

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



Eva TINKOVÁ

Profilování exprese miRNA u Barrettova jícnu

Bakalářská práce

Studijní obor: Bioorganická chemie B1407

Vedoucí práce: MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.

Olomouc 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci, dne 11. 5. 2015

.....

Eva Tinková

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla poděkovat MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D. za jeho cenné rady, odbornou pomoc, ochotu, trpělivost a čas, který mi věnoval při zpracování předkládané bakalářské práce. Děkuji také celému kolektivu Ústavu molekulární a translační medicíny za poskytnutí příjemného pracovního prostředí. Práce vznikla za finanční podpory grantu IGA_LF_UP_2015_10.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Eva Tinková
Název práce: Profilování exprese miRNA u Barrettova jícnu
Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny
Školitel: MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2015
Abstrakt:

Bakalářská práce pojednává o problematice Barrettova jícnu, prekancerózní lézi, jež předchází vzniku adenokarcinomu jícnu, a také o úloze miRNA představujících novou třídu biomarkerů pro včasnou detekci maligního nádoru.

V úvodu teoretické části je objasněna definice Barrettova jícnu, dále jsou popsány příznaky a rizikové faktory tohoto onemocnění. Je také vysvětleno, jakým způsobem lze Barrettův jícen diagnostikovat a jsou zmíněny možnosti léčby. Další kapitola se zabývá funkcí miRNA, včetně jejich biogeneze. Popisuje možnosti detekce neznámých miRNA či metody, jimiž lze sledovat profily genové exprese miRNA.

Praktická část zahrnuje popis izolace miRNA ze vzorků odebraných od pacientů trpících Barrettovým jícnem pomocí kartáčkové biopsie. Soustředí se na microarray analýzu, díky níž byly stanoveny profily miRNA exprese u pacientů s Barrettovým jícnem.

Klíčová slova: Barrettův jícen, adenokarcinom jícnu, mikroRNA, kartáčkové biopsie

Počet stran: 44
Počet příloh: 2
Jazyk: čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Eva Tinková
Title: MiRNA expression profiling in Barrett's oesophagus
Type of thesis: Bachelor
Department: Institute of Molecular and Translational Research
Advisor: Josef Srovnal, MD, PhD
The year of presentation: 2015
Abstract:

This bachelor thesis deals with the issue of Barrett's oesophagus - a precancerous lesion that prevents oesophageal adenocarcinoma, and also about the role of miRNAs representing a new class of biomarkers for early detection of malignant tumours.

The introduction of the thesis illustrates the definition of Barrett's oesophagus, also describes the symptoms and risk factors of this disease. Furthermore, it Barrett's oesophagus diagnostics, and there are also discussed treatment options. Another chapter deals with the functions of miRNA including their biogenesis. It also gives the possibilities of detection unknown miRNA or methods which can be monitored miRNA expression profiles.

The practical part involves isolating miRNA from brush biopsy samples taken from patients suffering from Barrett's oesophagus. It also concentrates on microarray analysis thanks to which miRNA expression profiles were determined in patients with Barrett's oesophagus.

Keywords: Barrett's esophagus, esophageal adenocarcinoma, microRNA, brush biopsy

Number of pages: 44
Number of appendixes: 2
Language: Czech

Seznam použitých zkratk:

3'UTR	3' netranslatovaná oblast
APC	argonová plazmatická koagulace
BJ	Barrettův jícen
EAC	adenokarcinom jícnu
ER	endoskopická resekce
GERD	gastroezofageální refluxní onemocnění
HDAC4	histon deacetyláza 4
HGIN	intraepiteliální neoplazie vysokého stupně
IN	intraepiteliální neoplazie
LGIN	intraepiteliální neoplazie nízkého stupně
miRNA	mikroRNA
mRNA	mediátorová RNA
NGS	sekvenování nové generace
PARP1	poly-(ADP-ribóza) polymeráza 1
PDK1	fosfoinositid dependentní kináza 1
PDT	fotodynamická terapie
PPI	inhibitory protonové pumpy
pre-miRNA	prekurzorová miRNA
pri-miRNA	primární mikroRNA
qRT-PCR	kvantitativní reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce
RE	refluxní ezofagitida
RFA	radiofrekvenční ablace

Obsah:

Seznam použitých zkratk.....	6
Úvod.....	9
Cíle práce	10
TEORETICKÁ ČÁST	11
1. BARRETTŮV JÍCEN	12
1.1. Stručný pohled do historie.....	12
1.2. Definice Barrettova jícnu	13
1.3. Molekulární biologie Barrettova jícnu	15
1.3.1. p53.....	15
1.3.2. p16.....	16
1.4. Příznaky, rizikové faktory a prevalence Barrettova jícnu	16
1.4.1. Příznaky a rizikové faktory.....	16
1.4.2. Prevalence.....	17
1.5. Diagnóza Barrettova jícnu.....	17
1.5.1. Dispenzarizace	20
1.6. Léčba Barrettova jícnu	21
1.6.1. Antirefluxní léčba	21
1.6.2. Endoskopická léčba.....	22
1.6.2.1. Endoskopická resekce	22
1.6.2.2. Endoskopická ablace	23
2. MiRNA	24
2.1. Definice miRNA.....	24
2.2. Biogeneze miRNA.....	24
2.3. Funkce miRNA.....	26
2.4. Identifikace a detekce miRNA	27
2.4.1. Microarray technologie	28
2.4.2. Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR)	28
2.5. MiRNA u Barrettova jícnu	29

PRAKTICKÁ ČÁST	30
3. SOUBOR PACIENTŮ A METODY	31
3.1. Soubor pacientů	31
3.2. Metody	31
3.2.1. Izolace miRNA z kartáčkového stěru.....	31
3.2.2. Stanovení koncentrace a čistoty vzorků RNA	32
3.2.3. Microarray analýza.....	33
4. VÝSLEDKY	34
4.1. Koncentrace a čistota vyizolované RNA	34
4.2. Analýza expresních profilů miRNA pomocí čipů Affymetrix	35
5. DISKUZE	38
Závěr	40
Seznam použité literatury.....	41
Přílohy.....	45

Úvod:

Tato bakalářská práce pojednává o tzv. Barrettově jícnu. Jedná se o onemocnění, při kterém dochází k metaplastickým změnám normálního dlaždicového epitelu jícnu vlivem chronického působení kyselého žaludečního obsahu na sliznici jícnu. Barrettův jícen je označován za prekancerózní lézi - může se dále vyvíjet přes nízký a vysoký stupeň neoplazie až k adenokarcinomu jícnu, šesté nejčastější příčině úmrtí na rakovinu na světě. Pro pacienty s Barrettovým jícnem v současné době neexistuje možnost spolehlivé predikce rizika progresu do adenokarcinomu jícnu. Řada výzkumných pracovišť se proto zaměřuje na hledání nových diagnostických a prediktivních biomarkerů.

Studie z posledních let naznačují velký potenciál malých molekul mikroRNA (miRNA) regulovat genovou expresi u nejrůznějších mnohobuněčných organismů. Hrají důležitou roli v buněčných procesech, jako jsou vývoj, diferenciaci, proliferace či apoptóza. MiRNA mají vliv i na nádorovou transformaci buněk. U Barrettova jícnu dochází k postupné přeměně metaplastické tkáně v tkáň nádorovou, u níž jsou miRNA deregulovány a různě exprimovány. Tyto změny v expresních profilech miRNA se staly důležitými biomarkery pro včasnou detekci a prognózu nádorů, včetně predikce odpovědi na léčbu.

Cíle práce:

1. Provést rešerši na dané téma, zorientovat se v problematice profilování exprese miRNA u pacientů s Barrettovým jícnem, získat teoretické a praktické znalosti technologie miRNA microarrays, naučit se pracovat s příslušnými databázemi a softwarem
2. Zoptimalizovat metodiky izolace miRNA z archivovaného i čerstvého materiálu (FFPE, plazma, kartáčekový stěr), práce s platformou Affymetrix
3. Stanovit profily miRNA exprese u pacientů s Barrettovým jícnem

TEORETICKÁ ČÁST

1. BARRETTŮV JÍCEN

Jícen (esophagus) je svalová trubice, která spojuje hltan se žaludkem a jeho úkolem je především transport potravy a tekutin mezi těmito dvěma orgány.

Na obou koncích je opatřený horním a dolním jícnovým svěračem, z nichž každý zastává jinou funkci. Pokud je jícen v klidu, horní jícnový svěrač je uzavřen a brání tak vstupu vzduchu při dýchání. Dolní jícnový svěrač, umístěný v dolní třetině jícnu, zajišťuje prostup sousta do žaludku a znemožní samovolný zpětný tok žaludečního obsahu do oblasti jícnu (Duda *et al.*, 2012).

Jícen se svou stavbou odlišuje od ostatních úseků trávicí trubice. Nejpevnější vrstvu stěny jícnu tvoří sliznice, která je složena v podélné řasy. Její povrch je krytý mnohvrstevným dlaždicovým epitelem. Horní třetina jícnu je tvořena převážně příčně pruhovaným svalstvem, ve střední části postupně přechází ve svalstvo hladké, kterým je tvořena i dolní třetina jícnu (Duda *et al.*, 2012).

Stejně tak, jako většina orgánů i jícen podléhá různým změnám a onemocněním. Jednou z chorob postihující jícen je Barrettův jícen, jehož problematice je věnována celá následující kapitola.

1.1. Stručný pohled do historie

První zmínky o Barrettově jícnu (BJ) pochází z roku 1950 zásluhou anglického hrudního chirurga Ruperta Normana Barretta (1903-1979) (Obr. 1). Publikoval článek, ve kterém popsal vysokou strikturu jícnu s vředem. Sliznice jícnu pod strikturou byla pokryta cylindrobuněčnou výstelkou podobající se žaludeční a proto se Barrett původně domníval, že cylindrický epitel je součástí tubulárního segmentu žaludku u pacientů s kongenitálně zkráceným jícnem (Duda *et al.*, 2012; Lukáš, 2003).



Obr. 1: Rupert Norman Barrett (upraveno podle www.pinterest.com)

Toto tvrzení ale vyvrátili již v roce 1953 Allison a Johnstone. Na základě rentgenologických a anatomických studií ukázali, že se nejednalo o úsek žaludku, ale o jícnem vystlaný žaludečním epitelem, což o 10 let později rentgenologicky a manometricky potvrdil i Cohen se svými spolupracovníky (Duda *et al.*, 2012).

Lortat-Jacob v roce 1957 zavedl pro jícnem vystlaný v dolní části jícnu cylindrickým epitelem název endobrachezofagus. Tento termín byl synonymem Barrettova jícnu, stejně jako Allison-Johnstonův syndrom (Duda *et al.*, 2012).

Roku 1978 byl také popsán maligní potenciál BJ a právě v této době významně vzrostl zájem mnoha chirurgů a gastroenterologů, jejichž cílem bylo jednoznačně určit správnou diagnózu BJ. Byla určena hranice metaplastického segmentu, který musel dosahovat délky 3 cm, aby mohla být stanovena diagnóza BJ (Martínek *et al.*, 2009).

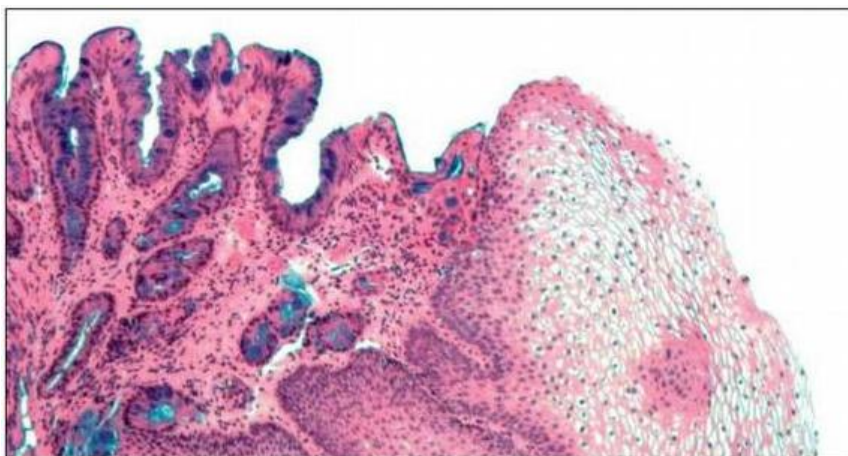
Schnell a Sontag roku 1992 uvedli publikaci, ve které sdělili, že určité riziko vzniku karcinomu jícnu je dokonce i v segmentech metaplastické sliznice kratší než 3 cm. Proto byly zavedeny pojmy podle délky metaplastického segmentu - „krátký“ a „dlouhý“ segment BJ. Bylo prokázáno, že čím větší je délka BJ, tím se také zvyšuje riziko vzniku karcinomu (Martínek *et al.*, 2009).

1.2. Definice Barrettova jícnu

Jako Barrettův jícnem je označován stav, kdy je původní sliznice jícnu s dlaždicovým epitelem nahrazena sliznicí tvořenou metaplastickým cylindrickým epitelem (Lukáš *et al.*, 2010; Kroupa, 2012). Tato oblast, nacházející se v dolní části jícnu na přechodu do žaludku, by měla být makroskopicky (endoskopicky) viditelná a dříve bylo uváděno, že by měla histologicky obsahovat intestinální metaplazii (Obr. 2) (Kroupa, 2012; Pročke, 2010). Montrealský konsenzus expertů ale nepovažuje podmínku detekce intestinální metaplazie za nezbytnou. Uvádí, že za Barrettův jícnem se nyní považuje jakýkoli typ cylindrického epitelu v jícnu, ať už intestinální nebo žaludeční (gastrická) metaplazie (GM). Nově jsou tedy z histologického hlediska rozlišeny 2 základní typy BJ: s intestinální metaplazií a s gastrickou metaplazií (Pročke, 2010).

Toto onemocnění trávicího traktu velmi úzce souvisí s tzv. gastroezofageálním refluxním onemocněním (GERD). Lukáš *et al.* (2003) uvádí, že se jedná o průnik žaludeční šťávy ze žaludku do jícnu, což je způsobené nedostatečnou funkcí dolního jícnového svěrače. Zmiňuje také, že pokud je sliznice jícnu opakovaně a po delší dobu vystavená kyselému žaludečnímu obsahu, dochází k jejímu poškození. Takové poškození sliznice obvykle způsobuje refluxní ezofagitidu (RE), tedy zánět jícnu, a následkem je metaplazie dlaždicového epitelu na cylindrický, který je odolnější vůči kyselému prostředí (Duda *et al.*, 2012).

BJ se řadí mezi prekancerózy - existuje tedy zvýšené riziko, že se z takto změněné sliznice vyvine karcinom, konkrétně adenokarcinom jícnu (EAC) (Štefánek, 2011). Maligní rychlost progresu BJ v adenokarcinom závisí na stupni dysplazie (nověji neoplazie) přítomné v tkáni BJ. Histologie popisuje progresi BJ v následujícím pořadí: BJ bez intraepiteliální neoplazie, BJ s nízkým stupněm intraepiteliální neoplazie (LGIN), BJ s vysokým stupněm intraepiteliální neoplazie (HGIN) a adenokarcinom jícnu (EAC). Obecně platí, že se zvyšujícím se stupněm neoplazie se zvyšuje i riziko malignity. U pacientů trpících BJ je riziko vzniku adenokarcinomu jícnu asi 30 – 50 krát vyšší než v celkové populaci, uvádí se 0,3 – 2,0 % ročně. U pacientů s HGIN je uvedeno riziko vývoje EAC až 10% ročně (Duda *et al.*, 2012; Gregar, 2012; Wu *et al.*, 2013).



Obr. 2: Histologický obraz Barrettova jícnu: vlevo - intestinální metaplazie, vpravo – normální dlaždicový epitel (upraveno podle Pročkeho, 2010)

1.3. Molekulární biologie Barrettova jícnu

Jak už bylo vysvětleno výše, příčinou BJ je GERD, jehož následkem je poškozena sliznice jícnu, což podporuje buněčnou proliferaci a dochází k metaplazii dlaždicového epitelu za cylindrický epitel. BJ se může dále vyvíjet až v invazivní adenokarcinom a tato progresie je z pohledu histologie popsána v následujícím pořadí: metaplazie → intraepiteliální neoplazie → adenokarcinom jícnu.

Na progresi metaplazie BJ v adenokarcinom jícnu se podílejí geny, které regulují buněčný cyklus. Příkladem je cyklin D1, který v buněčném cyklu umožňuje přechod z G1 do S fáze, a u něhož byla zaznamenána zvýšená exprese u mnoha pacientů s BJ, dále CDX1 a CDX2 geny a růstové faktory, mezi něž řadíme TGF- α a EGFR, u kterých bylo také prokázáno, že jsou u BJ silně exprimovány. V neposlední řadě sem patří i tumor-supresorové geny. V karcinogenezi BJ jsou nejčastější inaktivní geny TP53 a CDKN2. Ztráta aktivity těchto tumor-supresorových genů je způsobená mutací, ztrátou heterozygoty (LOH) nebo metylací promotoru těchto genů (Casson *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2002).

1.3.1. p53

Protein p53, kódující gen TP53 umístěný na chromozomu 17p, je zapojen do signálních drah, jako jsou transkripční regulace, apoptóza nebo kontrola buněčného cyklu (Jazzi, 2012).

Protein p53, jakožto tumor-supresorový gen, má protinádorovou funkci, potlačuje růst buněk a chrání buňky před genetickými poruchami. Pokud dojde k poškození dědičné informace uložené v DNA, p53 zastaví buněčný cyklus v G1 fázi a umožní opravu DNA. Pokud reparace poškozené DNA není úspěšná, navodí p53 apoptózu (programovanou buněčnou smrt), čímž zabrání přenosu mutované DNA do dceřiných buněk a nedochází ke vzniku tumoru (Holčáková, 2008; www.wikiskripta.eu).

U mnoha typů nádorů, stejně jako u BJ nebo adenokarcinomu jícnu, je identifikovaný gen TP53 v mutované formě, tím pádem ztrácí svou funkci tumor-

supresoru. Mutace znemožní vazbu proteinu p53 na specifické úseky DNA a brání tak regulaci cílových genů - nedochází k apoptóze a buňky se začnou nekontrolovatelně množit, což vede ke vzniku nádoru. Mutace také úzce souvisí s různými chromozomálními abnormalitami, jako jsou aneuploidie nebo chromozomální nestabilita (Holčáková, 2008; www.wikiskripta.eu).

Studie ukázaly, že zvýšená exprese p53 je důkazem přítomnosti mutovaného genu TP53 a to odpovídá také horší prognóze onemocnění. V případě BJ bylo prokázáno nízké procento zvýšené exprese p53 – asi jen 5%, v případě LGIN je riziko vyšší (10-20%) a u případů HGIN a EAC je riziko až 60% (Fléjou, 2005; Cohen *et al.*, 2002).

1.3.2. p16

Protein p16, kódující gen CDKN2 lokalizovaný na chromozomu 9p, je taktéž tumor-supresorový gen a patří do rodiny CDK inhibitorů. Protein inhibuje komplex cyklin-CDK4/6 v G1 fázi, čímž reguluje (zastavuje) buněčný cyklus. Inaktivace p16 způsobená mutací, methylací promotoru nebo ztrátou heterozyzity může vést k deregulaci buněčné proliferace, tedy k nekontrolovatelnému buněčnému růstu, a dochází ke snížení hladiny genového produktu (Casson *et al.*, 2005; Wijnhoven *et al.*, 2001).

Snížená exprese proteinu p16 byla sledována u všech stadií progresu metaplazie BJ v adenokarcinomu a ztráta heterozyzity je zaznamenána u 59% případů BJ (Cohen *et al.*, 2002).

1.4. Příznaky, rizikové faktory a prevalence Barrettova jícnu

1.4.1. Příznaky a rizikové faktory

Jedním z nejdůležitějších faktorů pro úspěšnou léčbu nemocných s BJ je časná detekce, problémem ale je, že toto onemocnění se neprojevuje žádnými specifickými příznaky (s výjimkou změny sliznice). BJ může být ale doprovázen příznaky refluxní

choroby jícnu, zejména pálením žáhy (pyrózou), nebo případně příznaky adenokarcinomu jícnu, kam se řadí obtíže s polykáním (dysfágie), pokles na váze nebo krvácení (Lukáš *et al.*, 2003).

BJ se velmi často objevuje u pacientů, kteří jsou vyšetřováni endoskopicky pro refluxní chorobu jícnu, ne u všech se však BJ rozvíjí. Lukáš *et al.* (2003) zmiňuje, že důležitou roli pro vznik BJ hraje frekventní a dlouhotrvající období kyselého refluxu, ale také kouření, nadměrné požívání alkoholu, abnormální tvorba kyseliny, snížený tlak dolního jícnového svěrače, poruchy motility jícnu a hiátové hernie. Významný vliv má také genetická predispozice, věk, pohlaví, rasa (nejčastěji se BJ vyskytuje u bělošské rasy), ale i obranné mechanismy a rezistence původní sliznice (Martínek *et al.*, 2009).

1.4.2. Prevalence

Lukáš *et al.* (2003) vysvětluje, že prevalence BJ je obtížná z toho důvodu, že ne všichni pacienti s refluxní chorobou jícnu jsou vyšetřováni endoskopicky (pouze jeden z dvaceti pacientů je klinicky diagnostikován). Prevalenci BJ hodnotí na základě dostupných dat a endoskopických vyšetření. V obecné populaci byla zjištěna prevalence 1,6 %. U pacientů trpících refluxní chorobou jícnu (10 – 30 % populace) je prevalence 12 %. Výskyt BJ se zvyšuje s věkem. Nejvíce ohroženou skupinou jsou muži ve středním až vyšším věku (nejčastěji kolem 55. roku života), onemocnění je ale diagnostikováno i u žen a to v poměru 2:1 (Duda *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013).

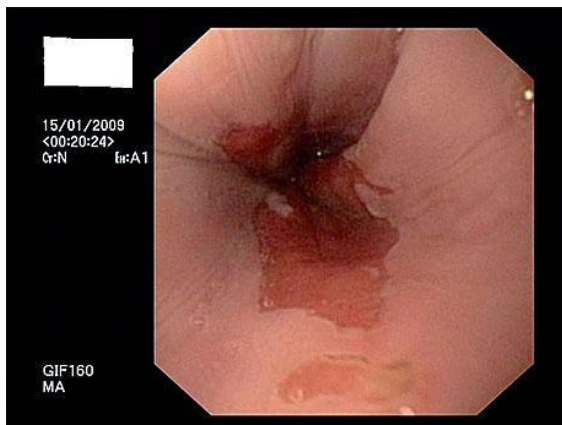
1.5. Diagnóza Barrettova jícnu

Základní metodou pro stanovení diagnózy BJ je endoskopie kombinovaná s histologickým vyšetřením bioptických vzorků odebraných nad gastroezofageální junkcí. Při endoskopickém vyšetření je ústy do jícnu zavedena úzká ohebná trubice, kterou je možno vyšetřit sliznici pohledem a současně lze také odebrat vzorky na histologické vyšetření (Lukáš *et al.*, 2003).

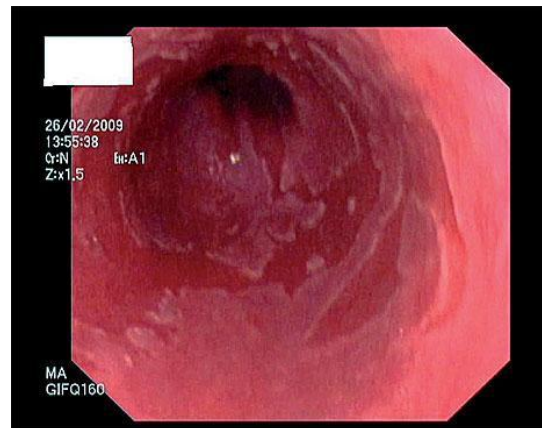
Podmínkou pro stanovení diagnózy BJ je endoskopicky zřetelné posunutí rozhraní epitelů nad oblast anatomického spojení žaludku a jícnu (gastroezofageální

junkci). Makroskopicky je možno vidět hranici epitelů jako rozhraní mezi světle růžovým epitelem jícnu a lososově červeným cylindrickým epitelem žaludku, majícím sametový vzhled (Kroupa, 2012; Lukáš *et al.*, 2003).

Pročke (2010) uvádí, že rozhodující význam z hlediska dělení segmentů má celková délka od nejproximálnějšího výběžku metaplastické sliznice k gastroezofageální junkci. Pokud je délka segmentu větší než 3 cm, jedná se o dlouhý segment BJ (Obr. 4), je-li kratší než 3 cm, hovoříme o krátkém segmentu BJ (Obr. 3) (Martínek *et al.*, 2009). Dříve platilo, že dlouhý segment metaplastické sliznice představuje vyšší riziko rozvoje karcinomu. Novější studie však prokázaly, že i v krátkém segmentu dochází k malignímu zvratu a proto délka segmentu už není tak zohledňována, uvádí Pročke (2010). Zmiňuje také, že pro rozsah BJ se nyní používá tzv. Pražská C a M klasifikace: C udává délku cirkulárního segmentu a M odpovídá celkové délce BJ. Martínek *et al.* (2009) vysvětluje, že tato klasifikace nese určité výhody, jako je přesné určení délky i charakteru metaplastického segmentu, ale také popisnost a jednoduchost. Pro ilustraci ukazuje nález C2M5 (Obr. 5), což v Pražské C a M klasifikaci znamená, že celková délka BJ je 5 cm, přičemž 2 cm tvoří cirkulární segment a 3 cm nejdelší z jazýčků.

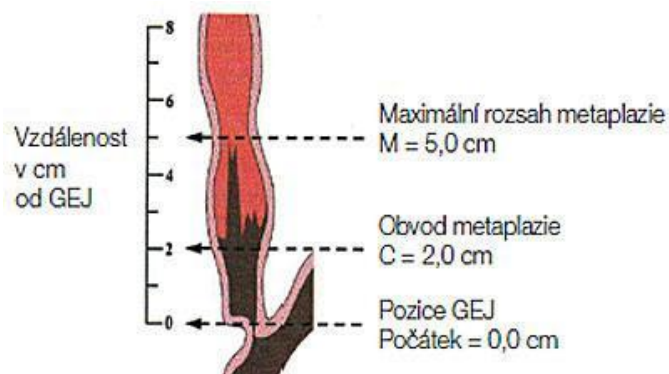


Obr. 3: Krátký segment BJ



Obr. 4: Dlouhý segment BJ

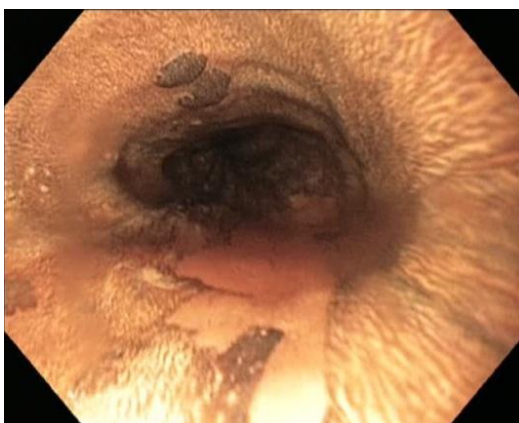
(upraveno podle Martíňka *et al.*, 2009)



Obr. 5: Pražská C a M klasifikace BJ – nález C2M5 (upraveno podle Martíňka *et al.*, 2009)

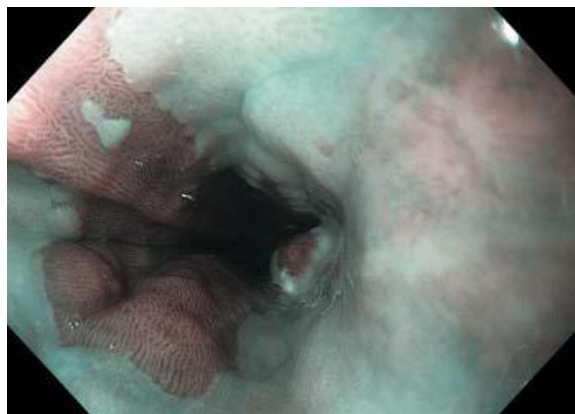
Endoskopie se využívá ke sledování pacientů s BJ a umožňuje tak posoudit riziko vzniku karcinomu. Slouží také k detekci ložisek dysplazie, jež předchází vzniku karcinomu, případně umožňuje zachytit karcinom v časném stádiu. Pro lepší vykreslení rozhraní sliznice se využívá řada dalších metod. Jednou z nich je chromodiagnostika. Jedná se o barvení sliznice Lugolovým roztokem (Obr. 6), případně methylenovou modří, toluidinovou modří, indigem karmínu nebo kyselinou octovou. Lugolův roztok se aplikuje do jícnu, přičemž dlaždicový epitel je tmavě zbarvený, zatímco cylindrický epitel zůstává bílý. Vysvětluje se to tím, že metaplastický epitel odlišně váže specifická barviva (Martínek *et al.*, 2009; Kroupa, 2012).

Další možností je použití metody označované jako NBI (Narrow Band Imaging). Tato metoda umožňuje pozorovat změny sliznice charakteristické pro rozvoj epitelových nádorů. Pomocí filtrovaného světla (skládajícího se ze dvou vlnových délek, 415 a 540 nm, které jsou vysoce absorbovány krevním barvivem) je dosahováno vyššího kontrastu mezi epitelem a slizničními cévami. Díky tomu lze zachytit i drobné změny, které nejsou v bílém světle pozorovatelné. NBI je využívána také k přesnějšímu určování resekcčních okrajů při operacích zhoubných nádorů, k vyšetřování onkologických pacientů po prodělané léčbě a k provádění cílených odběrů biopsií už při endoskopii (Lukeš, 2012). Duda *et al.* (2012) zmiňuje, že přesnost a pozitivní hodnota predikce této metody při endoskopii dysplastických změn v BJ je až 90%.



Obr. 6: Endoskopický pohled na BJ po aplikaci Lugolova roztoku

(upraveno podle www.kolonoskopie.cz)



Obr. 7: Zobrazení BJ NBI metodou (upraveno podle Kroupy, 2012)

Pro stanovení definitivní diagnózy je nezbytné histologické vyšetření. Biopsie se odebírají nejčastěji po jednom vzorku ze čtyř kvadrantů na každé 2 cm délky BJ. Nevýhodou při odběru biopsií je krvácení ze sliznice, které ztěžuje přesný odběr dalších vzorků (Pročke, 2010; Martínek *et al.*, 2009).

Histologický nález je velmi důležitý nejen z hlediska potvrzení diagnózy, ale také pro stanovení dalšího postupu léčby. Rozhodujícím kritériem je přítomnost intraepiteliální neoplazie (IN). Riziko vzniku adenokarcinomu stoupá se zachyceným stupněm IN v metaplastickém epitelu. Nejzávažnější je histologický nález adenokarcinomu v oblasti BJ (Pročke, 2010; Kroupa, 2012).

1.5.1. Dispenzarizace

Všichni pacienti trpící BJ by měli být dispenzarizováni, to znamená, že musí být pravidelně sledováni a kontrolováni. U pacientů s BJ bez prokazatelné IN se uvádí endoskopické vyšetření každé 3 roky. Pacienti s LGIN bývají kontrolováni každých 6-12 měsíců do té doby, než přestane být dysplazie detekovatelná (obvykle 2 následné endoskopie bez nálezu LGIN). V případě histologické detekce HGIN je endoskopická dispenzarizace intenzivnější, odstupy kontrolních endoskopií jsou 2-3 měsíce (Pročke, 2010).

1.6. Léčba Barrettova jícnu

Jak už bylo řečeno, BJ je komplikací gastroezofageálního refluxního onemocnění, proto je prvním krokem antirefluxní léčba vedoucí k potlačení produkce žaludeční kyseliny inhibitory protonové pumpy bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost refluxních symptomů, a dále léčba endoskopická, kam řadíme resekci a ablací, případně léčba chirurgická, tedy ezofagektomie (Kroupa, 2012).

Pokud je zjištěn BJ s nízkým stupněm intraepiteliální neoplazie, obvykle se provádí pouze endoskopické kontroly s biopsiemi jednou za půl roku. V případě nálezu intraepiteliální neoplazie vysokého stupně nebo časného karcinomu jícnu je indikována resekce, doplněná následně ablací zbylé metaplastické sliznice. V pokročilém stádiu karcinomu jícnu se přistupuje k chirurgické a následně onkologické léčbě (Lukáš, 2003).

Při rozhodování o způsobu terapie se postupuje vždy individuálně, je třeba uvážit celkový stav pacienta, jeho věk, stádium onemocnění, riziko metastatického postižení nebo riziko případného náročného chirurgického zákroku (Kroupa, 2012; Pročke, 2010; Martínek *et al.*, 2009).

1.6.1. Antirefluxní léčba

Tento typ léčby je většinou indikován u všech pacientů s BJ a jejím cílem je hlavně eliminovat gastroezofageální reflux a zabránit tak progresi BJ. Jsou podávány inhibitory protonové pumpy (PPI), které účinně potlačují tvorbu žaludeční kyseliny. PPI jsou bezpečné a dobře tolerované i při dlouhodobém podávání, pacienti se proto nemusí obávat nežádoucích účinků dlouhodobé léčby. Jako PPI je nejčastěji podáván omeprazol. Studie prokázaly, že omeprazol podávaný po dobu 4 – 8 týdnů v dávce 20mg/den přináší úlevu až u 71 – 96 % pacientů. Kromě omeprazolu je dostupný ještě pantoprazol, lansoprazol nebo esomeprazol (Kroupa, 2012; Lukáš *et al.*, 2003 a 1997; Pročke, 2010).

Pokud pacienti z nějakého důvodu nechtějí nebo nemohou užívat antirefluxní léky, alternativním řešením může být antirefluxní operace. Operace v porovnání s léky

sice vykazuje srovnatelný efekt na zamezení gastroezofageálního refluxu, avšak její účinek je časově omezený a Pročke (2010) konstatuje, že po 10 letech od operace až polovina pacientů opět vyžaduje léčbu farmakologickou. Kroupa (2012) předpokládá, že při úspěšné operaci lze lépe kontrolovat reflux, uvádí také, že jícnen není tak vystaven kontaktu s žaludečním obsahem jako při farmakoterapii.

V současné době není prokázáno, že samotná antirefluxní léčba může navodit úplné vymizení metaplastické sliznice, v mnoha případech byla ale zaznamenána regrese dysplazie (Pročke, 2010).

1.6.2. Endoskopická léčba

Jsou rozlišovány dva základní typy endoskopické léčby - endoskopická resekce (mukosektomie) a endoskopické ablační metody. Jak zdůrazňuje Pročke (2010), tyto metody poskytují řadu výhod. Jsou relativně jednoduché, časově méně náročné, vysoce účinné a je tam menší riziko závažnějších komplikací, jako je například krvácení a perforace jícnu. Jako nevýhodu považuje poměrně vysokou cenu přístrojového vybavení i spotřebního materiálu.

1.6.2.1. Endoskopická resekce

Endoskopická resekce (ER) je relativně novou metodou a jedná se v podstatě o endoskopické odstranění sliznice a submukózy (Martínek *et al.*, 2009). Jak popisuje Pročke (2010), princip této metody spočívá v tom, že po identifikaci léze určené k resekci je nejdříve do submukózy injikován roztok, což způsobí elevaci léze (její oddělení od svalové vrstvy). Elevovaný útvar je zachycen endoskopickou kličkou (případně čepičkou nebo ligátorem) a následně je odříznut díky vysokofrekvenčnímu elektrickému proudu. Resekovaná tkáň je poté odeslána k histologickému vyšetření. Martínek *et al.* (2009) zmiňuje, že v poslední době se v případě výskytu HGIN nebo časného adenokarcinomu volí postup tzv. totální resekce metaplastického segmentu. V tomto případě je odstraněn celý segment BJ, ne pouze konkrétní léze.

1.6.2.2. Endoskopická ablace

Martínek *et al.* (2009) řadí mezi endoskopické metody také ablační techniky, které různým mechanismem vedou ke zničení metaplastické sliznice, případně submukózy.

K destrukci BJ je hojně používanou technikou argonová plazmatická koagulace (APC), dnes se už ale od této metody opouští. Jak vysvětluje Pročke (2010), tato technika působí povrchně, může zanechat ostrůvky metaplastické sliznice BJ schované pod nově vytvořeným dlaždicovým epitelem. A právě to může být později příčinou skrytého nádorového bujení.

Další technikou je fotodynamická terapie (PDT). Principem této metody je podání pacientovi fotosenzitivní chemickou látku (fotosenzibilizátor), která je přednostně vychytávána v metaplastické sliznici BJ. Tato tkáň je pak ozářena světlem o určité vlnové délce, proto dochází k excitaci fotosenzibilizátoru a následuje zánik metaplastických buněk (Pročke, 2010). Martínek *et al.* (2009) doplňuje, že tato léčba je technicky náročná, drahá a je doprovázena častějšími komplikacemi, objevují se zejména stenózy.

Pro praktické použití je k dispozici ještě řada metod, například kryoablace, tj. destrukce tkáně pomocí extrémně nízkých teplot, nebo ablace různými termálními katétry či laserem (Pročke, 2010; Martínek *et al.*, 2009).

Novinkou v této oblasti je radiofrekvenční ablace (RFA) – destrukce povrchové vrstvy sliznice přímou aplikací radiofrekvenční energie, která navodí koagulační nekrózu. K ablací se používá tzv. haló balón (Pročke, 2010, Martínek *et al.*, 2009).

Pacienti jsou po endoskopické destrukci jícnu kontrolováni, zpočátku v kratších intervalech (2-3 měsíce), později při příznivém endoskopickém a histologickém nálezu lze kontroly postupně prodlužovat (Pročke, 2010).

2. MiRNA

První microRNA (miRNA), *lin-4*, byla popsána roku 1993 u organismu *Caenorhabditis elegans* zásluhou Leeho a jeho spolupracovníků v laboratoři Victora Ambrose. Tento objev znamenal velký posun jak v oblasti molekulární biologie, tak také v klinické praxi, kde lze využít potenciál miRNA například v diagnostice či v terapii nádorových onemocnění (Slabý *et al.*, 2012; Mathé *et al.*, 2009).

2.1. Definice miRNA

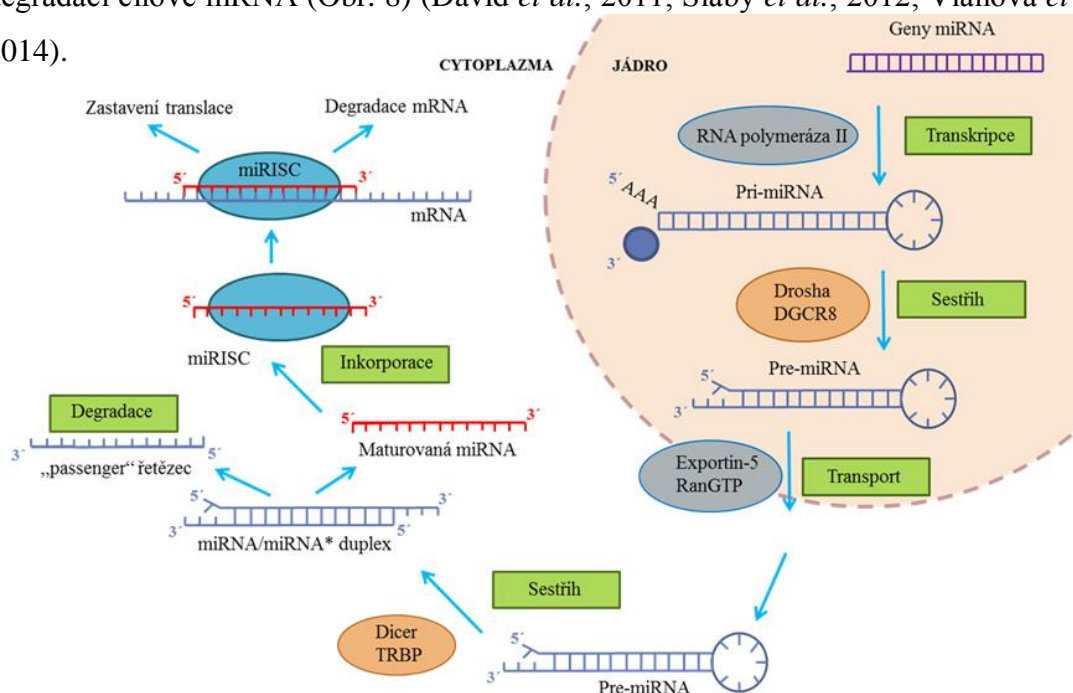
MiRNA je definována jako krátká jednořetězcová nekódující RNA o délce 21-23 nukleotidů, vyskytující se v genomech virů, rostlin i živočichů.

MiRNA hrají klíčovou roli hlavně v post-transkripční regulaci genové exprese, jsou částečně komplementární k určitým úsekům cílové mediátorové RNA (mRNA), váží se na ně a mohou tak inhibovat jejich translaci, případně mohou degradovat mRNA a nedochází tak ke vzniku cílového proteinu (Felekkis *et al.*, 2010). Podle Slabého *et al.* (2012) mají miRNA potenciál regulovat dokonce více než polovinu protein-kódujících genů v lidském genomu a každá miRNA může regulovat stovky cílových mRNA.

Molekuly miRNA jsou vysoce sekvenčně konzervované, dokonce i napříč nepříbuznými organizmy, a podílí se na buněčných procesech, jako jsou vývoj, diferenciaci, proliferaci, apoptóza a také na regulaci imunitního systému a nádorových transformací (Feber *et al.*, 2008; Slabý *et al.*, 2012; Kovaříková *et al.*, 2014). Důsledkem toho je, že jakákoli změna v expresi miRNA, ať už mutace miRNA, dysfunkce biogeneze miRNA nebo dysregulace miRNA, může vést k širokému spektru chorob, týká se to zejména nádorových onemocnění (Felekkis *et al.*, 2010). Expresní profily miRNA lze proto využít k histologické klasifikaci, predikci, časné diagnóze a prognóze lidských malignit (Calin *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009).

2.2. Biogeneze miRNA

Geny pro miRNA jsou nejdříve v jádře přepisovány RNA polymerázou II nebo RNA polymerázou III do tzv. primárního transkriptu RNA (pri-miRNA), který je opatřen na 3' konci guanidinovou čepičkou a na 5' konci nese polyadenylový zbytek. Dále vstupuje do děje multiproteinový komplex, tzv. microprocessor complex, který je tvořen ribonukleázou Drosha a proteinem Pasha (nebo DGCR8) schopného vázat dvouvláknovou RNA. Tento komplex dokáže změnit pri-miRNA na tzv. prekurzor miRNA (pre-miRNA), tj. asi 70 nukleotidů dlouhá vlásenková struktura s přesahem 2 nukleotidů na 3' konci. Pre-miRNA následně přechází z jádra do cytoplazmy pomocí GTP-dependentního transportního proteinu Exportin 5 (XPO5), kde interaguje s další ribonukleázou Dicer. Dicer odštěpí smyčku vlásenky z pre-miRNA a vznikne asi 22 nukleotidů dlouhá maturovaná dvouřetězcová miRNA (miRNA/miRNA* duplex). Tato ribonukleáza také způsobí rozdělení dvouřetězcové miRNA na dva jednotlivé řetězce. Řetězec označovaný jako „passenger strand“ je uvolněn a degradován, zatímco druhý řetězec, tzv. „guide strand“, je vázán do multiproteinového komplexu miRISC (miRNA-induced silencing complex). Tento komplex je kromě jiného tvořen také Argonautovými proteiny zajišťujícími degradaci, destabilizaci a translační inhibici cílové mRNA. MiRNA, která je součástí komplexu miRISC, se váže na neúplně komplementární místa v rámci 3' UTR cílových mRNA a to vede k utlumení translace dané miRNA. Úplná komplementarita miRNA s mRNA umožňuje štěpení, a tedy degradaci cílové mRNA (Obr. 8) (David *et al.*, 2011; Slabý *et al.*, 2012; Vlahová *et al.*, 2014).



Obr.8: Biogeneze miRNA (upraveno podle Vlahové *et al.*, 2014)

2.3. Funkce miRNA

Jak již bylo zmíněno výše, miRNA jsou především významnými regulátory genové exprese a podle Slabého *et al.* (2012) kontrolují jak fyziologické, tak patologické procesy v organismu.

Bylo zjištěno, že tyto malé molekuly miRNA hrají velkou roli ve vývoji rakoviny. Více než polovina genů pro miRNA leží totiž na fragilních částech chromozomů, které nejvíce podléhají mutačním změnám při rakovinném bujení (Vlahová *et al.*, 2014). MiRNA se mohou vyskytovat v genomu buď v podobě onkogenů, nebo mohou fungovat jako tumor-supresorové geny a podle toho kolísá hladina jejich výskytu v rakovinové tkáni (Vlahová *et al.*, 2014; Slabý *et al.*, 2012). Onkogenní miRNA má v nádorové buňce zvýšenou hladinu exprese a reguluje nádorové supresory (tlumí geny potlačující rozvoj nádorového onemocnění), exprese nádorově supresorové miRNA je naopak v nádoru snížena a reguluje onkogeny (Slabý *et al.*, 2012).

Postavení miRNA v post-transkripční regulaci genové exprese mnoha onkogenů a nádorových supresorů z nich vytváří novou třídu nádorových biomarkerů. Za ideální nádorové markery jsou považovány nejen kvůli specifickým expresním profilům miRNA v nádorové tkáni, vykazují také snadnou detekci, široký dynamický rozsah a vysokou stabilitu i při fixaci formalinem a archivaci v parafinových blocích (Slabý *et al.*, 2012). Nedávné studie ukázaly, že velký potenciál vykazují nejen tkáňové, ale také cirkulující miRNA. Vyskytují se v krevní plazmě, v séru, případně v dalších tělesných tekutinách, kde jsou snadno detekovatelné a velmi stabilní, narušily od mRNA, která byla běžně používána jako diagnostický marker. Jejich výhodou je také minimalizace invazivity při získávání vzorků a je možné opakované vyšetřování (Kovaříková *et al.*, 2014; Vlahová *et al.*, 2014).

Mnohé studie potvrzují, že miRNA vykazují odlišnou expresi v tkáni nádoru v porovnání s okolní nenádorovou tkání. Takovéto změny v hladinách exprese miRNA se liší v různých stádiích nádorů, jsou proto využívány také k časně diagnostice rozsahu onemocnění. Analýza profilu miRNA poskytuje informace o původu a histologické klasifikaci nádorových onemocnění, stupni malignity a míře diferenciaci nádorové tkáně. MiRNA jsou využívány také ke stanovení prognózy, různé miRNA jsou totiž

charakteristické pro různé molekulární podtypy nebo pro různá klinická stadia onemocnění (Kovaříková *et al.*, 2014). MiRNA slouží i jako prediktivní biomarkery, které umožňují předpovídat léčebnou odpověď u dané terapie (Slabý *et al.*, 2012). Schopnost miRNA regulovat signální dráhy v maligní transformaci z nich dělá také kandidáty pro molekulárně cílenou terapii (Kovaříková *et al.*, 2014).

2.4. Identifikace a detekce miRNA

Snaha o identifikaci neznámých miRNA vede k vývoji mnoha nových technologií a metod umožňujících rychle a co nejpřesněji kvantifikovat globální profily exprese miRNA v biologickém materiálu (Slabý *et al.*, 2012).

Mezi molekulárněbiologické metody určené k identifikaci nových molekul miRNA se řadí klasická přímá genetika, klonování miRNA a v současné době nejvíce využívaná metoda sekvenování nové generace (NGS). Technologie NGS je schopna generovat miliony čtení různých nukleotidových sekvencí. Je vhodná pro profilování transkriptů krátkých miRNA, v případě expresního profilování miRNA poskytuje vysokou citlivost a rozlišení. V roce 2007 byl uveden na trh společností Illumina sekvenátor založený na principu sekvenace syntézou. Prvním krokem je příprava knihovny. Vzorek je štěpen na kratší fragmenty, jejichž konce jsou zarovnané, fosforylovány a na 3'konci adenylovány. K oběma koncům jsou přidány adaptory. Následuje „bridged“ amplifikace vzorku, která probíhá na povrchu destičky označované jako „flow-cell“. Jednotlivé fragmenty jsou upevněny adaptorem na destičku, jejíž povrch je tvořený sekvencí komplementární k adaptorům. Dojde k ohnutí fragmentu a následnému připojení druhého konce fragmentu adaptorem k destičce. Na povrchu destičky se tvoří klastry připravené k vlastní sekvenaci. Přidávají se 4 různé fluorescenčně značené nukleotidy, tzv. reverzibilní terminátory, které jsou na 3'konci modifikovány, aby nedocházelo k připojení více než jednoho nukleotidu během cyklu. V každém kole syntézy jsou připojené nukleotidy detekovány laserem, fluorescenční značka je odstraněna a 3'konce jsou odblokovány. Celý cyklus se opakuje, dokud není přečtena celé sekvence (Slabý *et al.*, 2012; Koubková *et al.*, 2014; Jaborníková, 2012).

Mezi standardní metody užívané k detekci se řadí například northern blot nebo hybridizace *in situ*, největším posunem v oblasti molekulární medicíny byl však vývoj

vysokokapacitních metod, které umožňují paralelní a rychlou detekci všech miRNA přítomných ve zkoumaném vzorku tkáně. Tato skupina vysokokapacitních metod v podstatě zahrnuje dvě kategorie. První je zastoupena microarray technologií využívající přímou hybridizaci miRNA bez využití amplifikace předem připraveného vzorku, druhá kategorie představuje kvantitativní real-time PCR technologii, u které je naopak vyžadována amplifikace vzorku. Principy obou metod jsou dále popsány (Slabý *et al.*, 2012).

2.4.1. *Microarray technologie*

Technologie microarray, označovaná také jako čipová technologie, se využívá zejména pro sledování globální genové exprese miRNA.

V podstatě se jedná o hybridizaci nukleových kyselin. Microarray se provádí na podložních sklech, kde jsou umístěné sekvenčně specifické sondy. Tyto sondy hybridizují se vzorky miRNA, označenými fluorescenční barvou. Následnou analýzou fluorescenčního signálu získáme informace o jejich přítomnosti, případně množství. Výsledky analýzy v porovnání se zdravou kontrolní tkání nám umožňují sledovat změny v expresi miRNA (Slabý *et al.*, 2012).

2.4.2. *Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR)*

Tato metoda se využívá ke studiu genové exprese a její výhodou je vysoká citlivost. Nejprve se provádí reverzní transkripce, pomocí které je izolovaná RNA přepsaná do komplementární DNA (cDNA). Komplementární DNA je poté amplifikována a kvantifikována jednou z metod PCR.

Pro detekci miRNA pomocí qRT-PCR se využívají různé metody. Jednou z nich je například detekce pomocí fluorescenčních interkalačních barviv Sybr Green, kdy se sleduje nárůst fluorescence odpovídající vzrůstajícímu množství DNA ve vzorku. Další metoda využívá specifickou sondu založenou na detekčním systému TaqMan. Opět se sleduje nárůst fluorescence, která je detekována a zaznamenána v reálném čase (Slabý *et al.*, 2012).

2.5. MiRNA u Barrettova jícnu

V tkáni BJ bylo identifikováno mnoho miRNA, u nichž došlo ke změně exprese v porovnání se zdravou tkání. Mezi miRNA up-regulované v tkáni BJ patří miR-143, miR-145, miR-215, miR-451, miR-192, miR-194, miR-223 a miR-21. MiR-205, miR-214, miR-203 a miR-199a-5p se řadí naopak mezi miRNA, u nichž byla detekována snížená hladina exprese v případech BJ (Kovaříková *et al.*, 2014; Wijnhoven *et al.*, 2010; Mathé *et al.*, 2009).

Uvádí se, že až 60 % miRNA deregulovaných u BJ bylo identifikováno také v tkáni EAC. Řada miRNA vykazuje progresivní změnu exprese v sekvenci normální jícn, BJ a EAC, což naznačuje zapojení miRNA do progresu BJ. Mezi miRNA, jejichž exprese se zvyšuje v průběhu progresu nádoru od BJ přes LGIN, HGIN až po EAC patří miR-192, miR-194, miR-196b, miR-181a, miR-223, miR-25, miR-21 a miR-196a (Kovaříková *et al.*, 2014; Slabý *et al.*, 2012; David *et al.*, 2011; Revilla-Nuin *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013).

V tkáni BJ byla detekována zvýšená exprese také u miR-375, směrem k EAC se ale hladina exprese snižovala. Tato tumor-supresorová miRNA je proto považována za biomarker pro časnou detekci progresu BJ. Mezi další nádorově- supresorové miRNA, schopné predikovat riziko progresu BJ přes různá stádia neoplazie až k EAC, se řadí miR-15b, miR-203, miR-205, miR-27b, miR-23b, miR-486-5p, miR-133a a let-7 (Kovaříková *et al.*, 2014; Mathé *et al.*, 2009; Slabý *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013).

Tabulka 1: Přehled miRNA u BJ a EAC.

	Zvýšená exprese	Snížená exprese
BJ	miR-143, miR-145, miR-215, miR-451, miR-21, miR-192, miR-194, miR-223	miR-205, miR-214, miR-203, miR-199a-5p
EAC	miR-215, miR-99, miR-29c, miR-146a, miR-21, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-30e, miR-101, miR-223, miR-192, miR-194, miR-196, miR-214, miR-143, miR-146a, miR-126, miR-145, miR-197, miR-181a, miR-181b, miR-199a, miR-28, miR-513 miR-30a-5p, miR-125b	miR-221, miR-494, let-7b, let-7a, let-7c, let-7f, miR-345, miR-193a, miR-617, miR-149, miR-203, miR-210, miR-27b

PRAKTICKÁ ČÁST

3. SOUBOR PACIENTŮ A METODY

3.1. Soubor pacientů

Pro izolaci miRNA byly použity kartáčkové stěry získané ze suspektní oblasti jícnu při endoskopickém vyšetření od 51 pacientů – 28 pacientů s Barrettovým jícnem bez neoplazie (BJ), 13 pacientů s Barrettovým jícnem vykazujícím nízký stupeň intraepiteliální neoplazie (LGIN), 3 pacienti s Barrettovým jícnem vykazujícím vysoký stupeň intraepiteliální neoplazie (HGIN) a 7 pacientů s adenokarcinomem jícnu (EAC). Tento soubor byl tvořen pacienty obou pohlaví (38 mužů a 13 žen) různého věku. Nejmladší pacient byl ve věku 35 let, nejstarší pacient měl 89 let, průměrný věk byl 60 let.

3.2. Metody

3.2.1. Izolace miRNA z kartáčkového stěru

Izolace celkové RNA obohacené o krátké miRNA byla provedena pomocí mirVanaTM miRNA isolation kitu od společnosti Ambion. Prvním krokem izolace RNA byla inkubace s denaturačním lyzačním pufrem, díky čemuž došlo k narušení biologického materiálu. Následovala organická extrakce prováděná pomocí vysoce koncentrovaných chaotropních solí spojených s kyselým fenol-chloroformem, přičemž byl vzorek zbaven DNA, proteinů a jiných buněčných složek. Následným přidáním ethanolu k odebrané vodné fázi vzorku byla vysrážena RNA, která byla dále na filtru promývána promývacími roztoky. Po vymytí RNA z kolonky elučním roztokem o nízké iontové síle byl získán filtrát s vyizolovanou RNA. Podrobnější pracovní postup je uveden v Příloze 1.

3.2.2. Stanovení koncentrace a čistoty vzorků RNA

Ze vzorků vyizolované RNA byla stanovena její koncentrace a čistota. Tyto údaje jsou velmi důležité pro další analýzy, jako jsou například microarray nebo RT-PCR technologie.

Stanovení koncentrace a čistoty RNA ve vzorcích bylo prováděno na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 společnosti Thermo Fisher Scientific (Obr. 9). Tento spektrofotometr je schopen měřit v širokém rozmezí vlnových délek, od 220 až po 750 nm, a to s vysokou přesností a reprodukovatelností. Přístroj měří i vysoce koncentrované vzorky bez jakéhokoli dalšího ředění a jeho další výhodou také je, že k měření stačí pouze 1 μ l vzorku. Problémem mohou být směsi organických rozpouštědel a proteinů, které kontaminují vzorek RNA a snižují tak jeho čistotu a falešně ovlivňují výpočet koncentrace RNA.

Z naměřených absorbancí byla spočítána koncentrace RNA, čistota RNA byla určena z poměrů A_{260}/A_{230} a A_{260}/A_{280} (nukleové kyseliny mají absorpční maximum při vlnové délce 260 nm). Pokud poměr A_{260}/A_{280} odpovídá hodnotě 2,0, můžeme považovat RNA za čistou. Pokud jsou hodnoty nižší, jsou přítomny ve vzorku proteiny, chaotropní soli, guanidin isothiokyanát nebo fenol, tedy látky používané většinou při extrakci, které absorbují při vlnové délce 230 nm (některé proteiny mají absorpční maximum až při 280 nm). V případě sekundárního měření (poměr A_{260}/A_{230}) mohou být hodnoty vyšší, vyskytují se v rozmezí od 1,8 až po 2,2. Pokud jsou hodnoty nižší, naznačuje to opět přítomnost kontaminujících látek.



Obr. 9: Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (upraveno podle gcf.uta.edu)

3.2.3. *Microarray analýza*

Následovala identifikace expresních profilů miRNA pomocí microarray analýzy. MiRNA vyizolovaná z kartáčkových stěrů odebraných od pacientů s BJ a EAC byla nejprve značena pomocí FlashTagTM HSR RNA Labeling Kitu. Takto značené vzorky byly připraveny k hybridizaci probíhající na podložních sklíčkách, na kterých jsou umístěné specifické sondy. Po hybridizaci následovalo promývání a skenování.

MiRNA byla analyzována za použití GeneChip miRNA 3.0 Array (Affymetrix). Výsledná data byla vyhodnocena pomocí „R“ softwaru a Bioconductor package. Podrobnější pracovní postup je uveden v Příloze 2.

4. VÝSLEDKY

4.1. Koncentrace a čistota vyizolované RNA

Z 51 kartáčekových stěrů bylo v konečném důsledku úspěšně izolováno pouze 44 vzorků. Koncentrace a čistota RNA byla měřena spektrofotometrem NanoDrop ND-1000. Výsledné naměřené hodnoty koncentrací a čistoty RNA získané z kartáčekových stěrů jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2: Hodnoty naměřené při spektrofotometrickém stanovení vzorků.

Vzorky	Histologie	c RNA (ng/μl)	A260/A280
1	BJ	26,0	1,81
2	LGIN	4,4	0,95
3	BJ	1,8	0,68
4	BJ	68,7	1,84
5	BJ	79,6	1,98
6	BJ	134,6	2,00
7	LGIN	203,0	1,99
8	LGIN	136,2	2,04
9	BJ	176,2	2,03
10	BJ	181,0	2,00
11	BJ	255,7	2,01
12	LGIN	116,3	1,96
13	EAC	542,6	2,03
14	EAC	335,6	1,94
15	BJ	132,3	2,02
16	LGIN	174,5	2,00
17	BJ	90,1	2,04
18	LGIN	163,8	2,04
19	BJ	78,8	1,97
20	BJ	34,4	2,00
21	BJ	55,9	2,02
22	EAC	264,3	1,96

23	BJ	657,8	2,01
24	HGIN	79,6	1,99
25	EAC	259,2	1,95
26	LGIN	100,5	2,20
27	BJ	117,9	1,93
28	LGIN	50,8	1,77
29	LGIN	115,5	1,80
30	BJ	118,4	2,25
31	BJ	26,4	1,26
32	LGIN	78,1	2,25
33	BJ	62,3	1,82
34	BJ	101,4	2,04
35	EAC	57,3	2,12
36	BJ	84,3	2,00
37	LGIN	164,6	2,01
38	BJ	107,7	2,03
39	BJ	59,2	2,00
40	BJ	149,1	2,03
41	LGIN	246,9	2,03
42	BJ	137,2	2,01
43	EAC	153,7	1,99
44	HGIN	145,6	1,99

Jak vyplývá z tabulky 2, pomocí mirVana™ miRNA Isolation kitu se z kartáčkových stěrů podařilo získat velmi vysoké hodnoty jak koncentrace, tak také čistoty vzorků RNA. Téměř u všech vzorků se poměr A260/A280 přibližuje číslu 2, tedy hodnotě, při které lze RNA považovat za čistou.

4.2. Analýza expresních profilů miRNA pomocí čipů Affymetrix

Byla provedena microarray analýza profilů miRNA získaných z vybraných kartáčkových stěrů 5 pacientů s Barretovým jícnem bez neoplazie (BJ) a 5 pacientů s

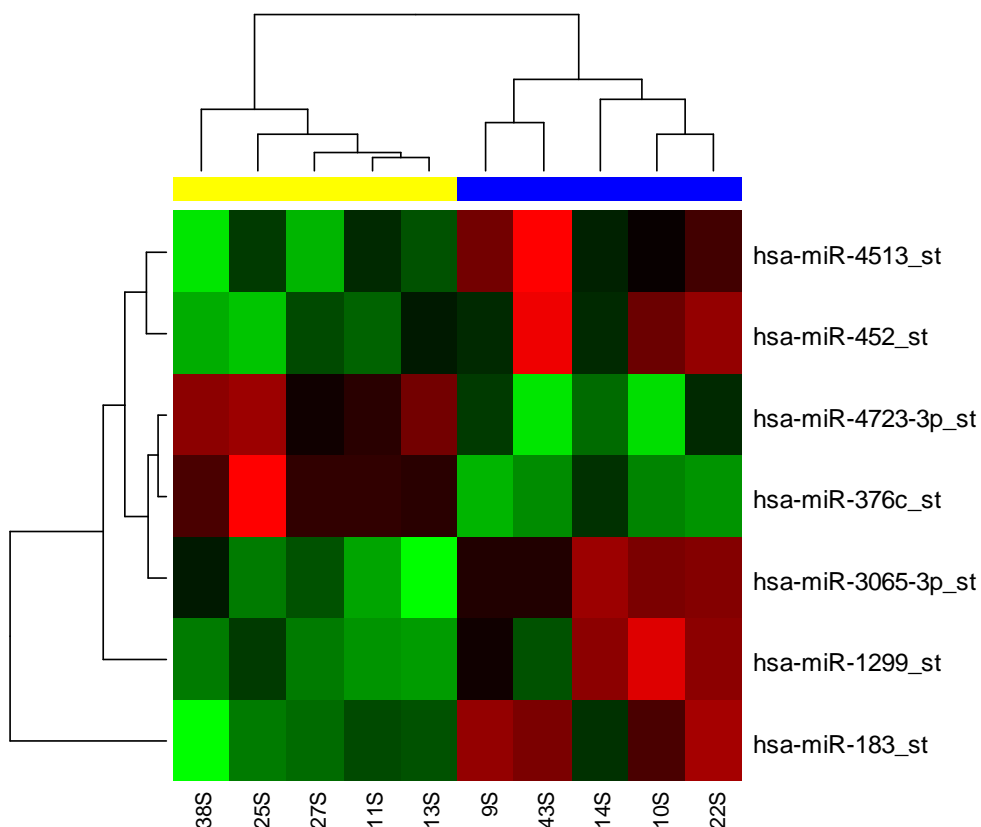
adenokarcinomem jícnu (EAC). Bylo identifikováno celkem 61 rozdílně exprimovaných miRNA v kartáčkovém stěru pacientů s EAC v porovnání se stěry pacientů s BJ. U 31 miRNA byla zjištěna zvýšená hladina exprese, 30 miRNA bylo naopak down-regulovaných. Míra významnosti byla velmi nízká: $p < 0.05$. MiRNA s rozdílnou expresí ve stěrech u pacientů s EAC jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: MiRNA s rozdílnými hladinami ve stěrech pacientů s BJ a EAC.

miRNA	logFC	p-hodnota	miRNA	logFC	p-hodnota
miR-183	1,82	0,0007	miR-4638-5p	-0,36	0,0282
miR-4723-3p	-0,44	0,0015	miR-4709-3p	0,34	0,0285
miR-376c	-0,36	0,0021	miR-941	0,83	0,0309
miR-1299	1,34	0,0023	miR-647	-0,24	0,0312
miR-3065-3p	0,27	0,0053	miR-4738-3p	0,53	0,0312
miR-4513	0,57	0,0062	miR-325	-0,29	0,0318
miR-452	0,66	0,0084	miR-665	1,42	0,0321
miR-320c	-0,77	0,0105	miR-4535	1,26	0,0333
miR-224	0,95	0,0114	miR-888	-0,21	0,0336
miR-590-5p	-0,35	0,0121	miR-2277-5p	-0,78	0,0337
miR-320a	-0,69	0,0139	miR-4312	-0,32	0,0341
miR-328	0,43	0,0143	miR-3945	-0,28	0,0352
miR-21-star	1,19	0,0143	miR-2277-3p	0,81	0,0364
miR-718	0,38	0,0143	miR-32-star	0,48	0,0375
miR-938	-0,31	0,0145	miR-4280	-0,35	0,0377
miR-891a	-0,39	0,0156	miR-3651	0,87	0,0383
miR-518a-5p	-0,25	0,0157	miR-4321	0,24	0,0386
miR-320b	-0,65	0,0159	miR-635	0,29	0,0401
miR-1825	0,71	0,0164	miR-4755-5p	0,32	0,0405
miR-7-2-star	0,33	0,0174	miR-4439	0,34	0,0432
miR-3150a-3p	0,28	0,0182	miR-519a	0,32	0,0448
miR-4270	-0,66	0,0196	miR-4275	0,30	0,0454
miR-3918	-0,36	0,0197	miR-3150a-5p	-0,23	0,0457
miR-4781-3p	-0,21	0,0206	miR-3134	-0,27	0,0461
miR-146a	1,08	0,0216	miR-3675-3p	-0,43	0,0465

miR-1255b	-0,26	0,0231	miR-548ak	-0,30	0,0475
miR-4417	2,87	0,0234	miR-4730	2,07	0,0475
miR-4266	-0,27	0,0240	miR-659	-0,34	0,0481
miR-4464	-0,21	0,0255	miR-9	0,19	0,0495
miR-4790-3p	0,18	0,0276	miR-4430	-0,75	0,0497
miR-320d	-0,60	0,0276			

Pomocí hierarchického klastrování byl získán na základě exprese sedmi nejvíce signifikantních miRNA ($p < 0.01$) dendrogram s teplotní mapou (Obr. 10), díky němuž lze odlišit stěry u pacientů s BJ a EAC. Na dendrogramu jsou tyto rozdílně exprimované miRNA barevně odlišeny – u pacientů s EAC jsou modré, zatímco u pacientů s BJ jsou zvýrazněny žlutě. Sloupce zobrazují jednotlivé vzorky a řádky představují jednotlivé geny. Barevná stupnice vyjadřuje změnu exprese miRNA – červená barva znamená zvýšenou expresi, zelená představuje sníženou expresi a černá barva vyjadřuje, že exprese zůstala nezměněná.



Obr. 10: Dendrogram s teplotní mapou zobrazující 7 různě exprimovaných miRNA u pacientů s BJ (žlutá) a EAC (modrá)

5. DISKUZE

Již v mnoha studiích byly uvedeny expresní profily miRNA získané z tkáňových vzorků odebraných od pacientů s BJ a EAC. Mezi nejvýznamnější miRNA různě exprimované u vzorků EAC v porovnání se vzorky BJ patří miR-192, miR-194, miR-21, miR-200c, miR-223, miR-93, miR-27b, miR-342, miR-125b, miR-100, miR-203, miR-205, miR-143 a miR-215. Tyto miRNA jsou běžně využívány jak v diagnostice, tak také v prognóze a při hledání nových terapeutických cílů (Feber *et al.*, 2008; Mathé *et al.*, 2009; Wijnhoven *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2009; David *et al.*, 2011).

V této bakalářské práci byla provedena izolace miRNA z kartáčkových stěrů získaných semi-invazivní cestou od pacientů s BJ a EAC. Pomocí microarray analýzy bylo možné stanovit specifický expresní profil u těchto vzorků. Byly zaznamenány změny v expresi mnoha miRNA, které byly již dříve identifikovány u pacientů s BJ a EAC (miR-21, miR-146a, miR-9, miR-325, miR-635, miR-659, miR-452, miR-183, miR-224,...) (ferrolab.dmi.unict.it). Kromě těchto známých miRNA byly ale deregulovány i miRNA, které byly u EAC pozorovány prvně (miR-4755-5p, miR-2277-5p, miR-4730, miR-3675-3p, miR-3065-3p, miR-4270, miR-3918,...). Tyto miRNA představují nové potenciální diagnostické biomarkery i slibné cíle pro další studium u Barrettova jícnu.

Jednou z miRNA, která byla identifikována v této práci, je miR-21. U této miRNA byla detekována zvýšená hladina exprese u pacientů s EAC, což dříve potvrdili ve svých studiích i Mathé *et al.* (2009) či Feber *et al.* (2008). U miR-21 je popisována změněná exprese i v případě BJ, z čehož vyplývá, že tato onkogenní miRNA je zapojena do progresu BJ v EAC (Wu *et al.*, 2013).

Další miRNA, u které byla zaznamenána změna exprese u pacientů s EAC, je miR-224. Tato miRNA je lokalizována na chromozomu X a je deregulována u mnoha typů nádorových onemocnění. Zvýšená hladina exprese miR-224 naznačuje, že se jedná o onkogenní miRNA. Řada studií uvádí, že miR-224 působí jako onkogen zejména u kolorektálního karcinomu, hepatocelulárního karcinomu a u karcinomu prsu a slinivky. U všech těchto typů karcinomu koreluje zvýšená hladina exprese s horší prognózou onemocnění (Zhang *et al.*, 2013; Liao *et al.*, 2013).

Zvýšená exprese byla identifikována také u miR-183, lokalizované na chromozomu 7q32.2. Tato miRNA je známým onkogenem spíše u dlaždicobuněčného karcinomu jícnu, kde snižuje expresi cílového genu PDCD4. Zvýšená hladina exprese miR-183 byla identifikována také u hepatocelulárního karcinomu, karcinomu prostaty a plic (www.atlasgeneticsoncology.org; www.genecards.org; Yang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014).

Pomocí microarray metody byl tedy stanoven specifický profil miRNA, který umožňuje odlišit pacienty s BJ a EAC, což naznačuje využití nejen tkáňových vzorků, ale také cytologických stěrů v diagnostice BJ a EAC.

Závěr:

Tato bakalářská práce si kladla za cíl poskytnout náhled do problematiky Barrettova jícnu a objasnit, jakou úlohu hrají miRNA ve vývoji karcinomu jícnu.

Barrettův jícn je premaligní metaplastická léze vykazující potenciál progresu přes nízký a vysoký stupeň intraepiteliální neoplazie až k adenokarcinomu jícnu. Tato metaplazie je spojována se změnami v genové expresi, které jsou studovány pomocí malých nekódujících molekul miRNA. Každý stupeň této progresu Barrettova jícnu se liší svým specifickým expresním profilem miRNA, čehož se využívá v diagnostice a v prognóze nádorů, a také při hledání nových terapeutických cílů.

Praktická část byla zaměřena zejména na microarray analýzu, díky které byly detekovány změny v expresi miRNA získaných z kartáčkových stěrů od pacientů s Barrettovým jícnem a adenokarcinmem jícnu. Bylo tak potvrzeno, že i kartáčkové stěry jsou vhodným zdrojem miRNA pro účely diagnostiky Barrettova jícnu a adenokarcinomu jícnu. Některé z identifikovaných miRNA byly popsány již v dřívějších studiích, byly ale identifikovány i nové miRNA potenciálně zajímavé cíle pro další studium u Barrettova jícnu.

Seznam použité literatury:

CALIN, G. A. et al. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer research* 2006, 66: 7390-7394.

CASSON, A. G. et al. Epidemiology and molecular biology of Barrett esophagus. *Thoracic and cardiovascular surgery* 2005, 17: 284-291.

COHEN, E. W. et al. Molecular biology of esophageal cancer. *Cancer of the upper gastrointestinal tract* 2002, 47-66.

DAVID, S. et al. MicroRNA involvement in esophageal carcinogenesis. *Curr Opin Pharmacol* 2011, 11(6): 612-616.

DUDA, M. et al. Jícen-pohled z mnoha úhlů v zrcadle zkušeností olomoucké jícnové školy. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, 2012. ISBN 978-80-244-3266-3.

FEBER, A. et al. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008, 135(2): 255-260.

FELEKKIS, K. et al. MicroRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia* 2010, 14(4): 236-240.

FLÉJOU, J. F. Barrett' s oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. *Gut* 2005, 54: 6-12.

GREGAR, J. et al. Využití NBI v diagnostice a sledování pacientů s Barrettovým jícnem. *Gastroent Hepatol* 2012, 66(3): 165-169.

HOLČÁKOVÁ, J. Úloha inhibitorů cyklin dependentních kináz při indukci transkripčního stresu a jejich vliv na aktivacínádorového supresoru p53a jeho homologů. *Disertační práce. Masarykova univerzita v Brně. Brno, 2008.*

<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/MIR183ID50539ch7q32.html> (staženo 29. 4. 2015)

<http://ferrolab.dmi.unict.it/miro/index.php> (staženo 29. 4. 2015)

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR183> (staženo 29. 4. 2015)

<http://www.wikiskripta.eu/index.php/P53> (staženo 15. 1. 2015)

JABORNÍKOVÁ, M. Nová generace sekvenování, využití v klinické diagnostice. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Brno, 2012.

JAZZI, F.R. Esophageal cancer-cell and molecular biology, biomarkers, nutrition and treatment. 1.vyd. Croatia, 2012. ISBN 978-953-51-0223-6.

KOUBKOVÁ, L. et al. Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. Klin Onkol 2014, 27(1): 61-68.

KOVAŘÍKOVÁ, A. et al. Role mikroRNA v molekulární patologii karcinomu jícnu a jejich potenciální využití v klinické onkologii. Klinická onkologie 2014, 27(2): 87-96.

KROUPA, R. Barrettův jícen, rizikové faktory, léčba. Interní medicína pro praxi 2012, 14(3): 104-106.

LI P. et al. MiR-183/-96/-182 cluster is up-regulated in most breast cancers and increases cell proliferation and migration. Breast Cancer Research 2014, 16: 473.

LIAO W. et al. MicroRNA-224 promotes cell proliferation and tumor growth in human colorectal cancer by repressing PHLPP1 a PHLPP2. Clin Cancer Res 2013, 19(17): 1-11.

LUKÁŠ, K. et al. Dieta a rady lékaře. Vředy žaludeční a dvanácterníkové. Refluxní choroba jícnu. 1.vyd. Praha: Triton. 2010. ISBN 80-7254-059-9.

LUKÁŠ, K. et al. Refluxní choroba jícnu. 2.vyd. Praha: Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0506-6.

LUKÁŠ, K. Refluxní choroba, minimum pro praxi. 1.vyd. Praha: Triton, 1997. ISBN 80-85875-49-7.

LUKEŠ, P. et al. Úloha NBI v endoskopické diagnostice. Endoskopie 2012, 21(1), 16-20.

MARTÍNEK, J. et al. Barrettův jícn-jak sledovat a jak léčit. Postgraduální medicína [online]. 2009 [cit. 2014-10-9]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/barrettuv-jicen-jak-sledovat-a-jak-lecit-428716>

MATHÉ, E. et al. MiRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus and associations with survival. *Clinical cancer research* 2009, 15: 6192.

PROČKE, M. Řešení Barrettova jícnu. *Lékařské listy* [online]. 2010 [cit. 2014-10-9]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/reseni-barrettova-jicnu-452135>

REVILLA-NUIN, B. et al. Predictive value of MicroRNAs in the progression of barrett esophagus to adenocarcinoma in a long-term follow-up study. *Ann Surg* 2013, 257(5): 886-93.

SLABÝ, O. et al. *MikroRNA v onkologii*. 1. vyd. Praha: Galén, 2012. ISBN 978-7262-587-1.

ŠTEFÁNEK, J. Barrettův jícn: od pálení žáhy k riziku zhoubného nádoru. *Ordinace.cz* [online]. 2011 [cit. 2014-10-31]. Dostupné z: <http://www.ordinace.cz/clanek/barretuv-jicen-od-paleni-zahy-k-riziku-zhoubneho-nadoru/>

VLAHOVÁ, V. et al. MiRNA: Od biogeneze po využití v lékařství. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* 2014, 1: 18-22.

WIJNHOVEN, B. P. L et al. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Annals of surgery* 2001, 233(3): 322-337.

WIJNHOVEN, B. P. L. et al. MicroRNA profiling of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *British Journal of Surgery* 2010, 97: 853-861.

WU, X. et al. MicroRNA expression signatures during malignant progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013, 6(3): 196-205.

XIONG, J. Emerging roles of microRNA-22 in human disease and normal physiology. *Curr Mol Med* 2012, 12(3): 247-258.

YANG M. et al. MiRNA-183 suppresses apoptosis and promotes proliferation in esophageal cancer by targeting PDCD4. *Mol Cells* 2014, 37(12):873-880.

YANG, H. et al. MicroRNA expression signatures in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Clinical cancer research* 2009, 15(18): 5744-5752.

ZHANG, G. et al. Up-regulation of miR-224 promotes cancer cell proliferation and invasion and predicts relapse of colorectal cancer. *Cancer Cell International* 2013, 13: 104.

Přílohy:

Příloha 1.

IZOLACE RNA Z KARTÁČKOVÝCH STĚRŮ

(pomocí mirVana^{MT} miRNA Isolation kit od Ambionu)

1. Výchozí vzorek je uchováván v 600 µl lyzačního pufru při 4 °C.
2. Rozmrazíme vzorek na ledě a vytemperujeme centrifugu na 4 °C. Pokud používáme nový kit, přidáme etanol k promývacím roztokům.
3. Po rozmrazení vzorek zvortexujeme a kartáček vyndáme.
4. Přidáme 60 µl miRNA Homogenate Additive, řádně zvortexujeme a necháme stát 10 min. na ledu.
5. Přidáme 600 µl Acid-Phenol:Chloroform (pipetujeme ze dna láhve – na povrchu vodný pufr). Zvortexujeme 30 – 60 s a centrifugujeme při 5 min / 10 000 x g / RT.
6. Dojde k rozdělení vodné a organické fáze, pokud není interfáze kompaktní, centrifugaci zopakujeme.
7. Opatrně odebereme vrchní vodnou fázi do čisté mikrozkušavky, aniž bychom interfázi rozvířili, a poznačíme si odebraný objem (cca 600 µl).
8. Dáme temperovat Elution Solution na 95 °C.
9. K vodné fázi přidáme 1,25 objemu, odebraného v kroku 7, absolutního ethanolu za RT. (Pokud jsme odebrali 600 µl vodné fáze, přidáme 750 µl ethanolu).
10. Umístíme Filter Cartridge do Collection Tube.
11. Napipetujeme 700 µl směsi lyzát-etanol na kolonku a centrifugujeme při 15 s / 10 000 x g / RT.
12. Filtrát odstraníme a opakujeme krok 11, dokud nepřefiltrujeme celý objem směsi.
13. Filtrát odstraníme, na kolonku nanese 700 µl miRNA Wash Solution 1 a centrifugujeme při 5-10 s / 10 000 x g / RT.
14. Filtrát odstraníme, na kolonku nanese 500 µl Wash Solution 2/3 a centrifugujeme 5-10 s / 10 000 x g / RT.
15. Odstraníme filtrát a opakujeme krok 14.
16. Filtrát odstraníme a centrifugujeme při 1 min / 10 000 x g / RT.
17. Kolonku přeneseme do nové Collection Tube a nanese 100 µl Elution Solution předeřátého na 95 °C. Centrifugujeme při 20-30 s / 10 000 x g / RT.
18. Kolonku vyhodíme a odebereme alikvot pro změření koncentrace a čistoty RNA na přístroji NanoDrop ND 1000 (blank = Elution Solution).
19. Pokud je koncentrace nízká (pod 30 ng / µl), vzorek zakoncentrujeme.

Příloha 2.

ANALÝZA EXPRESNÍCH PROFILŮ MIRNA POMOCÍ ČIPŮ AFFYMETRIX

FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Procedure

→ Poly A tailing

1. Upravit objem vzorku na 8 µl za použití Nuclease-Free vody (Vial 11, rozpustíme při pokojové teplotě, zvortexujeme a mírně zcentrifugujeme).
2. Poté vzorek umístíme na led a přidáme 2 µl RNA Spike Control Oligos (Vial 8, rozpustíme na ledu, pokud je to nezbytné, zcentrifugujeme a pracujeme na ledu), vrátíme na led.
3. Naředíme ATP mix (Vial 3, rozpustíme na ledu, pokud je to nezbytné, zcentrifugujeme a pracujeme na ledu) do 1 mM Trisu 1:38,5.
4. Do nuclease-free mikrokumavky si připravíme Poly A Tailing Master Mix (+10% navíc kvůli ztrátám při pipetování).

Reagencie	Množství (µl)
10x reaction buffer (Vial 1, rozpustíme při pokojové teplotě, zvortexujeme a mírně zcentrifugujeme)	1,5
25mM MnCl₂ (Vial 2, rozpustíme při pokojové teplotě, zvortexujeme a mírně zcentrifugujeme)	1,5
Naředěný ATP mix (Vial 3, připravený v kroku č. 3)	1
PAP enzym (Vial 4, vyjmeme z mrazáku těsně před použitím, mírně zcentrifugujeme, udržujeme na ledu, NEVORTEXUJEME!)	1

5. K 10 µl vzorku RNA/Spike Control Oligos přidáme 5 µl Master Mixu.
6. Promícháme (nevortexujeme!!!) a stočíme.
7. Inkubujeme 15 min při 37°C. Přebytek ATP mixu vyhodíme.

→ FlashTag Biotin HSR ligace

1. Po inkubaci z předchozího kroku vzorky stočíme a umístíme na led.
2. Ke každému vzorku přidáme po 4 μ l 5X FlashTag Biotin HSR ligačního mixu (Vial 5, rozpustíme při pokojové teplotě, zvortexujeme a mírně zcentrifugujeme).
3. Poté přidáme 2 μ l T4 DNA ligasy (Vial 6, vyjmeme z mrazáku těsně před použitím, mírně zcentrifugujeme, udržujeme na ledu, NEVORTEXUJEME!). **Master Mix v tomto kroku nepřipravujeme, přidáváme zvlášť, mohlo by dojít k autoligaci.**
4. Promícháme (nevortexujeme!!!) a stočíme.
5. Inkubujeme 30 min při 25°C (pokojová teplota).
6. Zastavíme reakci přidáním 2,5 μ l HSR Stop Solution (Vial 7, rozpustíme při pokojové teplotě, zvortexujeme a mírně zcentrifugujeme). Promícháme a stočíme.
7. Odebereme 2 μ l biotinem značeného vzorku pro ELOSA QC Assay (2 μ l biotinem značeného vzorku mohou ležet až 6 hod na ledu, nebo mohou být skladovány při -20 °C až 2 týdny).
8. Zbývající část vzorku je možno skladovat 6h na ledu nebo 2 týdny při -20°C.

Affymetrix® GeneChip® miRNA Array Procedure

Pozn.: Program miRNA 3_0, typ arraye: GeneChip miRNA 3.0 Array

Čipy rozbalíme a ponecháme alespoň 10-15 min při pokojové teplotě. Popíšeme a zadáme do systému.

→ Hybridizace

1. Připravíme si reagenty uvedené v tabulce a ponecháme je při pokojové teplotě.
2. 20X Eukaryotic Hybridization Controls (bioB, bioC, bioD a cre) zahřejeme na 65 °C po dobu 5min.

3. Z reagensií uvedených v tabulce si připravíme hybridizační koktejl.

Reagencie	Objem (μl)	Konečná koncentrace
2X Hybridization Mix	66	1x
27,5% Formamid (Vial 12, rozpustíme při pokojové teplotě, zvortexujeme a stočíme)	19,2	4 %
DMSO	12,8	9,7 %
20X Hybridization Controls	6,6	1x
Control Oligo B2, 3nM	2,2	50 pM
Nuclease-Free voda	3,7	
Celkový objem	110,5	

4. Inkubujeme 5 min při 99 °C a poté dalších 5 min při 45 °C (cykler, program miRNA3).
5. Do čipu pipetujeme 130 μl vzorku. Druhé septum propíchneme špičkou bez filtru.
6. Septa přelepíme 1/2“ Tough-Spots® kvůli minimalizaci vypařování a zabránění úniku.
7. Čipy umístíme do „vaniček“ a následně do držáků v pídce (NEZAPOMENOUT VYVÁŽIT!).
8. Inkubujeme 16-18 h při 48 °C a 60 rpm (ot/min).

→ Promytí a barvení

Pozn.: Před promýváním samotných čipů je nutné provést bleaching (1x týdně) a priming (vždy před analýzou).

1. Po 16-18 h hybridizaci vyjmeme čipy z pídky a odstraníme přelepky.
2. Obsah čipu odsajeme do mirkozkuhavky. Možno uchovat na ledu do dokončení testu nebo dlouhodobě při -80°C.
3. Čipy naplníme 160 μl Array Holding Buffer (doplňujeme z chladicí místnosti). Nesmí se objevit žádné bubliny.

4. Do mikroskopavek napipetujeme:
 - a) 600 μ l Stain Cocktail 1 (**hnědá** mikroskopavka).
 - b) 600 μ l Stain Cocktail 2
 - c) 800 μ l Array Holding Buffer
5. Dále pracujeme s promývací stanicí (FS450_0002 Protocol).
6. Zkontrolujeme, zda čip neobsahuje bubliny. Pokud ano, přepipetujeme Array Holding Buffer. Poté přelepíme septa. Pokračujeme skenováním čipů podle návodu Affymetrix® Command Console® User Guide (P/N 702569).