

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických vied



**PRÍPRAVA STAT3-KNOCKOUTOVANEJ
BUNKOVEJ LÍNIE
GLIOBLASTOMU MULTIFORME
POMOCOU METÓDY CRISPR-Cas9**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Barbora Vítovcová

Hradec Králové 2023

Bc. Dominika Papinčáková

„Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom. Literatúru a ďalšie zdroje, z ktorých som pri jej spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové

Bc. Dominika Papinčáková

Pod'akovanie

Touto cestou by som sa chcela poďakovať svojej vedúcej diplomovej práce prof. RNDr. Lenke Skálovej, Ph.D. a svojim konzultantkám PharmDr. Barbore Vítovcovej a RNDr. Katke Dvořákovéj za ich ochotu, za odborné vedenie, pomoc v laboratóriu a za rady pri spracovaní tejto práce. Tiež ďakujem doc. RNDr. Veře Královej, Ph.D. a zamestnancom Ústavu lekárskej biológie a genetiky Lekárskej fakulty Univerzity Karlovej v Hradci Králové za ich ústretovosť a ochotu. Za vykonanie IHC analýzy ďakujem MUDr. Jiřimu Soukupovi Ph.D. z Fingerlandova ústavu patológie FNHK. V neposlednom rade by som chcela poďakovať svojej rodine a priateľovi za neustálu podporu po celú dobu štúdia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králová

Katedra biochemických vied

Kandidát: Bc. Dominika Papinčáková

Školiteľ: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Príprava STAT3-knockoutovanej bunkovej línie glioblastomu multiforme pomocou metódy CRISPR-Cas9

Glioblastoma multiforme (GBM) je jedným z najčastejších primárnych nádorov mozgu u dospelých a jedným z najfatálnejších nádorových ochorení u ľudí. Kľúčovým onkogénom vo vývoji a progresii GBM je signálny transduktor a aktivátor transkripcie 3 (STAT3), ktorý je jedným z mediátorov tumorigenézy. V GBM je permanentne aktivovaný, čo vedie k zvýšenej bunkovej proliferácii, invazivite a angiogenéze.

Cieľom tejto práce bolo vytvoriť bunkovú líniu GBM STAT3-knockout (STAT3-KO). Na tento účel sa použila bunková línia U87MG a metóda na knockoutovanie génov CRISPR-Cas9.

V prvom kroku sme skúmali možnosť tlmenia expresie STAT3 pomocou siRNA a vhodnosť tohto typu buniek na presné dourčenie mechanizmu na editáciu génov CRISPR do bunky. V druhom kroku sme transfekovali bunky pomocou súpravy na knockoutovanie génu STAT3 (CRISPR) a testovali úspešnosť knockoutu. Vo vytvorenej STAT3-KO GBM bunkovej línii sme potvrdili STAT3-KO na úrovni DNA, RNA a proteínu. Následne sme na bunkovú líniu U87MG a U87MG-STAT3-KO pôsobili temozolomidom (používaným chemoterapeutickým liekom na GBM) a porovnali ich citlivosť.

Na záver boli bunky U87MG-STAT3-KO úspešne implantované do modelového organizmu a bolo opäť pozorované zníženie expresie STAT3 markeru.

ABSTRACT

Charles University

Fakulty of Pharmacy in Hradec Králove

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Dominika Papinčáková

Supervisor: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Preparation of STAT3-knockout glioblastoma multiforme cell line using CRISPR-Cas9 editing

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most common primary brain tumours in adults and one of the most fatal cancers in humans. A key oncogene in GBM development and progression is the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). It is one of the mediators of tumorigenesis, plays a strong *pro-survival* role in GBM and is permanently activated in GBM leading to increased cell proliferation, invasiveness, and angiogenesis.

The aim of this work was to establish a GBM STAT3-knockout (STAT3-KO) cell line. The U87MG cell line and the CRISPR-Cas9 gene knockout method were used for this purpose.

In a first step, we investigated the possibility of silencing STAT3 expression by siRNA and the suitability of this cell type to pinpoint the mechanism for CRISPR gene editing into the cell. In the second step, we transfected the cells using the STAT3 gene knockout kit (CRISPR) and tested the knockout success. In the established STAT3-KO GBM cell line, we confirmed STAT3-KO at the DNA, RNA and protein levels. We then treated the U87MG and U87MG-STAT3-KO cell line with temozolomide (a chemotherapeutic drug used for GBM) and compared their sensitivity.

Finally, U87MG-STAT3-KO cells were successfully implanted into the model organism and a decrease in STAT3 marker expression was again observed.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1	NÁDOROVÉ OCHORENIA	10
2.2	GLIOBLASTOMA MULTIFORME	11
2.2.1	Etiológia	12
2.2.2	Patofyziológia.....	12
2.2.3	Klinický obraz a diagnostika.....	13
2.2.4	Liečba	14
2.2.4.1	Chirurgická liečba	14
2.2.4.2	Rádioterapeutická liečba	15
2.2.4.3	Chemoterapeutická liečba, TMZ	16
2.2.4.4	Experimentálna liečba	19
2.3	STAT3.....	19
2.3.1	Štruktúra a aktivácia STAT3.....	20
2.3.1.1	Signálna dráha JAK/STAT3 v normálnej bunke.....	22
2.3.2	Úloha STAT3 pri vzniku a vývoji nádoru	23
2.3.3	STAT3 a glioblastoma multiforme	24
2.4	GÉNOVÉ INŽINIERSTVO.....	25
2.4.1	Metódy genetickej modifikácie	25
2.4.2	CRISPR-Cas9 metóda	26
2.4.2.1	Triedenie CRISPR metód	27
2.4.2.2	Mechanizmus fungovania CRISPR-Cas.....	27
3	CIEĽ	29
4	MATERIÁL	30
4.1	PRÍSTROJE	30
4.2	CHEMIKÁLIE.....	30
4.3	POMÔCKY.....	31
4.4	BUNKOVÉ LÍNIE	32
4.5	EXPERIMENTÁLNE ZVIERATÁ.....	32
5	METODIKA	33

5.1	STANOVENIE VIABILITY BUNIEK POMOCOU METÓDY WST-1	33
5.2	TRANSFEKCIA BUNIEK U87MG	34
5.2.1	Transfekcia buniek U87MG pomocou STAT3 – siRNA a transfekčného reagens X–tremeneGENE siRNA	35
5.2.2	Transfekcie buniek U87MG pomocou STAT3–Human gene knockout (CRISPR) a transfekčného reagens Turbofectin 8.0	36
5.3	STANOVENIE HLADINY DNA POMOCOU PCR METÓD	37
5.3.1	Izolácia DNA.....	38
5.3.2	Amplifikácia DNA pomocou PCR metódy	39
5.3.3	Gélová elektroforéza	39
5.4	STANOVENIE HLADINY MRNA METÓDOU RT-PCR.....	40
5.4.1	Izolácia mRNA.....	40
5.4.2	Príprava cDNA	41
5.4.3	PCR amplifikácia jednoreťazovej cDNA.....	42
5.5	STANOVENIE MNOŽSTVA PROTEÍNU METÓDOU WESTERN BLOT	42
5.5.1	Príprava bunkového lyzátu a stanovenie koncentrácie bielkovín pomocou BCA stanovenia.....	42
5.5.2	Elektroforéza proteínu na polyakrylamidovom géle	44
5.5.3	Western blot a chemiluminiscenčná detekcia proteínu	45
5.6	IN VIVO EXPERIMENT	46
5.6.1	Implantácia buniek do modelového organizmu	46
5.6.2	Imunohistochemická analýza nádorov	47
5.6.3	Spracovanie nádorov pre analýzu RNA	47
5.6.4	Spracovanie nádorov pre analýzu proteínov	48
5.7	ŠTATISTICKÁ ANALÝZA.....	48
6	VÝSLEDKY.....	49
6.1	HODNOTENIE EFEKTIVITY TRANSFEKCIE POMOCOU STAT3-SIRNA U BUNIEK U87MG	49
6.1.1	Hodnotenie efektivity na úrovni mRNA	49
6.1.2	Hodnotenie efektivity transfekcie na úrovni proteínov	49
6.2	ÚČINNOSŤ TRANSFEKCIE POMOCOU STAT3 HUMAN GENE KNOCKOUT (CRISPR) U BUNIEK U87MG.....	50
6.2.1	Hodnotenie účinnosti transfekcie na úrovni DNA	51

6.2.2	Hodnotenie účinnosti transfekcie na úrovni mRNA	53
6.2.3	Hodnotenie účinnosti transfekcie na úrovni proteínov	53
6.3	VPLYV TMZ NA ŽIVOTASCHOPNOŠŤ BUNIEK U87MG A U87MG-STAT3-KO ..	54
6.4	IMPLANTÁCIA BUNIEK U87MG A U87MG-STAT3-KO DO MODELOVÉHO ORGANIZMU	56
6.4.1	Porovnanie rastu nádoru a proliferačného indexu Ki67 u nádorov odvođených z U87MG a U87MG-STAT3-KO	56
6.4.2	Imunohistochemické stanovenie hladiny STAT3 u nádorov odvođených z buniek U87MG a U87MG-STAT3-KO	58
6.4.3	Stanovenie relatívneho množstva STAT3 mRNA	59
6.4.4	Stanovenie relatívneho množstva proteínu STAT3	60
7	DISKUSIA.....	62
8	ZÁVER.....	68
9	POUŽITÉ SKRATKY	69
10	ZOZNAM TABULIEK	71
11	ZOZNAM OBRÁZKOV.....	72
12	POUŽITÁ LITERATÚRA	74

1 ÚVOD

Nádory centrálného nervového systému (CNS) tvoria len malý podiel všetkých typov nádorových ochorení u ľudí, avšak sú hlavnou príčinou úmrtí súvisiacich s rakovinou. Medzi jeden z najagresívnejších primárnych nádorov mozgu patrí glioblastom multiforme (GBM). Pacienti s GBM majú veľmi nepriaznivú prognózu s mediánom prežitia približne 12 mesiacov a dlhodobé prežívanie je zriedkavé. Liečba glioblastómu zahŕňa chirurgický zákrok po ktorom nasleduje rádioterapia a chemoterapia, chemoterapeutickým liečivom temozolomidom (TMZ) (Liu a kol., 2010; Tan a kol., 2020).

Podobne ako pri iných nádoroch, sú pri glioblastóme bežné zmeny v expresii génov, vrátane inhibície nádorových supresorov alebo aktivácie onkogénov. STAT3 (signálny transduktor a aktivátor transkripcie) je aktivovaný vo vysokom percente práve u GBM. Zvýšená aktivácia STAT3 sa podieľa na regulácii viacerých charakteristických znakov GBM, vrátane rýchlej bunkovej proliferácie, zvýšeného prežitia buniek, angiogenézy a schopnosti vyhýbať sa imunitnému systému. STAT3 preto predstavuje veľmi zaujímavý cieľ pre liečbu GBM (Liu a kol., 2010; Kögel, 2022; West a kol., 2018).

Technologický pokrok, ako napríklad CRISPR-Cas9, umožňujúci presnú manipuláciu s akoukoľvek genomickou sekvenciou, napomáha objasneniu funkcie génov, napr. zapojených do karcinogenézy či korekcii mutácií spôsobujúcich rakovinu. (Minjiang a kol., 2019)

V našom projekte sme sa zamerali na vytvorenie novej bunkovej línie GBM STAT3-knockout (STAT3-KO) pomocou metódy CRISPR-Cas9. Následne sa skúmala citlivosť novo vytvorených buniek na chemoterapeutické liečivo temozolomid (TMZ).

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 *Nádorové ochorenia*

Rakovina je nádorové ochorenie, ktoré vzniká v dôsledku kumulatívnych genetických a epigenetických aberácií. Zdravá bunka má svoju definovanú štruktúru, tvar, reaguje na podnety z okolitého prostredia a podlieha regulovanému bunkovému deleniu. Akumulácie rôznych genetických abnormalít spôsobených chybami pri bunkovom delení či vplyvom rôznych fyzikálnych (ultrafialové alebo ionizujúce žiarenie), chemických (karcinogény) a biologických (onkovírusy) rizikových faktorov, môže spôsobiť, že sa z normálnej bunky vytvorí bunka, ktorá nereaguje na podnety, začne sa nekontrolovateľne deliť, mení svoj definovaný tvar, nereaguje na rastové inhibičné faktory apod. (Hofmanová, 2013).

Proces premeny normálnej bunky na nádorovú (neoplastickú) sa nazýva nádorová transformácia. Väčšinou tento proces začína z jednej bunky (monoklonálny počiatok) a ide o viacstupňový, náhodný dej. Zahŕňa proces iniciácie, promócie a progresie (Nečas, 2021).

Mutácie postihujú najčastejšie dva typy génov a to tumor supresorové gény a protoonkogény. Tieto gény sa zúčastňujú prevažne regulácie bunkovej proliferácie a apoptózy. Ďalšie gény, ktoré sa podieľajú na procese kancerogenézy sú gény kódujúce opravné systémy, ktoré sa podieľajú na opravách odchýliek, ktoré vznikli pri procese replikácie (Klener, 2011).

Nádory môžeme rozdeliť podľa histogenézy (napr. na nádory mezenchýmové, epitelové, neuroektodermové), podľa tkaniva, kde vznikajú (napr. sarkómy, leukémie) či podľa správania a biologických vlastností.

Podľa správania a biologických vlastností ich môžeme ďalej deliť na malígne a benígne. Bunky benígnych nádorov (napr. hemangiom) sú morfológicky a funkčne podobné bunkám pôvodného tkaniva a ich rast je obmedzený na svoje pôvodné miesto (nešíria sa do vzdialených miest tela). Naopak bunky malígnych nádorov sú schopné invázie do okolitého normálneho tkaniva, šíriť sa po tele prostredníctvom obehového alebo lymfatického systému a vytvárať tak metastázy. Iba zhubné nádory sa správne označujú ako rakovina a práve ich schopnosť invázie a metastázovania robí rakovinu takou nebezpečnou (Cooper, 2000).

2.2 Glioblastoma multiforme

Glioblastoma multiforme (GBM) je jedným z najčastejších primárnych nádorov mozgu u dospelých a jedným z najsmrteľnejších nádorových ochorení u ľudí s priemernou dĺžkou života približne jeden rok od stanovenia diagnózy. Táto zlá prognóza je spôsobená hlavne rezistenciou nádoru voči liečbe a vlastnou agresivitou nádoru (Stoyanov a kol., 2018).

Glioblastom patrí do heterogénnej skupiny nádorov mozgu označovaných ako gliómy, o ktorých sa predpokladá, že pochádzajú z gliových buniek alebo ich podtypov (to môže zahŕňať astrocytomy a oligodendrogliómy) (McKinnon a kol., 2021). Malígne gliómy (multiformný glioblastóm a anaplastický astrocytóm) sa vyskytujú častejšie ako iné typy primárnych nádorov centrálného nervového systému, pričom ich spoločný výskyt je 5 až 8 prípadov na 100 000 obyvateľov za rok (Friedman a kol., 2000).

Medzinárodným štandardom pre nomenklatúru a diagnostiku je klasifikácia podľa svetovej zdravotníckej organizácie (WHO). Tá klasifikuje gliómy do triedy I. až IV. na základe histopatologických kritérií. Gliómy I. stupňa sa týkajú lézií, ktoré majú nízky proliferatívny potenciál a je tam možnosť vyliečenia chirurgickým zákrokom, zatiaľ čo gliómy II. až IV. stupňa sú vysoko malígne a invazívne. GBM je najagresívnejší, vysoko invazívny a nediferencovaný typ nádoru, WHO ho zaradila do IV. stupňa (Hanif a kol., 2017).

Glioblastóm je heterogénny nádor zložený z odlišných typov buniek rôzneho pôvodu s rôznymi genetickými zmenami (Stoyanov a kol., 2018). GBM zahŕňa primárne a sekundárne typy, ktoré sa vyvíjajú rôznymi genetickými cestami a postihujú pacientov v rôznom veku. Primárne GBM sa vyskytujú u starších pacientov s priemerným vekom 62 rokov, zatiaľ čo sekundárne GBM vznikajú z astrocytómu nižšieho stupňa alebo oligodendrogliómu u mladších pacientov s priemerným vekom 45 rokov (Kanderi a Gupta, 2022). Sekundárne GBM sa prejavujú tým, že majú menší stupeň nekrózy, sú prednostne lokalizované vo frontálnom laloku a majú výrazne lepšiu prognózu. Histologicky sú primárne a sekundárne glioblastómy zväčša nerozlíšiteľné, líšia sa však genetickým a epigenetickým profilom (Ohgaki a Kleihues, 2013).

Primárne glioblastómy sa vyvíjajú u starších pacientov a zvyčajne vykazujú nadmernú expresiu epidermálneho rastového faktoru (EGFR), mutáciu fosfatázového

a tenzínového homológa (PTEN) , deléciu cyklín-dependentnej kinázy 2A (CDKN2A) (Ohgaki a Kleihues, 1999). Rozhodujúcimi genetickými znakmi sekundárneho glioblastómu sú mutácie izocitrátdehydrogenázy 1 (IDH1). Mutácie IDH1 sú najskôr zistiteľnou genetickou zmenou v prekursorových nízkostupňových difúzných astrocytómoch a v oligodendrogliómoch, čo naznačuje, že tieto nádory pochádzajú z nervových prekursorových buniek, ktoré sa líšia od buniek primárnych glioblastómov. Napriek podobnému histologickému vzhľadu sú primárne a sekundárne glioblastómy odlišné nádorové jednotky, ktoré vznikajú z rôznych prekursorových buniek a môžu si vyžadovať odlišné terapeutické prístupy (Ohgaki a Kleihues, 2013).

2.2.1 Etiológia

Etiológia GBM stále nie je objasnená. V súvislosti so vznikom GBM neboli popísané žiadne rizikové faktory (ani napr. vystavenie elektromagnetickému poľu v obytných priestoroch, formaldehyd, diagnostické ožarovanie). Možným rizikovým faktorom by mohlo byť ale ožarovanie mobilnými telefónmi (Urbańska a kol., 2014). Metaanalýza z roku 2007 (Hardell a kol., 2007) preukázala zvýšený výskyt u ľudí, ktorí používali mobilné telefóny najmenej 10 rokov, a najmä u tých, ktorí boli väčšinou jednostranne ožiarení.

Vyskytujú sa však mutácie špecifické pre glioblastómy v nádorových génoch (napríklad mutácie, TP53 a PTEN). Mutácie v génoch sú v glioblastómoch veľmi časté, ale nemajú úplne prognostický význam. V glioblastóme boli identifikované aj bodové mutácie EGFR (Liu a kol., 2016).

Výskyt GBM môže byť spojené s genetickými ochoreniami ako tuberózna skleróza, Turcotov syndróm, mnohopočetná endokrinná neoplázia typu IIA a neurofibromatóza typu I (Urbańska a kol., 2014).

2.2.2 Patofyziológia

Glioblastóm môže vzniknúť kdekoľvek v centrálnom nervovom systéme (CNS). Najčastejšie sa ale nachádza v mozgových hemisférach, v čelnom alebo spánkovom laloku. Jeho pôvod v CNS ho odlišuje od častejších sekundárnych karcinómov mozgu, ktoré vznikajú v dôsledku metastáz zo vzdialených primárnych ložísk, najčastejšie pľúc, prsníka alebo kože (McKinnon a kol., 2021).

Medzi základné charakteristiky GBM patrí vysoká malignita, hypercelularita, hypervaskularizácia, nekróza a pleomorfizmus (Polívka a kol., 2013). Infiltrujúci rast navyše spôsobuje, že sa nádorová masa nedá jasne odlíšiť od normálneho tkaniva (Urbańska a kol., 2014).

Metastázovanie tohto novotvaru mozgovomiechovým mokom alebo krvou sú zriedkavé a ak sa vyskytnú tak sa predovšetkým môžu objaviť na slezine, pohrudnici, pľúcach, lymfatických uzlinách, pečeni či kostiach. Predpokladá sa, že nízky metastatický potenciál GBM vyplýva z bariéry vytvorenej mozgovými plénami, ale aj z rýchleho rastu nádoru a krátkeho priebehu tohto ochorenia. V mozgu navyše chýbajú lymfatické cievy, takže metastázy touto cestou nie sú možné (Urbańska a kol., 2014).

2.2.3 Klinický obraz a diagnostika

V závislosti na umiestnenie nádoru v mozgu patria medzi najčastejšie klinické príznaky GBM bolesti hlavy, ataxia, závraty, poruchy videnia (rozmazané videnie) a časté synkopy. Rastúci nádor navyše spôsobuje zvýšenie vnútrolebečného tlaku. V dôsledku týchto nešpecifických príznakov sa glióm často nesprávne diagnostikuje ako infekcie, zápalové procesy, obehové či imunologické ochorenia (Urbańska a kol., 2014).

Počiatočná príznaky pacienta s glioblastómom sú často nešpecifické, môže ísť o podobné príznaky a symptómy ako pri iných primárnych alebo sekundárnych mozgových nádoroch alebo aj pri bežnejších benígnych neurologických ochoreniach. Približne polovica pacientov je diagnostikovaná po urgentnom príchode do nemocnice. Väčšina z nich navštívila svojho praktického lekára s príznakmi ešte pred stanovením diagnózy, často dokonca viackrát (McKinnon a kol., 2021).

Základnými metódami pri diagnostike GBM sú neurologické a zobrazovacie testy, biopsia a špeciálne vyšetrenie buniek. Počas neurologického vyšetrenia sa lekár pacienta opýta na príznaky a skontroluje jeho zrak, sluch, rovnováhu, koordináciu, silu a reflexy. Problémy v jednej alebo viacerých z týchto oblastí môžu poskytnúť vodítko o časti mozgu, ktorá by mohla byť postihnutá nádorom či inou patológiou (Mayo Clinic Staff, 2020).

Zobrazovacie testy môžu lekárovi pomôcť určiť prítomnosť umiestnenie a veľkosť nádoru. Pri diagnostike nádorov mozgu sa často používa magnetická rezonancia, ktorá sa môže použiť spolu so špecializovanými zobrazovacími vyšetreniami, ako je

funkčná magnetická rezonancia a spektroskopia magnetickej rezonancie. Medzi ďalšie zobrazovacie vyšetrenia môže patriť počítačová tomografia (CT) a pozitronová emisná tomografia (PET) (Mayo Clinic Staff, 2020).

Biopsia sa môže vykonať ihlou pred operáciou alebo počas resekcie glioblastómu, v závislosti od konkrétnej situácie a umiestnenia nádoru. Vzorka podozrivého tkaniva sa analyzuje v laboratóriu s cieľom určiť typy buniek a úroveň ich agresivity (Mayo Clinic Staff, 2020).

Špecializované testy nádorových buniek môžu lekárovi povedať, aké typy mutácií bunky získali. To lekárovi poskytne informácie o prognóze a môže usmerniť možnosti liečby (Mayo Clinic Staff, 2020).

2.2.4 Liečba

Liečba závisí predovšetkým na charaktere nádoru, na veku a na zdravotnom stave pacienta. Medzi základné možnosti terapie patrí chirurgická liečba s rádioterapiou a chemoterapiou. Liečba mozgových nádorov sa čoraz viac zlepšuje a rozširuje využitím počítačovej techniky v neurochirurgii a rádioterapii (Fadrus, 2015). Kvalita liečby predovšetkým závisí na úrovni diagnostiky, tiež na kvalite a prístupe modernej zobrazovacej techniky (Šlampa a kol., 2013).

2.2.4.1 Chirurgická liečba

Neurochirurgická operácia glioblastómu patrí medzi základné liečebné metódy. Cieľom operácie je odstrániť čo najväčšie množstvo nádoru a vyhnúť sa pooperačnej morbidite. K úplnému chirurgickému odstráneniu nádoru dochádza len zriedka kvôli infiltratívnejmu rastu nádoru (Lakomý a kol., 2010).

Aby bolo možné odstrániť čo najväčšie množstvo nádoru, často sa pred operáciou perorálne podáva látka s názvom kyselina 5-aminolevulová (5-ALA), ktorá sa používa na vizualizáciu nádorového tkaniva. Jej metabolity sa pri operácii vizualizujú pomocou špeciálne upraveného mikroskopu (Lakomý a kol., 2010).

Vzhľadom k významu kompletnej resekcie pre prežitie pacienta sa pokročilo v chirurgických technikách, ako je kraniotómia pri vedomí či neuromonitoring za cieľom, zlepšenia kvality resekcie a predchádzaniu následným deficitom. Nedávno sa vyvinuli resekčné zariadenia s použitím laserovej intersticiálnej termoterapie (LITT), ktorá

poskytuje menej invazívny, perkutánny prístup prostredníctvom zavedenia optického vlákna. Imitujúce tepelné poškodenie a vyvoláva nekrózu nádoru (Gilard a kol., 2021).

Ďalšou novinkou v chirurgickej resekcii mozgových nádorov je intraoperačné monitorovanie nádorových metabolitov založené na hmotnostnej spektrometrii. Analyzuje sa obsah buniek, čo umožňuje presné a molekulárne vymedzenie okrajov nádoru, a tým optimálnu resekciu (Gilard a kol., 2021).

Obecne sa chirurgická liečba navrhuje pacientom mladším ako 70 rokov, v dobrom fyzickom stave a s nádorom prístupným na úplne odstránenie (Lakomý a kol., 2010).

2.2.4.2 Rádioterapeutická liečba

V liečbe gliómov má rádioterapia veľmi dôležitú úlohu, pretože ak sa nemôže vykonať úplná resekcia gliómu, tak rádioterapia výrazne napomáha a zlepšuje výsledky pacienta hlavne u pacientov s gliómom vo vysokom štádiu. Vo všeobecnosti sa používa frakcionované ožarovanie s obmedzeným poľom, ktoré pokrýva rozšírenú léziu, ako aj peritumorózny edém.

Štandardná dávka je 60 Grayov (Gy) (Villano a kol., 2009). U gliómov vo vysokom štádiu sa aplikuje žiarenie 60Gy/5x2,0 Gy/týždenne po dobu 6 týždňov. U nízkostupňových gliómov sa aplikuje žiarenie okolo 45–54 Gy. Aká dávka sa použije závisí predovšetkým od pacienta a jeho zdravotného stavu. Celková dávka sa upravuje na základe veľkosti ožarovaného objemu a tiež na aké miesto ožarovanie pôsobí aby nedošlo k poškodeniu okolitých orgánov.

V medicíne sa využívajú rôzne druhy rádioterapie (napr. paliatívna, kuratívna). Paliatívna väčšinou pracuje na princípe, že žiarenia sa aplikuje na oblasti lôžka nádoru u pacientov s interkurentnými chorobami. Kuratívna je málo efektívna voči paliatívnej, aplikuje sa u pacientov, u ktorých nemôže byť vykonaná resekcia nádoru (Šlampa a kol., 2015).

Rádioterapia môže mať aj nežiadúce účinky. Medzi tie hlavné zaradujeme radiačnú dermatitídu, neurokognitívnu toxicitu. U pacienta sa môže po niekoľkých týždňoch objaviť endokrinopatia. V prípade, že pacient súbežne podstupuje aj chemoterapeutickú liečbu, tak je tam zvýšené riziko leukopénie, trombocytopénie popr. hepatotoxicity (Kanderi a Gupta, 2022).

2.2.4.3 Chemoterapeutická liečba, TMZ

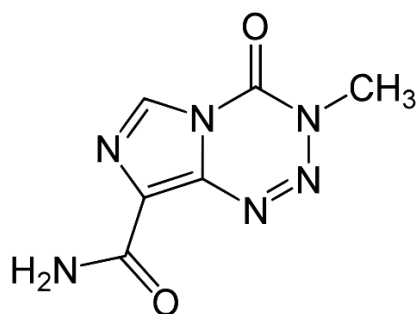
Chemoterapia je liečba pri ktorej sa pacientovi podávajú protinádorové liečivá (tzv. cytostatika). Cytostatiká sú látky prírodného alebo syntetického pôvodu s definovanou chemickou štruktúrou. Na bunky pôsobia tieto látky cytostaticky, tzn. inhibujú delenie a rast buniek. Účinok cytostatík sa nemusí prejavíť len na nádorových bunkách, ale môžu tiež ovplyvniť aj zdravé bunky, čo súvisí s častými nežiaducimi účinkami (Klener, 2011).

Cytostatiká majú svoj mechanizmus účinku, napr. alkylačný, radiomimetický, interkalačný, riadiometrický atď. Zástupcom alkylačných látok je práve najčastejšie používané cytostatikum pri liečbe GBM TMZ (Klener, 2011).

TMZ je perorálna alkylačná látka, ktorá preukázala účinnosť i pri liečbe rôznych solídnych nádorov vrátane primárnych malígnych nádorov mozgu a metastatického melanómu. Aktívne sa skúma aj na liečbu sekundárnych malignít CNS (Friedman a kol., 2011).

TMZ má určité výhody oproti mnohým existujúcim alkylačným látkam. Vďaka svojej jedinečnej chemickej štruktúre a farmakokinetickým vlastnostiam prechádza cez hematoencefalickú bariéru a k aktivácii nevyžaduje pečňový metabolizmus (Agarwala a kol., 2000).

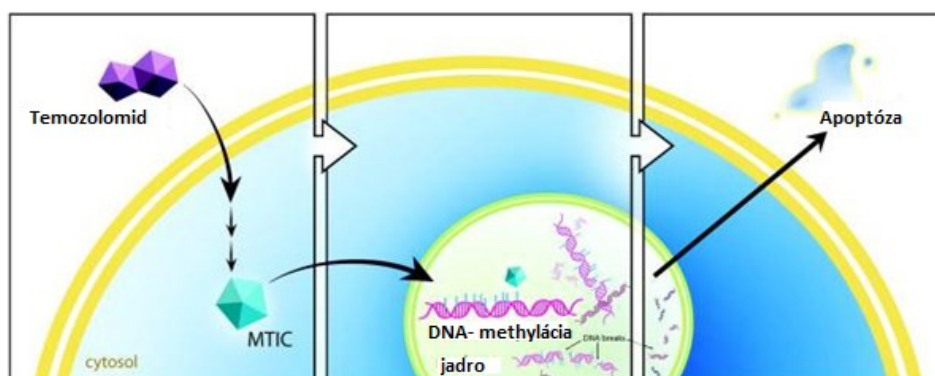
TMZ je imidazotetrazínový derivát alkylačnej látky dakarbazínu. Chemický názov TMZ je 3-methyl-4-oxoimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazine-8-karboxamid. TMZ je stabilný pri pH nižšom ako 5, preto sa obvykle podáva perorálne. Pri vyššom pH ako 7 sa rýchlo hydrolyzuje na 5-(3-metyltriazén-1-yl)imidazol-4-karboxamid (MTIC) (Lee a kol., 2016).



Obrázok 1 Chemická štruktúra temozolomidu
(Zdroj: <https://pl.wikipedia.org/wiki/Temozolomid>)

Mechanizmus účinku je založený na schopnosti jeho metabolitov prepojiť metylové skupiny na guanínové bázy DNA. Po perorálnom podaní sa TMZ ľahko absorbuje v tenkom čreve (v podstate 100% perorálne podanej dávky sa dostane do krvného obehu) a vďaka svojej malej veľkosti (194 Da) a lipofilite dobre preniká cez hematoencefalickú bariéru (Villano a kol., 2009).

TMZ podlieha spontánnej vnútrobunkovej premene prostredníctvom hydrolyzy na silné metylačné činidlo MTIC, ktorý je tiež aktívnym metabolitom dakarbazínu. MTIC sa rýchlo mení na neaktívny 5-aminoimidazol-4-karboxamid (AIC) a na elektrofilný alkylačný metyldiazóniový kation, ktorý prenáša metylovú skupinu na báze DNA. DNA-metyl adukty sú následne zodpovedné za cytotoxicitu. Alkylácia polohy O⁶ guanínu predstavuje len asi 5 % aduktov DNA, ale je primárne zodpovedná za cytotoxické účinky TMZ. Väčšinu DNA-metylových aduktov predstavujú N⁷ guanín a N³ adenín. O⁶-metylguanínová lézia vedie k dvojvláknovým zlomom DNA a následnej bunkovej smrti prostredníctvom apoptózy alebo autofágie (Weselowski a kol., 2010).



Obrázok 2 Mechanizmus účinku temozolomidu
(Zdroj: Villano a kol., 2009)

Schválená konvenčná schéma je denná dávka 150 až 200 mg/m² počas 5 dní každého 28denného cyklu. Denná liečba dávkou 75 mg/m² až sedem týždňov je bezpečná. Táto úroveň expozície temozolomidu vyčerpáva enzým O⁶-metylguanín-DNA metyltransferázu (MGMT), ktorý opravuje DNA. Tento účinok môže byť dôležitý, pretože nízke hladiny MGMT v nádorovom tkanive sa spájajú s dlhším prežívaním pacientov s glioblastómom, ktorí dostávajú adjuvantnú chemoterapiu na báze nitrozomočoviny (Stupp a kol., 2005).

Hlavným vedľajším účinkom spojeným s podávaním TMZ, ktorý vedie k prerušeniu liečby, je myelosupresia s oneskorenou trombocytopéniou (ktorá je zvyčajne reverzibilná). Tento nežiaduci účinok sa zvyčajne objavuje 21–28 dní po začiatku každého liečebného cyklu a zlepšuje sa na trombocytopéniu 1. stupňa 7–14 dní po ukončení liečby (Ortiz a kol., 2021).

Ďalším často sa vyskytujúcim nežiaducim účinkom je lymfocytopenia. Bolo zistené, že hlavnými postihnutými populáciami buniek sú CD4+ T-bunky a B-bunky. U pacientov sa pokles počtu lymfocytov spája so zvýšeným rizikom oportúnnych infekcií, ako je pneumónia spôsobená *Pneumocystis carinii* a iné oportúnne infekcie, napríklad *Aspergillus pneumonia*, *Herpes simplex*, *Varicella zoster*. Nehematologické vedľajšie účinky sú zvyčajne mierne až stredne závažné. Ďalšie vedľajšie účinky môžu byť nevoľnosť a zvracanie, únava, bolesť hlavy a v zriedkavých prípadoch kožné reakcie (napr. žihľavka a vyrážka) (Ortiz a kol., 2021).

V súvislosti s používaním TMZ v terapii GBM sa objavili niektoré nové poznatky. Jeden z týchto nových prístupov patrí do oblasti nanotechnológií. Nanomedicína je odvetvie medicíny využívajúce nanorozmerové materiály na liečbu, monitorovanie alebo diagnostiku určitých ochorení, ako sú napríklad nádorové ochorenia. Tieto nanoformy sa môžu použiť na transport rôznych typov molekúl: liečiv, proteínov, nukleových kyselín či fluorofórov. Nanoformulácie alebo nanočastice (NP) zlepšujú farmakokinetické vlastnosti liečiv a tým zvyšujú protinádorovú účinnosť liečiv a znižujú ich systémovú toxicitu (Ortiz a kol., 2021).

Nanomedicína by mohla vyriešiť problémy spojené s podaním TMZ u GBM. Medzi hlavné úskalia podania TMZ patrí jeho rýchla degradácia, nedostatočná špecifickosť a ťažkosti s dosiahnutím účinnej dávky liečiva v nádorovom tkanive (len 20% systémovej expozície TMZ preniká do mozgového tkaniva, a teda množstvo liečiva v samotnom nádore, je oveľa nižšie) (Ortiz a kol., 2021).

Nové nanoformulácie sa zameriavajú na prekonanie mechanizmov, hoci väčšina štúdií je predklinická. Okrem toho vývoj analógov TMZ s rovnakým mechanizmom účinku ako TMZ, ale odlišnou štruktúrou, má za cieľ zlepšiť jeho farmakokinetický profil (Ortiz a kol., 2021).

2.2.4.4 Experimentálna liečba

Vývoj nových účinných liekov pri liečbe GBM je náročné v dôsledku niekoľkých biologických prekážok. Medzi tie najvýznamnejšie patrí hematoencefalická bariéra, ktorá sťažuje obecné prístup liečiv do mozgu, extrémna heterogenita ochorenia a tiež schopnosť nádoru vyvinúť rezistenciu na protinádorovú liečbu (Di Nunno a kol., 2021).

Napriek tomu rastúce poznatky o molekulárnych mechanizmoch súvisiacich s vývojom a progresiou ochorenia umožnili identifikovať niekoľko atraktívnych cieľov pre systémovú liečbu GBM. Väčšinu týchto cieľov predstavujú receptory tyrozínkinázy (TK) (Di Nunno a kol., 2021).

Ďalším smerom je imunoterapia. Ide o liečebnú metódu, ktorej princípom je aktivácia schopnosti imunitného systému rozpoznať a útočiť na nádorové bunky s minimom iných nežiaducich účinkov.

Pri vývoji imunoterapie GBM však stále existujú prekážky, ktoré je potrebné prekonať. Bunky GBM môžu pôsobiť lokálne imunosupresívne mnohými spôsobmi. Na jednej strane môžu samotné GBM bunky vylučovať rôzne protumorózne cytokíny alebo chemokíny, ktoré môžu ovplyvňovať polarizáciu makrofágov, podporovať nábor regulačných T buniek a inhibovať dozrievanie dendritických buniek. Na druhej strane, bunky GBM môžu exprimovať imunosupresívne molekuly, ako napríklad ligand 1 proteínu programovanej bunkovej smrti (PD-L1), ktorý môže zabrániť proliferácii a aktivácii T buniek.

Napriek týmto výzvam imunoterapia GBM dosahuje značné úspechy, ktoré boli podnetom na množstvo klinických skúšok. Zaviedlo sa aj čoraz viac imunoterapeutických prístupov na liečbu GBM ako napríklad peptidové vakcíny, DC vakcín, inhibítory kontrolných bodov (Huang a kol., 2021).

2.3 STAT3

Členovia rodiny STAT sú transkripčné faktory, ktoré sprostredkujú mnohé bunkové procesy a podieľajú sa na patogenéze rôznych ľudských ochorení.

Proteíny STAT boli objavené v priebehu štúdia špecifickosti signalizácie z receptorov interferonov (IFN). Prvotné zistenie príbuzných proteínov, z ktorých každý je aktivovaný iným cytokínovým receptorom, naznačilo, že tieto proteíny by mali spĺňať

požiadavky na nosiče vnútrobunkovej signálnej informácie schopné zachovať špecifickosť interakciám cytokín-receptor. Vo všeobecnosti niektoré štúdie naznačovali vysoký stupeň špecifickosti rôznych proteínov STAT v jednotlivých signálnych dráhach (Zhou a Chen, 2021).

Bolo popísaných sedem proteínov STAT: STAT 1, 2, 3, 4, 5A, 5B a 6, ktoré sú kódované génmi zoskupenými na rôznych chromozómoch. Gény kódujúce STAT1 a STAT4 sa nachádzajú na chromozóme 2, STAT2 a STAT6 na chromozóme 17 a STAT3, STAT5a a STAT5b na chromozóme 12 (Kamran a kol., 2013).

Jedným z členov rodiny STAT je práve cytoplazmatický transkripčný faktor STAT3, ktorý sprostredkúva prenos signálu z plazmatickej membrány do jadra pri rôznych bunkových aktivitách. Zároveň zohráva kľúčovú úlohu v mnohých kritických bunkových procesoch, ako je proliferácia, diferenciácia, prežívanie, imunosupresia, angiogenéza a tumorigenéza.

Cielené knockoutovanie STAT3 v embryu vedie k včasnej embryonálnej letalite. STAT3 je nevyhnutný tiež napríklad pre diferenciáciu pomocných T-buniek Th17 (Levy a kol., 2002; Zhou a Chen, 2021; Tolomeo a Cascio, 2021).

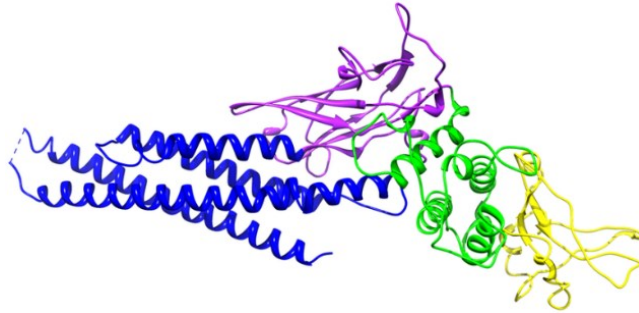
Zvýšená expresia a aktivita STAT3 sa podieľa na vzniku rôznych solídnych a hematologických nádorov vrátane leukémie, lymfómov a rakoviny hlavy a krku. Okrem toho sa zvýšené hladiny STAT3 spájajú so zlou prognózou niektorých druhov rakoviny (Liu a kol., 2014).

2.3.1 Štruktúra a aktivácia STAT3

Všetkých sedem známych proteínov rodiny STAT má podobnú štruktúru zloženú z nižšie uvedených domén.

1. Špirálovitá N-koncová doména („N-terminal domain“; „ND“) slúži k interakcii proteín-proteín medzi susediacimi STAT dimérmi na DNA
2. Doména s vinutou cievkou („Couled-coil“ ; „CC“) slúži k interakcii s regulačnými proteínmi, ktoré pozitívne alebo negatívne modulujú transkripčnú aktivitu
3. DNA-viazuca doména („DNA binding domain“; „DBD“) slúži na rozpoznávanie špecifických DNA-sekvencií cieľových génov
4. Špirálová spojovacia doména („Helical linker“; „LK“), ktorá sa podieľa na jadrovom exporte a väzbe DNA

5. Doména homológie Src 2 („Src homology 2“; „SH2“) potrebná pre väzbu receptorov a dimerizáciu
6. C-koncová transaktivačná doména („C-terminal transactivation domain“; „TAD“), ktorá obsahuje špecifické zvyšky, ktoré sú fosforylované pri transkripčnej aktivácii (Tolomeo a Cascio, 2021).



Obrázok 3 3D štruktúra proteínu STAT3
(Zdroj: : Guanizo a kol.,2018)



Obrázok 4 Oblasti STAT3
(Zdroj: Guanizo a kol.,2018)

STAT proteíny sú aktivované v cytoplazme Janusovými kinázami (JAK), rodinou zloženou zo štyroch rôznych vnútrobunkových nereceptorových tyrozínkináz prenášajúcich signály sprostredkované cytokínmi. JAK sú spojené s dvoma rôznymi typmi receptorov (typ I a typ II), ktoré nemajú žiadnu katalytickú aktivitu, ale po väzbe so špecifickým ligandom umožňujú autofosforyláciu JAK, ktorá následne fosforyluje a aktivuje proteíny STAT (Tolomeo a Cascio, 2021)

STAT3 je jedným z najkomplexnejších regulátorov transkripcie a účastní sa na mnohých biologických procesoch. STAT3 je aktivovaný celou rodinou cytokínov typu interleukin 6 (IL-6), ktorú tvoria IL-6, IL-11, IL-22, IL-27, IL-31, onkostatín M (OSM), kardirotrofin 1 (CT-1), ciliárny neurotrofický faktor (CNTF), kardirotrofinom podobný cytokínový faktor 1 (CLCF1) a leukemický inhibičný faktor (LIF). Tieto cytokíny sa podieľajú na embryonálnom vývoji, imunologickej aktivite, zápale, krvotvorbe, kardiovaskulárnej fyziológii, regenerácii pečene a neurónov (Tolomeo a Cascio, 2021).

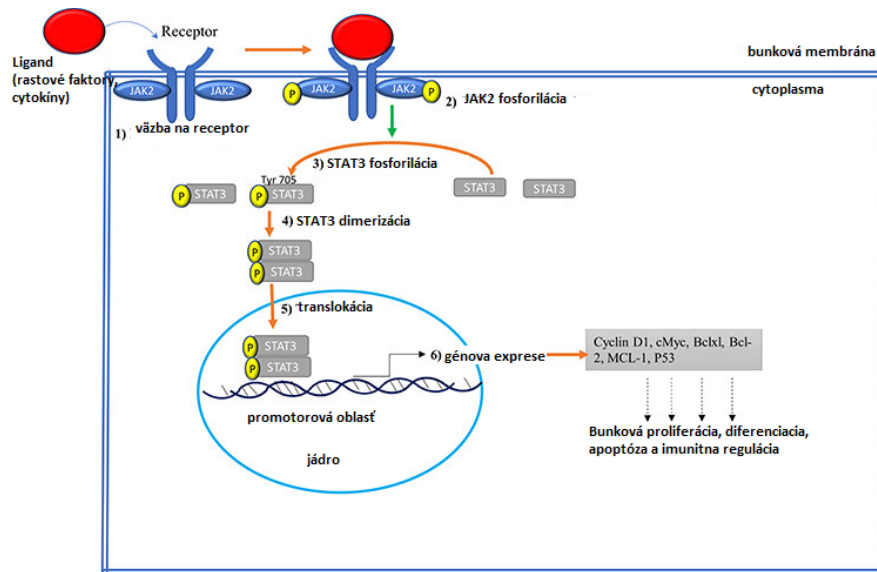
2.3.1.1 Signálna dráha JAK/STAT3 v normálnej bunke

JAK a STAT proteíny tvoria základnú vnútrobunkovú signálnu sieť, ktorá bola objavená pred takmer tromi desaťročiami. Mnohé cytokíny a rastové faktory využívajú túto signálnu dráhu na prenos signálov z bunkovej membrány do jadra, kde aktivujú gény prostredníctvom transkripcie (Mengie a kol., 2022).

Receptorová tyrozínkináza (RTK), proteíny JAK a STAT sú kľúčovými zložkami dráhy JAK/STAT. RTK sú membránové receptory spojené s tyrozínkinázami (TK), ktoré patria do nadrodiny cytokínových receptorov a viažu sa s mnohými cytokínmi a signálmi rastových faktorov v signálnej dráhe JAK/STAT. Každá RTK má extracelulárnu doménu na väzbu s ligandmi, transmembránovú doménu a intracelulárnu doménu na zostupnú kaskádovitosť. RTK sama o sebe nemá kinázovú aktivitu, ale vo svojej intracelulárnej doméne má väzobné miesto pre JAK (Mengie a kol., 2022).

K aktivácii dráhy JAK2/STAT3 dochádza po naviazaní hormónov (napr. prolaktín), rastových faktorov (napr. epidermálny rastový faktor (EGFR), či cytokínov (najmä rodina IL-6), na extracelulárnu doménu špecifických bunkových receptorov RTK.

JAK2 sprostredkúva najmä signalizáciu prostredníctvom viacerých cytokínových receptorov, ako sú receptory IL-6, erytropoetínu, leptínu a IFN- γ . Táto interakcia vedie k dimerizácii alebo multimerizácii podjednotiek receptorov, čím sa JAK2, ktoré sú nekovalentne spojené s intracelulárnymi doménami receptorov, dostávajú do vzájomnej blízkosti. Tým dochádza k vzájomnej fosforylácii JAK2 na ich tyrozínových zvyškoch a k aktivácii ich kinázovej domény, ako je znázornené na obrázku nižšie. Keď sú proteíny JAK2 fosforylované, umožňuje ich aktivovaná kinázová doména ďalšiu fosforyláciu tyrozínových zvyškov na vnútrobunkových doménach receptora, aby sa vytvorili väzbové miesta pre proteíny disponujúce doménou SH2 (teda cytoplazmatického proteínu STAT3). STAT3 následne podlieha fosforylácii na Tyr705 (resp. p-STAT3) pomocou JAK2, čo spôsobuje dimerizáciu p-STAT3 a následnou translokáciu do jadra, kde sa tento dimér viaže na špecifické sekvencie DNA a indukuje transkripciu cieľových génov (Mengie a kol., 2022).



Obrázok 5 Signalizačná dráha JAK/STAT
(Zdroj: Mengie a kol., 2022)

Dominantné mutácie v géne STAT3 vedú k čiastočnej strate funkcie proteínu STAT3, čo spôsobuje autozomálne dominantný syndróm hyper IgE (AD-HIES alebo Jobov syndróm) charakterizovaný opakovanými bakteriálnymi pľúcnyimi a kožnými infekciami spojenými s tvorbou chladových abscesov, závažnou ekzémovou vyrážkou, chronickou mukokutánnou kandidózou, primárnymi štrukturálnymi abnormalitami spojivového tkaniva a tvorbou arteriálnych tortuozít/aneuryziem. Táto strata funkcie neznamená úplnú absenciu proteínu alebo jeho funkcie, pretože úplná absencia STAT3 nebola u ľudí pozorovaná a u myší je letálna.

Zisk funkcie STAT3 sa klasicky spája s novotvarmi, zatiaľ čo špecifické somatické mutácie v STAT3 boli zaznamenané u veľkej podskupiny pacientov s veľkou granulárnou lymfocytárnou leukémiou (Forbes a kol., 2016).

2.3.2 Úloha STAT3 pri vzniku a vývoji nádoru

Rast nádoru je riadený nádorovými bunkami (vnútorný fenomén buniek), ale aj imunitnými bunkami v mikroprostredí nádoru (vonkajší fenomén buniek). Progresia nádorového ochorenia je teda sprostredkovaná aktiváciou transkripčných programov zodpovedných za nadmernú proliferáciu nádorových buniek, ale aj indukovanou proliferáciou/aktiváciou imunosupresívnych buniek (napr. Th17 lymfocyty, Treg bunky alebo odvodené myeloidné supresorové bunky (MDSC)).

Jedným z kľúčových transkripčných faktorov zapojených do týchto procesov je práve STAT3 (Rebé a kol., 2013).

STAT3 sa v súčasnosti považuje za onkogén a jeho dysregulovaná aktivita bola zaznamenaná takmer u 70 % prípadov rakoviny.

Narušená aktivita STAT3 v rakovinových bunkách spôsobuje nepretržitú transkripciu bunkových rastových faktorov a anti-apoptotických molekúl, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu pri udržiavaní bunkového rastu a prežívania. STAT3 navyše udeľuje nádoru veľkú malignitu tým, že podporuje nádorovú inváziu, migráciu, metastázovanie a angiogénu. V neposlednom rade STAT3 podporuje rakovinu prostredníctvom zápalu, obezity, kmeňových buniek a premetastatickej niky. Preto je zvýšená expresia STAT3 často spájaná so zlou prognózou nádorových ochorení (Tolomeo a Cascio, 2021).

2.3.3 STAT3 a glioblastoma multiforme

Väčšina štúdií, ktoré poukazujú na to, že STAT3 je kľúčovým onkogénom vo vývoji a progresii GBM, pochádza z laboratórnych bunkových línií a zvieracích modelov. Predmetom týchto štúdií bolo porovnávanie kontrolných bunkových línií s bunkami s prechodným alebo stabilným vyradením expresie STAT3 (alebo regulátorov STAT3) v množstve testov na báze buniek (Liu a kol., 2010).

STAT3 je kľúčový pre udržiavanie neurálnych kmeňových buniek a vývoj astrocytov, avšak bolo zistené, že u GBM a odvodených bunkách je STAT3 konštitutívne aktivovaný v porovnaní s normálnymi tkanivami. Aktivovaný STAT3 prispieva k autokrínnej slučke IL-6-STAT3 a prerušenie tejto slučky inhibítorom JAK AG490 alebo dominantným negatívnym mutantom STAT3 (DN- STAT3) inhibuje STAT3 a jeho Bcl-2, Bcl-xL a Mcl-1, čo vedie k apoptóze. Rovnaké výsledky sa pozorujú v bunkách astrocytému liečených siRNA (cielenou na STAT3) (Liu a kol., 2010).

Okrem toho, keď sa DN-STAT3 stabilne exprimuje hypoxiou indukovaným spôsobom v inom GBM bunkovej línii, nádor odvodený z tejto bunkovej línie nerastie nad hrúbku 2 mm v dôsledku zníženej angiogézy a indukovanej apoptózy. Klinické štúdie tiež dokazujú, že pacienti s GBM s vyššou expresiou fosforylovaného STAT3 majú kratšie prežívanie ako pacienti s nižšou expresiou proteínu p-STAT3 (Liu a kol., 2010).

2.4 Génové inžinierstvo

Genómové inžinierstvo je výkonným nástrojom pre širokú škálu aplikácii v biomedicínskom výskume a medicíne. Umožňuje štúdium funkcie génov a ich reguláciu prostredníctvom vytvárania *in vitro* (bunkových) alebo *in vivo* (zvieracích) modelov ochorení. Génové inžinierstvo takto zohráva kľúčovú úlohu pri vývoji génovej terapie pri genetických ochoreniach (Lu Xiao-Jie a kol., 2017).

Preukázalo sa, že metódy génového inžinierstva sa dajú použiť na opravu chybných DNA u myši, čím sa vyličia z genetických porúch. Tiež sa uvádza, že podobne sa dajú upraviť aj ľudské embryá.

Medzi ďalšie potenciálne klinické aplikácie patrí génová terapia, liečba infekčných chorôb (napr. HIV) a inžinierstvo autológneho materiálu pacienta na liečbu rakoviny a iných chorôb (Redman a kol., 2016).

V posledných desaťročiach sa objavil nový prístup s názvom "editácia genómu", ktorý sa široko využíva pri štúdiu funkčnej genomiky. Editácia genómu je postavená na upravených, programovateľných a vysoko špecifických nukleázach, ktoré môžu indukovať zmeny špecifické pre dané miesto v genómoch bunkových organizmov prostredníctvom sekvenčne špecifickej domény viažucej DNA a nešpecifickej domény štiepiacej DNA. Následný proces opravy bunkovej DNA vytvára požadované inzercie, delécie alebo substitúcie. Príkladom takejto technológie je napr. CRISPR–Cas9 (Zhang a kol., 2014).

2.4.1 Metódy genetickej modifikácie

Na úpravu genómu bolo vyvinutých viacero umelých nukleázových systémov, ako nukleázy so zinkovými prstami (ZFN), ktoré sú široko používané ako umelé nukleázy. Obsahujú spoločnú DNA-viažucu doménu Cys2-His2 a DNA-štiepiacu doménu restriktívnej endonukleázy FokI.

Ďalšou populárnou platformou na editáciu genómu sú nukleázy podobné transkripčným aktivátorom (TALEN), ktoré sú odvodené od prirodzeného proteínu rastlinných patogénnych baktérií *Xanthomonas*. Prostredníctvom zamiešania opakovaných aminokyselinových rozpoznávacích motívov možno TALEN naprogramovať tak, aby spôsobili na špecifickú sekvenciu DNA.

Alternatívu k ZFN a TALENu je systém „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) protein 9 (CRISPR–Cas9)“. Na rozdiel od proteínom riadeného štiepenia DNA ZFN a TALEN závisí CRISPR–Cas9 od malej RNA na sekvenčne špecifické štiepenie. Keďže na vytvorenie sekvenčnej špecifickosti je potrebná len programovateľná RNA, CRISPR–Cas9 je ľahko použiteľný (Zhang a kol., 2014).

2.4.2 CRISPR-Cas9 metóda

CRISPR–Cas9 je technológia editovania génov, ktorá spôsobila veľký prevrat v biomedicínskom výskume. Táto technológia umožňuje rýchlo, lacno a relatívne jednoducho opravovať chyby v genóme a aktivovať alebo inaktivovať gény v bunkách a organizmoch. Má množstvo laboratórnych aplikácií vrátane rýchleho vytvárania bunkových a zvieracích modelov, funkčných genomických skrínigov a zobrazovania bunkového genómu (Redman a kol., 2016).

Kľúčovým bodom na začatie editácie je potreba vytvoriť dvojvláknový zlom (DSB) v DNA na konkrétnom mieste v genóme. K dosiahnutiu tohto presného DSB výskumníci vyvinuli upravené nukleázy, označované aj ako "molekulárne nožnice". Práve vývoj univerzálnych systémov CRISPR-Cas ako molekulárnych nožníc, pri ktorých stačí jednoduchá výmena vodiacej sekvencie RNA na prepracovanie nukleázovej špecificity, otvoril cestu k revolúcii v prírodných vedách.

Technológia CRISPR-Cas9 je vynikajúcim príkladom využitia prirodzene sa vyskytujúceho systému na vývoj syntetickej súpravy nástrojov na vedecké skúmanie. Systémy CRISPR sú adaptívne imunitné systémy, ktoré sa nachádzajú v baktériách a archeách. Zabezpečujú imunitu voči opakovaným útokom bakteriofágov, vírusov napádajúcich baktérie (Das a kol., 2022).

CRISPR-Cas možno použiť na modifikácie ľudského genómu, na cielečné zasiahnutie latentných a chronických vírusových infekcií v ľudských bunkách. Napríklad intrastromálna injekcia Cas9 ako neintegrujúceho sa lentivírusu zabránila infekcii vírusom herpes simplex typu 1 a patológii ochorenia a zničila vírusový rezervoár na myšacích modeloch. Tento systém by mohol byť použitý aj na iné herpetické vírusy, ako je napríklad vírus Epstein-Barrovej, a to cíelením Cas9 na základné promótoary alebo kódujúce sekvencie vo vírusovom genóme. Do fázy I/II klinického skúšania sa dostala

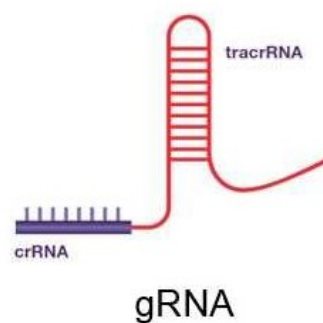
najmä stratégia založená na metóde CRISPR na odstránenie infekcií HIV (Chavez a kol., 2022).

2.4.2.1 Triedenie CRISPR metód

Systémy CRISPR-Cas sú rozdelené do dvoch tried (trieda 1 a 2). Tieto triedy sa ďalej delia na šesť typov (I až VI). Systémy triedy 1 (typy I, III a IV) používajú vo svojich efektorových nukleázach CRISPR ribonukleoproteínov viacero Cas proteínov a systémy triedy 2 (typy II, V a VI) používajú jeden Cas proteín. Systémy CRISPR-Cas triedy 1 sa najčastejšie vyskytujú v baktériách a archeách a tvoria 90 % všetkých identifikovaných lokusov CRISPR-Cas. Systémy CRISPR-Cas triedy 2, ktoré tvoria zvyšných 10 % sa vyskytujú takmer výlučne v baktériách a zostávajú ako ribonukleoproteínový komplex pozostávajúci z CRISPR RNA (crRNA) a Cas proteínu. Najviac charakterizovaným systémom CRISPR-Cas je podtyp II-A nachádzajúca sa v baktérii *Streptococcus pyogenes*, ktorý využíva proteín SpCas9 (Paul a kol., 2020).

2.4.2.2 Mechanizmus fungovania CRISPR-Cas

Systém CRISPR–Cas9 sa skladá z krátkej nekódujúcej gRNA a nukleázy Cas9. gRNA má dve molekulárne zložky: špecifickú CRISPR RNA pre cieľ (crRNA) a pomocnú trans-aktivujúcu crRNA (tracrRNA). Jednotka gRNA navádza proteín Cas9 na špecifický genómový lokus, kde nukleáza Cas9 vyvolá dvojvláknový zlom na špecifickej cieľovej sekvencii genómu (Gene Editing - Thermo Fisher Scientific - CZ).



Obrázok 6 gRNA
(Zdroj: www.thermofisher.com)

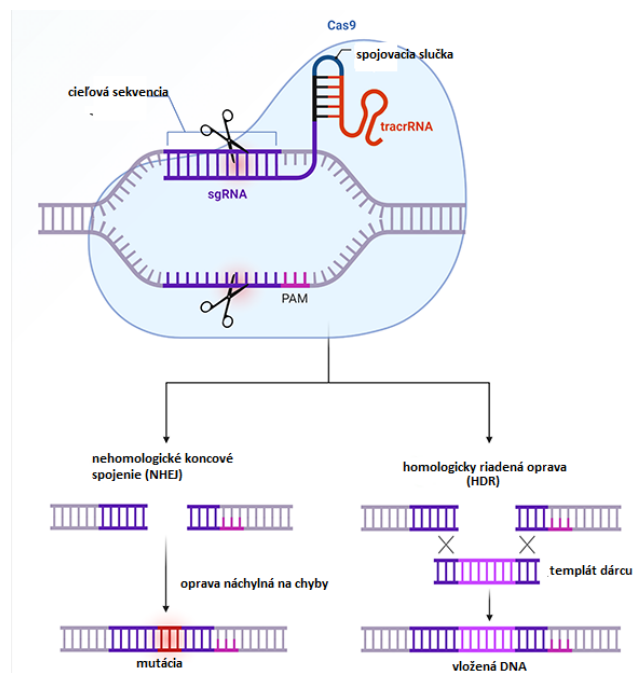
V baktériách sa lokusy CRISPR skladajú zo série opakovaní oddelených úsekmi exogénnej DNA (s dĺžkou ~ 30 bp), ktoré sa nazývajú „spacer“. Sústava opakovaní a spacerov sa transkribuje ako dlhý prekurzor a spracúva sa v rámci sekvencií opakovaní

na vytvorenie malých crRNA, ktoré špecifikujú cieľové sekvencie (známe aj ako protospacery) štiepené nukleázou Cas9 (Gene Editing - Thermo Fisher Scientific - CZ).

Cas9 rozpoznáva veľmi krátku konzervovanú sekvenciu (s dĺžkou niekoľkých nukleotidov) susediacu s vodiacou sekvenciou, ktorá sa nazýva "protospacer adjacent motif" (PAM). Po nasmerovaní na cieľové miesto DNA Cas9 vytvorí dvojláknový zlom (CRISPR-Cas technology: Targeted Genome Editing Technology - ACROBiosystems).

V neprítomnosti opravnej šablóny má proces nehomologického spájania koncov (NHEJ) za následok heterogénnu populáciu buniek s rôznymi inzerciami alebo deléciami (indelmi) okolo zlomu definovaného gRNA. Tento proces sa dá využiť na vytvorenie bunkových línií s náhodnými deléciami okolo špecifickej sekvencie, čím sa vytvorí funkčný knockout (Gene Editing - Thermo Fisher Scientific - CZ).

Alternatívne ak je k dispozícii opravná šablóna, možno zaviesť používateľom definovanú sekvenčnú zmenu na špecifickom mieste v genóme prostredníctvom mechanizmu bezchybnej opravy zameranej na homológiu. Tento proces sa môže použiť na zvýšenie expresiu nového génu, vytvorenie bunkových modelov relevantných pre ochorenie alebo označenie endogénnych génov nahlasovanými časťami (Gene Editing - Thermo Fisher Scientific - CZ).



Obrázok 7 Mechanizmus CRISPR-Cas9
(Zdroj: <https://www.bio-rad-antibodies.com>)

3 CIEĽ

Cieľom tejto práce bolo vytvoriť STAT3-knockoutovanú bunkovú líniu GBM z buniek U87MG, pomocou metódy CRISPR-Cas9.

Čiastkovými cieľmi bolo:

- Vykonať transfekciu buniek U87MG pomocou STAT3-siRNA a následne overiť efektivitu transfekcie na úrovni mRNA a proteínov
- Vykonať transfekciu buniek U87MG pomocou metódy STAT3-knockout CRISPR-Cas9 a následne overiť efektivitu knockoutu na úrovni DNA, mRNA a proteínov
- Stanoviť vplyv chemoterapeutického liečiva TMZ na životnosť buniek U87MG a U87MG-STAT3-KO a porovnať citlivosti oboch bunkových línií
- Implantovať bunkové línie U87MG a U87MG-STAT3-KO do imunodeficitných myší Nude-Foxn1nu za využitia PBS a kolagénu ako prostredie pre implantáciu buniek, a porovnať rast a proliferačný index takto vzniknutých nádorov

4 MATERIÁL

4.1 Prístroje

- Centrifúga (Eppendorf Centrifuge)
- Inkubátor bunkových kultúr
- Laminárny box
- Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific)
- Odsávačka
- PCR laminárny box
- Spektrofotometer (Tecan Infinite M2000)
- Trepáčka
- Ventana Benchmark Ultra machine
- Vortex
- Termoblok

4.2 Chemikálie

- „Buffer AE“
- „Buffer AL“
- „Buffer ATL“
- „Buffer AW1“
- „Buffer AW2“
- „RiboLock RNAsa inhibitor
- 10% roztok APS
- 10% SDS
- 5% roztok mlieka v TBST pufru
- 96 % etanol
- Bezsérové médium Opti-MEM
- DNA pufr
- Genomic Lysis Buffer
- Glycín (192 mM)
- Chloroform
- Isobutanol nasýtený vodou

- Médium EMEM (od spoločnosti ATCC) obohatené o 10% FBS a 1% antibiotík penicilín/streptomycín
- Metanol
- M-MuLV Reverse Transcriptase
- Proteinkináza K
- Pufr 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
- Pufr 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
- Puromycín rozpustený v kultivačnom médiu
- Q5 polymeráza (New England Biolabs; iBioTech)
- RBI pufr
- Redestilovaná voda
- RNAsa-free water
- RNW pufr
- Roztok AA+ bisAA
- SignalSilence STAT3 siRNA II – zásobný roztok
- SWI pufr
- Taq polymeráza (New England Biolabs | iBioTech)
- TBST pufr
- TEMED
- TRIS (25 mM)
- Turbofectin 8.0
- WST-1

4.3 Pomôcky

- 1,5 ml mikrocentrifugačná skúmavka
- 96 – jamkové doštičky (Thermo Scientific)
- Iné laboratórne pomôcky (rukavice, buničina, kadičky...)
- komerčný kit „GeneAll RNA Purification System
- Petriho miska
- Pipety (Eppendorf)
- Pomôcky pre blotting (filtračný papier, PVDF membrána, blotovacie hubky)
- Pomôcky pre prípravu elektroforetického gélu (spony, hrebeň, sklo, stojan)
- Špičky rôznej veľkosti (Eppendorf)

4.4 Bunkové línie

Ľudská bunková línia U87MG má epitelovú morfológiu a bola pôvodne získaná od 44-ročnej pacientky v roku 1966 na univerzite v Uppsale vo Švédsku. Táto bunková línia bola charakteristická k výskumu glioblastómu. Neskôr nasledovalo porovnávanie profilov expresie génov medzi bunkovou líniou U87MG distribuovanou bunkovým repositárom American Type Culture Collection (ATCC) a pôvodným nádorovým tkanivom a zistilo sa, že bunková línia z ATCC má vyššiu mieru proliferácie a došlo aj k identifikácii chromozómu Y. Na základe uznania tohto rozporu ATCC v súčasnosti označuje U87MG identifikátorom HTB-14TM a opisom, že ide pravdepodobne o glioblastóm CNS mužského pôvodu (Pokorná a kol., 2021).

Bunkové línie pre náš výskum boli zakúpené od firmy ATCC a boli kultivované v bunkových inkubátoroch (pri 37 °C a 5% CO₂) v príslušných kultivačných fľaštičkách s kultivačnou plochou 75 cm². Bunky U87MG (ATCC® HTB-14M) boli kultivované v médiu EMEM (od spoločnosti ATCC), obohatené o 10% FBS a 1% zmes antibiotík penicilín/streptomycín.

Bunkové línie U87MG-STAT3-KO boli geneticky upravené, tak aby došlo ku knockoutu STAT3. Bunkové línie boli kultivované v médiu EMEM (od spoločnosti ATCC), obohatené o 10% FBS a 1% zmes antibiotík penicilín/streptomycín.

Pre implantáciu do modelového organizmu sa použili bunkové línie U87MG a U87MG STAT3-KO

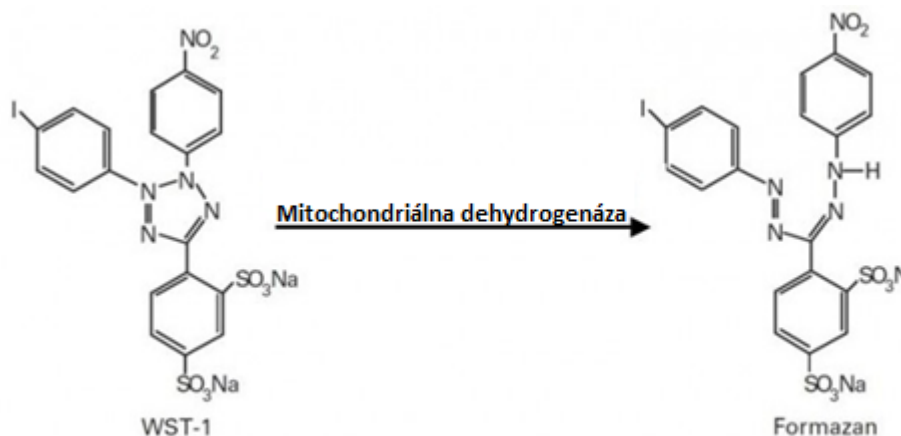
4.5 Experimentálne zvieratá

Pre vykonanie *in vivo* experimentu sa použili myši („Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu“, samice, staré 6 týždňov, ďalej len nu-nu myši). Ide o nahú myš, ktorá má inaktivovaný transkripčný faktor FOXN1, čo je charakterizované nedostatkom viditeľnej srsti a imunodeficiencie (absencia thymu a T-lymfocytov) (Gawronska-Kozak, 2011).

5 METODIKA

5.1 Stanovenie viability buniek pomocou metódy WST-1

Kľúčovou technikou v prírodných vedách sa stalo meranie životaschopnosti a proliferácie buniek. Water-Soluble Tetrazolium 1 (WST-1) metóda sa stala rýchlou, citlivou, spoľahlivou a jednoduchou metódou, ktorá slúži na analýzu počtu životaschopných buniek pomocou štiepenia tetrazolových solí pridaných do kultivačného média. Tetrazolové soli sa štiepia na formazán pomocou bunkových enzýmov (viz. obrázok nižšie). Zvýšenie počtu životaschopných buniek vedie k zvýšeniu celkovej aktivity mitochondriálnych dehydrogenáz vo vzorke, čo následne vedie k zvýšenej tvorbe farbiva formazanu. Kvantifikácia formazánového farbiva produkovaného metabolicky aktívnymi bunkami sa stanovuje pomocou spektrofotometra (SigmaAldrich, 2009).



Obrázok 8 Štiepenie tetrazolovej soli na formazan pomocou mitochondriálnej dehydrogenázy
(Zdroj: *Biovision*, 2013)

Životaschopnosť bola testovaná u bunkovej línie U87MG, ktoré boli nasadené do 96 jamkových mikrotitračných doštičiek a umiestnené do bunkového inkubátora. Následne sa druhý deň odsalo pôvodné médium a k bunkám sa pridal TMZ v rôznych koncentráciách. Mikrotitračné doštičky sa vložili do CO₂ inkubátora a boli inkubované pri teplote 37°C a 5% CO₂, po dobu 48 hodín.

Po stanovenej dobe inkubácie sa pripravil pracovný roztok, ktorý obsahoval reagensiu WST-1 a médium v pomere 1:20. Z doštičky sa odsalo médium s TMZ a následne sa do každej jamky pipetovalo 100 µl roztoku WST-1 v médiu. Mikrotitračná doštička sa vložila späť do CO₂ inkubátora na 2 hodiny pri teplote 37°C a 5% CO₂.

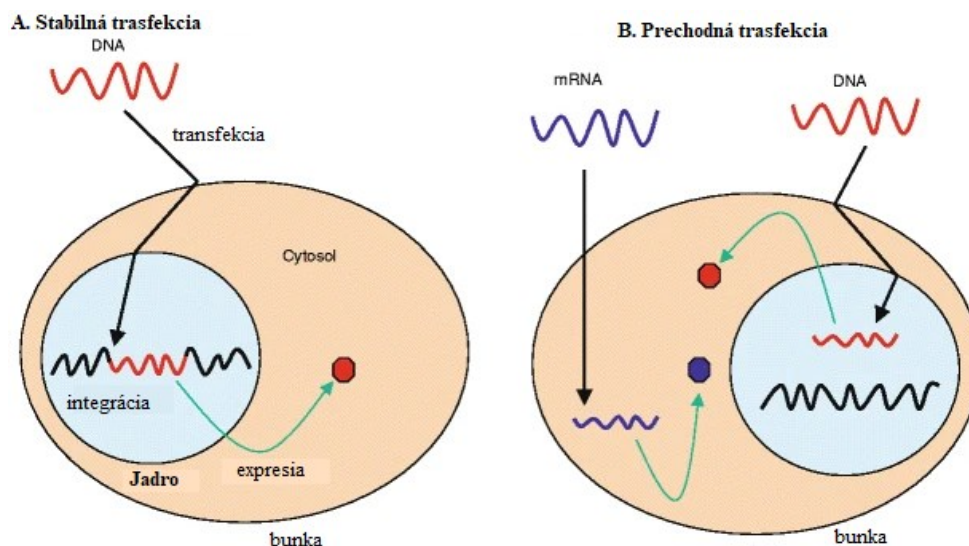
Po uplynutí inkubačnej doby sa zmerala absorbancia pri vlnovej dĺžke 450 nm (za použitia referenčnej vlnovej dĺžky 690nm) na spektrofotometri Tecan Infinite M200.

5.2 Transfekcia buniek U87MG

Transfekcia je široko používaná laboratórna technika kultivácie buniek, pri ktorej sa do buniek vnášajú cudzie nukleové kyseliny (NK). Je to výkonný nástroj, ktorý umožňuje štúdium funkcie génov a génových produktov v bunkách (Fus-Kujawa a kol., 2021).

V súčasnosti pokrok v technológiách biologických vied umožňuje transfekciu rôznych typov nukleových kyselín do buniek cicavcov vrátane: DNA, RNA ako aj malých nekódujúcich RNA (napr. siRNA, shRNA a miRNA). Výber správnej transfekčnej metódy závisí od typu buniek a formy vnášania NK do buniek. Na vnášanie NK sa používajú fyzikálne (napr. mikroinjekcia, optická transfekcia, elektroporácia), chemické (napr. katalyzuje sa transport DNA cez membránu pomocou Ca^{2+} fosfátu alebo polykatiónov) alebo, v praxi najpoužívanejšie, biologické metódy (napr. NK sa do buniek dostávajú pomocou vírusov) (Fus-Kujawa a kol., 2021).

Vnesený genetický materiál (DNA a RNA) môže byť v bunkách stabilne alebo prechodne. Pri stabilnej transfekcii sa zavedený genetický materiál (transgén), ktorý vykonáva selekciu, včlení do genómu hostiteľskej bunky a umožňuje expresiu transgénu aj po replikácii bunky. V prípade prechodnej transfekcie dochádza len k časovo obmedzenej expresii transfekovaných génov a nedochádza k ich začleneniu do genómu, Z bunky sa odstráni buď vplyvom prostredia alebo závislosti od delenia bunky. Preto pri výbere transfekcie je nutné zvážiť cieľ experimentu (Kim a Eberwine, 2010).



Obrázok 9 Stabilná a prechodná transfekcia
(Zdroj: Kim a Eberwine, 2010)

5.2.1 Transfekcia buniek U87MG pomocou STAT3 – siRNA a transfečného reagens X-tremeGENE siRNA

Bunky U87MG boli kultivované v 6-jamkovej doštičke v koncentrácii 150 tisíc buniek na jamku po dobu 24 hodín. Nasledujúci deň sa pripravili roztoky siRNA zo zásobného roztoku (SignalSilence STAT3 siRNA II.) o koncentrácii 10 μ M. Roztoky sa pripravili podľa nasledujúcej tabuľky (viz nižšie).

Tabuľka 1 Príprava roztoku si-RNA

	Kontrolná siRNA 100 nM	siRNA 10 nM	siRNA 50 nM	si RNA 100 nM
Množstvo siRNA	10 μ l	1 μ l	5 μ l	10 μ l
Množstvo OptiMEM	90 μ l	99 μ l	95 μ l	90 μ l

Na prípravu kontrolnej siRNA sa využil SignalSilence Control siRNA (Florescein conjugated) a na prípravu testovanej siRNA sa využil konkrétny druh Signal Silence (Signal Silence STAT3 siRNA II). SiRNA sa riedila vždy do bezsérového média Opti-MEM (1x) a pripravené roztoky sa nechali stáť maximálne 5 minút.

Na prípravu transfečného reagens X-tremeGENE v médiu Opti-MEM pre jednu jamku sa zmiešalo 5 μ l X-tremeGENE a 45 μ l Opti-MEM. Pridalo sa ekvivalentné

množstvo transfekčného reagens k jednotlivým roztokom siRNA. Špička s roztokom transfekčného reagens sa ponorila do polovice objemu v skúmavke a pomaly sa vypustil do transfekčného reagens.

Roztok sa premiešal na vortexe pri veľmi nízkej rýchlosti po dobu 5 sekúnd a následne sa inkuboval 15 – 20 minút pri pokojovej teplote. Doštičky s bunkami sa vybrali z inkubátora a do každej jamky sa po kvapkách pridalo 100µl príslušného roztoku siRNA:X-tremeGENE. Doštičky sa jemne zamiešali krúživým pohybom a vložili naspäť do inkubátora, kde sa inkubovali 24 hodín pre správne prebehnutie transfekcie.

5.2.2 Transfekce buniek U87MG pomocou STAT3–Human gene knockout (CRISPR) a transfekčného reagens Turbofectin 8.0

Pre túto trasfekciu bolo potrebné nasadiť bunkovú líniu U87MG o koncentrácii 3×10^5 buniek/jamku do 6-jamkovej doštičky. Nasledujúci deň sa skontrolovala konfluencia, ktorá by mala dosahovať 50-70%.

Pripravili sa celkom 3 sterilné skúmavky, pridanie jednotlivých reagens muselo byť presne v predpísanom poradí aby sa získali optimálne podmienky transfekcie. Do každej skúmavky sa pridalo 250 µl OPTI-MEM I (Life Technologies). Do prvej skúmavky sa pridalo 10 µl gRNA1 (gRNA vektor (SKU KNxxxxxxxG1, KNxxxxxxxG2), 5 µg DNA v TE pufru), do druhej skúmavky sa pridalo 10 µl gRNA2 (gRNA vektor (SKU KNxxxxxxxG1, KNxxxxxxxG2), 5 µg DNA v TE pufru) a do tretej sa pridalo 10 µl „scramble control“ (lyofilizovaný kontrolný vektor). Všetky skúmavky sa opatrne premiešali na vortexe. Po premiešaní sa do každej skúmavky pridalo 10 µl donorovej DNA a opäť sa zvortexovalo. Následne sa pridalo 6 µl transfekčného reagens (Turbofectin 8.0) a opatrne sa premiešalo pipetou. Zmes sa nechala stáť 15 min pri pokojovej teplote.

Do pripravenej 6-jamkovej doštičky s bunkami U87MG sa po kvapkách pridala pripravená zmes a opatrne sa premiešala s médiom kývavým pohybom zo strany na stranu, aby došlo ku kompletnej distribúcii a premiešaniu. Doštičky sa vložili do 5% CO₂ inkubátoru a nechali inkubovať 48 hod.

Po trasfekcií sa bunky spasážovali v pomere 1:10 a vytvorili sa duplikáty (2 jamky pre každú trasfekciu = celkovo 6 jamiiek). Bunky rástli ďalšie 3 dni a znovu sa spasážovali

v pomere 1:10. Po každej pasáži sa odobrala vzorka do DNA pufru, ktorý sa uchovával v mrazáku pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Po 6. pasáži sa bunky vložili do 10 cm Petriho misky. gRNA1 sa dalo do prvej Petriho misky, gRNA2 sa dalo do druhej a SC sa dalo do tretej Petriho misky. Bunková suspenzia sa zaliala 12 ml média s puromycínom v koncentrácii $2,5\text{ }\mu\text{g/ml}$, aby sa vyseletovali transfekované bunky.

5.3 Stanovenie hladiny DNA pomocou PCR metód

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je technika, ktorá sa vo veľkej miere používa v základných a biomedicínskych vedách. Ide o laboratórnu techniku používanú na amplifikáciu špecifických segmentov DNA (Ghannam a Varacallo, 2022).

Základné komponenty PCR:

Templát DNA je vzorka DNA, ktorá obsahuje cieľovú sekvenciu. Na začiatku PCR sa na túto vzorku pôsobí vysokou teplotou a dochádza k oddeleniu vlákien od seba.

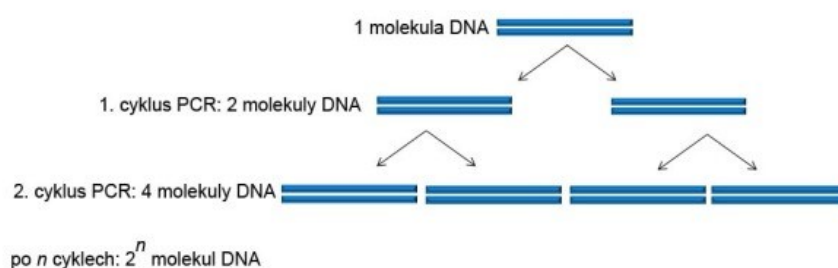
DNA polymeráza je určitý typ enzýmu, ktorý zabezpečuje vytvorenie nových vlákien komplementárne k cieľovej sekvencii. Najčastejšie používaným enzýmom je TaqDNA-polymeráza (*Thermis aquaticus*). Ďalším často používaným enzýmom je PfuDNA-polymeráza (*Pyrococcus furiosus*). Oba tieto enzýmy sú vhodné k využívaniu pre PCR, vďaka ich termostabilite a tvorbe nových vlákien DNA, pomocou templátu DNA a primerov.

Nukleotidy (dNTP) sú stavebný prvok pre replikáciu DNA. Pomocou polymerázy sa pridá komplementárna báza do nového rastúceho vlákna DNA, podľa párovania A-T a C-G.

Primery sa používajú na dosiahnutie selektívnej amplifikácie. Sú to jednovláknové úseky, ktoré sa syntetizujú chemicky a musia byť komplementárne s oboma koncami danej sekvencie, ktorá sa bude amplifikovať. Veľkosť primerov je zvyčajne od 10 do 30 nukleotidov (Kadri, 2020).

Princíp PRC:

Prvý krok (tzv. denaturácia) zahŕňa denaturáciu DNA, pri ktorej dochádza k oddeleniu komplementárne vlákna od seba. To sa deje pri teplote viac ako 90°C. V ďalšom kroku (tzv. anealing), dochádza pri teplote 50-55°C k hybridizácii primerov. Pri reakcii sa používajú 2 primery. Jeden primer je naľavo (5') a druhý napravo (3') od cieľovej sekvencie, ktorá sa amplifikuje. V poslednom kroku (tzv. polymerizácia), sa pri teplote 72°C pomocou Taq-polymerázy sa pripájajú jednotlivé dNTP, čím dochádza k syntéze komplementárneho vlákna k templátovej DNA. (National Laboratory of Enteric Pathogens a kol., 1991; <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/polymerazova-retazova-reakcia-pcr>)



Obrázok 10 Amplifikácia DNA PCR metódou
(Zdroj: <https://labguide.cz/metody/pcr>)

Detekcia PCR:

Poznáme 2 metódy vizualizácie produktov PCR. V prvej metóde môže dochádzať k farbeniu už amplifikovaného produktu DNA chemickým farbivom (napr. etídiumbromid). Dochádza k tomu, že farbivo sa začlení medzi vlákna duplexu alebo primery (prip. nukleotidy) sa označujú pomocou fluorescenčných farieb (napr. fluorofory) pred amplifikáciou. Druhá metóda umožňuje začlenenie značiek priamo do PCR produktov (Garibyan a Avashia, 2013).

5.3.1 Izolácia DNA

Pre izoláciu DNA sa použilo 500 μ l bunkového lyzátu v DNA lyzačnom pufre „Genomic Lysis Buffer“ v 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky. Pridalo sa 180 μ l „Buffer ATL“ a 20 μ l proteinkinázy K. Skúmavka sa zvortexovala a inkubovala pri teplote 56 °C, po dobu 1 hod až kým nedošlo k úplnej lýze.

Po inkubácii sa pridalo 200 μ l „Buffer AL“ a premiešalo na vortexe po dobu 15 s. Nasledovala inkubácia pri teplote 70 °C; po dobu 10 min, potom sa pridalo 200 μ l 96% etanolu, skúmavka sa zvortexovala a krátko scentrifugovala. Vzniknutá zmes sa napipetovala na kolónku „QIAamp Mini spin column“ umiestnenú v „Collection Tube“. Nasledovala centrifugácia pri 8 000 rpm 1 min. Následne sa kolónka preniesla do novej „Collection Tube“ a pridalo sa 500 μ l „Buffer AW1“. Nasledovala centrifugácia pri 8 000 rpm na 1 min.

Po centrifugácii sa pridala sa „Buffer AW2“ o objeme 500 μ l. Nasledovala centrifugácia pri 14 000 rpm. po dobu 3 min. Na záver bola kolónka prenesená do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky a na kolónku bolo pridaných 200 μ l „Buffer AE“. Nasledovala minútová inkubácia pri pokojovej teplote a centrifugácia pri 8 000 rpm po dobu 1 min

5.3.2 Amplifikácia DNA pomocou PCR metódy

Pre PCR amplifikáciu sa pripravili dva „Master mix“ pre Q5 polymerázu (Q5 High-Fidelity DNA Polymerase - New England Biolabs; iBioTech) a pre Taq polymerázu (OneTaq Quick-Load DNA Polymerase - 2500 units - New England Biolabs; iBioTech). Pre prvý „Master mix“ bolo na jednu vzorku použitých 25 μ l pufru, 0,25 μ l Q5 polymerázy, 2 μ l dNTPs, 0,5 μ l „Forward primer“, 0,5 μ l „Reverse primer“, 15,75 μ l vody.

Pri druhom „Master mixe“ sa použilo na jeden vzorek 5 μ l pufru, 0,1 μ l Taq polymerázy, 2 μ l dNTPs, 0,5 μ l „Forward primer“, 0,5 μ l „Reverse primer“ a 15,9 μ l vody. Do PCR mikroskúmavky sa napipetovalo 24 μ l „Master mixu“ ku ktorému sa pridalo 1 μ l templátu. Skúmavky sa opatrne premiešali na vortexe. Nasledovala amplifikácia v PCR cykléry po dobu 1,5 hod.

5.3.3 Gélová elektroforéza

Najrozšírenejšou metódou analýzy PCR produktov je použitie agarózovej gélovej elektroforézy. Dochádza k oddeleniu jednotlivých produktov na základe ich náboja a veľkosti. Elektroforéza umožňuje vizualizáciu a analýzu PCR produktov (určuje prítomnosť a veľkosť produktov). Na gél sa vopred napipetuje určený súbor produktov DNA o známej veľkosti, ide o tzv. štandardizované molekulárne markery, ktoré sa

porovnávajú so vzniknutými produktami a pomáhajú určiť ich veľkosť (Garibyan a Avashia, 2013).

Pripravil sa 1% gél zmiešaním 0,5 g práškovej agarózy s 50 ml TAE pufrou. Celá zmes sa zahriala na 1 min v mikrovlnnej trúbe a po miernom vychladnutí sa naliala do formy. Vo forme bol zasunutý hrebeň, ktorý vytvoril v géle jamky pre naniesenie vzorku. Gél sa nechal 45 min tuhnúť pri laboratórnej teplote. Zatuhnutý gél sa preniesol do elektroforetickej vane. Následne sa vaňa naplnila TAE pufrom, tak aby prekryvala gél.

Na parafilm sa pridalo 1 μ l farbiva a 5 μ l vzorku, zmes sa premiešala a naniesla na dno príslušnej jamky na gély. Do prvej jamky sa nanieslo 10 μ l DNA štandardu. Po nanesení všetkých vzoriek do jamiek, sa opatrne nasadilo veko elektroforetickej vane. Elektródy sa zapojili do zdroja napätia. Delenie vzoriek DNA prebieha pri 100 V po dobu 30 min a 60min, po ktorom nasledovala detekcia pomocou UV žiarenia.

5.4 Stanovenie hladiny mRNA metódou RT-PCR

Real-Time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR) predstavuje ďalšiu možnosť využitia polymerázovej reakcie. Kým klasická PCR umožňuje iba kvalitatívnu analýzu, teda stanovenie prítomnosti alebo neprítomnosti určitej sekvencie, real-time PCR umožňuje aj kvantitatívnu analýzu, teda stanovenie množstva danej sekvencie (Cíchová a Prokšová, 2012).

Množstvo DNA je detekované prítomnosťou fluorescenčného substrátu, ktorý sa viaže na danú DNA. Florescencia sa vyžaruje až po naviazaní substrátu na DNA. Hladina fluorescencie odráža množstvo prítomnej DNA (<https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>).

Ako zdroj fluorescencie sa často využíva SYBRgreen. Ide o nešpecifický fluorescenčný substrát, ktorý sa viaže na dvojláknovú DNA, čo znamená, že ak je v reakcii prítomná len jednovláknová DNA, molekuly SYBRgreenu zostávajú vo voľnom stave a nefluoreskujú (Boháčová, 2021).

5.4.1 Izolácia mRNA

Bunky sa kultivovali v 6-jamkových kultivačných doštičkách. Po uplynutí kultivačnej doby sa médium odstránilo a do každej jamky bolo pridané ľadové PBS o objeme 3 ml. Kývavým pohybom došlo k opláchnutiu buniek a PBS sa odsalo. Potom

sa pridal TRISOL o objeme 200 μ l a bunky sa nechali lyzovať približne 2 minúty. Pomocou škrabky sa bunky zoškrabovali a preniesli sa do 1,5 ml skúmavky.

K lyzovaným vzorkám sa pridalo 200 μ l 100% etanolu a zľahka sa to premiešalo. Premiešaná zmes sa preniesla do „Zymo-Spin IIC Column“ (kolónky) vloženaj do „Collection Tube“. Nasledovala centrifugácia pri 13 000 rpm a teplote 4°C po dobu 30 s. Po centrifugácii sa kolónky preniesli do novej „Collection Tube“ a pipetou sa pridalo 400 μ l „RNA Wash Buffer“. Nasledovala centrifugácia (13 000 rpm, 4°C, 30 s.).

V „RNAsa-free“ mikroskúmavke bola pripravená zmes DNAsy v „DNA Digestion buffer“. Pre jednu reakciu bolo potrebné zmiešať 5 μ l DNAsy a 75 μ l pufru. Takto vytvorená zmes sa preniesla na kolónky a nechalo sa to stáť pri pokojovej teplote 15 min. Po uplynutí času sa na kolónku napipetovalo 400 μ l „Direct Zol RNA PreWash“ a centrifugovalo sa pri 13 000 rpm a 4°C, po dobu 30 s. Predchádzajúci krok sa zopakoval znovu. Následne sa na kolónku napipetovalo 700 μ l „RNA Wash Buffer“ a opäť došlo k centrifugácii pri 13 000 rpm, pri teplote 4°C, po dobu 2 min.

V poslednom kroku boli kolónky prenesené do čistej 1,5 ml „RNAsa-free“ mikroskúmavky. Aby došlo k vymytiu RNA z kolónky, tak sa priamo na kolónky sa pridalo 20 μ l DEPC vody a centrifugovalo pri 13 000 rpm a 4°C po dobu 30 s. Získané vzorky sa použili na zmeranie koncentrácie RNA pomocou spektrofotometru NanoDrop 200. Pre ďalšie spracovanie sa vzorky uchovávali pri teplote -80°C.

5.4.2 Príprava cDNA

V sterilnej skúmavke (bez nukleáz) bola pripravená zmes A. Zmes A pozostávala z 1 μ g celkovej RNA, 1 μ l „Random hexamer primer“ a doplnená „DEPC treated water“ do objemu 11 μ l. Zmes sa opatrne premiešala pipetou a stočila sa v centrifúge. Inkubovalo sa to pri teplote 70 °C, po dobu 5 min a následne sa to zachladilo.

Počas inkubácie sa pripravila zmes B, kde pre jednu vzorku bolo potrebné zmiešať 4 μ l 5x reakčného pufru, 2 μ l 10mM dNTP mix, 1 μ l „RiboLock RNAsa inhibitor“ (20 U/ μ l) a 2 μ l „M-MuLV Reverse Transcriptase“ (20 U/ μ l).

Takto vzniknutá zmes B sa pridala k zmesi A a opatrne sa premiešala. Inkubovalo sa 5 min pri pokojovej teplote a následne 60 min pri 37°C. Reakcia sa ukončila zahriatím na 70 °C, po dobu 5 min.

5.4.3 PCR amplifikácia jednoreťazovej cDNA

Vzorky z predchádzajúceho kroku sa riedili podľa pomeru 1:5 pre cieľovú mRNA amplifikáciu (pridalo sa 80 μ l DEPC k 20 μ l zmesi A+B) a v pomere 1:40 pre amplifikáciu housekeepingového génu (195 μ l DEPC vody a 5 μ l zriedeného vzorku)

Následne sa pripravila zmes C, kde pre 1 vzorku bolo potrebné zmiešať 25 μ l „SYBR Green“, 1 μ l „Forward primer“ pre cieľovú mRNA (10 mM), 1 μ l „Reverse primer“ pre cieľovú RNA (10 mM) a 13 μ l vody.

Do doštičky pre LightCycler 96 sa napipetovala zmes C o objeme 20 μ l. (v duplikátoch pre každú vzorku). Následne bolo do príslušných jamôk pipetované 5 μ l nariadeného vzorku zmesi A+B pre cieľovú mRNA. Doštička sa prikryla fóliou a premiešala sa na ThermoMixeru pri laboratórnej teplote. Analýza sa vykonala pomocou LightCycler 96 prístroja.

5.5 Stanovenie množstva proteínu metódou *Western blot*

Western blot je základnou metódou na identifikáciu a kvantifikáciu špecifického proteínu komplexnej zmesi extrahovanej z buniek alebo tkaninového lyzátu (Meftahi a kol., 2021). Pri tejto technike sa zmes proteínov oddeľuje na základe molekulovej hmotnosti, pomocou gélovej elektroforézy. Takto rozdelené proteíny sú následne pomocou Western blotu prenesené na membránu, ktorá sa následne inkubuje s protilátkami pre špecifický proteín. Nenaviazaná protilátka sa premyje a ponechá sa len naviazaná protilátka na špecifický proteín. Naviazané protilátky sa potom vizualizujú (Kim, 2017).

5.5.1 Príprava bunkového lyzátu a stanovenie koncentrácie bielkovín pomocou BCA stanovenia

Proteínový test BCA patrí medzi najpoužívanejšie testy na stanovenie koncentrácie bielkoviny. Jeho hlavné výhody sú rýchla doba stanovenia, široký rozsah linearita a kompatibilita s detergentami.

Bunkový lyzát v Eppendorf skúmavkách bol uložený v mrazáku pri teplote -20°C . Po rozmrazení sa lyzát homogenizuje pomocou striekačky a injekčnej ihly nasatím a vysatím (celkom 10x) a nechá sa 20 min inkubovať na ľade. Následne sa lyzát vložil do

predchladenej centrifúgy a centrifugoval pri teplote 4°C na 10 minút. Supernatant sa preniesol do novej skúmavky a zmrazil sa jeho objem.

V bunkovom lyzáte bola stanovená koncentrácia proteínov pomocou metódy s kyselinou bicínchoninovou (BCA). Prvý krok zahŕňa redukciu Cu^{2+} na Cu^{1+} proteínom v alkalickom prostredí. Táto reakcia sa označuje ako „Biuretová“. V druhom kroku reaguje Cu^{1+} s dvoma molekulami kyseliny bicínchononovej (BCA) za vzniku fialovo zafarbeného produktu. Tento komplex vykazuje absorbciu pri vlnovej dĺžke 562 nm a je priamo úmerný s koncentráciou bielkoviny (Frasco a kol., 2019).

Pre každú vzorku bolo v duplikátoch pripravené 50 μl 10x zriedeného vzorku. Následne sa pripravili roztoky pre stanovenie kalibračnej krivky podľa tabuľky nižšie.

Tabuľka 2 Riedenie kalibračných roztokov

	Koncentrácia	1% roztok BSA	Destilovaná voda
1.	0 $\mu\text{g/ml}$	0 μl	500 μl
2.	200 $\mu\text{g/ml}$	10 μl	490 μl
3.	400 $\mu\text{g/ml}$	20 μl	480 μl
4.	600 $\mu\text{g/ml}$	30 μl	470 μl
5.	800 $\mu\text{g/ml}$	40 μl	460 μl
6.	1000 $\mu\text{g/ml}$	50 μl	450 μl

V ďalšom kroku sa pripravil pracovný roztok C, ktorý vznikol zmiešaním roztoku A (kyselina bicínchoninová, uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný v 0,1M NaOH) a roztoku B (4% (w/v) pentahydrát síranu meďnatého) v pomere 50:1.

Následne sa do každej jamky v 96-jamkovej doštičke napipetovalo 200 μl pracovného roztoku C a 10 μl kalibračného roztoku BCA alebo zriedeného vzorku. Doštička sa inkubovala pri teplote 37 °C, po dobu 30 minút za konštantného trepania. Po inkubácii sa absorbcia merala na spektrofotometri Tecan Infinite M200 pri vlnovej dĺžke 562 nm.

Pri vyhodnocovaní sa odčítal priemer hodnôt absorbcie slepého vzorku od priemernej hodnoty absorbcie príslušného vzorku. Pomocou rovnice kalibračnej krivky sa následne vypočítala koncentrácia bielkoviny vo vzorke.

5.5.2 Elektroforéza proteínu na polyakrylamidovom géle

Podľa obsahu bielkoviny sa vzorky nariadili tak, aby výsledná koncentrácia bielkoviny vo vzorku bola 1 µg/µl, pomocou 4xSDS pufru a lyzačného pufru s roztokom inhibítorov proteáz.

Podľa nasledujúcich tabuliek (Tabuľka 3 a Tabuľka 4) sa pripravil separačný a zaostrovací gél.

Tabuľka 3 Zloženie separačného gélu

	10% - 2gely; 1,5 mm (hrúbka gelu)
Redestilovaná voda	8,1 ml
Pufr 1,5M Tris-HCl pH 8,8	5 ml
Roztok AA+bis AA	6,7 ml
10% SDS	0,2 ml
——iniciácia polymerácie——	
10% roztok APC	200 µl
TEMED	16 µl

Tabuľka 4 Zloženie zaostrovacieho gélu

	15% - 2 gely; 1,5 mm (hrúbka gelu)
Redestilovaná voda	6,1 ml
Pufr 0,5M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml
Roztok AA+bis AA	1,3 ml
10% SDS	0,1 ml
——iniciácia polymerácie——	
10% roztok APC	200 µl
TEMED	16 µl

Pripravil sa stojan, sklo, sklo so spacerem, spony a hrebeň. Skla sa priložili k sebe, spojili sponami a položili so nalievacieho stojanu. Pripravený roztok separačného gélu bol ihneď pipetou naliati medzi skla do výšky cca 4,5 cm od spodného okraja. Následne sa prevrstvilo cca 200 µl isobutanolu nasýteným vodou a nechal polymerovať 60 minút.

Po uplynutí 60 min sa isobutanol opatrne odstránil a následne sa pomocou pipety nalial medzi skla zaostrovací roztok až po horný okraj. Opatrne sa vsunul hrebeň a nechalo sa to opäť polymerovať 30 min.

Po polymerácii boli gély vytiahnuté zo stojanu, opláchnuté vodou, bol vytiahnutý hrebeň a gély boli následne vložené do pripraveného stojanu na elektroforézu. Do

vnútorného elektródového priestoru bol naliaty elektródový pufr tak aby bol celý gél ponorený. Do vonkajšieho elektródového priestoru sa naliat elektródový pufr, tak aby hladina bola vždy nad elektródovým drôtom.

Pred nanesením na gél boli vzorky 5 min povarené v termobloku; pri teplote 95 °C. Do prvej jamky sa napipetoval molekulárny štandard o objeme 5 µl. Do ďalších jamôk sa napipetovali vzorky o objeme 30 µl. Po napipetovaní sa stojan dal na ľad spustila sa elektroforéza pri konštantnom napätí 120 V.

5.5.3 Western blot a chemiluminiscenčná detekcia proteínu

Pre imunoblotting sa pripravil blotovací pufr. Navázilo sa 6,06 g TRIS (25mM) a 28,8 g glycínu (192 mM). Navážená zmes sa rozpustila v 500 ml redestilovanej vody a pridal sa metanol v objeme 400 ml. Po rozpustení sa roztok preliat do odmernej banky a doplnil vodou do 2000 ml. Vzniknutý blotovací pufr sa preliat do fľaše a uchovával sa v chladničke.

Po dokončení elektroforézy bol odstránení zaostrovací gél a zo separačného gélu bola odstránená dolná časť s modrým farbivom.

Pre immunoblotting je potrebné aktivovať PVDF membránu, ktorá sa namočila do metanolu na 5 min. Po aktivácii sa membrána spolu so separačným gélom vložila do plastovej krabičky s viečkom a zaliala blotovacím pufrom. Do ďalšej plastovej krabičky sa vložil filtračný papier a blotovacia hubka a opäť sa to zalialo blotovacím pufrom. Všetko bolo ponechané v blotovacom pufri 20 min.

Po ubehnutí 20 min sa vytvoril blotovací sendvič, ktorý pozostával z 1 blotovacej hubky, na tú sa položil filtračný papier, gél, PVDF membrána, filtračný papier a blotovacia hubka. Blotovací sendvič sa zavrel a vložil do blotovacieho nástavca.

Blotovací nástavec sa vložil do vani a do voľného priestoru sa vložilo ledítko. Aby nedochádzalo k prílišnému zahrievaniu, vaňa sa vložila do ľadového kúpeľa. Viečko s káblami sa pripojilo na vaňu a pripojilo sa k zdroju. Prenos proteínov z gélu na PVDF membránu prebiehal po dobu 1,5 hod pri konštantnom napätí 100V a prúde 0,25A.

Membrána sa opatrne preniesla pinzetou do plastovej misky s viečkom. Do krabičky sa naliata destilovaná voda a kývavým pohybom sa membrána opláchla. Na

membránu sa potom nalialo 25 ml 5% roztoku mlieka v TBST pufru a plastová miska sa položila na kývačku a nechalo sa blotovať 2 hod.

Po uplynutí doby sa mlieko zlialo a membrána sa opláchla destilovanou vodou. Nasledovalo pridanie primárnej protilátky (zásobná protilátky zriedená podľa inštrukcií výrobcu 5% BSA, či 5% mliekom v TBST pufru). Membrána s primárnou protilátkou sa inkubovala cez noc pri teplote 4 °C. Druhý deň sa protilátka odstránila a membrána sa opláchla TBST pufrom 4x po dobu 5 min.

Po opláchnutí sa pridala sekundárna protilátka (zásobná protilátka zriedená podľa inštrukcií výrobcu 1:10 000 – 1:20 000 s 1% BSA v TBST pufru). Inkubácia membrány trvala 2 hod. Nasledovalo opláchnutie TBST pufrom 4x po dobu 5 min.

Pre chemiluminiscenčnú detekciu sa použil „Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent“, ktorý vznikol zmiešaním roztoku A („luminol solution“) a roztoku B („peroxide solution“) v pomere 1:1.

Z plastovej krabičky sa vylial prebytočný TBST pufr a na povrch membrány sa napipetoval daný substrát v objeme cca 1,5 ml na membránu a nechalo sa to inkubovať 5 min. Po inkubácii sa membrány nechala odkvapkať a bola vložená do prístroja Azure c600. Kvantifikácia sa stanovila pomocou programu AzureSpot.

5.6 In vivo experiment

5.6.1 Implantácia buniek do modelového organizmu

Na tento experiment boli implantované bunkové línie U87MG a U87MG-STAT3-KO. Pripravené bunkové suspenzie boli implantované subkutánne podľa rozpisu. Aplikovala sa suspenzia v PBS alebo v kolagéne. Bunky boli implantované do 7 nu-nu myší. Testované modelové organizmy boli rozdelené do 4 skupín podľa nasledujúcej tabuľky nižšie.

Tabuľka 5 Rozdelenie nu-nu myší do skupín a typy implantovaných buniek

Skupina	Počet myší	Počet vpichov	Typ buniek	Koncentrácia buniek na 100µl	Bunky zriedené v:
1.	3	2x	U87MG	1 mil.	PBS
2.	2	2x	U87MG	1 mil.	Kolagén (Geltrex)
3.	1	2x	U87MG STAT3	1 mil.	PBS
4.	1	2x	U87MG STAT3	1 mil.	Kolagén (Geltrex)

Nádory zo všetkých skupín sa nechali rásť po dobu max. 4 týždňov (v závislosti od zdravotného stavu myší a veľkosti nádoru). Rast nádorov bol sledovaný 2x do týždňa.

Po usmrtení boli cieľové tkanivá odobrané do predom pripravených skúmaviek a podrobené ďalším analýzám. Vzorky pre histopatologickú analýzu boli odobrané do 4% formalínu, vzorky pre ďalšiu analýzu RNA a proteínov boli odobrané do čistých 2ml skúmaviek a uchované pri -80°C.

5.6.2 Imunohistochemická analýza nádorov

Odobraná časť nádoru bola fixovaná v 4% formaldehide a následne boli spracované na parafínové bločky. Tieto bločky sa narezali na tenké plátky o veľkosti 2 až 3 µm. Ako primárne protilátky sa použila STAT3 a taktiež sa použila protilátka pre proliferačný marker ki67. Naviazanie protilátok na špecifické antigény sa vykonala na prístroji Ventana Benchmark Ultra machine. Po naviazaní protilátky, boli tkanivové rezy nafarbené kontrastnou látkou hematoxylínom a sklíčka boli analyzované pomocou svetelného mikroskopu.

5.6.3 Spracovanie nádorov pre analýzu RNA

Nádory z nu-nu myší sa najskôr rozstrihali pomocou nožníc na malé kúsky. Nádory sa ďalej homogenizovali pomocou prístroja TissueLyser LT pridaním 200 µl TRISOL reagentu a kovovej guľičky. Vzniknutý homogenát sa nechal odstáť pri pokojovej teplote 5min.

K izolácii RNA z nádoru sa použil komerčný kit „GeneAll RNA Purification System“. V prvom kroku sa k homogenátu pridalo 200 µl chloroformu. Zmes sa premiešala a 2 min sa inkubovala pri pokojovej teplote. V druhom kroku sa zmes

centrifugovala pri otáčkach 12 000 g a teplote 4°C na 15 min. Vrchná (vodná) vrstva sa odobrala do čistej skúmavky. Následne sa do skúmavky pridal rovnaký objem RBI pufru a zmes sa premiešala.

Zmes sa preniesla na kolónku (max. 700 µl) a centrifugovalo sa to pri 10 000 g, teplote 4°C, po dobu 30 s. Po centrifugácii sa na kolónku pridal SWI pufr v objeme 500 µl. Nasledovala ďalšia centrifugácia pri 10 000 g, teplote 4°C, po dobu 30 s.

Potom sa pridalo 500 µl RNW pufru a opäť prebehla centrifugácia pri 10 000 g, teplote 4°C, po dobu 30 s. A nakoniec ešte ďalšia 1 min pre vylúčenie zbytkovej tekutiny.

Pre elúciu sa RNA kolónky preniesli do čistej 1,5 ml „RNAsa-free“ mikroskúmavky. Priamo na kolónku sa pridalo 50 µl „RNAsa-free water“ a nechalo sa to stáť 1 min. Po uplynutí prebehla posledná centrifugácia pri 10 000 g a teplote 4°C, po dobu 1 min. Koncentrácia RNA sa zmerala pomocou prístroja NanoDrop 200. Ďalšie spracovanie vzoriek a samotná analýza prebehla, ako je popísane v predchádzajúcich kapitolách.

5.6.4 Spracovanie nádorov pre analýzu proteínov

K nádoru z nu-nu myši sa pridala kovová guľička a 100 µl lyzačného pufru. Nádory sa homogenizovali pomocou TissueLyser LT prístroja. Potom sa vzorky homogenizovali ešte pomocou injekčnej striekačky s ihlou (10x opakovanie nasat' a vypustiť).Vzniknutý homogenát sa nechal 20 min stáť na ľade a následne sa centrifugoval pri 13 000 rpm a 4°C po dobu 10min.

Supernatant sa odobral do čistých 1,5 ml skúmaviek. Tieto vzorky podobne ako pri *in vitro* analýze sa použili pre stanovenie koncentrácie bielkoviny pomocou Western Blot metódy. Ďalšie spracovanie vzoriek a samotná analýza prebehla, ako je popísane v predchádzajúcich kapitolách

5.7 Štatistická analýza

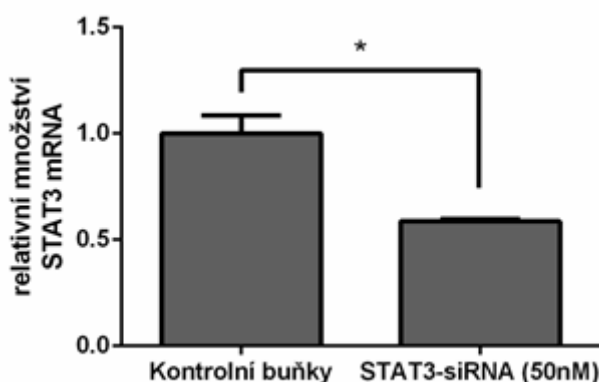
Výsledky merania sú vyjadrené ako priemerná hodnota \pm SD z aspoň dvoch nezávislých meraní. Štatistická analýza sa vykonala pomocou Two-Way ANOVA testu. Štatistická významnosť sa označila ako * a odpovedá hladine významnosti $p < 0,05$. K analýze bol použitý program GraphPad Prism 6.0.

6 VÝSLEDKY

6.1 Hodnotenie efektivity transfekcie pomocou STAT3-siRNA u buniek U87MG

6.1.1 Hodnotenie efektivity na úrovni mRNA

Hodnotenie účinnosti transfekcie pomocou STAT3-siRNA bolo vykonané na úrovni mRNA, a to stanovením relatívneho množstva STAT3 mRNA pomocou metódy RT-PCR. Pre toto stanovenie boli použité bunky U87MG, ktoré boli transfekované pomocou siRNA proti STAT3 o koncentrácii 50 nM po dobu 24h.



Obrázok 11 Stanovenie relatívneho množstva STAT3 mRNA pomocou metódy RT-PCR u bunkovej línie U87MG transfekovaných pomocou siRNA. * $p < 0,05$ vs neovplyvnená kontrola

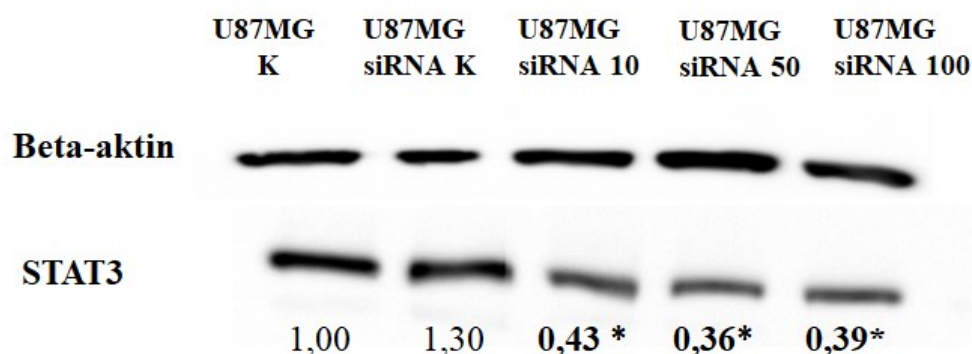
Na vyššie uvedenom grafe je znázornené relatívne množstvo STAT3 mRNA u buniek kontrolných (netransfekovaných), a u buniek transfekovaných pomocou STAT3-siRNA.

Výsledky ukázali, že po transfekcii buniek U87MG pomocou STAT3-siRNA dochádzalo k signifikantnému poklesu relatívneho množstva STAT3 mRNA v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou. Tento pokles bol štatisticky významný, čo potvrdilo úspešnosť vykonanej transfekcie.

6.1.2 Hodnotenie efektivity transfekcie na úrovni proteínov

Hodnotenie úspešnosti transfekcie proti STAT3 ďalej prebehlo na úrovni proteínov pomocou metódy Western blot. Transfekcia bola opäť vykonaná u buniek

U87MG pomocou STAT3-siRNA o koncentráciách 10 nM, 50 nM a 100 nM a pomocou kontrolnej siRNA o koncentrácii 100 nM.



Obrázok 12 Stanovenie expresie markeru STAT3 na úrovni proteínov pomocou metódy Western blot u bunkovej línie U87MG transfekovanej pomocou siRNA.

* $p < 0,05$ vs neovplyvnená kontrola

U buniek transfekovaných pomocou STAT3-siRNA dochádzalo k zníženiu hladiny proteínu STAT3, tento pokles bol štatisticky významný u všetkých testovaných koncentráciách oproti neovplyvniteľnej kontrole. K najväčšiemu zníženiu hladiny STAT3 dochádzalo pri použití STAT3-siRNA o koncentrácii 50 nM, čo naznačuje, že táto koncentrácia bola najúčinnnejšia pri potlačovaní expresie proteínu STAT3 v bunkách.

Použitím kontrolnej siRNA nedochádzalo k štatisticky významným zmenám hladiny STAT3 u buniek U87MG.

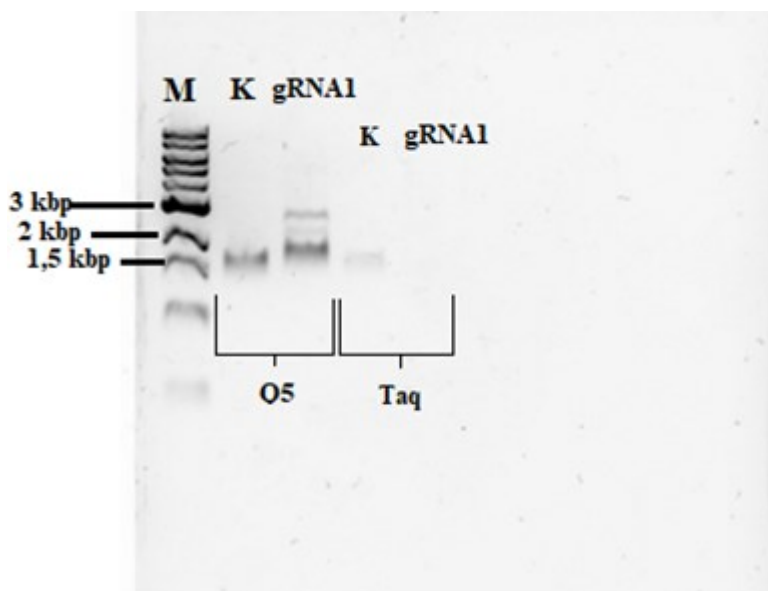
6.2 Účinnosť transfekcie pomocou STAT3 Human Gene

Knockout (CRISPR) u buniek U87MG

Úspešnosť transfekcie a jej hodnotenie závisí od mnohých faktorov, ako sú typ bunky, použitá CRISPR metóda a ďalšie. Preto je dôležité pri hodnotení účinnosti transfekcie použiť viacero rôznych metód, ktoré spoločne poskytujú čo najpresnejšie výsledky. Hodnotenie úspešnosti STAT3-knockoutu prebiehalo u buniek U87MG transfekovaných pomocou STAT3 Human Gene Knockout kitu za využitia dvoch vodiacich sekvencií RNA – gRNA1 a gRNA2.

6.2.1 Hodnotenie účinnosti transfekcie na úrovni DNA

Hodnotenie úspešnosti transfekcie na úrovni DNA prebehlo pomocou metódy PCR na agarázovom géle. Pre prvotnú optimalizáciu metódy boli použité bunky U87MG transfekované pomocou vodiacej sekvencie RNA označené ako gRNA1. Optimalizácia prebiehala za využitia dvoch typov polymeráz, Q5 a Taq polymeráza.



Obrázok 13 Hodnotenie účinnosti transfekcie metódou CRISPR-Cas9 na úrovni DNA pomocou PCR metód

M - marker od spoločnosti Neb; K- kontrolne bunky, netransfekované; gRNA1- transfekované bunky pomocou vodiacej sekvencie gRNA1; gRNA2- transfekované bunky pomocou vodiacej sekvencie gRNA2

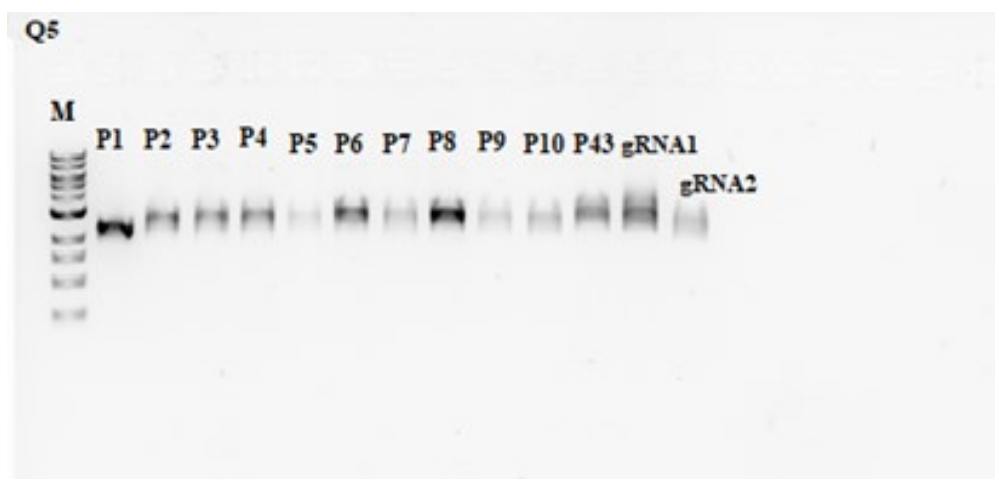
Pre optimalizáciu metodiky a overenie účinnosti knockoutu sa použili netransfekované bunky („K“) a bunky transfekované a po vyselektovaní knockoutovaných buniek („gRNA1“). Boli navrhnuté špecifické primery pre danú oblasť (odpovedajúcej sekvencii kódovanej gRNA1) a pre správnu optimalizáciu metódy sa použili 2 typy polymeráz (Q5 a Taq polymeráza). V prvom stĺpci s označením M sa nachádza rebríček od spoločnosti Neb. V druhom (K) môžeme pozorovať amplifikovaný fragment PCR o veľkosti 1 484 kbp, ktorý vykazuje pôvodnú veľkosť, teda netransfekovanú sekvenciu. V stĺpci gRNA1 sa nachádza fragment o veľkosti 3 969 kbp, ktorého veľkosť svedčí o začlenení vodiace sekvencie gRNA1, a knockoutu genu pre STAT3. Obe tieto výsledky sú viditeľné pri použití Q5 polymerázy.

Pri použití Taq polymerázy je viditeľný amplifikovaný fragment pôvodnej sekvencie u kontrolných vzoriek, ale nebolo možné pozorovať žiadny výsledok u vzoriek

získaných z transfekovaných buniek. Pre tento experiment tak nebola Taq polymeráza vhodná a pre ďalšie experimenty bola použitá Q5 polymeráza.

Už vďaka prvotnému overeniu a optimalizácii bolo možné potvrdiť knockout génu pre STAT3 na úrovni DNA prítomnosťou fragmentu o väčšej veľkosti u testovaného vzorku.

Následne sa po prvotnom overení, stanovovala účinnosť transfekcie postupne získaných buniek z jednotlivých subkultivácií („P1-P10“), ktoré boli transfekované pomocou vodiacej sekvencie gRNA1, výsledné bunkové línie získané transfekciou pomocou vodiacej sekvencie gRNA1 („gRNA“), buniek transfekovaných pomocou vodiacej sekvencie gRNA2 („gRNA2“) oproti kontrolným bunkám („P43“), kde sa jedná o bunky U87MG pred transfekciou. Pri gRNA2 bunkách sa použila vodiaca sekvencia gRNA2, kde z nich bola použitá len jedna vzorka z dôvodu, že v médiu rástli pomaly a po použití puromycínu neostalo dostatočné množstvo buniek. Pre toto hodnotenie sa použila Q5 polymeráza.



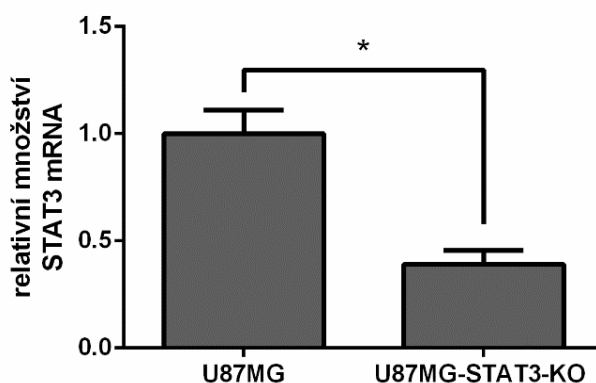
Obrázok 14 Hodnotenie účinnosti transfekcie metódou CRISPR-Cas9 na úrovni DNA pomocou PCR metódy

M - marker od spoločnosti Neb; P1-P10 bunky z jednotlivých subkultivácií; P43- kontrolne bunky, netransfekované; gRNA1- transfekované bunky pomocou vodiacej sekvencie gRNA1; gRNA2- transfekované bunky pomocou vodiacej sekvencie gRNA2

Na obrázku vyššie bolo vykonané hodnotenie účinnosti u viacerých postupne získaných vzoriek (jednotlivé subkultivácie a výsledné bunkové kultúry vzniknuté transfekciou vodiacich sekvencií gRNA1 a gRNA2), tieto výsledky sú nejednoznačné a vyžadujú tak ďalšiu optimalizáciu metodiky.

6.2.2 Hodnotenie účinnosti transfekcie na úrovni mRNA

Hodnotenie účinnosti transfekcie pomocou STAT3 Human Gene Knockout (CRISPR) na úrovni mRNA, bolo vykonané stanovením relatívneho množstva STAT3 mRNA pomocou metódy RT-PCR. Pre toto stanovenie boli použité bunky U87MG-STAT3-KO (knockoutovaná pomocou sekvencie gRNA1), ktoré boli porovnané s normálnou bunkovou líniou U87MG.

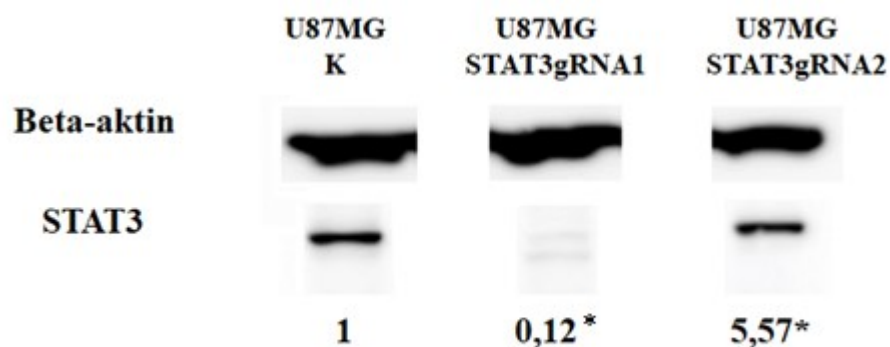


Obrázok 15 Stanovenie relatívneho množstva STAT3 na úrovni mRNA pomocou metódy PCR bunkovej línie U87MG u transfekcie pomocou CRISPR-Cas9. * $p < 0,05$ vs neovplyvnená kontrola

U novo vytvorenej bunkovej línie U87MG-STAT3-KO dochádza k poklesu hladiny STAT3 mRNA v porovnaní s netransfekovanými bunkami U87MG. Toto zníženie relatívneho množstva mRNA je u buniek U87MG-STAT3-KO štatisticky významné

6.2.3 Hodnotenie účinnosti transfekcie na úrovni proteínov

Hodnotenie účinnosti transfekcie pomocou STAT3 Human Gene Knockout (CRISPR) ďalej prebehlo na úrovni proteínov pomocou metódy Western blot. Pre toto stanovenie boli použité bunky U87MG-STAT3-KO (knockoutované pomocou sekvencie gRNA1 a gRNA2), ktoré boli porovnané s normálnou bunkovou líniou U87MG.



Obrázok 16 Stanovenie expresie markeru STAT3 na úrovni proteínov pomocou metódy Western blot u bunkovej línie U87MG transfekovanej pomocou CRISPR-Cas9. * $p < 0,05$ vs neovplyvnená kontrola

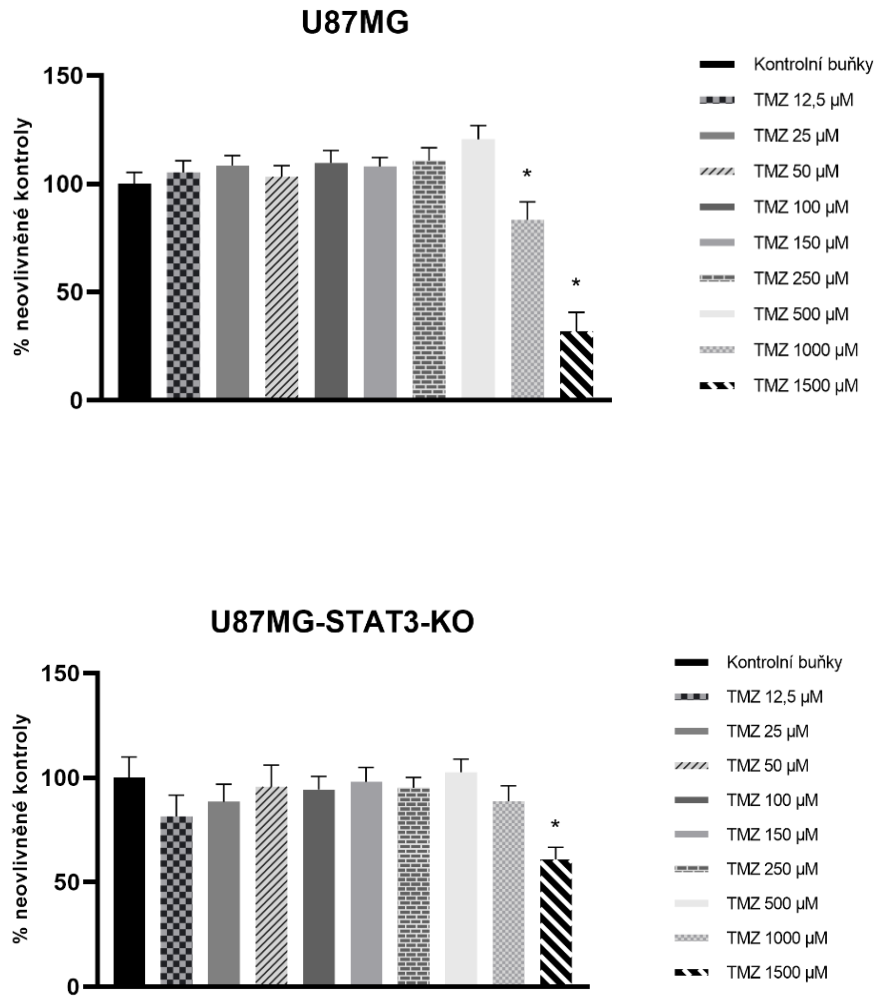
Na úrovni proteínov bolo možné pozorovať zníženie hladiny STAT3 u buniek transfekovaných pomocou sekvencie vodiacej RNA označenej ako gRNA1, kde dochádzalo k štatisticky významnému zníženiu proteínu STAT3 v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou.

U buniek transfekovaných pomocou vodiacej sekvencie RNA označenej ako gRNA2 dochádzalo naopak k štatisticky významnému zvýšeniu hladiny proteínu STAT3.

Na základe jednotlivých stanovení bolo možné potvrdiť vytvorenie knockoutovanej bunkovej línie U87MG-STAT3-KO, ktorá vznikla transfekciou pomocou metódy CRISPR-Cas9 za pomoci vodiacej sekvencie RNA označenej ako gRNA1 z pôvodnej bunkovej línie U87MG.

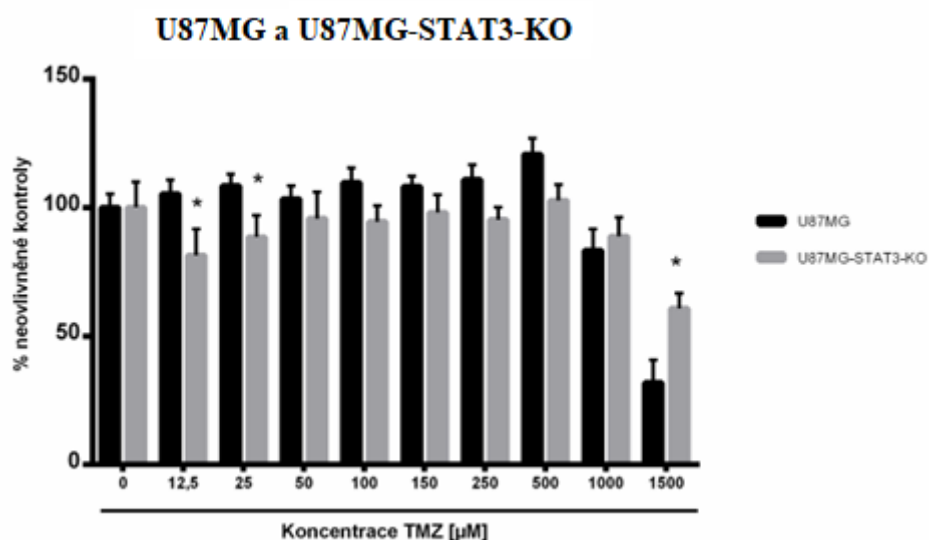
6.3 Vplyv TMZ na životaschopnosť buniek U87MG a U87MG-STAT3-KO

Vplyv TMZ na proliferáciu buniek bol testovaný pomocou metódy WST-1. Proliferácia buniek GBM bola stanovovaná na bunkových líniiach U87MG a U87MG-STAT3-KO. Bunky boli po dobu 48 hod vystavené rôznym koncentráciám liečiva TMZ (12,5 μM ; 25 μM ; 50 μM ; 100 μM ; 150 μM ; 250 μM ; 500 μM ; 1 000 μM ; 1 500 μM).



Obrázok 17 Stanovenie vplyvu TMZ na proliferáciu buniek U87MG a U87MG-STAT3-KO metódou WST-1. * $p < 0,05$ vs. neovplyvnená kontrola

Pri bunkách U87MG pozorujeme štatisticky významné zníženie životnosti buniek po ovplyvnení koncentraciami TMZ 1 000 µM a 1 500 µM.. U novo vytvorenej bunkovej línie U87MG-STAT3-KO môžeme pozorovať štatisticky významné zníženie životnosti buniek až pri ovplyvnení TMZ o koncentrácii 1 500 µM. U buniek U87MG-STAT3-KO sme však pozorovali zvýšenú citlivosť k podaniu TMZ, predovšetkým pri ovplyvnení nižšími koncentraciami TMZ, preto sme pristupovali k porovnaní citlivosti oboch bunkových línií k TMZ.



Obrázok 18 Porovnanie vplyvu TMZ na proliferáciu buniek U87MG a U87MG-STAT3-KO metódou WST-1. * $p < 0,05$ vs. U87MG

Na vyššie uvedenom grafe vidíme porovnanie životnosti dvoch bunkových línii, U87-MG a U87MG-STAT3-KO, po ovplyvnení chemoterapeutickým liečivom TMZ. Po ovplyvnení nižšími koncentraciami TMZ (12,5 µM a 25 µM) bolo možné pozorovať zvýšený efekt na životnosť buniek u U87MG-STAT3-KO, pričom tento rozdiel bol oproti efektu na bunky U87MG štatisticky významný. Naopak pri ovplyvnení vyššími koncentraciami (1 500 µM) bolo možné pozorovať znížený efekt na životnosť buniek U87MG-STAT3-KO, a tento rozdiel oproti efektu na životnosť buniek U87MG bol taktiež štatisticky významný.

6.4 Implantácia buniek U87MG a U87MG-STAT3-KO

do modelového organizmu

6.4.1 Porovnanie rastu nádoru a proliferačného indexu Ki67 u nádorov odvodených z U87MG a U87MG-STAT3-KO

Pre implantáciu buniek do modelového organizmu (nu-nu myši) sa použili bunkové línie U87MG a U87MG-STAT3-KO, ktoré boli zriedené v PBS a v kolagéne. Bunkové línie boli implantované do nu-nu myši a nádory sa nechali rásť po dobu 4 týždňov.

K usmrtení nu-nu myši došlo po 4 týždňoch a nádory boli zväžené a zaznamenané v tabuľke nižšie.

Tabuľka 6 Priemery výsledných veľkostí nádoru po implantácii bunkových línií U87MG a U87MG-STAT3-KO implantovaných v PBS a kolagéne do nu-nu myši; * $p < 0,05$ vs U87MG (PBS), # $p < 0,05$ vs U87MG (kolagén)

	priemerná váha [g]	SD [g]	počet nádorov
U87MG (PBS)	0,398	±0,234	n = 6
U87MG (kolagen)	0,955*	±0,309	n = 4
U87MG-STAT3-KO (PBS)	0,16*	±0,040	n = 2
U87MG-STAT3-KO (kolagén)	0,425#	±0,295	n = 2

Na základe našich výsledkov bolo možné pozorovať zvýšené hmotnosti nádoru po jeho implantovaní v kolagéne, kedy dochádzalo k zisku nádoru o štatisticky významne vyššej priemernej hmotnosti.

Veľkosť nádoru buniek vzniknutých po implantácii U87MG-STAT3-KO bolo štatisticky významne znížená oproti nádorom vzniknutých z normálnych buniek U87MG, a to pri oboch typoch použitého implantačného prostredia (PBS a kolagénu)

Následne sa stanovovala hodnota Ki67, čo je antigén, ktorý sa exprimuje v bunkách v aktívnej fáze bunkového cyklu. Keďže rýchlosť delenia buniek môže byť dôležitým ukazovateľom nádorového rastu a metastáz, stanovovanie hodnoty ki67 sa používa na určenie proliferačnej aktivity, tzv. proliferačného indexu.

Pri detekcii Ki67 sa sledovalo množstvo antigénu v jadrách buniek. Pozitívne hodnoty sú potom vyjadrené ako percentuálny podiel Ki67 pozitívnych buniek z celkového počtu nádorových buniek. Čím vyššie percento Ki67, tým väčšia pravdepodobnosť, že sa nádor bude rýchlejšie deliť.

Tabuľka 7 Stanovenie proliferáčného faktoru Ki67 u bunkových línii U87MG a U87MG-STAT3-KO implantovaných v PBS a v kolagéne (výsledok je uvedený ako pozitivita vzorku v percentách)

	proliferáční marker Ki67 [%]
U87MG (PBS)	80
U87MG (kolagen)	70
U87MG-STAT3-KO (PBS)	95
U87MG-STAT3-KO (kolagen)	90

U nádorov vzniknutých z oboch dvoch implantovaných línii, U87MG a U87MG-STAT3-KO nedochádzalo k významným zmenám v hodnotách proliferáčného markeru Ki67 v závislosti na použítom implantačnom prostredí (PBS a kolagén)

U nádorov vzniknutých po implantácii buniek U87MG-STAT3-KO sme mohli pozorovať zvýšenú hodnotu proliferáčného markeru Ki67, a teda proliferáciu týchto nádorov, toto zvýšenie však nie je štatisticky významné.

6.4.2 Imunohistochemické stanovenie hladiny STAT3 u nádorov odvodených z buniek U87MG a U87MG-STAT3-KO

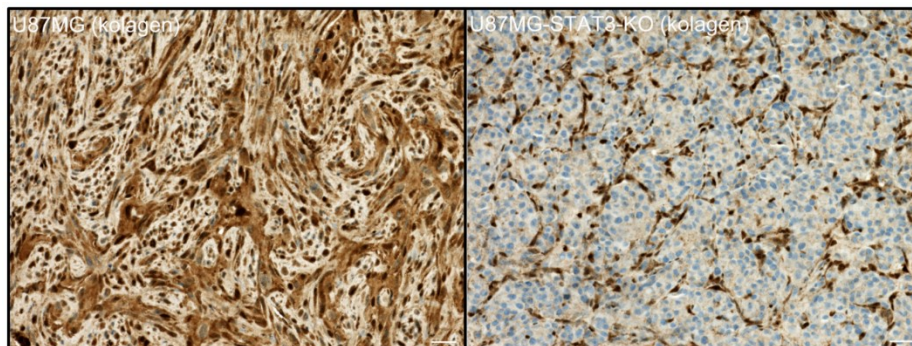
U nádorov získaných po implantácii buniek U87MG a U87MG-STAT3-KO do modelového organizmu bola stanovená tiež hladina markeru STAT3 pomocou imunohistochemickej analýzy.

Tabuľka 8 Imunohistochemické stanovenie hladiny STAT3 u nádorov odvodených z buniek U87MG a U87MG-STAT3-KO implantovaných v PBS a kolagéne (výsledok je uvedený ako pozitivita vzorku v percentách)

	STAT3 pozitivita [%]
U87MG (PBS)	80
U87MG (kolagen)	90
U87MG-STAT3-KO (PBS)	30
U87MG-STAT3-KO (kolagen)	10

Na výsledkoch z imunohistochemickej analýzy sa potvrdilo, že sa podarilo vykonať STAT3-knockout u bunkovej línie U87MG. Navyše pri implantácii do modelového organizmu nedochádza k obnoveniu expresie tohto transkripčného faktoru.

Zároveň sme nepozorovali žiadny významný vplyv použitého implantačného prostredia (PBS a kolagén) na hodnoty STAT3 pozitivity u vzniknutých nádorov.

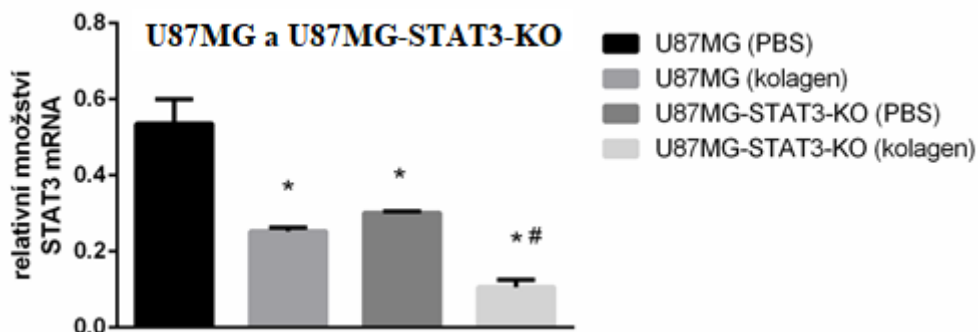


Obrázok 19 Snímky z imunohistochemickej analýzy buniek U87MG v kolagéne a U87MG-STAT3-KO v kolagéne (zväčšenie 200x, mieridlo 50 μ m)

Zníženú expresiu STAT3 u nádorov vzniknutých po implantácii U87MG-STAT3-KO do modelového organizmu môžeme ďalej pozorovať na ilustračných mikroskopických fotografiách získaných behom imunohistochemickej analýzy. U nádoru vzniknutého z buniek U87MG-STAT3-KO dochádzalo predovšetkým k farbeniu prerastajúceho tkaniva myši, ale nedochádzalo k samotnému farbeniu vzniknutého nádoru.

6.4.3 Stanovenie relatívneho množstva STAT3 mRNA

U nádorov odobraných po ukončení experimentu sa stanovovalo relatívne množstvo STAT3 mRNA pomocou metódy RT-PCR. Stanovenie sa vykonalo u nádorov odvodených z buniek U87MG a U87MG-STAT3-KO implantovaných do nu-nu myši.



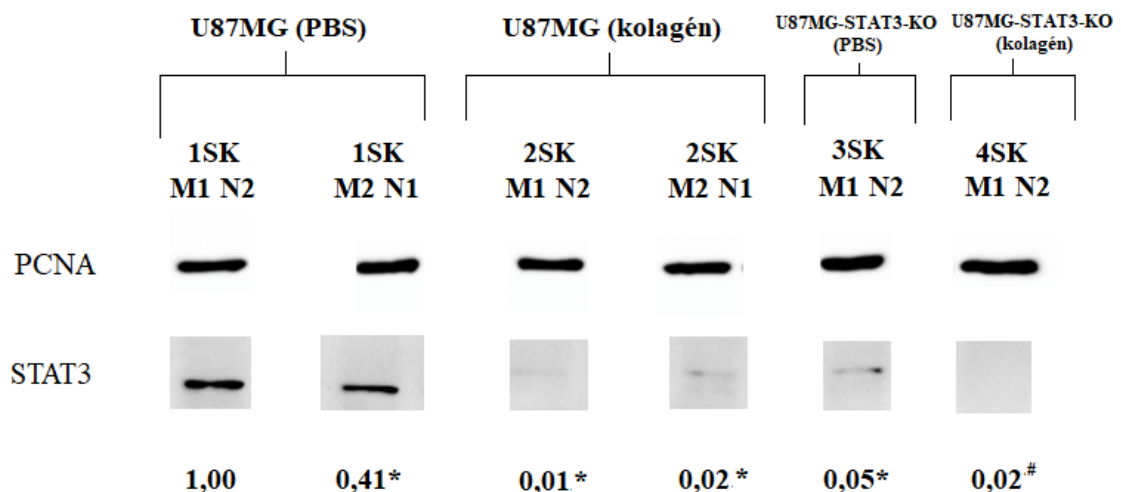
Obrázok 20 Stanovenie relatívneho množstva STAT3 na úrovni mRNA pomocou RT-PCR po implantácii bunkových línií U87MG a U87MG-STAT3-KO zriedených v PBS a kolagéne do nu-nu myši; * $p < 0,05$ vs U87MG (PBS), # $p < 0,05$ vs U87MG (kolagén)

Na vyššie uvedenom grafe sme pozorovali, že dochádzalo k zníženiu relatívneho množstva STAT3 mRNA u nádorov odvodených z buniek U87MG-STAT3-KO implantovaných v PBS oproti kontrolným nádorom odvodených z buniek U87MG implantovaných v PBS, a tento pokles bol štatisticky významný. Tiež u nádorov odvodených z buniek U87MG-STAT3-KO implantovaných v kolagéne dochádzalo k štatisticky významnému zníženiu relatívneho množstva STAT3 mRNA oproti kontrolným nádorom odvodených z buniek U87MG implantovaných v kolagéne.

K štatisticky významnému rozdielu tiež dochádzalo u relatívneho množstva STAT3 mRNA u nádoroch odvodených z buniek U87MG implantovaných v PBS a v kolagéne, a síce bolo možné pozorovať zníženie relatívneho množstva STAT3 mRNA pri implantácii v kolagéne oproti implantácii v prostredí PBS.

6.4.4 Stanovenie relatívneho množstva proteínu STAT3

U odobraných nádorov sa ďalej stanovovala hladina STAT3 proteínu pomocou metódy Western blot. Stanovenie bolo vykonané u nádorov odvodených z buniek U87MG a U87MG-STAT3-KO, implantovaných do nu-nu myší, ktoré boli rozdelené do skupín, 1SK (U87MG v PBS); 2SK (U87MG v kolagéne); 3SK (U87MG-STAT3-KO v PBS); 4SK (U87MG-STAT3-KO v kolagéne)



Obrázok 21 Stanovenie hladiny STAT3 na úrovni proteínov pomocou Western blotu u nádorov odvodených z bunkových línií U87MG a U87MG-STAT3-KO zriedených v PBS a kolagéne do nu-nu myší; * $p < 0,05$ vs U87MG (PBS), # $p < 0,05$ vs U87MG (kolagén)

Na vyššie uvedenom obrázku sme pozorovali, že dochádzalo k zníženiu hladiny proteínu STAT3 u nádorov odvodených z buniek U87MG-STAT3-KO implantovaných v PBS oproti kontrolným nádorom odvodených z buniek U87MG implantovaných v PBS, a tento pokles bol štatisticky významný. Tiež u nádorov odvodených z buniek U87MG-STAT3-KO implantovaných v kolagéne dochádzalo k štatisticky významnému zníženiu hladiny proteínu STAT3. K štatisticky významnému poklesu došlo aj u kontrolných buniek U87MG implantovaných v kolagéne oproti bunkám U87MG implanotavných v PBS, čo potvrdzuje predchádzajúce výsledky na úrovni mRNA.

7 DISKUSIA

Glioblastoma multiforme (GBM) patrí medzi najmalígnejšie a najviac vyskytujúci sa typ primárnych astrocytómov. Predstavuje približne viac ako 60% všetkých nádorov mozgu u dospelých ľudí. Napriek moderným liečebným postupom patrí medzi smrteľné ochorenia s veľmi zlou prognózou. Medián prežitia sa pohybuje okolo 1 roku (Hanif a kol., 2017).

Pri terapii glioblastómu sa používa niekoľko liečebných postupov, súčasným zlatým štandardom terapie je maximálna možná chirurgická resekcia, nasledovaná kombinovanou rádio- a chemoterapiou. Pri chemoterapii sa uplatňuje alkylačné chemoterapeutikum TMZ, veľkým problémom je však rezistencia GBM na túto liečbu. Jedným z cieľov súčasného výskumu je tak nachádzať nové potencionálne cieľové molekuly, ktoré vykazujú špecifické zmeny v GBM pre zlepšenie terapeutického úspechu možnou aplikáciou cielenej terapie. Existuje niekoľko štúdií, ktoré sa zaoberali možnosťou pôsobiť na zvýšenú expresiu niektorých génov, ako je gén pre EGFR, proteín tyrozínkinázy alebo autotaxínu (ATX). V týchto štúdiách bolo zistené, že signálne dráhy podporujúce invazivitu GBM môžu byť novými vhodnými cieľmi na manipuláciu správania mozgových nádorov a ich zablokovanie by mohlo zlepšovať terapeutický úspech (Hoelzinger a kol., 2005).

Medzi transkripčný faktor podieľajúci sa na abnormálnej regulácii bunkových cyklov patrí v GBM tiež STAT3, ktorého kontinuálna aktivácia v tomto nádore vedie k zvýšenej bunkovej proliferácii, invazivite a angiogenéze. Aktivované STAT3 navyše ovplyvňuje radu ďalších signálnych dráh, vo výsledku vedúcich k zvýšenému prežitiu nádoru a jeho odolnosti voči chemoterapii (Ping a kol., 2020). Inhibícia jeho aktivity by mohla byť vhodným cieľom nádorovej terapie a mnohých nádorov, vrátane GBM.

Cieľom tejto práce bolo vytvoriť model GBM buniek s knockoutovaným génom kódujúci molekulu STAT3. Pomocou tohto modelu bude v nasledujúcich projektoch možné testovať vplyv tohto knockoutu na chovanie a prežívanie buniek GBM a získať tak ďalšie poznatky o možnej vhodnosti využitia STAT3 ako cieľ nádorovej terapie.

Pre výber vhodnej bunkovej línie pre tento projekt bolo najprv vykonané umlčanie expresie STAT3 pomocou vhodnej siRNA. Cieľom transfekcie pomocou siRNA, bolo zistiť či zvolené bunky U87MG sú vhodné pre transfekciu systémom CRISPR-Cas9.

Účinnosť transfekcie bola potvrdená na úrovni mRNA a na úrovni proteínov, kde v oboch prípadoch dochádzalo k štatisticky významnému poklesu hladiny STAT3 pri použití siRNA proti STAT3 o koncentrácii 50 nM. Zároveň sme nepozorovali žiadny vplyv na hladinu proteínu STAT3 pri použití kontrolnej siRNA, čím došlo tiež k vylúčeniu vplyvu transfekčných reagensii na hladiny tohto proteínu. Na základe tohto prvého testovania bola bunková línia U87MG zvolená pre ďalšie experimenty.

Jednou z metód na zníženie alebo knockout akéhokoľvek vybraného proteínu je využitie metódy CRISPR-Cas9. Systém CRISPR-Cas9 umožňuje presný zásah do expresie onkogénov, čím zároveň dochádza k zmene ich aktivity vedúcej až k prípadnej inhibícii rastu nádoru. V štúdiu od Li W. a kol., (2019) bolo zistené, že použitím špecifického systému CRISPR-Cas9 dochádza ku knockoutu génu CD133, čo vedie vo výsledku k zníženiu expresie intermediárneho filamentu vimentínu v bunkách rakoviny hrubého čreva, významnému zníženiu proliferácie buniek a tvorbe kolónii. Využitie tohto systému tak nie len umožnilo dokázanie významného inhibičného účinku knockoutu CD133 na migráciu a inváziu, ale tiež možnosť využitia samotného systému CRISPR-Cas9 ako terapeutického prostriedku (Li W. a kol., 2019).

Ďalším krokom nášho projektu bolo vykonanie STAT3 knockoutu u buniek U87MG za využitia systému CRISPR-Cas9. V rámci tejto práce bol použitý komerčne dostupný kit a dve vodiace sekvencie RNA – gRNA1 a gRNA2, čo viedlo k vzniku dvoch bunkových kultúr (U87MGgRNA1-STAT3-KO a U87MGgRNA2-STAT3-KO). Avšak pri použití systému CRISPR-Cas9 v kombinácii s vodiacou sekvenciou gRNA1 došlo k vzniku viabilnej bunkovej línie, u ktorej bolo pri prvotnom testovaní na úrovni proteínov potvrdené tiež zníženie hladiny proteínu STAT3. U bunkovej kultúry vzniknutej pri použití vodiacej sekvencie gRNA2 naopak dochádzalo k zvýšenej hladine proteínov STAT3 a nebol pozorovaný žiadny efekt naznačujúci knockout tejto molekuly.

Na základe týchto prvotných výsledkov sme ďalej pristúpili k overeniu účinnosti vykonaného knockoutu na úrovni DNA. Najprv došlo k optimalizácii metódy, kde sa použili dve typy polymeráz – Q5 a Taq. Podľa našich prvotných výsledkov bola vybraná pre ďalšie testovanie Q5 polymeráza, ktorá vykazovala väčšiu vhodnosť pre kombináciu zvoleného typu buniek a použitie navrhnutých primerov. Pri Taq polymeráze nebolo možné pozorovať žiadny výsledok.

V tomto prvotnom experimente zároveň došlo k potvrdeniu začlenenia vodiacej sekvencie gRNA1 do DNA transfekovaných buniek U87MG, o čom svedčila aj zmenená veľkosť fragmentu pozorovaného na agarázovom géle po vykonaní PCR stanovenia (3969 bp so začlenenou gRNA1 oproti 1484 bp u kontrolných buniek). Po tomto úspešnom prvotnom potvrdení sme ďalej testovali väčšiu sadu vzoriek, zahrňujúcich jednotlivé subkultivácie transfekovaných buniek vrátane výslednej vzniknutej bunkovej línie, avšak výsledky tohto testovania neboli jednoznačné a naznačujú nutnosť ďalšej optimalizácie metodiky, predovšetkým podmienok vykonania PCR amplifikácie a gélovej elektroforézy.

Pre finálne potvrdenie vykonaného STAT3 knockoutu sa pristúpilo k stanovení účinnosti transfekcie pomocou CRISPR-Cas9 metódy na úrovni mRNA. Pre tento účel bola využitá novo vytvorená bunková línia U87MG-STAT3-KO, vzniknutá za využitia vodiacej sekvencie gRNA1, u ktorej bolo možné pozorovať pokles relatívneho množstva STAT3 mRNA v porovnaní s jeho relatívnym množstvom u netransfekovaných buniek U87MG. Na základe jednotlivých stanovení bolo možné potvrdiť vytvorenie knockoutovanej bunkovej línie U87MG-STAT3-KO, ktorá vznikla transfekciou pomocou metódy CRISPR-Cas9 za pomoci vodiacej sekvencie RNA označenej ako gRNA1 z pôvodnej bunkovej línie U87MG.

V poslednej časti in vitro experimentu sa testoval vplyv bežne používaného chemoterapeutického liečiva TMZ na novo vytvorenú bunkovú líniu U87MG-STAT3-KO, predovšetkým za účelom možných zmien v citlivosti takto vzniknutých buniek oproti pôvodným bunkovým líniam. Testoval sa efekt rôznych koncentrácií TMZ na životnosť buniek, kde sa najprv tento efekt testoval na kontrolných bunkách U87MG. Bolo pozorované, že po podaní vyšších a klinicky nedosiahnuteľných koncentrácií TMZ (1 000 μM a 1 500 μM) dochádzalo k štatisticky významnému zníženiu životnosti buniek, zatiaľ čo pri použití nižších koncentráciách nebol pozorovaný žiadny efekt na životnosť buniek U87MG. Následne sa testovala citlivosť bunkovej línie s knockoutovanou STAT3, U87MG-STAT3-KO, k pôsobeniu liečiva TMZ pri rovnakých koncentráciách. Tiež tu dochádzalo k významnému zníženiu životnosti buniek po podaní vyšších a klinicky nedosiahnuteľných koncentráciách TMZ (1 500 μM), zároveň však bolo možné pozorovať tiež zníženie životnosti buniek pri podaní nižších koncentrácií TMZ (12,5 μM a 25 μM), avšak tieto zníženia neboli štatisticky významné. Na základe týchto výsledkov sa pristúpilo k porovnaniu citlivosti oboch bunkových línii k podaniu

TMZ a bolo zistené, že pri nižších koncentráciách TMZ (12,5 μM a 25 μM) bolo možné pozorovať štatisticky významné zvýšený efekt na životnosť buniek U87MG-STAT3-KO oproti efektu týchto koncentrácií TMZ na pôvodné bunky U87MG. Tento výsledok naznačuje možný efekt inhibície exprese, prípadne tiež aktiváciu molekuly STAT3 na pôsobenie TMZ na bunky GBM a potencionálny účinok liečiva. Cielový knockout molekuly STAT3 alebo jej inhibície pomocou špecifického inhibítora alebo iného liečiva pôsobiaceho na túto signálnu dráhu by mohol prispieť k zvýšenému terapeutickému potenciálu TMZ, jeho efektu na prežitie buniek GBM a ďalej k zníženiu potrebných dávok tohto liečiva. Tento efekt je nutné podrobiť ďalšiemu testovaniu, naše výsledky však naznačujú zaujímavý smer ďalšieho výskumu potencionálnej terapie GBM.

Nami získané výsledky boli ďalej overované *in vivo* na modelových organizmoch. Ako modelové organizmy boli vybrané nu-nu myši, do ktorých bola implantovaná kontrolná bunková línia U87MG a novo vytvorená bunková línia U87MG-STAT3-KO. Ako implantačné médium bolo použité PBS a kolagén.

Naše výsledky ukazujú, že po implantácii novo vytvorenej bunkovej línie U87MG-STAT3-KO dochádzalo k vzniku štatisticky významne menších nádorov, a to v oboch typoch použitého implantačného média. Veľkosť nádoru vzniknutého z normálnych buniek U87MG vykazovalo zvýšenú hmotnosť, významne zvýšená hmotnosť bola tiež u buniek, ktoré boli implantované v kolagéne v porovnaní s bunkami implantovanými v PBS. Podobný efekt bol tiež pozorovaný po implantácii buniek U87MG-STAT3-KO, kde implantáciou v kolagéne dochádzalo k vzniku štatisticky významne väčších nádorov. Tieto výsledky naznačujú možný benefit pri použití kolagénu ako implantačného média u buniek U87MG a ich knockoutovanej varianty, umožňujúcej vznik väčších nádorov a tým zisk väčšieho materiálu pre ďalšie testovanie.

Pre ďalšie potvrdenie týchto výsledkov bol ďalej testovaný proliferačný faktor Ki67 u nádorov vzniknutých implantáciou oboch bunkových línií v oboch implantačných médiách. Pri porovnaní implantácie v PBS a v kolagéne neboli pozorované žiadne zmeny, takže môžeme potvrdiť, že použitím rôznych implantačných médií nedochádza k zmene proliferačného stupňa. Hodnoty markeru Ki67 bola však miene zvýšená u nádoroch vzniknutých po implantácii buniek U87MG-STAT3-KO, toto zvýšenie nebolo štatisticky významné. Naše výsledky teda ukazujú, že hoci po vyradení STAT3 dochádza k zníženiu rastu nádoru z hľadiska jeho hmotnosti, nedochádza k zníženiu

miery proliferácie, a teda absencia tejto molekuly nemôže súvisieť so zlepšením klinickej prognózy alebo zmenou histopatologického stupňa nádoru.

Nádorové tkanivo získané z nu-nu myši bolo ďalej analyzované na úrovni proteínov a na úrovni mRNA. Podobne ako pri experimente u bunkových línii, bolo možné pozorovať zníženie relatívneho množstva STAT3 mRNA aj hladiny STAT3 proteínu u nádorov vzniknutých po implantácii buniek U87MG-STAT3-KO. Toto zníženie bolo pozorované pri nádoroch vytvorených implantáciou v oboch typoch implantačných médií (PBS a kolagén), čím sa potvrdili naše predchádzajúce výsledky získané v experimentoch *in vitro*. Zároveň bolo možné potvrdiť, že počas implantácie knockoutovaných buniek nedochádza k obnoveniu expresie knockoutovaného génu, v našom prípade STAT3, v dôsledku prostredia modelového organizmu, a zvolený modelový organizmus je teda vhodný na ďalšie použitie novovytvorenej bunkovej línie.

Znížená prítomnosť STAT3 bola ďalej potvrdená pomocou imunohistochemickej analýzy, kde opäť bolo možné pozorovať štatisticky významné zníženie STAT3 u nádorov vzniknutých implantáciou buniek U87MG-STAT3-KO (v oboch typoch implantačného média), čo umožnilo potvrdenie predchádzajúcich záverov pomocou ďalšieho metodického postupu.

Zaujímavý trend bol však pozorovaný porovnaním výsledkov získaných z nádorov vzniknutých implantáciou oboch typoch buniek v rôznych implantačných médiách, a to ako na úrovni mRNA, tak na úrovni proteínov. Bolo možné pozorovať výrazné zníženie relatívneho množstva STAT3 mRNA a tiež hladiny STAT3 proteínu u nádorov vzniknutých implantáciou v kolagéne. Tento výsledok tak naznačuje, že zatiaľ čo použitie kolagénu ako implantačného média sa javí ako vhodné pre získanie väčšieho množstva materiálu, je nutné zvážiť jeho použitie v prípade potreby overenia expresie niektorých mRNA a proteínov, pretože ich hladiny môžu byť použitím tohto implantačného média znížené.

Na základe našich výsledkov je možné konštatovať, že za použitia systému CRISPR-Cas9 bola úspešne vytvorená knockoutovaná bunková línia U87MG-STAT3-KO, ktorá vykazuje zvýšenú citlivosť k nižším koncentráciám bežne užívaného liečiva TMZ a tiež znížená schopnosť rastu *in vivo* v modelovom organizme. Tieto zistenia naznačujú možné využitie cieleného knockoutu molekuly STAT3, alebo zníženia jeho expresie či aktivácie pomocou špecifických inhibítorov k zvýšeniu terapeutického účinku

TMZ a zlepšenie terapie GBM. Ako predchádzajúci štúdie naznačujú, tak samotné využitie CRISPR-Cas9 môže byť vhodnou alternatívou pri cielej liečbe nádorov, pretože umožňuje presnú genetickú modifikáciu buniek a tým zníženie expresie cieľového génu. Na získanie ďalších presnejších informácií vedúcich ku konkrétnym záverom a odpovediam na vyššie uvedené hypotézy je potrebné ďalšie pokračovanie experimentu, vrátane rozšírenia testovania na ďalšie typy GBM buniek.

8 ZÁVER

Na základe vykonaných experimentov môžeme výsledky zhrnúť do niekoľkých bodov:

- Bola vykonaná úspešná transfekcia buniek U87MG pomocou STAT3-siRNA, čo bolo dokázané signifikantným poklesom relatívneho množstva STAT3 mRNA a znížením hladiny proteínu STAT3.
- Overenie knockoutu STAT3 u buniek U87MG metódou CRISPR-Cas9 na úrovni DNA dokázalo úspešnejšiu transfekciu u finálnej subkultivácie buniek. Optimalizácia metodiky pre overenie účinnosti knockoutu STAT3 na úrovni DNA ukázala, že Q5 polymeráza bola pre tento projekt vhodnejšia ako Taq polymeráza. Testovanie účinnosti knockoutu STAT3 pomocou CRISPR metódy (pri použití Q5 polymerázy) u postupne získaných vzoriek z jednotlivých subkultivácií vykazovalo nejednoznačný výsledok. Knockout STAT3 u buniek U87MG pri použití vodiacej sekvencie gRNA1 bol overený na úrovni mRNA a proteínov, kedy dochádzalo k výraznému poklesu oproti kontrolným bunkám. Pri použití vodiacej sekvencie gRNA2 došlo k zvýšenej expresii STAT3 oproti referenčnému proteínu, čo naznačovalo, že ku knockoutu u buniek U87MG pri použití tejto sekvencie nedochádzalo
- Pri porovnaní citlivosti buniek U87MG a novo vytvorenej línie U87MG-STAT3-KO na chemoterapeutické liečivo TMZ bolo zistené, že o koncentracii TMZ 12,5 μM a 25 μM znižuje životnosť buniek U87MG-STAT3-KO viac oproti kontrolným bunkám
- Po implantácii nádorových buniek do modelového organizmu bolo možné pozorovať, že po implantácii kontrolných buniek U87MG dochádzalo k vzniku nádoru o zvýšenej hmotnosti oproti nádorom vzniknutých po implantácii buniek U87MG-STAT3-KO. STAT3 knockout u nádorov vzniknutých po implantácii buniek U87MG-STAT3-KO bol dokázaný jeho zníženou hladinou, a to za pomoci IHC analýzy a tiež na úrovni mRNA a proteínov. Implantácia oboch typov buniek do modelového organizmu s použitím kolagénu ako implantačného média viedla k zvýšenému rastu nádoru, ale k zníženiu expresie STAT3 na úrovni mRNA a proteínu

9 POUŽITÉ SKRATKY

5-ALA – kyselina 5-aminolevulová

AIC – 5-aminoimidazol-4-karboxamid

ATCC – „American Type Culture Collection“

CDKN2A – cyklín-dependentná kináza 2A

CLCF1 – cytokínový faktor 1

CNS – centrálny nervový systém

CNTF – ciliárny neurotrofický faktor

CRISPR – „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat“

CT – počítačová tomografia

CT-1 – kardiostrofin 1

DSB – dvojláknový zlom

EGFR – epidermálneho rastového faktoru

GBM – glioblastoma multiforme

Gy – Gray

IDH1 – zocitrátdehydrogenáza 1

IL-6 – interleukín 6

INF – interferon

JAK – Janusová kináza

LIF – leukemický inhibičný faktor

LITT – laserová intersticiálna termoterapia

MDSC – odvodené myeloidné supresorové bunky

MGMT – O⁶-metylguanín-DNA metyltransferázu

MTIC – 5-(3-metyltriazén-1-yl)imidazol-4-karboxamid

NK – nukleová kyselina

NP – nanočastice

OSM – onkostatín M

PD-L1 – ligand 1 proteín programovanej bunkovej smrti

PET – pozitronová emisná tomografia

PTEN – fosfatázový a tenzínový homológ

RTK – receptorová tyrozínkináza

STAT – prevodník signálu a aktivátor transkripcie

TALEN – transkripčný aktivátor

TK- tyrozínkináza

TMZ – temozolomid

WHO – Svetová zdravotnícka organizácia

WST – Water-Soluble Tetrazolium 1

ZFN – nukleázy so zinkovými prstami

10 ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1 Príprava roztoku si-RNA	35
Tabuľka 2 Riedenie kalibračných roztokov	43
Tabuľka 3 Zloženie separačného gélu	44
Tabuľka 4 Zloženie zaostrovacieho gélu	44
Tabuľka 5 Rozdelenie nu-nu myší do skupín a typy implantovaných buniek	47
Tabuľka 6 Priemery výsledných veľkostí nádoru po implantácii bunkových línií U87MG a U87MG-STAT3-KO implantovaných v PBS a kolagéne do nu-nu myší	57
Tabuľka 7 Stanovenie proliferačného faktoru ki67 u bunkových línií U87MG a U87MG-STAT3-KO implantovaných v PBS a v kolagéne.....	58
Tabuľka 8 Imunohistochemické stanovenie hladiny STAT3 u nádorov odvodených z buniek U87MG a U87MG-STAT3-KO implantovaných v PBS a kolagéne.....	58

11 ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1 Chemická štruktúra temozolomidu.....	16
Obrázok 2 Mechanizmus účinku temozolomidu (Zdroj: Villano a kol., 2009).....	17
Obrázok 3 3D štruktúra proteínu STAT3.....	21
Obrázok 4 Oblasti STAT3.....	21
Obrázok 5 Signalizačná dráha JAK/STAT	23
Obrázok 6 gRNA.....	27
Obrázok 7 Mechanizmus CRISPR-Cas9.....	28
Obrázok 8 Štiepenie tetrazolovej soli na formazan pomocou mitochondriálnej dehydrogenázy	33
Obrázok 9 Stabilná a prechodná transfekcia	35
Obrázok 10 Amplifikácia DNA PCR metódou	38
Obrázok 11 Stanovenie relatívneho množstva STAT3 mRNA pomocou metódy RT-PCR u bunkovej línie U87MG transfekovaných pomocou siRNA.....	49
Obrázok 12 Stanovenie expresie markeru STAT3 na úrovni proteínov pomocou metódy Western blot u bunkovej línie U87MG transfekovanej pomocou siRNA	50
Obrázok 13 Hodnotenie účinnosti transfekcie metódou CRISPR-Cas9 na úrovni DNA pomocou PCR metód.....	51
Obrázok 14 Hodnotenie účinnosti transfekcie metódou CRISPR-Cas9 na úrovni DNA pomocou PCR metódy	52
Obrázok 15 Stanovenie relatívneho množstva STAT3 na úrovni mRNA pomocou metódy PCR bunkovej línie U87MG u transfekcie pomocou CRISPR-Cas9.....	53
Obrázok 16 Stanovenie expresie markeru STAT3 na úrovni proteínov pomocou metódy Western blot u bunkovej línie U87MG transfekovanej pomocou CRISPR-Cas9	54
Obrázok 17 Stanovenie vplyvu TMZ na proliferáciu buniek U87MG a U87MG-STAT3-KO metódou WST-1	55
Obrázok 18 Porovnanie vplyvu TMZ na proliferáciu buniek U87MG a U87MG-STAT3-KO metódou WST-1	56

Obrázok 19 Snímky z imunohistochemickej analýzy buniek U87MG v kolagéne a U87MG-STAT3-KO v kolagéne	59
Obrázok 20 Stanovenie reaktívneho množstva STAT3 na úrovni mRNA pomocou RT-PCR po implantácii bunkových línií U87MG a U87MG-STAT3-KO zriedených v PBS a kolagéne do nu-nu myší	59
Obrázok 21 Stanovenie hladiny STAT3 na úrovni proteínov pomocou Western blotu u nádorov odvodených z bunkových línií U87MG a U87MG-STAT3-KO zriedených v PBS a kolagéne do nu-nu myší	60

12 POUŽITÁ LITERATÚRA

Acro Biosystems. CRISPR Cas technology, Targeted Genome Editing Technology, [online]. Dostupné z: https://www.acrobiosystems.com/A1657-CRISPR-Cas-technology.html?gclid=Cj0KCQiA2-2eBhClARIsAGLQ2RmQvHJl8-KEdFASatkJXNPxHJsWFhJQATckXkVSv5ouGgoL7edJ6caApyqEALw_wcB

Agarwala S.S., Kirkwood J.M., (2000). Temozolomide, a Novel Alkylating Agent with Activity in the Central Nervous System, May Improve the Treatment of Advanced Metastatic Melanoma, *The Oncologist*, 5(2), 144 - 151, [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-2-144>

Alifieris, C., Trafalis, D.T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment, *Pharmacology & Therapeutics*, 63-82, ISSN 0163-7258. [online]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725815000960>. DOI: 0.1016/j.pharmthera.2015.05.005

Biopedia. Polymerázová reťazová reakcia-PCR. [online]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/polymerazova-retazova-reakcia-pcr>

Biovision, Inc.(2013). Ready-to-use Cell Proliferation Reagent, WST-1. BioVision - Life Science Source [online]. Dostupné z: <http://www.biovision.com/ready-to-use-cell-proliferation-reagent-wst-1-5637.html>

Boháčová J.(2021). Scorpion sondy: princíp a využitie v realtime PCR. LabGuide.cz. [online]. Dostupné z <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/scorpion-sondy/>

Cíchová M., Prokšová M. (2012). Možnosti využitia metódy PCR v mikrobiologických analýzach vody. *Hydrochémia*. [online]. Dostupné z: https://www.vuvh.sk/download/kni_znica/zborniky/zb_hydrochemia12/28.pdf

Cooper G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. [online]. *The Development and Causes of Cancer*. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>

Das S., Bano S., Kapse P, Kundu G.C. (2022). CRISPR based therapeutics: a new paradigm in cancer precision medicine. *Mol Cancer*, 21(1), 85. [online]. DOI: 10.1186/s12943-022-01552-6. PMID: 35337340; PMCID: PMC8953071

Dhanik, A., McMurray, J., Kaviraki, L.E. **(2012)** Binding Modes of Peptidomimetics Designed to Inhibit STAT3. [online]. DOI: 10.1371/journal.pone.0051603.

Di Nunno V., Franceschi E., Tosoni A., Gatto L., Lodi R., Bartolini S., Brandes A.A. **(2021)** Glioblastoma: Emerging Treatments and Novel Trial Designs. *Cancers (Basel)*, 13(15),3750. [online]. DOI: 10.3390/cancers13153750. PMID: 34359651; PMCID: PMC8345198.

Forbes L.R., Milner J.D., Haddad E. **(2016)**. Signal transducer and activator of transcription 3: a year in review. *Curr Opin Hematol.* 23(1):23-7. [online]. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000206. PMID: 26574998; PMCID: PMC4790836.

Frasco D. **(2019)**. Determination of total protein concentration, ThermoScientific. Thermo Fisher Scientific, Madison, W.I. [online]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Application-Notes/AN53072-determination-total-protein-concentration-bca-assay.pdf>

Friedman, H.S., Kerby, T., Calvert, H. **(2000)**. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Research*, 6(7):2585-97. [online]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10914698/> PMID: 10914698.

Fus-Kujawa A., Prus P., Bajdak-Rusinek K., Teper P., Gawron K., Kowalczyk A., Sieron A. L., **(2021)** An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9 [online]. DOI: 10.3389/fbioe.2021.701031 Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.701031> ISSN=2296-4185

Gariyban L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol.* **(2013)**. 133(3):1-4. [online]. DOI: 10.1038/jid.2013.1. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>

Gawronska-Kozak B. **(2011)**. Scarless skin wound healing in FOXP1 deficient (nude) mice is associated with distinctive matrix metalloproteinase expression. *Matrix Biol.*, 30(4):290-300. [online]. DOI: 10.1016/j.matbio.2011.04.004. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3114183/>

Ghannam MG, Varacallo M. Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. [Updated 2022 May 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/>

Gilard V, Tebani A, Dabaj I, Laquerrière A, Fontanilles M, Derrey S, Marret S, Bekri S. **(2021)**. Diagnosis and Management of Glioblastoma: A Comprehensive Perspective. *J Pers Med*, 11(4), 258. [online]. DOI: 10.3390/jpm11040258. PMID: 33915852; PMCID: PMC8065751.

Guanizo, A., Fernando, C.D., Garama, D.J., Gough, D.J. **(2018)**. STAT3: a multifaceted oncoprotein. *Growth Factors*, 36, 1-14. [online]. DOI: 10.1080/08977194.2018.1473393.

Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi S.M., Simjee Sh.U. **(2017)**. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*. 18(1):3-9. [online]. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.1.3. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5563115/>

Hanif, F., Muzaffar K., Perveen K., Malhi S.M., Simjee Sh.U. **(2017)**. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*. 8(1):3 9. [online]. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.1.3. PMID: 28239999; PMCID: PMC5563115.

Hardell L., Carlberg M., Söderqvist F., Mild, K.H., Morgan, L.L. **(2007)**. Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for ≥ 10 years, *Occupational and Environmental Medicine*; 64:626-632. [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2092574/>

Hoelzinger DB, Mariani L, Weis J, Woyke T, Berens TJ, McDonough WS, Sloan A, Coons SW, Berens ME. **(2005)**. Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. *Neoplasia*. 2005 Jan;7(1):7-16. [online]. DOI: 10.1593/neo.04535. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1490313/>

HOFMANOVÁ, J. **(2013)**. Genotoxicita a karcinogeneze: Nádorové onemocnění, úvod a základní pojmy. Brno: Masarykova univerzita. ISSN 1802 128X. [online]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html

Huang B., Li X., Li Y., Zhang J., Zong Z., Zhang H. **(2021)**. Current Immunotherapies for Glioblastoma Multiforme. *Front Immunol*. 9;11:603911. [online]. DOI: 10.3389/fimmu.2020.603911. PMID: 33767690; PMCID: PMC7986847.

- Chavez M., Chen X., Finn P.B., Qi L.S. (2023). Advances in CRISPR therapeutics. *Nature Reviews Nephrology*, 19(1):9-22. [online]. DOI: 10.1038/s41581-022-00636-2. PMID: 36280707; PMCID: PMC9589773.
- Isbir T., Kirac D., Demircan B., Dalan B., (2013). Gel Electrophoresis, *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, Academic, 165-167, ISBN 9780080961569
- Kadri K., (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. 2020 IntechOpen. [online]. DOI: 10.5772/intechopen.86491. Dostupné z: 10.5772/intechopen.86491
- Kamran, M.Z., Patil, P., Gude, R.P. (2013) Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *Biomed Res Int*. [online]. DOI:10.1155/2013/421821. PMID: 24199193; PMCID: PMC3807846.
- Kanderi, T., Gupta, V. (2022). Glioblastoma Multiforme. In: *StatPearls*. Treasure Island StatPearls. [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558954/>
- Kim B. (2017) Western Blot Techniques. *Methods Mol Biol*. 2017;1606:133-139. [online]. DOI: 10.1007/978-1-4939-6990-6_9. PMID: 28501998.
- Kim, T.K., Eberwine, J.H.(2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 397, 3173 3178 [online]. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- Kleihues P., Ohgaki H., (1999). Primary and secondary glioblastomas: From concept to clinical diagnosis, *Neuro Oncology*, 1(1),4451, [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/neuonc/1.1.44>
- Klener, P. (2011). *Základy klinické onkologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-755-1.
- Kögel, D. (2022). STAT3 Enhances Sensitivity of Glioblastoma to Cell Death. *Encyclopedia*. [online]. Dostupné z: <https://encyclopedia.pub/entry/18754>
- Kumar, P, Malik, Y.S, Ganesh, B., Rahangdale, S., Saurabh, S., Natesan, S., Srivastava, A, Sharun K, Yattoo MI, Tiwari R, Singh RK and Dhama K. (2020) CRISPR-Cas System: An Approach With Potentials for COVID 19 Diagnosis and Therapeutics. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 10:576875. [online]. DOI: 10.3389/fcimb.2020.576875

Lakomý, R., Burkoň, P., Burkoňová, D., Janáček R. (2010) Nové možnosti léčby glioblastoma multiforme. *Klinická onkologie Brno*, 23(6), 381-387. [online]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/klinicka-onkologie/2010-6-3/nove-moznosti-lecby-glioblastoma-multiforme-33901>

Lee S.Y.(2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis.* May 11;3(3):198-210. [online]. DOI: 10.1016/j.gendis.2016.04.007. PMID: 30258889; PMCID: PMC6150109. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30258889/>

Levy D.E., Lee C.K. (2002) What does Stat3 do? *J Clin Invest.* 109(9):1143-8. [online]. DOI: 10.1172/JCI15650. PMID: 11994402; PMCID: PMC150972. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11994402/>

Li W, Cho MY, Lee S, Jang M, Park J, Park R. (2019) CRISPR-Cas9 mediated CD133 knockout inhibits colon cancer invasion through reduced epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One.* 14(8):e0220860. [online].DOI: 10.1371/journal.pone.0220860, Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31393941/>

Liu A., Hou C., Chen H., Zong X., Zong P. (2016) Genetics and Epigenetics of Glioblastoma: Applications and Overall Incidence of IDH1 Mutation. *Front Oncol.* 29;6:16. [online]. DOI: 10.3389/fonc.2016.00016. PMID: 26858939; PMCID: PMC4731485. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26858939/>

Liu Y.L. Chenglong, C., Lin J.,(2010). STAT3 as a Therapeutic Target for Glioblastoma, *Anti Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10(7) [online]. Dostupné z: <https://dx.doi.org/10.2174/187152010793498636>

Liu, Y., Li, C., & Lin, J. (2010). STAT3 as a Therapeutic Target for Glioblastoma. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10(7), 512–519. [online]. Dostupné z: [doi:10.2174/187152010793498636](https://doi.org/10.2174/187152010793498636)

Liu, L.J., Leung, K.H., Chan, D.H., Wang, J.J., Ma, D.L., Leung, C.H. (2014) Identification of a natural product-like STAT3 dimerization inhibitor by structure-based virtual screening. *Cell Death Dis* 5, e1293. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.250>

Lu, L.J., Ji, L.J., Torres Ruiz, R., RodriguezPerales, S., (2017). CRISPRCas9 technology: Applications and human disease modelling, *Briefings in Functional Genomics*, 16(1),4-12. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/bfgp/elw025>

Mayo Clinic Staff. **(2020)**. Glioblastoma. Mayo Clinic. Retrieved. [online]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/glioblastoma/cdc-20350148>

McKinnon C., Nandhabalan M., Murray S.A, Plaha P. **(2021)**. Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management. *BMJ*. 14;374:n1560. [online]. DOI: 10.1136/bmj.n1560. PMID:34261630. Dostupné z: <https://www.bmj.com/content/374/bmj.n1560.long>

Meftahi G.H., Bahari Z., Zarei Mahmoudabadi A., Iman M., Jangravi Z. **(2021)**. Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(4), 509-517. [online]. DOI: 10.1002/bmb.21516. Dostupné z: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmb.21516>

Meftahi G.H.,Bahari Z.ZareiMahmoudabadiA.,Iman M.,JangraviZ. **(2021)** Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochem Mol Biol Educ*. 49(4):509-517. [online]. DOI: 10.1002/bmb.21516. Epub 2021 Apr 13. PMID: 33847452. Dostupné z:https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bmb.21516?saml_referrer

Mengie Ayele T, Tilahun Muche Z, Behaile Teklemariam A, Bogale Kassie A, Chekol Abebe E. **(2022)**. Role of JAK2/STAT3 Signaling Pathway in the Tumorigenesis, Chemotherapy Resistance, and Treatment of Solid Tumors: A Systemic Review. *J Inflamm Res*. 25;15:1349-1364. [online]. DOI: 10.2147/JIR.S353489. PMID: 35241923; PMCID: PMC8887966. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8887966/>

Minjiang Ch., Aiwu M., Min X., Qiaoyou Weng, Jianting M., Jiansong J. **(2019)**. CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges, *Cancer Letters*, 447, 48-55, ISSN 0304-3835, [online]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.017>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383519300291>

National Laboratory of Enteric Pathogens, Bureau of Microbiology, Laboratory Centre for Disease Control. The polymerase chain reaction: An overview and development of diagnostic PCR protocols at the LCDC. *Can J Infect Dis*. **(1991)** Summer;2(2):89-91. [online]. DOI: 10.1155/1991/580478. PMID: 22529715; PMCID: PMC3327995.

Nečas E. (2021). *Obecná Patologická Fyziologie*, Karolinum Press, ProQuest Ebook Central, [online]. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/cuni/detail.action?d ocID=6658944>.

Ohgaki H., Kleihues P. (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 15;19(4):764-72. [online]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002. Dostupné z: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/19/4/764/78094/The-Definition-of-Primary-and-Secondary>

Ortiz R., Perazzoli G., Cabeza L., Jiménez-Luna C., Luque R., Prados J., Melguizo C. (2021) Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. *Curr Neuropharmacol.* 19(4):513-537. [online]. DOI: 10.2174/1570159X18666200626204005. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8206461/>

Paul B, Montoya G. (2020). CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. *Biomed J.* 2020 Feb;43(1):8-17. [online]. DOI: 10.1016/j.bj.2019.10.005. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7090318/>

PCR. LabGuide – Průvodce laboratoří [online]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/pcr/>

Ping C., Fen W., Jingjing H., Ying S., Jijun W., Sicen W. (2020). STAT3 inhibition induced temozolomide-resistant glioblastoma apoptosis via triggering mitochondrial STAT3 translocation and respiratory chain dysfunction, *Cellular Signalling*, 71, ISSN 0898 6568, [online]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109598>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656820300759>

Pokorná M., Hudec M., Juříčková I., Vácha M., Polívková Z., Kútna V., Pala J., Ovsepian S.V., Černá M., O'Leary V.B.(2021) All-Trans Retinoic Acid Fosters the Multifarious U87MG Cell Line as a Model of Glioblastoma. *Brain Sci.* 11(6):812. [online]. DOI: 10.3390/brainsci11060812. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8234004/>

Polívka, J. (2013). Multifonní glioblastom: přehled nových poznatku o patogenezi, biomarkrech a perspektívach léčby. *Česká a Slovenská Neurologie*, 76(5), 576-582. [online]. Dostupné z: <https://www.csn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2013->

5/multiformni-glioblastom-prehled-novych-poznatku-o-patogenezi-biomarkerech-a-perspektivach-lecby-41393

Real-time PCR. LabGuide – Průvodce laboratoří [online]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>

Rébé C, Végran F, Berger H, Ghiringhelli F. (2013). STAT3 activation: A key factor in tumor immunoescape. *JAKSTAT*, 2(1):e23010. [online]. DOI: 10.4161/jkst.23010. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3670267/>

Redman M, King A, Watson C, King D. (2016) What is CRISPR/Cas9? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2016 Aug;101(4):213-5. [online]. DOI: 10.1136/archdischild-2016-310459. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4975809/>

Roberts K., (2021). How CRISPR Revolutionized Science. [online]. Dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/blog/how-crispr-revolutionized-science.html>

SigmaAldrich (2009). Cell Proliferation Assay Based on BrdU Incorporation into Cellular DNA. [online]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/350/519/cellprorobul.pdf>

Stoyanov, G.S., Dzhankov, D., Ghenev, P. (2018). Cell biology of glioblastoma multiforme: from basic science to diagnosis and treatment. *Med Oncol*, 35, 27. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12032-018-1083-x>

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987-96. [online]. DOI: 10.1056/NEJMoa043330. PMID: 15758009.

Šlampa P. (2013). Gliomy: současná diagnostika a léčba. Praha: Maxdorf, Jessenius. ISBN 978-807-3453-213.

Šlampa P., Kazda T., Lakomý R., Pospíšil P., Slabý O., (2015). Kombinace radioterapie a systémové léčby gliomů; [online]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a->

multidisciplinarni-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologicckych-konferencnich-abstrakt/kombinace-radioterapie-a-systemove-lecby-gliomu/

Tan, A.C., Ashley, D.M., López, G.Y., Malinzak, M., Friedman, H.S., Khasraw, M. (2020). Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin.* 70: 299- 312. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3322/caac.21613>

ThermoFisher Scientific, (2022). A complete CRISPR and TALEN gene editing toolkit. [online]. Dostupné z: [Gene Editing | Thermo Fisher Scientific - CZ](#)

Tolomeo M, Cascio A. (2021) The Multifaced Role of STAT3 in Cancer and Its Implication for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 9;22(2):603. [online]. DOI: 10.3390/ijms22020603. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/2/603>

Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. (2014). Glioblastoma multiforme – an overview. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia.* 18(5):307-312. [online]. DOI:10.5114/wo.2014.40559., Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4248049/>

Villano, J.L., Seery, T.E. & Bressler, L.R.(2009). Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. *Cancer Chemother Pharmacol.* 64, 647–655 [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00280-009-1050-5>

Wesolowski JR, Rajdev P, Mukherji SK.(2010). Temozolomide (Temodar). *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010 Sep;31(8):1383-4. [online]. DOI: 10.3174/ajnr.A2170 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7966084/>

West, A.J., Tsui, V., Stylli, S.S., Nguyen, H.P., Morokoff, A.P., Kaye, A.H., & Luwor, R.B. (2018). The role of interleukin-6-STAT3 signalling in glioblastoma (Review). *Oncology Letters,* 16, 4095-4104. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9227>

Zhang, F., Wen, Y., Guo X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges, *Human Molecular Genetics,* 23(R1), 40–R46. [online]. DOI:10.1093/hmg/ddu125

Zhou, Y., Chen, J.J. (2021). STAT3 plays an important role in DNA replication by turning on WDHD1. *Cell Biosci.* [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00524-x>