

# **Univerzita Palackého v Olomouci**

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



## **Prognostický význam imunohistochemické detekce vybraných microRNA spojených s mnohočetnou lékovou rezistencí ve vzorcích nemalobuněčného plicního karcinomu**

Autor:

**Tereza Hasová**

Studijní obor:

Experimentální biologie

Vedoucí práce:

MUDr. MVDr. Josef Škarda Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením MUDr. *et* MVDr. Jozefa Škardy, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů a dalších informačních zdrojů uvedených v seznamu literatury na konci práce. Tvorba TMA bloků se souborem pacientů – bloky byly zhotoveny laborantkami na Ústavu molekulární patologie, Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Statistické zhodnocení studie provedl biostatistik Giorgi Mgebrishvili.

V Olomouci dne: 31. 7. 2014

Hasová Tereza

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce MUDr. MVDr. Josefu Škardovi Ph.D., za odbornou a pedagogickou pomoc, za cenné informace a věnované úsilí. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Bořucké za odbornou pomoc v laboratoři. Chtěla bych poděkovat Mgr. Zdeňkovi Noskovi za pečlivou přípravu pufrů a reagensů.

## Abstrakt

MiRNA hrají klíčovou roli v regulaci genové exprese, řídí stovky a tisíce nových cílových genů, kontrolují geny, které jsou zapojené v buněčných procesech jako je diferenciaci, regulace buněčného cyklu, odezva na cytotoxický stres a apoptóza. Proto jsme pomocí *in situ* hybridizace vizualizovali expresi a lokalizaci vybraných miRNA zapojených do procesu mnohočetné lékové rezistence - miR-21, Let7a, miR-126 a U6 snRNA ve formalínu fixovaných a do parafínu zalitých vzorcích nemalobuněčných karcinomů plic a následně jsme korelovali expresi a lokalizaci jednotlivých miRNA s histologickými subtypy nemalobuněčných karcinomů plic u pacientů s délkou přežití a délkou bez příznakového období.

V souladu se současnými literárními poznatky jsme zjistili, že získané výsledky jednoznačně ukazují na upregulaci miR-21 a to hlavně v spinocelulárním karcinomu, ale i v adenokarcinomu, což je v souladu s nejnovějšími studiemi zabývajícími se biologickou funkcí miR-21 u NSCLC. Byla také zjištěna downregulace miR-126 byla popsána u některých histologických subtypů nemalobuněčného karcinomu plic a to zejména u spinocelulárního karcinomu a adenokarcinomu. U Let-7a byla v ojedinělých případech pozorována pozitivní exprese u spinocelulárního karcinomu a u adenokarcinomu.

Relativně vzácný výskyt pacientů s NSCLC s homogenním neoadjuvantním režimem chemoterapie nám pouze umožnil sledovat trend korelace mezi expresí výše uvedených miRNA a histologickými subtypy nemalobuněčných karcinomů plic, délkou přežití a délkou bez příznakového období.

Nebyly zjištěny signifikantní korelace mezi histologickými subtypy NSCLC, interval bezpříznakového období a délkou přežití. V budoucnu plánujeme rozšířit detekci daných miRNA v rámci celostátní multicentrické studie pacientů s neoadjuvantní chemoterapií NSCLC.

**Klíčová slova:** NSCLC, miRNA, *in situ* hybridizace, léková rezistence

## **Abstract**

MicroRNAs play key role in genome expression. They regulate hundreds to thousands target genes, which are involved in differentiation, regulation cells cycle and apoptosis. For this reason we detected selected marker miRNA using ISH involved in mutli-drug resistance – microRNA-21, microRNA-126, Let-7a and U6 snRNA in formalin-fixed paraffin-embedded non-small cell lung cancers.

The expression of this microRNAs were correlated with histological subtypes of NSCLC. Consistently with recent literature data we have seen up-regulation of miR-21 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. In minority cases let-7a was up-regulated in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma.

Relatively uncommon patients with no adjuvant chemotherapy regime in NSCLC allowed us only to follow statistical trend of correlation between expression of miRNA and histological subtypes of NSCLC, symptom free period and overall survival.

No significant correlations were found between histological subtypes of NSCLC and symptom free period and overall survival. Therefore in future we plan to extend the detection of microRNAs within large multicenter study of patients with no-adjuvant chemotherapy.

**Key words: NSCLC, miRNA, in situ hybridization , drug resistance**

## Seznam použitých zkratk

miR	- microRNA
NSCLC	- non-small cell lung cancer
ISH	- <i>in situ</i> hybridizace
FFPE	- Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded
VEGF-A	- Vascular endothelial growth factor A
P	- korelace
DFS	- interval bezpříznakového období
OS	- celkové přežití
miRs	- microRNAs
AP	- alkalická fosfatáza

## Obsah

1.	ÚVOD	9
2.	PŘEHLED PROBLEMATIKY	11
2.1	Obecné údaje o microRNA	11
2.1.1	MiR-21 jako možný prognostický a prediktivní faktor	12
2.1.2	MiR-126 jako potencionální prognostický faktor	12
2.1.3	Členové Let-7 rodiny jako možné prognostické a prediktivní faktory	13
2.1.4	MiR-155 jako potencinální prognostický a prediktivní faktor	13
2.1.5	Další studované miRNA zapojené v progresi rakoviny plic	13
3.	CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	15
4.	MATERIÁL A METODY	16
4.1	Tvorba TMA bločků	16
4.2	<i>In situ</i> hybridizace	16
4.2.1	The miRCURY LNA <sup>TM</sup> microRNA ISH Optimization kit (FFPE)	16
4.3	One dey microRNA ISH protokol	18
4.3.1	Deparafinování sklíčka v xylému a ethanolu	18
4.3.2	Inkubace sklíček s Proteinase-K	18
4.3.3	Umístění sklíček do PBS	18
4.3.4	Dehydratace sklíček	19
4.3.5	Aplikace hybridizačního mixu a hybridizace po dobu 60 minut při 55°C	19

4.3.6	Odstranění Fixogumu a krycího skla	19
4.3.7	Promytí sklíček v SSC pufrech	20
4.3.8	Aplikace hydrofobní bariéry	20
4.3.9	Inkubace s blokujícím roztokem	20
4.3.10	Aplikace anti-DIG reagentu	21
4.3.11	Promytí v PBS-T	21
4.3.12	Inkubace s AP substrátem	21
4.3.13	Inkubace sklíček v KTBT pufrem	21
4.3.14	Promytí vodou	21
4.3.15	Dobarvení jádra s Nuclear Fast Red™	21
4.3.16	Oplachování v tekoucí vodě	22
4.3.17	Dehydratace sklíček	22
4.2.18	Zafixování nabarvených preparátů	22
4.3.19	Histologické hodnocení exprese jednotlivých microRNA	22
5.	VÝSLEDKY	23
5.1	Vyhodnocení U6 snRNA	23
5.2	Vyhodnocení miR-21	26
5.3	Vyhodnocení miR-126	29
5.4	Vyhodnocení Let-7a	32
6.	DISKUZE	35
7.	ZÁVĚR	38
8.	LITERÁRNÍ ZDROJE	39
	PŘÍLOHY	45



## 1. ÚVOD

Podle posledních údajů z roku 2010 - 2011 v České republice každý rok onemocní více než 77 000 lidí rakovinou. U mužů je nejčastějším zhoubným nádorem karcinom plic, u žen je to karcinom prsu. Podle posledních údajů došlo k rapidnímu nárůstu nových případů karcinomu plic u žen ([www.kurakovaplice.cz](http://www.kurakovaplice.cz), zdroje statistik – WHO, Český statistický úřad ČSÚ, doc. MUDr. Eva Králíková, CSc).

Z histologického hlediska lze rozdělit karcinom plic na dva hlavní skupiny: malobuněčný (SCLC) a nemalobuněčné plicní karcinomy (NSCLC) karcinom (Klein, Chirurgie karcinomu plic, 2006). Více než 80 % všech případů zhoubných nádorů plic tvoří nemalobuněčné plicní karcinomy.

Léčba karcinomu plic zahrnuje obvykle kombinaci chirurgických postupů, radioterapie a různých režimů chemoterapie. Volba léčebného postupu u nemalobuněčných plicních karcinomů do velké míry závisí na stádiu onemocnění. (Klein, kniha Chirurgie karcinomu plic;2006).

Dle závažnosti onemocnění můžeme pacienty rozdělit od stádia IA až po stádium IV. Jelikož je většina onemocnění diagnostikována až v pokročilejším stádiu, není možné použít operativní léčbu. Obecně se uznává chemoterapeutický režim pro první linii a měl by obsahovat derivát platiny jako je například karboplatina nebo cisplatina a to v kombinaci s lékem 3. Generace. Léčba je volena dle stádia onemocnění.

Kombinace chemoterapie a radioterapie je použita u pokročilých stadií IIIB, jako standartní léčba po mnoho let. Chirurgická léčba se používá, pokud došlo během chemoterapie nebo chemoradioterapie k významnému zmenšení nádoru. U klinického stádia IV se chirurgická léčba již většinou neprovádí, výjimku tvoří pacienti se solitární metastázou. Léčba je individuální a zohledňuje se aktuální stav pacienta (Chemoterapie karcinomu plic, profesor Petr Zatloukal, Med. Pro Praxi 2008; 5(1): 23–27).

Tabulka 1: Histologické typy bronchogenního karcinomu  
(Převzato z Klinická onkologie 6/2008 Skříčková a spol.)

<b>Nemalobuněčný karcinom</b>	<b>Muži</b>	<b>Ženy</b>
spinoceleulární karcinom	40%	20%
adenokarcinom	24%	46%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• acinární</li> <li>• papilární</li> <li>• brochoalveolární</li> <li>• solidní hlenotvorný</li> </ul>		
velkobuněčný karcinom	7%	8%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• obrovskobuněčný karcinom</li> <li>• karcinom z jasných buněk</li> </ul>		
smíšené karcinomy		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• adenoskvamózní karcinom</li> <li>• mukoepidermoidní</li> <li>• adenoidně cystický karcinom</li> </ul>		
nediferencovaný karcinom		
<b>Malobuněčný karcinom</b>	22%	20%
WHO klasifikace malobuněčného karcinomu	IASLC (International Association for Study of Lung Cancer) klasifikace malobuněčného karcinomu	
Malobuněčný karcinom	Malobuněčný karcinom bez nemalobuněčné komponenty	
Intermediární karcinom	Malobuněčný s velkobuněčnou komponentou	
Kombinovaný karcinom	Malobuněčný s podílem adeno nebo spinoceleulárního karcinomu	

## 2. PŘEHLED PROBLEMATIKY

### 2.1 Obecné údaje o miRNA

MicroRNA jsou jednořetězové RNA, přibližně 19-22 nukleotidů dlouhé, které hrají klíčovou roli, jak v regulaci genové exprese, tak i v indukci degradace mRNA nebo v inhibici translace. Řídí stovky až tisíce nových cílových genů, proto kontroluje širokou oblast biologických funkcí (Tom Donnem *et al.* 2012). V současnosti bylo u člověka popsáno 1048 miRNA ([www.miRBase.org](http://www.miRBase.org)). Na základě rozmístění v genomu je možno geny pro miRNA rozdělit do několika skupin. U člověka jsou rozmístěny náhodně po všech chromozómech kromě chromozómu Y. Minimálně polovina genů pro miRNA u člověka byla na chromozómu nalezena v blízkosti dalšího genu kódujícího miRNA (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001). Tyto klastrové geny bývají transkribovány společně za vzniku polycistronního primárního transkriptu (Lee *et al.*, 2002).

Molekuly miRNA vznikají v jádře po transkripci genu pro miRNA na primární transkript (pri-miRNA). Ten je následně štěpený pomocí komplexu Drosha na prekurzorovou miRNA (pre-miRNA). Pre-miRNA je poté přenášena z jádra do cytoplasmy pomocí exportinu-5 (EXP5). V cytoplasmě je pak podrobena enzymatickým úpravám. Vznikne tak jednovláknový řetězec RNA, který se naváže na cílové molekuly mRNA. Podle míry komplementarity může být mRNA buď degradována, nebo je pouze zamezeno její translaci, bez naštěpení.

MiRNA je možno rozdělit z hlediska jejich cílových kódujících mRNA na miRNA s charakterem onkogenu, či miRNA s charakterem nádorového supresoru. miRNA s charakterem onkogenu umlčují translaci nádorových supresorů. Hladiny exprese takovýchto miRNA jsou v nádorových buňkách oproti normálním upregulovány. To vede ke snížení hladin exprese nádorových supresorů v nádorové buňce (Kumar *et al.*, 2007). Naopak

hladiny tumor-supresorových miRNA umlčující translaci onkogenů bývají většinou v nádorech downregulovány (Johnson *et al.*, 2005).

MicroRNAs regulují rozsáhlou škálu procesů, které se podílí na nádorové transformaci. Kontrolují také geny zapojené v buněčných procesech, jako jsou diferenciace, regulace buněčných cyklů, odezva na stres a apoptóza. Bylo zjištěno, že miRs se podílejí na regulaci všech doposud známých signálních drah a na jejich poruchách uvnitř buňky.(Gianpiero Di Leva *et al.*, 2014). Nádorové buňky mají obecně změněnou expresi miRNA ve srovnání s nenádorovou tkání. Tato pozměněná exprese se může také podílet na deregulaci apoptózy, transportních mechanismů a metabolismu xenobiotok . Z uvedeného důvodu mohou hrát také zásadní roli při vzniku mnohočetné lékové rezistence (Hummel *et al.*, 2010)

### **2.1.1 MiR-21 jako možný prognostický a prediktivní faktor**

U pacientů s NSCLC byla prokázána upregulace miR-21. Uvedená miRNA inhibuje tumor-supresorový gen PTEN, kterého funkcí je inhibice signální dráhy PI3K/Akt a tím blokuje buněčný cyklus ve fázi G1 (Zhang JG *et al.*, 2010; DeVita *et al.*, 2008).

### **2.1.2 MiR-126 jako potencionální prognostický faktor**

MiR-126 je obecně považována za onkogenní miRNA, ale v několika případech se ale projevila také jako tumorový supresor.

Downregulace miR-126 byla popisována u karcinomu děložního čípku, prsu, tlustého střeva, konečníku, žaludku, a také v některých histologických subtypech nemalobuněčných karcinomů plic, zejména u adenokarcinomů , spinocelulárních karcinomů (Shusheng Wang *et al.*, 2008; Calin, *et al.*, 2004;Feng *et al.*, 2010).

Studie zabývající se expresí dané mi RNA u NSCLC, prokázali že u nemalobuněčných karcinomů plic vystupuje miR-126 ve většině případech ve funkci nádorového supresoru(Crawford *et al.*, 2008). U adenokarcinomů byla hladina exprese miR-126 snížena, naopak u spinocelulárních karcinomů

bylo pozorováno, že hladina miR-126 je výrazně zvýšena. Uvedená miRNA je zapojená v procesu regulace exprese VEGF-A (Vascular endothelial growth factor A). VEGF-A po navázání na příslušné receptory aktivuje MAP kinasovou signální dráhu, zapojenou do procesu angiogeneze (Heusschen *et al.* 2010; Sandler *et al.*, 2006; Shusheng Wang *et al.*, 2008). Mir- 126 můžeme zařadit mezi miRNA mající vztah s angiogenezí spolu s ostatními miRs které regulují proces angiogeneze jako jsou miR-155, miR-21 a miR-424 (Tom Donnem *et al.*, 2012). Prognostický a prediktivní význam miR-126 u pacientů s různými histologickými subtypy není však jednoznačně objasněný.

### **2.1.3 Členové Let-7 rodiny jako možné prognostické a prediktivní faktory**

Členové Let-7 rodiny fungují jako nádorové supresory (Cheng-Chia Yu *et al.*, 2011) Ve srovnání s normální tkání s nádorovou tkání je jejich exprese v průběhu progresu nádoru downregulována. Downregulace Let-7 souvisí s horším přežitím u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (Takamizava *et al.*, 2004).

### **2.1.4 MiR-155 jako potenciální prognostický a prediktivní faktor**

MiR-155 je jednou z miRNA jejíž upregulace může hrát důležitou roli jako onkogen. (Dorsett Y *et al.*, 2008). Prognostický význam miR-155 závisí na histologickém podtypu a stádiu onemocnění u pacientů s NSCLC. (Tom Donnem *et al.*, 2011).

### **2.1.5 Další studované miRNA zapojené v progresi rakoviny plic**

Mir-223 se řadí mezi další tumorový supresor nádoru plic (Weigi Nian *et al.*, 2013).

Byla studována upregulace miR-31 na citlivost k cisplatině (diamminedichloroplatinum, DDP) u pacientů s NSCLC. Uvedená miRNA je

zapojená v rezistenci buněk na DDP. Spolupracuje se sekvencemi *ABCB9*. Sekvence *ABCB9* je členem MDR/Tap pod skupiny a má vliv na lékovou rezistenci a patří mezi jedny z cílových genů miR-31. Uplatňuje svůj anti-apoptotický účinek prostřednictvím represe *ABCB9* exprese (Zhuo Dong *et al.*, 2014).

(Xiang-hua Liu *et al.*, 2012) Zjistili, že vyšší klinické stádium nemalobuněčného karcinomu plic je spojováno s vyšší expresí miR-196a v tkáních nemalobuněčného karcinomu plic.

Mezi nejstudovanější miRNA spojovanou s karcinomy patří miR-210. Zvýšená sérová hladina miR-210 se vyskytovala u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic v porovnání s kontrolní zdravou tkání (Zhi-Hong Li *et al.*, 2013). Zvýšená sérová hladina miR-210 souhlasí dřívějšími poznatky, že v nádorových buňkách se nachází vyšší hladiny miR-210. (An Zhao *et al.*, 2013). Zvýšená hladina miR-210 v séru se vyskytovala hlavně u pacientů ve stádiu onemocnění III – IV ve srovnání s pacienty ve stádiu I-II. MiR-210 se zaměřuje na specifické mitochondriální komponenty s významem regulace přežití, buněčné smrti a modulace HIF-1 aktivity (Puisségur MP *et al.*, 2011).

MiR-34 se řadí mezi tzv. miRNA rodiny a skládá se ze tří miRNA – miR-34a, miR-34b a miR-34c. Výše uvedené miRNAs mají účast v dráze p53 a exprese přímé indukce p53 v reakci na poškození DNA nebo na onkogenní stres (Galardo E *et al.* 2009). Podle výše uvedené studie pacienti s NSCLC nízkou expresí miR-34 měli vyšší riziko replasu než pacienti s vyšší expresí miR-34. MiR-205 je ve většině případů řazena do skupiny tumor supresorových miRNA. Zvýšená exprese dané miR-205 byla doposud detekována u pacientů s rakovinou hlavy a krku, močového měchýře, a v některých subtypech karcinomu plic zejména ve spinocelulárních karcinomech (Jiang *et al.*, 2005; Gottardo *et al.*, 2007).

V diagnostice je možno miR-205 považovat za přídatný marker spinocelulární diferenciace. Bylo prokázáno, že upregulace miR-205 je přítomna u spinocelulárních karcinomů plic ve srovnání s adenokarcinomy (Lebanony *et al.*, 2009).

### **3. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

1. Optimalizace imunohistochemické detekce vybraných miRNA na histologických řezech z formalínu fixovaných a zalitých na parafinovém bločku
2. Detekce miR-21, Let-7a, miR-126 a U6 snRNA ve formalínu fixovaných a do parafinu zalitých vzorcích nemalobuněčných karcinomů plic
3. Korelace exprese a lokalizace jednotlivých miRNA s histologickými subtypy nemalobuněčných karcinomů plic, délkou přežití a délkou bez příznakového období u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1 Tvorba TMA bloků

K tvorbě TMA bloků pomocí přístroje pro tkáňovou array byly použity vzorky nemalobuněčného karcinomu plic zalité v parafínu. Z jednoho donorového bloku byly odebrány a umístěny do recipientního bloku dva vzorky nádorové a jeden vzorek zdravé plicní tkáně pomocí duté jehly (4 mm). Pro správnou orientaci TMA bloku zde byly umístěny i vzorky dvou kontrolních tkání.

Byl použit soubor 36 pacientů s neoadjuvantním chemoterapií na bázi platinových derivátů (cisplatina, carboplatina). Všichni pacienti měli operabilní nemalobuněčný karcinom plic. TMA bloky byly zhotoveny na Ústavu molekulární patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

### 4.2 *In situ* hybridizace

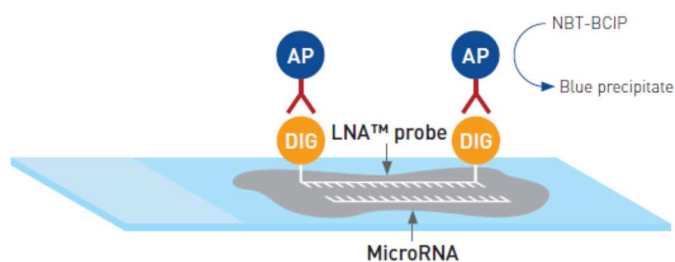
*In situ* hybridizace se využívá k vizualizaci genové exprese a lokalizaci v různých specifických vzorcích a buněčných typech. ISH patří mezi nejběžnější metody vizualizace genové exprese a její lokalizace. Pomocí ISH jsem schopni v různých buněčných tkáních či buněčných populacích určit úroveň exprese miRNA či mRNA. Tato histologická analýza nám usnadňuje pochopení role miRNA v biologických a molekulárních procesech. (Boye Schnack *et al.*,2012, Jørgensen S *et. al.*,2010)

#### 4.2.1 The miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization kit (FFPE)

Kit umožňuje rychlý a dostatečný postup pro snadné uskutečnění microRNA ISH analýzy. MicroRNA pufr je speciálně vyvinutý pro využití double – DIG-labeled miRCURY LNA™ microRNA detekčních prób. Tato metoda se využívá pro citlivou a specifickou detekci microRNA exprese



pomoci ISH v FFPE oblastech různých vzorků. Detekce microRNA v FFPE má mnoho výhod jako je použití nesavčího haptenu digoxigeninu (DIG). Během procesu jsou microRNA zviditelněny použitím Proteinase K, které dovolují zpřístupnění double-DIG-labeled LNA<sup>TM</sup> prób pro hybridizaci sekvence microRNA. Digoxigenins mohou být rozpoznány specifickými anti-DIG antibody, tak že přímo konjugují s enzymem alkalickou fosfatázou. Alkalická fosfatáza konvertuje s rozpustnými substráty 4-nitro-blue tetrazolium (NBT) a 5-brom-4-chloro-3'-indolylphosphate (BCIP) ve vodě a alkoholu v nerozpustnou tmavě modrou NBT-BCIP sraženinu. Nakonec dobarvení jádra aplikované do oblastí poskytuje lepší histologické rozlišení.



*Schéma převzato z miRCURY LNA<sup>TM</sup> microRNA ISH Optimization Kit(FFPE), Instruction manual v2.0*

### **4.3 One day microRNA ISH protokol**

#### **4.3.1 Deparafinování sklíček**

Sklíčka byla umístěna na stojan, deparafinována v xylénu a roztoku ethanolu za laboratorní teploty a přemístěna ze sterilní flakony do další sterilní flakony. Postup byl následující:

- propláchnout v Xylénu a nechat působit 5 minut
- propláchnout v Xylénu a nechat působit 5 minut
- propláchnout v Xylénu a nechat působit 5 minut
- 10 krát ponořit do 99,9% Ethanolu
- 10 krát ponořit do 99,9% Ethanolu
- propláchnout na 5 minut v 99,9 % Ethanolu
- 10 krát ponořit do 96% Ethanolu
- propláchnout na 5 minut v 96% Ethanolu
- 10 krát ponořit do 70% Ethanolu
- Propláchnout 5 minut v 70% Ethanolu
- Promýt 2-5 minut v PBS

#### **4.3.2 Inkubace s Proteinase-K**

Na celý povrch řezu bylo aplikováno přibližně 300  $\mu$ l Proteinase-K reagentu, který byl připraven z 7,5  $\mu$ l Proteinasy-K a 10 ml Proteinase-K pufru (900ml RNase-free vody přidat 5 ml 1M Tris-HCl (pH7,4), 2 ml 0,5 M EDTA a 0,25 M NaCl, nutno vyautoklávovat) inkubováno 10 minut při 37°C v laboratorním termostatu.

#### **4.3.3 Umístění sklíček do PBS**

Sklíčka byla přemístěna po 10 minutové inkubaci do flakonek obsahující PBS. Sklíčka byla dvakrát promyta v PBS.

#### **4.3.4 Dehydratace sklíček**

Sklíčka byla dehydratována v novém roztoku Ethanolu. Poté byla usušena na čistých papírových ubrouscích na vzduchu po dobu 15 minut. Postup s Ethanolem byl následující:

- 10 krát ponořit do 70% ethanolu
- promýt v 70% Ethanolu po dobu 1 minuty
- 10 krát ponořit do 96% Ethanolu
- promýt v 96% Ethanolu po dobu 1 minuty
- 10 krát ponořit do 99,9% Ethanolu
- promýt v 99,9% Ethanolu po dobu 1 minuty

#### **4.3.5 Aplikace hybridizačního mixu a hybridizace po dobu 60 minut při 55°C**

Na sklíčka bylo aplikováno 25 µl hybridizačního mixu, který obsahoval microRNA ISH pufr (zředit 1ml microRNA ISH pufr s 1 ml RNase- free vodou) a vybranou LNA<sup>TM</sup> microRNA sondou. Před přidáním sondy do microRNA ISH pufru musí být sonda aktivovaná v termostatu při 90°C po dobu 4 minut. Jednotlivé ředění sond viz. Tabulka 2 v příloze. Je nutné se vyvarovat dotknutí pipety v oblasti vzorku. Na každou oblast byla použita sterilní krycí skla. Nakonec byla sklíčka utěsněna Fixogumem (gumový cement). Sklíčka byla přemístěna do Hybridizeru. Hybridizační program byl spuštěn po dobu 1 hodiny. Hybridizační teplota byla 55 °C.

#### **4.3.6 Odstranění Fixogumu a krycího skla**

Fixogum byl odstraněn pomocí pinzety. Je vhodné vyvarovat se sklouznutí sklíček, které by mohlo poškodit vzorek. Poté došlo k odstranění krycího skla a přemístění sklíčka do flakonky s obsahem 5xSSC (20xSSC pH 7.0 zakoupený jako RNase - free, 11=250 ml 20xSSC + 750 ml vody) za laboratorní teploty.

#### **4.3.7 Promytí sklíček v SSC pufrech**

Sklíčka byla promyta ve flakonách v SSC pufrech podle postupu níže. Sklíčka byla přemístěna do flakonek, vždy o požadované koncentraci SSC umístěné ve vodní lázni za při 55 °C. Postup s SSC pufrem(pufry musí být autoklávovány) byl následující:

- promývat sklíčka 5xSSC (1L = 250 ml 20xSSC + 750 ml vody, autoklávovat) po dobu 5 minut při 55 °C ve vodní lázni
- promývat sklíčka 1xSSC ( 1l=50ml 20xSSC + 950 ml vody, autoklávovat) po dobu 5 minut při 55°C ve vodní lázni
- promývat sklíčka 1xSSC ( 1l=50ml 20xSSC + 950 ml vody. autoklávovat) po dobu 5 minut při 55°C ve vodní lázni
- promývat sklíčka 0,2xSSC ( 1l=10ml 20xSSC + 990ml vody, autoklávovat) po dobu 5 minut při 55°C ve vodní lázni
- promývat sklíčka 0,2xSSC po dobu 5 minut při 55°C ve vodní lázni
- promývat sklíčka 0,2xSSC po dobu 5 minut laboratorní teploty

#### **4.3.8 Aplikace hydrofobní bariéry**

Sklíčka byla přesunuta do kyvety s PBS. Vzorčky byly ponechány chvíli v PBS. Poté byla vytaženy na papírové ubrousky a byla nakreslena hydrofobní bariéra okolo vzorků s použitím DAKO – tužky. Nutno dbát, aby jednotlivé preparáty nevyschly.

#### **4.3.9 Inkubace s blokovacím roztokem**

Sklíčka byla umístěna do vlhkostní komůrky a inkubována s blokovacím roztokem (PBS, 0,1% Tween, 2% Sheep serum, 1% BSA) po dobu 15 minut za laboratorní teploty.

#### **4.3.10 Aplikace anti-DIG reagentu po dobu 60 minut**

Byl odstraněn blokovací roztok a aplikován anti-DIG reagent (zředí ovčí anti-DIG-AP antibody 1:800 v antibody ředícím roztoku – PBS, 0,05% Tween, 1% sheep serum, 1% BSA) Inkubace 60 minut ve vlhkostní komůrce za laboratorní teploty.

#### **4.3.11 Promytí v PBS-T**

Skříčka byla promyta 3 krát po 3 minutách v PBS-T (1 ml Tween-20 do 1 l PBS, pH 7,4autoklávovat).

#### **4.3.12 Inkubace s AP substrátem**

Byl aplikovaný čerstvě připravený AP substrát (v 10 ml Milli-Q vody rozpustit NBT-BCIP tabletu, po rozpuštění přidat 20 µl Levamisolu. Nutno připravit AP substrát bez přístupu světla. Inkubace po dobu 2 hodin při 30°C ve vlhkostní komůrce a inkubátoru při 30°C. Vzorky byly chráněny před světlem.

#### **4.3.13 Inkubace skříček v KTBT pufru**

Skříčka byla inkubována v KTBT pufru (do 900ml RNase-free vody přidat 7,9g Tris-HCl (50mM), 8,7g NaCl (150mM) a 0.75g KCl (10mM) - upravit objem do 1000ml, není potřeba upravovat pH, autoklávovat) ve vlhkostní komůrce. Do oblasti vzorku bylo dvakrát po 5 minutách aplikováno 300 µl KTBT pufru.

#### **4.3.14 Promytí vodou**

Skříčka byla promyta vodou dvakrát po 1 minutě.

#### **4.3.15 Dobarvení jádra s Nuclear Fast Red™**

Bylo aplikováno 200 µl Nuclear Fast Red™ pro dobarvení jádra s inkubací 1 minuty.

#### **4.3.16 Oplachování v tekoucí vodě**

Skříčka byla vyjmuta z vlhkostní komůrky a umístěna do kyvety s vodou. Poté byla opatrně propláchnuta v tekoucí vodě přibližně 10 minut.

#### **4.3.17 Dehydratace sklíčků**

Skříčka byla dehydratována v roztoku ethanolu podle následujícího postupu a poté byla přemístěna na čisté papírové ubrousky.

- Ponořit 10 krát do 70% Ethanolu
- Promýt v 70% Ethanolem po dobu 1 minuty
- Ponořit 10 krát do 96% Ethanolu
- Promýt v 96% Ethanolem po dobu 1 minuty
- Ponořit 10 krát do 99,9% Ethanolu
- Promýt v 99,9% Ethanolu po dobu 1 minuty

#### **4.3.18 Zafixování nabarvených preparátů**

Na sklíčka do oblasti preparátu bylo aplikováno několik kapek média (Eukitt) pro zafixování obarvených preparátů.

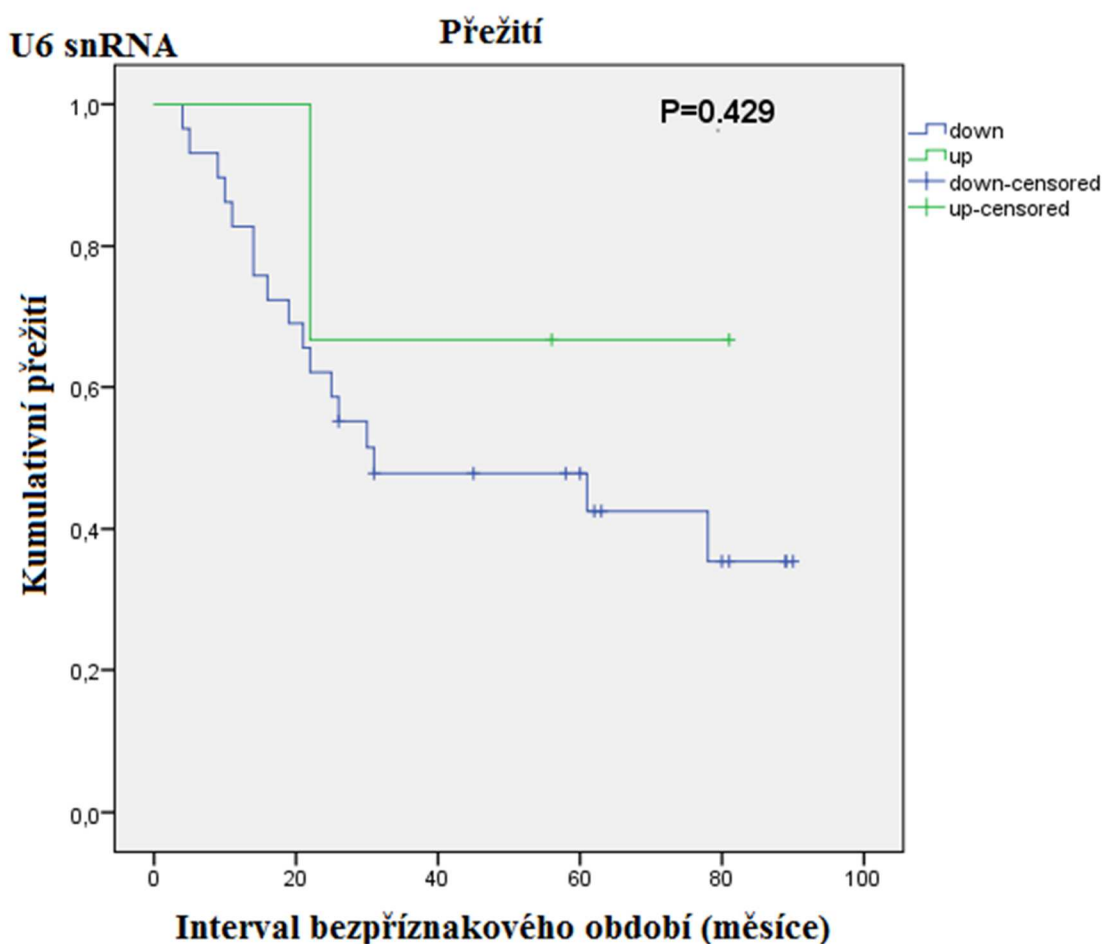
#### **4.3.19 Histologické hodnocení exprese jednotlivých miRNA**

Za pozitivní byla považována exprese miRNA ve více než 10% nádorové populaci. Vzorky byly analyzovány pomocí světelného mikroskopu následující den a foceny pomocí kamery DP71 v programu QUICKPHOTOMICRO 2.3.

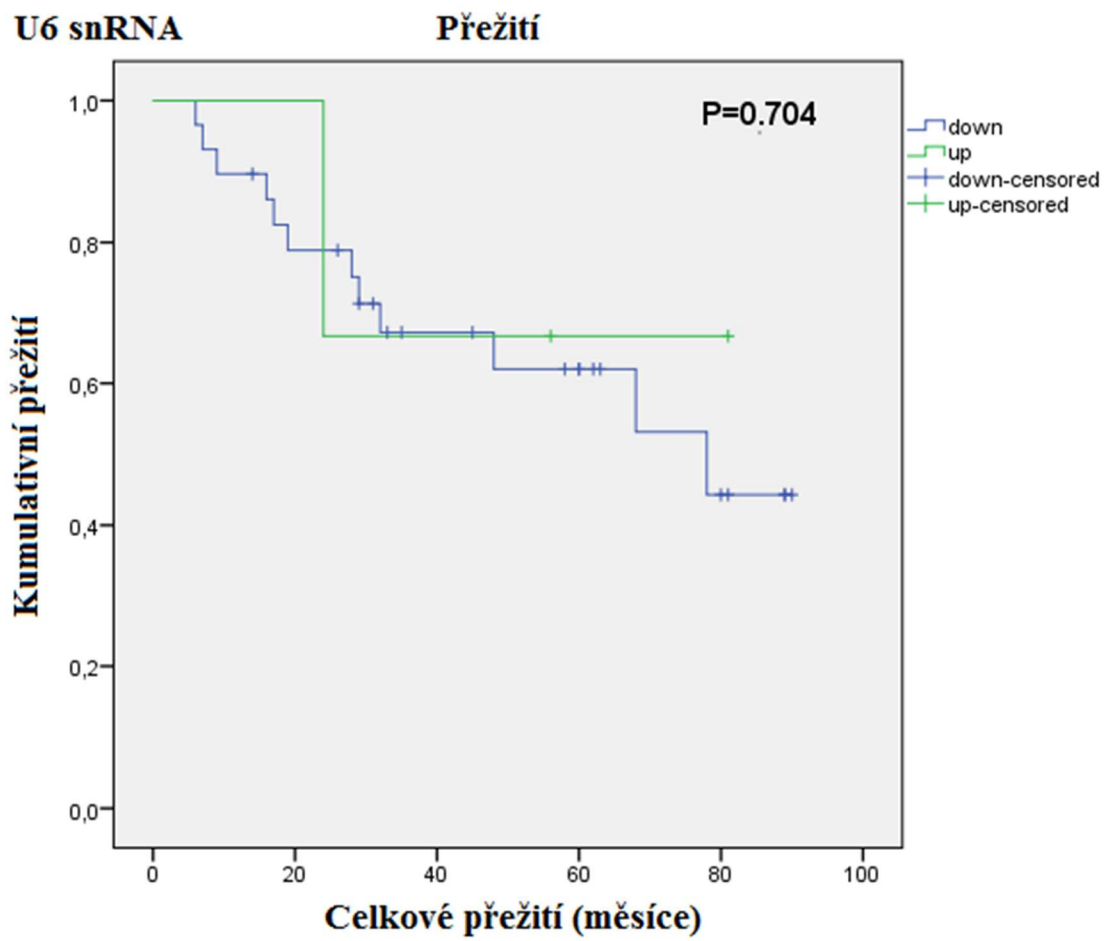
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Vyhodnocení U6 snRNA

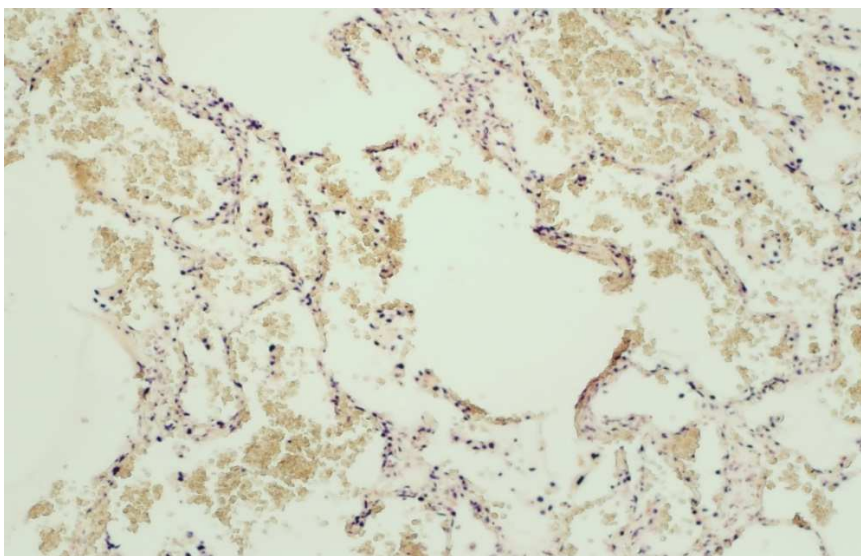
Expres U6 byla přítomna v normální, jaterní a nádorové tkáni. Expres byla výrazná ve viabilní nádorové tkáni. Zvýšená expres byla pozorována u spinocelulárního karcinomu ve srovnání s ostatními tkáněmi. Za pozitivní byla považována nukleární expres. Dále byla pozorována expres u lymfocytů v zánětlivých ložiscích.



Obr. 1: Korelace mezi expresí U6 snRNA a intervalem bezpříznakového období. Z grafu je zřejmé, že nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi expresí miRNA U6 a intervalem bezpříznakového období.  $P = 0.429$

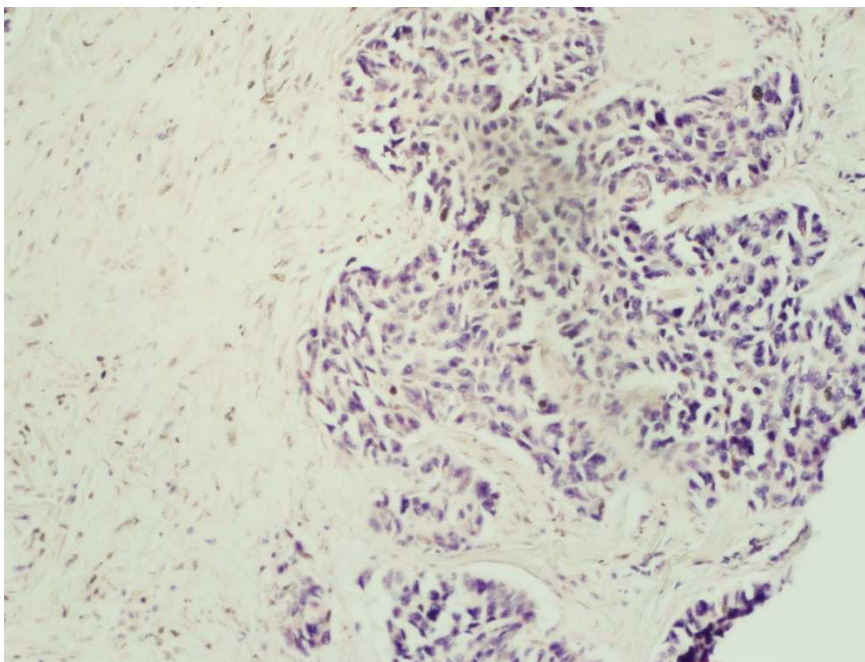


Obr. 2: Korelace mezi expresí U6 snRNA a celkovým přežitím. Z grafu je zřejmé, že nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi expresí U6 snRNA a celkovým přežitím.  $P = 0.704$

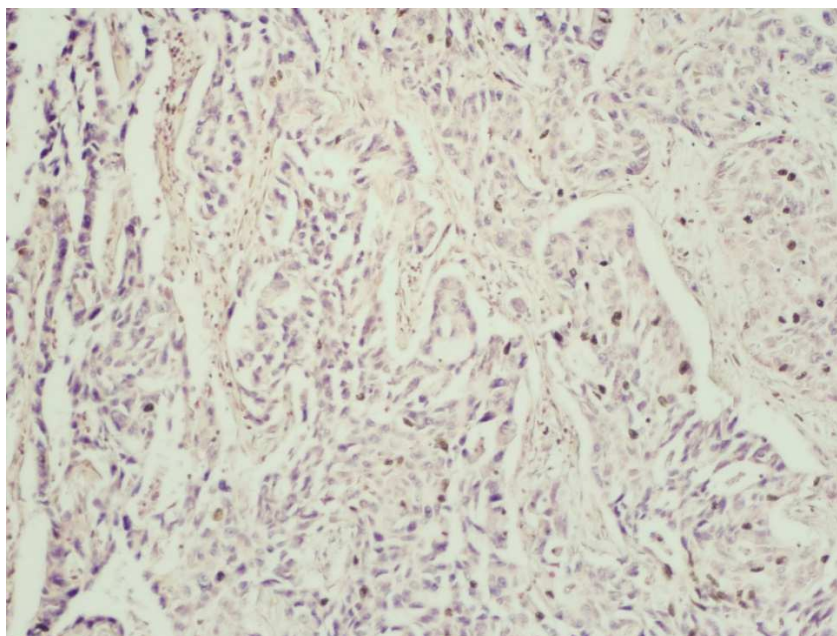


Obr. 3: Fotografie exprese U6 snRNA v normální plicní tkáni při zvětšení 100x





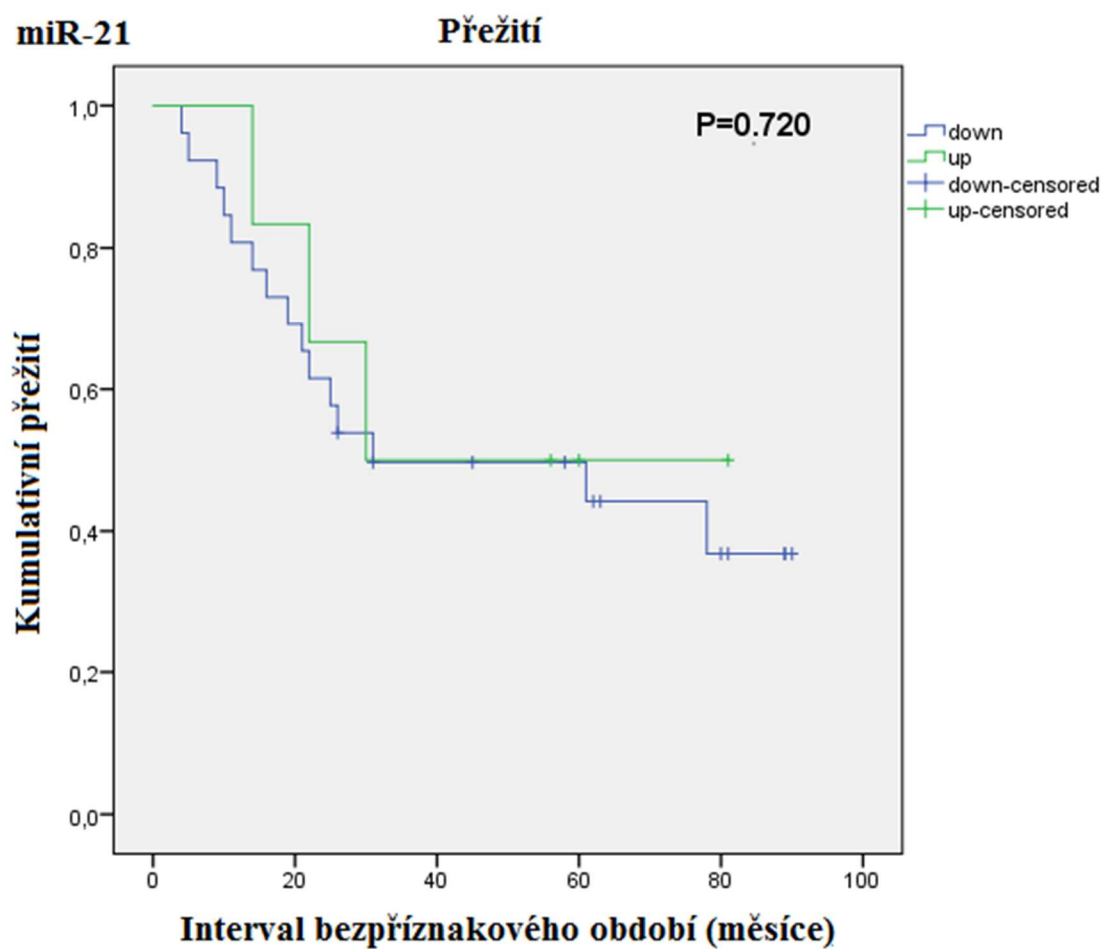
*Obr. 4: Fotografie exprese U6 snRNA ve spinocelulárním karcinomu při zvětšení 100x*



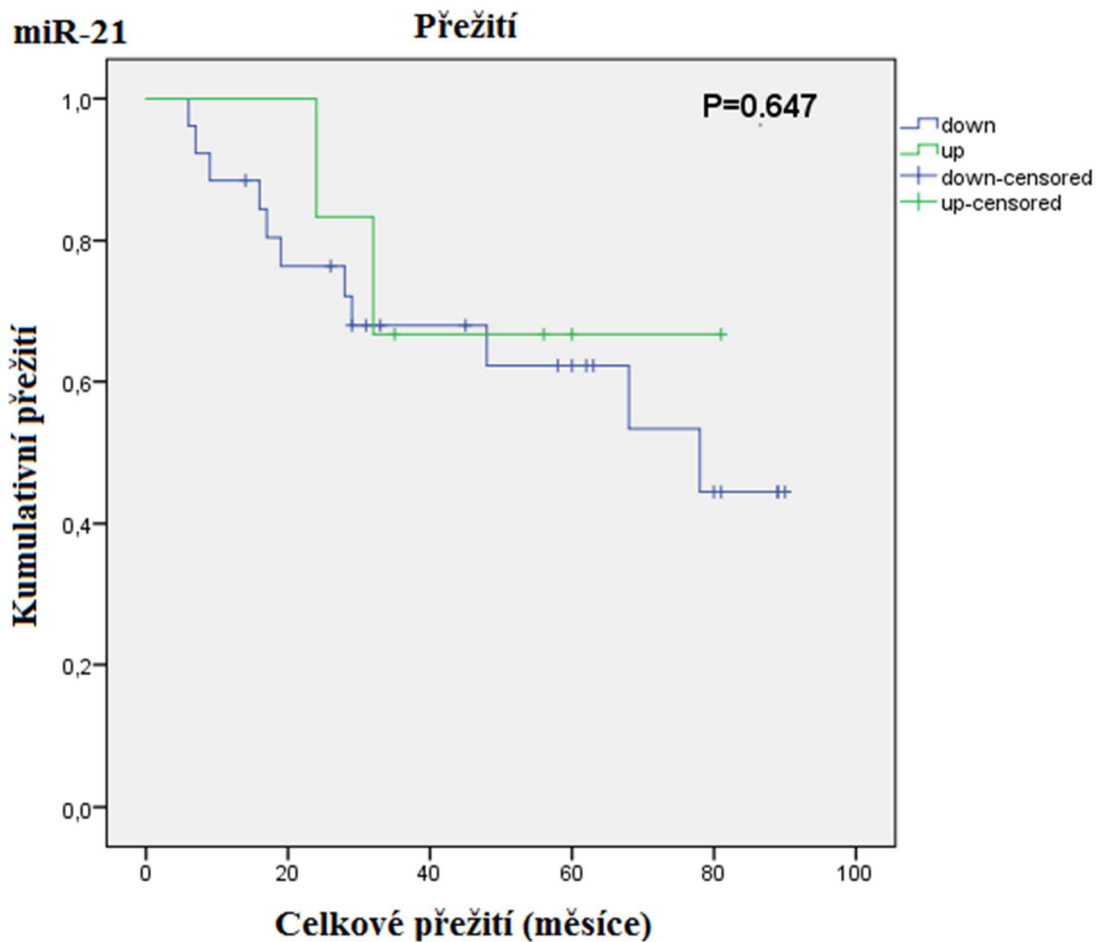
*Obr. 5: Fotografie exprese U6 snRNA v adenokarcinomu při zvětšení 100x*

## 5.2 Vyhodnocení miR-21

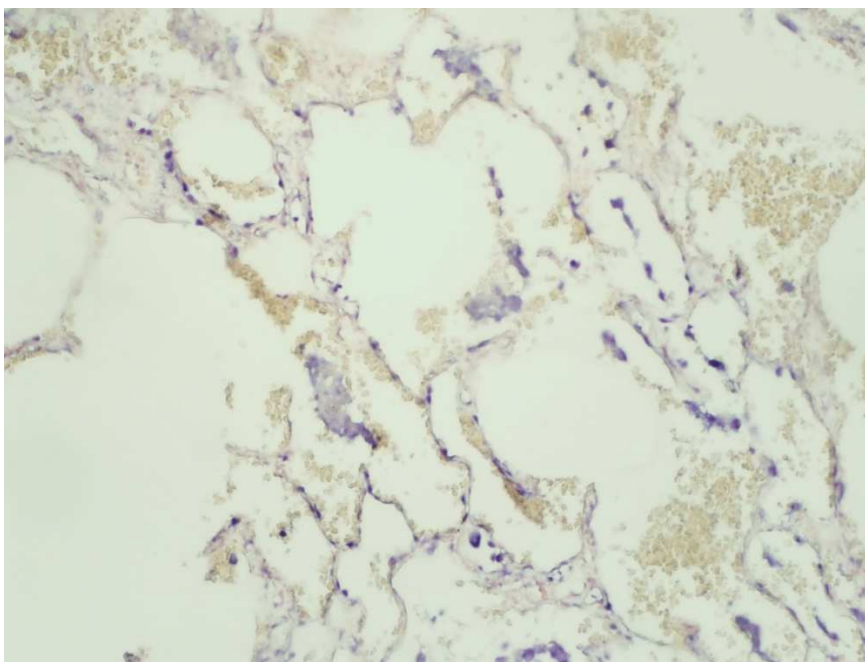
Byla pozorována upregulace u spinocelulárního karcinomu.



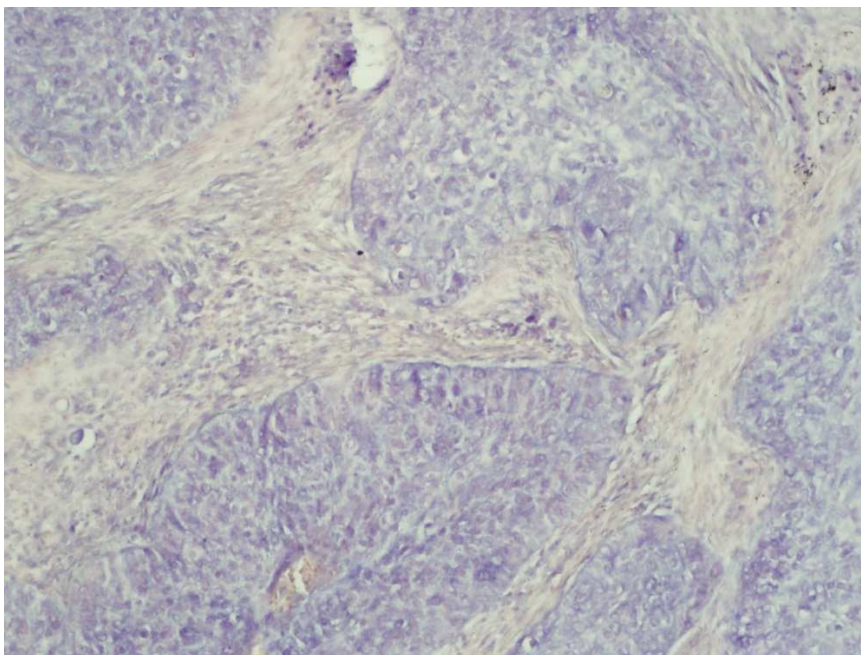
Obr. 6: Korelace mezi expresí miR-21 a intervalem bezpříznakového období. Z grafu je zřejmé, že nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi expresí miR-21 a intervalem bezpříznakového období.  $P = 0.720$



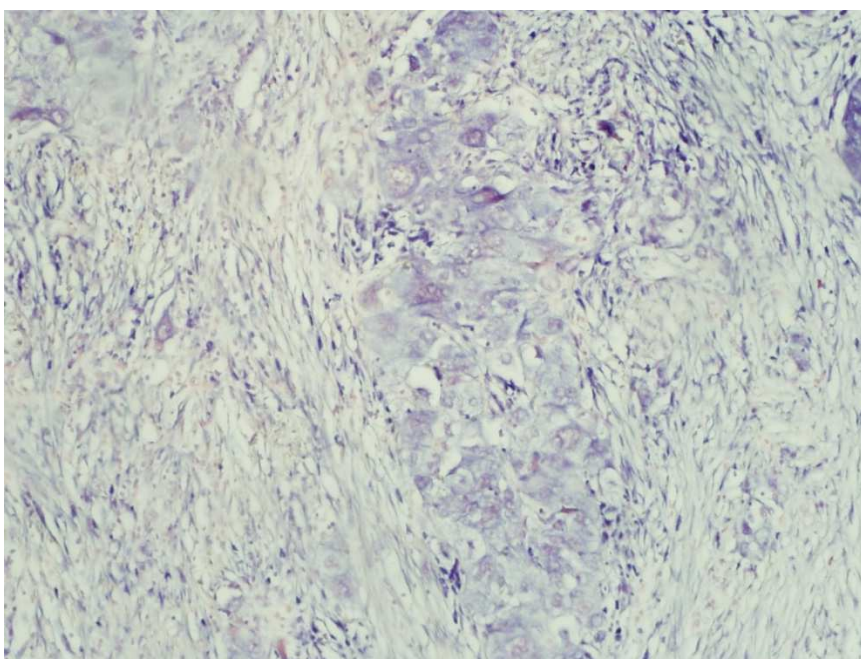
Obr. 7: Korelace mezi expresí miR-21 a celkovým přežitím. Z grafu je zřejmé, že nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi expresí miR-21 a celkovým přežitím.  $P = 0.647$



Obr. 8: Fotografie exprese miR-21 v normální plicní tkáni při zvětšení 100x



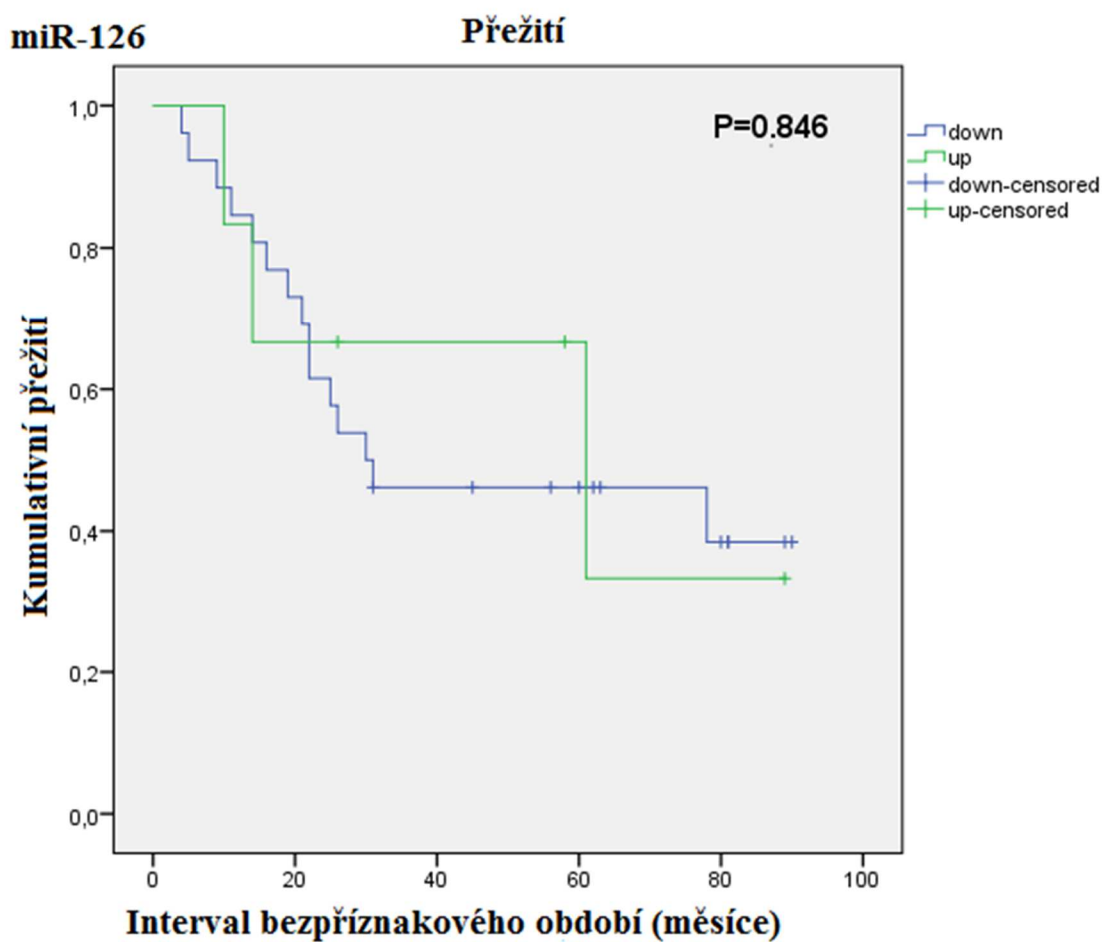
*Obr. 9: Fotografie exprese miR-21 ve spinocelulárním karcinomu při zvětšení 100x*



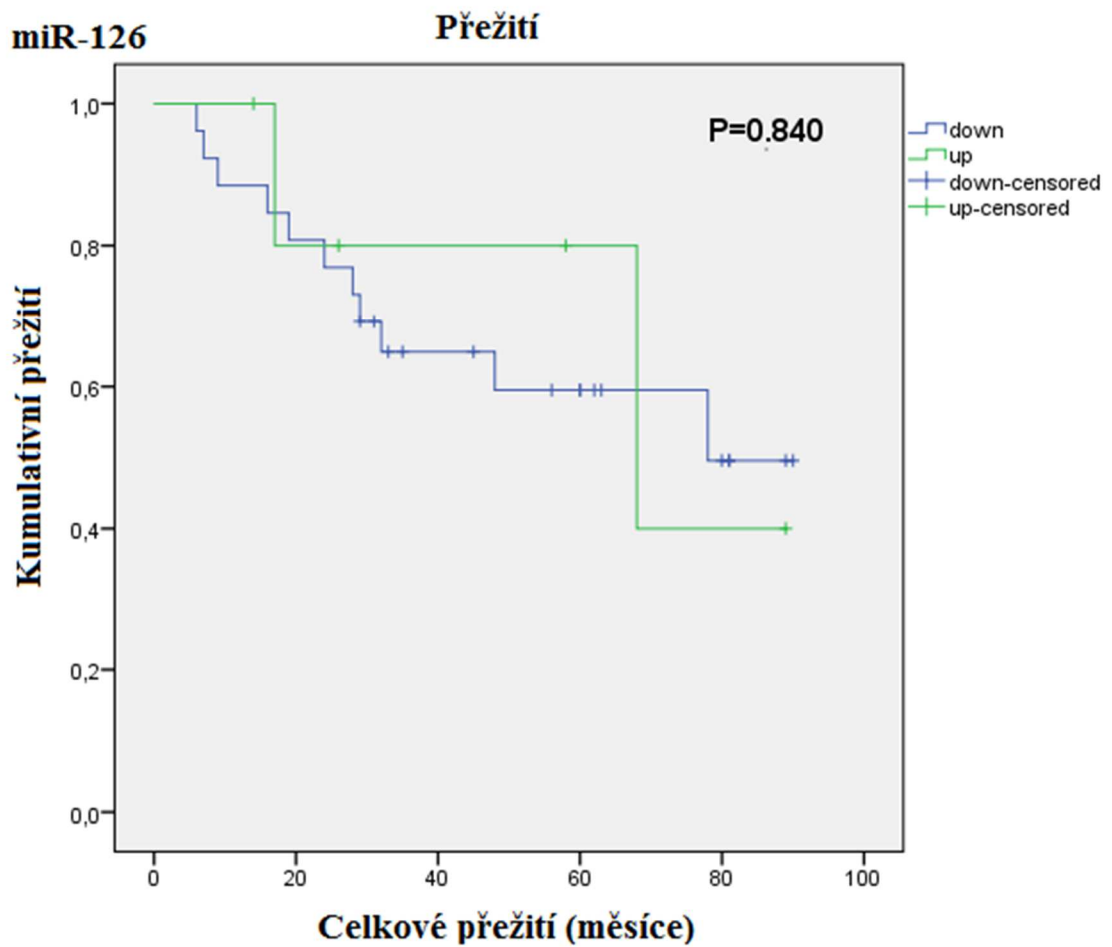
*Obr. 10: Fotografie exprese miR-21 v adenokarcinomu při zvětšení 100x*

### 5.3 Vyhodnocení miR-126

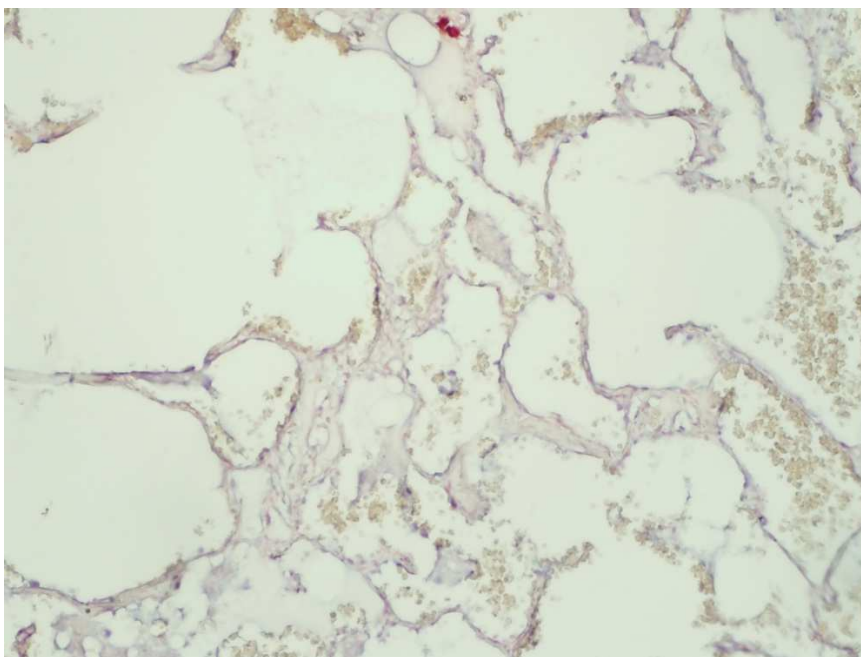
U miR-126 byla exprimována v normální plicní tkáni. Výraznější pozitivita byla pozorována u adenokarcinomu, naopak u spinocelulárního karcinomu nebyla pozorována pozitivita.



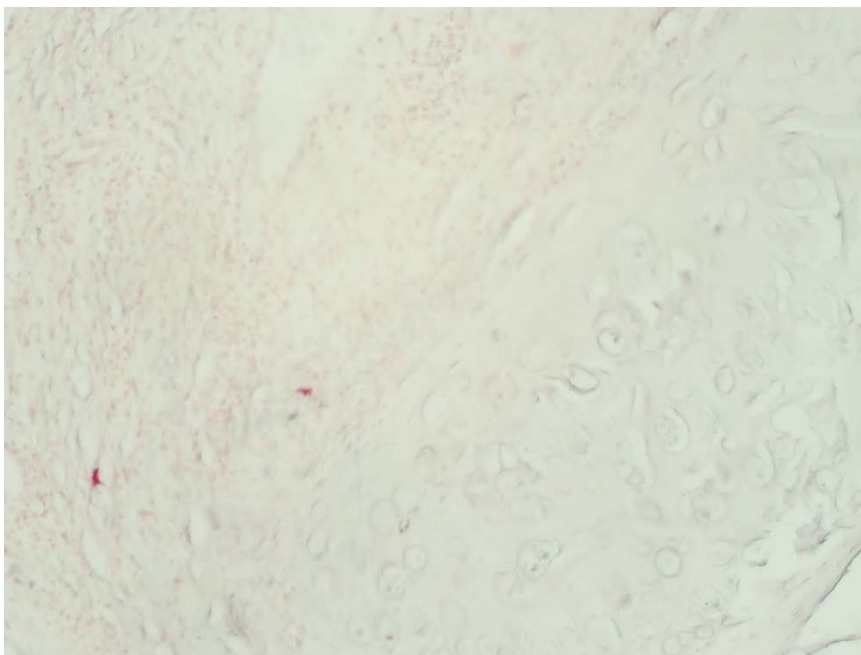
Obr. 11: Korelace mezi expresí miR- 126 a intervalem bezpříznakového období. Z grafu je zřejmé, že nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi expresí miR-126 a intervalem bezpříznakového období.  $P = 0.846$



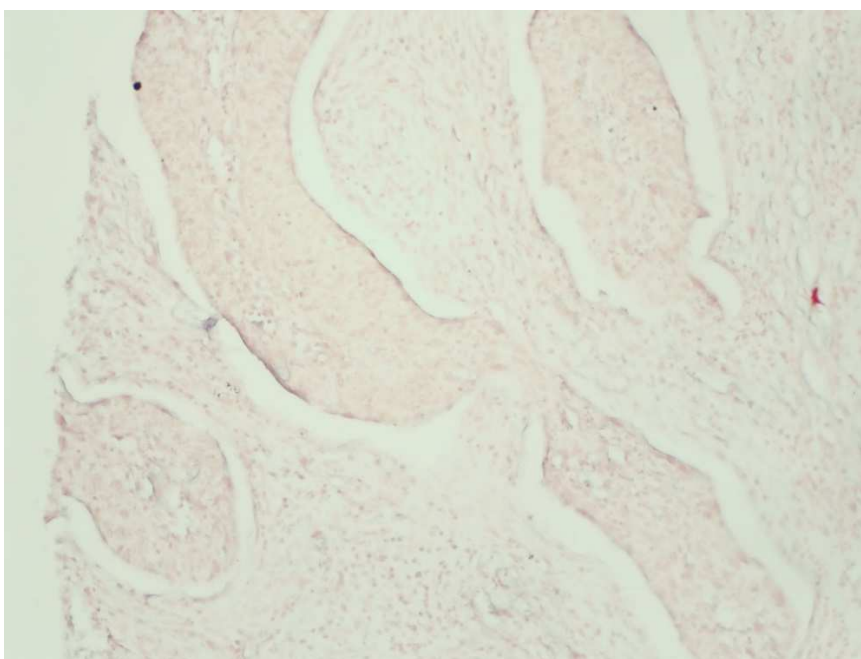
Obr. 11: Korelace mezi expresí miR-126 a celkovým přežitím. Z grafu je zřejmé, že nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi expresí miR-126 a celkovým přežitím.  $P = 0.840$



Obr. 12: Fotografie exprese miR-126 v normální plicní tkáni při zvětšení 100x



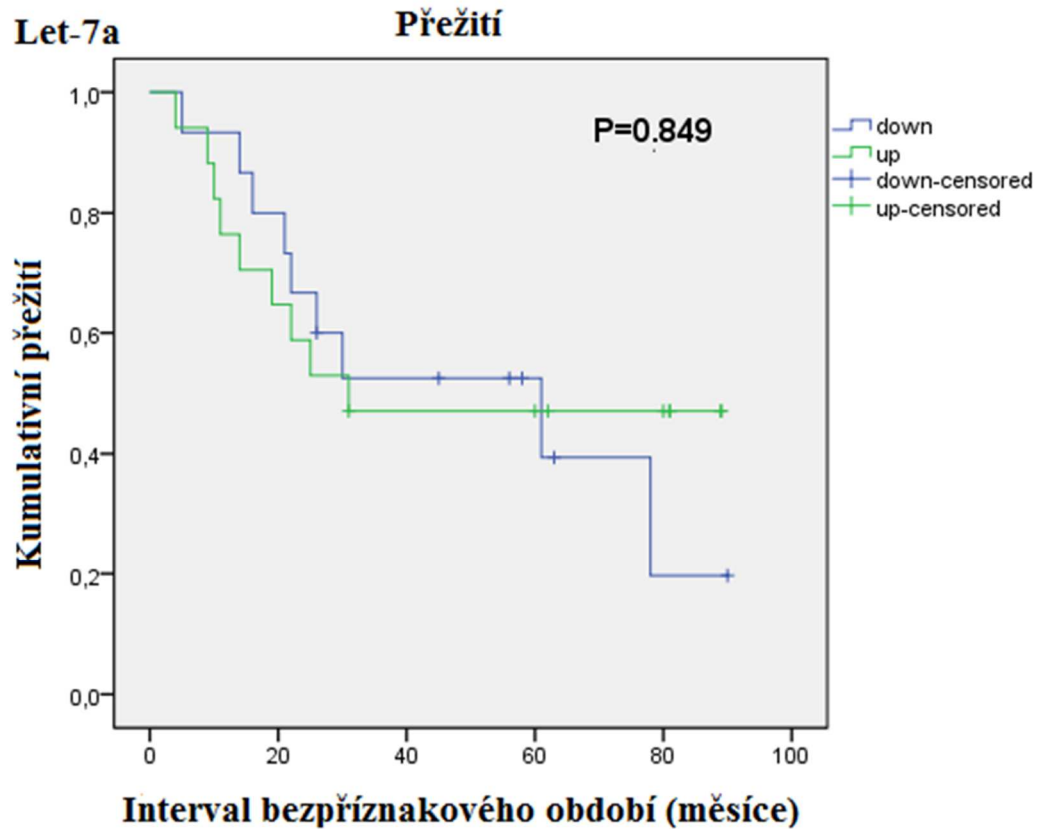
*Obr. 13: Fotografie exprese miR-126 ve spinocelulárním karcinomu při zvětšení 100x*



*Obr. 14: Fotografie exprese miR-126 v adenokarcinomu při zvětšení 100x*

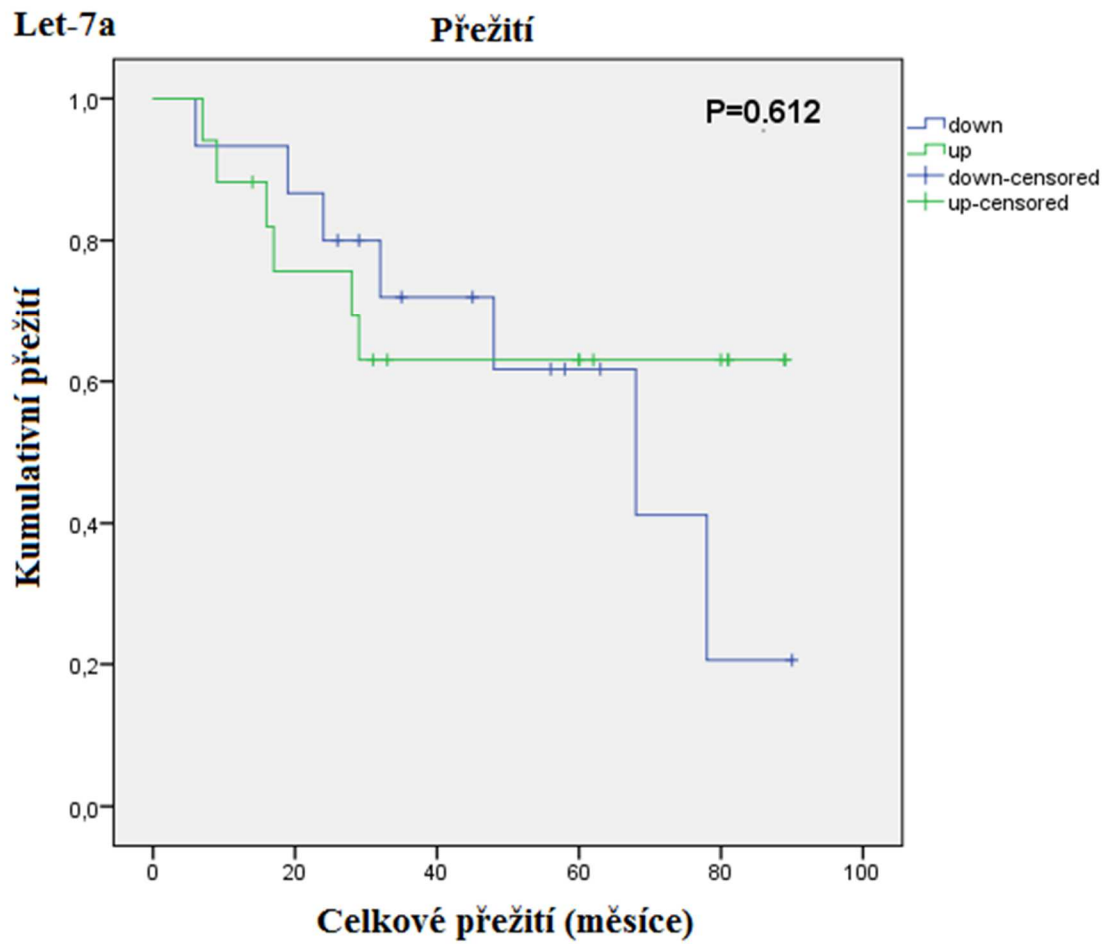
## 5.4 Vyhodnocení Let-7a

U jatrní tkáně a spinocelulárního karcinomu byla pozorována pozitivní exprese Let-7a. V ojedinělých případech byla pozorována pozitivní exprese v adenokarcinomu a také v normální plicní tkáni v bronších.

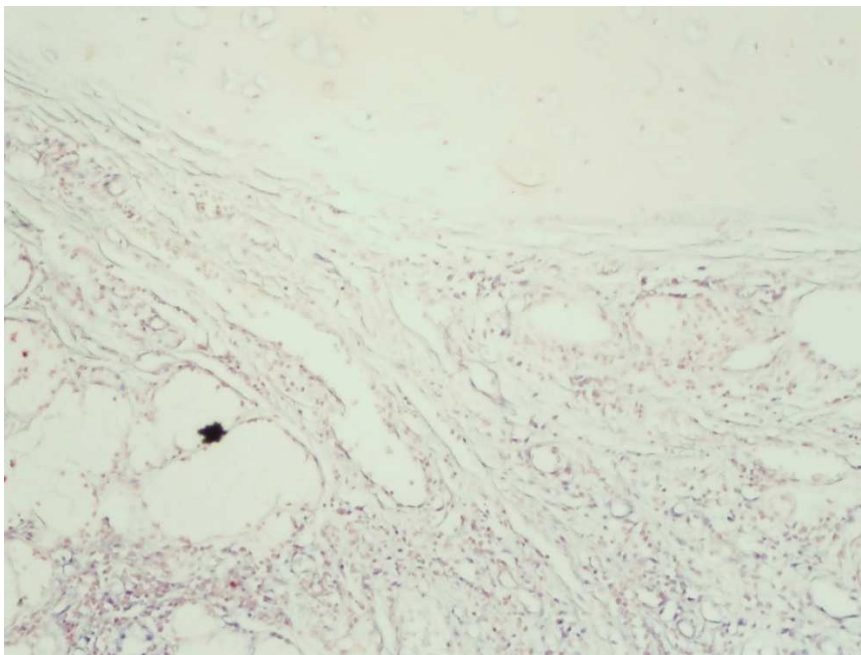


Obr. 15: Korelace mezi expresí Let-7a a intervalem bezpříznakového období. Z grafu je zřejmé, že nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi expresí Let-7a a intervalem bezpříznakového období.  $P = 0.849$

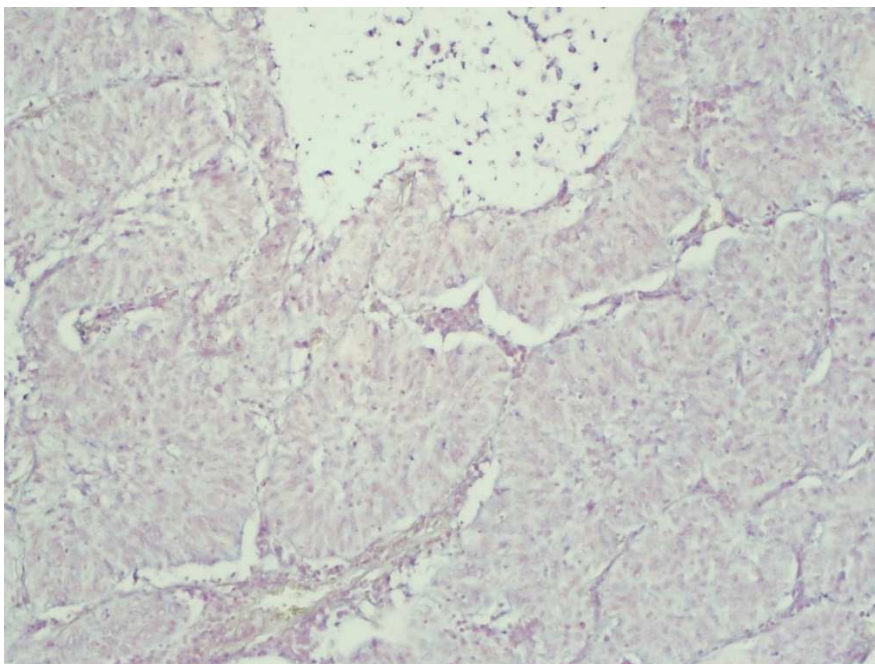




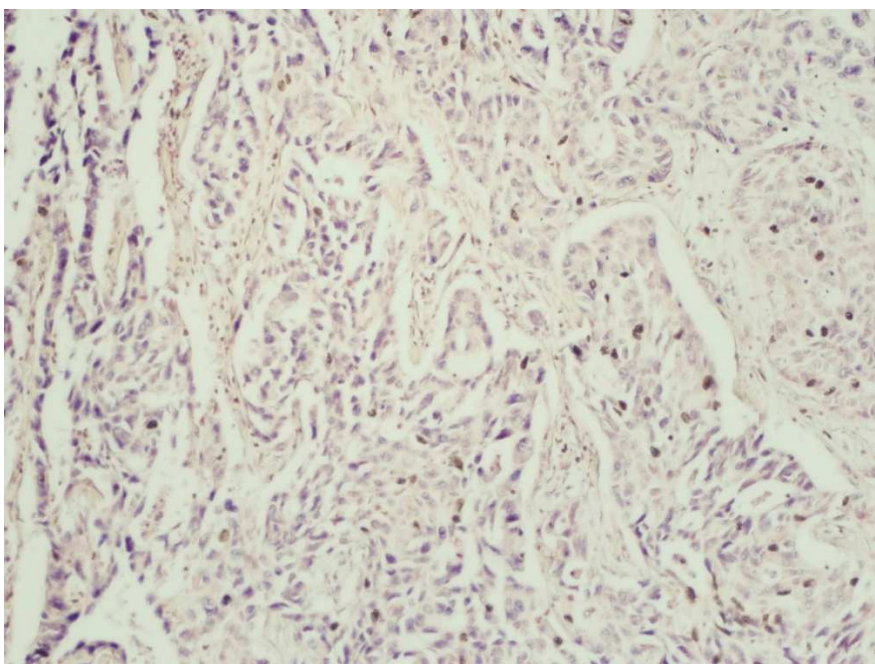
Obr. 16: Korelace mezi expresí *Let-7a* a celkovým přežitím. Z grafu je zřejmé, že nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi expresí *Let-7a* a celkovým přežitím.  $P = 0.612$



Obr. 17: Fotografie exprese *Let-7a* v normální plicní tkáni při zvětšení 100x



*Obr. 18: Fotografie exprese Let-7a ve spinocelulárním karcinomu při zvětšení 100x*



*Obr. 19: Fotografie exprese Let-7a v adenokarcinomu při zvětšení 100x*

## 6. DISKUZE

Karcinom plic patří mezi velice závažné onemocnění, bývá nejčastěji příčinou úmrtí mužů na onkologické onemocnění a druhou nejčastější příčinou onkologické mortality u žen. Nepříznivým faktorem pro dlouhodobé přežívání pacientu s karcinomem plic je fakt, že přibližně tři čtvrtiny onemocnění jsou diagnostikovány v pokročilém často inoperabilním stádiu. Léčba nemalobuněčného karcinomu plic se odvíjí od klinického stádia onemocnění. Mezi základní léčebné postupy patří chemoterapie, radioterapie a v poslední době se do popředí dostává cílená biologická léčba (www.kurakovaplice.cz, zdroje statistik – WHO, Český statistický úřad ČSÚ, doc. MUDr. Eva Králíková, CSc.) Jednou z nejčastějších příčin selhávání chemoterapie u NSCLC je výskyt mnohočetné lékové rezistence. Tato je definována jako rezistence na cytostatika s různou strukturou a mechanismem účinku. Procesy regulace buněčného cyklu a apoptóza jsou významnou mírou zapojené v daném procesu mnohočetné lékové rezistence. Klíčovou roli v regulaci daných procesů mají miRNA. Právě miRNA jsou schopné kontrolovat stovky až tisíce genů zapojených v buněčných procesech jako je diferenciaci, regulace buněčného cyklu, odezva na cytotoxický stres a apoptóza.

V dané bakalářské práci jsme proto pomocí *in situ* hybridizace vizualizovali expresi a lokalizaci vybraných miRNA zapojených do procesu mnohočetné lékové rezistence - miR-21, Let-7a, miR-126 a U6 snRNA ve formalínu fixovaných a do parafinu zalitých vzorcích nemalobuněčných karcinomů plic a následně jsme korelovali expresi a lokalizaci jednotlivých miRNA s histologickými subtypy nemalobuněčných karcinomů plic s délkou přežití a délkou bez příznakového období u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic.

V literatuře byly doposud identifikovány různé miRNA, které jsou považovány za specifické prognostické klasifikátory (potencionálními prediktory odpovědi nemalobuněčných karcinomů plic na chemoterapii) tedy miR-155, miR-21, miR-34 a Let-7 (Miaomiao Yang et al., 2013; Fassina A. et al. 2011).

Proto jsme pomocí *in situ* hybridizace vizualizovali expresi a lokalizaci vybraných miRs zapojených do procesu mnohočetné lékové rezistence - miR-21, Let-7a, miR-126 a U6 snRNA ve formalínu fixovaných a do parafínu zalitých vzorcích nemalobuněčných karcinomů plic a následně jsme korelovali expresi a lokalizaci jednotlivých miRNA s histologickými subtypy nemalobuněčných karcinomů plic s délkou přežití a délkou bez příznakového období u pacientů s NSCLC.

Výsledky exprese U6 snRNA nám potvrdili, že metodika funguje. U6 snRNA je house keeping genem. Exprese byla pozorována v jaterní a normální plicní tkáni, ale i v nádorové tkáni. Výrazná exprese se vyskytovala ve viabilní nádorové tkáni. Značná exprese U6 snRNA se vyskytovala také u lymfocytů a v zánětlivých ložiscích. Prognostický význam exprese rodiny U6 snRNA nebyl doposud v literatuře jednoznačně objasněný u pacientů s NSCLC. (OS-0,704;DFS-0,429).

U pacientů s NSCLC byla prokázána upregulace miR-21, která inhibuje tumor-supresorový gen PTEN, kterého funkcí je inhibice signální dráhy PI3K/Akt a tím také i blokáda buněčného cyklu ve fázi G1 (Zhang et al., 2010; DeVita et al., 2008). Prognostický a prediktivní význam dané miRNA však nebyl spolehlivě u jednotlivých histologických subtypů NSCLC objasněn. Naše získané předběžné výsledky poukazují na upregulaci miR-21 a to hlavně v spinocelulárních karcinomech, a také v adenokarcinomech, což je v souladu s výše uvedenými studiemi zabývajícími se expresí a prognostickým významem miR-21 u pacientů s NSCLC. V rámci naší pilotní studie nebyl potvrzený prognostický význam exprese dané miRNA v rámci souboru pacientů s neoadjuvantní chemoterapií.(OS-0,647; DFS-0,720)

Downregulace miR-126 byla popsána u spinocelulárního karcinomu plic a některých typů adenokarcinomu (Shusheng Wang et al., 2008; Calin, 2004; Feng et al., 2010). Daná miRNA má vztah k angiogenezi spolu s miR-155, miR-21 a miR-424 (Tom Donnem et al., 2012). Prognostický a prediktivní význam dané miRNA není u pacientů s NSCLC jednoznačně objasněný. Dle našich pilotních výsledků jsme neprokázali prognostický a

prediktivní význam exprese dané miRNA u pacientů s NSCLC. (OS-0,840; DFS-846)

Členové Let-7 rodiny fungují jako nádorové supresory (Cheng-Chia Yu *et al.*, 2011). Ve srovnání s normální tkání s nádorovou tkání je exprese členů Let-7 family v průběhu progresu nádoru downregulována. Downregulace Let-7 je spojena s horším přežitím u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (Takamizava *et. al.*, 2004). U Let-7a byla v ojedinělých případech pozorována pozitivní exprese u spinocelulárního karcinomu, adenokarcinomu a v jaterní tkáni. Lze konstatovat, že exprese Let-7a byla v našich případech NSCLC downregulována. V rámci naší studie nebyl zjištěný na dané pilotním souboru pacientů s neoadjuvantní chemoterapie prognostický význam exprese dané miRNA. Pro jednoznačné ověření prognostického významu exprese výše uvedených námi studovaných miRNA bude potřebná multicentrická retrospektivní studie s větším množstvím pacientů s NSCLC, kterým byla podána neoadjuvantní chemoterapie. (OS-0,612; DFS-0,849)

## 7. ZÁVĚR

Závěrem lze říci, že metodu ISH, lze použít ke stanovení upregulace či downregulace jednotlivých miRNAs ve formalínu fixovaných a parafínu zalitých vzorcích nemalobuněčného karcinomu plic.

Uvedená metoda zároveň umožňuje zjistit lokalizaci miRNA v buněčném nádorovém epitelu a stromální komponentě nádoru.

Daná metoda ISH byla aplikována na tkáňové microarrays.

Výsledky získané námi vyselektovaných miRNAs jsou v souladu se současnými literárními poznatky.

## 8. SEZNAM LITERATURY

An Zhao, Guorong Li, Michel Péoc'h, Christian Genin, Marc Gigante, Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma, *Experimental and Molecular Pathology*, Volume 94, Issue 1, February 2013, Pages 115–120

Boye Schnack Nielsen, MicroRNA In Situ Hybridization, Next-Generation MicroRNA Expression Profiling Technology, *Methods in Molecular Biology* Volume 822, 2012, pp 67-84.

Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. and Croce, C.M. (2004): Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9): 2999-3004

Crawford, M., Brawner, E., Batte, K., Yu, L., Hunter, M.G., Otterson, G.A., Nuovo, G., Marsh, C.B. and Nana-Sinkam, S.P. (2008): MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung

DeVita, V.T., Lawrence, T.S., Rosenberg, S.A., DePinho, R.A. and Weinberg, R.A. (2008): DeVita, Hellman, and Rosenberg's *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. Lippincott Williams & Wilkins, New York, 3200 s

Di Leva G, Garofalo M, Croce CM, MicroRNAs in cancer, *Annu Rev Pathol.* 2014;9:287-314

Donnem T, Eklo K, Berg T, Sorbye SW, Lonvik K, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Stenvold H, Bremnes RM, Busund LT, Prognostic impact of MiR-155 in non-small cell lung cancer evaluated by in situ hybridization, *Journal of Translational Medicine* 2011, 9:6

Dorsett Y, McBride KM, Jankovic M, Gazumyan A, Thai TH, Robbiani DF, Di Virgilio M, Reina San-Martin B, Heidkamp G, Schwickert TA, Eisenreich T, Rajewsky K, Nussenzweig MC., MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation, *Immunity*. 2008 May;28(5):630-8

Fassina A, Cappellesso R, Fassan M, Classification of non-small cell lung carcinoma in transthoracic needle specimens using microRNA expression profiling, *Chest*. 2011 Nov;140(5):1305-11

Feng, R., Chen, X., Yu, Y., Su, L., Yu, B., Li, J., Cai, Q., Yan. M., Liu, B. and Zhu, Z. (2010): miR-126 functions as a tumour suppressor in human gastric cancer. *Cancer Letters* 298:50-63

Gallardo E, Navarro A, Viñolas N, Marrades RM, Diaz T, Gel B, Quera A, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Ramirez J, Monzo M, miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer, *Carcinogenesis* 2009 Nov;30(11):1903-9

Gianpiero Di Leva, Michela Garofalo, and Carlo M. Croce, MicroRNAs in Cancer, *Annual Review of Pathology (2014): Mechanisms of Disease*, Vol. 9: 287-314

Gottardo, F., Liu, C.G., Ferracin, M, Calin, G.A., Fassan, M., Bassi, P., Sevignani, C., Byrne, D., Negrini, M., Pagano, F., Gomella, L.G., Croce C.M. and Baffa, R. (2007): Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urologic Oncology* 25: 387-392

Gianpiero Di Leva, Michela Garofalo, and Carlo M. Croce, MicroRNAs in Cancer, *Annual Review of Pathology (2014): Mechanisms of Disease*, Vol. 9: 287-314

Heusschen, R., van Gink, M., Griffioen, A.W. and Thijssen, V.L. (2010): Micro-RNAs in the tumor endothelium: novel controls on the angioregulatory switchboard. *Biochimica et Biophysica Acta* 1805: 87-96



Hummel R, Hussey DJ, Haier J., MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types, *European Journal of Cancer*, Volume 46, Issue 2, January 2010, Pages 298–311

Cheng-Chia Yu , Yi-Wei Chen, Guang-Yuh Chiou, Lo-Lin Tsai , Pin-I Huang, Charne-Yung Chang, Ling-Ming Tseng, Shih-Hwa Chiou, Sang-Hue Yen, Ming-Yung Chou, Pen-Yuan Chu, Wen-Liang Lo, MicroRNA let-7a represses chemoresistance and tumorigenicity in head and neck cancer via stem-like properties ablation, *Oral Oncology* Volume 47, Issue 3, March 2011, Pages 202–21

Jiang J., Lee E.J., Gusev Y. and Schmittgen, T.D. (2005): Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Research* 33: 5394-5403

Jørgensen S, Baker A, Møller S, Nielsen BS, Robust one-day in situ hybridization protocol for detection of microRNAs in paraffin samples using LNA probes, *Methods*. 2010 Dec;52(4):375-81.

Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D. and Slack, F.J.(2005): RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120: 635-47

Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R. and Jacks, T. (2007): Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature Genetics* 39: 673-677

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001): Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853-858

Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. and Bartel, D.P. (2001): An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 858-862

Lebanony, D., Benjamin, H., Gilad, S., Ezagouri, M., Dov, A., Ashkenazi, K., Gefen, N., Izraeli, S., Rechavi, G., Pass, H., Nonaka, D., Li, J., Spector, Y., Rosenfeld, N., Chajut, A., Cohen, D., Aharonov, R. and Mansukhani, M. (2009): Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma

Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993): The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5): 843-854

Miaomiao Yanga, Hongchang Shena, Chen Qiua, Yang Nia, Liguang Wanga, Wei Donga, Yida Liaoa, Jiajun Du, High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer, *European Journal of Cancer*, Volume 49, Issue 3, February 2013, Pages 604–615

M-P Puisségur, N M Mazure, T Bertero, L Pradelli, S Grosso, K Robbesermeant, T Maurin, K Lebrigand, B Cardinaud, V Hofman, S Fourre, V Magnone, J E Ricci, J Pouysségur, P Gounon, P Hofman, P Barbry, B Mari, miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity, *Cell Death Differ.* Mar 2011; 18(3): 465–478

Prof. MUDr. Jiří Klein, Ph. D., kniha *Chirurgie karcinomu plic*, vydavatelství Grana, 2006

Prof. MUDr. Petr Zatloukal, *Chemoterapie karcinomu plic*, CSc., Med. Pro Praxi 2008; 5(1): 23–27

Sandler A, Herbst R., Combining targeted agents: blocking the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor pathways, *Clin Cancer Res.* 2006 Jul 15;12(14 Pt 2):4421s-4425s.

Shusheng Wang, Arin B. Aurora, Brett A. Johnson, Xiaoxia Qi, John McAnally, Joseph A. Hill, James A. Richardson, Rhonda Bassel-Duby, Eric N. Olson, The Endothelial-Specific MicroRNA miR-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis, *Developmental Cell*, Volume 15, Issue 2, 12 August 2008, Pages 261–271

Skříčková J., Čoupek P., Babičková L., Tomíšková M., Kaplanová J., Princ D., Kadlec B., Špelda S, *Klinická onkologie*, 15. prosince 2008, volume 21

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T, Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival, *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3753-6

Tom Donnem, Christopher G. Fenton, Kenneth Lonvik, Thomas Berg, Katrine Eklo, Sigve Andersen, Helge Stenvold, Khalid Al-Shibli Samer Al-Saad, Roy M. Bremnes, Lill-Tove Busund, MicroRNA Signatures in Tumor Tissue Related to Angiogenesis in Non-Small Cell Lung Cancer, *PLoS One*. 2012;7(1):e29671

Weiqi Nian, Xujun Ao, Yongzhong Wu, Yi Huang, Jianghe Shao, Yiming Wang, Zhengtang Chen, Fanglin Chen, Donglin Wang, miR-223 functions as a potent tumor suppressor of the Lewis lung carcinoma cell line by targeting insulin-like growth factor-1 receptor and cyclin-dependent kinase, *Oncology letters* Aug 2013; 6(2): 359–36

Xiang-hua Liu, Kai-hua Lu, Ke-ming Wang, Ming Sun, Er-bao Zhang, Jin-song Yang, Dan-dan Yin, Zhi-li Liu, Jing Zhou, Zhi-jun Liu, Wei De, Zhao-xia Wang, MicroRNA-196a promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion through targeting HOXA5, *BMC Cancer*. 2012; 12: 348.

Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, Liu Q, Jiang K, Yang GH, MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC), *Clinica Chimica Acta*. 2010 Jun 3;411(11-12):846-52

Zhi-Hong Li, Hong Zhan, Zhi-Guang Yang, Guo-Qiang Wen, You-Bing Cui, Guo-Guang Shao, Prognostic significance of serum microRNA-210 levels in nonsmall-cell lung cancer, J Int Med Res. 2013 Oct;41(5):1437-44

Zhuo Dong, Zhiwei Zhong, Lihua Yang, Shaomin Wang, Zhaohui Gong, MicroRNA-31 inhibits cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells by regulating the drug transporter ABCB9, Cancer letters Volume 343, Issue 2, 28 February 2014, Pages 249–257

Exiqon, miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit(FFPE), Instruction manual v2.0

[www.kurakovaplice.cz](http://www.kurakovaplice.cz), zdroje statistik – WHO, Český statistický úřad ČSÚ, doc. MUDr. Eva Králíková, CSc.

[www.miRBase.org](http://www.miRBase.org)

## **PŘÍLOHY**

## PŘÍLOHA 1

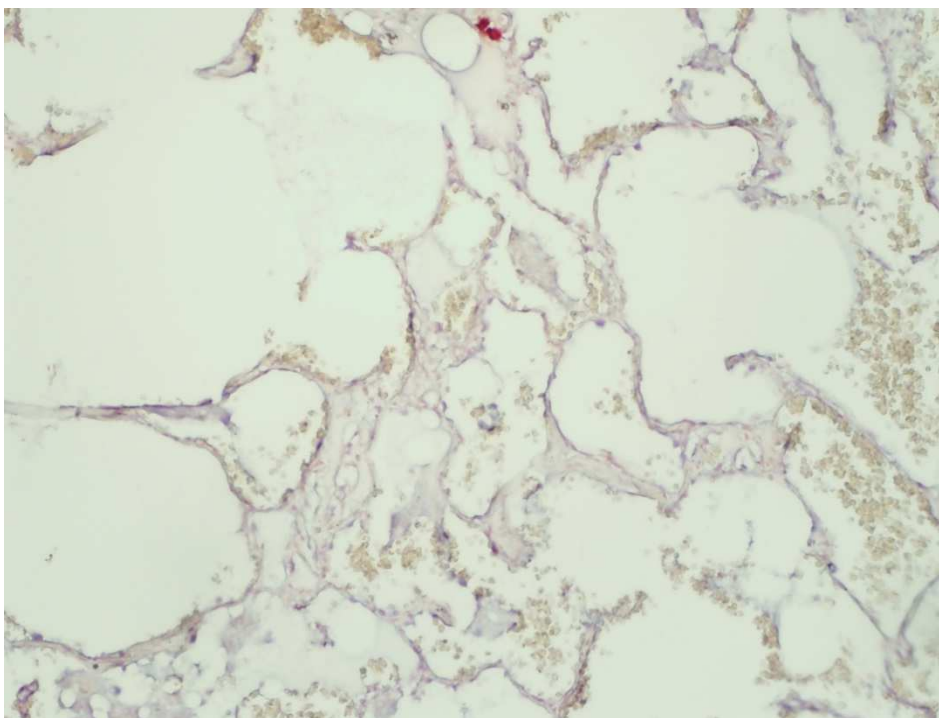
### Příprava a koncentrace sond

*Tabulka P1: Příprava a koncentrace sond*

Sonda	Objem sondy	Objem 1x ISH pufru	Koncentrace sondy
LNA <sup>TM</sup> U6 snRNA	12 $\mu$ l	2 ml	3 nm
LNA <sup>TM</sup> miR-21	3,2 $\mu$ l	2 ml	40 nm
LNA <sup>TM</sup> miR-126	3,2 $\mu$ l	2 ml	40 nm
LNA <sup>TM</sup> Let-7a	3,2 $\mu$ l	2 ml	40 nm
LNA <sup>TM</sup> scrambled microRNA	3,2 $\mu$ l	2 ml	40 nm

## PŘÍLOHA 2

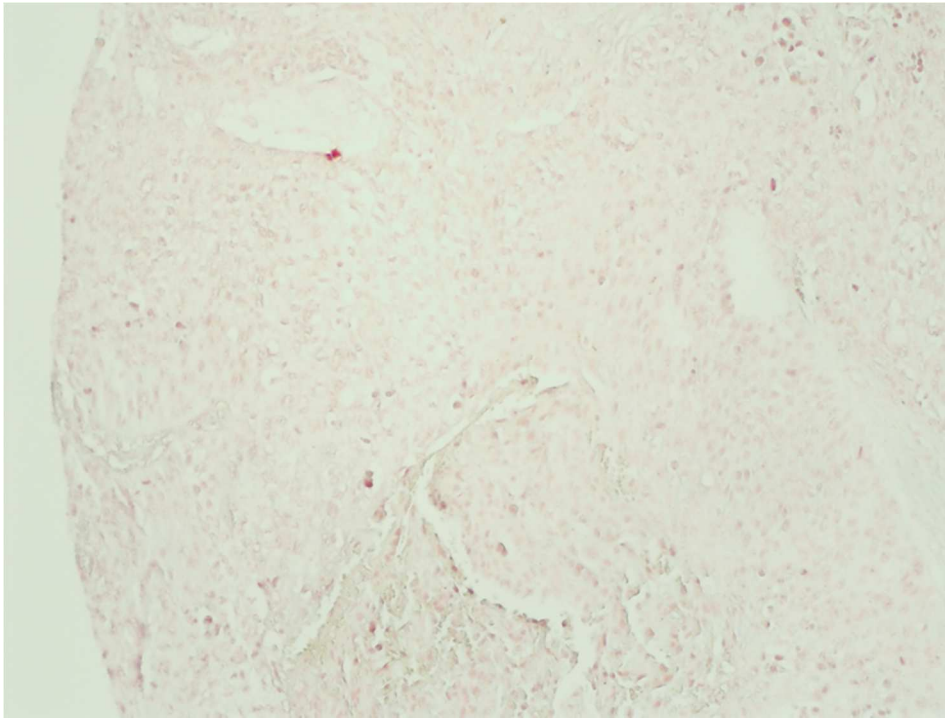
### Pozitivní kontrola exprese miR-126, koncentrace sondy 40 nm



*Obr. P2: Fotografie exprese miR-126, která byla použita jako pozitivní kontrola. Foceno kamerou DP71 pomocí programu QUICKPHOTOMICRO 2.3 foceno při zvětšení 100x*

### PŘÍLOHA 3

#### Negativní kontrola scrambled sonda, koncentrace 40nM



*Obr. P3: Fotografie exprese scrambled microRNA, která byla použita jako negativní kontrola. Foceno kamerou DP71 pomocí programu QUICKPHOTOMICRO 2.3 při zvětšení 100x*