultní nemocnice v Plzni. Statistická analýza a zpracování dat byla provedena Ing. Vendulou Novosadovou Ph.D. Výsledky práce byly již publikovány (Sojka, 2022).

Genotypový screening byl prováděn současně pro tumor a přilehlou tkáň bez nádoru. Genomová DNA, celková RNA a mRNA byly izolovány z tkáně tumoru a z přilehlé tkáně bez tumoru pomocí miRVana isolation kit protocol. Koncentrace a čistota RNA byly stanoveny spektrofotometricky. Genetický polymorfismus genů v *MUC13* genu rs1532602 byl stanoven diskriminační analýzou TaqMan allelic diskriminačním testem.

V této studii jsme analyzovali hladinu exprese *MUC13* a miR-4647 pomocí reverzní transkripce (RTr) a qPCR genu *MUC13*. Provedli jsme imunohistochemické stanovení proteinu MUC13. Kvantitativní hodnocení MUC13 bylo provedeno pod mikroskopem.

Byla provedena selekce miRNA. Předpokládá se, že miR-4647 se váže na *MUC13* jen v přítomnosti homozygotního GG genotypu rs1532602 v *MUC13*. Pro detekci miRNA byla celková RNA reverzně přepsána do cDNA za užití souborů genově specifických primerů. Všechny vzorky jsme primárně preamplifikovali za užití vysoce kvantitativního přístroje pro stanovení PCR v reálném čase Biomark (Fluidigm). MicroRNA qPCR byla připravena pomocí stejné platformy.

Výběr buněčných linií kolorektálního karcinomu byl založen na stupni bazální exprese *MUC13* v několika liniích kolorektálního karcinomu, jako je HCT-116, DLD-1, HT29, SW480. Následně byly buňky transfektovány 24 hodin 10 nmol hsa-miR-4647 (cat. 4464066; Sigma Aldrich,USA). Efekt silencingu byl verifikován pomocí qRT-PCR 48 hodin po transfekci pomocí testu TaqMan®Gene Expression Assay (ThermoFisher Scientific,USA) pro *MUC13*.

Celková RNA obsahující miRNA byla získána z buněk pomocí Qiagen miReasy Mini Kit (Qiagen, Germany). cDNA pro detekci genu *MUC13* po transfekci byla syntetizována z 400 ng celkové RNA v 20 µL RTr reakcí pomocí High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific,USA). Exprese *MUC13* byla normalizována na gen *ACTB*. Exprese miR-4647 byla měřena pomocí TaqMan MicroRNA Assays na 7500 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA).

Dále bylo provedeno hodnocení genotypu *MUC13* pro rs1532602 v obou buněčných liniích.

Za standardních podmínek DNA sekvenování bylo provedeno na ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific, USA) a výsledky byly vyhodnoceny pomocí Mutation Surveyor software (Softgenetics, USA).

U testu tvorby kolonií byl počet kolonií spočítán manuálně. Testy buněčné migrace byly provedeny po 48 hodinách po tranfekci pomocí Transwell Permeable Supports 6,5 mm Insert (Corning Costar, USA). Integrita plazmatické membrány byla hodnocena pomocí testu ToxiLight od Lonza (Basilej, Switzerland).

Statistická analýza stupně exprese byla provedena pomocí BM SPSS Statistics 20. Úroveň exprese každého vzorku byla normalizována pomocí předem vybraných referenčních genů a následně zprůměrována. Exprese miR-4647 u pacientů s kolorektálním karcinomem byla normalizována s expresí *RNU48*. Exprese *MUC13* byla normalizována k *ACTB* genu.

Cut-off je stanoven dle mediánu hodnot, takže hodnoty nad mediánem jsou vyšší hladiny a pod mediánem jsou nižší.

Vztahy mezi zkoumanými proměnnými a přežitím byly zkoumány pomocí Spearmanovy korelace vyjádřené Spearmanovým rho ( $\rho$ ). Všechny statistické testy byly provedeny pomocí log-rank testu a Kaplan-Meierových grafů. Všechny statistické testy byly provedeny na 95% hladině spolehlivosti p-hodnoty  $<0,05$  a byly považovány za statisticky významné.

## 4. Výsledky

### 4.1. Klinický výzkum

Expresí genu *MUC13* a miR-4647 byly analyzovány a porovnány. Celkově *MUC13* a miR-4647 byly v naší zkoumané skupině exprimovány odlišně: vyšší stupeň exprese *MUC13* byl pozorován ve tkáni tumoru ve srovnání s přílehlou slizniční tkáni. U miR-4647 jsme pozorovali trend opačný, a to nižší expresi v nádorové tkáni. Negativní korelace mezi *MUC13* a miR-4647 byla pozorována v tkáni tumoru i v přílehlé mukózní tkáni. Vyšší stupeň exprese miR-4647 byl pozorován u žen v porovnání k mužům. Pacienti, kteří neabsolvovali neoadjuvantní chemoterapii, měli hraničně nižší hladinu exprese miR-4647 v porovnání s pacienty po neoadjuvantní chemoterapii. Sledovali jsme, že vyšší stupeň exprese *MUC13* a miR-4647 je spojen s horší prognózou a přežitím. Předpokládáme, že v *silico* je miR-4647 vázána na rs1532602 v *MUC13* genu u homozygotního GG genotypu. Avšak v přítomnosti varianty homozygotního AA genotypu se miR-4647 na gen *MUC13* neváže. Nedávno bylo publikováno, že varianta homozygotního AA genotypu rs1532602 v miRNA ve vazebném místě *MUC13* je spojena s nižším rizikem vzniku kolorektálního karcinomu (Sheng, 2017). Je zajímavé, že pacienti nesoucí homozygotní GG genotyp rs1532602 v *MUC13* spolu s vyšším stupněm miR-4647 vykazovali horší OS.

Dále jsme pozorovali vyšší intenzitu exprese *MUC13* v tkáni národu při porovnání s okolní tkání bez nádoru (32,57 % versus 5,04 %). Mucinózní tumory exprimovaly *MUC13* s nižší intenzitou než adenokarcinomy bez mucinózní komponenty dle intenzity barvení (25 % vs. 34 %).

## 4.2. Výzkum založený na buněčných liniích

K analýze efektu miR-4647 na buněčnou migraci a tvorbu kolonií jsme nejprve optimalizovali proces transfekce odpovídajícího miR-4647 prekurzorům. Zaznamenali jsme signifikantně vyšší hladiny tumorsupresorové miR-4647. Ve většině případů byl nejvýznamnější účinek zaznamenán po 24 hodinách od transfekce.

Pro další zkoumání osy *MUC13* – miR-4647, linie buněk kolorektálního karcinomu byly transfekovány s miR-4647 k detekci hladin mRNA *MUC13* a proteinové exprese. Naše data odhalila, že nadměrná exprese miR-4647 inhibovala *MUC13* mRNA expresi ve srovnání s negativními kontrolami v HCT-116 a DLD-1 buňkách. Pozorovali jsme, že up-regulační exprese miR-4647 neovlivnila buněčnou homeostatickou síť. Pro stanovení efektu účinku miRNA na přežití buněk byla hodnocena závislost růstu pomocí testu tvorby kolonií. Po 12 dnech, buňky HCT-116 a DLD-1 transfekované pomocí testované miR-4647 tvořily významně méně kolonií než buňky transfekované pomocí kontrolních oligonukleotidů.

Ke zkoumání účinků miR-4647 na invazivní chování rakovinových buněk byl použit migrace. Schopnost migrace buněk CRC po transfekci pomocí miR-4647 byla redukována u obou buněčných linií. Abychom zjistili, jak snížená hladina *MUC13* ovlivňuje chování buněk kolorektálního karcinomu, umlčeli jsme *MUC13* pomocí siRNA v buňkách HCT-116. Nižší stupeň exprese *MUC13* jsme potvrdili potlačením tvorby kolonií (33% snížení,  $p=0,02$ ) a buněčné migrace (64% snížení,  $p=0,34$  D0003). Tento účinek byl také pozorován po umělé nadměrné expresi miR-4647, tato data mohou poukazovat na roli *MUC13* v buňkách CRC.

## 5. Diskuse

Nedávno bylo zjištěno, že homozygotní varianta genotypu AA rs 1532602 ve vazebném místě pro miRNA genu *MUC13* byla spojena s nižším rizikem vzniku CRC. Bylo zjištěno, že mucinózní kolorektální karcinomy jsou spojeny s kratší dobou přežití a vyšším stádiem TNM klasifikace při stanovení diagnózy. V předkládané disertační práci jsme analyzovali *in silico* predikovanou osu *MUC13* – miR-4647 a poukázali na asociaci jejich rozdílné exprese v přežití pacientů.

Nejprve jsme potvrdili, že exprese *MUC13* poklesla po uměle navozeném navýšení exprese miR-4647 v buňkách pomocí RT-qPCR. Dále jsme pozorovali sníženou expresi miR-4647 v lidské tkáni CRC v porovnání s okolní zdravou tkání, zatímco bylo zjištěno, že *MUC13* je zvýšeně exprimován v nádorech kolorektálního karcinomu.

Naším hlavním výsledkem je pozorování vyšší expresní hladiny *MUC13* ve spojení s horším přežíváním pacientů s CRC. Tato zjištění byla také potvrzena na funkčních testech *in vitro*, kde buňky s nižší expresní hladinou *MUC13* měly nižší schopnost tvorby kolonií. Kromě toho buňky CRC se zvýšenou expresí miR-4647 tvořily významně méně kolonií a projevovaly nižší schopnost migrace. Předpokládá se, že miR-4647 se váže alelu G na polymorfním sekvenčním místě rs1532602 genu *MUC13*. Tato pozorování zjistila, že horší přežívání buněk s CRC může být asociováno s genem *MUC13*, a ne zvýšenou sekrecí miR-4647. Vyšší stupeň exprese miR-4647 v CRC byl zároveň spojen s kratším přežíváním u pacientů s homozygotním GG genotypem rs1532602 *MUC13*. Naším nejdůležitějším zjištěním byl vliv



vyššího stupně exprese miR-4647 na přežití pacientů, který nebyl doposud analyzován dle dostupné literatury.

Přítomnost SNP by také mohla přispět k rozdílným interakcím miRNAs, které se váží na tuto oblast. Tato skutečnost může mít efekt na posttranskripční regulace zprostředkované jednotlivými SNP. Z toho důvodu nemůžeme v současné době vyloučit, že pozorované klinické fenotypy mohou být výsledkem různých kombinací miRNAs navazující na některou z předpokládaných SNP. Navíc nedávné výzkumy naznačují, že genové variace v jiných oblastech než 3'UTR mohou také ovlivnit vazbu miRNAs.

Je zajímavé, že jsme pozorovali vyšší hladiny exprese miR-4647 v asociaci s horším přežíváním pacientů s CRC. Tato kontroverzní asociace s našimi údaji by měla být zvažována opatrně. Jednou z hypotéz by mohla být skutečnost, že podle Targetscanu, je dalším cílem miR-4647 tumor nekrotizujícího faktor, který hraje důležitou roli v homeostáze B buněk, procesech imunitního systému a signalizační cestě atd. MiRNAs pracují s přesným nastavením translace prostřednictvím specifických vazeb mRNA. Negativní regulace exprese genu *TNFRSF13C* prostřednictvím miR-4647 inhibuje jeho translaci a způsobuje degradaci cílové mRNA. Spojení horšího přežití pacientů s vyšším stupněm exprese miR-4647 by takto mohlo být vysvětleno. Sheng a kol. pozorovali, že MUC13 podporuje tvorbu TNF způsobenou NF- $\kappa$ B aktivací za pomoci TNFR1 a E3 ligázy, což zvyšuje ubiquitinaci RIPK1 (2013).

Pacienti nesoucí homozygotní genotyp GG pro rs1532602 v *MUC13* spolu s vyššími hladinami miR-4647 však vykazovali horší OS. To by mohlo vysvětlit pozorování vyšších hladin exprese miR-4647 a horšího přežití pacientů.

V nádorové tkáni byla pozorována vyšší intenzita exprese MUC13 v porovnání s její přilehlou nenádorovou tkání. Na druhou stranu v naší studii mucinózní tumory exprimovaly MUC13 na nižší úrovni na základě nižší intenzity barvení v porovnání s adenokarcinomy (25 % vs. 34 %). Ve výše uvedené studii jsme pozorovali vyšší expresi MUC13 u tumorů v porovnání s přilehlou nenádorovou tkání střeva. Další studie prokáží přesnější vztah mezi expresí MUC13, stadiem tumoru a prognózou maligního procesu.

Deregulace exprese *MUC13* byla pozorována u karcinomů vaječníku, slinivky břišní, žaludku a kolorektálního karcinomu (Gupta, 2012, Chauhan, 2012). Potvrdili jsme, že pacienti s CRC s vyšším stupněm exprese *MUC13* v nádorové tkáni mají horší prognózu a kratší přežití v porovnání s pacienty s nižším stupněm exprese. Tato pozorování souhlasí se studii Gupta a kol. (2012, 2014). *MUC13* mRNA byla také identifikována v krvi pacientů s kolorektálním karcinomem, avšak *MUC13* mRNA byla také detekována v krvi zdravých jedinců (Lauriola, 2010). Sheng a kol. pozorovali, že MUC13 by mohl chránit epiteliální buňky tlustého střeva před apoptózou (2017) a to pomocí cílení MUC13 a MUC13 regulované dráhy, které senzibilizující rakovinové buňky k smrti a z toho důvodu by tato signalizační dráha mohla představovat slibný cíl k léčbě rakoviny (Williams, 2001).

Chauhan a kol. prokázali, že exprese MUC13 zvýšila expresi HER2 u různých typů buněčných linií a že zablokování MUC13 vedlo k snížení exprese HER2 (2012). HER2 se široce podílí na vzniku rakoviny u lidí (Settleman, 2015) a ovlivňuje patogenezí karcinomů (Chaturvedi, 2015). Výzkumy však naznačují, že aktivace ErbB receptorů by mohla být potencována proteiny, jako jsou MUC1 a MUC4

(Chaturvedi, 2008). Exprese MUC13 na povrchu buněk CRC může také ovlivnit růstové charakteristiky tumoru prostřednictvím interakcí s receptory růstového faktoru c-erbB, modulací adheze a interferací pomocí rozpoznávání imunitním systémem. MUC13 na nádorových buňkách pravděpodobně interaguje s endoteliálními ligandy během metastazování (Williams, 2001). MUC13 uvolňovaný z povrchu nádorových buněk by mohl být důležitým diagnostickým cílem ke zjištění jeho hladin v séru pacientů s gastrointestinálním karcinomy. V praxi existuje významná klinická potřeba identifikovat biomarkery, které by odhalily časně fáze CRC. Takovéto markery by mohly hrát přídatnou roli v detekci CRC a stanovení správného typu chemoterapie a případně i možnost monitorace odpovědi na léčbu. Současně při výzkumu identifikace biomarkerů je cíl vyvíjet i zajistit nové a přesnější cíle terapie.

MiRNA ovlivňuje nejen různé biologické procesy, ale i se podílí na procesu progresu a metastazování u lidské rakoviny (Detassis, 2017). Deregulace miRNA je asociována s mnoha typy onemocnění. Tato zjištění vedla k rozvoji výzkumu, který by umožnil léčebný zásah a ovlivnění této regulační cesty, jako nový terapeutický cíl. Nedávno dosáhlo již několik terapeutik ovlivňující miRNA klinického vývoje (Rapaimoole, 2017). V souladu s výše uvedenými poznatky v naší studii miR-4647 potlačoval růst *in vitro*.

U žen byly pozorovány významně vyšší hladiny exprese miR-4647 ve srovnání s muži. Pacienti mužského a ženského pohlaví mají různé endokrinní pozadí. Lze předpokládat, že změny pozorované v hladinách exprese miR-4647 by tedy mohly souviset s pohlavím pacientů, namísto MUC13 nebo CRC.

## 6. Závěr

Tato studie se zabývala *in silico* predikovanou osou *MUC13* – miR-4647 u kolorektálního karcinomu. Naše data prezentovala zásadní roli *MUC13* na přežívání pacientů a tím pádem se osa *MUC13* – miR-4647 zdá být velice nadějná s ohledem na nové terapeutické přístupy. Potvrdili jsme, že stupeň exprese *MUC13* poklesl po uměle navozené navýšené expresi miR-4647 pomocí RT-qPCR. Dále jsme pozorovali sníženou expresi miR-4647 u lidské tkáni kolorektálního karcinomu v porovnání s okolní zdravou tkání bez tumoru a zvýšení exprese *MUC13* u kolorektálního karcinomu. Naopak při nižší expresi *MUC13* měli pacienti s CRC delší přežívání. Dále jsme dokázali, že buňky kolorektálního karcinomu se zvýšenou expresí miR-4647 tvoří významně méně kolonií a projevují nižší schopnost migrace. Tato pozorování zjistila, že horší přežívání pacientů s kolorektálním karcinomem může být asociováno s genem *MUC13* a se sníženou expresí miR-4647. Tímto bychom mohli potvrdit naši hypotézu, ale k detailnějšímu pochopení dané problematiky bude potřeba dalšího zkoumání.

*MUC13* uvolněný z povrchu nádorových buněk by mohl být důležitým diagnostickým cílem ke zjištění jeho hladin v séru pacientů s gastrointestinálním karcinomem.

Existuje důkaz, že miRNA SNP mohou hrát zásadní roli při předpovídání rizika rakoviny, odpovědi na léčbu a výsledku. Pochopení faktorů přispívajících k riziku rakoviny může představovat silný nástroj do budoucna pro klinické lékaře a genetické poradce, stejně jako pro prohlubování našeho chápání biologie rakoviny. Pokud by byla identifikována jedna riziková alela nebo signatura alel, mohli by kliničtí lékaři

doporučit konkrétní skupině pacientů, aby zahájili dřívější, častější a intenzivnější screening nebo ještě přísnější preventivní opatření v naději, že zabrání nemoci nebo ji zachytí dříve v léčitelném stádiu. Také je zajímavé, že jelikož jsou miRNA stimulovány vnějšími podněty, bylo by možné pacienty s takovými SNP poučit o úpravě faktorů životního stylu, aby se udržela homeostáza jejich zděděných rozdílů. Tato cesta aktivního výzkumu se může ukázat jako nejslibnější.

Vzhledem k uvedeným výsledkům se osa *MUC13* – miR-4647 u kolorektálního karcinomu zdá být velice nadějná s ohledem na nové terapeutické přístupy. Předpokládáme, že *MUC13* by mohl představovat signifikantní potenciál pro screening, diagnózu a léčbu rakoviny.

## 7. Literatura

- DETASSIS Simone, Margherita GRASSO a kol. microRNAs Make the Call in Cancer Personalized Medicine. *Front Cell Dev Biol.* 2017 Sep., 5: p. 86. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00086>
- DUŠEK Ladislav, MUŽÍK Jan a kol. *Epidemiologie zhubných nádorů v České republice* [online]. Verze 7.0, Masarykova univerzita, 2005-2022, [cit. 2022-11-27]. ISSN 1802 – 8861. Dostupné z <http://www.svod.cz>.
- GCO.fr. [online] *Global cancer observatory*. Lyon: Internation Agency for Research on Cancer, 2021, [cit. 2022-11-27]. Dostupné z: <https://gco.iarc.fr>
- GUPTA K. Brij, Diane M. MAHER a kol. Increased expression and aberrant localization of mucin 13 in metastatic colon cancer. *J Histochem Cytochem.* 2012 Nov., 60(11): p. 822-31. DOI: [10.1369/0022155412460678](https://doi.org/10.1369/0022155412460678).
- GUPTA K. Brij, Diane M. MAHER a kol. Functions and regulation of MUC13 mucin in colon cancer cells. *J Gastroenterol.* 2014 Oct., 49(10): p. 1378-91. DOI: [10.1007/s00535-013-0885z](https://doi.org/10.1007/s00535-013-0885z).
- CHAUHAN C. Subhash, Kelley VANNATTA a kol. Expression and functions of transmembrane mucin MUC13 in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2009 Feb., 69(3): p. 765-74. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-08-0587](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0587).
- WILLIAMS J. Stephanie, Daniel H. WRESCHER a kol. Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J Biol Chem.* 2001 May, 276(21): p. 18327-36. DOI: [10.1074/jbc.M008850200](https://doi.org/10.1074/jbc.M008850200).
- CHATURVEDI Pallavi, Ajay P. SINGH a kol. MUC4 mucin interacts with and stabilizes the HER2 oncoprotein in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2008 Mar., 68(7): p. 2065-70. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-07-6041](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6041).
- RUPAIMOOLE Rajesha a Frank J. SLACK, MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2017 Mar., 16(3): p. 203-222. DOI: [10.1038/nrd.2016.246](https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246).
- CHAUHAN C- Subhash, Mara C. EBELING a kol. MUC13 mucin augments pancreatic tumorigenesis. *Mol Cancer Ther.* 2012 Jan., 11(1): p. 24-33. DOI: [10.1158/1535-7163.MCT-11-0598](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0598).
- JONCKHEERE Nicolas, Nicolas SKRYPE a kol. Mucins and tumor resistance chemotherapeutic drugs. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Aug., 1846(1): 142-51. DOI: [10.1016/j.bbcan.2014.04.008](https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.04.008).
- KHAN Sheema, Mara C. EBELING a kol. MicroRNA-145 targets MUC13 and suppresses growth and invasion of pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2014 Sep., 5(17): 7599-609. DOI: [10.18632/oncotarget.2281](https://doi.org/10.18632/oncotarget.2281).
- KUFE W. Donald. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2009 Dec., 9(12): 874–885. DOI: [10.1038/nrc2761](https://doi.org/10.1038/nrc2761).
- LAURIOLA Mattia, Giampaolo UGALINI a kol. Identification by a Digital Gene Expression Displayer (DGED) and test by RT-PCR analysis of new mRNA candidate markers for colorectal cancer in peripheral blood. *Int J Oncol.* 2010 Aug., 37(2): p. 519-25. DOI: [10.3892/ijo\\_00000701](https://doi.org/10.3892/ijo_00000701)

RUPAIMOOLE Rajesha a Frank J. SLACK, MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2017 Mar., 16(3): p. 203-222. DOI: [10.1038/nrd.2016.246](https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246).

SASAKI Osamu, Wendy S. ATKIN a kol. *Histopathology.* Mucinous carcinoma of the rectum. 1987 Mar., 11:259–72. DOI: [10.1111/j.1365-2559.1987.tb02631.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1987.tb02631.x).

SETTLEMAN Jeff. Predicting response to HER2 kinase inhibition. *Oncotarget.* 2015 Jan., 6(2): p. 588-9. DOI: [10.18632/oncotarget.3036](https://doi.org/10.18632/oncotarget.3036).

SHENG H. Yonghua, Rohan LOURIE a kol. The MUC13 cell-surface mucin protects against intestinal inflammation by inhibiting epithelial cell apoptosis. *Gut.* 2011 Dec., 60(12): p. 1661-70. DOI: [10.1136/gut.2011.239194](https://doi.org/10.1136/gut.2011.239194).

SHENG H. Yonghua, S TRIYANA a kol. MUC1 and MUC13 differentially regulate epithelial inflammation in response to inflammatory and infectious stimuli. *Mucosal Immunol.* 2013 May, 6(3): p. 557-68. DOI: [10.1038/mi.2012.98](https://doi.org/10.1038/mi.2012.98).

SHENG H. Yonghua, Choa P. Ng. MUC13 overexpression in renal cell carcinoma plays a central role in tumor progression and drug resistance. *Int J Cancer.* 2017 Feb. 140(10): p. 2351-2363. DOI: [10.1002/ijc.30651](https://doi.org/10.1002/ijc.30651).

SMITH R. Amber, Rebecca T. MARQUEZ a kol. Tumor suppressive microRNA-137 negatively regulates Musashi-1 and colorectal cancer progression. *Oncotarget.* 2015 May, 6(14): p. 12558-73. DOI: [10.18632/oncotarget.3726](https://doi.org/10.18632/oncotarget.3726).

SUMA S. Krupa a Vadakkepat MIRMALA. Mucinous component in colorectal carcinoma – prognostic significance: a study in a south Indian population. *J Surg Oncol.* 1992 Sep., 51:60–4. DOI: [10.1002/jso.2930510115](https://doi.org/10.1002/jso.2930510115).

ÚZIS.cz [online]. Praha, Novotvary. Ústav zdravotnických informací a statistiky, 2018, [cit. 2022-11-27]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008352/novotvary2018.pdf>

WILLIAMS J. Stephanie, Daniel H. WRESCHER a kol. Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J Biol Chem.* 2001 May, 276(21): p. 18327-36. DOI: [10.1074/jbc.M008850200](https://doi.org/10.1074/jbc.M008850200).

## Seznam publikací

**SOJKA Ladislav**, Alena OPATTOVÁ, Linda BÁRTU, Josek HORÁK, Vlasta KORENKOVÁ, Věra KŘÍŽKOVÁ, Jan BRUHA Václav LIŠKA, Michaela SCHNEIDEROVÁ, Ondřej KUBEČEK, Ludmila VODIČKOVÁ, Markéta URBANOVÁ, Jaromír ŠIMŠA, Pavel VODIČKA a Ludmila VODIČKOVÁ. The *MUC13*-miRNA-4647 axis in colorectal cancer: prospects to identifications of risk factors and clinical outcomes. *Oncology Letters*. 2022. **IF : 3.11**

TOMASOVÁ Kristýna, Michal KROUPA, Alžběta ZINKOVÁ, Marie KORABECNÁ, Veronika VYMETALKOVÁ, Pavel ŠKROBÁNEK, **Ladislav SOJKA**, Miroslav LEVÝ, Kari HEMMINKI, Václav LIŠKA, Petr HOŠEK, Rajiv KUMAR, Ludmila VODIČKOVÁ a Pavel VODIČKA. Monitoring of telomere dynamics in peripheral blood leukocytes in relation to colorectal cancer, patients' outcomes. *Frontiers in Oncology*. 2022 Sep., 12, 962929. DOI: 10.3389/fonc.2022.962929. **IF : 6,244**

LEVÝ Miroslav, Ludmila LIPSKÁ, **Ladislav SOJKA**, Jaromír ŠIMŠA a Vladimír VISOKAI. Impact of Postoperative Septic Complications on Recurrence of Colorectal Cancer. *Surg. Gastroenterol. Oncol*. 2017, Dec., 22(4), 313-317. DOI: 10.21614/sgo-22-4-313.

**SOJKA Ladislav**, Veronika MAKAJEVOVÁ, Jaromír ŠIMŠA, Jana VOTRUBOVÁ, Radoslav MATĚJ. Primární lymfomy zažívacího traktu z pohledu chirurga. *Rozhledy v chirurgii*, 2017, vol. 96, s. 276-283. ISSN 0035-9351.

**SOJKA Ladislav**. Corpus alienum – migrující cizí těleso. *Rozhledy v Chirurgii*. 2016 Zář, roč. 95, č. 9, s. 373-376.

HLAVSA Jan, Martin LOVEČEK Martin, Filip ČEČKA, Pavel ZÁRUBA, Pavel SKALICKÝ, Kateřina VINKLEROVÁ, Jana TESAŘIKOVÁ , Michal GREGOŘÍK, Aleš FOLTYS, Petr OSTRUSZKA, Robert GÜRLICH, Tomáš HRÁČEK, Martin OLIVERIUS, Lukáš HAVLŮJ, Jiří TVRDOŇ, Silvia JAROŠČIAKOVÁ, Martin PODHRÁDSKÝ, Tomáš KREJČÍ, Jan VOTAVA, Ivo NOVÁČEK, Karel RUPERT, Tomáš KURAL, Zdeněk KRŠKA, David HOSKOVEC, Jaromír ŠIMŠA, **Ladislav SOJKA**, Lukáš BURDA, Jiří KLEIN, Jan ŽÁK, Katarína GLOMBOVÁ, Jan WECHSLER, Igor PENKA, Pavel KOŽNAR, Miloslav ROUSEK , Jiří FRONĚK, Miloš KUČERA, Tomáš PAVLÍK, Aneta ŠIKYŇOVÁ, David ROZSNYO, Lumír KUNOVSKÝ, Petr MORAVČÍK, Vladimír PROCHÁZKA, Zdeněk KALA. Současný stav chirurgické léčby chronické pankreatitidy v České Republice. *Rozhledy v chirurgii*. 2022.