

## Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-16-0209**  
**Cirkadiánna a ontogenetická regulácia miRNA u cicavcov.**

Zodpovedný riešiteľ **doc. Iveta Herichová, PhD.**  
Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Prírodovedecká fakulta**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zürich, 8603, Schwerzenbach, Switzerland  
Functional Genomics Centre Zurich, ETH Zurich/ University of Zurich, 8057, Zurich, Switzerland

### Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

.

### Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Za najvýznamnejšie považuje články, ktoré sa stretli s významným citačným ohlasom. Vybraných 5 publikácií, ktoré boli všetky vypracované v rámci riešenie projektu, spoločne priniesli grantu súhrnne 47 citácií, mnohé z nich v časopisoch s vysokým IF.

Hasakova K, Reis R, Vician M, Zeman M, Herichova I. Expression of miR-34a-5p is up-regulated in human colorectal cancer and correlates with survival and clock gene PER2 expression. PLoSOne. 2019 14(10):e0224396. – 14 ohlasov

Ohlasy:

1. Qin, H., Wang, C., Hua, Y. LINC01123 is associated with prognosis of oral squamous cell carcinoma and involved in tumor progression by sponging miR-34a-5p(2022) Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, 133 (1), pp. 50-59.
2. Mohamed, D.A.-W., Nabil, E.S., Motaleb, F.I.A., Aboushahba, R.M., Abou-Zeid, A.A.A., Mohamed, S.M. miR-34a-5p suppresses colorectal cancer cell proliferation through silencing Microtubule Actin Crosslinking Factor 1 (MACF1) gene (2021) GeneReports, 25, art. no. 101416.
3. Wu, X., Cheng, Y.-S.L., Matthen, M., Yoon, A., Schwartz, G.K., Bala, S., Taylor, A.M., Momen-Heravi, F. Down-regulation of the tumor suppressor miR-34a contributes to head and neck cancer by up-regulating the MET oncogene and modulating tumor immune evasion (2021) Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 40 (1), art. no. 70.
4. Chen, Y.-L., Liu, X.-L., Li, L. Prognostic value of low microRNA-34a expression in human gastrointestinal cancer: a systematic review and meta-analysis (2021) BMC Cancer, 21 (1), art. no. 63.

5. Yaghoubi, N., Zahedi Aval, F., Khazaei, M., Aghaee-Bakhtiari, S.H. MicroRNAs as potential investigative and predictive biomarkers in colorectal cancer (2021) *Cellular Signalling*, 80, art. no. 109910.
  6. Haupt, S., Haupt, Y. Cancer and Tumour Suppressor p53 Encounters at the Juncture of Sex Disparity (2021) *Frontiers in Genetics*, 12, art. no. 632719.
  7. Shen, L.-D., Qi, W.-H., Bai, J.-J., Zuo, C.-Y., Bai, D.-L., Gao, W.-D., Zong, X.-L., Hao, T.-T., Ma, Y., Cao, G.-C. Resibufogenin inhibited colorectal cancer cell growth and tumorigenesis through triggering ferroptosis and ROS production mediated by GPX4 inactivation (2021) *Anatomical Record*, 304 (2), pp. 313-322.
  8. Zhou, Y., Zhang, J., Li, W., Zhang, D., Wang, Z., Zhai, Y., Yu, H., Li, Z. Integrative investigation of the TF-miRNA coregulatory network involved in the inhibition of breast cancer cell proliferation by resveratrol (2021) *FEBS Open Bio*.
  9. Jiang, H., Yang, X., Mi, M., Wei, X., Wu, H., Xin, Y., Jiao, L., Sun, S., Sun, C. Development and performance evaluation of TaqMan real-time fluorescence quantitative methylation specific PCR for detecting methylation level of PER2 (2021) *Molecular Biology Reports*.
  10. Rajendran, S., Barbon, S., Pucciarelli, S. Spotlight on circadian genes and colorectal cancer crosstalk (2021) *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders – Drug Targets*, 21 (1), pp. 4-11.
  11. Kumar, S., Gonzalez, E.A., Rameshwar, P., Etchegaray, J.-P. Non-coding RNAs as mediators of epigenetic changes in malignancies (2020) *Cancers*, 12 (12), art. no. 3657, pp. 1-32.
  12. Kalfert, D., Ludvikova, M., Pesta, M., Ludvik, J., Dostalova, L., Kholová, I. Multifunctional roles of miR-34a in cancer: A review with the emphasis on head and neck squamous cell carcinoma and thyroid cancer with clinical implications (2020) *Diagnostics*, 10 (8), art. no. 563.
  13. Chinnapaiyan, S., Dutta, R.K., Devadoss, D., Chand, H.S., Rahman, I., Unwalla, H.J. Role of non-coding RNAs in lung circadian clock related diseases (2020) *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (8), art. no. 3013.
  14. Shi, W., Song, J., Gao, Z., Liu, X., Wang, W. Downregulation of mir-7-5p inhibits the tumorigenesis of esophagus cancer via targeting klf4 (2020) *OncoTargets and Therapy*, 13, pp. 9443-9453.
- Hasáková K, Bezakova J, Vician M, Reis R, Zeman M, Herichova I. Gender-dependent expression of leading and passenger strand of miR-21 and miR-16 in human colorectal cancer and adjacent colonic tissues. *Physiol Res*. 2017 66 (Suppl 4):S575-S582. – 13

Ohlasy:

1. Bizzarri, A.R., Cannistraro, S. Direct interaction of miRNA and circRNA with the oncosuppressor p53: An intriguing perspective in cancer research (2021) *Cancers*, 13 (23), art. no. 6108.
2. Fehlmann, T., Kern, F., Laham, O., Backes, C., Solomon, J., Hirsch, P., Volz, C., Müller, R., Keller, A. MiRMaster 2.0: Multi-species non-coding RNA sequencing analyses at scale (2021) *Nucleic Acids Research*, 49 (W1), pp. W397-W408.
3. Abancens, M., Bustos, V., Harvey, H., McBryan, J., Harvey, B.J. Sexual Dimorphism in Colon Cancer (2020) *Frontiers in Oncology*, 10, art. no. 607909.
4. Marques, D., Ferreira-Costa, L.R., Ferreira-Costa, L.L., Bezerra-Oliveira, A.B., Correa, R.D.S., de Oliveira Ramos, C.C., Vinasco-Sandoval, T., Lopes, K.P., Vialle, R.A., Vidal, A.F., Silbiger, V.N., Ribeiro-Dos-santos, Â. Role of miRNAs in sigmoid colon cancer: A search for potential biomarkers (2020) *Cancers*, 12 (11), art. no. 3311, pp. 1-23.
5. Wang, Q., Sun, Q., Wang, J., Qiu, X., Qi, R., Huang, J. Identification of differentially expressed miRNAs after *Lactobacillus reuteri* treatment in the ileum mucosa of piglets (2020) *Genes and Genomics*, 42 (11), pp. 1327-1338.
6. Farace, C., Pisano, A., Griñan-Lison, C., Solinas, G., Jiménez, G., Serra, M., Carrillo, E., Scognamiglio, F., Attene, F., Montella, A., Marchal, J.A., Madeddu, R. Deregulation of cancer-stem-cell-associated miRNAs in tissues and sera of colorectal cancer patients (2020) *Oncotarget*, 11 (2), pp. 116-130.
7. Zhang, X., Cheng, Z., Wang, L., Jiao, B., Yang, H., Wang, X. MiR-21-3p Centric Regulatory Network in Dairy Cow Mammary Epithelial Cell Proliferation (2019) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (40), pp. 11137-11147.

8. Pardini, B., Sabo, A.A., Birolo, G., Calin, G.A. Noncoding rnas in extracellular fluids as cancer biomarkers: The new frontier of liquid biopsies (2019) *Cancers*, 11 (8), art. no. 1170.
  9. Bahreyni, A., Rezaei, M., Bahrami, A., Khazaei, M., Fiuji, H., Ryzhikov, M., Ferns, G.A., Avan, A., Hassanian, S.M. Diagnostic, prognostic, and therapeutic potency of microRNA 21 in the pathogenesis of colon cancer, current status and prospective (2019) *Journal of Cellular Physiology*, 234 (6), pp. 8075-8081.
  10. Zhang, K., Han, Y., Zhao, Y., Sun, Y., Zou, M., Fu, Y., Peng, X. Upregulated gga-mir-16-5p inhibits the proliferation cycle and promotes the apoptosis of mg-infected df-1 cells by repressing pik3r1-mediated the pi3k/akt/nf-kb pathway to exert anti-inflammatory effect (2019) *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (5), art. no. 1036.
  11. Gazova, A., Samakova, A., Laczo, E., Hamar, D., Polakovicová, M., Jurikova, M., Kyselovic, J. Clinical utility of miRNA-1, miRNA-29g and miRNA-133s plasma levels in prostate cancer patients with high-intensity training after androgen-deprivation therapy (2019) *Physiological Research*, 68, art. no. 4298, pp. S139-S147.
  12. Dehghan, F., Boozarpour, S., Torabizadeh, Z., Alijanpour, S. miR-21: A promising biomarker for the early detection of colon cancer (2019) *OncoTargets and Therapy*, 12, pp. 5601-5607.
  13. Neve, B., Jonckheere, N., Vincent, A., Van Seuning, I. Epigenetic regulation by lncRNAs: An overview focused on UCA1 in colorectal cancer (2018) *Cancers*, 10 (11), art. no. 440.
- Pidíková P, Reis R, Herichová I. miRNA Clusters with Down-Regulated Expression in Human Colorectal Cancer and Their Regulation. *Int J Mol Sci*. 2020 21(13):4633. - 11  
ohlasov
- Ohlasy:
1. Sun, F., Zhang, J., Ge, L., Liu, S., Zhu, T., Wang, Y., Wang, J., Li, H. Linear poly-thymine probe-based coupling of autocatalytic target recycling with nonlinear DNA assembly for label-free detection of micro RNAs (2022) *Microchemical Journal*, 175, art. no. 107162.
  2. Lu, Y., Cao, G., Lan, H., Liao, H., Hu, Y., Feng, H., Liu, X., Huang, P. Chondrocyte-derived Exosomal miR-195 Inhibits Osteosarcoma Cell Proliferation and Anti-Apoptotic by Targeting KIF4A in vitro and in vivo (2022) *Translational Oncology*, 16, art. no. 101289.
  3. Rana, V., Parama, D., Khatoon, E., Girisa, S., Sethi, G., Kunnumakkara, A. B. Reiterating the emergence of noncoding rnas as regulators of the critical hallmarks of gall bladder cancer (2021) *Biomolecules*, 11 (12), art. no. 1847.
  4. Ma, H., Li, M., Jia, Z., Chen, X., Bu, N. miR-876-3p suppresses the progression of colon cancer and correlates the prognosis of patients (2021) *Experimental and Molecular Pathology*, 122, art. no. 104682.
  5. Chen, L., He, M., Zhang, M., Sun, Q., Zeng, S., Zhao, H., Yang, H., Liu, M., Ren, S., Meng, X., Xu, H. The Role of non-coding RNAs in colorectal cancer, with a focus on its autophagy (2021) *Pharmacology and Therapeutics*, 226, art. no. 107868.
  6. Boštjančič, E., Večerić- haler, Ž., Kojc, N. The role of immune-related mirnas in the pathology of kidney transplantation (2021) *Biomolecules*, 11 (8), art. no. 1198.
  7. XIE, N., MENG, Q., ZHANG, Y., LUO, Z., XUE, F., LIU, S., LI, Y., HUANG, Y. MicroRNA-142-3p suppresses cell proliferation, invasion and epithelial-to-mesenchymal transition via RAC1-ERK1/2 signaling in colorectal cancer (2021) *Molecular Medicine Reports*, 24 (2), art.no. 12207.
  8. Stark, V.A., Facey, C.O.B., Viswanathan, V., Boman, B.M. The role of miRNAs, miRNA clusters, and isomirs in development of cancer stem cell populations in colorectal cancer (2021) *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (3), art. no. 1424, pp. 1-18.
  9. Zou, W., Wang, Y., Song, Q., Li, Q., Ren, J., Liu, X., Cui, W. Ultrasound-targeted micro bubble destruction mediated miR-492 inhibitor suppresses the tumorigenesis in non-small cell lung cancer (2021) *Annals of Medicine*, 53 (1), pp. 2246-2255.
  10. Shi, D., Zhou, Z., Zhang, S. MiRNA-6715-5p Inhibits Cellular Proliferation and Invasion in Colorectal Cancer by Directly Targeting CST4 (2021) *Journal of Oncology*, 2021, art. no. 7615712.
  11. Maminezhad, H., Ghanadian, S., Pakravan, K., Razmara, E., Rouhollah, F., Mossahebi-Mohammadi, M., Babashah, S. A panel of six-circulating miRNA signature in serum and its potential diagnostic value in colorectal cancer (2020) *Life Sciences*, 258, art. no. 118226.
- Hasakova K, Vician M, Reis R, Zeman M, Herichova I. Sex-dependent correlation between survival and expression of genes related to the circadian oscillator in patients with colorectal

cancer. *Chronobiol Int.* 2018 35(10):1423-1434. – 7 ohlasov

Ohlasy:

1. Aroca-Siendones, M.I., Moreno-Sanjuan, S., Puentes-Pardo, J.D., Verbeni, M., Arnedo, J., Escudero-Feliu, J., García-Costela, M., García-Robles, A., Carazo, Á., León, J. Core circadian clock proteins as biomarkers of progression in colorectal cancer (2021) *Biomedicines*, 9 (8), art. no. 967.
  2. Gao, X., Tang, M., Tian, S., Li, J., Liu, W. Identification of a circadian gene signature that predicts overall survival in lung adenocarcinoma (2021) *Peer J*, 9, art. no. 11733.
  3. Heo, J.-W., Kim, S.-E., Sung, M.-K. Sex differences in the incidence of obesity-related gastrointestinal cancer (2021) *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (3), art. no. 1253, pp. 1-17.
  4. Zhang, J., Lv, H., Ji, M., Wang, Z., Wu, W. Low circadian clock genes expression in cancers: A meta-analysis of its association with clinicopathological features and prognosis (2020) *PLoS ONE*, 15 (5), art. no. e0233508.
  5. Deng, F., Yang, K., Zheng, G. Period Family of Clock Genes as Novel Predictors of Survival in Human Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis (2020) *Disease Markers*, 2020, art. no. 6486238, .
  6. Bajpai, J., Chandrashekhara, A., Banavali, S., Gupta, S. Osteosarcoma journey in India: Each step reveals a new horizon! (2020) *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 41 (1), pp. 4-6.
  7. Bajpai, J., Chandrasekharan, A., Simha, V., Mandal, T., Shah, K., Hingmare, S., Rangarajan, B., Shetty, N., Vora, T., Ghosh, J., Rekhi, B., Banavali, S., Gupta, S. Osteosarcoma journey over two decades in India: Small steps, big changes (2019) *Pediatric Blood and Cancer*, 66 (9), art. no. e27877.
- Pidíková P, Herichová I. miRNA Clusters with Up-Regulated Expression in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 13(12):2979. – 2 ohlasy

Ohlasy:

1. Smolarz, B., Durczyński, A., Romanowicz, H., Hogendorf, P. The role of microrna in pancreatic cancer (2021) *Biomedicines*, 9 (10), art. no. 1322.
2. Liu, B., Shyr, Y., Liu, Q. Pan-cancer analysis reveals common and specific relationships between intragenic mirnas and their host genes (2021) *Biomedicines*, 9 (9), art. no. 1263.

### Uplatnenie výsledkov projektu

Projekt významne prispel nielen k novým dôležitým poznatkom v oblasti regulácie hladín miRNA a prepojení tejto regulácie s cirkadiánnym systémom, ale aj k vzdelávaniu študentov II. a III. stupňa vysokoškolského štúdia. Projekt vytvoril priestor pre päť dizertačných prác, pričom štyria z piatich doktorandov boli aj členmi riešiteľského kolektívu. Na práci sa tiež podieľalo 11 diplomantov, čo potvrdzuje rozsiahle zapojenie mladých vedeckých pracovníkov do projektu.

Vrámci riešenia projektu boli získané a úspešne vyriešené 4 granty UK doktorandov, ktorí boli členmi riešiteľského kolektívu (UK/53/2019, UK/96/2020, UK/315/2021 - Mgr. Paulína Pidíková, UK/113/2018, - Dr. Kristína Hasáková). Experimentálne výstupy tohto projektu priamo iniciovali predloženie VEGA grantu zameraného na vplyv elektromagnetického žiarenia na účinky miRNA a nimi regulovaných hodinových génov v nádorových bunkách kolorektálneho karcinómu (VEGA 1/0679/19 - Úloha hodinových génov a s nimi funkčne súvisiacich miRNA pri exekučných účinkoch faktorov regulujúcich progresiu bunkového cyklu. – Prof. Iveta Herichová, PhD.).

Vrámci riešenia projektu vzniklo 16 vedeckých článkov v časopisoch, ktoré už počas riešenia projektu zaznamenali súhrnne 54 citácií (22.1.2022 Scopus, bez autocitácií).

Citácie spadajú najmä do vedných oblastí Biochemistry, Genetics and Molecular Biology (40%) a Medicine (32%) a 61% citácií pochádza z experimentálnych článkov, čiže údaje získané vrámci riešenia projektu boli veľkou mierou priamo prínosné vo výskume.

Výstupy projektu majú už v tomto období uplatnenie v translačnej medicíne, čo odrzkadľuje tematické spektrum identifikovaných citácií. Väčšina citačných ohlasov na články, ktoré vznikli vrámci riešenia projektu, súvisia s využitím miRNA v diagnostike a liečení ochorení. Sú zväčša zamerané na kolorektálny karcinóm, ale predovšetkým miR-34a-5p, ktorá je skloňovaná aj v súvislosti s inými typmi nádorových ochorení. Významná časť citácií poukazuje na význam od pohlavia závislej incidencie kolorektálneho karcinómu a s tým súvisiacej potreby prispôbiť tomu prevenciu a diagnostiku tohto ochorenia. K rozšíreniu

teoretických znalostí o regulácii hladín miRNA prispeli dve rozsiahle in silico analýzy zamerané na reguláciu miRNA v transkripčných klastroch, čo takisto môže vyústiť do praktického využitia viacerých miRNA v jednej transkripčnej jednotke.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)**

Identifikovali sme DGCR8 ako komponent biosyntetickej dráhy miRNA, ktorého expresia vykazuje denný rytmus. Táto rytmicita je avšak oveľa výraznejšia v periférnych tkanivách v porovnaní s centrálnym cirkadiánnym oscilátorom v SCN a s prefrontálnym kortexom. Tvorba pre-miRNA komplexom Drosha/DGCR8 je okrem denného rytmu v expresii komponentov mikroprocesoru ovplyvňovaná aj ďalšími faktormi (Pidíková et al., v recenznom konaní, Herichová et al., 2021). In silico analýza identifikovala 13 klastrov so zníženou (Pidíková et al., 2020) a 15 klastrov so zvýšenou expresiou (Pidíková et al., 2021) v tkanive kolorektálneho karcinómu u človeka. Častá lokalizácia spoločne regulovaných klastrov bola v intrónových segmentoch. Väčšina klastrov bola regulovaná viacerými transkripčnými faktormi a očakávaná jednotná regulácia klastra bola preukázaná len v niektorých prípadoch. Screeniny odhalili 14 rytmicky exprimovaných miRNA v pľúcach a 36 rytmicky exprimovaných miRNA v hrubom čreve potkana. Tieto počty identifikovaných miRNA predstavujú približne 5 – 10% analyzovaného transkriptómu miRNA. Funkčné dôkazy miRNA vybraných na základe selekčných kritérií, miR-34a-5p, miR-138-5p a miR-150-5p, preukázali významný vplyv študovaných miRNA na bunkový cirkadiánný oscilátor. Zatiaľ čo miR-34a-5p inhibuje expresiu hodinových génov *per2* a *bmal1*, miR-138-5p inhibuje expresiu transkripčného faktoru *clock* a miR-150-5p znižuje expresiu *per2* a *clock*. Poukázali sme na významné pohlavné rozdiely v expresii miR-21 a miR-16 (Hasáková et al., 2017) ako aj v korelácii hodinových a hodinami regulovaných génov s prognózou pacientov s kolorektálnym karcinómom (Hasáková et al., 2018). Podobne aj prognostická hodnota expresie miR-34a-5p vykazuje od pohlavia závislý vzťah (Hasáková et al., 2019). Neskorší screening odhalil, že podiel up-regulovaných miRNA v nádorovom tkanive je vo všeobecnosti vyšší u mužov v porovnaní so ženami. Tieto výsledky môžu mať priame výstupy do translačnej medicíny (Herichová et al., 2020). Záverom možno konštatovať, že ciele projektu boli splnené.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)**

DGCR8 is a component of the miRNA biosynthetic pathway that shows the most pronounced daily rhythm in expression. This rhythmicity is more robust in peripheral tissues compared to the central oscillator in the SCN and prefrontal cortex. We suppose that the production of pre-miRNA by the Drosha/DGCR8 complex is influenced not only by the daily pattern in expression of microprocessor complex members, but also by other humoral factors (Pidíková et al., submitted, Herichová et al., 2021). In silico analysis identified 13 clusters with decreased (Pidíková et al., 2020) and 15 clusters with increased expression (Pidíková et al., 2021) in human colorectal cancer tissue. Co-regulated clusters were frequently situated within introns. The most clusters have been regulated by several transcription factors and expected uniform regulation of the cluster was observed in only a few cases. Screenings revealed 14 and 36 rhythmically expressed miRNAs in the rat lungs and colon, respectively. Rhythmically expressed miRNAs represent approximately 5 – 10% of analyzed miRNA transcriptome. Functional evidence of miR-34a-5p, miR-138-5p and miR-150-5p demonstrated a significant effect on the cellular circadian oscillator. While miR-34a-5p inhibits the expression of the *per2* and *bmal1*, miR-138-5p inhibits the expression of *clock* and miR-150-5p administration causes decrease in expression of *per2* and *clock*. We identified significant gender differences in miR-21 and miR-16 expression in colorectal cancer tissue (Hasáková et al., 2017). Also a correlation between expression of *clock* and *clock*-controlled genes with the prognosis of colorectal cancer patients is sex-dependent (Hasáková et al., 2018). Prognostic value of miR-34a-5p expression is more valid for males compared with females (Hasáková et al., 2019). Subsequent screening revealed that the proportion of up-regulated miRNAs in tumor tissue is generally higher in men compared to women. These results can be very useful in translational medicine immediately. In conclusion, it can be stated that the objectives of the project have been met.