

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Monika Hurtíková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Vliv mikroRNA při vzniku karcinomu prsu

Bakalářská práce

Monika Hurtíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: Mgr. Spiros Tavandzis

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala pod vedením vedoucího bakalářské práce samostatně, za použití v práci uvedených pramenů a literatury.

Datum

Podpis.....

Souhrn

Tato bakalářská práce se věnuje obecným dějům vedoucím k tumorigenese, se zaměřením na vliv mikroRNA při vzniku karcinomu prsu. Cílem této práce bylo shrnout poznatky z odborných článků a literatury. V rámci práce byl také proveden experiment, k ověření nového, časově a finančně méně náročného způsobu izolace cirkulující mikroRNA ze séra.

Summary

This thesis deals with general phenomena, leading to tumorigenesis, focusing on the influence of microRNAs in breast cancer development. The aim of this study was to summarize the findings of scientific articles and literature. As part of this work was also carried out an experiment to verify the new, less expensive and time-consuming method for isolation of circulating microRNAs from the serum.

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu bakalářské práce Mgr. Spirovi Tavandzisovi za odborné vedení, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Arpádu Bodayovi a paní Mgr. Veronice Krhutové za cenné rady a odborný dohled.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ago 2 – protein Argonaut 2

ATP – adenosintrifosfát

Bcl2 – B-cell lymphoma 2 gene

BRCA1 – breast cancer type 1 susceptibility gene

BRCA2 – breast cancer type 2 susceptibility gene

BCSCs – breast cancer stem cells

cDNA – complementary DNA

CHEK2 - checkpoint kinase 2 gene

c-myc - v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

CNS – centrální nervový systém

Cp – průsečík křivky tání

CpG – CG ostrůvky

DLBCL – B-buněčný lymfom

DNA – deoxiribonukleová kyselina

DNasy – deoxyribonukleázy

dRT – direct reverse transcription (přímá reverzní transkripce)

dsRNA – dvouvláknová RNA

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

EMT – epiteliálně-mezenchymální tranzice

ER – estrogení receptor protein

ERα –estrogení receptor gene

FGFR2- fibroblast growth factor receptor 2

FOXO3a – forkhead box O3 gene

FFPE – Formalin-fixed paraffin-embedded

HER2/Neu – tyrozin-protein kinázový receptor 2

HuR – RNA vázající protein (RBP)

HDAC – histon deacetyláza

Inv – invalid

LSP1 - lymphocyte-specific protein 1

MAP3K1 - mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 gene

MCF-7 – human breast adenocarcinoma cell line

min – minuty

miRBase–biological database, archiv mikroRNA

miRNA – mikroRNA

ml - mililitr

mM – mikromol

MP – mikro-particles

mRNA – mediátorová RNA

MV – mikro-vesicles

MVB – multi-vesicular bodie

ncRNA – non-coding RNA

pH - potential of hydrogen

Pol II – Polymeráza II

PTEN – phosphatase and tensin homolog gene

PTGS –post-transcriptional gene silencing

pre-miRNA – prekurzor miRNA

pri-miRNA – primární miRNA

p53 – tumor supresor protein

qRT-PCR – kvantitativní real-time PCR

Ran GTP – Ran = Ras-related nuclear protein, GTP = malý G protein (GTPáza)

Ras – rodina genů ze skupiny protoonkogenů

RBP – ribosom binding protein

rcf – relativecentrifugal force

RhoA -ras homolog family member A

RISC – Reduced Instruction Set Computing

RNA – ribonukleová kyselina

RNAa – RNA aktivace

RNAi – RNA interference

RNasy – ribonukleázy

rpm – revolutions per minute

RT – reverzní transkripce

saRNA – small – RNA induced gene activation

sec – sekunda

shRNA – hairpin RNA

siRNA – small interfering RNA

sncRNA – small non-coding RNA

SNP – single nucleotide polymorphism

SOCS1 –suppressor of cytokine signaling proteins 1

ssRNA – single strand RNA

STAT3 – signal transducer and activator for transcription 3 gene

Taq DNA polymeráza – *Thermus aquaticus* DNA polymeráza

TGFb – transforming growth factor 1

TMEM49 – VMP 1 - vacuole membrane protein 1

TP53–tumor protein 53 gene

TRBP – the human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein

UTR – untranslated region

VMP1 - vacuole membrane protein 1

XPO5 – exportin 5

ZEB1 - zinc finger transcription factor 1

ZEB2 - zinc finger transcription factor 2

Obsah

1. Úvod.....	13
2. Karcinom prsu	14
2.1. Epidemiologie karcinomu prsu	14
2.2. Histologické dělení karcinomu prsu.....	14
2.3. Genetika karcinomu prsu.....	15
3. Proces karcinogeneze.....	16
4. Fyziologická funkce nekódující RNA.....	17
4.1. RNA interference (RNAi).....	17
4.2. Aktivace genů indukovaná malými RNA (RNAa) - small activating RNA (saRNA)	17
4.3. Funkční molekuly RNAi	18
4.3.1. MikroRNA (miRNA):.....	18
4.3.1.1. Lokalizace genů pro miRNA v lidském genomu:.....	18
4.3.1.2. Biogeneze miRNA.....	19
4.3.2. Small interfering RNA (siRNA):	20
5. Proteiny účastníci se RNA interference	21
5.1. Mikroprocesorové jaderné proteiny	21
5.2. Cytoplasmatické proteiny účastníci se RNAi	22
6. Vliv miRNA na vznik a vývoj karcinomu prsu.....	24
6.1. Obecné mechanismy deregulace miRNA u lidských nádorů	24
6.1.1. Deregulace transkripce	24
6.1.2. Epigenetické změny.....	25
6.1.3. Mutace	26
6.1.4. Změny počtu kopií DNA	26
6.1.5. Poškození dráhy biogeneze miRNA	27
6.2. Moduly miRNA.....	27
6.2.1. Modul 1 - jedna miRNA reguluje více genů.....	27
6.2.2. Modul 2 - více miRNA reguluje jediný gen	27
6.2.3. Modul 3 - více miRNA reguluje více genů	28
7. Vybrané miRNA podílející se na vzniku karcinomu prsu	28
7.1. MikroRNA s funkcí tumor supresoru	29
7.1.1. Rodina miRNA-200	29
7.1.2. miR - 125	29
7.1.3. Rodina let-7 miRNA	29
7.1.4. miR-205	30

7.1.5.	miR-206	30
7.1.6.	miR-31	30
7.2.	Onkogenní miRNA.....	31
7.2.1.	miR-21	31
7.2.2.	miR -155	31
8.	Cirkulující miRNA.....	33
8.1.	Pasivní únik z rozbitých buněk.....	34
8.2.	Aktivní Sekrece jako MV-Free miRNA	34
8.3.	Aktivní sekrece prostřednictvím mobilních z buňky odvozených mikrovezikul	34
9.	Mikro RNA jako biologický marker a její stabilita	35
10.	Principy použitých metoda metody izolace celkové mRNA	36
10.1.	Izolace celkové mRNA.....	36
10.2.	Reverzní transkripce celkové mRNA.....	37
10.3.	Reverzní transkripce miRNA	38
10.4.	Přímá reverzní transkripce ze séra s využitím precipitačního pufru	39
10.5.	Kvantifikace miRNA s využitím duálně značených hydrolyzačních sond - TaqMan sond	39
11.	Materiál a metodika.....	41
11.1.	Rozdělení experimentu	41
11.2.	Použitý materiál a přístroje.....	43
11.2.1.	Speciální reagenty.....	43
11.2.2.	Obecné reagenty a spotřební materiál	43
11.2.3.	Použití přístrojové vybavení	43
11.3.	Postupy použité v experimentu.....	43
11.3.1.	Separace séra z plné krve.....	43
11.3.2.	Převzatý a upravený postup přímé reverzní transkripce s použitím dvou souprav pro přepis do cDNA – TEST 1	44
11.3.3.	Příprava master mixu pro kvantitativní real-time PCR pro mix A a mix B – TEST 1.	45
11.3.4.	Postup izolace miRNA ze séra komerční kolonkovou soupravou NucleoSpin – TEST 2	46
11.3.5.	Plně převzatý postup přímé reverzní transkripce s použitím soupravy TaqMan MicroRNA reverse transcription kit – TEST 2.....	47
11.3.6.	Příprava master mixu pro kvantitativní real-time PCR miR-155 u dvou izolačních metod pro cirkulující miRNA – TEST 2	47
12.	Výsledky:.....	48
13.	Diskuze:	50
14.	Závěr	52

15. Citovaná literatura.....	53
-------------------------------------	-----------

1. Úvod

Charakteristickými znaky nádorových onemocnění jsou regulační odchylky v expresi genů, genové amplifikace, delecce, poškození DNA genotoxickými látkami, či odchylky v transkripčním a translačním aparátu buňky. V posledních letech se prokázalo, že regulace genové exprese na post-transkripční úrovni ovlivňuje až 50% všech strukturních genů. Za tuto regulaci jsou zodpovědné malé nekódující molekuly RNA označované jako mikroRNA (miRNA). Předpokládá se, že geny, které tyto molekuly kódují, tvoří 1 až 2 % lidského genomu (Krol *et al.*, 2013). První miRNA byla objevena v roce 1993 v hlístici zvané Hád'átko obecné (*Caenorhabditis elegans*) doktorem Lee a jeho spolupracovníky a byla označena jako lin-4 (Lee *et al.*, 1993).

Kromě fyziologické funkce se miRNA uplatňuje také v různých patologických procesech včetně procesu karcinogeneze. Deregulace exprese miRNA byla zjištěna u různých typů nádorů, jako jsou nádory kolorekta, močového měchýře, vaječnicků, prsu aj. Karcinom prsu je jedním z nejčastějších nádorových onemocnění žen, s největším procentem úmrtnosti. Díky tomu se stává středem zájmu vědců a lékařů zabývajících se novými způsoby diagnostiky a léčby tohoto onemocnění. Studium miRNA je již několik let velmi nadějným směrem, kterým by se mohla ubírat diagnostika a profylaxe nádorových onemocnění.

V této práci jsou shrnuty poznatky v oblasti vztahu miRNA a vývoje karcinomu prsu, popisující vybrané miRNA, které se účastní procesu karcinogeneze u tohoto nádorového onemocnění. Jsou zde uvedeny základní informace týkající se biogeneze miRNA a jejich vlastností, které mohou být využity k diagnostickým účelům. Zároveň jsou zde uvedeny výsledky vlastních analýz, které sloužily k ověření některých literárních údajů vztahujících se k izolaci těchto molekul ze sera a otevřely tak cestu k realizaci diplomové práce.

2. Karcinom prsu

Jako karcinom označujeme útvar vyznačující se neregulovaným dělením buněk epiteliálního původu. K epiteliálním nádorům řadíme také adenokarcinomy, což jsou nádory odvozené z buněk tvořících žlázy. Přibližně 85% všech maligních nádorů, které se mohou šířit z primárního místa výskytu na jiná místa v organismu, pochází z epiteliálních buněk. Existují také další typy nádorů odvozené z jiných tkání, jako jsou sarkomy (mezenchymální tkáň) nebo nádory CNS (neuroektodermální tkáň) (Pecorino a kol., 2008).

2.1. Epidemiologie karcinomu prsu

Rakovina prsu je celosvětově jedním z hlavních důvodů úmrtí u žen (Jemal et al., 2011). V České republice je karcinom prsu považován za nejčastější druh nádorového onemocnění u žen a jeho incidence stoupá (Vyzula *et al.*, 2011), (1). Ve světovém měřítku zaujímá Česká republika 26. místo s incidencí $70,9/10^5$ (www.svod.cz). Tímto onemocněním u nás trpí každá 9 žena a každá 30 tomuto onemocnění podlehně. Výzkum genů, včetně genů kódujících miRNA, které jsou s rakovinou prsu asociované, by mohl umožnit záchyt toto onemocnění již v raném stádiu a tak pomoci k úspěšné léčbě (Jemal et al., 2011).

2.2. Histologické dělení karcinomu prsu

Na základě imunohistologického hodnocení lze karcinom prsu rozdělit do pěti základních molekulárních podtypů: laminární-A (vysoká exprese estrogenový receptorů - ER, nižší míra proliferace), laminární-B (nižší exprese ER, vysoká míra proliferace), HER2/Neu-positivní (vysoká exprese HER2/Neu receptorů nebo amplifikace *HER2/Neu* genu, vysoká proliferace), karcinomy bazálního typu (tzv. „basal-like“ karcinomy, vysoká proliferace), „normal breast-like“ (karcinomy s genovým profilem podobným buňkám s normální proliferací). Každý z těchto typů nádoru se liší jak průběhem nemoci, tak svými biologickými vlastnostmi (Sorlie *et al.*, 2001), (Munker and Calin, 2011).

2.3. Genetika karcinomu prsu

Většina karcinomu prsu vzniká v průběhu života spontánně v důsledku interakce prostředí s (nizkopenetrantními geny) geny malého účinku. Jen asi 5-10% případů má hereditární základ a u značné části z nich lze nalézt germinální mutaci v některém z vysoce penetrantních predispozičních genů označovaných jako BRCA1 nebo BRCA2 (z anglického breast cancer), které jsou zodpovědné za udržování integrity a stability genomu (Klenner *et al.*, 2002), (Gross *et al.*, 1999).

V rámci hereditární formy, kdy jsou všechny buňky těla na jedné alele již nositelem mutace, stačí v každé tělesné buňce jakýkoliv zásah ke kompletnímu vyřazení funkce příslušného genu (3). Geny, které jsou mutacemi takto vyřazovány z funkce, se označují jako nádorové supresory a jejich inaktivace je často spojována s nádorovými syndromy.

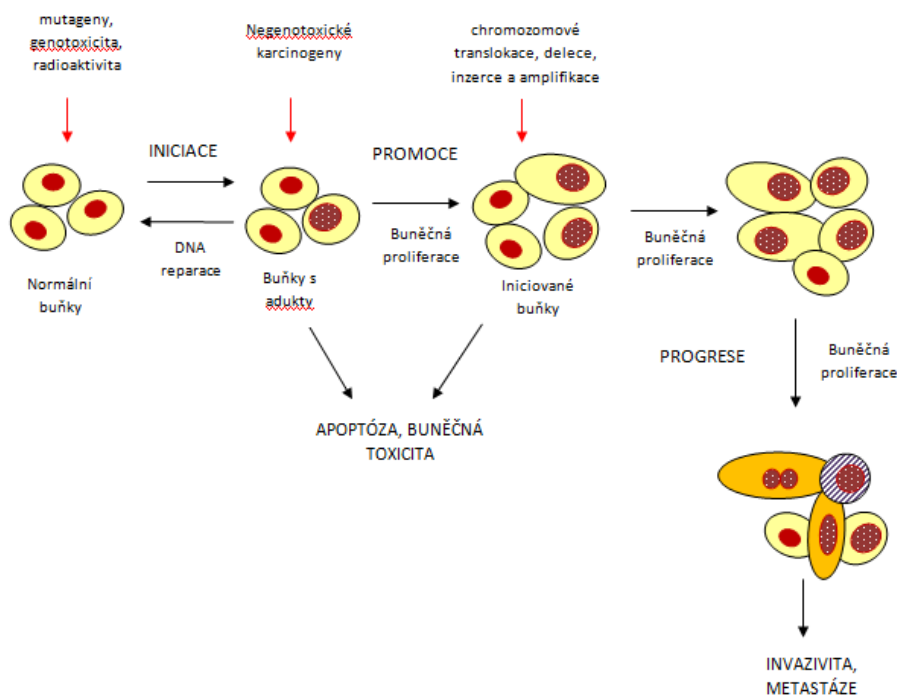
Sporadická forma karcinomu prsu je onemocnění polygenního původu, vzniklé v důsledku interakce prostředí (životní styl, hormonální vlivy, znečištění prostředí, vystavení mutagenům apod.) a většího počtu genů s malým účinkem (minorgeny), jako jsou například geny *CASP8* (caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase), *FGFR2* (fibroblast growth factor receptor 2), *MAP3K1* (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1), *LSP1* (lymphocyte-specific protein 1), *CHEK2* (checkpoint kinase 2) ap., jejichž vliv na zvýšení rizika vzniku nádoru prsu byl studován v rozsáhlých genomových asociačních studiích (Wooster and Weber, 2003), (Cox *et al.*, 2007), (Easton *et al.*, 2007), (Hunter *et al.*, 2007). Tato forma onemocnění se oproti hereditární formě vyznačuje výskytem ve vyšším věku. Prostředí, může působit přímo a vyvolávat vznik mutací v molekule DNA, nebo nepřímo a ovlivňovat tak expresi různých genů epigenetickým zásahem na úrovni transkripce jako je hypermetylace regulačních oblastí genů či post-transkripčně za účasti molekul miRNA.

Molekuly miRNA jsou významnými regulátory genové exprese a jejich deregulace může vést k narušení důležitých buněčných dějů. Ve svých abnormálních koncentracích mohou působit jako nádorové supresory, ale i jako onkogeny tím, že deregulují velké množství drah, jež ovlivňují geny podílející se na proliferaci, diferenciaci, apoptóze, angiogenezi apod. Mají také funkci modulátorů, tzn., že více molekul miRNA může společně ovlivňovat konkrétní regulační dráhu. Podle informací z databáze miRBase, která shromažďuje informace o objevených miRNA, je u lidí známo více než 1400 těchto molekul jejich cíle jsou u mnoha z nich stále neznámé (Kozomara and Griffiths-Jones, 2011).

3. Proces karcinogeneze

Karcinogeneze u nádoru prsu je podobně jako u dalších nádorových onemocnění vícestupňový proces, který je výsledkem interakce genetických, epigenetických změna prostředí (viz Obr. č. 1).

Tento proces je zahájen indukcí mutací, tedy fází iniciace. V této fázi na buňku působí řada faktorů (fyzikální, chemické, biologické mutageny). Výsledkem jsou jednoduché záměny bází, nebo malé delece a to zejména v kritických oblastech genomu (protoonkogeny, tumor supresory), což stačí k přeměně normální buňky na buňku iniciovanou. V další fázi tzv. promoční dochází ke klonálnímu růstu této iniciované buňky v důsledku působení negenotoxických karcinogenů. Progrese je pozdější fází karcinogeneze a je charakterizována akumulací dalších mutací a chromozomových změn (chromozomové translokace, delece, inzerce a amplifikace genů), což bývá spojeno se vzrůstající rychlostí proliferace, invazivitou a tvorbou metastáz. Tímto dochází k nevratnému přechodu z preneoplastické populace v neoplastickou, z beginního stádia do maligního stádia (4).



Obrázek č. 1: Schéma vícestupňového procesu karcinogeneze. Převzato a upraveno podle: (Oliveira et al., 2007)

4. Fyziologická funkce nekódující RNA

4.1. RNA interference (RNAi)

U eukaryotických organismů, je regulace exprese genů řízena především na úrovni transkripce. Část regulace však probíhá také na postranskripční úrovni. Některých z těchto úprav se účastní malé nekódující molekuly RNA (ncRNA), tím že se párují s komplementárními bázemi na molekule mRNA, především v 3'UTR oblasti a brání tak translaci mRNA do proteinu. Tento proces se nazývá RNA interference (RNAi), jelikož malé molekuly RNA interferují s cílovou mRNA (Bagasra and Prilliman, 2004), (Snustad a kol., 2009).

RNAi má důležitou roli v ochraně buňky proti parazitárním nukleotidovým sekvencím – virům a transpozónům (Bagasra and Prilliman, 2004). Jedná se o proces obrany, při kterém dochází k degradaci nežádoucí RNA v buňce. Tento proces je také využíván při regulaci genové exprese vlastních genů buňky. Dvouvláknové molekuly RNA (dsRNA), které se těchto procesů účastní, podléhají mnohastupňovým úpravám, jejichž výsledkem jsou menší dsRNA oligomery o délce mezi 21 – 23 nt (siRNA, miRNA), (viz Obr. č. 2 a Obr. č. 3). Z těchto oligomerů jsou pak za účasti multiproteinových komplexů vytvořeny jednovláknové RNA. Tyto ssRNA poté interagují s komplementárními sekvencemi mRNA, což vede k inhibici translace a degradaci molekul mRNA. V genomech rostlin a živočichů existují stovky genů kódujících regulační RNA, jež *in vivo* vytvářejí dsRNA (Cuccato *et al.*, 2011).

4.2. Aktivace genů indukovaná malými RNA (RNAa) - small activating RNA (saRNA)

Nedávno bylo zjištěno, že dsRNA mohou také aktivovat expresi genů mechanismem, který byl nazván „small – RNA induced gene activation“ nebo RNAa. Bylo prokázáno, že tyto molekuly cílí na genové promotory, což má za následek zvýšenou transkripční aktivaci genů spojených s těmito promotory. RNAa byla prokázána i v lidských buňkách s použitím syntetické dsRNA. V současnosti není jasné, zda se RNAa vyskytuje i v jiných organismech (13).

4.3. Funkční molekuly RNAi

RNA interference zahrnuje malé molekuly interferujících RNA (siRNA – z angl. short interfering RNA) nebo mikroRNA (miRNA, microRNA). Tyto jednořetězcové molekuly jsou vytvářeny z větších, dvouřetězcových molekul enzymatickou činností proteinů. siRNA a miRNA jsou po celé své délce spárovány, kromě 3' konce, kde jsou dva přesahující nukleotidy (Snustad a kol., 2009).

Původ dvouřetězcových molekul RNA v buňce může být exogenní (infekce virem nebo výsledek laboratorních experimentů) nebo endogenní (molekuly dsRNA syntetizované v jádře buňky - pri-miRNA), (viz Obr č. 2). Obě tyto dsRNA se po působení endonukleázy Dicer nakonec dále zpracovávají v komplexu RISC (z angl. RNA – Induced Silencing Complex) viz kapitoly 4.3.1 a 4.3.2 (Bagasra and Prilliman, 2004).

4.3.1. MikroRNA (miRNA):

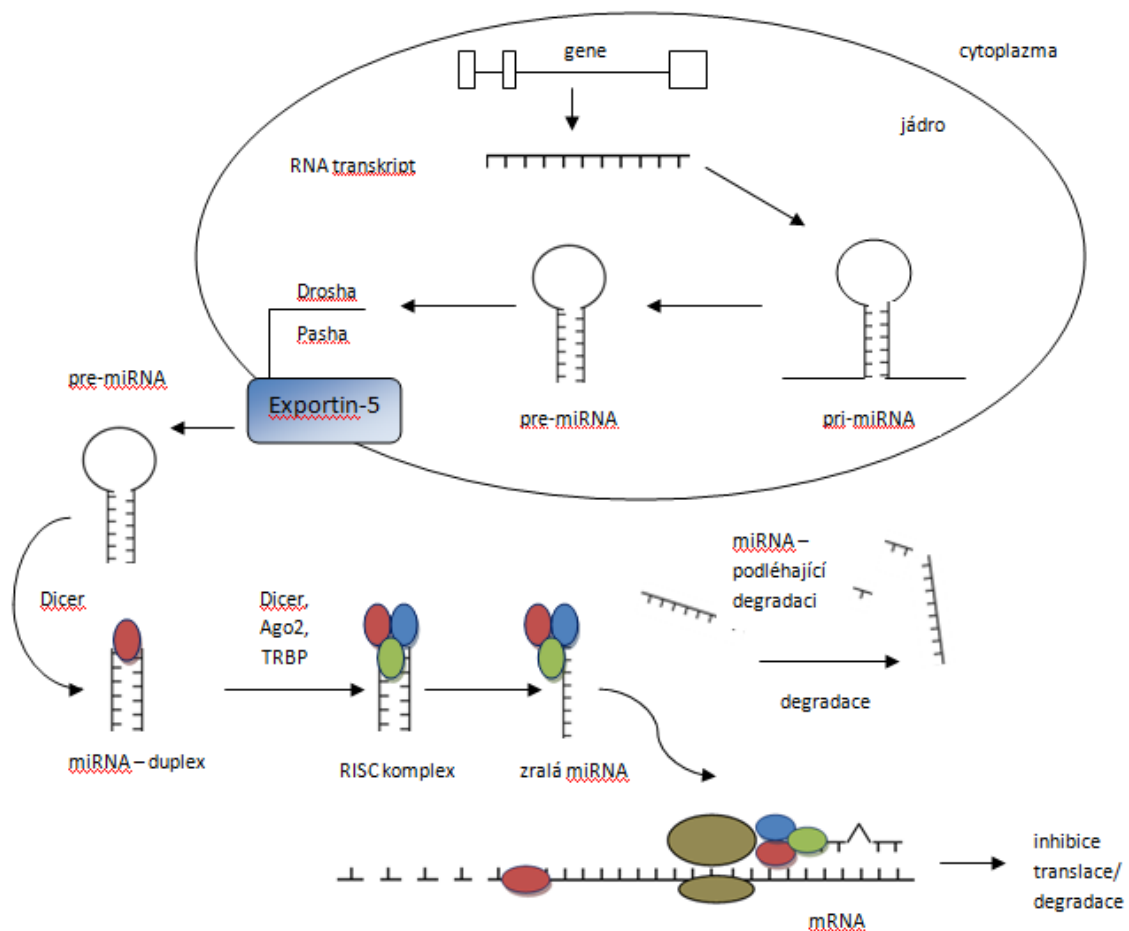
Mikro RNA jsou velkou skupinou malých, jednovláknových, nekódujících RNA účastnících se posttranskripční inhibice genů kódujících proteiny u živočichů (Hibio *et al.*, 2012). Jejich obvyklá délka je cca 21 nukleotidů. Je známo, že miRNA jsou často deregulovány u různých typů nádorů a nacházejí se v nestabilních oblastech lidského genomu (Esquela-Kerscher and Slack, 2006), (Calin *et al.*, 2004b).

4.3.1.1. Lokalizace genů pro miRNA v lidském genomu:

Většina genů kódujících miRNA se vyskytuje v intergenových oblastech, které tvoří až 75% genomu. Některé však byly nalezeny také v oblastech intronů genů. To znamená, že miRNA geny musejí být transkribovány jako autonomní transkripční jednotky s vlastními promotory. Transkripce je řízena převážně RNA polymerázou II za vzniku primárního transkriptu (pri-miRNA), (Krol *et al.*, 2010).

4.3.1.2. Biogeneze miRNA

Jak je zobrazeno na obrázku č. 2, z genomu jsou nejprve přepisovány primární molekuly miRNA dlouhé 70 -100 nt (pri-miRNA), které vytvářejí dvouvláknové vlásenky. Tyto dvouvláknové molekuly jsou dále zpracovávány funkcí ribonukleázy Drosha a RNA-vázacího proteinu Pasha za vzniku 70 nukleotidu (nt) dlouhého prekurzoru pre-miRNA. Drosha a Pasha dohromady tvoří multiproteinový komplex označovaný jako microprocessor. Pre-miRNA jsou dále transportovány do cytoplazmy pomocí RAN GTP-transportéru exportin 5 (XPO5). Následně vytváří pre-miRNA komplex s endonukleázou Dicerem a dsRNA vázajícím proteinem TRBP (Krol *et al.*, 2010), (Roberts *et al.*, 2011). Endonukleázovou aktivitou Diceru pak dochází k rozštěpení pre-miRNA za vytvoření 22 nukleotidů dlouhého dvouvláknového miRNA duplexu. MiRNA duplex je vložen do proteinu Argonaut (Ago) v komplexu RISC jako dvojvlákno, jež je následně funkcí Ago2 rozděleno na dvě jednoduchá vlákna. Vlákno, které zůstává navázáno na RISC komplex, působí jako vodičko podporující translační expresi a to především na 3' nepřekládané oblasti (UTR) cílových mRNA, zatímco druhé vlákno (miRNA) z krátce trvajících duplexu je degradováno. Vazba miRNA na 5'UTR mRNA je méně častá, ale také možná (Lee *et al.*, 2009). Zralá miRNA je krátká jednovláknová RNA molekula o velikosti 19-25 nukleotidů. Koncová 3'UTR mRNA vykazuje u zvířat částečnou homologii s miRNA a to konkrétně 2-8 nukleotidů 5' konce miRNA, to následně umožňuje blokování translace, jež je následováno mRNA degradací (George and Mittal, 2010). Je prokázáno, že u lidí je řada nemocí včetně nádorů způsobena právě aberantně exprimovanou, nebo mutovanou miRNA (Iorio *et al.*, 2005a), (Bartel, 2004).



Obrázek č. 2: Schématické zobrazení procesu biogeneze miRNA. Převzato a upraveno podle (Mattiske et al., 2012).

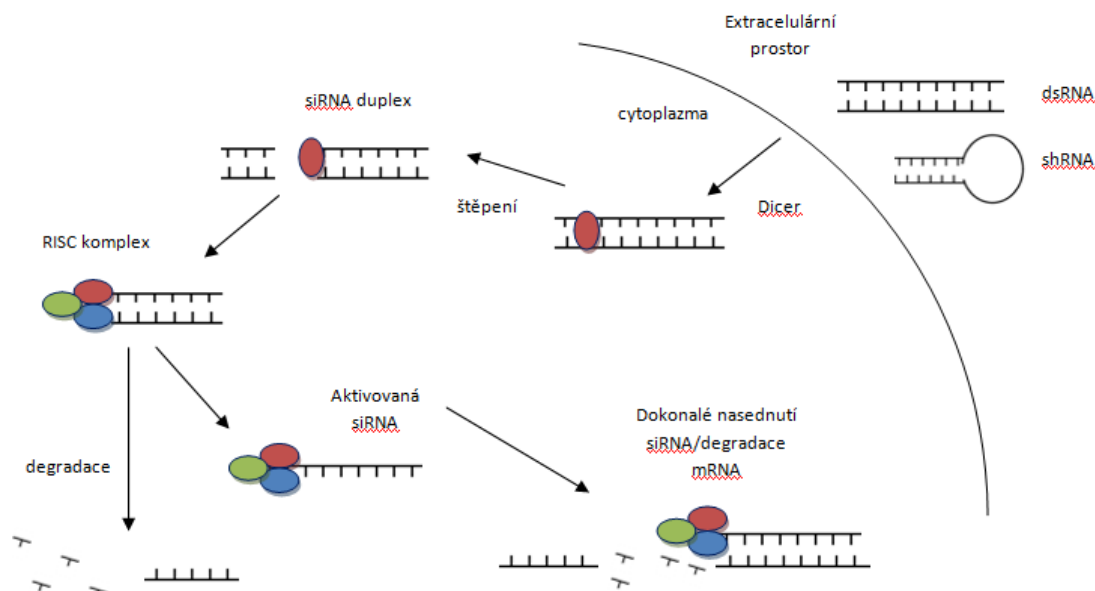
4.3.2. Small interfering RNA (siRNA):

Malé interferující RNA (siRNA), jsou třídou dvouvláknových RNA molekul o délce 20-25 bp, na 5' konci jsou fosforylovány a na 3' konci jsou hydroxylovány se dvěma převislými nukleotidy na obou stranách. Tyto molekuly vznikají enzymatickou funkcí Diceru z dlouhých dsRNA nebo, malých hairpin RNA (shRNA), (Bernstein et al., 2001).

SiRNA byly poprvé objeveny skupinou Davida Baulcombe jako součást post-transkripčního umlčování genů (PTGS) v rostlinách. Hlavní funkcí těchto molekul je interakce se specifickými sekvencemi molekuly mRNA. Tato interakce způsobuje štěpení mRNA a zabraňuje tak translaci mRNA do protein (Agrawal et al., 2003).

Biogeneze těchto molekul začíná podobně jako u miRNA aktivitou enzymu Dicer, který štěpí dvouvláknovou RNA (dsRNA) molekulu do krátkých dvouřetězcových fragmentů (cca 21 nukleotidů). Každá siRNA, která má indukovat degradaci mRNA se nejdříve musí

rozvinout do ssRNA. Jedno vlákno je degradováno enzymatickou aktivitou Dicer. Druhé vlákno je začleněno do RISC komplexu aúčastní se RNAi. Štěpení cílové mRNA je katalyzováno proteinem Argonaut, jež je součástí RISC (Bagasra and Prilliman, 2004).



Obrázek č.3: Schématické zobrazení procesu biogeneze siRNA.

5. Proteiny účastníci se RNA interference

5.1. Mikroprocesorové jaderné proteiny

Drosha

miRNA dozrává z pri-miRNA, jež se zpracovává endoribonukleotidovou funkcí enzymu Drosha. Drosha je součástí rodiny RNas III, které jsou zodpovědné za štěpení dvouvláknové RNA. Poškozením jejich funkce může být také poškozeno dozrávání miRNA. Podle studie prováděné u karcinomu jícnu (Sugito *et al.*, 2006) bylo zjištěno, že potlačení funkce Drosha proteinu v nádorových buněčných liniích má za následek inhibici proliferace nádorových buněk (Scotto *et al.*, 2008). Jedním z důležitých zjištění je, že zvýšená exprese Drosha vede k urychlenému dozrávání pri-miR-21 na miR-21. Ta se ve svých nadměrných koncentracích v tkáních podílí na rozvoji řady nádorových onemocnění včetně rakoviny prsu (Slaby *et al.*, 2007), což je v protikladu s předešlým zjištěním. Drosha v jádře rozpoznává vlásenkovou oblast kódující miRNA a vystřihne ji z primárního transkriptu. Tato uvolněná

vlásečka je následně exportována do cytoplazmy, kde je dále zpracována proteinovou mašinerií do zralé miRNA (Snustad a kol., 2009).

Pasha

Funkce enzymu Drosha je v mikroprocesorovém komplexu spjata s ds-RNA vazebným proteinem, DGCR8 (DiGeorge syndromchromozomální oblasti 8, také známým jako Pasha identifikovaným v *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans*), (Han et al., 2004), (Denli et al., 2004), (Gregory et al., 2004), (Landthaler et al., 2004). Lidský gen *DGCR8* je lokalizován na chromozómu 22q11 (Shiohama et al., 2003). Bylo zjištěno, že experimentální inhibice genu *DGCR8* pomocí siRNA vedla k nárůstu hladin pri-miRNA a zároveň k poklesu pre-miRNA a zralé miRNA. K obnovení aktivity štěpení pri-miRNA dojde pouze v případě kombinace protein DGCR8 s Drosha, což znamená, že DGCR8 je nezbytný kofaktor pro enzymovou aktivitu Drosha (Han et al., 2004), (Gregory et al., 2004).

5.2. Cytoplasmatické proteiny účastníci se RNAi

Multiproteinový komplex RISC

Jak již bylo uvedeno v kapitole 4 v cytoplazmě se dvouvláknové siRNA a miRNA molekuly začleňují do ribonukleoproteinových částic, kde jsou tyto dvojvlákna následně rozpletena. Jedno z vláken je vždy přednostně odstraněno, zbývající je pak schopno interagovat s cílovým úsekem molekuly mRNA. Interakce mezi molekulami RNA je zprostředkována jedním vláknem ncRNA (siRNA, miRNA) v RNA- proteinovém komplexu a komplementární sekvencí v molekule mediátorové RNA. Tato interakce zabraňuje expresi genů z mRNA, proto se celý tento komplex nazývá také umlčovací komplex indukovaných RNA.

Komplexy RISC se u různých organismů liší jak svým složením, tak velikostí. U všech organismů, je však součástí komplexu alespoň jeden protein z rodiny Argonaut, který umožňuje téměř dokonalé párování mezi ncRNA (siRNA, miRNA) a mRNA (Kim and Lee, 2009). Osud mediátorové RNA po navázání na ncRNA přes proteinový komplex RISC je závislý na dokonalosti párování bází mezi molekulami RNA. Pokud je mRNA s ncRNA uvnitř komplexu RISC spárována nedokonale (miRNA), dochází nejprve zastavení translace a teprve později k postupné degradaci molekuly mRNA ve směru 5'-3'. Dokonalé párování (siRNA) s molekulou mRNA má za následek okamžité rozštěpení molekuly mRNA, díky

enzymatické aktivitě proteinu Argonaut (viz Obr. 2), (Snustad a kol., 2009), (Bagasra and Prilliman, 2004).

Dicer

Je součástí rodiny RNas III a zpracovává pre-miRNA v cytosolu (Bernstein *et al.*, 2001). Není přesně známo zda Dicer působí jako proto-onkogen nebo tumor supresor, jelikož zpracovává všechny dvouřetězcové RNA bez sekvenční preference (Elbashir *et al.*, 2001). I když se názory v tomto ohledu různí, obecně je zastáván názor, že aberantní (ať už snížená či zvýšená) exprese Diceru se podílí na tumorogenezi. Dále se ukázalo, že zvýšená exprese Diceru může zvýšit produkci tumorogenní miRNA (např. miR-21), kterou ovlivňuje skrz Drosha. Studie tedy podporují proto-onkogenní funkci Drosha (Kuehbacher *et al.*, 2007), (Tokumaru *et al.*, 2008).

Ago2

Protein Ago2, je součástí komplexu RISC. Tento protein je schopen aktivitou své katalytické domény rozštěpit mRNA, na které je komplementárně navázaná sekvence siRNA. V jedné studii byla zjištěna souvislost mezi zvýšenou hladinou proteinu Ago2 a agresivnějším typem nádoru prsu (Blenkiron *et al.*, 2007). Jakým způsobem Ago2 podporuje vznik nádorů, není doposud známo. Jedno z možných vysvětlení je že, Ago2 v soutěži mezi různými miRNA umožňuje „vyhrát“ miRNA s tumorogenními vlastnostmi a tím podporuje jejich účinky v průběhu tumorogeneze (Vickers *et al.*, 2007). Na vývoj nádorového onemocnění u savců mohou mít vliv také změny v RNasové aktivitě různých enzymů (Kim and Lee, 2009).

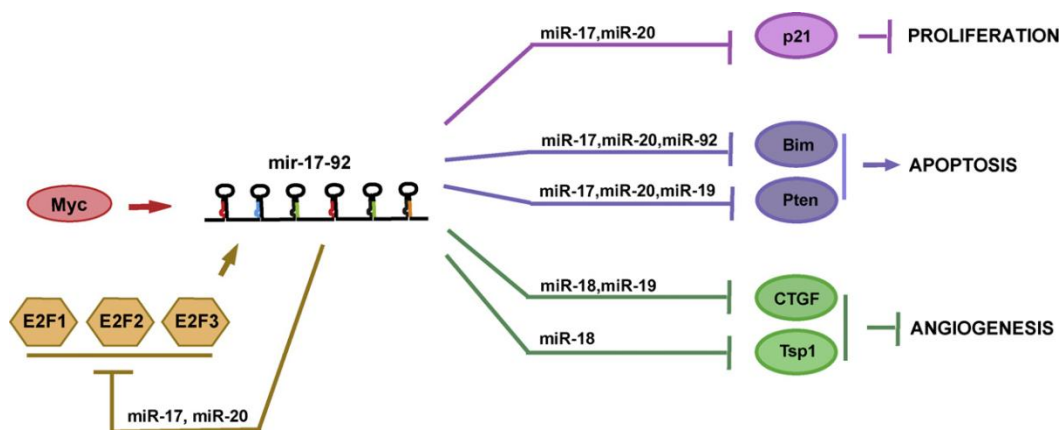
6. Vliv miRNA na vznik a vývoj karcinomu prsu

6.1. Obecné mechanismy deregulace miRNA u lidských nádorů

6.1.1. Deregulace transkripce

Většina miRNA je transkribována pomocí Pol II, což naznačuje, že transkripční regulace miRNA bude jedním z hlavních kroků regulace genové exprese v buňkách. Této deregulace se účastní například transkripční faktor c-myc, jehož zvýšená exprese se objevuje u mnoha typů nádorů (Lee *et al.*, 2004), (Cai *et al.*, 2004). Tento transkripční faktor ovlivňuje expresi mnoha miRNA. Jako příklad lze uvést miR-17-92 cluster jehož součástí je 7 polycystronně uspořádaných miRNA (-17-5p, -17-3p, -18a, -19a, -20a, -19b-1, -92-1). V případě nadměrné exprese tohoto transkripčního faktoru dochází také ke zvýšené expresi clusteru miR-17-92 a post-transkripční represi mnoha cílových mRNA, jejichž deregulace vede ke zvýšené proliferaci, angiogenezi a blokaci apoptózy. V rámci tohoto clusteru se tedy uplatňuje tzv. pleiotropií působení miRNA na více cílových molekul současně (Obr. č. 3), (O'Donnell *et al.*, 2005), (Chang *et al.*, 2008). Zvýšená exprese miR-17-92 se objevuje u agresivních forem karcinomu prsu s vysokou mírou proliferace a je také spojována s vysokou frekvencí mutací genu *TP53* (Brosh *et al.*, 2008).

Protein p53 kódovaný genem *TP53* je dalším příkladem transkripčního faktoru uplatňujícího se při regulaci transkripce miRNA, který se zároveň vyznačuje funkcí tumor supresoru. Protein p53 reaguje na různé stresové podněty v buňce, včetně poškození DNA a ovlivňuje procesy, jako jsou zástava buněčného cyklu, reparace DNA, apoptóza, inhibice angiogeneze. Jako transkripční faktor se účastní také regulace exprese miRNA. Příkladem může být miR-34. Bylo zjištěno, že inaktivace proteinu p53 v nádorových buňkách vede k potlačení exprese této tumor supresorové miRNA (Pecorino a kol., 2008), a tím k potlačení její schopnosti regulovat buněčnou migraci a invazivitu (Yang *et al.*, 2013).



Obrázek č. 4: Ukázka pleiotropního působení clusteru miR-17-92 na více cílových molekul současně s následným ovlivněním procesů proliferace, apoptózy a angiogeneze. Převzato z (Olive et al., 2010).

6.1.2. Epigenetické změny

Epigenetické změny ovlivňující expresi genů zahrnují především metylaci regulačních oblastí DNA a histonové modifikace (fosforylace, acetylace). V důsledku těchto změn dochází jak u zdravých, tak nádorových buněk k remodelaci chromatinu a ke změnám v expresi protein-kódujících genů, ale také genů kódujících miRNA (Egger et al., 2004). V průběhu metylace jsou přidávány metylové skupiny na 5 uhlík cytosinu. V DNA jsou u normálních buněk metylovány jen 3-4% cytosinu v genomu. K metylacím dochází pouze na cytosinu, který je lokalizovaný vedle guaninu v orientaci 5' (CpGs). CpG ostrůvky, jsou umístěny v oblastech promotorů asi 50% všech genů. Díky tomu je DNA metylace součástí mechanismů účastnících se regulace genové exprese. V rámci karcinogeneze se jedná především o oblasti genomu, jež se podílejí na potlačení vzniku nádoru (nádorově supresorové geny) – hypermethylace nebo oblasti, kde jsou lokalizovány onkogeny podporující rozvoj nádoru - hypomethylace. Genom nádorové buňky může být o 20 – 60% méně methylován, ve srovnání s buňkou zdravou právě v oblastech, kde se vyskytují onkogeny. K hypomethylaci a hypermethylaci dochází hlavně v kódujících a repetitivních oblastech genomu (Pecorino a kol., 2008).

Příklad epigenetického umlčení exprese miRNA je uveden v práci Zhang *et al.* V této studii se prokázalo, že tři clustery miRNA, včetně tumor supresorového clusteru, které jsou lokalizovány na chromozómu 14 (Dlk1-Dtl2 doména), jsou u nádoru vaječníku deregulovány právě v důsledku epigenetických změn (Zhang et al., 2008). Výsledky studie Lujambio et al., 2008 navíc ukazují, že metylace genů pro nádorově supresorové miRNA přispívají u různých typů nádorů k progresi onemocnění a vzniku metastáz. Epigenetické

umlcování supresorových miRNA tedy můžeme chápat jako obecný mechanismus, podobně jako je tomu u transkripčního umlcování strukturních tumor supresorových genů.

6.1.3. Mutace

Je známo, že mutace v oblastech genomu kódujících proteiny způsobují zvýšení/snížení exprese daného produktu, což může vést k následné tumorogenezi. K mutacím však může docházet také na úrovni genů, kódujících miRNA (Calin et al., 2004a). Jednonukleotidové polymorfismy (SNP - single nucleotide polymorphism) jsou velmi rozšířené v rámci vývoje nádoru (He et al., 2007), (Croce, 2008). Tyto sekvenční změny se objevují také v miRNA a jsou považovány za novou třídu funkčních polymorfismů vyskytujících se v lidském genomu. Působí na třech úrovních v rámci biogeneze miRNA. 1) působí na úrovni samotné transkripce (pri-miRNA), 2) mění proces zpracování pre-miRNA, 3) působí na úrovni interakce miRNA – mRNA (Calin and Croce, 2006), (Yanaihara et al., 2006), (Wu et al., 2008).

6.1.4. Změny počtu kopií DNA

Změny v počtech kopií DNA jsou dalším z mechanismů, které ovlivňují míru exprese a funkci genu a často přispívají ke vzniku nádoru (Pinkel and Albertson, 2005). Objevují se především v pozdějších stádiích karcinogeneze (viz kapitola 3). Například delece oblastí kódujících miR-16-1 a miR-15a byly nalezeny u nádorů prsu a vaječníku. Tyto dvě miRNA potlačují expresi protoonkogenu *Bcl2* a mohou tak být považovány za nádorové supresory (Zhang et al., 2006). Jako příklad vlivu amplifikace můžeme uvést amplifikaci oblasti obsahující 7 miRNA v polycistronním klastru označovaném jako C13. Bylo zjištěno, že u vzorku lymfomu, byla exprese pri- a zralé miRNA v tomto lokusu významně zvýšená. Tento klastr je označován jako onkogen, protože narušuje rovnováhu mezi buněčnou smrtí a proliferací, v důsledku narušení dráhy řízené protoonkogenem *c-Myc* (O'Donnell et al., 2005), (Ota et al., 2004), (Hayashita et al., 2005), (Dews et al., 2006).

6.1.5. Poškození dráhy biogeneze miRNA

Poškozením nebo deregulací exprese klíčových proteinů účastnících se dozrávání miRNA může opět vést k podpoře tumorogeneze (Thomson et al., 2006), (Muralidhar et al., 2007). K těmto proteinům řadíme proteiny uvedené v kapitole 5: RNA III enzym Drosha, RNA-binding domain Pasha, Exportin5, RNA III enzym Dicer, Argonaut II (Kumar et al., 2007).

6.2. Moduly miRNA

MikroRNA jejichž účinky jsou síťovitě propojené a ovlivňují širokou škálu buněčných procesů, označujeme jako moduly (Sharma and Vogel, 2009). Tyto moduly lze rozdělit do 3 tříd popsaných níže.

V této práci vybrali 7 modulů, jež jsou spojeny s metastázemi u karcinomu prsu: miR-202, let-7b, miR – 132, miR-200a, miR-503, miR-497 jež jsou pozitivní v regulaci zánětlivé odpovědi (Zhou *et al.*, 2013).

6.2.1. Modul 1 - jedna miRNA reguluje více genů

Bylo zjištěno, že v rámci regulačních sítí může být jedna miRNA využívána k regulaci více cílů. Například miR-205 se uplatňuje při vývoji, jak normální, tak nádorové prsní tkáně (Avril-Sassen et al., 2009), (Greene et al., 2010a). V nádorové tkáni může být její exprese jak snížena, tak zvýšená (Iorio et al., 2005), (Sempere et al., 2007), (Mattie et al., 2006). To znamená, že může působit buď jako nádorový supresor nebo protoonkogen. Mezi cíle miR-205 patří nádorový supresor PTEN, onkogen HER3, prometastatické geny *Zeb1* a *Zeb2* (zinc finger E-box binding homeobox 1 a 2) a angiogenní faktor VEGFA (Greene et al., 2010b), (Iorio et al., 2009), (Gregory et al., 2008), (Wu et al., 2009).

6.2.2. Modul 2 - více miRNA reguluje jediný gen

Jako příklad modulu 2 lze uvést miR-22 a miR-206, jejichž zvýšená exprese byla zjištěna ve vzorcích ER (estrogen receptor) negativních nádorů prsu (Iorio et al., 2005b), (Kondo et al., 2008). Nadměrná exprese každé z těchto dvou miRNA vede ke snížení hladiny proteinu ER α v buňkách MCF-7 (Pandey and Picard, 2009). Přibližně dvě třetiny všech nádorů prsu jsou estrogenně podmíněné. Zajímavá je ektopická exprese miR-206 a miR-22, která vede k inaktivaci růstu buněk (Pandey and Picard, 2009), (Di et al., 2010). Inhibice

buněčného růstu byla také pozorována při ektopické expresi let-7 v MCF-7 buňkách (Zhao et al., 2011).

6.2.3. Modul 3 - více miRNA reguluje více genů

V tomto případě se jednáo propracovanou síť interakcí, která umožňuje buňce robustně a komplexně řídit svůj fenotyp, tím způsobem, že je více cílových genů, regulováno pomocí více miRNA. Tento mechanismus vyžaduje koordinovanou regulaci exprese více miRNA.

Příkladem uvedeného typu regulace jsou miRNA z rodiny miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429), které se účastní regulace proteinů označovaných ZEB1 a ZEB2 v procesu EMT (epiteliálně-mezenchymální tranzice). Oba proteiny mají zásadní vliv během embryonálního vývoje (Christoffersen et al., 2007), (Kato et al., 2007). Bylo zjištěno, že ZEB1 a ZEB2 recipročně regulují expresi rodiny miR-200 (Bracken et al., 2008), (Burk et al., 2008). Kromě rodiny miR-200 jsou ZEB1 a ZEB2 regulovány také celou řadou jiných miRNA, např. miR-221 (Chen et al., 2010), miR-138 (Liu et al., 2011), miR-203 (Saini et al., 2011) a miR-205 (Christoffersen et al., 2007), (Kato et al., 2007). Navíc některé z nich mohou regulovat také jiné cíle, které jsou rovněž spojeny s EMT (Schickel et al., 2010).

K modulu 3 lze přiřadit také již zmiňovaný onkogenní cluster miR-17-92 (viz kapitola 5.1.1.).

7. **Vybrané miRNA podílející se na vzniku karcinomu prsu**

Již několik let je deregulace exprese miRNA spojována s buněčnou proliferací, invazivitou, angiogenezí a metastázemi u rakoviny prsu (Ahmad et al., 2010). Nádor se může vyvinout buď redukcí/deleci oblastí, kde se vyskytují geny kódující nádorově supresorové miRNA, nebo amplifikací či nadměrnou expresí onkogenních miRNA (O'Day and Lal, 2010). To naznačuje, že miRNA by se mohly využívat nejen pro stanovování diagnózy, prognózy a předpovědi průběhu léčby, ale také jako nové velmi specifické terapeutické cíle (Calin et al., 2002). V další části této kapitoly jsou uvedeny vybrané miRNA, které jsou u karcinomu prsu deregulovány.

7.1. MikroRNA s funkcí tumor supresoru

7.1.1. Rodina miRNA-200

Tato rodina miRNA obsahuje 5 členů rozdělených do dvou klastrů: miR-200a, miR-200b a miR-429 jež jsou lokalizovány na chromozomu 1 a miR-141 a miR-200c jež jsou lokalizovány na chromozomu 12 (Siegel *et al.*, 2012). Tyto miRNA mají vysoký stupeň překrytí, proto by se při diagnostice nádoru prsu a metastáz, mohly využít jako skupinový marker (Cochrane *et al.*, 2010), (Uhlmann *et al.*, 2010).

7.1.2. miR - 125

Do této skupiny řadíme dvě izoformy: miR-125a a miR-125b (Shi *et al.*, 2007). Obě tyto miRNA mají u nádoru prsu výrazně sníženou expresi. Gen pro miR-125b je umístěn na chromozomu 11q23-24, tento úsek genomu bývá u karcinomu prsu, vaječníku a plic často odstraněn. Bylo zjištěno, že se miR-125 vyskytuje v diferencovaných buňkách nebo tkáních. U nádorů prsu je však exprese miR-125 snížena, což naznačuje, že by tato miRNA mohla mít vliv na inhibici diferenciace nádorových buněk (Volinia *et al.*, 2006). Byla také zjištěna korelace mezi expresí miR-125a a expresí genu pro HuR. HuR je RNA vázající protein (RBP), který je u mnoha nádorů přítomen ve zvýšené míře. Zvýšená exprese miR-125a vede v důsledku její vazby do 3'UTR oblasti k blokaci translace HuR do proteinu, což vede k útlumu buněčného růstu, redukci migrace a proliferace (Guo *et al.*, 2009). Další studie ukázala, že exprese obou těchto mikro RNA je snížena u nádorů prsu, které mají zvýšenou expresi HER2 (viz. buněčná signalizace), (Mattie *et al.*, 2006), miR-125a a miR-125b zde působí jako nádorové supresory tak, že blokují vazebné místo pro ligand na HER2 receptoru (O'Day and Lal, 2010), (Scott *et al.*, 2007).

7.1.3. Rodina let-7 miRNA

Lethal -7 (let-7) byla jedna z prvních identifikovaných savčích miRNA obsahující 12 poddruhů (Iorio *et al.*, 2008), (Siegel *et al.*, 2012).

MikroRNA z rodiny let-7 jsou nádorové supresory s anti-proliferačními vlastnostmi, které se mimo jiné účastní regulace exprese např. Onkogenů *RAS* (Volinia *et al.*, 2006), nebo *bcl2* (Landi *et al.*, 2010), (Cimmino *et al.*, 2005). Bylo zjištěno, že exprese let-7 miRNA v subpopulaci buněk označovaných jako tumor-iniciující buňky nebo jako nádorové kmenové buňky (BCSCs - breast cancer stem cells) s vysokou schopností tvořit nádor byla oproti

nádorovým buňkám bez tumorogenního potenciálu značně snížena. Let-7 je zřejmě zodpovědná za regulaci vlastností těchto buněk, protože její redukce inhibuje diferenciaci, apoptózu (Jemal et al., 2011) a udržuje proliferaci BCSCs (Iorio et al., 2008).

Snížená exprese různých miRNA rodiny let-7 byla zjištěna kromě nádorové tkáně pacientek s karcinomem prsu také v buňkách mízních uzlin. Působením miRNA z rodiny let – 7 *in vivo* na nádorové buňky vedlo k redukci proliferace a metastázování. Naopak jejím zablokováním u diferencovaných nádorů došlo k rychlému znovu obnovení nádoru. Tato zjištění by bylo možné v budoucnu využít u pacientek s karcinomem prsu při vytvoření nových léčebných postupů (Bart, 2010).

7.1.4. miR-205

Expese této supresorové miRNA je u nádoru prsu snížena (Wu *et al.*, 2009). MikroRNA-205 inhibuje expresi tyrozin-protein kinázového receptor HER3, inaktivuje protein kinázu Akt, což vede k potlačení signalizace PI3K/Akt růstové signální dráhy a inhibici proliferace (Menard *et al.*, 2004).

7.1.5. miR-206

MikroRNA-206 se účastní inhibice migrace u karcinomu prsu (Song *et al.*, 2009), (Liu *et al.*, 2010). Zvýšená expese této miRNA se vyskytuje u nádoru prsu s nízkou koncentrací estrogenových receptorů (ER-) kdy miR-206 zároveň inhibuje expresi genu pro estrogenový receptor *ERα* (Adams *et al.*, 2007).

7.1.6. miR-31

Tato miRNA je exprimována ve zdravé tkáni prsu, u metastazující formy nádoru prsu není vůbec detekovatelná, nebo jen v malém množství (Valastyan *et al.*, 2009). miR-31 by tak mohla plnit úkol nádorového supresoru v rámci inhibice tvorby metastáz (Tang *et al.*, 2012).

7.2. Onkogenní miRNA

7.2.1. miR-21

Tato mikroRNA byla nalezena ve svých nadexprimovaných hodnotách u mnoha typů nádorů, včetně nádoru prsu (Volinia et al., 2006), (Hwang et al., 2010). Gen kódující pri-miR-21 se nachází v intronové oblasti genu TMEM49 (VMP1- vacuole membrane protein 1) (Kumarswamy et al., 2011).

Jedním z cílů této miRNA je také tumor supresorový gen *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), (Meng et al., 2007), (Qi et al., 2009). Zvýšená exprese miR-21 inhibuje *PTEN* a vede k tvorbě agresivních typů nádorů, které bývají spojovány s pokročilejšími stádii rakoviny, postihujícími lymfatické uzliny (Qi et al., 2009). Bylo také zjištěno, že zvýšená exprese miR-21 vede k inhibici jednoho ze členů apoptotické dráhy a vede ke zvýšené expresi *Bcl2* a inhibici apoptózy (Shi et al., 2010). Inhibice miR-21 zvyšuje expresi *PTEN* a tím dochází ke snížení proliferace, migrace a invazivity nádorových buněk (Meng et al., 2007).

7.2.2. miR -155

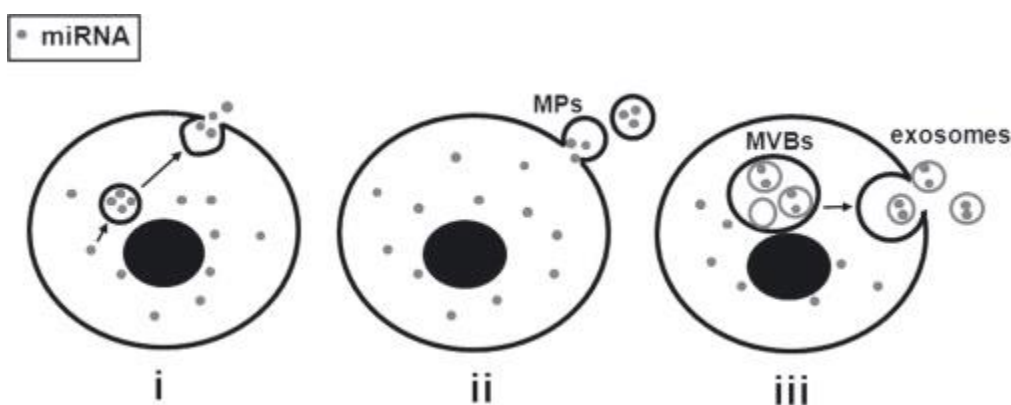
Tato miRNA je jednou z nejznámějších molekul, které bývají u mnoha nádorů včetně nádoru prsu nadexprimovány. Podílí se na proliferaci a působí jako inhibitor apoptózy podobně jako miR-21 (Volinia *et al.*, 2006). Ve svých nadměrných koncentracích je spojován s metastázemi a invazivitou, působí jako zprostředkovatel TGF β (transforming growth factor, beta), který se účastní EMT. Zejména role miR-155 v EMT má slibný terapeutický potenciál, vzhledem k tomu, že zvýšené hladiny miR-155 jsou spojeny s invazivními a metastazujícími typy nádoru prsu (Kong *et al.*, 2008). Vztahem exprese miR-155 a hormonálních receptorů u nádorů prsu se zabývala řada studií. Zvýšená exprese miR-155 bývá spojována s ER negativními nádory prsů (Blenkiron *et al.*, 2007), (Wang *et al.*, 2010). Vztah miR-155 s progesteronovými receptory je z důvodů kontroverzních výsledků stále nejasný (Blenkiron *et al.*, 2007), (Zhu *et al.*, 2009). miR-155 u karcinomu prsu působí jako supresor pro *SOCS1* (suppressor of cytokine signaling 1) (Jiang *et al.*, 2010a), což následně vede k trvalé aktivaci *STAT3* (signal transducer and activator of transcription 1) signalizace. Aktivace zánětlivých kaskád ukazuje na komunikativní roli miR-155 mezi zánětem a vznikem nádoru (Jiang *et al.*, 2010b). Regulace exprese miR-155 je u rakoviny prsu spojena také s genem *BRCA1*. *BRCA1* (breast cancer susceptibility gene) je spojen s opravou DNA v průběhu buněčného cyklu. Mutace tohoto genu jsou spojeny s vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu (viz kapitola 2.3). Přechodná nadměrná exprese *BRCA1* je naopak spojena se sníženou expresí miR-155.

Mechanismus regulace je založen na interakci proteinu *BRCA1* s promotorovou oblastí pro miR-155. To vede k aktivaci histon deacetylázy (HDAC) která brání expresi *BIC* genu (ten kóduje miR-155) (Chang *et al.*, 2011). Tato miRNA také inhibuje expresi *RhoA* (ras homolog family member A) genu, který se účastní různých buněčných procesů, zahrnující například adhezi, pohyblivost a polaritu buněk (Corcoran *et al.*, 2011). Dalším cílem miR-155 je gen *FOXO3a* (forkhead box O3), který je miRNA-155 inhibován (Kong *et al.*, 2010). Celkově můžeme říct, že nadměrná exprese miR-155 vede k chemorezistenci a přežívání nádorových buněk, nízká exprese miR-155 vede k chemosenzitivě a apoptóze. To ukazuje, že miRNA-155 je velice slibný terapeutický cíl u rakoviny prsu (Kim and Lee, 2009).

8. Cirkulující miRNA

Předešlá kapitola byla věnována deregulaci intracelulárních mikroRNA získaných z nádorové tkáně. Molekuly miRNA se však vyskytují také v různých tělních tekutinách (krev - cirkulující, moč, sekrety – necirkulující) a jejich uvolňování z buněk do cirkulace se děje aktivně a selektivně (Coulouarn *et al.*, 2009), (Tsai *et al.*, 2009). Bylo zjištěno, že molekuly miRNA mohou být do krve uvolňovány selektivně jak je patrné z výsledků práce Maurice Chan. V této práci testovali 20 nejvýznamnějších miRNA deregulovaných u nádoru prsu a sledovali jejich expresi paralelně v buňkách nádorové tkáně a sérech pacientů. Zjistili, že pouze 7 těchto miRNA bylo exprimováno zároveň v nádoru i séru (Chan *et al.*, 2013).

Cirkulující miRNA v krvi onkologických pacientů může hrát důležitou roli při rozvoji nádorového onemocnění, stejně jako miRNA v buňkách nádorové tkáně. Mechanismy sekrece a biologická funkce extracelulární miRNA zůstává stále nezcela pochopena (Yu *et al.*, 2011). Zen and Chen-Yu Zhang navrhují tři možné cesty, jak může miRNA vstoupit do krevního běhu: 1) pouhým vyloučením buňkou (podobně jsou vylučovány např. cytokiny a hormony, 2) exosomy s mikročásticemi (MPs -micro particles), 3) prostřednictvím mikrovezikul (MVs- microvesicles), (Zen and Zhang, 2012).



Obrázek č. 5: Znázornění různých způsobů sekrece miRNA do krve. i) Sekrece pomocí váčků a granulí, ii) sekrece na membráně, iii) sekrece z buněčných elementů nazývaných multivezikulární tělíska - multivesicular bodies (MVBs). Převzato z (Zen and Zhang, 2012).

8.1. Pasivní únik z rozbitých buněk

Pasivní únik miRNA z buněk je proces, který nevyžaduje dodání energie. K uvolňování tedy dochází např. při tvorbě nádorových metastáz, chronickém zánětu a při dalších dějích vedoucích k poškození buněk a uvolnění miRNA. Tato cesta však nemá příliš velký vliv na přítomnost miRNA v krvi.

Množství miRNA v tělních tekutinách závisí na stavu organismu, což naznačuje, že buňky samy mohou selektivně uvolňovat miRNA do oběhu podle potřeby. K tomu je však zapotřebí jiných přístupů než prostý pasivní únik z rozbitých buněk.

8.2. Aktivní Sekrece jako MV-Free miRNA

Tento proces je závislý na ATP a teplotě (viz obr. 6, i). Při této cestě je nejprve miRNA ukládána do sekrečních vesikul nebo granulí, které následně interagují s plazmatickou membránou a umožňují tak sekreci miRNA do krevního oběhu, podobně jako se to děje při sekreci hormonu nebo cytokininu (Montero-Hadjadje *et al.*, 2009), (Han *et al.*, 2009).

8.3. Aktivní sekrece prostřednictvím mobilních z buňky odvozených mikrovezikul

Toto je další možná cesta, která vyžaduje dodání energie. Je zprostředkována MV, které jsou odvozeny z buněk a obvykle k ní přiřazujeme MP a exosomy (viz obr. 6, ii a iii). Exosomy jsou membránové váčky endocytického původu uvolňované fúzí multivezikulárních tělísek - multivesicular bodies (MVBs) s plazmatickou membránou (jejich průměr je 40 – 100 nm). Exosomy, které se vyskytují v cirkulaci při nádorovém onemocnění, mohou hrát důležitou roli v mezibuněčné komunikaci (Valadi *et al.*, 2007). MP se oproti exosomům odlučují přímo z plazmatické membrány (jejich průměr je 4100 nm). MVs byly identifikovány v různých tělesných tekutinách, jako je krev, moč, mateřské mléko, a sliny. Druh a počet od buněk odvozených MV se výrazně liší, v závislosti na typu chorobného stavu pacienta (Simpson *et al.*, 2009), (Boulangier *et al.*, 2006).

9. Mikro RNA jako biologický marker a její stabilita

První zmínka o miRNA jako o potenciálních nádorových markerech cirkulujících v krvi byla podána v práci Lawrie *et al* v roce 2008, ve které srovnávali hladiny miRNA u pacientů s B-buněčným lymfomem (DLBCL) a zdravých kontrol. Výsledky ukázaly významně zvýšené hladiny těchto molekul ve skupině pacientů (Lawrie *et al.*, 2008).

MiRNA v porovnání s mRNA má v diagnostice nádorů prsu výhodu, co se týče stability. miRNA daleko déle přetrvává *in vivo* a je velmi stabilní *in vitro*, což je důležité pro klinické studie a umožňuje tak analýzy také z formalínu fixovaných vzorků (Blenkiron *et al.*, 2007c). Bylo potvrzeno, že miRNA ve formalínu fixované a parafínu uchovávané tkáni (FFPE) je na rozdíl od mRNA velmi stabilní, stejně tak jako v čerstvých (zmražených) vzorcích (Li *et al.*, 2007), (Lu *et al.*, 2005).

Bylo také zjištěno, že miRNA v lidské plazmě je chráněna před endogenním působením RNas a je tedy velmi stabilní také v tomto prostředí (Mitchell *et al.*, 2008), (Zen and Zhang, 2012). Vysoká stabilita miRNA byla testována v séru různých organismů (myš, potkan, pes a člověk) a to při vysoce agresivních experimentálních podmínkách. Bylo zjištěno, že sérové cirkulující miRNA mají schopnost „přežít“ var, změny v pH i opakované zmrazování, včetně skladování v dlouhodobě zmraženém stavu (Zen and Zhang, 2012).

Přítomnost miRNA byla zjištěna také v moči pacientů s karcinomem močového měchýře. V práci (Hanke *et al.*, 2010) byl při srovnání zdravých kontrol a těchto pacientů zjištěn významný rozdíl v koncentracích miRNA v sérech.

Několik studií prokázalo přítomnost miRNA také ve slinách a uvádějí možnost jejího využití jako nádorových biomarkerů. Hanson *et al.* ve své práci poskytl navíc komplexní shrnutí výskytu miRNA v dalších biologických tekutinách jako je sperma, sekrety, menstruační krev (Park *et al.*, 2009), (Michael *et al.*, 2010), (Hanson *et al.*, 2009). Na základě těchto informací, došli k závěru, že miRNA je stabilně přítomna v séru, plazmě, moči, krvi, spermatu a dalších tělních sekretech. Mohou být detekovány různými technikami, včetně sekvenování, miRNA microarray analýzou, real-time qRT-PCR. Různé miRNA jsou v tělních tekutinách rozdílně exprimovány v závislosti na lidských dysfunkčních podmínkách. Díky svým vlastnostem tak mají molekuly miRNA velký potenciál jako neinvazivní nebo minimálně invazivní biomarkery různých onemocnění včetně rakoviny (Zen and Zhang, 2012).

PRAKTICKÁ ČÁST PRÁCE

V následujících kapitolách praktické části jsou uvedeny výsledky analýz a aplikované metody, kterými byla ověřována použitelnost nového postupu izolace cirkulující miRNA ze séra, využití přímé reverzní transkripce a následné relativní kvantifikace miR-155 a miR-16. Pro přehlednost je v kapitole 10 uveden také princip izolace a reverzní transkripce celkové mRNA.

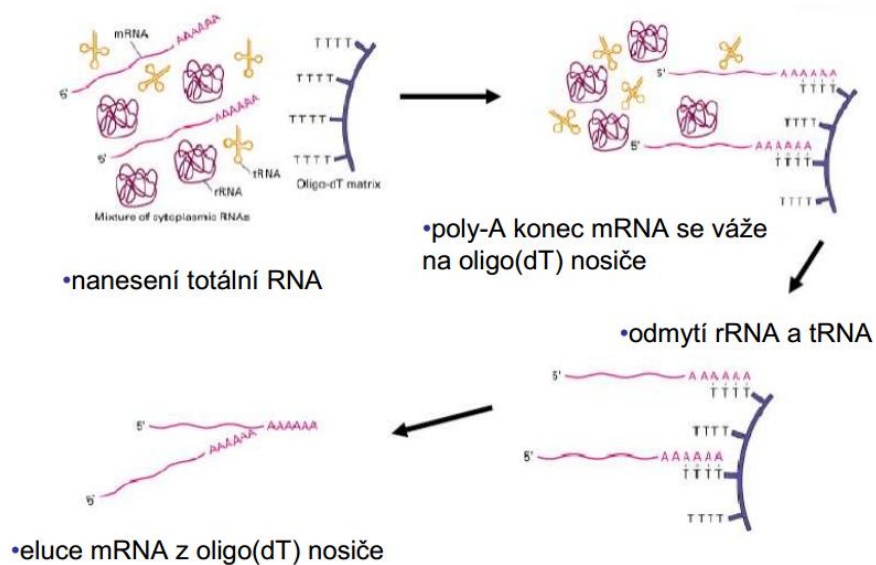
10. Principy použitých metoda metody izolace celkové mRNA

10.1. Izolace celkové mRNA

Izolace celkové mRNA je založena na hybridizaci oligo(dT) kotev s poly(A) sekvence na 3' koncích molekul RNA (veškeré mRNA, dlouhé nekódující RNA). Tyto hybridizační oligo(dT) kotvy mohou být připevněny například na stěnu mikrozkušavky, nebo adsorpci na silikátové částice. Opakovaným promýváním pak dochází k odstranění ostatních složek z roztoku.

Vzorky RNA je po celou dobu izolace potřeba chránit před působením RNáz buď přidáním inhibitoru RNáz, práci se vzorky při nízké teplotě (4°C) nebo skladováním při -70°C.

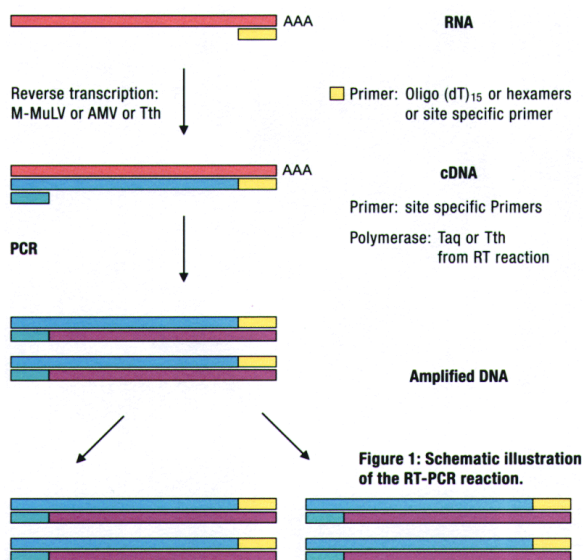
K následným molekulárně biologickým analýzám se využívá cDNA (tzv. komplementární DNA ke studované RNA), která se syntetizuje pomocí reverzní transkripce. Důvodem je vyšší stabilita DNA a vyšší spolehlivost enzymů pracujících s DNA (5). Metoda reverzní transkripce se využívá také při analýzách miRNA s jistou modifikací viz kapitola 10.3.



Obrázek č. 6: Princip izolace celkové mRNA. Převzato a upraveno z internetového odkazu (7).

10.2. Reverzní transkripce celkové mRNA

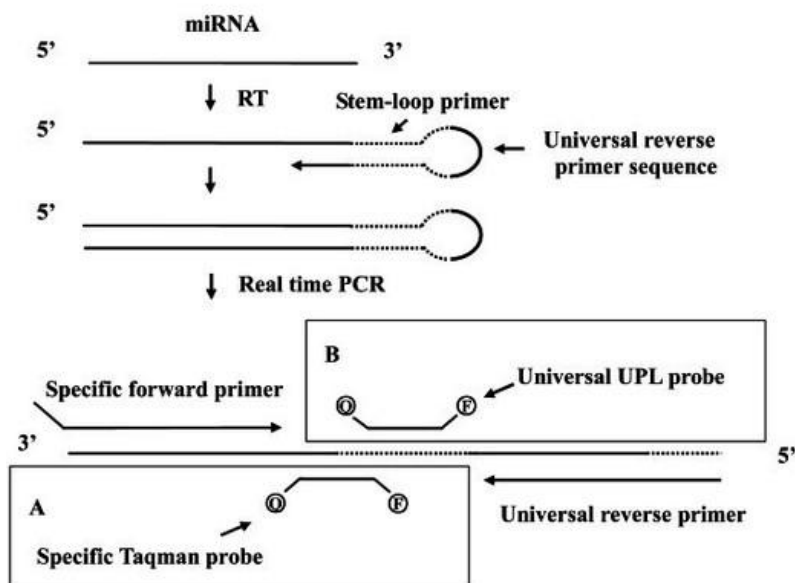
Reverzní transkripce je metoda využívající RNA jako šablónu k syntéze cDNA. V rámci této metody se využívá enzymu reverzní transkriptázy (RT) a krátkého oligonukleotidového primeru obsahujícího poly(T) sekvenci, která komplementárně nasedá na poly(A) konec molekuly mRNA. Výsledný řetězec cDNA může být následně použit jako šablóna pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) viz Obr. č. 7. (6).



Obrázek č. 7: Schéma průběhu RT-PCR. Převzato z internetového odkazu (8).

10.3. Reverzní transkripce miRNA

V této práci byla pro přepis z miRNA do cDNA použita souprava TaqMan MicroRNA reverse transcription kit (LifeTechnologies). Na rozdíl od reverzní transkripce celkové mRNA, při níž se využívá krátkého oligonukleotidového primeru obsahujícího poly(T) sekvenci, je k přepisu do cDNA z celkové RNA využíváno miRNA specifických primerů (pro studované miRNA). Výsledkem tohoto přepisu je tedy cDNA obsahující pouze sekvence námi analyzovaných miRNA, nikoliv celého genomu. Tento přepis lze provádět současně pro více miRNA formou multiplexového uspořádání reakce. Primery jsou vlásenkovitě zatočeny ke 3' konci zralé molekuly miRNA (viz Obr. č. 8). Tato metoda je velmi citlivá a může být používána již u malých množství celkové RNA (9).



Obrázek č. 8: Schéma průběhu RT-PCR pro miRNA. Převzato z internetového odkazu (10).

Získané cDNA ať již z mRNA nebo z miRNA můžeme dále využít při stanovení míry exprese vybraných genů pomocí relativní kvantitativní PCR.

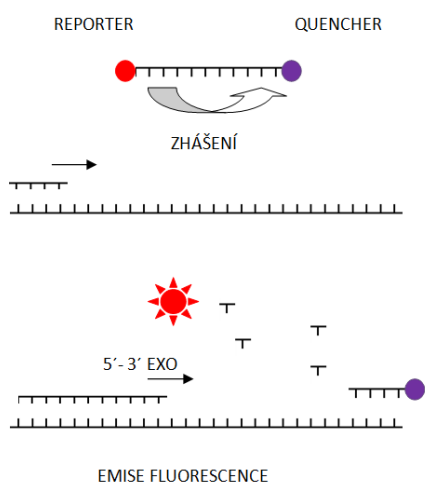
10.4. Přímá reverzní transkripce ze séra s využitím precipitačního pufru

Tento způsob izolace byl poprvé popsán v práci Sota Asaga a jeho kolegů. Při tomto postupu zpracování vzorků séra je v podstatě propojena část izolační s reverzní transkripcí. Podle uvedených výsledků lze velice významně zkrátit čas zpracování vzorků pro analýzu exprese miRNA. Metoda byla vyzkoušena na vzorcích sér 102 pacientek s různými stádii onemocnění karcinomem prsu a 20 vzorcích zdravých kontrol. K deaktivaci proteinů, které by mohly brzdit RT-qPCR byl použit precipitační (deaktivací) pufr, jehož složení je uvedeno v kapitole 11.2.1(Asaga et al., 2011).

10.5. Kvantifikace miRNA s využitím duálně značených hydrolyzačních sond - TaqMan sond

Tato technologie využívá 5' - 3' exonukleázovou aktivitu Taq DNA polymerázy ke štěpení sondy značené na obou koncích fluorofory (reporter = fluoreskující, quencher = nefluoreskující). Sekvence sondy je navržena tak, aby se komplementárně párovala s cílovou sekvencí uvnitř amplifikovaného regionu. Sonda volně přítomná v roztoku zaujímá takovou prostorovou konfiguraci, kdy zhášec = quencher inhibuje reporter a tudíž sonda nesvítí. Pokud

sonda hybridizuje s cílovou sekvencí, aktivuje se díky 5' - 3' exonukleázové aktivitě Taq DNA polymerázy, která v průběhu elongační fáze odštěpuje nukleotidy od 5' konce sondy. Tím dochází k prostorovému oddělení fluoroforů což umožňuje aktivaci fluorescence reportéru. Používané hydrolyzační sondy bývají nejčastěji značeny reportérem na 5' konci a quencherem na 3' konci (11).



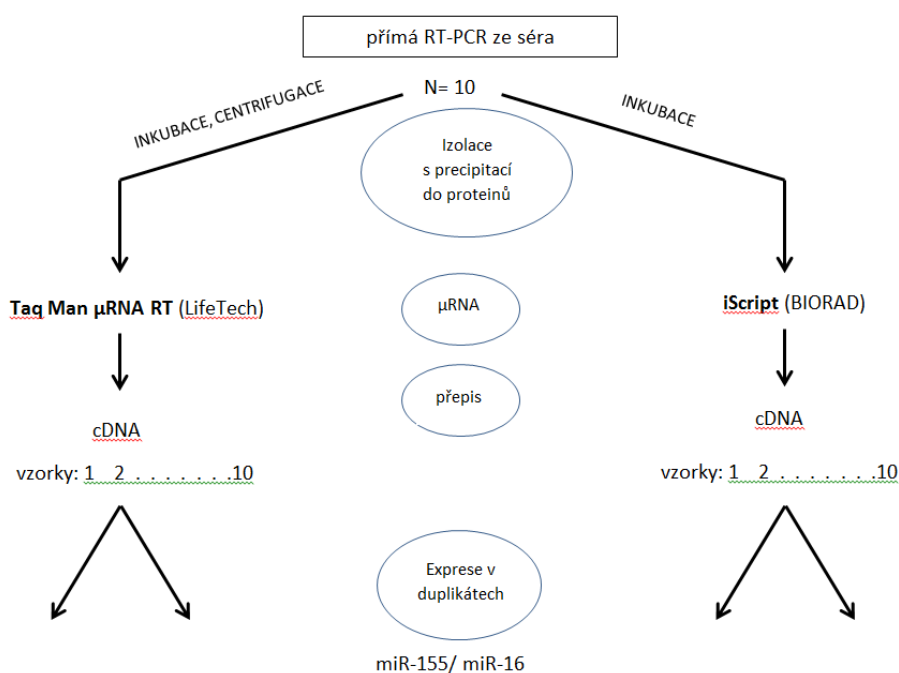
Obrázek č. 9: Schéma principu funkce TaqMan sond. Převzato a upraveno z internetového odkazu (12).

11. Materiál a metodika

11.1. Rozdělení experimentu

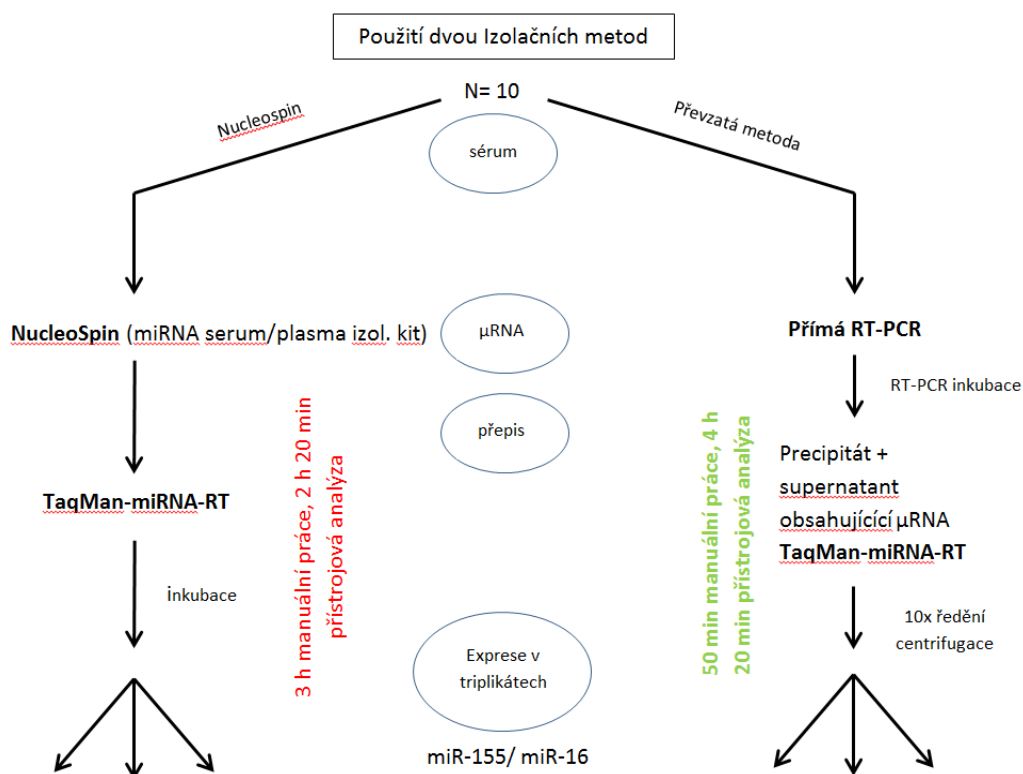
Experiment byl rozdělen do dvou částí. V obou částech byl jako primární materiál využita srážlivá krev pacientek s karcinomem prsu a zdravých kontrol, která byla zpracována postupem uvedeným v kapitole 7.

V první části (test 1) jsme u 10 vzorků dříve zmražených sér (-20°C) pacientek s karcinomem prsu zjišťovali, zda je možné provést reverzní transkripci přímo ze séra, jak bylo uvedeno v práci (Asaga et al., 2011). Metoda tzv. přímé reverzní transkripce dRT (direct reverse transcription) ze séra byla upravena tak, aby inkubační programy odpovídaly doporučením námi použitých dvou komerčně dodávaných souprav pro přepis do cDNA viz Tab č. 1 a Tab č. 2. Jako vstupní materiál byl u testu 1 použit roztok séra s inaktivačním pufrům. Každý vzorek byl zpracován dvěma odlišnými typy reagensů potřebnými pro reverzní transkripci, které byly označeny jako mix A a mix B (Tab č. 1 a Tab č. 2). Vzorky byly inkubovány (přepis do cDNA) při dvou odlišných teplotních podmínkách dle manuálu výrobce viz Tab č. 3 a Tab.č. 4. Po přepisu byly zpracovány metodou qRT-PCR. Objemy reagensů a teplotní profily jsou uvedeny v tabulce č. 5. Byla sledována míra exprese miR-16 a miR-155. Rozložení experimentu je znázorněno na Obrázku č. 10.



Obrázek č. 10: Schéma zobrazení průběhu analýzy – test1.

Druhá část experimentu (test 2) byla zaměřena na ověření shody výsledků relativní kvantifikace miR-16 a miR-155 pomocí qRT-PCR (quantitative real-time PCR) při použití dvou odlišných izolačních postupů cirkulující miRNA ze séra. V prvním případě byly vzorky izolovány komerční soupravou NucleoSpin (Macharey-Nagel), která využívá kolonkovou separaci miRNA. Druhá byla převzata metoda přímé reverzní transkripce, která byla použita také v testu 1 (mix A). Analýza probíhala u 10 vzorků původně zmraženého sér zdravých kontrol a to v triplikátech. U metody dRT byl však na rozdíl od testu 1 striktně dodržen postup používaný autory v původním článku viz kapitola 11.3.5. Postup analýzy je uveden na obrázku č. 11.



Obrázek č. 11: Schéma zobrazení průběhu analýzy – test 2. Text označený červenou a zelenou barvou ukazuje čas potřebný pro manuální zpracování vzorků a čas přístrojové analýzy u obou postupů izolace.

11.2. Použitý materiál a přístroje

11.2.1. Speciální reagentie

Izolace miRNA:

- Izolační souprava NucleoSpin miRNA Plasma (Macherey-Nagel)
- Precipitační (deaktivační) pufr pro přímou reverzní transkripci: 2,5% Tween 20, 50 mmol/L Tris (Sigma-Aldrich), 1 mmol/L EDTA (Sigma-Aldrich)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich)

Reverzní transkripce:

- TaqMan MicroRNA reverse transcription kit (LifeTechnologies)
- TaqMan microRNA assay 20x - primery *miR-16*, *miR-155* (LifeTechnologies)

Relativní kvantifikace:

- TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (LifeTechnologies)
- TaqMan microRNA assay 20x - sondy *miR-16*, *miR-155* (LifeTechnologies)

11.2.2. Obecné reagentie a spotřební materiál

- RNase/DNase free PCR voda (Bioline)
- Sterilní RNase/DNase free plasty – 0,2 mL zkumavky, 1,5 mL a 2mL zkumavky, špičky s filtrem (Eppendorf), 96 jamkové destičky - 0,2 mL (Bioplastics)
- Zakrývací fólie (Bioplastics)

11.2.3. Použití přístrojové vybavení

- Termocykléry Eppendorf Pro S, Biorad T100
- Mrazák -20°C
- Centrifuga Eppendorf 5804R a 5424 (Eppendorf)
- Laminární box HeraSafe (Kaitrade)
- Light Cycler 480 (ROCHE)
- Agilent bioanalyser 2000 (Agilent)
- Chladicí stojánky
-

11.3. Postupy použité v experimentu

11.3.1. Separace séra z plné krve

Biologickým materiálem byla srážlivá krev. Po odběru byla sražená krev centrifugována při 4000 rpm po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Izolované sérum bylo rozděleno do dvou alikvotů (2x 1ml do šroubovacích zkumavek). Jeden alikvot byl použit k okamžité analýze a druhý byl zmražen při -20°C pro validaci výsledků a eventuální další diagnostické použití.

11.3.2. Převzatý a upravený postup přímé reverzní transkripce s použitím dvou souprav pro přepis do cDNA – TEST 1

1. Rozmrazené sérum 10 pacientek bylo centrifugováno při 4000 rpm 5 min.
2. Následně byly připraveny dva master mixy A a B pro RT-PCR podle tabulky č. 1 a 2. Do chlazené destičky byly takto připravené roztoky po 10 µl rozpipetovány do 10 jamek pro mix A a do 10 jamek pro mix B.
3. 10 µl séra každé pacientky bylo následně smícháno s 10 µl precipitačního pufru. Takto vzniklé roztoky byly po 5 µl rozpipetovány do připravených jamek obsahujících dané roztoky.

Tabulka č. 1: Příprava master mixu A pro přepis do cDNA

Mix A.	1 reakce (µl)	11 reakcí (µl)
100mM dNTPs	0,15	1,65
10x Reverse Transcription buffer	1,5	16,5
RNase inhibitor 20U/ul	0,19	2,09
Nuclease-free water	4,16	45,76
Reverse transcriptase 50U/ul	1	11
5x RT primer (miR155 + miR16)	1,5 + 1,5	16,5 + 16,5
Mix sérum + pufr	5	
Celkem	15	

Tabulka č. 2: Příprava master mixu B pro přepis do cDNA

Mix B.	1 reakce (µl)	11 reakcí (µl)
5x iScript Reaction Mix	4	44
iScript Reverse Transcriptase	1	11
RNase inhibitor 20U/ul	0,19	2,09
Nuclease-free water	6,81	74,91
5x RT primer (miR155 + miR16)	1,5 + 1,5	16,5 + 16,5
Mix sérum + pufr	5	
Celkem	15	

4. Vzorčky byly dále inkubovány dvěma způsoby viz Tab č. 3 a 4.

Tabulka č. 3: Použité inkubační podmínky pro Master Mix - A

Mix A: Kit microRNA reverse transcription kit – LifeTech (Cyklér Epp Pro S)	
16°C	30min
42°C	30min
85°C	5min
8°C	hold

Tabulka č. 4: Použité inkubační podmínky pro Master Mix - B

Mix B: Kit iScript – BIORAD (Cyklér BIORAD)	
25°C	5min
42°C	30min
85°C	5min
4°C	hold

11.3.3. Příprava master mixu pro kvantitativní real-time PCR pro mix A a mix B – TEST 1

1. Nejprve byly připraveny master mixy A a B podle tabulky č. 5.
2. Do mikrotitrační destičky bylo následně pipetováno 19,2 μ l mixu A a 17,5 μ l mixu B.
3. Do každé jamky mixu A bylo přidáváno 0,8 μ l neředěné cDNA jednotlivých vzorků. V případě mixu B byla nejprve cDNA získána při RT-PCR zředěna 10x vodou a následně centrifugována při 9000 rcf 5min. Do příslušných pozic mikrotitrační destičky pro mix B bylo pipetováno 2,5 μ l ředěné cDNA.
4. Analýza qPCR proběhla v real-time termocyklyzáru LC480 (ROCHE) za podmínek uvedených v tabulce č. 6.

Tabulka č. 5: Příprava Master Mixu pro kvantitativní real-time PCR provedenou v duplikátech.

Master Mix	Mix A			Mix B		
	1 vzorek (μl)	miR16 (μl)	miR155 (μl)	1 vzorek (μl)	miR16 (μl)	miR155 (μl)
Taq Man Universal PCR Master Mix II	10	230	230	10	230	230
Nuclease-free water	8,2	188,6	188,6	6,5	149,5	149,5
Taq Man micro RNA assay 20x - sonda	1	23	23	1	23	23
Rozpipetovat po	19,2			17,5		
Počet reakcí	23					

Tabulka č. 6: Podmínky pro kvantitativní PCR použité pro oba master mixy A i B a také v testu 2.

Mix A +B (LC480 Roche)	
50°C	2min
95°C	10min
95°C	15sec
60°C	1min

} 40 x

11.3.4. Postup izolace miRNA ze séra komerční kolonkovou soupravou NucleoSpin – TEST 2

1. Do zkumavek bylo napipetováno 400 µl plazmy/séra každého z 10 vzorků. Poté bylo přidáno 100 000x synteticky připravené cel-miR-39 (naředěná ze zásobního roztoku, který je 100 pmol/ µl) a 120 µl lyzačního pufru (MLP). Vzorky byly vortexovány po dobu 5 sec a inkubovány 3 min při pokojové teplotě.
2. Následně bylo ke vzorkům přidáno 40 µl pufru (MPP), vortexováno 5 sec, inkubováno 1 min při pokojové teplotě a následně centrifugováno 3 min při 11000 rcf.
3. Supernatanty vzorků, byly přeneseny do čistých zkumavek.
4. K těmto supernatantům bylo přidáno 530 µl izopropanolu a vortexováno 5 sec.
5. 650 µl každého vzorku z kroku 4 bylo přeneseno na kolonky umístěné v 10 čistých zkumavkách. Následně inkubováno 2 min při pokojové teplotě a centrifugováno 30 sec při 11000 rcf. Prošlé filtráty byly vylity do opadu a kolonky opět umístěny do zkumavek. Poté byl přenesen i zbytek roztoku z kroku 4 a opakován krok 5.
6. Na kolonky bylo nanášeno 100 µl pufru (MW1) a vzorky byly centrifugovány 30 sec při 11000 rcf. Prošlé filtráty byly vylity a kolonky opět vráceny do zkumavek.
7. Na kolonky bylo nanášeno 650 µl pufru (MW2) a vzorky byly centrifugovány 30 sec při 11000 rcf. Prošlé filtráty byly vylity a kolonky opět vráceny do zkumavek.
8. Na kolonky bylo nanášeno 250 µl pufru (MW2) a vzorky byly centrifugovány 2 min při 11000 rcf. Prošlé filtráty byly vylity a kolonky opět vráceny do zkumavek. Pro dokonalejší vysušení zkumavek byla centrifugace ještě jednou opakována.
9. Kolonky byly přeneseny do čistých 1,5 ml zkumavek. Na středy kolonek bylo poté nanášeno 30 µl RNase-free H₂O. Proběhla inkubace 1 min při pokojové teplotě a následná centrifugace 1 min při 11000 rcf. Získané filtráty obsahovaly miRNA, která byla uskladněna při -20°C.

11.3.5. Plně převzatý postup přímé reverzní transkripce s použitím soupravy TaqMan MicroRNA reverse transcription kit – TEST 2

1. Rozmrazená séra 10 zdravých žen byla centrifugována při 4000 rpm 5 min.
2. 2,5 µl séra každé kontroly bylo následně smícháno s 2,5 µl precipitačního pufru. Do takto vzniklých roztoků po 5 µl byly přidány ostatní reagenty potřebné pro RT (viz. Tab. č. 1. Tyto vzorky byly inkubovány 2 h při 37°C s následnou 5 min enzymovou inaktivací při 95°C.
3. Takto přepsané cDNA byly následně 10x zředěny vodou a centrifugovány při pokojové teplotě při 9000 rcf po dobu 5 min (pro odstranění vysrážených proteinů).
4. Při qRT-PCR byly vytvořeny triplikáty každého vzorku a do každé reakce bylo přidáno 2,5 µl naředěné cDNA.

11.3.6. Příprava master mixu pro kvantitativní real-time PCR miR-155 u dvou izolačních metod pro cirkulující miRNA – TEST 2

Pro relativní kvantifikaci byl jako referenční gen použit miR-16, cílovým genem byla miR-155. Práce probíhala po celou dobu přípravy a zpracování vzorků na chladícím stojánku. Pro každou specifickou miRNA byl připraven master mix. Skladba master mixů a jednotlivé objemy reagentů jsou uvedeny v tabulce č. 7.

1. Nejprve byly připraveny master mixy pro miR-16 a miR-155 podle tabulky č. 7.
2. Do mikrotitrační destičky bylo následně pipetováno 17,5 µl příslušného master mixu.
3. Každý ze dvou master mixů (pro miR-16 a miR-155), byl připraven tak, aby mohla proběhnout analýza každého vzorku v triplikátu.
4. Do příslušných jamek bylo následně přidáváno 2,5 µl 10x ředěné a centrifugované cDNA.
5. Vzorky byly analyzovány na přístroji LC480 při podmínkách uvedených v tabulce č. 6.

Tabulka č. 7: Příprava kvantitativní PCR pro miR-155 a miR-16 u dvou izolačních metod v triplikátech.

Název reagensie	1	miR-155	miR-16
	vzorek (μ l)	33 vzorků (μ l)	
TaqMan Universal PCR Master Mix II	10	330	330
Nuclease-free water	6,5	214,5	214,5
TaqMan miRNA assay 20x - sonda	1	33	33

12. Výsledky:

Izolace miRNA proběhla celkem u 10 vzorků sér pacientek s karcinomem prsu a 10 zdravých control. Celkově bylo provedeno 200 reakcí, 80 v rámci testu 1 a 120 v rámci testu 2.

Porovnáním výsledků qRT-PCR mixu A a mixu B v testu 1 byly mezi oběma soubory pro miR-16 zjištěny rozdíly v C_p hodnotách a to také v rámci některých duplikátů v obou mixech. Výsledky C_p hodnot u miR-155 nejsou hodnotitelné viz tabulka č. 8.

Výsledné C_p hodnoty u dvou izolačních postupů – testu 2 jsou shrnuty v tabulce č. 9. Veškeré reakce byly provedeny v triplikátech. U izolace miR-155 pomocí komerční soupravy selhalo 19 reakcí (relativní kvantifikace) z celkových 30 a u přímé RT-PCR selhalo 23 reakcí. Vysoký počet negativních hodnot lze pozorovat také v rámci opakování v triplikátech. U exprese miR-16 selhala kvantifikace pouze jednou a to ve vzorku K5 pro mix B. Tato chyba byla pravděpodobně způsobena chybným pipetováním již při přípravě přepisu do cDNA.

Čas potřebný pro manuální zpracování vzorků sér byl metodou přímé RT-PCR zkrácen na třetinu doby používané u komerční soupravy viz Obr. č. 11. Celková doba manuálního zpracování vzorků tedy byla zkrácena ze 3 hodin na 50 minut.

Tabulka č. 8: Výsledky srovnání Cp hodnot miR-155 a miR-16 u dvou souprav pro přepis do cDNA při přímé RT-PCR ze séra. Pro analýzu v duplikátech byly použité vzorky sér pacientek s karcinomem prsu. Inv – neplatné.

Výsledky testu 1 - srovnání Cp hodnot miR-155 a miR-16 u dvou souprav pro přepis do cDNA												
č, vzorku	Mix A - LifeTech (Cp)						Mix B - BIORAD (Cp)					
	miR-155		miR-16		miR-155 / miR-16		miR-155		miR-16		miR-155 / miR-16	
GB2	0	35	35	35	0	1	0	0	35	35	0	0
GB3	0	0	35	35	0	0	0	0	35	0	0	Inv
GB6	0	0	35	35	0	0	0	0	35	35	0	0
GB7	35	35	35	35	1	1	0	0	0	35	Inv	0
GB8	0	0	35	35	0	0	0	0	0	35	Inv	0
GB9	0	0	35	35	0	0	0	35	35	0	0	Inv
GB10	0	0	35	0	0	Inv	0	0	0	35	Inv	0
GB50	35	0	0	35	Inv	0	0	0	0	0	Inv	Inv
GB68	0	35	35	35	0	1	0	0	0	35	Inv	0
GB79	0	0	35	35	0	0	0	0	35	0	0	Inv

Tabulka č. 9: Výsledky srovnání Cp hodnot miR-155 a miR16 u dvou izolačních postupů při použití soupravy LifeTech pro přepis do cDNA, Pro analýzu v triplikátech byly použité vzorky zdravých kontrol. Inv – neplatné

Výsledky testu 2 - srovnání Cp hodnot miR-155 a miR16 u dvou izolačních postupů																		
č, vzorku	Komerční souprava NucleoSpin (Cp)									Převzata metoda přímé RT-PCR ze séra (Cp)								
	miR-155			miR-16			miR-155 / miR-16			miR-155			miR-16			miR-155 / miR-16		
K1	0	35	0	35	35	35	0	1	0	0	0	0	0	35	35	Inv	0	0
K2	0	35	0	33,4	33,4	34	0	0,3	0	35	0	0	35	35	35	1	0	0
K3	35	35	0	35	35	35	1	1	0	35	0	0	35	35	35	1	0	0
K5	0	35	0	35	35	35	0	1	0	0	0	0	0	0	0	Inv	Inv	Inv
K6	0	0	0	35	35	35	0	0	0	0	0	35	35	35	35	0	0	1
K9	35	0	0	31,7	31,6	32	0,1	0	0	0	0	35	35	35	35	0	0	1
K11	0	35	0	33,4	33,5	33	0	0,4	0	0	0	35	35	35	35	0	0	1
K12	0	0	35	35	35	35	0	0	1	35	0	0	35	35	35	1	0	0
K13	0	35	0	34,2	34,3	35	0	0,6	0	0	0	0	35	35	35	0	0	0
K14	35	0	35	35	35	35	1	0	1	0	0	35	35	35	35	0	0	1

13. Diskuze:

Karcinom prsu je nejčastějším nádorovým onemocněním u žen v ČR a jeho incidence stále narůstá. Většina případů vzniká v průběhu života spontánně v důsledku přímé (mutace v DNA), či nepřímé (epigenetické zásahy, post-transkripční regulace) interakce s prostředím a ovlivňuje tak míru exprese genů. Asi 5-10% případů má hereditární základ, většinou založený na germinální mutaci v genech označovaných jako *BRCA1* a *BRCA2*.

MikroRNA spojené se vznikem nádorů můžeme rozdělit podle jejich funkce podobně jako strukturní geny na nádorově supresorové (se sníženou expresí) a onkogenní (se zvýšenou expresí). Některými RNA však nelze zařadit striktně do jedné z těchto kategorií a to z důvodu jejich zapojení do složitých sítí molekulárních drah, kdy v jedné dráze mohou fungovat jako supresor a v jiné jako onkogen (Adams *et al.*, 2007), podobně jako je tomu u enzymů účastnících se biogeneze miRNA (Elbashir *et al.*, 2001).

Výhodou miRNA oproti jiným molekulám používaným v současnosti v diagnostice (proteiny, mRNA) je její vysoká stabilita, přítomnosti ve všech tělních tekutinách (krev, sérum, moč, sekrety, aj.) a tkáních a její selektivní uvolňování do cirkulace při různých patologických procesech, což umožňuje neinvazivní diagnostické a terapeutické využití těchto molekul.

Od objevení funkce miRNA v rámci regulace genové exprese došlo k velkému pokroku. Podle databáze miRBase, je u lidí známo více než 1400 těchto molekul a stále dochází k objevům nových. Většina již prozkoumaných miRNA má za cíl regulaci genů odpovědných za diferenciaci, buněčnou proliferaci, přežívání, angiogenesi a proto není divu, že se uplatňují ve své deregulované podobě také při patologických procesech včetně nádorového onemocnění. Jak bylo uvedeno v kapitole 7. Patologické hladiny některých miRNA mají spojitost s agresivitou a metastazováním u pacientů s onkologickým onemocněním. V této studii byla zjištěna souvislost mezi zvýšenou hladinou proteinu Ago2 a agresivnějším typem nádoru prsu (Blenkiron *et al.*, 2007a). Nicméně výsledky různých prací týkající se relativní kvantifikace konkrétních miRNA se nemusí vždy shodovat to z důvodu rozdílné molekulární histologické charakterizace použitých primárních vzorků a postupů využívaných při jejich zpracování. Jako cílovou molekulu pro relativní kvantifikaci ze séra jsme vybrali miR-155, jejíž zvýšená exprese je dávana do souvislosti s angiogenezí, agresivitou a metastazováním u karcinomu prsu (Kong *et al.*, 2008).

V praktické části bylo provedeno srovnání dvou souprav pro přepis miRNA do cDNA (TaqMan, iScript) u vzorků zmražených sér 10 pacientek s rakovinou prsu.

Rozdíly v Cp hodnotách, které byly zjištěny při porovnání výsledků qRT-PCR mixu A a mixu B v testu 1 mohly být způsobeny využitím souprav iScript, která původně nebyla určena pro přepis miRNA do cDNA. Nelze vyloučit ani chybu v pipetování, čemuž by také odpovídaly rozdílné výsledky Cp hodnot duplikátů jednotlivých vzorků (viz Tab. č. 8). Výsledky Cp hodnot u miR-155 nejsou hodnotitelné pravděpodobně z důvodu chyby, která mohla být způsobena nefunkčností některé z reagentů. Z daných výsledků je patrné, že pro další analýzu v testu 2 bylo možné použít soupravu pro přepis do cDNA firma LifeTech.

Při ověření dvou způsobů izolace miRNA ze séra v testu 2 soupravou NucleoSpin a přímou RT-PCR, byla potvrzena závažná chyba, která se objevila také v testu 1 při expresi miR-155. Vzhledem k tomu, že exprese miR-16 proběhla v pořádku můžeme vyloučit chybu pipetování i chybu přístrojovou. Je tedy velmi pravděpodobné, že tato chyba byla způsobena nefunkčností některé z reagentů. Hodnoty Cp miR-16 získané po izolaci soupravou NucleoSpin se téměř shodují s hodnotami získanými přímou RT-PCR jak je patrné z tabulky č. 9. Lze tedy konstatovat, že výsledky experimentů uvedených v praktické části bakalářské práce potvrzují závěry Asaga *et al.* co se týče funkčnosti metodiky přímé RT-PCR ze séra. Metoda je tedy funkční a lze ji využít, jako rychlejší, manuálně a finančně méně náročnou alternativou ke komerčně dostupným izolačním soupravám. Pro potvrzení těchto výsledků by bylo vhodné provést analýzu větším souborem vzorků.

Selhání analýzy exprese miR-155 bylo způsobeno degradací sond, které jsou citlivé na teplotní změny při opakovaných cyklech zmrazování, nebo v důsledku působení světla. Nicméně tomuto neodpovídá jejich uchování, jelikož reagentie byla před zahájením analýz alikvotována do menších objemů a zmrazena. Pro analýzu byly vždy použity jen nutné objemy, ostatní alikvóty nebyly rozmrazovány. Lze předpokládat také možný rozpad primerů, protože v tomto případě nebyly používány alikvóty. Degradace primeru je ovšem méně pravděpodobná, nicméně možná. Měření koncentrace cDNA, kterou bychom mohli ověřit případné selhání primerů pro přepis do cDNA však v tomto případě není možné použít z důvodu duplexového uspořádání reakce (společný přepis miR-155 a miR-16 do cDNA v jedné reakci). Pro ověření degradace bude proveden samostatný přepis pro miR-155. Vyšší hodnoty Cp u miR-16 u přímé RT-PCR by mohly být sníženy zvětšením objemu cDNA přidávané reakční směsi pro qRT-PCR.

14. Závěr

Závěrem lze shrnout, že mikroRNA výrazným způsobem zasahuje do procesu karcinogeneze u nádoru prsu a do celé řady jiných fyziologických i patologických procesů. Uplatňují se jako nádorové supresory i onkogeny ve složitých sítích biologických drah. Kromě solidní tkáně jsou tyto molekuly uvolňovány také do tělních tekutin včetně krve, jsou relativně snadno dostupné a vysoce stabilní, což z nich činí nadějně molekuly pro využití v diagnostice jako minimálně inazivní markery.

Izolace mikroRNA zahrnuje velké množství přístupů jež jsou finančně i manuálně náročné. Tyto limity by mohla pomoci překonat metoda přímé RT-PCR, která výrazným způsobem zkracuje dobu manuálního zpracování vzorků a snižuje finanční náklady. Tato práce potvrzuje funkčnost této metody v praxi.

15. Citovaná literatura

- Adams, B. D., H. Furneaux, and B. A. White, 2007, The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines: *Mol.Endocrinol.*, v. 21, no. 5, p. 1132-1147.
- Agrawal, N., P. V. Dasaradhi, A. Mohammed, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar, and S. K. Mukherjee, 2003, RNA interference: biology, mechanism, and applications: *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, v. 67, no. 4, p. 657-685.
- Ahmad, A., Z. Wang, D. Kong, S. Ali, Y. Li, S. Banerjee, R. Ali, and F. H. Sarkar, 2010, FoxM1 down-regulation leads to inhibition of proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through the modulation of extra-cellular matrix degrading factors: *Breast Cancer Res.Treat.*, v. 122, no. 2, p. 337-346.
- Asaga, S., C. Kuo, T. Nguyen, M. Terpenning, A. E. Giuliano, and D. S. Hoon, 2011, Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer: *Clin.Chem.*, v. 57, no. 1, p. 84-91.
- Avril-Sassen, S. et al., 2009, Characterisation of microRNA expression in post-natal mouse mammary gland development: *BMC.Genomics*, v. 10, p. 548.
- Bagasra, O., and K. R. Prilliman, 2004, RNA interference: the molecular immune system: *J.Mol.Histol.*, v. 35, no. 6, p. 545-553.
- Bart, T., 2010, Cost effectiveness of cord blood versus bone marrow and peripheral blood stem cells: *Clinicoecon.Outcomes.Res.*, v. 2, p. 141-147.
- Bartel, D. P., 2004, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function: *Cell*, v. 116, no. 2, p. 281-297.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon, 2001, Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference: *Nature*, v. 409, no. 6818, p. 363-366.
- Blenkiron, C. et al., 2007, MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype: *Genome Biol.*, v. 8, no. 10, p. R214.
- Boulanger, C. M., N. Amabile, and A. Tedgui, 2006, Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease: *Hypertension*, v. 48, no. 2, p. 180-186.
- Bracken, C. P., P. A. Gregory, N. Kolesnikoff, A. G. Bert, J. Wang, M. F. Shannon, and G. J. Goodall, 2008, A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition: *Cancer Res.*, v. 68, no. 19, p. 7846-7854.
- Brosh, R. et al., 2008, p53-Repressed miRNAs are involved with E2F in a feed-forward loop promoting proliferation: *Mol.Syst.Biol.*, v. 4, p. 229.
- Burk, U., J. Schubert, U. Wellner, O. Schmalhofer, E. Vincan, S. Spaderna, and T. Brabletz, 2008, A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells: *EMBO Rep.*, v. 9, no. 6, p. 582-589.
- Cai, X., C. H. Hagedorn, and B. R. Cullen, 2004, Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs: *RNA.*, v. 10, no. 12, p. 1957-1966.

- Calin, G. A., and C. M. Croce, 2006, MicroRNA signatures in human cancers: *Nat.Rev.Cancer*, v. 6, no. 11, p. 857-866.
- Calin, G. A. et al., 2002, Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 99, no. 24, p. 15524-15529.
- Calin, G. A. et al., 2004a, MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 101, no. 32, p. 11755-11760.
- Calin, G. A. et al., 2004b, Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 101, no. 9, p. 2999-3004.
- Chan, M., C. S. Liaw, S. M. Ji, H. H. Tan, C. Y. Wong, A. A. Thike, P. H. Tan, G. H. Ho, and A. S. Lee, 2013, Identification of circulating microRNA signatures for breast cancer detection: *Clin.Cancer Res.*, v. 19, no. 16, p. 4477-4487.
- Chang, T. C., D. Yu, Y. S. Lee, E. A. Wentzel, D. E. Arking, K. M. West, C. V. Dang, A. Thomas-Tikhonenko, and J. T. Mendell, 2008, Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis: *Nat.Genet.*, v. 40, no. 1, p. 43-50.
- Chen, Y., M. Banda, C. L. Speyer, J. S. Smith, A. B. Rabson, and D. H. Gorski, 2010, Regulation of the expression and activity of the antiangiogenic homeobox gene GAX/MEOX2 by ZEB2 and microRNA-221: *Mol.Cell Biol.*, v. 30, no. 15, p. 3902-3913.
- Christoffersen, N. R., A. Silahatoglu, U. A. Orom, S. Kauppinen, and A. H. Lund, 2007, miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFH1B: *RNA.*, v. 13, no. 8, p. 1172-1178.
- Cimmino, A. et al., 2005, miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 102, no. 39, p. 13944-13949.
- Cochrane, D. R., E. N. Howe, N. S. Spoelstra, and J. K. Richer, 2010, Loss of miR-200c: A Marker of Aggressiveness and Chemoresistance in Female Reproductive Cancers: *J.Oncol.*, v. 2010, p. 821717.
- Corcoran, C., A. M. Friel, M. J. Duffy, J. Crown, and L. O'Driscoll, 2011, Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer: *Clin.Chem.*, v. 57, no. 1, p. 18-32.
- Coulouarn, C., V. M. Factor, J. B. Andersen, M. E. Durkin, and S. S. Thorgeirsson, 2009, Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties: *Oncogene*, v. 28, no. 40, p. 3526-3536.
- Cox, A. et al., 2007, A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk: *Nat.Genet.*, v. 39, no. 3, p. 352-358.
- Croce, C. M., 2008, Oncogenes and cancer: *N.Engl.J.Med.*, v. 358, no. 5, p. 502-511.
- Denli, A. M., B. B. Tops, R. H. Plasterk, R. F. Ketting, and G. J. Hannon, 2004, Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex: *Nature*, v. 432, no. 7014, p. 231-235.
- Dews, M. et al., 2006, Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster: *Nat.Genet.*, v. 38, no. 9, p. 1060-1065.
- Di, L. G. et al., 2010, MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer: *J.Natl.Cancer Inst.*, v. 102, no. 10, p. 706-721.

- Easton, D. F. et al., 2007, Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci: *Nature*, v. 447, no. 7148, p. 1087-1093.
- Egger, G., G. Liang, A. Aparicio, and P. A. Jones, 2004, Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy: *Nature*, v. 429, no. 6990, p. 457-463.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, 2001, RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs: *Genes Dev.*, v. 15, no. 2, p. 188-200.
- Esquela-Kerscher, A., and F. J. Slack, 2006, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer: *Nat.Rev.Cancer*, v. 6, no. 4, p. 259-269.
- Easton, D. F. et al., 2007, Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci: *Nature*, v. 447, no. 7148, p. 1087-1093.
- George, G. P., and R. D. Mittal, 2010, MicroRNAs: Potential biomarkers in cancer: *Indian J.Clin.Biochem.*, v. 25, no. 1, p. 4-14.
- Greene, S. B., P. H. Gunaratne, S. M. Hammond, and J. M. Rosen, 2010a, A putative role for microRNA-205 in mammary epithelial cell progenitors: *J.Cell Sci.*, v. 123, no. Pt 4, p. 606-618.
- Greene, S. B., J. I. Herschkowitz, and J. M. Rosen, 2010b, Small players with big roles: microRNAs as targets to inhibit breast cancer progression: *Curr.Drug Targets.*, v. 11, no. 9, p. 1059-1073.
- Gregory, P. A., A. G. Bert, E. L. Paterson, S. C. Barry, A. Tsykin, G. Farshid, M. A. Vadas, Y. Khew-Goodall, and G. J. Goodall, 2008, The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1: *Nat.Cell Biol.*, v. 10, no. 5, p. 593-601.
- Gregory, R. I., K. P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch, and R. Shiekhattar, 2004, The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs: *Nature*, v. 432, no. 7014, p. 235-240.
- Gross, E., N. Arnold, J. Goette, U. Schwarz-Boeger, and M. Kiechle, 1999, A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC: *Hum.Genet.*, v. 105, no. 1-2, p. 72-78.
- Guo, X., Y. Wu, and R. S. Hartley, 2009, MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer: *RNA.Biol.*, v. 6, no. 5, p. 575-583.
- Han, C., T. Chen, M. Yang, N. Li, H. Liu, and X. Cao, 2009, Human SCAMP5, a novel secretory carrier membrane protein, facilitates calcium-triggered cytokine secretion by interaction with SNARE machinery: *J.Immunol.*, v. 182, no. 5, p. 2986-2996.
- Han, J., Y. Lee, K. H. Yeom, Y. K. Kim, H. Jin, and V. N. Kim, 2004, The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing: *Genes Dev.*, v. 18, no. 24, p. 3016-3027.
- Hanke, M., K. Hoefig, H. Merz, A. C. Feller, I. Kausch, D. Jocham, J. M. Warnecke, and G. Sczakiel, 2010, A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer: *Urol.Oncol.*, v. 28, no. 6, p. 655-661.
- Hanson, E. K., H. Lubenow, and J. Ballantyne, 2009, Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs: *Anal.Biochem.*, v. 387, no. 2, p. 303-314.
- Hayashita, Y. et al., 2005, A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation: *Cancer Res.*, v. 65, no. 21, p. 9628-9632.

- He, L. et al., 2007, A microRNA component of the p53 tumour suppressor network: *Nature*, v. 447, no. 7148, p. 1130-1134.
- Hibio, N., K. Hino, E. Shimizu, Y. Nagata, and K. Ui-Tei, 2012, Stability of miRNA 5'terminal and seed regions is correlated with experimentally observed miRNA-mediated silencing efficacy: *Sci.Rep.*, v. 2, p. 996.
- Hunter, D. J. et al., 2007, A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer: *Nat.Genet.*, v. 39, no. 7, p. 870-874.
- Hwang, J. H. et al., 2010, Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer: *PLoS.One.*, v. 5, no. 5, p. e10630.
- Iorio, M. V., P. Casalini, C. Piovan, L. G. Di, A. Merlo, T. Triulzi, S. Menard, C. M. Croce, and E. Tagliabue, 2009, microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer: *Cancer Res.*, v. 69, no. 6, p. 2195-2200.
- Iorio, M. V., P. Casalini, E. Tagliabue, S. Menard, and C. M. Croce, 2008, MicroRNA profiling as a tool to understand prognosis, therapy response and resistance in breast cancer: *Eur.J.Cancer*, v. 44, no. 18, p. 2753-2759.
- Iorio, M. V. et al., 2005, MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer: *Cancer Res.*, v. 65, no. 16, p. 7065-7070.
- Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, 2011, Global cancer statistics: *CA Cancer J.Clin.*, v. 61, no. 2, p. 69-90.
- Jiang, S., H. W. Zhang, M. H. Lu, X. H. He, Y. Li, H. Gu, M. F. Liu, and E. D. Wang, 2010, MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene: *Cancer Res.*, v. 70, no. 8, p. 3119-3127.
- Kato, M., J. Zhang, M. Wang, L. Lanting, H. Yuan, J. J. Rossi, and R. Natarajan, 2007, MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 104, no. 9, p. 3432-3437.
- Kim, W. C., and C. H. Lee, 2009, The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1796, no. 2, p. 99-113.
- Kondo, N., T. Toyama, H. Sugiura, Y. Fujii, and H. Yamashita, 2008, miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer: *Cancer Res.*, v. 68, no. 13, p. 5004-5008.
- Kong, W., L. He, M. Coppola, J. Guo, N. N. Esposito, D. Coppola, and J. Q. Cheng, 2010, MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer: *J.Biol.Chem.*, v. 285, no. 23, p. 17869-17879.
- Kong, W., H. Yang, L. He, J. J. Zhao, D. Coppola, W. S. Dalton, and J. Q. Cheng, 2008, MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA: *Mol.Cell Biol.*, v. 28, no. 22, p. 6773-6784.
- Kozomara, A., and S. Griffiths-Jones, 2011, miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data: *Nucleic Acids Res.*, v. 39, no. Database issue, p. D152-D157.
- Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, 2010, The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay: *Nat.Rev.Genet.*, v. 11, no. 9, p. 597-610.

- Krol, K., I. Y. Morozov, M. G. Jones, T. Wyszomirski, P. Weglenski, A. Dzikowska, and M. X. Caddick, 2013, RrmA regulates the stability of specific transcripts in response to both nitrogen source and oxidative stress: *Mol.Microbiol.*, v. 89, no. 5, p. 975-988.
- Kuehbacher, A., C. Urbich, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler, 2007, Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis: *Circ.Res.*, v. 101, no. 1, p. 59-68.
- Kumar, M. S., J. Lu, K. L. Mercer, T. R. Golub, and T. Jacks, 2007, Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis: *Nat.Genet.*, v. 39, no. 5, p. 673-677.
- Kumarswamy, R., I. Volkmann, and T. Thum, 2011, Regulation and function of miRNA-21 in health and disease: *RNA.Biol.*, v. 8, no. 5, p. 706-713.
- Landi, M. T. et al., 2010, MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer: *Clin.Cancer Res.*, v. 16, no. 2, p. 430-441.
- Landthaler, M., A. Yalcin, and T. Tuschl, 2004, The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis: *Curr.Biol.*, v. 14, no. 23, p. 2162-2167.
- Lawrie, C. H. et al., 2008, Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma: *Br.J.Haematol.*, v. 141, no. 5, p. 672-675.
- Lee, I., S. S. Ajay, J. I. Yook, H. S. Kim, S. H. Hong, N. H. Kim, S. M. Dhanasekaran, A. M. Chinnaiyan, and B. D. Athey, 2009, New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites: *Genome Res.*, v. 19, no. 7, p. 1175-1183.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, and V. Ambros, 1993, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*: *Cell*, v. 75, no. 5, p. 843-854.
- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, and V. N. Kim, 2004, MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II: *EMBO J.*, v. 23, no. 20, p. 4051-4060.
- Li, J., P. Smyth, R. Flavin, S. Cahill, K. Denning, S. Aherne, S. M. Guenther, J. J. O'Leary, and O. Sheils, 2007, Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells: *BMC.Biotechnol.*, v. 7, p. 36.
- Liu, H., Y. D. Cao, W. X. Ye, and Y. Y. Sun, 2010, Effect of microRNA-206 on cytoskeleton remodelling by downregulating Cdc42 in MDA-MB-231 cells: *Tumori*, v. 96, no. 5, p. 751-755.
- Liu, X., C. Wang, Z. Chen, Y. Jin, Y. Wang, A. Kolokythas, Y. Dai, and X. Zhou, 2011, MicroRNA-138 suppresses epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cell lines: *Biochem.J.*, v. 440, no. 1, p. 23-31.
- Lu, J. et al., 2005, MicroRNA expression profiles classify human cancers: *Nature*, v. 435, no. 7043, p. 834-838.
- Lujambio, A. et al., 2008, A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 105, no. 36, p. 13556-13561.
- Mattie, M. D. et al., 2006, Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies: *Mol.Cancer*, v. 5, p. 24.
- Mattiske, S., R. J. Suetani, P. M. Neilsen, and D. F. Callen, 2012, The oncogenic role of miR-155 in breast cancer: *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, v. 21, no. 8, p. 1236-1243.

- Menard, S., P. Casalini, M. Campiglio, S. M. Pupa, and E. Tagliabue, 2004, Role of HER2/neu in tumor progression and therapy: *Cell Mol.Life Sci.*, v. 61, no. 23, p. 2965-2978.
- Meng, F., R. Henson, H. Wehbe-Janek, K. Ghoshal, S. T. Jacob, and T. Patel, 2007, MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer: *Gastroenterology*, v. 133, no. 2, p. 647-658.
- Michael, A., S. D. Bajracharya, P. S. Yuen, H. Zhou, R. A. Star, G. G. Illei, and I. Alevizos, 2010, Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers: *Oral Dis.*, v. 16, no. 1, p. 34-38.
- Mitchell, P. S. et al., 2008, Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 105, no. 30, p. 10513-10518.
- Montero-Hadjadje, M. et al., 2009, Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: role of conserved N- and C-terminal peptides: *J.Biol.Chem.*, v. 284, no. 18, p. 12420-12431.
- Munker, R., and G. A. Calin, 2011, MicroRNA profiling in cancer: *Clin.Sci.(Lond)*, v. 121, no. 4, p. 141-158.
- Muralidhar, B. et al., 2007, Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels: *J.Pathol.*, v. 212, no. 4, p. 368-377.
- O'Day, E., and A. Lal, 2010, MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer: *Breast Cancer Res.*, v. 12, no. 2, p. 201.
- O'Donnell, K. A., E. A. Wentzel, K. I. Zeller, C. V. Dang, and J. T. Mendell, 2005, c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression: *Nature*, v. 435, no. 7043, p. 839-843.
- Olive, V., I. Jiang, and L. He, 2010, mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network: *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, v. 42, no. 8, p. 1348-1354.
- Oliveira, P. A., A. Colaco, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, P. L. De La Cruz, and C. Lopes, 2007, Chemical carcinogenesis: *An.Acad.Bras.Cienc.*, v. 79, no. 4, p. 593-616.
- Ota, A., H. Tagawa, S. Karnan, S. Tsuzuki, A. Karpas, S. Kira, Y. Yoshida, and M. Seto, 2004, Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma: *Cancer Res.*, v. 64, no. 9, p. 3087-3095.
- Pandey, D. P., and D. Picard, 2009, miR-22 inhibits estrogen signaling by directly targeting the estrogen receptor alpha mRNA: *Mol.Cell Biol.*, v. 29, no. 13, p. 3783-3790.
- Park, N. J., H. Zhou, D. Elashoff, B. S. Henson, D. A. Kastratovic, E. Abemayor, and D. T. Wong, 2009, Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection: *Clin.Cancer Res.*, v. 15, no. 17, p. 5473-5477.
- Pecorino, L., (2008): *Molekular biology of cancer, Mechanism, targets and therapeutics*, sec. Edition, Oxford, ISBN: 978-0-19-921148-7.
- Pinkel, D., and D. G. Albertson, 2005, Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer: *Nat.Genet.*, v. 37 Suppl, p. S11-S17.
- Qi, L. et al., 2009, Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma: *BMC.Cancer*, v. 9, p. 163.

- Roberts, A. P., A. P. Lewis, and C. L. Jopling, 2011, miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components: *Nucleic Acids Res.*, v. 39, no. 17, p. 7716-7729.
- Saini, S. et al., 2011, Regulatory Role of mir-203 in Prostate Cancer Progression and Metastasis: *Clin.Cancer Res.*, v. 17, no. 16, p. 5287-5298.
- Schickel, R., S. M. Park, A. E. Murmann, and M. E. Peter, 2010, miR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1: *Mol.Cell*, v. 38, no. 6, p. 908-915.
- Scott, G. K., A. Goga, D. Bhaumik, C. E. Berger, C. S. Sullivan, and C. C. Benz, 2007, Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b: *J.Biol.Chem.*, v. 282, no. 2, p. 1479-1486.
- Scotto, L. et al., 2008, Integrative genomics analysis of chromosome 5p gain in cervical cancer reveals target over-expressed genes, including Drosha: *Mol.Cancer*, v. 7, p. 58.
- Sempere, L. F., M. Christensen, A. Silaharoglu, M. Bak, C. V. Heath, G. Schwartz, W. Wells, S. Kauppinen, and C. N. Cole, 2007, Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer: *Cancer Res.*, v. 67, no. 24, p. 11612-11620.
- Sharma, C. M., and J. Vogel, 2009, Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA: *Curr.Opin.Microbiol.*, v. 12, no. 5, p. 536-546.
- Shi, L., J. Chen, J. Yang, T. Pan, S. Zhang, and Z. Wang, 2010, MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity: *Brain Res.*, v. 1352, p. 255-264.
- Shi, X. B. et al., 2007, An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 104, no. 50, p. 19983-19988.
- Shiohama, A., T. Sasaki, S. Noda, S. Minoshima, and N. Shimizu, 2003, Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 304, no. 1, p. 184-190.
- Siegel, R. et al., 2012, Cancer treatment and survivorship statistics, 2012: *CA Cancer J.Clin.*, v. 62, no. 4, p. 220-241.
- Simpson, R. J., J. W. Lim, R. L. Moritz, and S. Mathivanan, 2009, Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential: *Expert.Rev.Proteomics.*, v. 6, no. 3, p. 267-283.
- Slaby, O., M. Svoboda, P. Fabian, T. Smerdova, D. Knoflickova, M. Bednarikova, R. Nenutil, and R. Vyzula, 2007, Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer: *Oncology*, v. 72, no. 5-6, p. 397-402.
- Song, G., Y. Zhang, and L. Wang, 2009, MicroRNA-206 targets notch3, activates apoptosis, and inhibits tumor cell migration and focus formation: *J.Biol.Chem.*, v. 284, no. 46, p. 31921-31927.
- Sorlie, T. et al., 2001, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 98, no. 19, p. 10869-10874.
- Snustad, D., Simmons, M. J., (2009): *Genetika, nakl.: MU Brno*, 1. Vyd., ISBN – 13: 978-80-210-4852-2.

- Sugito, N. et al., 2006, RNASEN regulates cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients: *Clin.Cancer Res.*, v. 12, no. 24, p. 7322-7328.
- Tang, J., A. Ahmad, and F. H. Sarkar, 2012, The Role of MicroRNAs in Breast Cancer Migration, Invasion and Metastasis: *Int.J.Mol.Sci.*, v. 13, no. 10, p. 13414-13437.
- Thomson, J. M., M. Newman, J. S. Parker, E. M. Morin-Kensicki, T. Wright, and S. M. Hammond, 2006, Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer: *Genes Dev.*, v. 20, no. 16, p. 2202-2207.
- Tokumaru, S., M. Suzuki, H. Yamada, M. Nagino, and T. Takahashi, 2008, let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop: *Carcinogenesis*, v. 29, no. 11, p. 2073-2077.
- Tsai, W. C. et al., 2009, MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma: *Hepatology*, v. 49, no. 5, p. 1571-1582.
- Uhlmann, S. et al., 2010, miR-200bc/429 cluster targets PLCgamma1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer: *Oncogene*, v. 29, no. 30, p. 4297-4306.
- Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee, and J. O. Lotvall, 2007, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells: *Nat.Cell Biol.*, v. 9, no. 6, p. 654-659.
- Valastyan, S., F. Reinhardt, N. Benaich, D. Calogrias, A. M. Szasz, Z. C. Wang, J. E. Brock, A. L. Richardson, and R. A. Weinberg, 2009, A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis: *Cell*, v. 137, no. 6, p. 1032-1046.
- Vickers, T. A., W. F. Lima, J. G. Nichols, and S. T. Crooke, 2007, Reduced levels of Ago2 expression result in increased siRNA competition in mammalian cells: *Nucleic Acids Res.*, v. 35, no. 19, p. 6598-6610.
- Volinia, S. et al., 2006, A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 103, no. 7, p. 2257-2261.
- Vyzula, R., L. Dusek, J. Prausova, J. Abrahamova, and J. Vorlicek, 2011, [18th oncology forum--report from the meeting in Brno November 5 2010]: *Klin.Onkol.*, v. 24, no. 1, p. 58-66.
- Wang, F., Z. Zheng, J. Guo, and X. Ding, 2010, Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor: *Gynecol.Oncol.*, v. 119, no. 3, p. 586-593.
- Wooster, R., and B. L. Weber, 2003, Breast and ovarian cancer: *N.Engl.J.Med.*, v. 348, no. 23, p. 2339-2347.
- Wu, H., S. Zhu, and Y. Y. Mo, 2009, Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer: *Cell Res.*, v. 19, no. 4, p. 439-448.
- Wu, M., N. Jolicoeur, Z. Li, L. Zhang, Y. Fortin, D. L'Abbe, Z. Yu, and S. H. Shen, 2008, Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs: *Carcinogenesis*, v. 29, no. 9, p. 1710-1716.
- Yanaihara, N. et al., 2006, Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis: *Cancer Cell*, v. 9, no. 3, p. 189-198.

Yang, S. et al., 2013, MicroRNA-34 suppresses breast cancer invasion and metastasis by directly targeting Fra-1: *Oncogene*, v. 32, no. 36, p. 4294-4303.

Yu, D. C., Q. G. Li, X. W. Ding, and Y. T. Ding, 2011, Circulating MicroRNAs: Potential Biomarkers for Cancer: *Int.J.Mol.Sci.*, v. 12, no. 3, p. 2055-2063.

Zen, K., and C. Y. Zhang, 2012, Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers: *Med.Res.Rev.*, v. 32, no. 2, p. 326-348.

Zhang, L. et al., 2006, microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 103, no. 24, p. 9136-9141.

Zhang, L. et al., 2008, Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 105, no. 19, p. 7004-7009.

Zhao, Y., C. Deng, J. Wang, J. Xiao, Z. Gatalica, R. R. Recker, and G. G. Xiao, 2011, Let-7 family miRNAs regulate estrogen receptor alpha signaling in estrogen receptor positive breast cancer: *Breast Cancer Res.Treat.*, v. 127, no. 1, p. 69-80.

Zhou, X., J. Liu, X. Ye, W. Wang, and J. Xiong, 2013, Ensemble classifier based on context specific miRNA regulation modules: a new method for cancer outcome prediction: *BMC.Bioinformatics.*, v. 14 Suppl 12, p. S6.

Zhu, W., W. Qin, U. Atasoy, and E. R. Sauter, 2009, Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects: *BMC.Res.Notes*, v. 2, p. 89.

Internetové zdroje:

1. <http://www.gate2biotech.cz/rizikove-factory-karcinomu-prsu-ceho-se-bat-a-ceho-nikoliv>
2. www.svod.cz
3. <http://www.genetika-biologie.cz/knudsonova-teorie-dvou-zasahu>
4. http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html
5. <http://biologie.upol.cz/metody/Izolace%20nukleovych%20kyselin.htm>(http://cs.wikipedia.org/wiki/RNA#Metody_pr.C3.A1ce_s_RNA)
6. <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-preparation/reverse-transcription-cdna-synthesis>
7. <http://biomikro.vscht.cz/vyuka/ib/prednaska2.pdf>
8. <http://biologie.upol.cz/metody/Izolace%20nukleovych%20kyselin.htm>
9. <http://www.biocompare.com/Product-Reviews/41116-TaqMan-MicroRNA-Reverse-Transcription-Kit-from-Life-Technologies-Applied-Biosystems/>
10. https://www.google.cz/search?q=TaqMan+MicroRNA+reverse+transcription+kit&hl=c&site=imghp&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ei=QBNeUnRF6Ly7Aa_7oCgBA&ved=0CAYQAUoAQ&biw=1280&bih=899#facrc=&imgdii=1_S_2CXo2qCWZM%3A%3BUxuf5JVK1umOXM%3B1_S_2CXo2qCWZM%3A&imgrc=1_S_2CXo2qCWZM%253A%3BBwCm0pA1je-9CM%3Bhttp%253A%252F%252Fmedia.biocompare.com%252Fm%252F37%252FArticle%252F41116-187x140.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.biocompare.com%252FProduct-Reviews%252F41116-TaqMan-MicroRNA-Reverse-Transcription-Kit-from-Life-Technologies-Applied-Biosystems%252F%3B187%3B140
11. <http://generi-biotech.com/sondy-dualne-znacene-sondy/>
12. <http://generi-biotech.com/sondy-dualne-znacene-sondy/>
13. <http://epigenie.com/small-rna-mediated-gene-activation/>