

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



Bc. Jakub ONDROUCH

Profilování exprese miRNA u onemocnění jícnu

Diplomová práce

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie 1407T024

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

Olomouc 2015

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

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci“

V Olomouci dne

.....

podpis

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat zejména MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D. za ochotu a čas věnovaný řešení mé diplomové práce a dále celému kolektivu Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP za poskytnutí zázemí pro řešení úkolů spojených s mou prací. Práce vznikla za finanční podpory grantu IGA LF UP 2015 10. Děkuji.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Jakub Ondrouch
Název práce:	Profilování exprese miRNA u onemocnění jícnu
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Školitel:	MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2015
Abstrakt:	<p>Karcinom jícnu v současné době patří mezi onemocnění s velice špatnou prognózou. Tato práce je zaměřena na studium jeho regulace prostřednictvím miRNA. Technologií microarray byly potvrzeny některé doposud známé miRNA jako jsou miR-21, miR-25, miR-203, miR-205 které hrají významnou roli v regulaci tohoto onemocnění. Dále byly objeveny miRNA s výrazně alterující expresí napříč jednotlivými histologickými stádii onemocnění například miR-375, miR-145. Pomocí těchto a dalších miRNA byly sestaveny 4 profily exprese miRNA pro rozdílná stadia tohoto adenokarcinomu jícnu.</p>
Klíčová slova:	miRNA, jícen, adenokarcinom, dlaždicobuněčný karcinom, microarray, Barretův jícen, gastroesofagální reflux, miR-21, miR-25, miR-203, miR-205, miR-210, miR-375
Počet stran:	51
Počet příloh:	0
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Jakub Ondrouch
Title: MiRNA expression profilig in oesophageal disease
Type of thesis: Diploma
Department: Institute of Molecular and Translational Medicine,
Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký
University in Olomouc
Advisor: Josef Srovnal, MD, PhD
The year of presentation: 2015
Abstract: Oesophageal adenocarcinoma is recently disease
with very bad prognosis. This thesis is focused on
miRNA regulation of this adenocarcinoma. Some
miRNA's important in adenocarcinomas regulation
like miR-21, miR-25, miR-203, miR-205 was
confirmed by microarray technology. Next, some
new miRNA's with altered expression during
different histological stages was discovered, for
example miR-375, miR-145. Finally, through this
miRNA's 4 expression profiles for different
histological stages was composed.
Keywords: miRNA, esophagus, adenocarcinoma, squamous
cell carcinoma, microarray, Barrett's esophagus,
gastroesophageal reflux, miR-21, miR-25, miR-
203, miR-205, miR-210, miR-375
Number of pages: 51
Number of appendixes: 0
Language: Czech

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Cíle práce	8
3. Teoretická část	9
3.1 Úloha miRNA v regulaci buněčných pochodů.....	9
3.2 Karcinomy jícnu	10
3.2.1 Epidemiologie a etiologie	11
3.2.2 Klinický obraz.....	12
3.2.3 Diagnóza	12
3.2.4 Léčba.....	12
3.3 Současný stav problematiky.....	13
3.4 Technologie DNA čipů	14
3.5 Čip použitý v experimentu	16
4. Praktická část	17
4.1 Materiál a metody.....	17
4.1.1 Soubor pacientů.....	18
4.1.2 Izolační procedura.....	20
4.1.3 Kontrola kvality a kvantifikace	21
4.1.4 Microarray analýza.....	23
4.1.5 Analýza dat získaných skenováním	25
4.1.6 Validace	26
5. Výsledky.....	29
6. Diskuze.....	40
7. Závěr	43
8. Seznam použitých zkratk.....	44
9. Seznam použité literatury.....	47

1. Úvod

Diplomovou prací navazuji na svou předešlou bakalářskou práci, věnovanou taktéž onemocněním jícnu, v níž jsem se zabýval převážně metodami izolace RNA a jejich optimalizací. Tím bylo dosaženo velice stabilního základu pro další pokračování profilování exprese miRNA u pacientů s onemocněním jícnu, neboť kvalitně vyizolovaná RNA v dostatečném množství je základní surovinou pro profilování exprese kupříkladu pomocí platformy Affymetrix.

Nádory jícnu patří díky svému dlouhému bezpříznakovému období mezi onemocnění s velice pozdní diagnostikou a tudíž i špatnou prognózou. V současné době je onemocnění klasifikováno na základě histologického vyšetření, které může být velice subjektivní. Metoda miRNA microarray společnosti Affymetrix nám dává do rukou silný nástroj, kterým dokážeme klasifikovat stádia onemocnění na základě rozdílné exprese jednotlivých miRNA a zpřesnit tak dosud používanou terapii, nebo ušít pacientům novou terapii „na míru“. Tyto miRNA řídí až 60% všech buněčných procesů a hrají také významnou roli při regulaci nádorového růstu. Studie ubírající se stejným směrem, vznikají již řadu let, ale jejich slabost tkví v nízkém počtu pacientů. Proto je nezbytný další výzkum v této oblasti, který by potvrdil již dosažené výsledky, ale také nakonec zachránil stovky lidských životů.

2. Cíle práce

1. Provést rešerši na dané téma, zorientovat se v problematice profilování exprese miRNA u pacientů s onemocněním jícnu, získat teoretické a praktické znalosti technologie miRNA microarrays, naučit se pracovat s příslušnými databázemi a softwarem.
2. Stanovit profily miRNA exprese u pacientů s onemocněním jícnu.
3. Provést validaci identifikovaných miRNA s prognostickým potenciálem.

3. Teoretická část

3.1 Úloha miRNA v regulaci buněčných pochodů

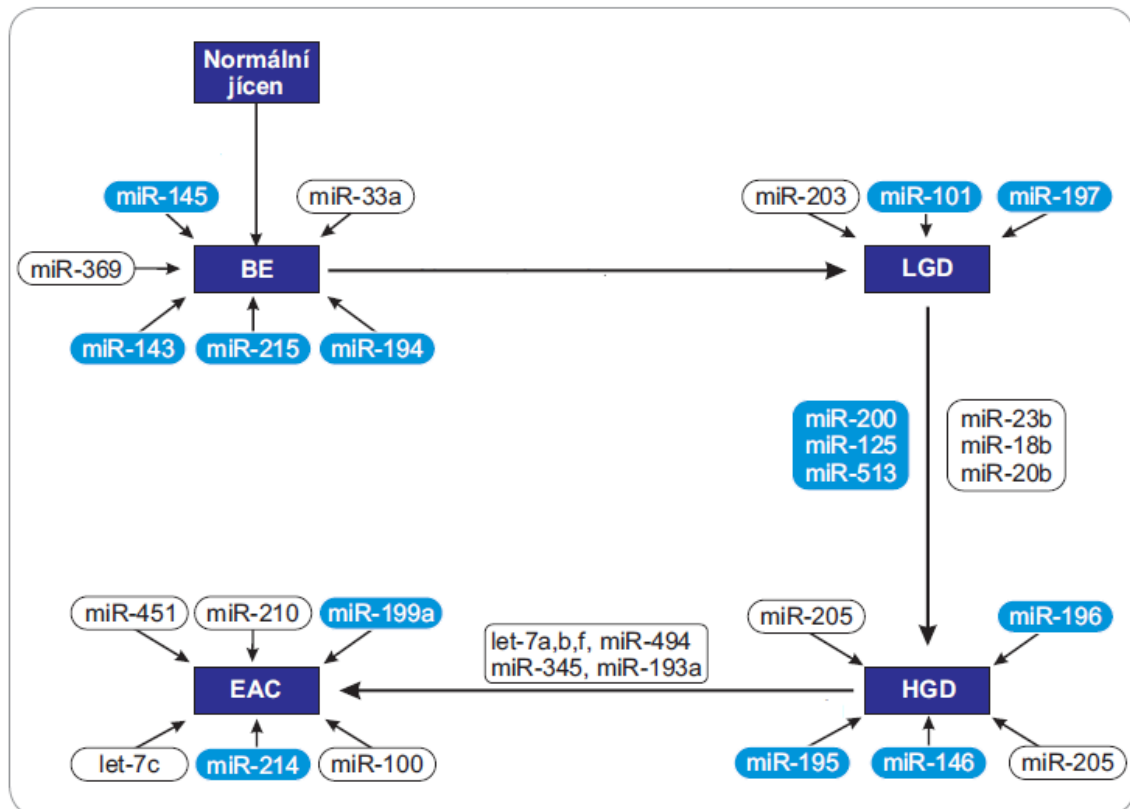
MiRNA jsou krátké úseky RNA o cca 24 nukleobázích, jejichž funkce spočívá v regulaci genové exprese vysoce specifickou vazbou na cílovou mRNA. Pouze u některých byla prokázána jejich funkce, ale odhaduje se, že regulují až 60% všech lidských genů^{1, 2}. Mnohé miRNA hrají významnou roli také v regulaci nádorového bujení a to jako onkogeny nebo tumor supresory a mohou být využity v klasifikaci nádoru^{3, 4}. MiRNA se vyskytují dobře zachovalé v širokém spektru vzorků (sérum, plasma, moč, formalínem fixovaná tkáň-FFPE) a jsou detekovatelné s daleko větší přesností nežli proteiny⁵. Jejich sekvence se mohou lišit pouze v jednom jediném nukleotidu a i tato drobná změna způsobuje naprosto odlišnou funkci obou miRNA⁵. Pomocí technologie microarrays jsme schopni velice přesně mapovat jejich deregulaci. Hladiny miRNA mohou být v nádorové tkáni buď zvýšené (up-regulace) nebo snížené (down-regulace) oproti zdravé tkáni, a právě z těchto hodnot a porovnáním se zdravou tkání jsme schopni klasifikovat stádium onemocnění⁴.

Tab. 1 Vybrané miRNA a jejich regulace ve vztahu k onemocnění (převzato dle Slabý et al, 2015⁶).

Dg.	MikroRNA	Regulace	Korelace	Tkáň	Literatura	
ESCC	miR-103	↑	ESCC vs. NSE	T	Guo et al. [19]	
	miR-21			T, CC	Hiyoshi et al. [21]	
	miR-21			T, CC	Mori et al. [23]	
	miR-129			T	Ogawa et al. [20]	
	miR-205			T, CC	Matsushima et al. [17]	
	miR-10a, miR-22, miR-100, miR-148b, miR-223, miR-133a, miR-127-3p			S	Zhang et al. [38]	
	miR-21			T	Akagi et al. [27]	
	miR-31			T, S	Zhang et al. [61]	
	miR-145			T	Akagi et al. [27]	
	miR-21			P	Komatsu et al. [39]	
	miR-92a			T, CC	Chen et al. [57]	
	miR-21			S	Kurashige et al. [58]	
	miR-142-3p			T	Lin et al. [25]	
	miR-223			T, CC	Kurashige et al. [40]	
	miR-107			T	Guo et al. [19]	
	miR-10a			T, CC	Matsushima et al. [17]	
	miR-145, miR-133a, miR-133b			T, CC	Kano et al. [54]	
EAC	miR-375	↓	EAC vs. NSE, EAC vs. BE	P	Komatsu et al. [39]	
	miR-29c			CC	Ding et al. [53]	
	miR-375			T	Kong et al. [55]	
	miR-196a			EAC vs. NSE	T, CC	Luthra et al. [60]
	polycistron miR-106b-25			EAC vs. BE	T	Kan et Meltzer [16]
	miR-196a			EAC vs. NSE, EAC vs. BE	T	Maru et al. [31]
	miR-21, miR-143, miR-145, miR-194, miR-215			BE, EAC vs. NSE	T	Wijnhoven et al. [18]
	miR-215, miR-560, miR-615-3p, miR-192, miR-326, miR-147			EAC vs. NSE, EAC vs. BE	T	Fassan et al. [33]
	miR-143, 145, 215			EAC vs. BE	T	Wijnhoven et al. [18]
	miR-203, 205			NSE vs. BE	T	Wijnhoven et al. [18]
rodina miR-200	miR-141, miR-200c	↓	EAC vs. NSE, EAC vs. BE	BE vs. GE, BE vs. DE	T, CC	Smith et al. [56]
	miR-100, miR-23a, miR-605, miR-99a, miR-205, let-7c, miR-203			HGD vs. BE	T, CC	Smith et al. [56]
				EAC vs. NSE, EAC vs. BE	T	Fassan et al. [33]

BE – Barrettův jícn, CC – buněčná kultura, DE – duodenální epitel, EAC – ezofageální adenokarcinom, GE – žaludeční epitel, HG – high grade dysplazie (intraepiteliální neoplazie), miR – mikroRNA, NSE – normální dlaždicobuněčný epitel, P – krevní plazma, S – krevní sérum, T – tkáň

Mnohé miRNA jsou známy jako onkogeny hrající hlavní roli v širokém spektru nádorových onemocnění a také u karcinomu jícnu např. miR-21, miR-25, miR-196a, miR-181, jejichž hladiny mají vzestupnou tendenci. Na druhé straně stojí tumor supresorové miRNA jako miR-203, miR-205, miR-23b, miR-27b, miR-210, jejichž hladiny se při onemocnění snižují. Právě tyto a několik dalších miRNA, jsou vhodnými biomarkery pro detekci progresu adenokarcinomu jícnu^{6, 7}.



Obrázek 1 Zapojení vybraných miRNA do vývoje onemocnění od Barrettova jícnu (BE) k adenokarcinomu (EAC). Modře jsou zvýrazněné miRNA se zvýšenou expresí, bíle se sníženou expresí (upraveno dle Kovaříková et al, 2014⁸).

3.2 Karcinomy jícnu

Onemocnění postihujících jícen je celá řada. Od vrozených růstových vad, přes zánětlivé, mechanické či chemické poškození až po nádory. Nejběžnějšími typy nádorů jícnu jsou dlaždicobuněčný karcinom (70%) a adenokarcinom (30%)⁹. Zatímco vznik dlaždicobuněčného karcinomu (ESCC) je spojen převážně s kouřením a alkoholismem, vznik adenokarcinomu jícnu (EAC) je způsoben převážně gastroezofagálním reflexem (GERD), při němž je sliznice v blízkosti dolního jícnového svěrače neustále naleptávána refluxujícími žaludečními šťávami^{9, 10}. U epitelu vystaveného chronickému

působení žaludečních šťáv dojde k metaplazii v odolnější cylindrický epitel, tím vzniká Barrettův jícn (BE), který dále prograduje v low-grade dysplazii a high-grade dysplazii^{9, 11}. Maligní transformací metaplastického epitelu vzniká EAC.

Nicméně rozdělení jednotlivých vývojových stádií může být značně subjektivní a může se mezi histology výrazně lišit¹². Proto jsou vyvíjeny snahy o vytvoření nezávislých objektivních markerů, které by doplňovaly a zpřesňovaly histologické vyšetření a vylepšovaly stratifikaci rizika mezi pacienty s BE, a tím umožnily ekonomicky výhodný screening a léčbu pacientů s BE¹³.

U Barrettova jícnu bylo pozorováno zvýšení exprese miR-196a a její pozitivní korelace s progresí onemocnění⁶. Dále byly prokázány zvýšené hladiny miR-21, miR-25, miR-192, miR-194^{7, 14}. Naopak ke snížení exprese při onemocnění dochází u miR-203, miR-205, let-7c, miR-23a¹⁴.

3.2.1 Epidemiologie a etiologie

Podle databáze Globocan patří karcinomům jícnu desátá příčka v celosvětově incidenci nádorových onemocnění. Některé zdroje uvádějí osmou příčku^{15, 16}, což může být způsobeno rozdíly ve sběru dat, nebo pomalejším tempem růstu míry incidence oproti jiným typům nádorů. V některých zemích dochází v posledních letech dokonce ke snížení incidence a také mortality¹⁵, pravděpodobně v důsledku technologického pokroku v léčbě a diagnostice onemocnění.

Karcinomy jícnu postihují převážně muže s mediánem 65let. Velice ojediněle se vyskytují u osob mladších 30 let¹⁷. Mortalita dosahuje až 90%¹⁵, i po terapii se pětiletá míra přežití pohybuje pod 30%¹⁸.

Mezi rizikové faktory patří jako u většiny nádorových onemocnění špatná životospráva. Nejrizikovější jsou kouření a alkoholismus¹⁷, u adenokarcinomu je to GERD a obezita. Dále jsou to: nedostatek vitamínů a stopových prvků, nedostatek vlákniny a konzumace horkých nebo kořeněných pokrmů, které mohou podráždit nebo poškodit sliznici jícnu¹⁷. Protektivně působí dostatečný přísun ovoce, zeleniny a masa ve stravě, dostatek vitamínů (především C, E), karotenoidů, vlákniny a omezení dalších negativních dietních vlivů⁹.

3.2.2 Klinický obraz

Hlavním a takřka jediným příznakem Barrettova jícnu je pyróza, lidově pálení žáhy. To je však spojeno spíše s GERD nežli s BE^{9, 17}. Pacienti tomuto příznaku nepřikládají takřka žádnou váhu a na vyšetření se jich dostaví pouze minimum⁹. To umožní nerušenou progresi BE až v karcinom. Dále to mohou být nevolnost, zvracení, bolesti v hrudní oblasti, chronický kašel a záněty hltanu⁹.

Kariny jícnu se vyznačují dlouhým bezpříznakovým obdobím. V pozdějších fázích se objevují problémy s polykáním (dysfagie) až neschopnost polknout tuhou stravu¹⁷. Pacient ubírá na váze, a pokud karcinom proroste do cév, může se objevit vykašlávání či zvracení krve¹⁷.

3.2.3 Diagnóza

Správné určení stádia karcinomu je nejdůležitějším prognostickým parametrem. První volbou bývá endoskopické vyšetření a biopsie, při které se odebere část tkáně pro histologické vyšetření, popřípadě pro výzkumné metody jako je například FISH, IHC, PCR nebo microarrays. Pro posouzení růstu karcinomů do stěny jícnu a tvorby metastáz se využívá vyšetření pomocí RTG a CT. Tak je možno odhalit i vzdálené metastázy a napadení dalších orgánů. Další metodou vizualizace stěny jícnu je endosonografie¹⁷.

Pacientovi jsou z krve stanoveny nádorové markery SCC, CEA a CA 72-4, jejichž hladiny mohou být zvýšené nad referenční mez a jsou specifické právě pro karcinomy jícnu, vyšetří se krevní obraz, funkce jater a ledvin.

3.2.4 Léčba

Na základě předchozích vyšetření se posoudí operabilita nádoru a pokud je to možné provede se resekce. Jako náhrada odebrané části se použije část střeva nebo žaludku. To je možné pouze v počátečních stádiích nádoru¹⁹. Důležité je podotknout, že díky dlouhému bezpříznakovému období není okamžitý chirurgický zákrok u více než 50% pacientů možný²⁰. Pokud je nádor neoperovatelný, přistupuje se k neoadjuvantní konkomitantní chemoradioterapií s cílem redukce nádorové masy vedoucí k eventuálnímu chirurgickému zákroku. Nejčastěji používanými chemoterapeutiky jsou deriváty cis-platiny a 5-floruracilu. Takto vedená terapie zvyšuje počet pacientů s dobou přežití nad 5 let až o 25%²⁰.

Odpověď na léčbu se u pacientů velice různí, tak jako nežádoucí účinky terapie. Jak radioterapie, tak chemoterapie nepůsobí pouze na nádorové buňky, ale ovlivňují také tkáň ve svém okolí. Po radioterapii se může objevovat zarudnutí kůže v místě ozáření nebo drobné puchýřky, otoky sliznic mohou dočasně zhoršit polykání a pacient může být náchylný k nejrůznějším infekcím. Chemoterapie často působí na celý organismus, může se objevovat únava, nevolnosti, vypadávání vlasů a zvýšená náchylnost k infekcím v důsledku oslabeného imunitního systému. Pacient je dále sledován i po ukončení terapie^{21, 22}.

3.3 Současný stav problematiky

Veškerý výzkum kolem RNA začíná rokem 1993, kdy byly poprvé objeveny a v té době se zároveň objevuje první teorie o jejich úloze v buněčné regulaci²³. Od té doby se stále více vědeckých týmů zabývá jejich hledáním, popisem a specifikací jejich funkce. K 25. 3. 2015 je známo 2588 lidských miRNA a 1881 jejich prekurzorů, což je nárůst zhruba o deset miRNA oproti roku 2014²⁴. Velké množství prací zaměřených na profilování exprese miRNA u karcinomů jícnu vzniká od roku 2009 až do současnosti. Bylo identifikováno poměrně velké množství miRNA jejichž hladiny výrazně diferencují v průběhu onemocnění. Současný výzkum již tedy není zaměřen pouze na objevování a identifikaci nových miRNA, ale také na jejich validaci. Mnohé z těchto miRNA se již nyní jeví jako velice slibní kandidáti na pozici specifických biomarkerů z nichž některé byly zmíněny v kapitole 3.1 Úloha miRNA v regulaci buněčných pochodů a 3.2 Karcinomy jícnu.

Technologie použitá v této práci již nabízí nový typ čipu, který pokrývá daleko větší škálu miRNA, také databáze miRBase je neustále obohacována o nové miRNA. Velice rychlým tempem jsou rozvíjeny statistické programy pro analýzu dat získaných z microarrayí tak, aby byla výsledná data co nejrelevantnější. Další rychle se rozvíjející metodou je RNA-seq umožňující velice přesné stanovení sekvence miRNA a všech jejich isoformů a zároveň její kvantifikaci. Tato technologie není limitována potřebou znát přesný transkript a její horní detekční limit závisí pouze na počtu transkriptů získaných sekvenováním. Zároveň není rušena takřka žádnými signály pozadí jak je tomu u microarrayí.

3.4 Technologie DNA čipů

Trendem současné medicíny a výzkumu je mapování molekulárně genetických mechanismů uvnitř buněk, které jsou zapojeny do patologických procesů. Biočipové technologie se v současnosti používají k identifikaci molekulárních podstaty onemocnění, hledání a identifikaci nových biomarkerů, zpřesnění klasifikace daného onemocnění, predikci odpovědi pacienta na léčbu a její zefektivnění například zavedením cílené léčby²⁵. Oproti mRNA postrádají miRNA běžné sekvence jako například Poly-A konec a díky své délce přibližně 22 nukleotidů jsou nevhodné pro použití tradičních RT-PCR. Tyto vlastnosti jsou důležité pro jejich odlišení od celkové RNA, protože tvoří jen velice malou její část⁵. Vedle qRT-PCR, či RNA-seq je technologie microarrays relativně levným nástrojem umožňujícím velké množství paralelních měření. Jejich nevýhoda tkví v nízké specifitě k miRNA podobných sekvencí a v nemožnosti jejich absolutní kvantifikace⁵. Použití genových čipů umožňuje sledovat v jednom experimentu tisíce genů. V krátkém čase je tak možné odhalit různé genové mutace, polymorfizmy či chromozomové aberace²⁵.

Technologie microarrays je odvozena od metody Southern blotting, která umožňuje identifikace genového cíle pomocí gelové elektroforézy DNA a následného značení pomocí hybridizovaných prób²⁶. DNA čipy jsou založeny na interakci mezi DNA sondami imobilizovanými na pevném nosiči a zkoumanými značenými molekulami²⁵. Každý čip^a obsahuje několik míst se stejnou sekvencí tzv. spoty, jejichž porovnáním je možné eliminovat chybu vzniklou nesprávnou hybridizací. Jednotlivé spoty obsahují část sekvence hledaného genu tzv. sondy, kterých je pro každý gen jedenáct. Ke každé jednotlivé sondě (PM) je přiřazena ještě jedna mismatch (MM) sonda doplněná a chybně se párující bázi, kterou je ověřena specifita hybridizace²⁵ a funguje tak jako jakási kalibrace pro hodnotu udanou PM sondou. Po aplikaci vzorku na čip značená miRNA kvantitativně hybridizuje s komplementární próbou. Naměřená intenzita signálu značené miRNA potom odráží počet jejich sekvencí, z nichž lze také posoudit míru ovlivnění cílových genů²⁷.

Základem každého čipu různých společností je pevný nosič. Nejčastěji se jedná o sklo, nylonové a plastové materiály, jejichž povrch je upraven pomocí hydrofobních polymerů (poly-L-lysin, modifikovaný silan- aminosilan, epoxysilan atd.), které

^a Jedná se o chip společnosti Affymetrix, Santa Clara, CA, USA použitý v experimentu.

poskytují reakční skupiny (-NH₂, -OH, =O) pro navázání oligonukleotidů²⁵. Existuje několik typů arrayů podle způsobu výroby a typu použitých prób. Oligonukleotidové próby jsou kratší, mají uniformní délku a jejich výhodou je možnost automatizace a kontrola kvality během jejich výroby. Kratší délka prób zvyšuje specifitu, a zároveň snižuje možnost chyb při syntéze, zatímco delší jsou náchylnější k chybnému párování^{25, 28}. Dalším typem prób jsou cDNA nebo jiné PCR produkty získané z DNA knihoven. Jedná se o mnohem delší vlákna, než je tomu u oligonukleotidů, u kterých není nutné znát jejich přesnou sekvenci. Zároveň je jejich příprava mnohem jednodušší a je možné je připravit přímo v laboratoři. Cenově je jedná o výhodnější produkt, nežli jsou oligonukleotidové čipy. Délka sondy zvyšuje intenzitu signálu, hybridní molekula je stabilnější a umožňuje nastavit takové podmínky, aby se snížil signál pozadí. Tento typ prób trpí nižší specifikou, možností kontaminace cDNA/PCR produktů a možností cross-hybridizace^{25, 28}.

Jednou z metod nanášení prób na pevný podklad je mechanické spotování, kdy jsou jednotlivé sondy nanášeny tenkými jehlami přímo na určené místo na čipu, popřípadě se používá stejná technologie jako u dnešních „inkjet“ tiskáren²⁸. Dalším způsobem je syntéza *in situ*. Nejznámějším zástupcem této technologie je firma Affymetrix, Santa Clara, CA²⁸. Tyto čipy mají nejvyšší hustotu prób. Syntézu řídí fotolitografická maska, kterou si lze představit jako desku s otvory na určitých místech, kterými prochází světelný paprsek. Tímto paprskem UV světla jsou uvolněny fotolabilní protektivní skupiny, a může proběhnout syntéza báze na specifickém místě, zatímco ostatní skupiny zůstávají chráněny. Poté proběhne výměna masky s otvory na jiných místech a proběhne další syntéza. Opakováním těchto kroků je nasynthetizován celý čip do délky 25 nukleotidů na próbu^{25, 28}. Společnost Roche používá pro syntézu obdobnou metodu, místo fotolitografické masky však používá tzv. digital micromirror device²⁸. Alternativní metodu k technologii čipů nabízí společnost Illumina, San Diego, CA, USA. Technologie Beadarrays je založena na 3 μm silikových kuličkách náhodně usazených v substrátu. Čip poté prochází tzv. decoding procesem ve kterém se určí poloha jednotlivých sekvencí na čipu²⁸. Předpokládá se, že 25 nukleotidové próby nahradí ostatní typy, jelikož jsou pro analýzu nejvýhodnější²⁹.

Dále se mohou čipy lišit podle množství použitých barev pro značení. Jednokanálový přístup využívá pro značení pouze jednu fluorescenční značku. Čipy firmy Affymetrix využívají značení zkoumané RNA biotin-streptavidin komplexem.

Každý vzorek je hybridizován na čip sám. Získanou absolutní intenzitu signálů jednotlivých prób je tak nutné porovnat s dalšími čipy, čemuž předchází normalizace dat získaných z celého experimentu³⁰. Dvoukanálový přístup využívá porovnání zkoumaného vzorku s vzorkem referenčním značeným odlišným fluoroforem. Obvykle používanými barvivy jsou Cy3 a Cy5. Oba vzorky jsou naznačeny příslušnou barvou a naneseny na čip. Barva je excitována laserem i příslušné vlnové délce odpovídající oranžové a červené oblasti světelného spektra a je pořízen sken čipu. Relativní intenzity jednotlivých fluoroforů jsou použity pro analýzu a identifikaci deregulovaných genů^{31,32}. Oba dva tyto přístupy vykazují shodnou reprodukovatelnost, specifitu, sensitivitu a poskytují podobně kvalitní data. Avšak i přesto je při výběru vhodného typu čipu nutné brát v potaz drobné rozdíly v poskytovaných datech³⁰.

3.5 Čip použitý v experimentu

V experimentu byl použit miRNA 3.0 array chip společnosti Affymetrix. Tento čip je navržen pro analýzu až 19 913 zralých miRNA pokrytých v 179 217 próbách. Veškeré miRNA jsou obsaženy již v databázi miRBase v.17. Čip dále obsahuje 3 076 prób pro detekci lidských, myších a krysích pre-miRNA a 1 826 prób pro detekci lidských snoRNA a scaRNA. Veškeré próby jsou 25-merní. Čip dále obsahuje sady hybridizačních, housekeeping a spike-in labeling kontrol sloužících pro kontrolu kvality a normalizaci dat a dále sadu background prób pro korekci chybného párování a šumu pozadí.

4. Praktická část

V rámci praktické části byla provedena retrospektivní studie hodnotící expresi miRNA u pacientů s onemocněním jícnu. Ta zahrnovala celkem 119 patientských vzorků formalínem fixované tkáně v různých stádiích onemocnění včetně 24 zdravých kontrol. Po deparafinizaci z nich byla sérií několika kroků izolována a pročištěna celková RNA, u které byla proměřena kvalita a kvantita. RNA byla následně aplikována a hybridizována na čipy. Získaná surová data byla statisticky zpracována a poskytla data pro vytvoření profilu exprese miRNA pro jednotlivá stádia onemocnění. Následně byly nejslibnější miRNA s prognostickým a diagnostickým potenciálem validovány pomocí PCR.

4.1 Materiál a metody

Pro izolace RNA bylo použito komerčních kitů: miRNeasy mini kit (Quiagen) pro izolaci z plazmy a FFPE.

Kontrola kvality a kvantifikace byla provedena pomocí RNA 6000 Nano Kit (Agilent).

Microarray analýza byla provedena pomocí FlashTag Biotin HSR Labeling Kitu (Affymetrix).

Validace byly provedeny pomocí TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kitu metodou real-time PCR.

Chemikálie: TRI reagent (Molecular Research Center), chloroform (Serva), ethanol (Serva), DEPC (diethylpyrocarbonate) Treated Water (Ambion), RNasin ribonuclease inhibitor (Promega), RNaseZAP

Přístrojové a další vybavení: zkumavky 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf), 5 ml, 1 ml, 200 µl, 10 µl automatické pipety (Eppendorf), epDualfilter T. I. P. S. (Eppendorf), 0,2 ml Thermo-tube (ABgene), stojánek na zkumavky, chlazený stojánek na zkumavky, laminární box (BioAir), kombinovaná chladnička (Gorenje), vortex (Scientific Industries, Genie), minicentrifuga (Eppendorf), chlazená centrifuga (Hermle), termocykler TProfessional Basic (Biometra), termoblok (Major Science), vakuový

koncentrátor SpeedVac Eppendorf 5031 (Eppendorf), NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), RNA 6000 Nano Chip (Agilent), Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.), vortex (Scientific Industries, Genie), přípravná stanice (Agilent Technologies, Inc.), GeneChip miRNA 3,0 array (Affymetrix), Hybridization Oven 645 (Affymetrix), Fluidic Station 450 (Affymetrix), GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix), PC s přístupem k internetu, TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase® (Applied Biosystems), 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), 96-jamkové desky a krycí fólie, PCR mikrokumavky, centrifuga s držákem na desky,

4.1.1 Soubor pacientů

Do studie bylo zahrnuto celkem 119 patientských vzorků (24 zdravých kontrol, 60 s diagnózou Barrettova jícnu a 35 s diagnózou adenokarcinomu), jejichž zpracované microarraye svou kvalitou vyhovovali další analýze. Veškeré bioptické vzorky pro tuto retrospektivní studii poskytla Fakultní nemocnice Olomouc. Od všech pacientů byl vyžadován podepsaný informovaný souhlas týkající se odběru bioptického materiálu a použití klinických a demografických údajů pro vědecké účely. Veškeré údaje byly shromažďovány v anonymizované podobě. Protokol studie byl schválen místní etickou komisí. Podrobný popis souboru pacientů je shrnutý v tabulce 2.

Tab. 2 Soubor pacientů retrospektivní studie.

	Barrettův jícn	Adenokarcinom
Počet pacientů	60	35
Medián věku	62 (53-71)	68 (69-76)
Poměr pohlaví		
M:Ž	70:30	85:15
Histologická stádia n (%)		
Metaplazie bez dysplazie	33 (55%)	
Low-grade dysplazie	21 (35%)	
High-grade dysplazie	6 (10%)	
Obezita n (%)		
Ano	14 (23%)	
Ne	42 (70%)	
Neurčeno	4 (7%)	
Kouření n (%)		
Ano	20 (33%)	
Ne	36 (60%)	
Neurčeno	4 (7%)	
Alkoholismus n (%)		
Ano	2 (3%)	
Ne	52 (90%)	
Neurčeno	4 (7%)	
Diferenciace nádoru		
Dobrá		9 (26%)
Střední		13 (37%)
Malá		13 (37%)
Metastáze v lymfatických uzlinách		
Ano		14 (40%)
Ne		21 (60%)
Vzdálené metastáze		
Ano		6 (17%)
Ne		29 (83%)

4.1.2 Izolační procedura

Izolace RNA z FFPE

Pro izolaci byl použit miRNeasy mini kit společnosti Qiagen. Před samotnou izolací bylo vzorky nutné deparafinizovat. Pro tyto účely existuje celá řada postupů od luhování vzorků v horké vodě a v roztocích etanolu se snižující se koncentrací, přes deparafinizaci pomocí xylenu až po použití jednoduchého lyzačního pufru. Poslední dvě metody byly porovnány v mé předchozí bakalářské práci a bylo zjištěno, že xylen má negativní vliv na fragmentaci RNA a z hlediska koncentrace a čistoty vzorku není jeho použití vyžadováno. Proto jsme při izolaci dalších vzorků zvážili rizika spojená s použitím xylenu a od jeho použití ustoupili.

Deparafinizace vzorku

Pro přípravu 20 ml lyzačního pufru použijeme následující reagenty:

Tab. 3 Složení lyzačního pufru.

Složka	Objem (ml)
RNAasin 10 000 U	0,25
EDTA 0,5 M	0,80
Proteinasa K (10 mg/ml)	1,00
SDS 10 %	2,00
TRIS 1M pH 7,4	2,00
DEPC water	13,95

Cca 8-10 parafinových řezů umístíme do 1,5 ml zkumavky a přidáme 500 µl lyzačního pufru.

1. Vzorky zvortexujeme, stočíme a necháme inkubovat 12 hodin při 60 °C.
2. Necháme vzorky ekvilibrovat při pokojové teplotě a pokračujeme podle izolačního protokolu.

Izolace RNA

1. Ke vzorku přidáme 700 µl TRI reagent (možno použít TRIzol-Invitrogen, Qiazol-Qiagen) a řádně zvortexujeme.
2. Inkubujeme 5 minut při pokojové teplotě.
3. Přidáme 140 µl chloroformu a řádně vortexujeme alespoň 15 s.
4. Inkubujeme 3 minuty při pokojové teplotě.

5. Centrifugujeme 15 minut při 12 000 x g a 4 °C.
6. Přeneseme svrchní vodnou fázi do nové 1,5ml zkumavky. Dbáme přitom na to, abychom nenabrali bílý prstenec nebo spodní organickou fázi (růžová). Vyhneme se tak kontaminaci vzorku DNA a proteiny.
7. Ke vzorku přidáme 1,5 násobek jeho objemu absolutního etanolu a vzorek promícháme. (pokud odebereme 500 µl přidáme 750 µl etanolu)
8. Nanese maximálně 700 µl vzorku na kolonku a centrifugujeme 30 s při ≥ 8000 x g. Filtrát odstraníme.
9. Opakujeme krok 8., dokud nenanese na kolonku celý vzorek.
10. Nanese na kolonku 700 µl RWT pufru a centrifugujeme 30 s při ≥ 8000 x g. Filtrát odstraníme.
11. Nanese na kolonku 500 µl RPE pufru a centrifugujeme 30 s při ≥ 8000 x g. Filtrát odstraníme.
12. Opět nanese na kolonku 500 µl RPE pufru a centrifugujeme 30 s při ≥ 8000 x g. Filtrát odstraníme.
13. Přeneseme kolonku do čisté Collection Tube a centrifugujeme 2 min při maximální rychlosti, aby se kolonka vysušila.
14. Napipetujeme na kolonku (přímo na střed) 100 µl RNase-free nebo DEPC vody a necháme 1 minutu inkubovat. (Pro zvýšení výtěžků je možno opakovat kroky 14-15 se menším množstvím vody, v případě potřeby je možné vzorek zakoncentrovat)
15. Centrifugujeme 1 min při ≥ 8000 x g a jímáme filtrát.
16. Vzorek uchováváme při -80 °C.

4.1.3 Kontrola kvality a kvantifikace

Po izolaci RNA je provedena první kontrola kvality a kvantifikace vyizolované RNA. V případě, že RNA nespĺňuje požadovaná kritéria, je nutné opakovat izolační proceduru. Po izolaci každého vzorku je odebrán alikvot 1 až 1,5 µl do 0,2 ml PCR zkumavky pro spektrofotometrické měření na přístroji NanoDrop 1000. Přístroj je chopen proměřit několik vlnových délek najednou, pro posouzení kvality a čistoty RNA jsou důležité A230, A260, A280. Samotná RNA absorbuje při 260 nm, zbylé absorbance patří kontaminantům, jako jsou proteiny, chemikálie použité při izolaci a

další nežádoucí látky. Software přiložený k přístroji určí poměry A260:A230 a A260:A230 jejichž hodnota se může pohybovat v rozmezí 0-2,2. Čistota by se měla tedy co nejvíce blížit hodnotě 2,2. Z praxe ovšem víme, že je velice náročné se této hodnotě přiblížit, a je proto nutné přistupovat k hodnocení jednotlivých vzorků individuálně. Také záleží na typu vzorku, kupříkladu RNA vyizolovaná z FFPE dosahuje vysokých čistot oproti RNA vyizolované z plazmy, u které jsou hodnoty nevalné³³. Software také spočítá přibližnou koncentraci RNA z hodnoty A260. Při měření se postupuje podle pokynů dodaných spolu s přístrojem, přičemž jako Blank se použije eluční činidlo, nejčastěji tedy RNase-free voda nebo jiný eluční pufr.

Pro microarray analýzu je nutná RNA o co nejvyšší možné kvalitě a čistotě. Dalším nástrojem pro kontrolu kvality a koncentrace je elektroferografické ověření na Agilent 2100 Bioanalyzer. Přístroj využívá kapilární genovou elektroforézu pro rozdělení jednotlivých fragmentů RNA a detekci na základě fluorescence barviva přidaného do gelu. Výstupem je elektroforeogram na kterém jsou patrné píky jednotlivých fragmentů a dále RIN číslo, které udává integritu a kvalitu vyizolované RNA a jeho maximální hodnota nabývá čísla 10.

Postup přípravy RNA nano/pico labchipu:

Před použitím Agilent 2100 Bioanalyseru je nutné nejprve provést dekontaminaci elektrod. K tomu jsou použity dva čistící čipy. První je naplněn 350 μ l RNaseZAP a vložen na minimálně 10 sekund do přístroje. Poté je vyjmut a nahrazen druhým čipem naplněným 350 μ l RNase-free vodou, který je v přístroji rovněž ponechán minimálně 10 sekund. Pokud přístroj poskytuje nečekaný, nebo jinak zkreslený výstup, jedním z možných důvodů může být znečištění elektrod, které nelze odstranit pouze promytím a elektrody je nutné umístit do ultrazvuku na dostatečně dlouhou dobu.

Připraví se ladder zahřátím na 70 °C po dobu 2 minut. Zchlazený ladder se rozalíkvotuje do zkumavek a ihned zamrazí na -80 °C.

550 μ l RNA 600 Nano gel matrix se nanese do zkumavky s filtrem (součást kitu), ta se následně centrifuguje při 1500 x g po dobu 10 minut. Přefiltrovaný gel se rozalíkvotuje po 65 μ l a uchovává maximálně 4 týdny při 4 °C.

Podle očekávané koncentrace RNA popř. podle koncentrace naměřené spektrofotometricky se použije příslušný čip (Nano/Pico). V případě vysokých koncentrací RNA nad 500 ng/μl se RNA naředí RNase-free vodou, pro koncentrace nižší než 25ng/μl se použije Pico chip.

1. Ekvilibrujeme RNA 6000 Nano dye concentrate na laboratorní teplotu a zvortexujeme.
2. Do 65 μl gelu nepipetujeme 1 μl RNA 6000 Nano dye concentrate.
3. Směs zvortexujeme 10 s a centrifugujeme při 10 minut při 13 000 x g.
4. Připravíme 2 μl alikvoty vzorků RNA a vložíme je do termobloku na 2 minuty při 70 °C.
5. Sestavíme priming station a vložíme do ní čip.
6. Napipetujeme 9 μl gelu s barvou do jamky označené symbolem G v černém poli
7. Nastavíme píst na 1 ml a uzavřeme priming station. Píst stlačíme až pod úchytku a necháme stlačený po 30 sekund. Gel se roztláčí do celého čipu. Po 30 sekundách uvolníme úchytku a necháme píst volně vyjet.
8. Otevřeme priming station a nepipetujeme 9 μl gelu s barvou do jamek označených G v bílém poli.
9. ^bNapipetujeme 9 μl RNA conditioning solution do jamky označené CS.
10. Napipetujeme 5 μl RNA markeru do každé z jamek pro vzorek označených číslem a do jamky označené symbolem žebříku.
11. ^cNapipetujeme 1 μl ladderu do jamky označené symbolem žebříku.
12. Napipetujeme 1 μl vzorku do jamek označených číslem. Do nepoužitých jamek nepipetujeme 1 μl markeru.
13. Upevníme čip na vortex a vortexujeme 1 minutu
14. Analýzu spustíme do 5 minut.

4.1.4 Microarray analýza

Nejprve je k RNA ve vzorku dosyntetizován poly-A konec. RNA je poté označena biotinem a nahybridizována na čip. Čip je následně promyt a naskenován.

^b Tento krok provedeme pouze při použití Pico chipu. Pokud používáme Nano chip, krok 9. přeskočíme.

^c Pro Pico chip použijeme příslušný ladder, který je odlišný od ladderu pro Nano chip.

Čip vyžaduje pro analýzu minimálně 130 ng miRNA. Je proto nutné nejprve naředit nebo zkoncentrovat vzorek miRNA tak aby v 8 μ l bylo minimálně 130 ng.

1. K 8 μ l RNA přidáme 2 μ l Spike Control Oligos. Pracujeme na ledu
2. Naředíme ATP mix 1:500 1mM Tris
3. Připravíme poly-A tailing Master Mix s 10% nadbytkem podle následující tabulky.

Tab. 4 Složení poly-A Master Mix.

Složka	Objem pro jednu array (μ l)
10X Reaction Buffer	1,5
25mM MnCl ₂	1,5
Naředěný ATP mix	1,0
PAP enzym	1,0

4. Přidáme 5 μ l Master Mixu ke vzorku a jemně vortexujeme
5. Inkubujeme 15 minut při 37 °C
6. Po inkubaci stočíme a pracujeme opět na ledu.
7. Přidáme 4 μ l 5X FlashTag Biotin HSR ligation Mix
8. Přidáme 2 μ l T4 DNA Ligase. Nepřipravujeme Master Mix aby nedošlo k autoligaci.
9. Vzorky promýcháme převrácením zkumavky nebo propipetováním (nevortexujeme) a stočíme.
10. Inkubujeme 20 minut při 25 °C.
11. Reakci zastavíme přidáním 2,5 μ l HSR Stop Solution. Promýcháme a stočíme.
12. Odebereme 2 μ l pro ELOSA QC Assay.
13. Předehřejeme 20X Eucaryotic Hybridization Controls 5 minut na 65 °C.
14. Připravíme hybridizační Master Mix.

Tab. 5 Složení Hybridizačního mixu.

Složka	Objem pro jednu array (μ l)
2X Hybridization Mix	66,0
27,5% Formamine	19,2
DMSO	12,8
20X Hybridization Controls	6,6
Control Oligo B2, 3nM	2,2
Nuclease-free water	3,7
Celkový objem 110,5 μ l	

15. Přidáme 110,5 µl hybridizačního Master Mixu ke vzorku.
16. Inkubujeme 5 minut při 99 °C, poté 5 minut při 45 °C.
17. Připravíme si jednotlivé arraye tak, že zapíchneme špičku do horního pravého septa.
18. Nadávujeme 130 µl vzorku levým spodním septem na čip (malá bublina v čipu je žádoucí).
19. Vytáhneme špičky a zalepíme obě septa, aby nedocházelo k odpařování tekutiny.
20. Umístíme arraye do držáku a vložíme je do hybridizační pece.
21. Inkubujeme 16-18 hodin při 48 °C a 60 rpm.
22. Po inkubaci vytáhneme arraye z hybridizační pece a odkryjeme obě septa.
23. Odsajeme z čipu hybridizační koktejl a naplníme je Array Holding Buffrem (bez bublin v čipu).
24. Do držáků promývací stanice umístíme zkumavky s roztoky v následujícím sledu:
 - Pozice 1. – tmavá zkumavka, 600 µl Stain Cocktail 1
 - Pozice 2. – čirá zkumavka, 600 µl Stain Cocktail 2
 - Pozice 3. – čirá zkumavka, 800 µl Array Holding Buffer
25. Umístíme čipy do držáků a spustíme promývací protokol FS450_0002
26. Po promytí zkontrolujeme čipy, zda neobsahují vzduchové bubliny. Pokud ano, manuálně je doplníme Array Holding Buffrem (bubliny nejsou při skenování žádoucí). Zalepíme obě septa a zkontrolujeme skleněný povrch čipu.
27. Zadáme sériová čísla čipů do databáze, umístíme je do skeneru a spustíme skenování.

Pro ovládání promývací stanice a skeneru používáme Affymetrix® GeneChip® Command Console® (AGCC)

4.1.5 Analýza dat získaných skenováním

Čip je promytím zároveň obarven, aby bylo možné měřit intenzity jednotlivých signálů. Prvotním datovým výstupem je soubor formátu .DAT. Jedná se o základní technické údaje o skenovaném čipu a jeho „fotografii“ obsahující intenzity jednotlivých pixelů. Tento formát dat nevyovídá nic o tom, které intenzity náleží sledovaným miRNA. Jelikož mají jednotlivé body čtvercový charakter a leží na síti na sebe kolmých

čar, nazývá se proces určení jednotlivých bodů grid alignment nebo také registration, česky „úprava mřížky“³⁴. Toto je možné pomocí čtyř kontrolních bodů v každém z rohů arraye. Ty mají charakter 4 x 4 střídajících se tmavých a světlých pixelů v šachovnicovém uspořádání. Jakmile je mřížka na svém místě jsou k jednotlivým pixelům přiřazeny jejich próby a těm pak jejich intenzity. Následná data očištěna od hrubých chyb jsou uložena v souboru zvaném .CEL, který obsahuje sumarizovaná data z .DAT souboru³⁴. Tento výpočet byl proveden pomocí AGCC.

Následuje kontrola kvality naskenovaného obrazu pomocí Affymetrix® miRNA QCTool. Naskenovaná plocha čipu může obsahovat celou řadu defektů, které nejsou viditelné pouhým pohledem na .DAT soubor. Může se jednat o různá tmavá a světlá místa, naskenované bubliny a jiné artefakty, tzv. coffee rings, dark clouds a mnoho dalších. Takové čipy bylo pak nutno vyřadit z experimentu nebo připravit znovu.

Normalizace získaných dat byla provedena pomocí RMA (robust multi-array average) algoritmu a statistického balíku Bioconductor založeného na jazyku „R“, navrženého pro genomickou analýzu, statistické výpočty a grafiku. Tento algoritmus se vyznačuje vysokou specifičností a senzitivitou zvláště pro nízké hladiny exprese^{35, 36}. Právě v tomto kroku je provedeno odstranění šumu pozadí, dále kvantilová analýza, při které se provede korelace intenzit mezi jednotlivými čipy a sumarizace, která vyhodnotí intenzitu jednotlivých prób taky, aby reprezentovala celý gen. Pro porovnání exprese mezi jednotlivými skupinami pacientů byl použit LIMMA (Linear Models for Microarray Data) software, který je taktéž součástí balíku Bioconductor. Základní myšlenkou tohoto nástroje je linearizovat hodnoty exprese jednotlivých genů. Tento přístup zjednodušuje analýzu a je vhodný i pro menší soubory vzorků³⁷. Pro vizualizaci výsledných skupin pacientů byly použity tzv. heat mapy. Tento typ klastrové analýzy shlukuje jednotlivé vzorky na základě podobnosti v expresi. Výběr nejvhodnějších kandidátů s největší silou predikce byl proveden pomocí regresní analýzy. Anotace jednotlivých miRNA byly získány z databáze miRBase.

4.1.6 Validace

Validace byla provedena pouze u vybraných miRNA s vysokým prognostickým a diagnostickým potenciálem a to pomocí metody PCR. Metoda je založena na syntéze cDNA pomocí TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) a

následné real-time PCR reakce pomocí 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Všechny vzorky byly měřeny v tripletu.

Syntéza cDNA:

Pro PCR je nutná RNA o koncentraci 1-10 ng na 5 μ l.

1. Rozmrazíme všechny komponenty na ledu.
2. Připravíme RT Master Mix:

Tab. 6 Složení RT Master Mixu.

Componenta	Objem pro jeden vzorek (μ l)
100mM dNTPs (s dNTP)	0,15
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/ μ L	1,00
10 \times Reverse Transcription Buffer	1,50
RNase Inhibitor, 20U/ μ L	0,19
Nuclease-free water	4,16
Celkem	7,00

3. Master Mix vortexujeme, stočíme a udržujeme na ledu.
4. K 5 μ l vzorku přidáme 7 μ l Master Mixu, lehce zvortexujeme a stočíme.
5. Přidáme 3 μ l RT Primer, lehce zvortexujeme a stočíme.
6. Inkubujeme 5 minut na ledu.
7. Nastavíme na thermal cycleru teplotu:

30 minut	16 °C
30 minut	42 °C
5 minut	85 °C
∞	4 °C
8. Vložíme vzorky do cycleru a spustíme běh.

PCR reakce

1. Naředíme PCR Master Mix:

Tab. 7 Ředění PCR Master Mixu.

Komponenta	Objem pro jeden vzorek (μ l)
TaqMan 2 \times Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG	10,00
Nuclease-free water	7,67
Celkem	17,67

2. Přidáme 1 μ l 20 \times TaqMan MicroRNA Assay mix.

3. Přidáme 1,33 µl RT produktu.
4. Napipetujeme 20 µl mixu na dno jamky jamky na 96-jamkové desce.
5. Přikryjeme desku fólií a centrifugujeme.
6. Nastavíme program přístroje, vložíme do něj desku a spustíme běh.

10 minut	95 °C
Cykly: 15 sekund	95 °C
60 sekund	60 °C

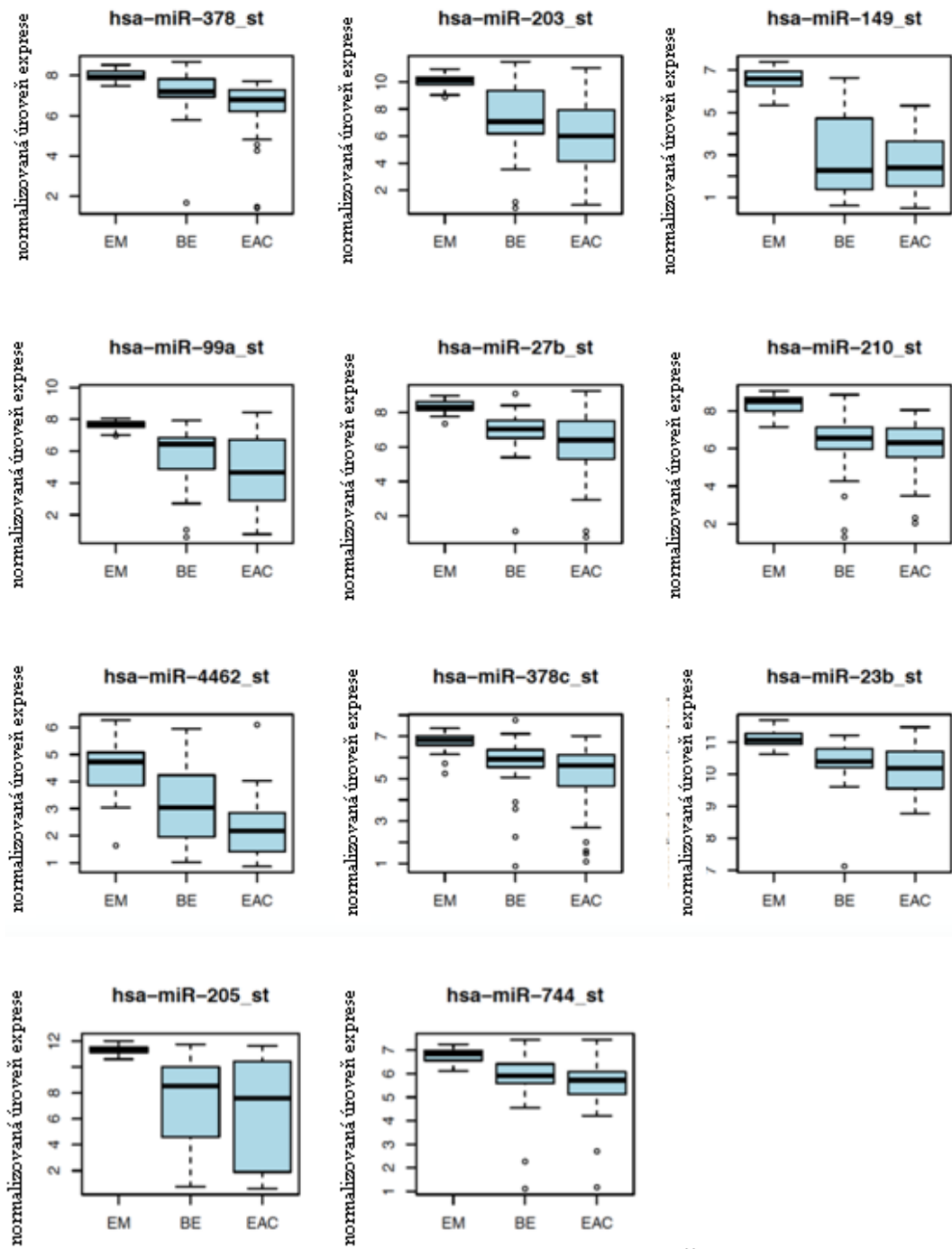
Data ze systému byla vyhodnocena pomocí SDS (2.0.1) softwaru (Applied Biosystems). Data byla normalizována za pomoci jadéřkové RNA, RNU44 a následně analyzována metodou $2^{-\Delta C_t}$. Veškeré výpočty byly prováděny v programu Prism 6.0.0. MiRNA na hladině statistické významnosti $p \leq 0,05$ byly považovány za významné.

5. Výsledky

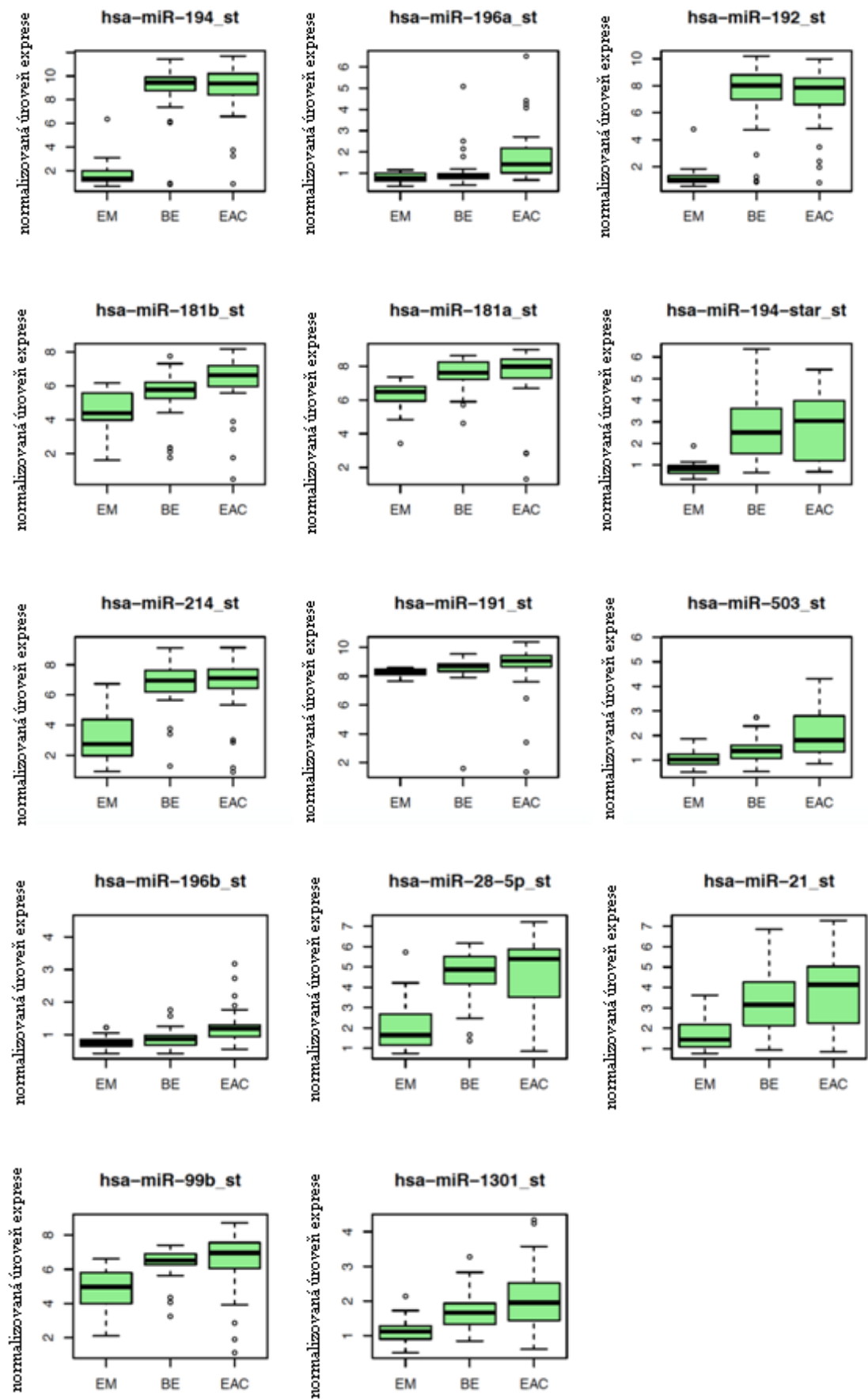
Statistická analýza mikročipových dat odhalila výraznou deregulaci některých miRNA. Ty byly rozděleny do několika skupin podle způsobu deregulace. Tabulka 7 shrnuje 16 miRNA s výrazně zvyšující se expresí a 11 miRNA se snižující se expresí mezi zdravou sliznicí, Barrettovým jícnem a adenokarcinomem. Z nichž některé jsou známými onkogeny a tumor-supresory a byly potvrzeny u řady dalších nádorových onemocnění. Dále jsou v tabulce zahrnuty miRNA, u kterých byl tento způsob deregulace pozorován dalšími vědeckými týmy, a také miRNA u kterých je deregulace pozorována poprvé, či ještě nebyla objevena. Hladiny významnosti byly pro up-regulované miRNA $p \leq 0,0015$ a pro down-regulované $p \leq 0,0001$.

Tab. 7 MiRNA s nejvýrazněji diferencovanou expresí napříč různými stádii onemocnění.

miRNA	zdravá sliznice		Barrettův jícen		Adenokarcinom		p-value	Searmanův korelační koeficient
	Průměr	SD	Průměr	SD	Průměr	SD		
miRNA s progresivně klesající hladinou exprese								
miR-378	7,98	0,28	7,14	0,98	6,36	1,52	$2,31 \times 10^{-9}$	-0,59
miR-203	10,05	0,50	6,79	2,60	5,82	2,07	$4,99 \times 10^{-8}$	-0,56
miR-149	6,56	0,48	3,10	1,83	2,69	1,41	$7,89 \times 10^{-8}$	-0,56
miR-99a	7,65	0,31	5,57	2,08	4,68	2,31	$3,83 \times 10^{-7}$	-0,54
miR-4462	4,05	1,02	3,15	1,24	2,38	1,13	$1,16 \times 10^{-6}$	-0,53
miR-27b	8,33	0,37	6,67	1,61	6,01	2,00	$1,18 \times 10^{-6}$	-0,53
miR-210	8,39	0,52	6,15	1,59	6,08	1,48	$5,49 \times 10^{-6}$	-0,31
miR-23b	11,13	0,28	10,37	0,62	10,17	0,73	$6,91 \times 10^{-6}$	-0,50
miR-378c	6,72	0,49	5,53	1,36	5,02	1,61	$1,86 \times 10^{-5}$	-0,49
miR-744	6,77	0,32	5,75	1,29	5,53	1,16	$4,99 \times 10^{-5}$	-0,48
miR-205	11,30	0,34	7,34	3,63	6,70	4,15	$5,90 \times 10^{-5}$	-0,48
miRNA s progresivně rostoucí hladinou exprese								
miR-196a	0,78	0,21	1,13	0,73	1,83	1,26	$3,89 \times 10^{-6}$	0,51
miR-194	1,78	1,23	8,81	2,40	8,92	2,32	$8,71 \times 10^{-6}$	0,50
miR-181b	4,55	1,21	5,37	1,58	6,23	1,60	$1,94 \times 10^{-5}$	0,49
miR-181a	6,27	0,84	7,51	1,01	7,48	1,73	$2,18 \times 10^{-5}$	0,49
miR-28-Sp	2,04	1,26	4,32	1,37	4,68	1,85	$3,81 \times 10^{-5}$	0,48
miR-192	1,23	0,81	7,21	2,39	7,20	2,20	$5,41 \times 10^{-5}$	0,48
miR-194*	0,84	0,32	2,73	1,43	2,78	1,47	0,00015	0,46
miR-212	1,70	0,80	3,13	1,50	3,94	1,72	0,00020	0,46
miR-503	1,07	0,34	1,54	0,87	2,03	0,88	0,00025	0,46
miR-191	8,26	0,26	8,58	1,05	8,63	1,72	0,00025	0,46
miR-196b	0,77	0,20	0,96	0,44	1,26	0,54	0,00043	0,45
miR-214	3,18	1,70	6,75	1,56	6,63	1,92	0,00061	0,44
miR-151-3p	2,50	1,18	3,96	1,39	4,50	1,75	0,00072	0,44
miR-151-5p	6,11	0,79	7,22	1,31	7,32	1,39	0,00108	0,43
miR-4417	2,18	0,90	3,33	1,49	4,32	1,85	0,00110	0,43
miR-25	3,52	1,46	4,08	1,64	5,25	1,58	0,00124	0,43



Obrázek 2 MiRNA s hladinami progresivně klesajícími směrem od zdravé tkáně k adenokarcinomu. Data po normalizaci.



Obrázek 3 MiRNA s hladinami progresivně narůstajícími směrem od zdravé tkáně k adenokarcinomu. Data po normalizaci.

Na obrázku 2 a 3 jsou zobrazeny tzv. boxploty znázorňující rozptyl naměřených hodnot exprese jednotlivých, vybraných miRNA. Odlehlé hodnoty jsou znázorněny tečkou, středová část je ohraničena hodnotami 1. a 3. kvartilu. Medián hodnot je znázorněn horizontální linií uvnitř středové části. Tyto grafy shrnují vždy celý soubor vzorků pro dané histologické stádium. Proto jsou z nich dobře patrné veškeré změny, které daná miRNA ve své expresi vykazuje. I když je se medián exprese snižuje, může u některých pacientů nastat nepatrné zvýšení nebo stabilizace exprese. Velké množství miRNA vykazuje takřka shodnou míru exprese ve zdravé tkáni, Při progresi onemocnění se variabilita exprese zvyšuje.

V Tabulce 8 je shrnuto 5 miRNA, které vykazují deregulaci exprese v průběhu progresu Barrettova jícnu v adenokarcinomu. MiRNA mají v tomto případě více než dvojnásobně zvýšenou expresi tkáni Barrettova jícnu, ale sníženou expresi v tkáni adenokarcinomu jícnu. Tyto a miRNA zmíněné výše jsou pravděpodobně nejvíce biologicky relevantní miRNA zapojené do procesu progresu Barrettova jícnu.

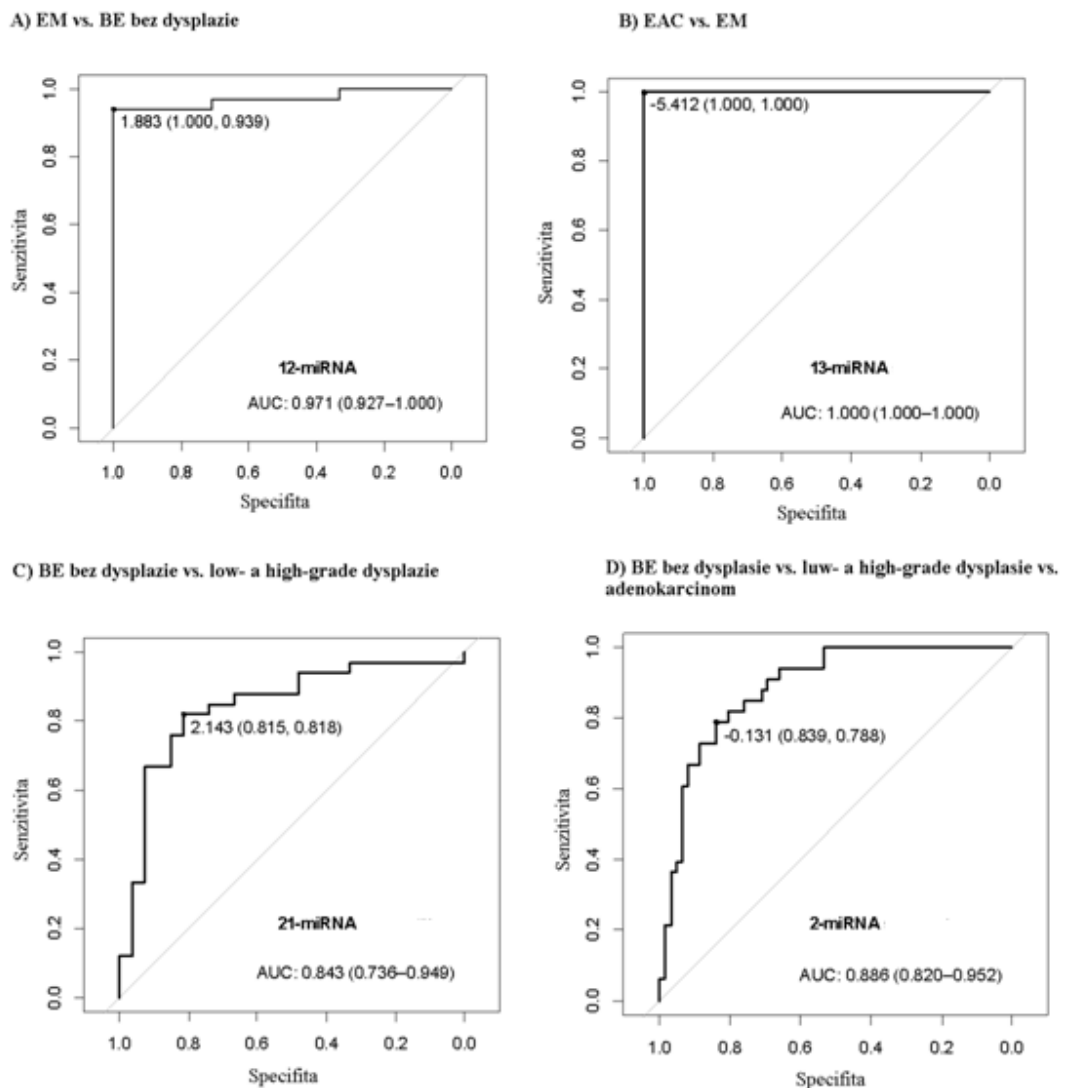
Tab. 8 MiRNA s deregulovanou expresí mezi EM a BE a EAC.

miRNA	BE vs. EM		EAC vs. BE	
	Změna exprese	p-value	Změna exprese	p-value
miR-375	2,58	0,0237	0,10	2,63x10 ⁻¹⁰
miR-148a	3,73	2,72x10 ⁻⁵	0,40	0,021
miR-200b	3,23	0,0015	0,41	0,0654
miR-145	10,27	8,39x10 ⁻⁸	0,45	0,2337
miR-195	6,36	3,82x10 ⁻⁵	0,49	0,3123

Tab. 9 Charakteristické profily miRNA specififikující stádia onemocnění.

	Počet	miRNA	SN	SP	p-value
BE vs.EM	12	miR-149 (-), miR-192 (+), miR-194 (+), miR-210 (-), miR-214 (+), miR-194* (+), miR-125a-5p (+), miR-146a (+), miR-221 (-), miR-199b-3p (+), miR-625 (+), miR-145 (+)	0.94	1.0	<0.001
EAC vs. EM	13	miR-149 (-), miR-378 (-), miR-194 (+), miR-192 (+), miR-210 (-), miR-203 (-), miR-99a (-), miR-205 (-), miR-194* (+), miR-27b (-), miR-378c (-), miR-4462 (-), miR-23b (-)	1.0	1.0	<0.001
BE bez dysplazie vs. low- and high-grade dysplazie	21	miR-375 (+), let-7f (+), miR-2467-3p (-), miR-875-3p (-), miR-3158-5p (+), miR-549 (+), miR-1262 (-), miR-3127-3p (-), miR-30c (+), let-7a (+), let-7g (+), miR-4681 (+), let-7c (+), miR-4715-3p (+), miR-4692 (-), miR-146a* (+), miR-4324 (-), miR-4317 (+), miR-4802-3p (-), miR-523 (+), miR-4256 (+)	0.82	0.82	<0.001
BE bez dysplazie vs. low- and high-grade dysplazie a adenokarcinom	2	miR-375 (+), miR-93 (-)	0.79	0.84	<0.001

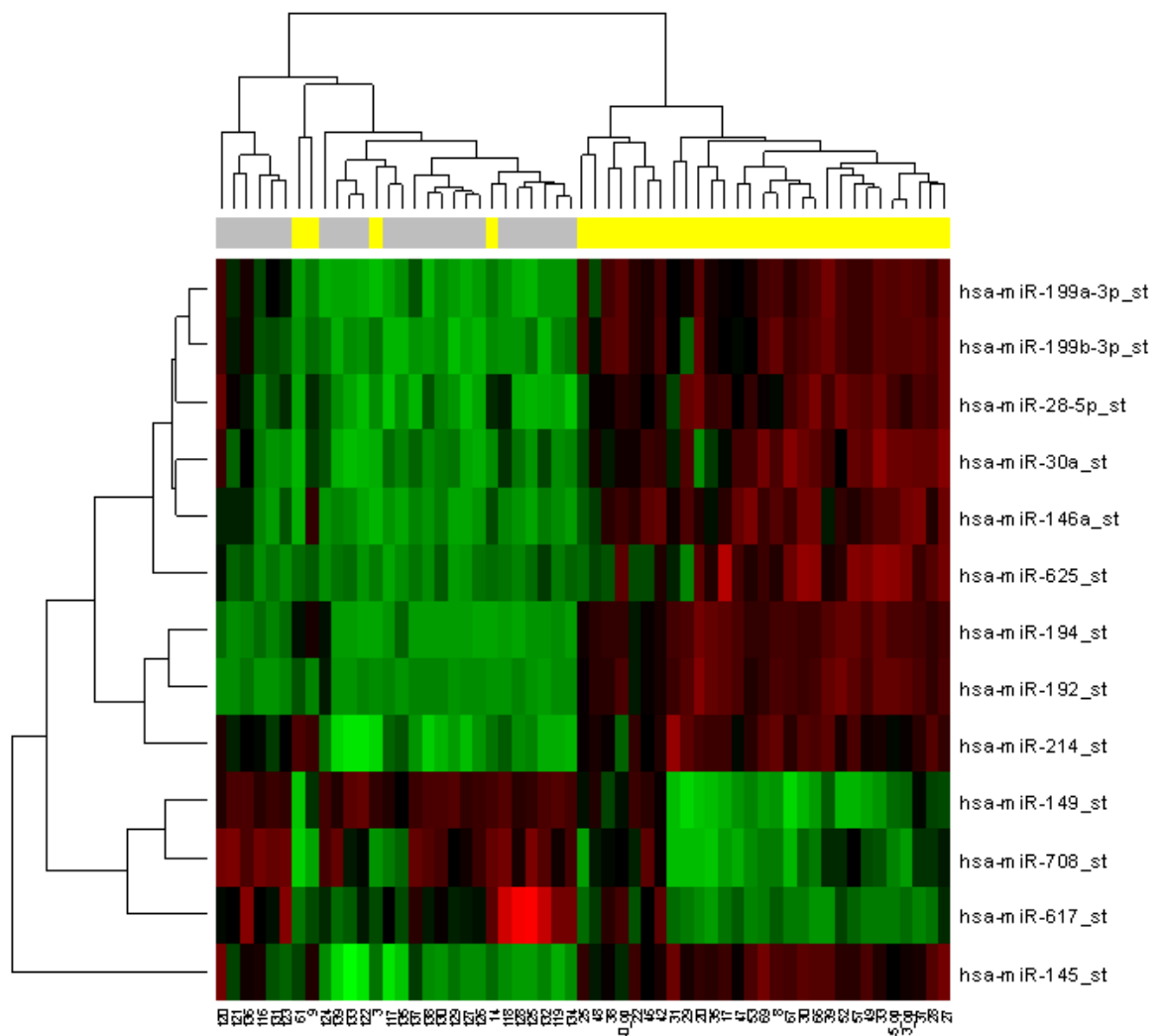
Pro výběr miRNA, které dokážou s největší diagnostickou silou rozlišit mezi jednotlivými skupinami pacientů s v různých stádiích onemocnění, byla použita logická regrese. Pomocí metody Leave-One-Out Cross-Validation bylo zabráněno vzniku náhodných chyb (viz obrázek 4). Touto analýzou byly určeny 4 specifické profily miRNA shrnuté na obrázku 6 A-D. Nalezeno bylo 12 miRNA, které dokážou se specifitou 100% a senzitivitou 94% rozlišit EM vs. BE, EM vs. EAC se podařilo charakterizovat pomocí 13 miRNA se 100% senzitivitou i specifitou, BE bez dysplazie vs. BE s dysplazií charakterizovalo 21 miRNA s 82% senzitivitou a 82% specifitou, BE bez dysplazie vs. BE s dysplazií vs. adenokarcinom 2 miRNA s 84 % specifitou a 79% senzitivitou. Tyto miRNA mohou posloužit jako nové diagnostické markery. Jednotlivé miRNA profily jsou shrnuty v tabulce 9.



Obrázek 4 Leave-One-Out Cross-Validation ROC křivky regresních modelů vyjadřující vztah mezi specifitou a senzitivitou jednotlivých miRNA profilů.

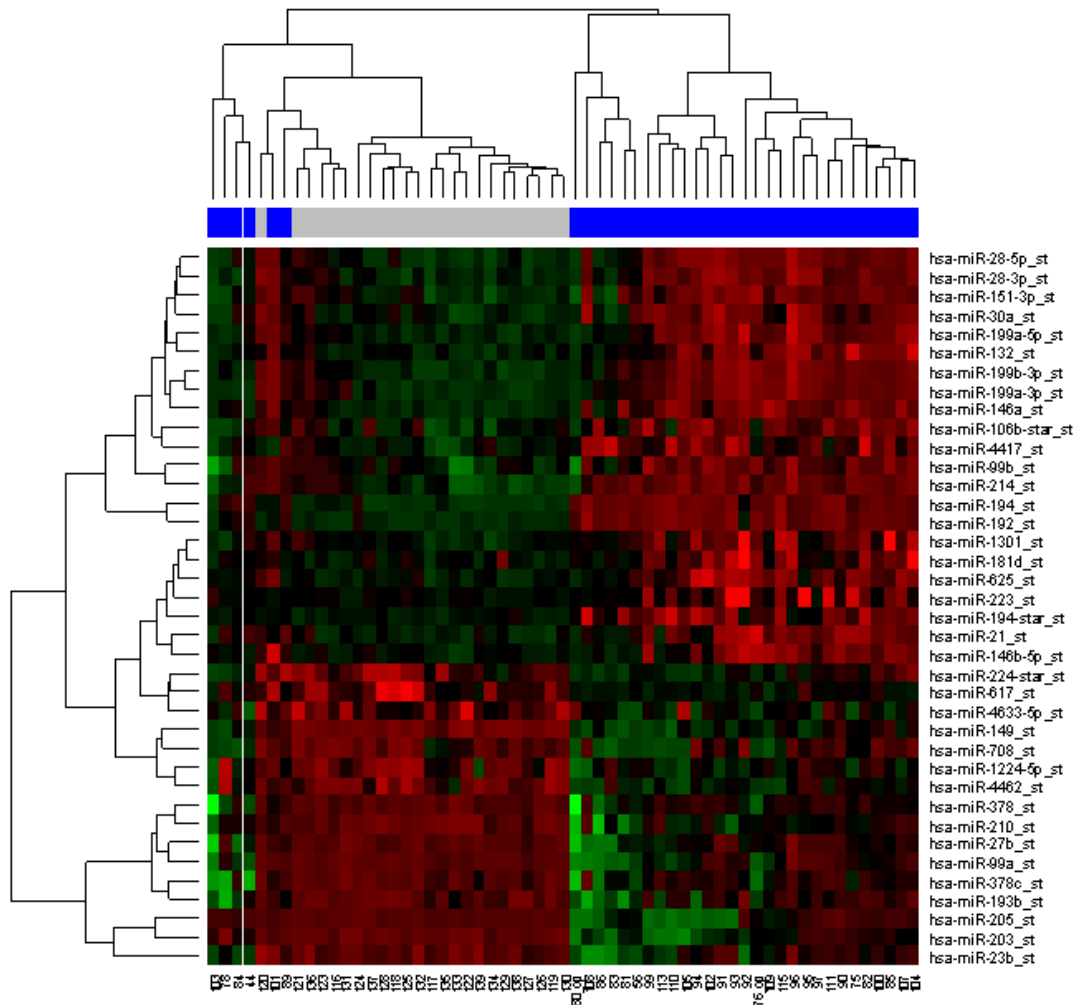
Pro vizualizaci skupin pacientů na základě podobnosti expresních profilů bylo použito řízeného hierarchického klastrování. Takto byli rozděleni jednotliví pacienti do skupin podle podobnosti v expresi miRNA specifických pro dané histologické stádium onemocnění.

Mezi veškerými miRNA analyzovanými v experimentu bylo identifikováno 13, které dokážou s vysokou přesností rozlišit mezi zdravou tkání a Barrettovým jícnem. Tyto miRNA mají míru statistické významnosti $p \leq 10^{-8}$. Na obrázku 5 je znázorněno hierarchické klastrování pacientů se zdravou tkání (šedá) a Barrettovým jícnem (žlutá). Deregulace jednotlivých miRNA profilů je zde velice dobře patrná.



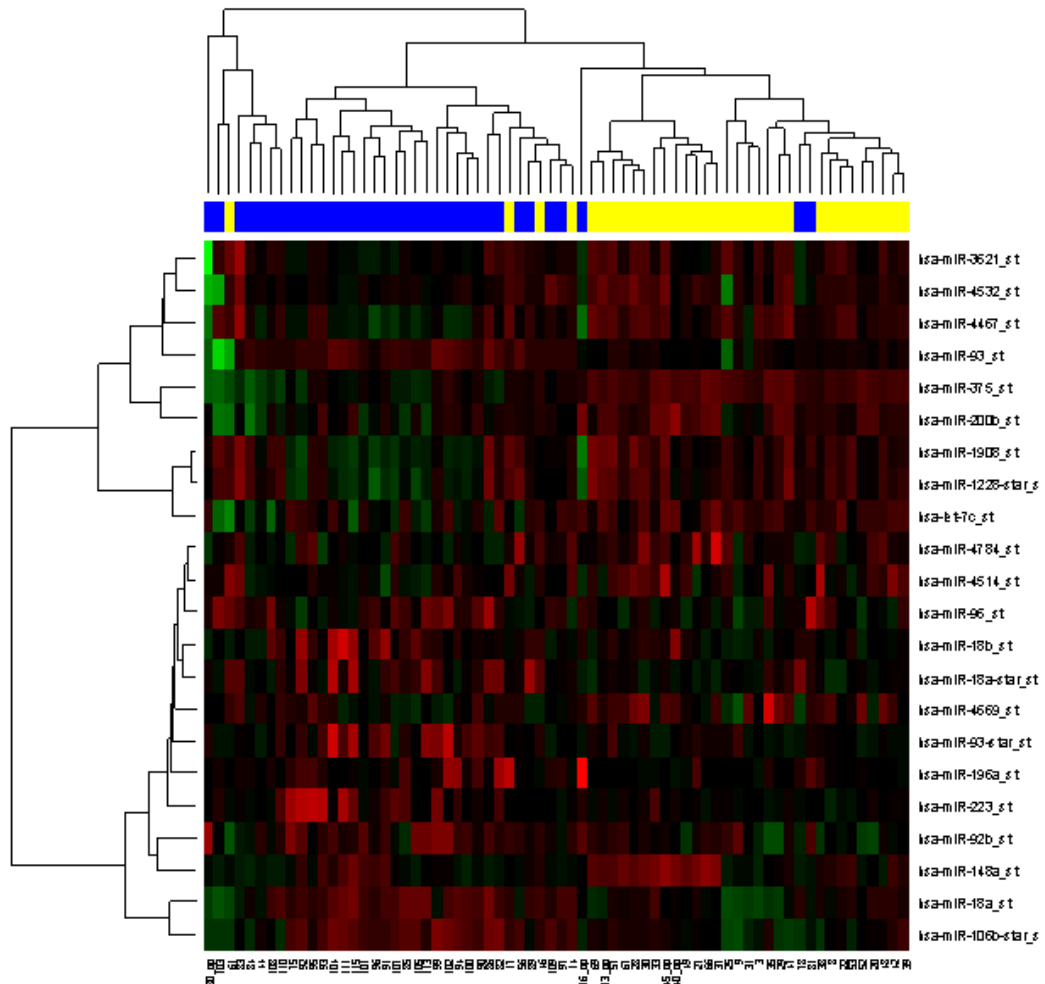
Obrázek 5 Heat mapa analyzovaných dat s ohledem na histologické stádium pacientů a expresi 13 miRNA. Řádky představují jednotlivé miRNA, zeleně down-regulace, červeně up-regulace. Sloupce představují pacienty se zdravou tkání (šedě) a s Barrettovým jícnem (žlutě).

Vysoce specifické profily exprese miRNA byly objeveny také mezi zdravou tkání a adenokarcinomem jícnu. Celkem 38 miRNA vykazuje míru statistické významnosti $p \leq 10^{-5}$, Klastrová analýza je zobrazena na obrázku 6. Na této klastrové analýze jsou také dobře patrné rozdílné profily exprese při prvním pohledu. Pacienti se zdravou tkání jsou označení šedě, s adenokarcinomem modře.



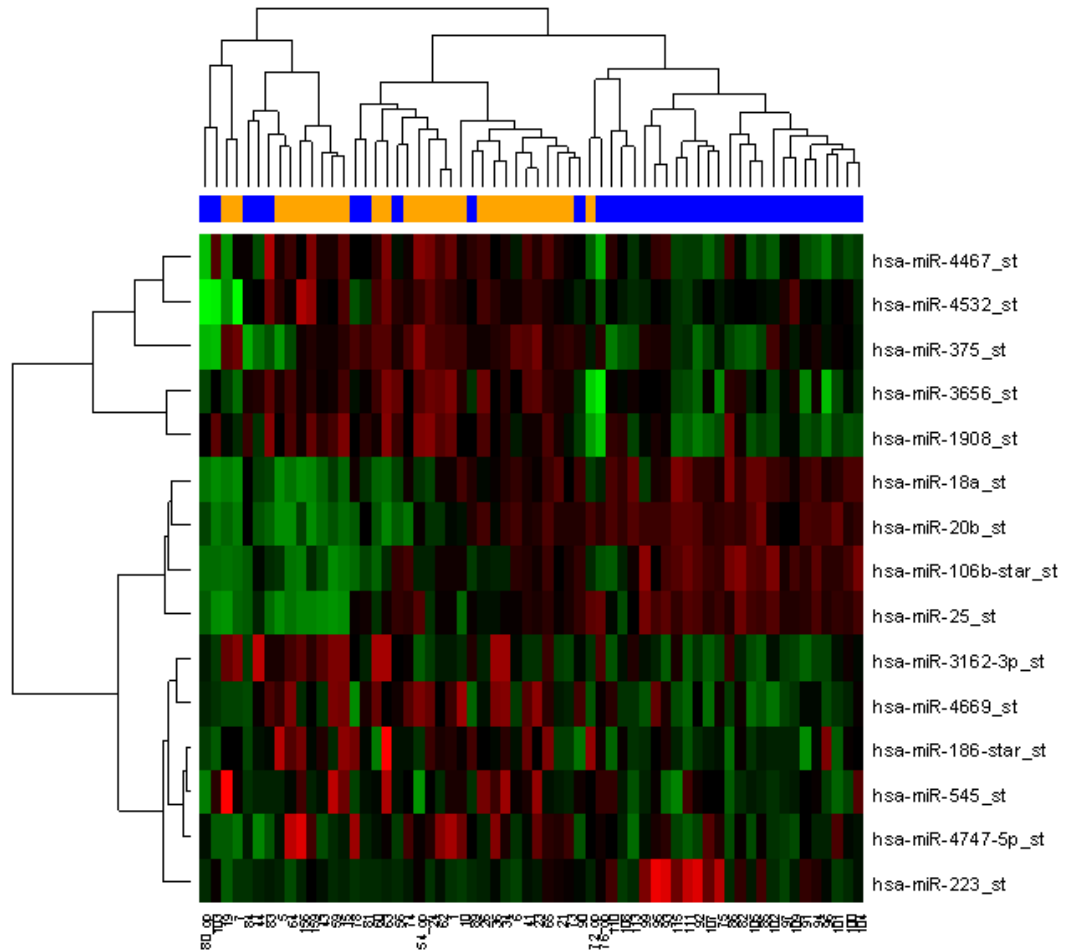
Obrázek 6 Heat mapa analyzovaných dat s ohledem na histologické stádium pacientů a expresi 38 miRNA. Řádky představují jednotlivé miRNA, zeleně down-regulace, červeně up-regulace. Sloupce představují pacienty se zdravou tkání (šedě) a s adenokarcinomem (modře).

Z klastrové analýzy dat získaných od pacientů s adenokarcinomem, v porovnání s Barrettovým jícnem (viz obrázek 7), není již tak dobře patrný rozdíl v expresi miRNA. Statistickou analýzou bylo odhaleno 22 miRNA na hladině statistické významnosti $p \leq 0,0001$, které jsou schopné s vysokou přesností rozlišit mezi Barrettovým jícnem (žlutě) a adenokarcinomem (modře).



Obrázek 7 Heat mapa analyzovaných dat s ohledem na histologické stádium pacientů a expresi 22 miRNA. Řádky představují jednotlivé miRNA (zeleně down-regulace, červeně up-regulace), sloupce pacienty s Barrettovým jícnem (žlutě) a s adenokarcinomem (modře).

Rozdíl mezi Barrettovým jícnem s dysplastickými změnami dobře charakterizuje 15 miRNA ($p \leq 0,0005$) viz obrázek 8. Tyto miRNA dokáží rozlišit mezi jednotlivými histologickými stádii s vysokou přesností.

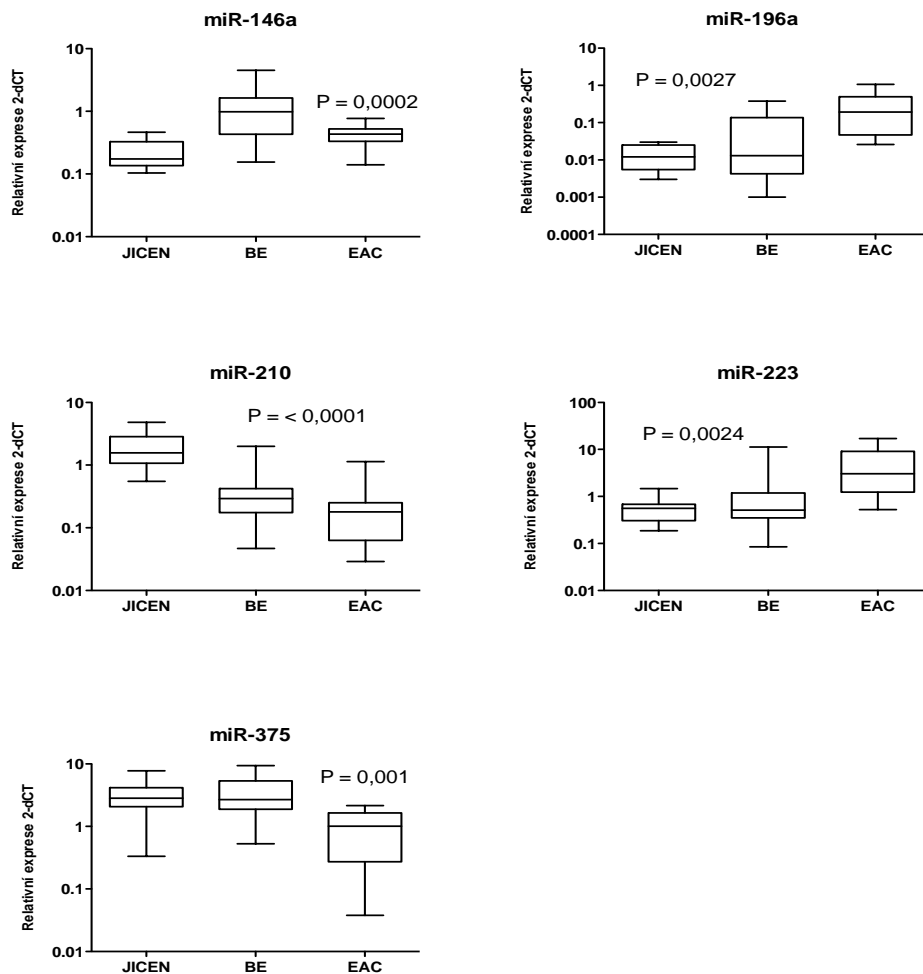


Obrázek 8 Heat mapa analyzovaných dat s ohledem na histologické stádium pacientů a expresi 15 miRNA. Řádky představují jednotlivé miRNA (zeleně down-regulace, červeně up-regulace), sloupce pacienty s Barrettovým jícnem s dysplazií (oranžově) a s adenokarcinomem (modře).

Pro validaci bylo vybráno 5 miRNA (viz Tab. 10 a obrázek 9), které se dle mikročipových dat jeví jako nejvhodnější kandidáti na diagnostický biomarker adenokarcinomu jícnu. U získaných dat byly testovány stejné korelace, které jsme již pozorovali na úrovni mikročipových analýz, přičemž všechna pozorování získaná pomocí čipů se u těchto pěti miRNA podařilo potvrdit i pomocí PCR. Míra exprese těchto miRNA byla analyzována pomocí metody real-time PCR v sekvenci zdravá tkáň (n=10), Barrettův jícen (25) a adenokarcinom (n=10).

Tab. 10 Exprese miRNA ve zdravé tkáni a adenokarcinomu validovaná metodou PCR

miRNA	Zdravá tkáň	Barrettův jícen + LGD	Adenokarcinom	p-value
miR-223	0,559	0,511	3,056	0,0024
miR-210	1,575	0,293	0,1795	< 0,0001
miR-146a	0,1745	0,986	0,4335	0,0002
miR-375	2,823	2,685	1,009	0,001
miR-196a	0,012	0,014	0,1925	0,0027



Obrázek 9 Změny exprese validovaných miRNA v sekvenci od tkáně normálního jícnu k adenokarcinomu.

6. Diskuze

Nádory jícnu patří mezi onemocnění s velice špatnou prognózou a vysokou mírou mortality. Toto onemocnění nemá až do svých pozdějších stádií žádné výraznější příznaky, postihuje především muže s mediánem věku 65 let a jeho incidence stále narůstá jak v rozvojových tak vospělých zemích. Mezi rizikové faktory patří především kouření a abúzus alkoholu, ale také špatně složená dieta a životní styl. V současné době je nejužívanější metodou diagnózy nádorů jícnu endoskopie s následným histopatologickým vyšetřením. To ovšem nemusí ve všech případech podat přesné informace o stádiu onemocnění.

Cílem práce bylo porovnat profily exprese miRNA u onemocnění jícnu a najít tak objektivní prognostické a diagnostické biomarkery. Pro tento účel byly použity vzorky FFPE tkáně 119 pacientů s onemocněním jícnu v různém stádiu vývoje. Z těchto vzorků byla výše zmíněnými postupy vyizolovaná celková RNA obohacená o frakci krátkých RNA, mezi které patří právě miRNA. Následně byla u všech vzorků zkontrolována kvalita a čistota vyizolované RNA a změřena její koncentrace pomocí přístrojů ND 1000 a Agilent 2100 Bioanalyzer. Vybrané vzorky s nejvyšší kvalitou a vhodnou koncentrací byly dále zpracovány pomocí high-throughput metody RNA microarrays, které je schopná sledovat expresi několika desítek tisíc miRNA najednou. Data byla dále statisticky zpracována a miRNA s nejsilnějším diagnostickým faktorem validovány pomocí metody realtime-PCR.

Diskuze k výsledkům z hlediska jednotlivých miRNA

Analýzou mikročipových dat byly rozlišeny dvě velké skupiny miRNA. První skupina vykazovala výrazně snižující se expresi jednotlivými stádii onemocnění. Mezi tyto RNA (viz Tab. 7) patří mnohé známé tumor-supresorové miRNA jako třeba miR-203, miR-205, miR-23b, miR-27b. Předpokládá se, že miR-23b a miR-27b kooperují v jakémsi klastru. Lze tedy předpokládat, že u pacientů bude pozorovatelná snižující se hladina jak jedné tak druhé. Pomocí metody PCR bylo potvrzeno, že hladina miR-203 byla ve tkáni adenokarcinomu výrazně nižší. Nižší hladinu miR-203 a miR-205 prezentoval mimo jiné také Wijnhoven et. al. v roce 2010³⁸. Tyto miRNA se tedy jeví jako slibné diagnostické markery adenokarcinomu jícnu. Druhá skupina, do které patří například miR-21 a miR-25 jež jsou známé onkogeny a nebo miR-194 či miR-196a, vykazovala v průběhu onemocnění zvyšující se míru exprese. PCR experimentem byla

potvrzena s vysokou přesností data z microarrayí a to zvyšující se hladina miR-196a, miR-223, klesající hladina miR-210 a zvyšující se hladinu miR-146a a miR-375 v BE s následným snížením u EAC. Zároveň se mezi veškerými zkoumanými miRNA objevili některé dosud nepopsané, miR-28-5p, miR-4417, miR-4462, miR-617, miR-625 jejichž úloha v regulaci karcinomu jícnu musí být teprve potvrzena.

Některé miRNA vykazují proměnlivou míru exprese napříč jednotlivými histologickými stádii onemocnění (viz Tab. 8). MiR-145 vykazovala 10x vyšší expresi v Barrettově jícnu oproti zdravé tkáni, ale více než dvakrát sníženou expresi v adenokarcinomu. Obdobné zvýšení exprese v Barrettově jícnu a následující snížení exprese v adenokarcinomu vykazovaly i další miRNA uvedené v tabulce 8.

Diskuze k výsledkům z hlediska expresních profilů miRNA

Pro vytvoření diagnostického profilu miRNA je zapotřebí specifických miRNA, u kterých je změna exprese dobře prokazatelná a výrazná. Takových miRNA bylo pomocí microarrayí a PCR nalezeno hned několik. Z těchto byly pro jednotlivá histologická stádia onemocnění sestaveny expresní profily miRNA (viz Tab. 9). Velice dobře se podařilo charakterizovat změny v expresi při progresi onemocnění do Barrettova jícnu. S vysokou specifitou i senzitivitou bylo určeno 12 miRNA (viz Tab. 9, obrázek 6 A), které dokážou rozlišit mezi zdravou tkáně a Barrettovým jícnem. Z klastrové analýzy je rovněž dobře patrné rozdělení pacientů do dvou skupin podle histologických stádií, Pouze 4 expresní profily pacientů s Barrettovým jícnem z celkového počtu 57 pacientů byly podobné zdravým jedincům. Obdobná situace vyvstala i u porovnání zdravé tkáně a adenokarcinomu. Do klastrové analýzy bylo zahrnuto celkem 59 vzorků a 6 pacientů s adenokarcinomem bylo přiřazeno do skupiny zdravých jedinců. Po zpřísnění podmínek analýzy ovšem došlo ke snížení počtu sledovaných miRNA signálů a tím zvýšení specifity a senzitivity až na 100%. Takto byl vytvořen profil exprese miRNA pro porovnání zdravé tkáně a adenokarcinomu. Pro zbylé dva případy, kdy se porovnávala jednotlivá stádia Barrettova jícnu a adenokarcinom nebyla situace již tak jednoznačná. Z klastrových analýz lze dobře rozpoznat, že jednotlivé expresní profily nevykazují takovou shodu jako u předchozích dvou případů a dochází tu k většímu prolínání pacientů mezi jednotlivými histologickými stádii. Přesto se podařilo vytvořit dostatečně specifický profil 21 miRNA, které dokážou odlišit jednotlivá stádia progresu Barrettova jícnu a dále nalézt 2

miRNA pro identifikaci metaplastických změn Barrettova jícnu v adenokarcinomu. Metaplazie tkáně je také pravděpodobně příčinou tak malého počtu pozorovaných miRNA. MiR-375 vykazuje zvýšení exprese v Barrettově jícnu ale snížení v adenokarcinomu, právě tato miRNA může mít dostatečný potenciál jako biomarker progresu Barrettova jícnu. Exprese mir-93 se metaplazií zvyšuje. Postup dysplazie a histologických změn v průběhu Barrettova jícnu je pozvolný, proto je zde nutný větší počet sledovaných miRNA u kterých zároveň nemusí být změna v expresi výrazná, nebo nemusí nastat, proto může být velice obtížné tyto změny sledovat a určit správně stádium dysplazie.

V průběhu studie bylo analyzováno celkem 1733 miRNA ze 119 patientských vzorků což se dá považovat za jednu z větších studií, které byly na mapování exprese miRNA u karcinomu jícnu provedeny. Pozitivní zprávou je že se podařilo potvrdit údaje již předešlých menších studií, jako například Wu et al. z roku 2013¹³ mapující hladinu 754 miRNA a nebo Wijnhoven et al. 2010³⁸ mapující 377 lidských miRNA, které rovněž poukazovali na deregulaci námi objevených miRNA jako jsou miR-21, miR-23b, miR-25, miR-27b, miR-203, miR-205, miR-375, let-7c. Zároveň se nám podařilo sestavit vlastní profily exprese miRNA a rozšířit tak dosud objevené expresní profily o další výrazně deregulované miRNA pro jednotlivá histologická stadia onemocnění tj. Barrettův jícn bez dysplazie, low-grade a high-grade dysplazii a adenokarcinomu. Největší specifity a senzitivity bylo dosaženo u profilování změn EM vs. BE a EM vs. EAC, změny mezi BE a EAC nebyly tak výrazné pravděpodobně důsledku metaplazie tkáně jak již bylo zmíněno výše. Slabost této, jako i dalších studií prováděných na toto téma, je nedostatečný počet sledovaných subjektů a nutnost konfirmace již dosažených výsledků pomocí dlouhodobé prospektivní studie.

7. Závěr

V teoretické části byla vypracována literární rešerše na téma Profilování exprese miRNA u onemocnění jícnu. Byly shrnuty veškeré základní poznatky o typech onemocnění, zejména pak o adenokarcinomu jícnu a Barrettově jícnu, na které je tato práce zaměřena. Teoretická část rovněž obsahuje informace o úloze miRNA v onemocnění jícnu, údaje o epidemiologii, etiologii, diagnóze a léčbě karcinomu jícnu a také shrnuje a popisuje metody používané pro profilování exprese miRNA.

V praktické části byla provedena izolace miRNA z retrospektivního souboru FFPE vzorků 119 pacientů. U všech vzorků byla změřena kvalita a kvantita vyizolované RNA a prostřednictvím technologie microarrays provedeno profilování exprese těchto miRNA. Pomocí statistického softwaru byly objeveny diagnosticky a prognosticky významné miRNA a stanoveny expresní profily pro jednotlivá histologická stádia onemocnění. Hladiny vybraných miRNA byly validovány pomocí metody real-time PCR.

Prostřednictvím platformy Affymetrix a statistickým hodnocením výsledků byly objeveny nové a potvrzeny některé již známe miRNA, jejichž hladiny jsou při onemocnění jícnu deregulovány. Výrazně deregulovanou hladinu mají miR-21, miR-23b, miR-25, miR-27b, miR-143, miR145, miR-194, miR-203, miR-205, miR-210, miR-375. Tyto RNA jsou vhodnými prognostickými a diagnostickými markery a mohou pomoci zpřesnit diagnózu a zefektivnit léčbu pacienta.

8. Seznam použitých zkratek

A – absorbance

AGCC – Affymetrix® GeneChip® Command Console®

AUC – area under curve

BE – Barrett's esophagus

CA 74-2 – cancer antigen 74-2

cDNA – complementary DNA

CEA – carcinoembryonic antigen

CT – computer tomography

Cy3 – cyanine 3

Cy5 – cyanine 5

DNA – deoxyribonucleotic acid

DEPC – diethylpyrocarbonate

DMSO – dimethyl sulfoxide

EAC – esophageal adenocarcinoma

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid

EM – esophageal mucosa

ESCC – esophageal squamous cell carcinoma

FFPE – formalin fixed parafin embeded

FISH – florescent in situ hybridization

GERD – gastroesophageal reflex dinase

IHC – immunohistochemistry

LIMMA – Linear Models for Microarray Data

MM – miss match

miRNA – micro RNA

mRNA – mediator RNA

MS2 RNA – bakteriofagální RNA, MS2

PC – personal computer

PCR – polymerase chain reaction

PM – perfekt match

pre-miRNA – pre-micro RNA

QC – quality control

qRT-PCR – quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

RIN – RNA integrity number

RT – reverse transcription

RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction

RTG – radioisotope thermoelectric generator

RNA – ribonukleic acid

ROC – receiver operating characteristic

rpm – rotation per minute

scaRNA – small Cajal body-specific RNA

SCC – squamous cell carcinoma antigen

SD – standard deviation

SDS – sodium dodecyl sulfate

snoRNA – small nucleolar RNA

Tab. – tabulka

tj. – to je

TRIS – tris(hydroxymetyl)aminomethane

tzv. – takzvaný

UV – ultraviolet

v – verze

9. Seznam použité literatury

1. AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* [online]. 2004, vol. 431, issue 7006, s. 350-355 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1038/nature02871. Dostupné z: <http://www.nature.com/nature/journal/v431/n7006/full/nature02871.html#close>
2. FRIEDMAN, R. C., K. K.-H. FARH, C. B. BURGE a D. P. BARTEL. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*[online]. 2008, vol. 19, issue 1, s. 92-105 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1101/gr.082701.108. Dostupné z: <http://genome.cshlp.org/content/19/1/92>
3. CALDAS, C. a J. D. BRENTON. Sizing up miRNAs as cancer genes. *Nature Medicine* [online]. 2005, vol. 11, issue 7, s. 712-714 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1038/nm0705-712. Dostupné z: <http://www.nature.com/nm/journal/v11/n7/full/nm0705-712.html>
4. KUSENDA, B., M. MRAZ, J. MAYER a S. POSPISILOVA. Microrna biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomedical Papers* [online]. 2006-12-1, vol. 150, issue 2, s. 205-215 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.5507/bp.2006.029. Dostupné z: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2006.029.html>
5. PRITCHARD, C. C., H. H. CHENG a M. TEWARI. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews Genetics*[online]. 2012-4-18, vol. 13, issue 5, s. 358-369 [cit. 2015-03-25]. DOI: 10.1038/nrg3198. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg3198>
6. SLABÝ, O. a M. SVOBODA. *MikroRNA v onkologii*. 1. vyd. Praha: Galén, c2012, xvii, 324 s. ISBN 978-807-2625-871.
7. GU, J., Y. WANG a X. WU. MicroRNA in the Pathogenesis and Prognosis of Esophageal Cancer. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2012, vol. 19, issue 7, s. 1292-1300 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.2174/138161213804805775. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092349>
8. KOVAŘÍKOVÁ, A., R. HÉŽOVÁ, J. SROVNAL, M. RÉDOVÁ-LOJOVÁ a O. SLABÝ. Role mikroRNA v molekulární patologii karcinomu jícnu a jejich potenciální využití v klinické onkologii. *Klinická onkologie*. 2014, **27**(2), 87-96. ISSN 0862-495X.

9. CONTEDEUCA, V. Barrett's esophagus and esophageal cancer: An overview. *International Journal of Oncology* [online]. 2012-05-17, s. - [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.3892/ijo.2012.1481. Dostupné z: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2012.1481>
10. DE JONGE, P. J. F., M. VAN BLANKENSTEIN, W. M. GRADY a E. J. KUIPERS. Barrett's oesophagus: epidemiology, cancer risk and implications for management. *Gut* [online]. 2013-12-04, vol. 63, issue 1, s. 191-202 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-305490. Dostupné z: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gutjnl-2013-305490>
11. SCHLEMPER, R. J., Y. KATO a M. STOLTE. *Review of histological classifications of gastrointestinal epithelial neoplasia: differences in diagnosis of early carcinomas between Japanese and Western pathologists* [online]. [cit. 2015-03-10].
12. MONTGOMERY, E., M. P. BRONNER, J. R. GOLDBLUM, J. K. GREENSON a M. M. HABER, Reproducibility of the diagnosis of dysplasia in Barrett esophagus: A reaffirmation. *Human Pathology* [online]. 2001, vol. 32, issue 4, s. 331-371 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1016/b978-012369416-4/50014-5.
13. WU, X., J.A. AJANI, J. GU, D.W. CHANG, W. TAN, M.A. HILDEBRANT, M. HUANG, K.K. WANG a E. HAWK. MicroRNA expression signatures during malignant progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)* [online]. 2013, č. 6, s. 196-205 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1158/1940-6207. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466817>
14. FASSAN, M., S. VOLINIA, J. PALATINI, M. PIZZI a R. BAFFA. MicroRNA expression profiling in human Barrett's carcinogenesis. *International Journal of Cancer* [online]. 2011-10-01, vol. 129, issue 7, s. 1661-1670 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1002/ijc.25823. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.25823>
15. Globocan 2012. IARC. [online]. 1.2015 [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
16. STEWART, B. W. a C. WILD. *World cancer report 2014*. World Health Organization, IARC press, s. 528-543. ISBN 9283204298.
17. AALTONEN, L. A. a S. R. HAMILTON. *Pathology and genetics of tumours of the digestive system*. Oxford: Oxford University Press (distributor), 2000, 314 p. ISBN 92-832-2410-8.

18. POLEDNAK, A. P. Trends in survival for both histologic types of esophageal cancer in U.S. surveillance, epidemiology and end results areas. *International Journal of Cancer* [online]. vol. 105, issue 1, s. 98-100 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1002/ijc.11029. Dostupné z:<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.11029>
19. ADAM, Z., M. KREJČÍ a J. VORLÍČEK. *Speciální onkologie: příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. 1. vyd. Praha: Galén, 2010, xxi, 417 s. ISBN 978-807-2626-489.
20. ENZINGER, P. C. a R. J. MAYER. Esophageal Cancer. *New England Journal of Medicine* [online]. 2003-12-04, vol. 349, issue 23, s. 2241-2252 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1056/NEJMra035010. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra035010>
21. AIRLEY, R. *Cancer chemotherapy*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2009, x, 341 p., [8] p. of plates. ISBN 04-700-9255-6.
22. HYNKOVÁ, L., H. DOLEŽELOVÁ a P. ŠLAMPA. *Radiační onkologie - učební text pro studenty 5. roč. LF MU Brno*. Brno, 2015. Dostupné z: <https://www.mou.cz/radiacni-onkologie-ucebni-text-pro-studenty-5-roc-lf-mu-brno/t2068>. Učební text. Masarykův Onkologický Ústav.
23. LEE, R. C., R. L. FEINBAUM a V. AMBROS. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* [online]. 1993, vol. 75, issue 5, s. 843-854 [cit. 2015-03-25]. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-y
24. Browse miRBase by species. THE UNIVERSITY OF MENCHESTER. MiRBase [online]. 21. vyd. June 2014 [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: <http://www.mirbase.org/index.shtml>
25. MERKEROVÁ M., A. KRÁČMAROVÁ , H. BRUCHOVÁ a R. BRDIČKA. (2006) Využití biočipových technologií v onkologii. *Klin Onkol* 19, 333-337.
26. CRONING, M., D. G. FRICKER, N. H. KOMIYAMA, S. GN. GRANT a L. GEBBIE. Automated design of genomic Southern blot probes. *BMC Genomics* [online]. 2010, vol. 11, issue 1, s. 159-177 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1007/978-1-62703-715-0_14.

27. TJONG, V., H. YU, A. HUCKNALL a A. CHILKOTI. Direct Fluorescence Detection of RNA on Microarrays by Surface-Initiated Enzymatic Polymerization. *Analytical Chemistry* [online]. 2013-01-02, vol. 85, issue 1, s. 426-433 [cit. 2015-03-29]. DOI: 10.1021/ac303132j. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac303132j>
28. MILLER, M. B. a Y. W. TANG. Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*[online]. 2009-10-12, vol. 22, issue 4, s. 611-633 [cit. 2015-03-29]. DOI: 10.1128/CMR.00019-09. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00019-09>
29. KNUDSEN, S. *Cancer diagnostics with DNA microarrays*. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, c2006, xvii, 185 p., [8] p. of plates. ISBN 9780471784074.
30. PATTERSON, T. A., T. A. LOBENHOFER a E. K. FULMER-SMENTE. Performance comparison of one-color and two-color platforms within the Microarray Quality Control (MAQC) project. *Nature Biotechnology* [online]. 2006, vol. 24, issue 9, s. 1140-1150 [cit. 2015-03-30]. DOI: 10.1038/nbt1242. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt1242>
31. SHALON, D, S J SMITH a P O BROWN. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Research* [online]. 1996, vol. 6, issue 7, s. 639-645 [cit. 2015-03-30]. DOI: 10.1101/gr.6.7.639.
32. TANG, T., N. FRANCOIS, A. GLATIGNY, N. AGIER, M.-H. MUCCHIELLI, L. AGGERBECK a H. DELACROIX. Expression ratio evaluation in two-colour microarray experiments is significantly improved by correcting image misalignment. *Bioinformatics* [online]. 2007, vol. 23, issue 20, s. 2686-2691 [cit. 2015-03-30]. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm399.,
33. ONDROUCH, J. Profilování exprese miRNA u onemocnění jícnu. Olomouc, 2013. bakalářská práce (Bc.). UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. Přírodovědecká fakulta
34. ARTEAGA-SALAS, J. M., H. ZUZAN, W. B. LANGDON, G. J. G. UPTON a A. P. HARRISON. An overview of image-processing methods for Affymetrix GeneChips. *Briefings in Bioinformatics* [online]. 2007, vol. 9, issue 1, s. 25-33 [cit. 2015-04-16]. DOI: 10.1093/bib/bbm055.

35. IRIZARRY, R. A., B. HOBBS a F. COLLIN. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* [online]. vol. 4, issue 2, s. 249-264 [cit. 2015-04-18]. DOI: 10.1093/biostatistics/4.2.249. Dostupné z: <http://biostatistics.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/biostatistics/4.2.249>
36. CARVALHO, B. S. a R. A. IRIZARRY. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* [online]. 2010-09-23, vol. 26, issue 19, s. 2363-2367 [cit. 2015-04-18]. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq431. Dostupné z: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/bioinformatics/btq431>
37. SMYTH, G. K. Limma: Linear Models for Microarray Data. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor* [online]. New York: Springer-Verlag, 2005, s. 397 [cit. 2015-04-18]. DOI: 10.1007/0-387-29362-0_23. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/0-387-29362-0_23
38. WIJNHOVEN, B. P. L., D. J. HUSSEY, D. I. WATSON, A. TSYKIN, C. M. SMITH a M. Z. MICHAEL. MicroRNA profiling of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *British Journal of Surgery* [online]. 2010, vol. 97, issue 6, s. 853-861 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1002/bjs.7000. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.7000>