



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra Organické chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

miRNA profilování u různých stádií aseptické osteolýzy

Autor:	Martin Mozolík, Bc.
Studijní program:	N1407 – Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Eva Kriegová, Dr.
Konzultanti práce:	Dr. Vladimír Beneš, Ph.D. Prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.
Termín a místo odevzdání práce:	7.5.2014, Olomouc

Rád bych poděkoval své školitelce, Ing. Evě Kriegové, Dr., za poučné vedení, trpělivost s mým stylem práce a mnoho rad, nejen ke studiu, ale i do života.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Petře Schneiderové, Mgr. Tereze Tománkové, Ing. Regině Fillerové a prof. MUDr. Jiřímu Gallovi, Ph.D. za cenné rady, informace a odbornou pomoc při vypracování této práce.

Speciální poděkování bych rád věnoval Dr. Vladimírovi Benešovi, Ph.D. a celému týmu pod jeho vedením za všestrannou pomoc, vstřícný, milý přístup, odborné rady a inspirativní diskuze, které mě obohatily.

Také bych chtěl poděkovat Mgr. Tomáši Novosádovi za zpracování výsledných sekvenačních dat a cenné rady při jejich statistické interpretaci.

Tato práce vznikla za finanční podpory Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví IGA MZ ČR NT11049, Interní grantové agentury Univerzity Palackého IGA_PU_LF_2014_20 a projektu CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

Já, Martin Mozolík, prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod odborným dohledem Ing. Evy Kriegové, Dr., a veškerou použitou literaturu jsem uvedl na konci práce.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry Organické Chemie Přírodovědecké fakulty a v knihovně Ústavu Imunologie, Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 7.5.2014

.....

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Martin Mozolík, Bc.
Název práce:	miRNA profilování u různých stádií aseptické osteolýzy
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Ústav Imunologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého Olomouc
Vedoucí práce:	Ing. Eva Kriegová, Dr.
Konzultanti:	Dr. Vladimír Beneš, Ph.D. Prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2014

Abstrakt:

Nahrazení poškozeného kloubu totální endoprotézou je jedna z nejčastějších ortopedických procedur. Dlouhodobé užívání implantátu je však limitováno vícerymi mechanizmy selhání, z kterých nejvýznamnější je v současnosti aseptická osteolýza. Mezi hlavní příčiny této patologie patří chronická, zánětlivá reakce na otěrové částice uvolňované z endoprotézy a zvýšení osteoklastogeneze a aktivity osteoklastů jako její následek. Tato práce je zaměřena na zjištění a porovnání expresních profilů vybraných miRNA u dvou skupin pacientů s totální endoprotézou kolenního kloubu, lišících se důvodem reoperace. U skupiny P1 byla tímto důvodem aseptická osteolýza a u skupiny C/TEP to byl jiný důvod. K zjištění a porovnání expresních profilů byla využita nová metoda Next Generation Sequencing, která se pro tuto aplikaci osvědčila. Z celkem identifikovaných 2593 různých miRNA a jejich prekurzorů ve všech vzorcích byl u 138 z nich zaznamenán statisticky významný rozdíl v míře exprese ($p \leq 0,05$) mezi skupinami C/TEP a P1, přičemž ve skupině P1 se v porovnání se skupinou C/TEP exprese zvýšila u 78 miRNA a snížila u 60 miRNA. Ve skupině P1 byly zjištěny i statisticky významné změny exprese u jiných miRNA, jejichž funkce v procesech aseptické osteolýzy ještě není známá a jako potencionální diagnostické markery nebo terapeutické cíle by měly být předmětem dalšího studia.

Klíčová slova:	miRNA exprese, Next Generation Sequencing, aseptická osteolýza, totální kloubní náhrada, kloub
----------------	--

Počet stran:	88
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Martin Mozolík, Bc.
Title:	miRNA profiling at various stages of aseptic osteolysis.
Type of thesis:	Diploma
Department:	Department of immunology, Faculty of medicine, Palacky University Olomouc, Czech Republic
Supervisor:	Ing. Eva Kriegová, Dr.
Supervisor-consultants:	Dr. Vladimír Beneš, Ph.D. Prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.
The year of presentation:	2014

Abstract:

One of the most common orthopedic procedures nowadays is total joint replacement surgery. However, numerous failure mechanisms limit the long-term success of the implant, where the aseptic osteolysis is currently the most frequent of them. Among the main causes of this pathology belong chronic inflammatory reaction caused by wear debris particles, which are continually released from the endoprosthesis and increase in osteoclastogenesis and activity of osteoclasts as its result. The aim of this study is to discover and compare the miRNA expression profiles in two groups of patients with total knee endoprosthesis, which differ in the purpose of reoperation. Patients in P1 group were reoperated due to aseptic osteolysis, whereas patients in C/TEP group were reoperated because of various other reasons. A new Next Generation Sequencing method was used to discover and compare the miRNA expression profiles, which proved itself competent for this application. We identified 2593 types of various miRNAs and their precursors, from which 138 of them had statistically significant difference in expression levels ($p \leq 0,05$) between groups C/TEP and P1. When compared to the group C/TEP, we found in the group P1 elevated expression in 78 miRNAs and decreased expression in 60 miRNAs. We also discovered another miRNAs in the group

P1, which had statistically significant differences in expression levels, but their function in the processes of aseptic osteolysis is still unknown and they should be subjects of further studies as a potential diagnostic markers or therapeutic targets.

Keywords: miRNA expression, Next Generation Sequencing, aseptic osteolysis, total joint replacement prosthesis, joint

Number of pages: 88

Language: Czech

Seznam použitých zkratk

ADAR	Adenosine deaminase acting on RNA (druh enzymů)
C/TEP	Skupina pacientů reoperovaných z jiných důvodů než je aseptická osteolýza
cDNA	komplementární DNA
ceRNA	competing endogenous RNA
c-fos/AP-1	protoonkogen, activator-protein 1 (transkripční faktor) ^(Chiu et.al., 1988)
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (nukleární enzym)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNMT1	DNA Methyl Transferase 1
dsRNA	dvouvláknová RNA (double stranded)
gDNA	genomická DNA
GTP	Guanozín trifosfát
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonát
IL	interleukin
IsomiR	sekvence miRNA, které pocházejí z jednoho genu, ale liší se v sekvenci díky RNA editaci
lncRNA	long non-coding RNA
MHC	Major Histocompatibility Complex (hlavní histokompatibilní komplex)

miRNA, miR	mikro RNA
mmHg	milimetry rtuťového sloupce
mRNA	mediátorová RNA
MWIR	Mammal wide interspersed repeat (druh repetitivní DNA)
NF-κB	Nuclear factor kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NGS	Next Generation Sequencing
NLR	NOD-like receptor
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
P1	Skupina pacientů reoperovaných z důvodu aseptické osteolýzy
pre-miRNA	prekurzor miRNA (přibližně 80 nukleotidů)
pri-miRNA	primary miRNA (několik set nukleotidů dlouhý prekurzor)
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
RANK	Receptor activator of NF-κB
RANKL	Receptor activator of NF-κB ligand
RIN	RNA Integrity Number (skóre kvality RNA vzorku)
RISC	RNA-induced silencing complex (také označován miRNP) (protein umožňující interakci miRNA s cílovou mRNA)
RNA	Ribonukleová kyselina
RNAa	Small RNA-induced gene activation
SBS	Sequencing by synthesis
SNP	[snip], single nucleotide polymorphism (záměna jednoho nukleotidu za jiný v sekvenci DNA)
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
TAE pufr	Tris/acetát/EDTA pufr
TAE pufr	tris-acetát EDTA pufr, pH 8,3
TBE pufr	Tris/borát/EDTA pufr
TE pufr	Tris/EDTA pufr
TLR	Toll-like receptor
TNFα	Tumour necrosis factor alpha
UHMWPE	Ultra-high molecular weight polyetylene (ultravysokomolekulární polyetylen)
USD	United States Dollar
UTR	Untranslated region (nepřekládaná oblast u mRNA)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	11
3. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1. KLOUB	12
3.1.1 Typy kloubů	12
3.2. PATOLOGIE KLOUBŮ	13
3.2.1 Osteoartritida	13
3.2.2 Revmatoidní artritida	13
3.2.3 Další onemocnění kloubů	14
3.3. UMĚLÁ KLOUBNÍ NÁHRADA	14
3.3.1 Možnosti fixace kloubní protézy	15
3.4. ASEPTICKÁ PERIPROSTETICKÁ OSTEOLÝZA	16
3.4.1 Vliv otěrových částic na periprostetickou osteolýzu	16
3.4.2 Vliv ostatních posuzovaných faktorů	18
3.4.3 Role jednotlivých buněk účastnících se v procesu aseptické periprostetické osteolýzy	19
3.5. ÚLOHA MIRNA PŘI ASEPTICKÉ PERIPROSTETICKÉ OSTEOLÝZE	20
3.5.1 Struktura a funkce miRNA	20
3.5.2 Biogeneze miRNA	21
3.5.2.1 Transkripce miRNA	22
3.5.2.2 Procesy biogeneze miRNA v jádře	22
3.5.2.3 Export z jádra	23
3.5.2.4 Procesy v cytoplazmě	23
3.5.3 Známé miRNA uplatňující se v patogenezi kloubů	24
3.6. SEKVENOVÁNÍ DALŠÍ GENERACE (NGS)	26
3.6.1 NGS jako univerzální biologický nástroj	26
3.6.1.1 Limitace NGS	27
3.6.2 Workflow	28
3.6.2.1 Příprava knihoven	28

3.6.2.2 Klonální amplifikace versus jednomolekulární templáty	29
3.6.2.3 Sekvenační reakce	30
3.6.2.4 Single read, paired-end read a mate-pair end sekvenování	31
3.6.2.5 Analýza dat	31
3.6.3 Princip	32
3.6.3.1 Illumina	33
3.6.3.2 Roche 454	35
3.6.3.3 Ion Torrent.....	35
3.6.3.4 SOLiD	35
3.6.3.5 PACBIO.....	36
3.6.3.6 Helicos	36
3.6.3.7 GridION	36
3.6.4 Využití NGS u profilování miRNA exprese	37
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1. MATERIÁL A METODY	38
4.1.1 Úvod.....	38
4.1.2 Studovaná skupina.....	39
4.1.3 Izolace RNA z periprostetické tkáně.....	41
4.1.3.1 Změření kvality a kvantity izolované RNA.....	44
4.1.4 Příprava miRNA knihovny pro NGS	46
4.1.4.1 Ligace 3' SR adaptéru.....	47
4.1.4.2 Hybridizace reverzního transkripčního primeru	47
4.1.4.3 Ligace 5' SR adaptéru	48
4.1.4.4 Reverzní transkripce	48
4.1.4.5 PCR amplifikace	48
4.1.4.6 Změření koncentrace připravených cDNA knihoven	49
4.1.4.7 Selektce podle velikosti na 4% agarozovém gelu	50
4.1.4.8 Separace a extrakce knihoven z gelu	51
4.1.4.9 Finální kontrola a kvantifikace knihoven	53
4.1.5 Úpravy knihoven před sekvenováním	54

4.1.5.1 Denaturace a ředění	54
4.1.5.2 PhiX Spike-In	55
4.1.5.3 cBot.....	55
4.1.6 Sekvenování	56
4.1.7 Zpracování a úprava sekvenačních dat.....	56
4.2. VÝSLEDKY	56
4.2.1 Změření kvality a kvantity izolované RNA.....	56
4.2.2 Kvantifikace připravených knihoven	58
4.2.3 Extrakce knihoven z gelu, jejich finální kontrola a kvantifikace.....	59
4.2.4 Sekvenování	60
4.2.5 Vyhodnocení sekvenačních dat.....	63
5. DISKUZE	69
5.1. VLIV MIRNA REGULACE NA ASEPTICKOU OSTEOLÝZU	69
5.2. VYUŽITÍ NGS PRO MIRNA PROFILOVÁNÍ.....	70
5.3. PŘÍNOS TÉTO PRÁCE.....	70
5.4. BUDOUCÍ VÝZKUM.....	72
6. ZÁVĚR	72
7. ABECEDNÍ SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	73

1. Úvod

Pohyb je pro člověka základní a přirozenou potřebou. Stabilita, ohebnost a pohyb jsou nenahraditelné funkce, které jsou zajištěny naším pohybovým aparátem – kostmi, svaly a klouby. V případě zhoršení či dokonce ztráty jejich funkce dochází k prudkému poklesu kvality života. Právě poruchy kloubů a kostí jsou dnes velice častými příčinami akutních i chronických zdravotních těžkostí, kterým se věnuje současná medicína. Jejich incidence stoupá a předpokládá se, že tento trend bude pokračovat i v budoucnosti.

Jedním z těchto ortopedických problémů je i aseptická osteolýza, která je častou komplikací po implantaci umělé kloubní náhrady – totální endoprotézy kloubu. Jedná se o aktivní

resorpci kostní tkáně následkem sterilního zánětu, který je vyvolán mechanickým drážděním buněk prostřednictvím částic vzniklých opotřebením kloubní náhrady.

Jedná se o závažný problém, protože tato komplikace obvykle v poměrně krátkém čase vyústí do chronicky bolestivého stavu a selhání kloubní náhrady následkem jejího uvolnění z kosti či jiné, související příčiny. Kromě značného snížení kvality života pacienta nejen po dobu reoperace a rekonvalescence je problémem i finanční náročnost této operace – náklady na jediný zákrok se obvykle pohybují v rozmezí 60 – 130 tisíc Kč a tedy představují značnou finanční zátěž, přičemž reoperace je zhruba 1,5 až 3× dražší.

Nedávným vědeckým výzkumem bylo zjištěno, že různí pacienti reagují na přítomnost a opotřebením kloubní náhrady různě. Po aktivaci vrozené imunity u některých pacientů zánětlivá reakce pokračuje až do selhání kloubní náhrady, kdežto u jiných pacientů jejich imunitní reakce dosáhne jistého rovnovážného stavu, který nevyústí v akutní selhání. Je logické se domnívat, že za rozdílností daných pozorovaných jevů stojí individuální genetické predispozice jednotlivých pacientů, které mají vliv na jejich imunitní systém a tedy i na odpověď pacientů na chronické mechanické dráždění tkání produkty opotřebením kloubní náhrady. Daná problematika je nejen vzhledem k své incidenci a finanční náročnosti předmětem intenzivního výzkumu, ke kterému by tato práce mohla přispět.

2. Cíl diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit a porovnat expresní profily vybraných miRNA u dvou skupin pacientů s totální endoprotézou kolenního kloubu, lišících se důvodem reoperace za využití technologie Next Generation Sequencing. Pacienti ve skupině P1 byli nuceni podstoupit reoperaci z důvodu aseptického uvolnění kloubní náhrady následkem aseptické osteolýzy, kdežto pacienti ze skupiny C/TEP podstoupili reoperaci z jiných důvodů než je aseptické uvolnění. Díky tomu, že metody Next Generation Sequencing umožňují náhled na celý transkriptom krátkých RNA v studované tkáni, součástí tohoto cíle byla i možná identifikace nových miRNA jakožto potenciálních diagnostických markerů či terapeutických cílů na základě statisticky významné odlišné míry exprese, které by se mohly podílet na procesu aseptické osteolýzy.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Kloub

Kloub je strukturálně a funkčně definován jako místo, kterým jsou spojeny dvě kosti za účelem umožnění pohybu částí těla. Způsob, jakým jsou kosti navzájem spojeny, určuje rozdělení podle struktury, kdežto rozdělení podle funkce je určeno na základě typu pohybu umožněného daným kloubem. V praxi se obě rozdělení významně překrývají. Kloubní plošky se všeobecně považují za malý kloub, obzvlášť při posuzování kloubů žeber. ^(Gray et. al., 2005).

3.1.1 Typy kloubů

Klasifikace podle struktury dělí klouby na tři skupiny podle typu pojivové tkáně, která spojuje sousední kosti:

- Vazivový kloub – kosti jsou spojeny hustou, vazivovou tkání, která je bohatá na kolagen.
- Chrupavkovitý kloub – kosti jsou spojeny pomocí chrupavky.
- Synoviální kloub – kosti nejsou spojeny přímo, ale mají mezi sebou synoviální kavitu, která je vystlaná synoviální tkání, které produkuje synoviální tekutinu (synovium – kloubní výstelka, maz). Kostí drží spolu pomocí husté, nepravidelné vazivové tkáně, kloubního pouzdra, které uzavírá kloub a je obvykle spojeno se šlachami. ^(Tortora, Derrickson, 2009)

Podle funkce může kloub být:

- Synartróza – dovoluje minimální nebo žádný pohyb. Mezi tento typ kloubů patří například lebeční švy.
- Amfiartróza – málo pohyblivý kloub. Většina těchto kloubů je chrupavkovitých a do této skupiny patří například meziobratlové ploténky.
- Diartróza – volně pohyblivý kloub. Všechny diartrotické klouby jsou synoviální klouby a tato označení si jsou rovnocenná. ^(Čihák, 2001)

3.2. Patologie kloubů

Klouby patří mezi vysoce zatěžované části lidského těla a jejich extenzivní opotřebení není zřídka. Jako i jiné tkáně lidského těla, mohou být napadeny bakteriemi, patologicky zacíleny imunitním systémem nebo trvale poškozeny od narození důsledkem geneticky podmíněné vývojové vady.^(Gardner, 1994)

3.2.1 Osteoartritida

Osteoartritida, známá také pod názvy artróza či osteoartróza, je nejčastěji se vyskytující onemocnění kloubů, které způsobuje postupnou degradaci chrupavky a kostí v kloubech.^(Umile et.al., 2012) Toto onemocnění se projevuje bolestí a křehkostí kloubů, sníženou pohyblivostí a v některých případech výrony. Příčina této nemoci není zatím přesně určena, předpokládá se vliv vícero faktorů, jako například genetická predispozice, věk, životní styl, nadváha, míra zátěže postiženého kloubu či následek úrazu. Vlivem zvýšeného působení prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, TNF α aj.) je inhibována obnova chrupavky a dochází ke zvýšení exprese genů pro destrukční enzymy ze skupiny metaloproteináz (například stromelysin, kolagenáza, plasmin), které odbourávají makromolekulární síť extracelulární matrix (mezibuněčné hmoty chrupavky). V počátečních stádiích je tento děj kompenzován zvýšenou tvorbou agrekanu s vyšším obsahem chondroitin sulfátu. Po vyčerpání kompenzačního mechanismu se destrukce chrupavky klinicky projeví bolestivostí a zánětem, který postihuje okolní tkáň jako například kloubní pouzdro a subchondrální kost (přilehlou k chrupavce). Postižená kost reaguje na vzniklou situaci svojí přestavbou, časem se na ní objeví výrůstky zvané osteofyty, které daný stav dále komplikují. Postupem onemocnění se bolest stává nesnesitelnou a pro výraznější zlepšení kvality života pacienta se obvykle využívá voperování umělé kloubní náhrady.^(Dougados et.al., 1996)

3.2.2 Revmatoidní artritida

Další časté onemocnění kloubů je autoimunitní revmatoidní artritida, chronická, systémová, zánětlivá porucha, která nejvíc postihuje synoviální klouby a může vést až k úplné ztrátě jejich funkce.^(Braun, Zwerina, 2011) Postihuje hlavně starší pacienty. Příčiny

revmatoidní artritidy nejsou kompletně známy, ale předpokládá se, že minimálně polovina rizika je genetického původu.^(Scott, Wolfe, Huizinga, 2010) U tohoto onemocnění byla zjištěna silná korelace s typem MHC antigenu HLA-DR4 (DR0401 a 0404) a geny PTPN22 a PADI4.^{Goeldner et.al., 2010)} Pokud je pacient nositelem genu PTPN22, jeho riziko je dvojnásobné oproti průměru. Vlastnictví genu PADI4 zvyšuje riziko revmatoidní artritidy jen u lidí asijského původu.^(Plenge et.al., 2007) Mezi nejvýznamnější negenetické riziko patří kouření, revmatoidní artritida se vyskytuje třikrát častěji u kuřáků v porovnání s nekuřáky.^(Sugiyama et.al., 2009) Epidemiologické studie potvrdily možný vliv Epstein-Barr viru a lidského Herpes viru 6 na toto onemocnění.^(Alvarez-Lafuente et.al., 2005) Dalším společným znakem u pacientů s revmatoidní artritidou je nedostatek vitamínu D, ale ještě nebyl prokázán jeho konkrétní vliv na prevenci nebo průběh onemocnění.^(Wen, Baker, 2011)

3.2.3 Další onemocnění kloubů

Mezi další poměrně časté onemocnění kloubů patří i ankylozující spondylitida (Bechtěrevova choroba), která se projevuje chronickým zánětem především páteřních obratlů a může postihovat až 1% populace, přičemž častěji postihuje muže než ženy. Její příčina rovněž není přesně identifikována. Byla však zjištěna souvislost mezi výskytem nemoci a přítomností antigenu HLA-B27.^(Dixon, 1978)

V neposlední řadě jsou klouby postihovány i infekčními chorobami, jako například hnisavá artritida, Lymfská borelióza či následek TBC u dětí.^(Shirliff, Mader, 2002) Mezi metabolické poruchy postihující klouby patří dna (Krystalové artropatie) jako následek hyperurikemie, zřidkavější chondrokalcinóza (pseudodna), kdy se v kloubech usazují depozice krystalů kalciových solí, převážně pyrofosfátu hydroxyapatitu a ochronóza, při které se kyselina homogentisová a její deriváty usazují v podobě černého pigmentu do kloubních chrupavek, vazů a šlach.^(Hart, 1969)

3.3. Umělá kloubní náhrada

Kloubní protézy jsou mechanické, zdravotnické aparáty sestavené pro celkovou nebo částečnou náhradu synoviálních kloubů, které byly poškozeny úrazem, degenerativním onemocněním nebo vrozenou vadou, navrženy za účelem obnovy jejich původní funkce. Dnes jsou na trhu umělé kloubní náhrady pro všechny synoviální klouby v lidském těle.

Celosvětově jsou nejčastěji transplantovány klouby kolenní (zhruba 1 500 000 ročně) a kyčelní (zhruba 1 000 000 ročně). ^(Kurtz et.al., 2011) Méně často jsou nahrazovány klouby ramenní, kotníkové, loketní, zápěstní a klouby prstů.

Dnešní populace stárne a zůstává déle fyzicky aktivní, implantáty pro kloubní artroplastiky proto musí snést vyšší zátěž po delší dobu, což klade zvýšené nároky na použité materiály i na technologie výroby. Obvyklé materiály využívané pro výrobu kloubních protéz jsou kovové slitiny medicínální kvality, biokeramika nebo polyetylen různé hustoty. V současnosti je nejvíc využívaným druhem polyetylenu ultravysokomolekulární polyetylen (UHMWPE). Nejčastěji používané kovy pro výrobu umělých kloubních náhrad jsou titan, kobalt, chrom, vanad, molybden a chirurgická ocel. ^(Semlitsch, Willert, 1980)

3.3.1 Možnosti fixace kloubní protézy

Součásti kloubní protézy mohou být připevněny přímo do kosti (bez kostního cementu) nebo s pomocí speciálního kostního cementu na bázi akrylátů, aplikovaného mezi předpřipravenou kost a součást protézy. Obě možnosti mají své specifické výhody i nevýhody. Zvolení konkrétního způsobu fixace je na chirurgovi provádějícím operaci, který se rozhoduje na základě vícero parametrů, jako jsou věk pacienta, očekávaná úroveň jeho aktivity nebo kvality kostní tkáně. Při fixaci bez použití kostního cementu se využívají komponenty, které přesně pasují do kostí, které tvoří kloub. Tato technika si vyžaduje maximum chirurgické preciznosti v přípravě místa v kostech pro dostatečnou stabilitu implantátu, která je základní podmínkou pro dosažení úspěšné integrace implantátu s kostí pacienta. Úspěšná integrace se projeví vytvořením nové kostní tkáně kolem celé komponenty, jako i na jejím pórovitém povrchu. Tato možnost se využívá především u relativně mladých pacientů s biologicky aktivní kostní strukturou, která je dostatečně schopná poskytnout podmínky vhodné k integraci implantátu. ^(Willert, 1993)

U cementovaných kloubních náhrad je fixace dosažena vyplněním prostoru mezi protézou a kostí kostním cementem na bázi akrylátů. Tato technika zaručuje okamžitou stabilitu implantovaných komponentů a jejich dokonalé usazení v kosti, bez ohledu na sníženou kvalitu kostní tkáně, například vlivem osteoporózy. Nevýhodou kostního cementu je exotermická polymerizační reakce, a tedy riziko nekrózy buněk pacienta, které jsou s kostním cementem v kontaktu, což výrazně zvyšuje riziko zánětlivé reakce. Také se může vytvořit alergická reakce na některou ze složek kostního cementu. Fixace s pomocí kostního cementu se využívá hlavně u starších pacientů, u kterých se předpokládá snížená kvalita

kostní tkáň a také u pacientů, jejichž struktura kosti je nevhodná pro bezcementní fixaci.^(Arora et.al., 2013)

3.4. Aseptická periprostetická osteolýza

Aseptická periprostetická osteolýza je jednou z hlavních příčin revizních operací u pacientů s umělou kloubní náhradou. Pokud není včas odhalena a léčena, osteolýza může vyústit v aseptické uvolnění kloubního implantátu z kosti. Riziko periprostetické osteolýzy u konkrétního pacienta je určeno vícerymi faktory, jako jsou věk, pohlaví, tělesná hmotnost či genetické predispozice. Ačkoliv postupný vývoj materiálů a dizajnu implantátů snížil výskyt této komplikace, žádný v současnosti známý dizajn nedokáže napodobit charakteristiky původního kloubu do té míry, aby se opotřebením neuvolňovaly otěrové částice. Předpokládá se, že zánětlivá reakce imunitního systému pacienta na tyto částice a následné komplikace jsou hlavními příčinami aseptické osteolýzy.^(Alidousti, Taylor, Bressloff, 2014)

Periprostetickou osteolýzu je velice náročné odhalit pomocí běžného rentgenového snímkování, proto je pro spolehlivou diagnostifikaci potřeba použít pokročilé zobrazovací metody, jakými jsou například vyšetření ultrazvukem, počítačová tomografie, magnetická rezonance nebo pozitronová emisní tomografie.^(Sofka et.al., 2006) Farmakologická či biologická intervence se jeví jako vhodná možnost lékařského zásahu, ale zatím se na trhu nenachází žádný preparát, který by zajišťoval prevenci nebo inhibici periprostetické osteolýzy, ačkoliv jsou takovéto preparáty intenzivně vyvíjeny.^(Tarmo, Shanbhag, Rubash, 2006) Vzhledem ke klesajícím rizikům se může zdát, že incidence periprostetické osteolýzy klesá díky pokrokům v oblasti dizajnu implantátů a zvyšujícím se znalostem o biologických procesech při osteolýze, ale prudký nárůst celkového počtu totálních artroplastik v posledních dvou dekádách výrazně zvyšuje potřebu lepších možností detekce a léčby periprostetické osteolýzy.^(Beck, Illingworth, Saleh, 2012)

3.4.1 Vliv otěrových částic na periprostetickou osteolýzu

Otěrové částice uvolněné smykovým třením z totální endoprotézy mají významnou úlohu u periprostetické osteolýzy. Jejich velikost se může pohybovat od jednotlivých atomů či molekul po částice větší než 10 μm . Uvolňují se kontinuálně používáním kloubu a byly nalezeny i mimo místa vzniku, například i na špičce stehenního implantátu, který je usazen

hluboko ve stehenní kosti. Při každém kroku může být vyprodukováno až 150 000 otěrových částic a za předpokladu, že člověk ujde zhruba milion kroků ročně, celkově může být ročně vyprodukováno až $1,5 \times 10^{11}$ částic, což představuje značnou zátěž pro organismus.^(Dowson, 2000) Mechanizmy a faktory, způsobující či podílející se na migraci částic z místa vzniku do periprostetické tkáně, ještě nejsou kompletně známy. Například otěrové částice mohou být transportovány kloubními tekutinami přes meziplošné mezery. Je také pravděpodobné, že pravidelné změny tlaku kapalin v kloubu, jako i mikropohyby samotného implantátu vznikající cyklickým zatížením například při chůzi, mohou přispívat k migraci otěrových částic a následně k osteolýze. Na potvrzení této hypotézy byly využity počítačové simulace dynamiky kapalin v prostředí mezi stehenní kostí a stehenním implantátem s fixací bez kostního cementu. Bylo zjištěno, že otěrové částice jsou distribuovány po celé délce mezery mezi stehenní kostí a stehenním implantátem. Nejvyšší koncentrace částic byla na horním a dolním konci této mezery, přičemž distribuci umožňovaly spíše změny tlaku kapalin uvnitř této mezery, než její samotný mikropohyb.^(Alidousti, Taylor, Bressloff, 2014)

Nejpodstatnějším vlivem otěrových částic je indukce chronické zánětlivé reakce v periprostetické tkáni, která vede k urychlení destrukce periprostetické kostní hmoty a k inhibici její regenerace. Ty nejmenší částice jsou rychle rozpuštěny v kloubních tekutinách a velmi často se shlukují se sérovými proteiny. Částice do velikosti 300 nm v průměru mohou být pinocytovány, což nevyústí v aktivaci imunitních buněk. Částice do velikosti 10 μ m mohou být fagocytovány, což už vede k aktivaci imunitních buněk, ke které však může dojít i bez fagocytózy, obzvlášť pokud jsou částice navázány na sérové proteiny.^(Sun et.al., 2003) Takovéto komplexy proteinů a otěrových částic interagují s receptory vrozené imunity na povrchu všech buněk, které následně spouští signalizační kaskádu zánětu, která je dále stimulována autokrinními a parakrinními procesy, které jsou důsledkem uvolnění prozánětlivých faktorů, stimulací toll-like receptorů a příslušných signalizačních kaskád.^(Tamaki et.al., 2009) Pokud jsou v okolí kloubu přítomny komplexy otěrových částic s endotoxiny, zánětlivá reakce je ještě mnohem intenzivnější.^(Greenfield, Bechtold, 2008) Relativní míra vlivu otěrových částic, endotoxinů, mechanických sil a ostatních faktorů na osteolýzu je kontroverzní, takže nejlepším řešením je považovat tyto faktory za spolupůsobící a ne za jednotlivé příčiny.^(Aspenberg, van der Vis, 1998)

Specifická biologická reakce organismu je závislá na typu, množství a charakteristice otěrových částic, jako i na individuální genetické výbavě daného pacienta. Na zvířecích modelech bylo zjištěno, že biologická reakce na otěrové částice je i systémová a nikoliv jen lokální.^(Goodman, Gibon, Yao, 2013) Po stimulaci otěrovými částicemi buňky z linie monocytů/makrofágů, polymorfonukleární leukocyty, fibroblasty a ostatní buňky zvyšují transkripci prozánětlivých látek, včetně cytokinů, chemokinů, reaktivních forem kyslíku

a dusíku, prostaglandinů, metaloproteináz, lysozomálních enzymů a ostatních mediátorů zánětu.^(Catelas, Jacobs, 2010) Tyto zánětlivé mediátory jsou pod přímou transkripční kontrolou NF- κ B, nukleárního faktoru interleukinu 6, TNF α a jiných.^(Nakashima et.al., 1999) Částice z organických polymerů nebo keramiky obvykle vyvolávají nespecifickou a neimunní reakci, avšak některé částice a ionty kovů mohou u některých pacientů vyvolat benigní pseudotumor následkem lokální fibrózy nebo antigen dependentní imunitní reakci typu IV, zprostředkovanou T-lymfocyty, pravděpodobně díky interakci s proteiny v kloubních tekutinách, které antigen-prezentující buňky imunity rozeznají jako cizí a prezentují je dál. Takováto reakce vede k silné bolesti a k značné destrukci kostní i periprostetické tkáně.^(Willert et.al., 2005) Kromě aktivace vrozené imunity pomocí toll-like receptorů na povrchu buněk, některé typy otěrových částic (obzvláště částic kovů) mohou aktivovat i inflamazom (cytoplazmatický komplex rozpoznávacích proteinů, nucleotide oligomerisation domain (NOD)-like receptorů (NLRs), v němž dochází k aktivaci zánětu). Tyto části se sestaví do komplexní multimolekulární struktury, která se nazývá Nucleotide-binding oligomerisation domain, leucine-rich repeat and pyrin domain-containing (NLRP). Tato struktura následně aktivuje kaskádu kaspázy 1, což vede k produkci a aktivaci prozánětlivých faktorů z jejich prekurzorů, hlavně IL-1 a IL-18.^(Caicedo et.al., 2009)

3.4.2 Vliv ostatních posuzovaných faktorů

Mezi důležité faktory, které mají vliv na periprostetickou osteolýzu, patří i dlouhodobá aktivita pacienta.^(Gallo et.al., 2013) Ukázalo se, že mezera vytvořená mezi kostí a implantátem v ní vsazeným může fungovat jako membránová pumpa pro částicemi nasycené tekutiny v kloubu.^(Alidousti, Taylor, Bressloff, 2011) Následné cyklické změny tlaku mohou vést k odbourání kostní hmoty, a to hlavně z dutin kolem tlakem namáhaných míst.^(Fahlgren et.al., 2010) Tlak kapaliny kolem uvolněné kyčelní protézy je zvýšený i bez aktivního pohybu pacienta a dosahuje hodnot 3 až 280 mmHg v závislosti od pozice.^(Robertsson et.al., 1997) Při provádění různých mechanických manévrů, jakými jsou například chůze nebo vstávání ze židle, může tlak této kapaliny vzrůst až na 155 až 776 mmHg u pacientů s kyčelní náhradou.^(Hendrix et.al., 1983) Bylo také zjištěno, že i stálý, zvýšený tlak kapaliny na kost může zapříčinit zpomalení tvorby kostní hmoty a dokonce i její odbourání.^(Hu, Wang, Zhang, 2010) Například u ortodontických pohybů zubů mohou být osteoklasty aktivovány už při tlacích 30 až 390 mmHg.^(Sato et.al., 1998) Vliv na aseptickou osteolýzu má i pooperační zatížení kostí vlivem umělého kloubu, které je odlišné od původního zatížení s fyziologickým kloubem. V kosti vznikají místa, která jsou zatížena mnohem větším nebo menším tlakem než byla původně, což v obou případech

vede k odbourávání kostní hmoty. Pooperační zatížení také výrazně snižuje mechanickou stabilitu zajištěnou fixací při totální artroplastice.^(Bellini et.al., 2007)

3.4.3 Role jednotlivých buněk účastnících se v procesu aseptické periprostetické osteolýzy

Lokální biologická reakce na přítomnost velkého množství otěrových částic vede ke zhoršení stavu lokální tkáně nebo k deregulaci procesů v něm, při čem hraje imunitní systém klíčovou roli. Makrofágy byly a jsou už tradičně ve středu zájmu při studiu biologie otěrových částic. Avšak výsledky vícerých pozorování rozšířily rozsah biologické odpovědi. V tkáních získaných při revizních operacích umělých kloubů je obvykle nalezeno vícero typů buněk, které mají svou úlohu v chronické zánětlivé reakci. Mezi těmito buňkami jsou nejčastěji buňky z linie monocytů / makrofágů (makrofágy, obří buňky cizího tělesa a osteoklasty), fibroblasty, lymfocyty a buňky tvořící vaskulární struktury. Histologické důkazy také potvrzují aktivní remodelaci přilehlého kostního lůžka, včetně přítomnosti osteoprogenitorních buněk a osteoblastů. Bylo zjištěno, že mezi periprostetickou tkání a přiléhající kostí může nastat i výrazná aktivní tvorba nové kostní tkáně, což ukazuje, že může dojít i k reparaci kosti.^(Kadoya et.al., 1996) Tyto nálezy jsou shodné s chronickou zánětlivou reakcí, u které můžeme pozorovat probíhající akutní zánětlivou reakci, destrukci lokální tkáně, fibrózu a aktivní obnovu. Velice zajímavým zjištěním je, že schopnost fagocytózy otěrových částic mají i jiné typy buněk než ty z linie monocytů / makrofágů, včetně fibroblastů a osteoblastů.^(Fujii et.al., 2011)

V reakci na otěrové částice, vzájemná signalizace mezi makrofágy, fibroblasty, osteoblasty a jejich progenitory a ostatními buňkami vede k produkci prozánětlivých faktorů, které působí autokrinně a parakrinně. Vlivem těchto faktorů se zvyšuje diferenciací, maturace a funkce osteoklastů, což vede k lokální destrukci kostní tkáně. Nejvýznamnější prozánětlivé faktory v těchto procesech jsou $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8, receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) a chemotaktický protein makrofágů 1.^(Kaufman et.al., 2008) Početné studie *in vitro*, *in vivo* a studie na vyoperovaných tkáních dokázaly, že otěrové částice vyvolávají a stimulují akutní a chronický zánět, jako i následnou osteolýzu.^(Tuan et.al., 2008) Nedávné studie potvrdily, že tkáně získané z okolí asepticky uvolněných totálních endoprotéz vykazují nerovnováhu v signální kaskádě RANKL-RANK, což favorizuje resorpci kostí.^(Mandelin et.al., 2003)

3.5. Úloha miRNA při aseptické periprostetické osteolýze

Hlavním znakem osteolýzy je úbytek kostní tkáně především činností osteoklastů. Osteoklastogeneze je regulována vícerými faktory, kterými jsou například cytokiny, faktory mikroprostředí a infiltrace monocytů.^(Ingham et.al., 2000) Víceré studie potvrdily, že signální kaskáda RANKL-RANK má klíčovou roli při diferenciaci osteoklastů z aktivovaných monocytů / makrofágů.^(Ren et.al., 2006) Avšak detaily regulačních mechanismů signální dráhy RANKL dosud nebyly dostatečně prozkoumány. Při nedávném výzkumu osteoklastogeneze bylo zjištěno, že v signální dráze RANKL-RANK mohou mikroRNA sloužit jako důležité regulátory při diferenciaci osteoklastů. Ukázalo se, že mikroRNA-21 (miR-21) podporuje diferenciaci prostřednictvím zvýšení transkripce transkripčního faktoru c-fos/AP-1, který ovlivňuje geny související s procesem osteoklastogeneze.^(Zhou, Liu, Cheng, 2012) Tato zjištění nasvědčují, že miR-21 může být využita jako terapeutický cíl pro onemocnění spojené s osteolýzou, včetně aseptické periprostetické osteolýzy.^(Sugatani, Vacher, Hruska, 2011) Na základě současných poznatků, je velice pravděpodobné, že v procesu osteolýzy může být zapojeno kromě miR-21 i mnoho dalších typů miRNA. Výzkum v dané oblasti je teprve v počátcích a k pochopení celkového obrazu vlivu miRNA na periprostetickou osteolýzu bude potřeba ještě mnoho studií, ke kterým by tato práce mohla přispět.

3.5.1 Struktura a funkce miRNA

MikroRNA jsou malé, nekódující molekuly RNA a jejich nejčastěji se vyskytující délka je 22 nukleotidů,^(Lind, Ohashi, 2014) ačkoli byly objeveny miRNA o délkách od 21 do 25 nukleotidů.^(Sun et.al., 2009) Nacházejí se v buňkách rostlin, živočichů a některých virů, kde mají vliv na transkripční a post-transkripční regulaci genové exprese.^(Chen, Rajewsky, 2007) MiRNA jsou kódovány eukaryotickou DNA u rostlin a živočichů a virální DNA u některých DNA virů. Funkce miRNA v regulaci genové exprese spočívá v nekovalentní vazbě na komplementární sekvence mediátorové RNA (mRNA) na základě komplementarity bází. Výsledkem je umlčení těchto mRNA, protože už nemohou být dále využity v syntéze proteinů. Takovéto dvouvláknové RNA (dsRNA) jsou často aktivně štěpeny pomocí endonukleáz v cytosolu.^(Kusenda et.al., 2009) V lidském genomu je ke dni 9.4.2014 evidováno 2578 aktivních miRNA molekul a 1872 miRNA prekurzorů^(Browse miRBase by species; Griffiths-Jones, 2004), vyskytují se

v nezanedbatelných počtech ve většině typů buněk lidského těla a předpokládá se, že u lidí mohou miRNA ovlivňovat expresi až u víc než 60% genů kódujících proteiny.^(Friedman et.al., 2008) Soubor všech exprimovaných molekul miRNA v jistém souboru buněk, jisté tkáni či organismu v určitém čase za určitých podmínek se nazývá mikroRNom.

U eukaryot jsou miRNA velmi dobře evolučně konzervovány a má se za to, že jsou životně důležitou a fylogeneticky starou komponentou regulace genové exprese.^(Lee, Risom, Strauss, 2007) Zatímco hlavní složky miRNA regulační dráhy jsou stejné u rostlin i živočichů, zdá se, že se soubory miRNA u těchto dvou říší vyvíjely osobitně, spolu s odlišným modelem funkce.^(Shabalina, Koonin, 2008) Živočišné miRNA jsou obvykle komplementární k sekvenci v 3' UTR, kdežto rostlinné miRNA jsou obvykle komplementární k exonům.^(Wang et.al., 2004) Rostlinné miRNA jsou obvykle dokonale nebo téměř dokonale komplementární k jejich cílovým mRNA a vyvolávají represi genové exprese skrz degradaci mRNA molekul.^(He, Hannon, 2004) Živočišné miRNA mají často jen částečnou komplementaritu k cílovým mRNA, jsou ale schopny rozeznat jejich cílové mRNA molekuly pouze na základě 6-8 nukleotidů v pozicích 2-7 na jejich 5' konci (tzv. „seed region“).^(Lewis et.al., 2003) Komplementarita v seed regionu ovšem musí být absolutní.^(Maziere, Enright, 2007) Částečná komplementarita obvykle neaktivuje rychlou degradaci mRNA molekul, ale inhibuje translaci proteinů^(Williams, 2008) a může i urychlit její deadenylaci, což má za následek její dřívější degradaci.^(Eulalio et.al., 2008) MiRNA regulace u živočichů umožňuje kombinatorickou regulaci, kde jedna molekula miRNA může mít vícero spolu nesouvisících mRNA cílů a exprese jedné molekuly mRNA může být regulována vícerymi spolu nesouvisejícími molekulami miRNA.^(Krek et.al., 2005) Bylo zjištěno, že miRNA může mít ojediněle vliv i na modifikaci histonů a DNA metylaci promoterů, což také ovlivní genovou expresi cílových genů.^(Hawkins, Morris, 2008) Dvouvláknová RNA může také aktivovat genovou expresi mechanismem nazvaným „Small RNA-induced gene activation“ (RNAa), kdy má dsRNA funkci promoteru.^(Place et.al., 2008) Interakce mezi miRNA a komplementárními sekvencemi genů a také pseudogenů, které sdílejí homologní sekvence, jsou považovány za zpětný kanál komunikace regulující míry exprese mezi paralogními geny. Tyto miRNA, které se váží na „miRNA response elements“ v genech a pseudogenech, byly pojmenovány jako Kompetitivní endogenní RNA (ceRNA) a jsou dalším vysvětlením pro perzistenci nekódující DNA.^(Salmena et.al., 2011)

3.5.2 Biogeneze miRNA

Molekuly miRNA jsou produkovány z jejich vlastních genů nebo z intronů jiných genů. Většina nalezených miRNA genů je z intergenních oblastí nebo jsou orientovány zrcadlově

(antisense) k sousedním genům, tudíž jsou považovány za samostatně se transkribující jednotky.^(Lagos-Quintana et.al., 2001) V některých případech jsou ale miRNA transkribovány spolu s cílovým genem. Tento mechanismus zajišťuje spřaženou regulaci miRNA i protein-kódujícího genu.^(Mraz et.al., 2012) Víceré studie odhalily, že až 40% všech známých miRNA může být kódováno v intronech proteiny kódujících i nekódujících genů a dokonce i v exonech nekódujících neproteinových transkriptů. Tyto miRNA jsou ve většině případů na kódujícím vlákně a tedy většinou regulovány spolu s geny, v nichž jsou kódovány.^(Rodriguez et.al., 2004) Ostatní miRNA geny mají typický promotor. Zhruba 42-48% všech miRNA pochází z polycistronických jednotek, které obsahují vícero oddělených slucek, ve kterých jsou kódovány aktivní miRNA.^(Altuvia et.al., 2005) Zhruba 6% všech známých lidských molekul miRNA vykazuje RNA editaci (tvorba IsomiRů), specifickou modifikaci RNA sekvencí za účelem vytvoření odlišných produktů z původní sekvence DNA. RNA editace zvyšuje diverzitu a dosah miRNA regulace za možnosti genomu.

3.5.2.1 Transkripce miRNA

Geny miRNA jsou obvykle transkribovány RNA polymerázou II.^(Zhou et.al., 2007) Polymeráza II se často váže na promotor, který se nachází blízko DNA sekvence kódující budoucí vlásenkovou smyčku pre-miRNA. Výsledný transkript je opatřen na 5' konci specificky modifikovaným nukleotidem, polyadenylován na 3' konci a následně sestřihán (splicing). Živočišné miRNA jsou nejprve transkribovány jako část jednoho ramena přibližně 80 nukleotidů dlouhé kmenové smyčky (pre-miRNA), která tvoří část několika set nukleotidů dlouhého miRNA prekursoru nazývaného „primary miRNA“ (pri-miRNA). Pokud se kmenová smyčka nachází v úseku 3' UTR, transkript může sloužit jako pri-miRNA i jako mRNA.^(Cai, Hagedorn, Cullen, 2004) Některé miRNA mohou být transkribovány i RNA polymerázou III, obzvláště ty, které jsou spojeny se sekvencemi Alu elementů, transferové RNA a promotory savčích široce rozptýlených repetitivních (MWIR).^(Faller, Guo, 2008)

3.5.2.2 Procesy biogeneze miRNA v jádře

Současné studie uvádějí, že jedna molekula pri-miRNA může obsahovat jeden až šest molekul pre-miRNA. Každá pre-miRNA sousedí se sekvencí potřebnou pro její správné zpracování. Dvouvláknová RNA struktura vlásenkové smyčky v molekule pri-miRNA je rozeznána jaderným proteinem známým jako „DiGeorge Syndrome Critical Region 8“ (DGCR8, „Pasha“ u bezobratlých). DGCR8 se sdružuje s RNA endonukleázou „Drosha“, čím vytvoří komplex „Mikroprocesor“.^(Gregory, Chendrimada, Shiekhattar, 2006) V tomto komplexu orientuje

DGCR8 katalytickou RNázovou doménu enzymu Drosha tak, aby uvolnila vlásenkové smyčky z pri-miRNA přibližně 11 nukleotidů od základny. Výsledný produkt má dvounukleotidový převis na 3' konci, který je zakončen hydroxylovou skupinou. Na 5' je fosfátová skupina. Ty molekuly pre-miRNA, které jsou vystřiženy přímo z intronů bez účasti komplexu Mikroprocesor, jsou známy jako „Mirtrony“ a byly nalezeny i u savců.^(Berezikov et.al., 2007) Molekuly pre-miRNA jsou z intronů získány linearizací pomocí „odvětovacího enzymu“ (Debranching enzyme).^(Kim et.al., 2000) Bylo zjištěno, že až 16% molekul pre-miRNA může být editováno mechanismem jaderné RNA editace.^(Winter et.al., 2009) Studie odhalily, že nejčastěji se vyskytující úpravou RNA u živočichů je záměna adeninu za inosin, kterou katalyzují enzymy známé jako „Adenosinové deaminázy působící na RNA“ (ADAR).^(Danecek et.al., 2012) RNA editace může zastavit úpravu molekul pre-miRNA v jádře a pozměnit následné procesy včetně úpravy miRNA v cytoplazmě či jejich specifity k miRNA cílům (například změnou nukleotidu v seed regionu).^(Kawahara et.al., 2008)

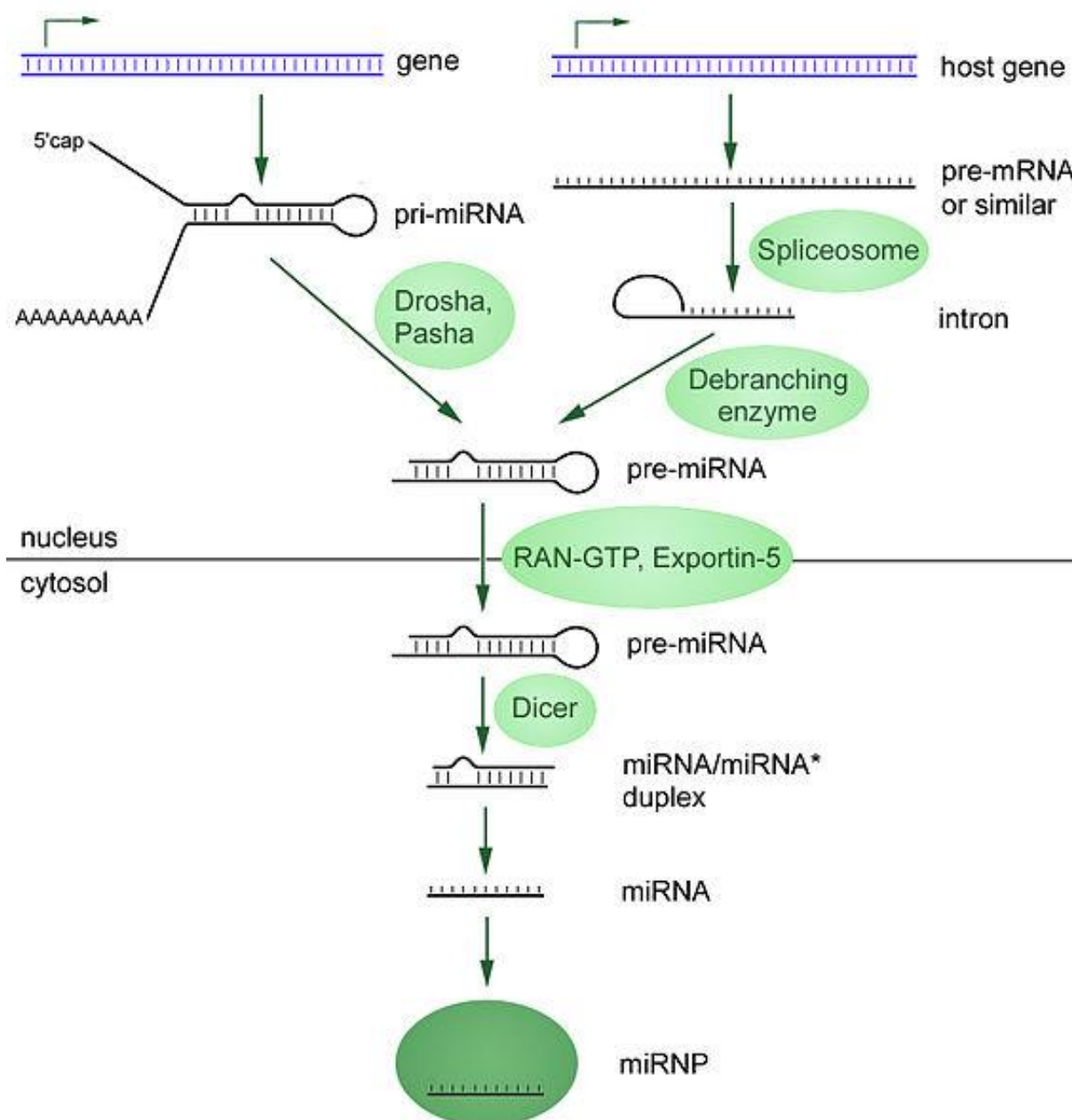
3.5.2.3 Export z jádra

Molekuly pre-miRNA jsou exportovány z jádra do cytoplazmy za účasti transportéru Exportin-5. Tento protein z rodiny karyoferinů rozeznává dvounukleotidový převis na 3' konci pre-miRNA. Transport do cytoplazmy je energeticky závislý na hydrolýze GTP, který se váže na Ran protein.^(Murchison, Hannon, 2004)

3.5.2.4 Procesy v cytoplazmě

Po exportu z jádra jsou molekuly pre-miRNA štěpeny Dicerem, enzymem z rodiny RNáz III. Tato endoribonukleáza interaguje s 3' koncem molekuly pre-miRNA a odštěpí slučku, která propojovala 3' a 5' konce za vytvoření nedokončeného miRNA:miRNA* duplexu, který je nejčastěji 22 nukleotidů dlouhý. Celková délka a velikost smyčky pre-miRNA molekuly ovlivňují efektivitu zpracování Dicerem, na kterou má vliv i nedokonalé párování na základě komplementarity nedokončeného duplexu miRNA:miRNA*. Ačkoli obě vlákna duplexu mohou potencionálně fungovat jako miRNA, obvykle je jen jedno vlákno inkorporováno do RNA-indukovaného umlčovacího komplexu (RISC), v kterém miRNA a cílová mRNA interagují.^(Lund, Dahlberg, 2006)

Celkový přehled biogeneze miRNA z genu či intronu až po aktivní komplex mi-RNA s proteiny (mi-RNP) je uveden na obrázku (Obr. 1).



Obr. 1: Celkový přehled biogeneze miRNA z genu či intronu až po aktivní komplex mi-RNA s proteiny (mi-RNP). ©Daniel Ramsköld.

3.5.3 Známé miRNA uplatňující se v patogenezi kloubů

Nedávný výzkum prokázal, že vícere mikroRNA mohou mít vliv na patogenezi kloubů, hlavně prostřednictvím vlivu na autoimunitní i fyziologickou imunitní reakci. Bylo například prokázáno, že snížená exprese miR-146a a miR-155 v T-regulačních lymfocytech v důsledku stimulace T-lymfocytů je spojena s revmatoidní artritidou. T-regulační lymfocyty byly

nalezeny v prozánětlivém fenotypu v důsledku zvýšené exprese a aktivaci Signálního Přenašeče a Aktivátora Transkripce 1 (STAT1), kterého mRNA je přímým cílem miR-146a. Na základě těchto výsledků se možno domnívat, že miR-146a se podílí na prozánětlivém fenotypu T-regulačních lymfocytů a zúčastňuje se patogeneze revmatoidní artritidy.^(Hou et.al., 2014) Jiné nedávné studie poskytli další důkazy, že i deregulace jiných miRNA může mít vliv na patogenezi a zánět kloubů. U pacientů s revmatoidní artritidou byly v porovnání se zdravými kontrolami zjištěny deregulované exprese těchto kandidátních miRNA: miR-21, miR-25, miR-95, miR-124a, miR-146a a miR186. Také byly zjištěny výrazně zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů, jakými jsou IL-6, IL-12, IL-17 a IL-21, přičemž exprese těchto cytokinů byly pozitivně (například miR-21) i negativně (například miR-146a) korelovány s expresí kandidátních mikroRNA.^(Singh, Hahn, Hossain, 2013) V další studii bylo u revmatoidních pacientů zjištěno významné zvýšení exprese miR-155 u vícerych typů buněk včetně fibroblastů podobných synovocytů po jejich stimulaci pomocí TNF- α , IL-1 β , lipopolysacharidy a bakteriálními lipoproteiny.^(Stanczyk et.al., 2008) Bylo také prokázáno na myším modelu, že nepřítomnost miR-155 zabránila vytvoření autoreaktivních B a T-lymfocytů u kolagenem vyvolané artritidy a myší modely vykazovaly výrazně sníženou lokální destrukci kosti prostřednictvím snížené generace osteoklastů.^(Blüml et.al., 2011) Ačkoli zatím nebyla funkce miR-155 v patogenezi kloubů detailně prozkoumána, bylo prokázáno, že miR-155 má kritickou funkci při regulaci imunitní odpovědi v tkáních kloubu a může hrát roli i při dalších kloubních zánětlivých onemocněních. Kromě miR-155 a výše zmíněných miRNA byly prozkoumány i další vybrané kandidátní miRNA, které se mohou uplatňovat v patogenezi kloubů: miR-15a, miR-16, miR-19a/19b, miR-23b, miR-29, miR-34a*, miR-127, miR-132, miR-203, miR-221/222, miR-223, miR-323-3p, miR-346 a miR-499. V této studii byl zkoumán i vztah mezi mikroRNA regulací a regulací pomocí DNA metylace. Bylo zjištěno, že v patogenezi revmatoidní artritidy se uplatňuje i regulace pomocí DNA metylace a byl odhalen vztah mezi miR-152 a DNMT1, což naznačuje možnost propojení mezi těmito regulačními mechanismy, a to nejen v patogenezi kloubů.^(Miao et.al., 2013) Vliv na patogenezi kloubů mohou mít i ty miRNA, které se uplatňují při stimulaci funkce osteoklastů, jakými jsou například miR-204, miR-211, nebo miR-379 a také ty miRNA, které se všeobecně uplatňují v patologických i fyziologických imunitních reakcích, jakými jsou například miR-10, miR-17-5p, miR-20a, miR-34a, miR-98, miR-106a, miR-125a, miR-126, miR-140, miR-142-3p, miR-148a/b, miR-150a, miR-196a a miR-326.^(Tomankova et.al., 2011) Vzhledem k těmto zjištěním je možno předpokládat, že v patogenezi kloubů se uplatňují i jiné miRNA, kterých vliv zatím nebyl objeven a popsán.

3.6. Sekvenování další generace (NGS)

Vysoká poptávka po nízkonákladovém sekvenování byla hlavní motivací pro vývoj vysoce výkonných technologií sekvenování další generace, které umožnily paralelizaci procesu sekvenování a jsou schopny číst tisíce až miliony sekvencí najednou. Ačkoli průlomové, Sangerovo sekvenování je omezeno mnoha limitacemi ve výkonu, rozsahu, rychlosti i rozlišení, které vyplývají z jeho podstaty. Za účelem překonání těchto bariér bylo nutno vyvinout zcela nové technologie, které využívají principiálně odlišné přístupy k sekvenování. Tyto technologie byly proto pojmenovány Next Generation Sequencing – sekvenování další generace. Díky svým vlastnostem umožnily početné přelomové objevy a stáli u zrodu revoluce na poli genomické vědy.^(Hall, 2007) Už pět let od představení NGS technologii se výrazně změnil způsob, jakým vědci získávají informace o genetické informaci z biologických systémů. Metody NGS se rychle ujaly v mnoha laboratořích po celém světě, protože NGS technologie umožňují téměř neomezené proniknutí do genomů, transkriptomů či epigenomů jakéhokoliv druhu. Tato výhoda podnítila mnoho vědeckých pokroků v mnoha oblastech, od výzkumu lidských chorob až po polnohospodářské a evoluční vědy.^(Church, 2006)

3.6.1 NGS jako univerzální biologický nástroj

Výkonná a flexibilní povaha NGS se uplatnila v mnoha oblastech výzkumu a NGS se stal klíčovým a nepostradatelným nástrojem v biologickém výzkumu. Se schopností analyzovat genetickou architekturu jakékoliv biologické jednotky, vědecká komunita začala využívat tuto technologii pro vývoj širokého spektra aplikací, které výrazně změnily dizajn nových studií, překonávají hranice minulé vědy a dovolují nám získat v minulosti nedosažitelné informace.^(Gullapalli et.al., 2012)

Platformy NGS možno využít pro širokou škálu aplikací, které dovolují vědcům klást virtuálně jakékoliv otázky ohledně genomů, transkriptomů a epigenomů jakéhokoliv organismu. Celkový výsledek sekvenčního experimentu je do velké míry určen způsobem, jakým jsou připraveny knihovny a jakým jsou následně zpracovány sekvenační data, samotný proces sekvenování je v podstatě neměnný. Na trhu je mnoho kitů pro standardní přípravu knihoven od mnoha výrobců, kteří nabízejí postupy pro sekvenování celých genomů, cílových regionů (například celkových exomů), specifických regionů DNA, protein-vázajících regionů, analýzu genové exprese či exprese miRNA. Pro dosažení specifických cílů výzkumu, mnoho vědců

vyvinulo nové protokoly pro izolaci specifických regionů v genomu, které jsou spojeny s jistou biologickou funkcí.^(Fiorentino et.al., 2014)

Digitální podpora NGS sekvenování umožňuje prakticky neomezený dynamický rozsah a poskytuje velmi vysokou citlivost pro kvantifikační aplikace, jakou je například analýza genové exprese. Využitím NGS mohou vědci kvantifikovat RNA aktivitu s mnohem větším rozlišením, než umožňují tradiční metody založené na mikročipech. Dostatečně vysoké rozlišení je důležité pro zachycení nepatrných změn v genové expresi, spojených s biologickými procesy. Zatímco na mikročipech může být změřena kontinuální změna intenzity signálu v rámci omezeného rozsahu od horní hladiny šumu po maximální nasycení, NGS kvantifikace je diskrétní, zaznamenávající počet čtení. Se zvyšujícím či snižujícím se počtem čtení, vědci mohou vyladit senzitivitu experimentu s ohledem na cíle jejich studie.^(Kawaji et.al., 2014)

3.6.1.1 Limitace NGS

Zvýšený výkon NGS reakcí jde na úkor délky čtení, jako možno postřehnout u většiny dostupných sekvenačních platform, které nabízejí kratší průměrnou délku čtení (30-400 bází) než je možná u metod využívajících Sangerovo sekvenování (500-1000 bází).^(Hert, Fredlake, Barron, 2008) Několik platform sekvenování třetí generace sice slibuje mnohem delší čtení, avšak tyto platformy ještě nejsou dostupné a potřebují doladit, jak bylo zmíněno.^(Thompson, Milos, 2011)

Kratší délka čtení způsobuje omezení typů možných experimentů, které mohou být provedeny pomocí NGS metod. Například, je složité sestavit genom *de novo* za použití krátkých fragmentů o velikostech do 400 bází.^(Nagarajan, Pop, 2010) Proto se většina aplikací těchto technologií zaměřuje na porovnávání hustoty a počtu kratších sekvencí k existujícímu referenčnímu genomu, což se někdy označuje jako „genome resequencing“. Nevýhodou je i to, že krátké délky čtení se nemusí přiřadit k referenčnímu genomu unikátně a vícere regiony různých genomů jsou proto nezmapovatelné těmito typem experimentů. Přirazování krátkých úseků sekvence k referenčnímu genomu může být obtížné i v případech výraznějších rozdílů mezi referenčním a sekvenovaným genomem, například vlivem strukturních variací (inzerce, delece, translokace, inverze, atd.).^(Nielsen et.al., 2011) S těmito záležitostmi se zápasí využitím delších čtení nebo využitím paired-end / mate-pair přístupů. Vzhledem na prozatím nedostatečnou vyspělost NGS platform třetí generace, téměř všechna resekvenování lidského genomu, které byly provedeny, spoléhali na přístupy paired-end a mate-pair u platform druhé generace. Paired-end sekvenování je technicky mnohem snadnější než mate-pair a vyžaduje méně DNA vzorku, což z tohoto přístupu dělá

víceméně standard pro resekvenování lidských genomů. Ačkoli nákladnější a technicky náročnější, mate-pair knihovny mohou snímat DNA sekvenci na delší vzdálenost (1,5 až 20 kilobází) než paired-end přístup (300 až 500 bází), jsou proto vhodnější pro mapování velmi rozlehlých strukturních změn.^(Mardis, 2011)

3.6.2 Workflow

Protokoly pro přípravu vzorku pro NGS jsou všeobecně vzato rychlejší a přímější než ty využívané pro Sangerovo sekvenování.^(BigDye®; NEBNext®)

Základní postup u NGS experimentů se dá rozdělit do 4 fází:

- 1) Izolace vzorku z biologického materiálu
- 2) Příprava templátů (knihoven), většinou pomocí kitů
- 3) Sekvenování a detekce
- 4) Analýza dat (bioinformatika)

Pro rychlou ilustraci procesu sekvenování pomocí NGS, představte si vzorek genomické DNA (gDNA). Tato gDNA je nejprve enzymaticky nebo mechanicky rozfragmentována a následně je z těchto fragmentů za pomoci určitého kitu vytvořena knihovna malých segmentů za využití PCR a specifických primerů, které umožňují provést sekvenační biochemii. Tyto segmenty mohou být v každém vzorku označeny jiným specifickým primerem lišícím se v nukleotidové sekvenci, což umožní jejich následné smíchání (pooling) a osekvenování v jednom běhu. Knihovny jsou dále obvykle namnoženy různými podobami PCR, které se liší mezi jednotlivými platformami a následně osekvenovány. Nově identifikované řady bází jsou softwarově upraveny a poskládány *de novo* nebo za využití referenčního genomu, pokud je k dispozici. Kompletní sada seřazených čtení odhalí celkovou sekvenci původního vzorku gDNA.^(Sibert et.al., 2011)

3.6.2.1 Příprava knihoven

Všeobecně vzato, počáteční materiál pro všechny NGS experimenty je dvouvláknová DNA. Její původ může být ale různý (genomická DNA, komplementární DNA, imunoprecipitovaná DNA, atd.). Všechny počáteční materiál musí být převeden na templáty sekvenační reakce (sekvenační knihovnu), což vyžaduje obvyklé kroky fragmentace, selekce podle délky a ligace adapterů.^(Linnarsson, 2010) Fragmentace a selekce podle délky slouží na zkrácení molekul DNA ve vzorku na sekvenovatelné fragmenty, kterých délka závisí od

požadavků každé konkrétní sekvenační platformy. Fragmentace může být provedena náhodným enzymatickým štěpením nebo mechanicky pomocí sonifikace nebo nebulizace.^(Knierim et.al., 2011) Proces ligace adapterů přidá ke koncům templátů syntetické molekuly DNA, které jsou specifické pro každou platformu. Adaptery slouží jako primery pro následnou amplifikaci a/nebo sekvenační reakce. V ideálním případě by výše popsané kroky vytvořily nezkreslenou sekvenační knihovnu, která přesně reprezentuje DNA populaci vzorku. V závislosti na použité NGS technologii, knihovna je osekvenována přímo (jednomolekulární templáty) nebo nejdříve amplifikována a až poté osekvenována (klonálně amplifikované templáty). Vytváření knihovny slouží i k prostorovému oddělení a imobilizaci populací DNA fragmentů pro sekvenování, typicky navázáním na pevné povrchy nebo kuličky, což dovolí následnou paralelní sekvenační reakci u každého, prostorově vymezeného templátu.^(Natrajan, Reis-Filho, 2011)

3.6.2.2 Klonální amplifikace versus jednomolekulární templáty

Většina sekvenčních platform není schopna zaznamenávat reakce jednotlivých molekul, je proto potřebné před sekvenováním templát amplifikovat za účelem zvýšení intenzity signálu při přidání nukleotidu.^(Mardis, 2011) Strategie amplifikace se liší mezi platformami. Obvykle je zahrnut nějaký typ PCR, nejčastěji emulzní nebo můstková PCR. Je důležité brát ohled na fakt, že jakákoli metoda amplifikace může do experimentu vnést sekvenační chyby, protože DNA polymerizační či ligační enzymy nejsou 100% přesné. Ještě horší situace je u sekvenování cDNA, protože amplifikačnímu kroku předchází její syntéza za využití enzymu reverzní transkriptázy, která nemá kontrolní podjednotku a její chybovost je o několik řádů vyšší než chybovost DNA polymerázy. Záměny nukleotidů způsobeny enzymy jsou na první pohled nerozeznatelné od SNP (single nucleotide polymorphism) v DNA.^(Metzker, 2009) Skutečný SNP může být rozeznán na základě opakovaného výskytu stejné záměny ve vícero čteních, kdežto chyba způsobena enzymem je náhodná. Amplifikační kroky také snižují detekci celého dynamického rozptylu sekvencí, protože sekvence s nízkou koncentrací nemusí být vůbec amplifikovány a tak vyřazeny ze sekvenačního kroku. Sekvenování jednomolekulárního templátu vůbec amplifikační krok nepotřebuje a také vyžaduje mnohem menší množství počátečního materiálu.^(Hart et.al., 2010) Schopnost osekvenovat extrémně malé množství DNA bez nutnosti předchozí manipulace s ní poskytuje metodám jednomolekulárního sekvenování výhodu většího dynamického rozsahu a detekce, včetně možnosti osekvenovat DNA z jediné buňky.^(Tang et.al., 2009) V současnosti jsou jednomolekulární platformy ještě jen na začátku vstupu na trh, avšak navzdory slibům ohledně zlepšení kvality signálu a rozšíření typů produkovaných dat, dostupnost těchto platform je limitovaná

a postupy pro následnou analýzu dat jsou mnohem méně rozvinuté než u platform využívajících klonální amplifikaci. Při jejich současné technologické úrovni jsou výhody jednomolekulárních platform často nejisté, tyto platformy byly však označeny za „Třetí generaci“ sekvenačních technologií, což odráží jejich obrovský potenciál, pokud budou jejich nedostatky minimalizovány.^(Shadt, Turner, Kasarskis, 2010)

3.6.2.3 Sekvenační reakce

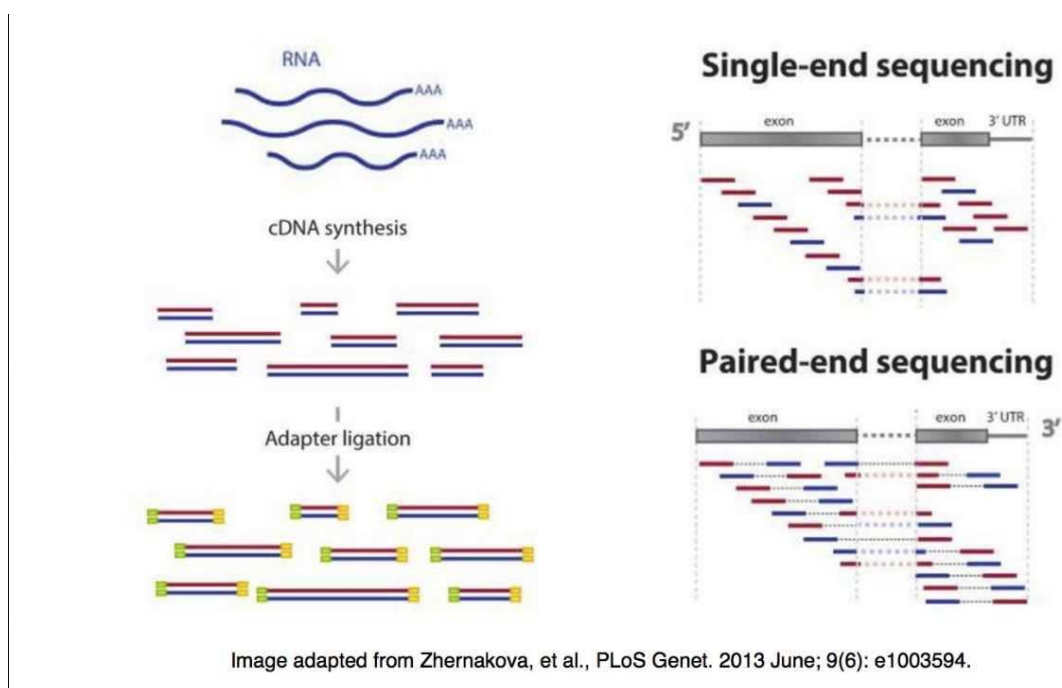
Každá sekvenační platforma využívá soubor jistých opakujících se chemických reakcí, které jsou prováděny a detekovány automaticky. Reakce obvykle využívají nějaký druh průtokové cely nebo čipu, které umožňují standardizované přidávání a detekci nukleotidů, promývání či vymývání reagensů a opakování tohoto cyklického procesu. Ačkoliv se všechny sekvenační platformy liší ve své vlastní využití chemii, využití DNA polymerázy nebo DNA ligázy je velice běžný jev, proto byla tato strategie nazvána „Sequencing by synthesis“ (SBS) a označují se tak všechny metody, které využívají některý z těchto enzymů.^(Fuller et.al., 2009)

Určování sekvence ve stylu postupného čtení nukleotidu za nukleotidem, využívaného NGS, překonává omezení dané požadavkem na samostatnou separaci a detekci, potřebných pro sekvenační metody první generace, což o několik řádů zlepšilo výkon sekvenačních reakcí. Takovéto zlepšení výkonu umožnilo snížit cenu za osekvenování 1 milionu bází víc než 100000× a v následujících letech se očekává ještě její další snižování.^(Lander, 2011) Razantní snížení nákladů v sekvenačních technologiích umožnilo jejich rychlé rozšíření a četné používání v různých aplikacích.

Vzhledem na citlivost sekvenační reakce na rovnoměrné zastoupení A:T a C:G párů bází v sekvenované DNA u vícero platform (roztoky nukleotidů jsou přiváděny v ekvimolárním množství; při nerovnoměrném zastoupení A:T a C:G párů bází hrozí zvýšení chybovosti sekvenační reakce na základě koncentračního gradientu), byla uvedena do praxe PhiX kontrola. PhiX kontrola slouží jako pozitivní kontrola pro kalibraci při sekvenování knihoven s nevyváženým poměrem A:T a C:G párů bází či knihoven s nízkou diverzitou. PhiX kontrola jsou knihovny připraveny z genomu bakteriofága ΦX174, kterého genom byl osekvenován jako první z DNA genomů a mohou být přidány přímo do jiných knihoven před amplifikací a generací klastrů. Genom ΦX174 je malý, mnohokrát osekvenovaný a má vyvážený poměr A:T a C:G párů bází, čím pomáhá vyvažovat jejich nerovnoměrné zastoupení v sekvenovaných knihovnách.^(Sanger et.al., 1977)

3.6.2.4 Single read, paired-end read a mate-pair end sekvenování

Typicky jsou NGS metodami molekuly DNA v knihovně osekvenovány pouze z jednoho konce (single end read), při kterém je směr čtení fragmentů náhodný. V závislosti na použitém protokolu pro přípravu knihoven a pro daný sekvenátor, přímá a zpětná čtení mohou být spárována za účelem zmapování obou konců lineárních DNA fragmentů (paired-end sequencing) nebo obou konců dříve cirkularizovaných DNA fragmentů („mate-pair sequencing“). Výběr konkrétního typu čtení závisí na klinické aplikaci a plánu studie. Je důležité zmínit, že oba přístupy párových čtení sekvenují jednomu od konců lineárních DNA fragmentů upravených do sekvenačních knihoven a proto neposkytují informace o sekvenci ve středu delších DNA fragmentů. Názorná ukázka rozdílů mezi single read a paired end přístupem je na obrázku (Obr. 2).



Obr. 2: Rozdíly mezi single read a paired end sekvenováním.

3.6.2.5 Analýza dat

Paradoxně, jedna z hlavních nevýhod NGS je současně také její největší předností – generování obrovských objemů dat. NGS reakce generují obrovské datasety o sekvencích v intervalu od milionů po miliardy bází, kterých interpretace není triviální záležitost. (Natrajan, Reis-Filho, 2011) Kromě toho, rozsah a vlastnosti produkovaných dat kladou značné požadavky na informační technologie využívané ve všech fázích sekvenování, včetně sledování dat,

úschovy a kontroly kvality.^(Pop, Salzberg, 2008) Tyto schopnosti rozsáhlého sběru dat se v současnosti zdvojnásobují jako omezení, protože posouvají kritické místo v genomickém výzkumu od získávání dat k jejich analýze a interpretaci.^(McPherson, 2009) NGS stroje generují ohromné kvanta dat tak rychlým tempem, že ponuka nestačí vyhovět požadavkům na nové analytické přístupy schopné efektivně zpracovávat NGS datasets. Analýza dat je kritický článek jakéhokoli NGS projektu a je velmi ovlivněna konkrétními cíli studie a typem projektu. Úvodní analýza nebo také volání bází (base calling) je typicky prováděna pomocí vlastního software sekvenační platformy. Po ní jsou sekvenační data upraveny procesem nazvaným „trimming“, při kterém se „ořežou“ od sekvence vzorku osekvenované adaptory, primery či indexy. Tento krok je důležitý pro úspěšné provedení dalšího kroku – přiřazení sekvencí k referenčnímu genomu nebo poskládání genomu *de novo*. Přiřazení sekvencí k referenčnímu genomu a jejich následné seřazení je aktivní oblast výpočetního výzkumu, při kterém jsou rychle vyvíjeny nové metody.^(Flicek, Birney, 2009) Po tomto kroku je potřeba data analyzovat vzhledem na specifické cíle experimentu.^(Martin, Wang, 2011; Medvedev, Stanciu, Brudno, 2009) Zajímavou informací může být, že celkově NGS sekvenování, ale hlavně analýza dat probíhá v téměř komunitním duchu, při které jednotlivé vědecké týmy navzájem nezištně spolupracují a navzájem si pomáhají nejen při řešení problémů. Ačkoli jsou na trhu mnohé komerční, uživatelsky přívětivé programy pro zpracování sekvenačních dat, masivně se uplatňují open source programy v různých programovacích jazycích, které jsou upravovány jednotlivými bioinformatickými skupinami dle aktuální potřeby.^(Jelsoft enterprises, 2014)

3.6.3 Princip

Všeobecně je základní koncept NGS technologie podobný kapilární elektroforéze, kde jsou jednotlivé báze malých fragmentů DNA postupně identifikovány ze signálů, které vyvolává jejich postupná syntéza pomocí komplementárního vlákna. NGS rozšiřuje tento proces na miliony reakcí na mnoha DNA fragmentech v masivně paralelním stylu. Zatímco u Sangerova sekvenování syntéza a detekce byly dvě oddělené procedury, u NGS jsou tyto dvě procedury spojené do jednoho kroku. Tento pokrok umožňuje rychlé sekvenování dlouhých úseků DNA, což při použití nejmodernějších přístrojů a sekvenční chemie dovoluje osekvenovat celý genom v jediném sekvenačním běhu.^(Mardis, 2008)

Konkrétní principy NGS, jako i jejich silné stránky a limitace se liší podle konkrétní platformy.^(Liu et.al., 2012)

V současnosti je všeobecně známých 7 platforem:

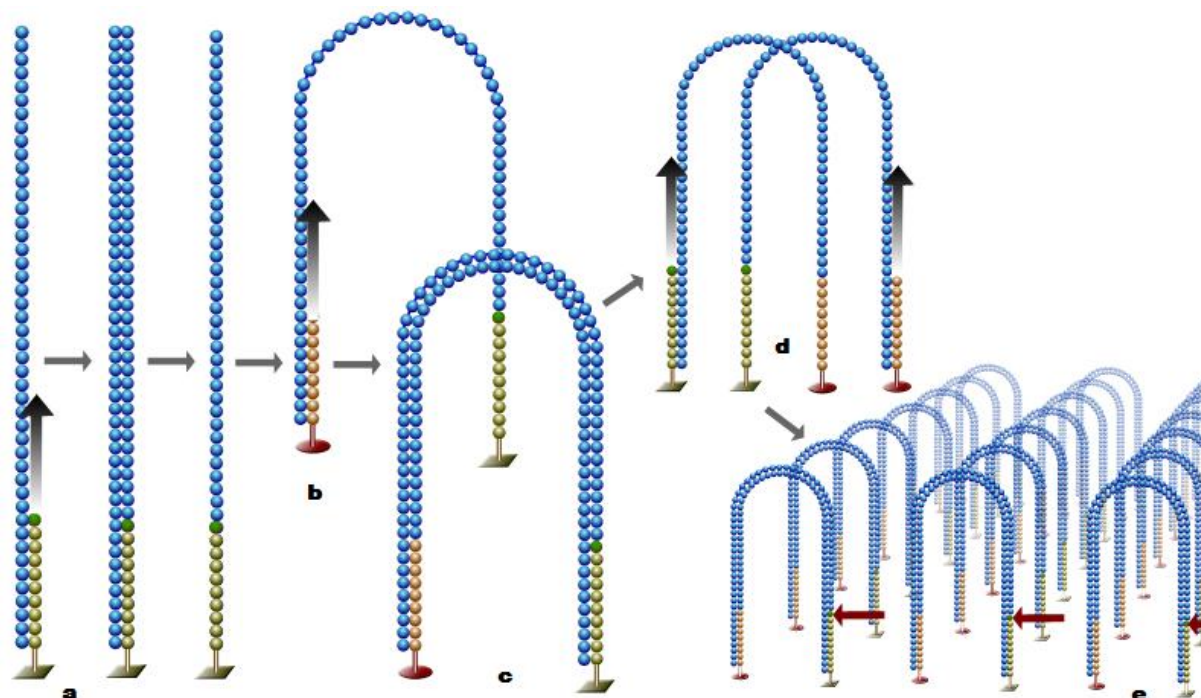
- 1) Illumina – Sequencing by Synthesis
- 2) Roche 454 Pyrosequencing
- 3) Life Technologies - Ion Torrent
- 4) Applied Biosystems – SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection)
- 5) Pacific Biosciences – PACBIO (Single-molecule real-time sequencing)
- 6) Helicos Genetic Analysis System – True single molecule fluorescent sequencing
- 7) Oxford Nanopore – GridION

3.6.3.1 Illumina

Illumina je v současnosti nejrozšířenější platforma ve světě. Hlavní výhody této platformy jsou cena za osekvenování 1 milionu bází (5 až 15 centů USD) a možnost velmi vysokého počtu čtení v jednom běhu (i víc než 3 miliardy). Tyto výhody kompenzují její nižší přesnost (98%) v porovnání s ostatními platformami. Instrumentace je však velice nákladná. Délka čtení se v současnosti pohybuje od 50 do 300 bází a čas běhu závisí na zvolené délce čtení a konkrétním přístroji.^(van Vliet, 2010) Illumina v současnosti poskytuje 3 přístroje, lišící se svým zaměřením – MiSeq, HiSeq 2500 a NextSeq 500.^(Compare Sequencing Platforms, 2014)

Vzorek genomické, komplementární či jiné DNA je nejprve purifikován a enzymaticky nebo mechanicky rozfragmentován na zhruba 200 nukleotidů dlouhé řetězce, pokud je to potřebné. Na jejich 3' a 5' konce jsou poté pomocí PCR nalogovány specifické adaptory, které umožňují navázání specifických primerů, indexů pro označení jednotlivých knihoven a oligonukleotidů sloužících k zachycení budoucích knihoven na povrch průtokové cely. Soubor fragmentů DNA z jednoho vzorku s nalogovanými primery, indexy a oligonukleotidy pro zachycení se nazývá knihovna. Knihovny je potřeba po přípravě purifikovat na základě délky za účelem odstranění nežádoucích fragmentů, které by mohli interferovat se sekvenováním. Před samotným sekvenováním musí proběhnout amplifikace knihoven, která se děje *in situ* v průtokové cele pomocí můstkové PCR (bridge PCR), při které se knihovny pomocí oligonukleotidů navážou hybridizací na specifické, komplementární, imobilizované oligonukleotidy a pak jsou pomocí DNA polymerázy namnoženy do klastrů, v kterých mají všechny knihovny stejnou sekvenci. (Obr. 3) Amplifikace knihoven do klastrů slouží pro amplifikaci fluorescenčního signálu z dané pozice. Illumina využívá technologii sekvenování ligací, které využívá čtyři odlišně fluorescenčně značené nukleotidy. V každém sekvenačním cyklu je ke každému vláknu nalogován jen jeden nukleotid, kterého fluorescenční značka zároveň slouží i jako terminátor polymerizace, takže po každé inkorporaci nukleotidu je fluorescenční značka zaznamenána pomocí CCD kamery a poté enzymaticky odštěpena, což umožní ligaci dalšího nukleotidu v dalším cyklu. Protože jsou všechny čtyři

fluorescenčně značené nukleotidy přítomny jako jednotlivé molekuly, přirozeně si při inkorporaci konkurují, což minimalizuje jejich špatné umístění. Určení konkrétního nukleotidu je odvozeno přímo z měření intenzity signálu v každém cyklu, což výrazně snižuje chybovost. Výsledek je přesné sekvenování báze za báží, které eliminuje specifické chyby plynoucí z kontextu DNA sekvence a umožňuje robustní identifikaci bází v celém genomu, včetně regionů s repetitivními sekvencemi či homopolymery.



Obr. 3: Princip můstkové PCR, která slouží k amplifikaci knihoven. Knihovny mají na každém konci jiný, specifický primer a průtoková cela obsahuje dva typy imobilizovaných oligonukleotidů, každý typ komplementární k jinému primeru. Nejprve se knihovny pomocí jednoho z primerů navážou hybridizací na jeden typ imobilizovaných oligonukleotidů, který slouží jako primer pro syntézu komplementárního vlákna pomocí DNA polymerázy. Komplementární vlákno je kovalentně navázáno k průtokové cele. Navázání knihoven na jeden ze dvou oligonukleotidů je náhodný a proces probíhá stejně i na druhém oligonukleotidu. (a) Druhý konec tohoto vlákna se následně překlápí a pomocí hybridizace se naváže druhým koncem k druhému typu imobilizovaného oligonukleotidu, (b) který také slouží jako primer pro syntézu, tentokrát původního vlákna. Výsledný tvar připomíná můstek, podle kterého byla tato metoda PCR pojmenována. Nyní jsou původní i komplementární vlákno kovalentně navázány k průtokové cele. (c) Následně jsou vlákna pomocí roztoku hydroxidu sodného denaturována a proces se opakuje znovu a znovu. (d) Následně se vytvoří klastry, ve kterých mají všechna vlákna původní či sekvenci k ní komplementární. (e)

3.6.3.2 Roche 454

Tato dnes již zastaralá metoda má celkovou přesnost kolem 99% a poskytuje dlouhé čtení (až 700 bází). Velkým problémem je nerovnoměrná distribuce chyb, která v jistých úsecích dosahuje až 50%, zejména v homopolymerních sekvencích, v kterých po sobě následuje 3 a více stejných nukleotidů. Tyto chyby mohou být kompenzovány vhodným provedením experimentu, ale i přes to je odlišení unikátních alel od chyb velmi náročné.^(Gillespie et.al., 2011) Čas běhu je 24 hodin. Cena za osekvenování 1 milionu bází je v porovnání s ostatními platformami vysoká (10 USD). Počet čtení v jednom běhu může být až 1 milion. Tato platforma využívá pro amplifikaci knihoven emulzní PCR, kde se stávají jednotlivé kapénky emulze oleje ve vodě mikroreaktory, v kterých probíhá PCR. Velice častým problémem je starý, závadný či jinak nevyhovující emulzní olej. Sekvenování probíhá syntézou a detekce je chemiluminiscenční.^(Harrington et.al., 2013)

3.6.3.3 Ion Torrent

Největšími výhodami této platformy jsou nízká cena instrumentace a rychlost – čas běhu je kolem 2 hodin. Vysoká rychlost čtení je na úkor přesnosti, která se pohybuje kolem 98% a často klesá i pod ni. Cena za osekvenování 1 milionu bází je zhruba 1 USD, délka čtení kolem 400 bází a maximální počet čtení v jednom běhu je 80 milionů. Ion Torrent využívá k amplifikaci knihoven emulzní PCR a sekvenace syntézou, detekce je prováděna měřením změny pH pomocí velmi citlivé elektrody na čipu. Při každé inkorporaci nukleotidu do molekuly DNA je uvolněn proton a Ion Torrent tyto změny dokáže zachytit a změřit.^(Merriman, Rothberg, 2012)

3.6.3.4 SOLiD

Tato metoda sekvenování využívá princip ligace a detekce oligonukleotidů. Cena za osekvenování 1 milionu bází je příznivá (13 centů USD), ale běhy jsou velice dlouhé (1-2 týdny), instrumentace je velice nákladná a délka čtení je velmi krátká (50+50 bází). V praxi byly zjištěny problémy s čtením palindromických sekvencí.^(Huang et.al., 2012) Ačkoliv je deklarovaná přesnost vysoká (99,9%), jen zřídka je jí dosaženo. Počet čtení v jednom běhu může být od 1,2 do 1,4 miliardy. Platforma SOLiD také využívá pro amplifikaci knihoven emulzní PCR, sekvenuje pomocí ligace dvoubázových sond a využívá fluorescenční detekci.

Celý systém je složitější v porovnání s ostatními platformami, je ale stále konkurenceschopný.^(Mitra et.al., 2013)

3.6.3.5 PACBIO

Ačkoli vývoj instrumentace k této metodě ještě není v současnosti dokončen, tato technologie nabízí sekvenování v reálném čase. Díky odlišnému konceptu může být délka čtení až 30 000 bází a čas běhu velice krátký (30 minut až 2 hodiny). Cena za osekvenování 1 milionu bází se v současnosti pohybuje v rozmezí 33 centů až 1 dolaru (USD), v jednom běhu možno udělat 400 milionů čtení, z toho 50 000 v jedné SMRT (single molecule real time) jamce. Pomocí platformy PACBIO mohou být detekovány i metylované báze. Instrumentace je nejdražší ze všech platforem, výkon i přesnost (87%) jsou v současnosti nedostatečné. Platforma PACBIO sekvenuje v reálném čase a nevyužívá žádný typ amplifikace. Na dně každé zespona nasvícené jamky s objemem v řádu zeptolitřů (10^{-21}) je imobilizována DNA polymeráza, která syntetizuje komplementární vlákno pomocí fluorescenčně značených nukleotidů. Pro detekci byla vyvinuta technologie SMRT, která využívá Zero Mode Waveguide – paládiové detektory umístěny na dně každé jamky mají průměr jen 100 nm a nejsou schopny zachytit fotony viditelného světla, protože vlnová délka viditelného světla je 400-700 nm.^(Pal, Pal, 2001) Zachycují jen jeho elektromagnetický vliv, což značně snižuje úroveň šumu.^(Ferrarini et.al., 2013)

3.6.3.6 Helicos

Platforma Helicos je podobná Illumině, například využitím průtokové cely, imobilizovaných oligonukleotidů a CCD kamery, byla ale vyvíjena nezávisle. Délka čtení je oproti Illumině mnohem menší (kolem 30 bází). Jeden běh trvá zhruba 8 dní a možno v něm udělat až 750 milionů čtení za zhruba dvojnásobnou cenu než u Illuminy. Tato platforma nevyužívá amplifikaci, sekvenuje pomocí ligace a detekuje laserem excitované fluorescenční sondy pomocí CCD kamery.^(Milos, 2008)

3.6.3.7 GridION

Tato unikátní platforma byla vyvinuta na Oxfordské univerzitě a využívá proteinu „Nanopore“ za účelem přímé elektrické analýzy jednotlivých molekul v reálném čase. Princip spočívá v usazení nanopóru do polymerové membrány s velmi vysokým elektrickým odporem a měření charakteristických změn množství proudících iontů skrz tento kanál

vyvolávaných průchodem různých analytů. Nanopór může být upraven pro měření různých molekul, včetně DNA, RNA, proteinů a jiných malých molekul. Při sekvenování DNA je na povrchu nanopóru usazen enzym z rodiny helikáz tak, aby jedno z vláken, na které rozděljuje sekvenovanou molekulu DNA, směřovalo dovnitř póru. Uvnitř póru mají na průtok iontů vliv současně až 4 nukleotidy a každé pořadí jakýchkoli 4 nukleotidů má za následek jinou, specifickou změnu množství proudících iontů, takže mohou být podle této změny identifikovány. Délka čtení je v podstatě neomezená a počet čtení je roven počtu využitých nanopórů, které mohou být vsazeny do čipu. V jednom čipu, který je usazen do kazety na jedno použití, mohou být až stovky tisíc mikrojamek. Každá mikrojамka má svou vlastní elektrodu a do polymerové membrány na povrchu každé mikrojамky je vsazen jediný nanopór. Jednotlivé přístroje GridION mohou být spojeny do klastrů a tím výrazně urychlen čas sekvenace nebo zvýšena hloubka čtení. Jedná se o přelomový koncept, který může stát u další revoluce v genomických vědách. ^(Nanopore DNA sequencing, 2014)

3.6.4 Využití NGS u profilování miRNA exprese

Vzhledem na velké množství buněčných procesů regulovaných pomocí miRNA, míra exprese určitých molekul miRNA se obvykle liší v patologickém a fyziologickém stavu určitého organismu, což dělá z miRNA potentní diagnostické markery. Zvýšení či snížení exprese určitých miRNA poskytuje i náhled na funkci daných miRNA molekul a jejich mRNA cílů v daném patologickém stavu, což může přispět k odhalení podstaty onemocnění a usnadnit či dokonce umožnit jeho léčbu. Kromě sekvenování genomické DNA, NGS technologie mohou být využity i pro sekvenování populací RNA molekul za účelem identifikování všech genů, které jsou transkribovány z DNA. Transkribované sekvence také obsahují proteiny nekódující druhy RNA, jakými jsou například miRNA či long non-coding RNA (lncRNA). ^(Zhou et.al., 2011)

Navzdory intenzivnímu vývoji, v současnosti ještě nejsou dostupné sekvenační technologie pro přímé sekvenování RNA, proto musí být jakákoliv RNA nejdříve převedena do cDNA pomocí reverzní transkripce. RNA sekvenování poskytuje informace jen o transkribovaných sekvencích, je proto větší pravděpodobnost, že bude objevena funkčně významná mutace. ^(Shah et.al., 2009)

V současnosti většina expresních analýz miRNA využívá mikročipy nebo qRT-PCR. Ačkoliv má každá strategie miRNA profilování své specifické výhody a nevýhody, které musí být zváženy vzhledem na cíle experimentu, při porovnání s ostatními metodami má NGS

nejvyšší detekční senzitivitu, největší dynamický rozptyl a nejvyšší přesnost při diferenční analýze exprese, což z NGS technologií činí výkonný nástroj pro miRNA profilování. (Tam et.al., 2014)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Praktická část této diplomové práce byla realizována na vícerych pracovištích. Vzorky periprostetické tkáně byly odebrány prof. MUDr. Jiřím Gallem, Ph.D. na Ortopedické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci, Olomouc, Česká republika. Izolace RNA z těchto tkání, kontrola její kvality na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer a vyhodnocení sekvenačních dat proběhlo na Ústavu Imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika. Měření koncentrace RNA na přístroji Qubit® 2.0 Fluorometer, příprava sekvenačních knihoven, jejich přečištění a kontrola kvality, příprava klastrů na přístroji cBot a sekvenování na přístroji HiSeq 2000 proběhla v Genomics Core Facility Evropské Molekulárně Biologické Laboratoře (EMBL), Heidelberg, Německo. Sekvenační data byla zpracována bioinformatikem Mgr. Tomášem Novosádem na superpočítači Anselm, který je pod správou vysokoškolského ústavu IT4Innovations Technické Univerzity Báňské - Technické univerzity v Ostravě, Ostrava, Česká republika.

4.1. Materiál a metody

4.1.1 Úvod

RNA je velmi náchylná k degradaci v důsledku působení enzymů ribonukleáz, které jsou přítomny v buňkách, na kůži i v prachu. Ribonukleázy jsou velice stabilní a je těžké je deaktivovat. Kvůli těmto rizikům je základem manipulace s RNA v laboratoři práce v sterilních podmínkách, které jsou dosaženy pomocí vícerych opatření. Mezi nejdůležitější z nich patří používání sterilních rukavic, nelepivého, sterilního a ribonukleáz prostého laboratorního vybavení a práci ve flowboxu s laminárním prouděním vzduchu. Také by na práci s RNA měla být vyhrazena určitá sada pipet, která by neměla být používána na žádnou

jinou činnost, aby se předešlo zkřížené kontaminaci či degradaci RNA ve vzorcích. Před a po jakékoli práci s RNA je důležité dekontaminovat všechny plochy s roztokem deaktivujícím ribonukleázy i deoxyribonukleázy.

4.1.2 Studovaná skupina

Studovány byly miRNA profily od celkem 17 pacientů, z kterých bylo 12 žen a 5 mužů. Skupinu P1 tvořilo 8 pacientů, z toho 7 žen a 1 muž. Do této skupiny byli zařazeni pacienti, u kterých bylo důvodem k revizní operaci akutní selhání totální endoprotézy následkem aseptické osteolýzy a odbourání kostní hmoty. Diagnóza T84.0 označuje mechanickou komplikaci endogenní kloubní protézy a diagnóza T84.1 označuje mechanickou komplikaci pomůcky na vnitřní fixaci kostí končetiny. Průměrná výška pacientů v této skupině byla 164 cm (150; 182), jejich průměrná hmotnost byla 80,9 kg (54; 106), jejich průměrné BMI bylo 30,01 (24,00; 38,93) a jejich průměrný věk při revizní operaci byl 77,1 roku (65; 88).

Skupinu C/TEP tvořilo 9 pacientů, z toho 5 žen a 4 muži. Do této skupiny byli zařazeni pacienti, u kterých byl k revizní operaci jiný důvod, než aseptická osteolýza. Mezi nejčastější důvody k revizní operaci pacientů zařazených do této skupiny byly permanentní bolesti a následky úrazů (fraktura česky, bolesti po pádu). Dále se vyskytli případy přeskokování kloubní náhrady, recidivující výpotek, omezená hybnost či nekróza kostí a svalů (no ne kloubu). Průměrná výška pacientů v této skupině byla 170 cm (158; 184), jejich průměrná hmotnost byla 85,9 kg (64; 107), jejich průměrné BMI bylo 29,82 (25,00; 36,59) a jejich průměrný věk při revizní operaci byl 66,7 roku (59; 83).

Individuální data pacientů jsou uvedena v tabulkách (Tab. 1 a Tab. 2).

Označení vzorku	Skupina	Pohlaví	Rok narození	Výška (cm)	Hmotnost (kg)	BMI	Věk při revizi
T4	P1	Ž	1940	157	89	36,11	67
T9	P1	Ž	1929	150	54	24,00	78
T73	P1	Ž	1945	165	106	38,93	65
T89	P1	Ž	1934	172	84	28,39	77
T97	P1	Ž	1930	162	70	26,67	81
T102	P1	M	1923	182	90	27,17	88
T131	P1	Ž	1929	159	64	25,32	82
T1215	P1	Ž	1933	164	90	33,46	79
T118	C/TEP	Ž	1948	160	88	34,38	63
T134	C/TEP	Ž	1942	166	85	30,85	70
T136	C/TEP	Ž	1929	160	64	25,00	83
T139	C/TEP	M	1944	177	80	25,54	68
T140	C/TEP	M	1947	184	96	28,36	65
T142	C/TEP	Ž	1948	158	80	32,05	64
T1203	C/TEP	M	1947	187	97	27,74	65
T1209	C/TEP	M	1949	171	107	36,59	63
T1248	C/TEP	Ž	1953	165	76	27,92	59
PRŮMĚR				167	83,5	29,91	71,6

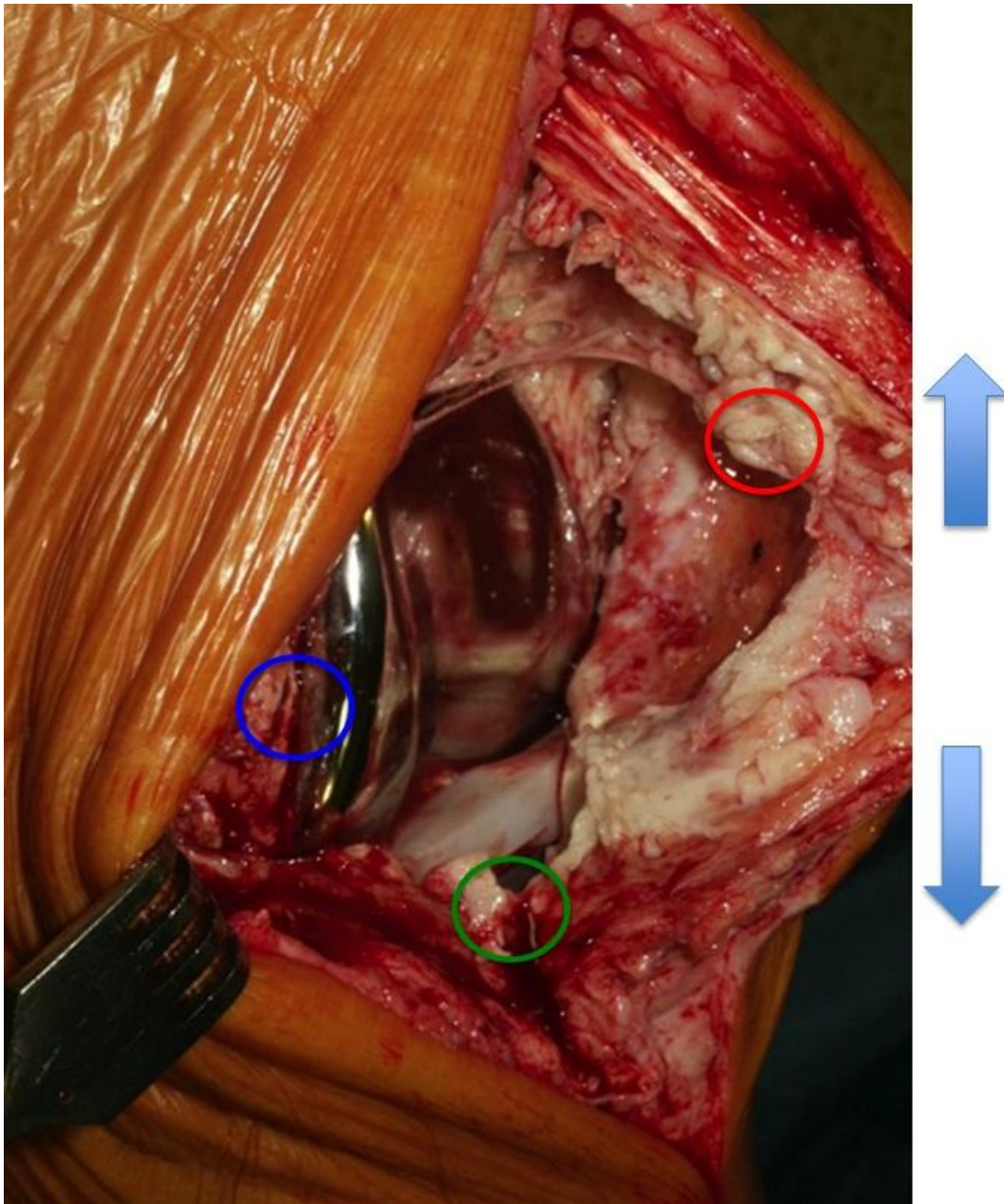
Tab. 1: Individuální data pacientů, část I.

Označení vzorku	Pracovní diagnóza / důvod reoperace	Datum primární operace TEP	Datum revizní operace	Čas mezi operacemi (roky)	Kouření	Kolik vykouřil denně / kdy přestal kouřit
T4	T 84.8	5.9.1997	5.3.2008	10	nekuřák	-
T9	T 84.8	4.6.1999	2.4.2008	8	nekuřák	-
T73	T84.1	3.4.1998	16.3.2011	12	nekuřák	-
T89	T84.8	25.5.2009	3.5.2011	2	nekuřák	-
T97	T84.0	15.12.1999	6.10.2011	11	nekuřák	-
T102	T84.1	3.4.1997	13.10.2011	14	exkuřák	před 30 lety
T131	T84.8	15.6.1999	4.4.2012	12	exkuřák	před 30 lety
T1215	T84.1	1.6.1996	30.1.2013	16	kuřák	1-5 / den, 25 let
T118	Nekróza proxim.tibie a svalů, kloub intaktní	21.1.2008	28.11.2011	3	nekuřák	-
T134	Vzorky z předem defin.lokalizací	6.10.2008	19.4.2012	3	nekuřák	-
T136	Fraktura pately po reimplantaci	4.4.2012	4.4.2012	0	nekuřák	-
T139	Bolesti po pádu, komp.stabilní	1.6.2002	5.9.2012	10	exkuřák	před 30 lety
T140	recidivující výpotek	19.4.2011	5.9.2012	1	nekuřák	-
T142	bolesti a přeskakování po TEP	30.3.2004	25.10.2012	8	exkuřák	20 denně, 10 let
T1203	bolesti	20.4.2012	5.2.2013	méně než rok	exkuřák	20 / den, 15 let, nekouří 30 let
T1209	bolesti FP po TEP	21.1.2013	21.1.2013	0	nekuřák	-
T1248	omezená hybnost	6.6.2012	25.4.2013	méně než rok	nekuřák	-

Tab. 2: Individuální data pacientů, část II.

4.1.3 Izolace RNA z periprostetické tkáně

Prvním krokem při studiu nukleových kyselin pomocí sekvenování je jejich izolace. Celková miRNA byla izolována z periprostetické tkáně získané z odběrových míst 1 a 2 u kolenního kloubu. Kompletní odběrová místa tkání u kolenního kloubu jsou znázorněna na obrázku (Obr. 4). Všechny tkáně byly ihned po odběru přemístěny do 2 ml mikrozkuvek, do kterých bylo předem napipetováno 500 µl RNA Lateru (Ambion, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA).



Obr. 4: Kompletní odběrová místa tkání u kolenního kloubu. Hned po otevření kloubu je odebrána část povrchového listu synoviální membrány obráceného k protéze (č. 1 a 2, červený kruh). V případě potřeby následuje odběr tkání z rozhraní mezi protézou a kostí u horní komponenty (v případě kolena femorální komponenta, č. 3 a 4, modrý kruh), případně jsou odebrány i tkáně z rozhraní mezi dolní komponentou a kostí (v případě kolena se nazývá tibiální, č. 5 a 6, zelený kruh). Šipky na pravé straně vymezují horní a dolní část kloubu.

Pro každou tkáň byla připravena nová Petriho miska, do které bylo napipetováno 500 μ l RNA Lateru. Tkáň z lokality 1 nebo 2 byla sterilní pinzetou přenesena z mikrozkušavky do Petriho

misky s RNA Laterem a sterilními nůžkami odstříhnuta její část, přibližně jedna pětina. Zbylá tkáň byla přemístěna zpátky do původní mikrozkušavky z RNA Laterem a uložena do -20°C. Každá odstřižená část v Petriho misce byla následně rozstříhána na malé kousky a přenesena do 10 ml sterilní zkumavky, do které bylo předem napipetováno 500 µl lyzačního roztoku (Lysis/Binding Buffer). Tkáně byly homogenizovány pomocí přístroje Ultra turrax UTC při různých otáčkách. Po každé homogenizaci byl přístroj vydesinfikován pomocí 10% vodního roztoku Sabimedu. Ihned po homogenizaci byla každá zkumavka přenesena na led.

Pro izolaci RNA z lyzátu byl využit mirVana miRNA kit. (Ambion, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA). Před každou izolací bylo nejprve potřeba připravit roztoky kitu. 100% ethanol, wash solution 1, wash solution 2/3 a Acid-phenol/Chloroform byly vytemperovány na laboratorní teplotu. Z elution solution byl do mikrozkušavky odpipetován alikvot podle počtu vzorků (1 vzorek = 100 µl roztoku) a zahřán na termobloku na teplotu 95°C. Dalším krokem byla organická extrakce. Ke tkáňovému lyzátu byl nejprve přidán roztok miRNA Homogenate Additive v množství rovnému jedné desetiny objemu lyzátu. Tato směs byla zvortexována a ponechána 10 minut na ledu. Dále byl přidán roztok Acid-Phenol/Chloroform ve stejném objemu, jako měl původní lyzáat a celá směs vortexována po dobu 1 minuty. Pak byla tato směs přenesena do mikrozkušavek o objemu 2 ml a centrifugována 5 minut při 10 000 g za laboratorní teploty. Po centrifugaci museli být odděleny organická a vodná fáze, jinak bylo nutné centrifugaci zopakovat. Po úspěšné centrifugaci byly opatrně odebrány vrchní vodní fáze a přeneseny do nové 2 ml mikrozkušavky, kde byl pipetou změřen objem. K této vodní fázi byl přidán 100% ethanol v množství pět čtvrtin jejího objemu. mirVana miRNA kit využívá k izolaci RNA mikrokolonky na bázi silikátů, na které se RNA nejprve naváže, poté je promyta a následně vyeluována. Mikrokolonky se umísťují do sběrných mikrozkušavek a průtok je zajištěn odstředivou silou. Do kolonky bylo napipetováno maximálně 700 µl směsi a byla centrifugována 15 sekund při 10 000 g. Následně byl eluát odstraněn a krok opakován, dokud přes kolonku neprošla celá vodní fáze s ethanolem. Poté byla kolonka promyta 700 µl wash solution 1 a centrifugována 10 sekund při 10 000 g. Eluát byl odstraněn a krok zopakován se 700 µl wash solution 2/3. Eluát byl odstraněn a kolonka centrifugována 1 minutu při 10 000 g pro odstranění zbylé tekutiny. Pak byla kolonka přenesena do nové 1,5 ml LoBind mikrozkušavky. Na její střed bylo napipetováno 100 µl předehřátého roztoku elution solution a centrifugováno 30 sekund při 14 000 g. Izolovaná RNA byla skladována při -80°C.

4.1.3.1 Změření kvality a kvantity izolované RNA

Pro další experimenty s izolovanou RNA musí být určeno její množství, koncentrace a kvalita (RIN – RNA integrity Number). Tyto údaje byly zjištěny pomocí přístrojů Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) a Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Stevens Creek Blvd Santa Clara, CA, USA).

Pro spolehlivé výsledky z RNA sekvenování je nutné použít vysoce kvalitní RNA – RIN má být vyšší než 8. Protože dané kvality RNA je těžké dosáhnout (obzvláště u izolací RNA ze specifických tkání, ke kterým patří i chrupavkovitá, periprostetická tkáň), volí se kompromisní řešení, při kterém RIN může být nižší než 8, ale nikdy by neměl mít hodnoty nižší než 6.

Určení kvality RNA na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer

Čipy pro přístroj Agilent 2100 Bioanalyzer jsou založeny na tradičních principech elektroforézy, která byla miniaturizována do formátu velikosti čipu. Tento formát výrazně snižuje separační čas a spotřebu reagensů. V skleněném těle čipu je vytvořena propojená síť mikrokanálek, které se po zaplnění směsí separačního polymeru s fluorescenčním barvivem stanou uzavřeným elektrickým obvodem. Do každé z 16 jamek čipu je zasazena jedna elektroda, která je napojena na nezávislý zdroj energie za účelem dosažení maximální kontroly a flexibility. Nabité biomolekuly jako DNA, RNA či proteiny jsou elektroforeticky poháněné gradientem napětí, podobně jako u klasické gelové elektroforézy. Díky konstantnímu poměru hmotnosti a náboje mohou být tyto biomolekuly rozseparovány pomocí separačního gelu jenom podle velikosti, kde menší fragmenty migrují rychleji než větší. Detekce je uskutečněna pomocí měření intenzity laserem indukované fluorescence. Standardní křivka migračního času v závislosti na velikosti fragmentů je vytvořena s pomocí ladderu, který obsahuje fragmenty o známé velikosti a tedy velikost jednotlivých fragmentů ve vzorcích může být vypočtena z jejich migračních časů. S každým měřeným vzorkem běží 2 markery (u měření RNA jen jeden), které určují hranice celkového intervalu změřitelných velikostí fragmentů. Horní a dolní markery slouží i jako interní standardy, které se využívají k zarovnání dat z ladderu s daty ze vzorků. Tento krok je důležitý pro kompenzaci případných odchylek mezi jednotlivými jamkami, které mohou nastat při analýze. Při analýze vzorků RNA, kvantifikování je provedeno pomocí ploch píků ladderu, kdy je plocha píků ladderu porovnána s celkovou plochou píků jednotlivých vzorků. Dolní marker není využíván pro kvantifikaci RNA vzorků. Při měření celkové RNA je vypočten i poměr mezi 28S a 18S ribozomální RNA, pomocí kterého může být odhadnuta integrita RNA vzorků. Tento poměr

se využívá, protože ribozomální RNA tvoří víc než 80% vzorků totální RNA a u savců, většina z toho je obsáhnuta v 28S a 18S fragmentech. Savčí 28S a 18S rRNA fragmenty jsou velké přibližně 5 kb a 2 kb a jejich teoretický poměr je 2,7:1. Za kvalitní RNA vzorek možno považovat i vzorek s 28S:18S poměrem do 2:1. Ještě lepší údaj o kvalitě RNA ve vzorku je RIN, který je vypočten z celkové elektroforetické stopy RNA vzorku, včetně přítomnosti či nepřítomnosti degradačních produktů.

Pro měření celkové RNA ve vzorcích byl použit Agilent RNA 6000 Nano Kit, který má kvantitativní rozsah 25-500 ng/μl a bylo postupováno podle pokynů v Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide (Agilent Technologies, Inc., Stevens Creek Blvd Santa Clara, CA, USA, https://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G2938-90037_RNA6000Nano_QSG.pdf).

Nejprve byla nastavena stanice pro přípravu čipu – výměnou stříkačky za novou, umístěním podkladní desky do pozice „C“ a nastavením svorky stříkačky do nejvyšší pozice.

Pak byl připraven RNA ladder. Mikrozkumavka s RNA ladderem byla stočena, zahřána na 70°C na 2 minuty a pak ihned přemístěna na led. RNA ladder byl rozalikovtován a skladován při -70°C. Před použitím byl alikvot pomalu rozmražen na ledu.

Následovala příprava gelu. 550 μl gelové matrice pro RNA bylo napipetováno do rotačního filtru, který byl centrifugován při 1500 g po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Připravený gel byl rozalikovtován po 65 μl a skladován při 4°C. Pro zvýšení odezvy na detektoru se do gelu pro RNA analýzu přidává RNA barvivo. Roztok koncentráту RNA barviva byl nejdřív po dobu 30 minut temperován při laboratorní teplotě. Pak byl důkladně zvortexován po dobu 10 sekund a stočen na mikrocentrifuze. Do jednoho alikvotu gelu (65 μl) byl přidán 1 μl koncentráту RNA barviva. Tento mix byl poté důkladně zvortexován a stočen při 13000 g po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Je možno ho použít jen ten den, kdy byl připraven.

Nyní byl mix gelu a RNA barviva nanesen na RNA čip. Nový RNA čip byl umístěn do stanice pro přípravu čipu. Do pozice „bílý G v černém kruhu“ bylo napipetováno 9 μl mixu gelu a RNA barviva. Píst stříkačky byl natažen do pozice „1 ml“ a stanice pro přípravu čipu byla uzavřena. Píst byl následně zatlačen až po svorku a po přesně 30 sekundách uvolněn. Po 5 sekundách byl píst pomalu vytažen do původní polohy (1 ml), stanice pro přípravu čipu otevřena a do pozic označených „černý G v bílém poli“ bylo napipetováno po 9 μl gelu. Poté bylo do všech 12 pozic pro vzorky a do pozice pro ladder napipetováno po 5 μl RNA markeru. Do pozice „Ladder“ byl napipetován 1 μl z alikvotu RNA ladderu. Do pozic 1-12 byl napipetován 1 μl od každého vzorku. V případě, že se všechny pozice pro vzorky na daném čipu nevyužily, do volných pozic byl napipetován 1 μl RNA markeru. Nyní bylo potřeba zbavit se bublin vzniklých při pipetování a rozmístit tekutiny rovnoměrně po dně. To se dosáhlo na

IKA vortexu, na 2400 otáčkách po dobu 1 minuty. Čip byl pak ihned přenesen do přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer a bylo postupováno podle pokynů na obrazovce.

Změření koncentrace RNA na přístroji Qubit® 2.0 Fluorometer

Koncentrace RNA byla změřena pomocí kitu Qubit™ RNA Assay Kit, který umožňuje kvantifikaci RNA snadno a přesně. Je vysoce selektivní pro RNA a spolehlivě změří koncentrace v rozsahu 250 pg až 100 ng RNA v 1-20 µl vzorku. Intenzita signálu je závislá na teplotě a měření musí probíhat při laboratorní teplotě. Signál je stabilní 3 hodiny. Kit obsahuje koncentrát reagentie pro měření, pufr pro jeho zředění a předředěné RNA standardy pro kalibraci. Všechny reagentie musí být před měřením vytemperovány na laboratorní teplotu. Bylo postupováno podle protokolu poskytnutého výrobcem. (Qubit™ RNA Assay Kits, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA, <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp32852.pdf>)

Nejprve byl připraven do plastové zkumavky pracovní roztok pro Qubit zředěním koncentrátu RNA reagentie RNA pufrém v poměru 1:200 v množství 200 µl pro každý vzorek a standard. Pro každý měřený vzorek a dva standardy byla připravena 500 µl mikrozkušavka pro PCR. Oba kalibrační standardy byly připraveny smícháním 10 µl roztoku standardu se 190 µl pracovního roztoku. Všechny vzorky byly připraveny smícháním 1 µl vzorku se 199 µl pracovního roztoku, promíchány na vortexu a inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 2 minut. Na přístroji byl vybrán program „RNA“ a bylo postupováno podle instrukcí na obrazovce.

4.1.4 Příprava miRNA knihovny pro NGS

Aby bylo možné RNA osekvenovat pomocí NGS, je nutné z izolované RNA vytvořit knihovny. Pro přípravu knihoven byly využity komerční kity NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (Set 1) a NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (Set 2), oba pro 24/96 reakcí. (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) Postupovalo se podle návodu poskytnutého výrobcem, který je dostupný online (<https://www.neb.com/products/e7300-nebnext-multiplex-small-rna-library-prep-set-for-illumina-set-1>). Postup byl stejný pro všechny vzorky.

Pro přípravu jedné miRNA knihovny těmito kity je nutno použít 100 ng až 1 µg celkové RNA, v této aplikaci bylo použito 500 ng. Výsledný objem roztoku celkové RNA se rovnal 6 µl a výsledná koncentrace RNA byla 83,3 ng/µl.

4.1.4.1 Ligace 3' SR adaptéru

Prvním krokem při přípravě NGS knihovny je ligace 3' adaptéru. K 6 µl roztoku RNA v sterilní, nukleáz prosté PCR mikrozkuhavce (celkový objem 200 µl) byl přidán 1 µl 3' SR adaptéru pro platformu Illumina. Tento roztok byl následně inkubován při 70°C v předeřátém termálním cykléru (MJ Research PTC-225 Peltier Thermo Cycler DNA Engine Tetrad, MJ Research Inc., Quebec, Canada) po dobu 2 minut. Ihned poté byly mikrozkuhavky přeneseny na led.

Dále bylo ke každému vzorku přidáno 10 µl pufru pro 3' ligaci (2X) a 3 µl roztoku enzymu pro 3' ligaci. Celkový objem v každé mikrozkuhavce nyní činil 20 µl. Pro zvýšení efektivity ligace 3' adaptéru i za cenu vytvoření konkatamerů (Konkatamer je dlouhá, celistvá molekula DNA, která obsahuje vícero kopie stejné DNA sekvence za sebou) byla použita delší inkubace při snížené teplotě (18 hodin, 16°C).

Použité kity využívají specificky chemicky upravené adaptéry, které se vážou jen na ty molekuly RNA, které mají na 5' konci fosfokupinu a na 3' konci hydroxylovou skupinu. Do této skupiny RNA molekul patří i miRNA (spolu s siRNA, piRNA, a.i.), která tvoří její podstatou část. 5'-fosfokupina a 3'-hydroxyskupina vznikla v důsledku procesů, kterými se tyto molekuly RNA v buňce vytváří. Díky těmto úpravám jsou adaptéry přímo a specificky navázány i na molekuly miRNA a tak dochází k separaci miRNA od mRNA z celkové, vyizolované RNA (mRNA má 5'-čepičku a 3'-polyadeninový konec).

4.1.4.2 Hybridizace reverzního transkripčního primeru

Tento krok je důležitý pro zabránění vytvoření adaptér-dimerů. SR RT primer se hybridizuje i k přebytku 3' SR adaptéru, který zůstal volný po 3' ligaci a tím se změní jednovláknová molekula DNA adaptoru na dvouvláknovou. Dvouvláknové DNA už nejsou substráty pro enzym T4 RNA ligázu 1 a tedy se neligují k 5' SR adaptéru v dalším legačním kroku.

U každého vzorku z předchozího kroku bylo k legačnímu roztoku přidáno 4,5 µl vody pro PCR a 1 µl SR RT primeru pro platformu Illumina a důkladně promícháno pipetováním. Celkový objem u každého vzorku nyní činil 25,5 µl. Následně byly vzorky zahřány na

termálním cykléru na 75°C po dobu 5 minut, poté zchlazeny na 37°C na dobu 15 minut a poté ještě jednou zchlazeny na 25°C na 15 minut.

4.1.4.3 Ligace 5' SR adaptéru

5' SR adaptér byl resuspendován ve 120 µl vody pro PCR. Do samostatné, nukleáz prosté PCR mikrozkušavky bylo přepipetováno 1,1 N µl roztoku 5' SR adaptéru, kde N bylo rovné počtu vzorků v daném experimentu. Tento alikvot byl dále inkubován v termálním cykléru při 70°C po dobu 2 minut, pak ihned přenesen na led a použit do 30 minut od denaturace.

Ke každému vzorku z předchozího kroku byl přidán 1 µl denaturovaného roztoku 5' SR adaptéru, 1 µl pufru pro 5' ligační reakci (10x), 2,5 µl roztoku enzymu pro 5' ligační reakci a obsah mikrozkušavek byl důkladně promíchán pipetováním. Celkový objem v každé mikrozkušavce nyní činil 30 µl. Vzorky byly inkubovány v termálním cykléru při 25°C po dobu 60 minut.

4.1.4.4 Reverzní transkripce

Ke každému vzorku z předchozího kroku bylo přidáno 8 µl pufru pro syntézu prvního vlákna, 1 µl myšího inhibitoru RNáz, 1 µl roztoku reverzní transkriptázy ProtoScript II a důkladně promícháno pipetováním. Celkový objem každého vzorku nyní činil 40 µl. Vzorky byly inkubovány v termálním cykléru při 50°C po dobu 60 minut a ihned poté byla provedena PCR amplifikace.

4.1.4.5 PCR amplifikace

Ke každému vzorku z předchozího kroku bylo přidáno 50 µl master mixu LongAmp Taq 2x, 2,5 µl SR primeru pro platformu Illumina, 5 µl vody pro PCR a 2,5 µl specifického indexovacího primeru, pro každý vzorek jiný a důkladně promícháno pipetováním. Celkový objem každého vzorku nyní činil 100 µl. Na termálním cykléru byl nastaven následující program (Tab.3).

Činnost	Teplota	Trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94°C	30 sec	1
Denaturace	94°C	15 sec	14
Hybridizace	62°C	30 sec	
Prodloužení (syntéza DNA)	70°C	15 sec	
Finální prodloužení	70°C	5 min	1
Zastavení	4°C	∞	

Tab. 3: Program nastaven na termálním cykléru.

Použití různých indexovacích primerů pro každý vzorek umožnilo multiplexing, což znamená, že knihovny připravené z jednotlivých vzorků mohou být jednoznačně identifikovány pomocí sekvence 6 nukleotidů, která je jiná v každém indexovacím primeru a tedy i ve všech knihovnách z určitého vzorku. Díky této možnosti jednoznačné identifikace mohou být knihovny z jednotlivých vzorků spolu smíchány, aniž by se ztratil údaj o jejich původu. Smíchání ekvimolárních množství knihoven z jednotlivých vzorků po indexaci se označuje jako pooling.

Ekvimolární množství knihoven z jednotlivých vzorků je potřebné dosáhnout za účelem jejich rovnoměrného zastoupení v průtokové cele při sekvenování. Pokud by ekvimolární zastoupení nebylo dosaženo, knihovny s vyšší koncentrací by byly osekvenovány mnohokrát na úkor těch s nižší koncentrací, čímž by byla ovlivněna celková výpovědní hodnota celého sekvenování.

4.1.4.6 Změření koncentrace připravených cDNA knihoven

Pro kontrolu kvality připravených cDNA knihoven byl použit Agilent DNA 1000 Kit a přístroj Agilent 2100 Bioanalyzer. Bylo postupováno podle pokynů v Agilent DNA 1000 Kit Guide (Agilent Technologies, Inc., Stevens Creek Blvd Santa Clara, CA, USA, <http://sydney.edu.au/medicine/bosch/facilities/molecular-biology/nucleic-acid/DNA1000%20kit%20Guide.pdf>).

Agilent DNA čip funguje na stejném principu jako Agilent RNA kit. Každý DNA čip obsahuje navzájem přepojenou soustavu mikrokanálků, díky kterým se fragmenty DNA elektroforeticky rozseparují na základě jejich velikosti. Agilent DNA 1000 kit byl vybrán, protože poskytuje vyšší rozlišení menších fragmentů v porovnání s ostatními Agilent separačními DNA kity. Jeho rozsah je 25 – 1000 párů bazí.

Nejprve byla nastavena stanice pro přípravu čipu – výměnou stříkačky za novou, umístěním podkladní desky do pozice „C“ a nastavením svorky stříkačky do nejnižší pozice.

Pro zvýšení odezvy na detektoru se do gelu pro DNA analýzu přidává DNA fluorescenční barvivo. Roztok koncentráту DNA barviva byl nejdřív po dobu 30 minut temperován při laboratorní teplotě. Pak byl důkladně zvortexován po dobu 10 sekund a stočen na mikrocentrifuze. Poté bylo přidáno 25 μ l koncentráту DNA barviva do mikrozkuhavky s DNA gelovou maticí. Tento mix byl poté důkladně zvortexován, stočen a přenesen do rotačního filtru, který byl centrifugován při 2240 g po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Tento mix byl uchováván při 4°C a chráněn před světlem.

Mix gelu a DNA barviva byl ponechán při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Nový DNA čip byl umístěn do stanice pro přípravu čipu. Do pozice „bílý G v černém kruhu“ bylo napipetováno 9 μ l mixu gelu a DNA barviva. Píst stříkačky byl natažen do pozice „1 ml“ a stanice pro přípravu čipu byla uzavřena. Píst byl následně zatlačen až po svorku a po přesně 60 sekundách uvolněn. Po 5 sekundách byl píst pomalu vytažen do původní polohy (1 ml), stanice pro přípravu čipu otevřena a do pozic označených „černý G v bílém poli“ bylo napipetováno po 9 μ l gelu. Poté bylo do všech 12 pozic pro vzorky a do pozice pro ladder napipetováno po 5 μ l DNA markeru. Do pozice „Ladder“ byl napipetován 1 μ l DNA ladderu. Do pozic 1-12 byl napipetován 1 μ l od každého vzorku. V případě, že se všechny pozice pro vzorky na daném čipu nevyužily, do volných pozic byl napipetován 1 μ l vody pro PCR. Nyní bylo potřeba zbavit se bublin vzniklých při pipetování a rozmístit tekutiny rovnoměrně po dně. To se dosáhlo na IKA vortexu, na 2400 otáčkách po dobu 1 minuty. Čip byl pak ihned přenesen do přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer a bylo postupováno podle pokynů na obrazovce.

Při následné analýze dat byla provedena relativní kvantifikace připravených knihoven pomocí software přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer. Tento software umožňuje relativní kvantifikaci jednotlivých píků nukleových kyselin či proteinů, v tomto případě DNA. Relativní kvantifikace je provedena pomocí horního markeru, kterého koncentrace je známá a tedy plocha jeho píku může být porovnána s vybraným píkem, z které může být vypočtena koncentrace vybraného fragmentu v měřeném vzorku.

4.1.4.7 Selektce podle velikosti na 4% agarozovém gelu

I přes snahu výrobců i uživatelů o minimalizování nežádoucích produktů při přípravě knihoven (duplexy primerů, přebytky primerů, defektní či neúplné knihovny, knihovny připravené z fragmentů jiných typů RNA než miRNA a piRNA, atd.) se tyto vyskytují v nezanedbatelném množství. Pro co nejvyšší kvalitu sekvenování je nutné oddělit knihovny připravené z miRNA od ostatních fragmentů nukleových kyselin. Za předpokladu, že miRNA

u lidí mají nejčastěji délku 22 nukleotidů, očekávaná délka připravené knihovny je 141 nukleotidů.

Vzhledem k tomu, že při přípravě knihoven z jednotlivých vzorků byly použity indexovací primery, bylo nyní možno smíchat ekvimolární množství knihoven z jednotlivých vzorků do jediné mikrozkušavky a separovat je na gelu společně. Relativní koncentrace DNA v knihovnách u jednotlivých vzorků byly vypočteny při kontrole kvality knihoven na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer z plochy píku s maximem při 141 pářů bází (Blíže popsáno v kapitole 4.1.3.1).

Nejprve bylo v 250 ml Erlenmeyerově baňce odváženo na předvážkách 8 g agarózy pro molekulární biologii (Merck KGaA, Darmstadt, Německo), která byla zalita 200 ml TAE pufru (1×) (Merck KGaA, Darmstadt, Německo) a inkubována 1 hodinu při 4°C. Poté byla tato směs zahřána v mikrovlnce a za občasného míchání dokonale rozpuštěna. V tomto kroku je důležité dát pozor, aby směs při zahřívání v mikrovlnce nepřetekla ven z baňky. Následně bylo do právě připraveného gelu přidáno 8 µl 1% (w/v) vodního roztoku ethidium bromidu (Merck KGaA, Darmstadt, Německo) a důkladně promícháno točivým pohybem. Zatímco gel chladl bez přístupu světla z bodu varu na zhruba 60°C, byla připravena vanička z elektroforetické cely. Protilehlé stěny byly zajištěny papírovou lepicí páskou, čímž se vytvořila nádobka, do které byl nalit gel. Ihned po nalití gelu byl vložen hřebínek (šířka jamky 5 mm) a pomocí 200 µl špičky odstraněny bubliny. Po 30 minutách byl ze ztuhlého gelu hřebínek opatrně vyjmut, vanička přesunuta do elektroforetické cely, která byla poté naplněna TAE puftrem (1×) až po značku. Ke smíchaným vzorkům bylo přidáno 8 µl 6× Orange DNA loading dye (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) a tento roztok (celkový objem 55 µl) byl rozpipetován do tří jamek v gelu – 2, 4 a 6. Do jamky 1 a 5 bylo napipetováno 7,5 µl O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder, Ready-to-Use 20-300 bp a do jamky 3 stejné množství O'GeneRuler Low Range DNA Ladder, Ready-to-Use 25-700 bp (oba od Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA). Pak byla elektroforetická cela připojena k zdroji napětí (120 V) a spuštěna v chladicí místnosti (4°C) na 3,5 hodiny.

4.1.4.8 Separace a extrakce knihoven z gelu

Po proběhnutí elektroforézy byla elektroforetická vana odpojena od zdroje napětí, vanička s gelem vyjmuta a gel přemístěn na UV transiluminátor. Při práci s gelem na transiluminátoru je potřebné chránit kůži a zrak před UV zářením, čehož bylo dosaženo pomocí laboratorního pláště a ochranného štítu na tvář s UV filtrem.

Protože předpokládaná délka připravených knihoven byla 141 nukleotidů, z gelu byly jednorázovým skalpelem vyřezány obdélníky v liniích 2, 4 a 6 mezi pruhem 140 ladderu

O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder, Ready-to-Use 20-300 bp a pruhem 150 ladderu O'GeneRuler Low Range DNA Ladder, Ready-to-Use 25-700 bp a přeneseny do předem zvážené, nukleáz prosté 1,5 ml mikrozkušavky (kap. 4.2.3, obr.). Zbytky gelu byly vyhozeny do nebezpečného odpadu a všechny povrchy, které přišly do styku s ethidium bromidem, byly vyčištěny 70% roztokem ethanolu.

Poté následovala extrakce knihoven z gelu, pro kterou byl využit kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Německo) a bylo postupováno podle návodu v QIAquick Spin Handbook (<http://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=3987caa6-ef28-4abd-927e-d5759d986658&lang=en>). Qiaquick systém kombinuje výhody rotační kolonky se selektivními vázacími vlastnostmi speciálně navržené křemíkové membrány. Pufry v každém kitu jsou optimalizovány pro efektivní znovuzískání DNA a odstranění nečistot při každé aplikaci. Při vysoké iontové síle a zvýšeném pH roztoku se DNA adsorbuje na křemíkovou membránu, zatímco kontaminanty projdou skrz. Po efektivním odstranění nečistot je čistá DNA vyeluována Tris pufrem nebo vodou. Křemíková membrána QIAquick je jedinečně navržena pro purifikaci DNA z vodních roztoků i agarózových gelů, přičemž na jednu kolonku se může navázat až 10 µg DNA. Vázací pufr v QIAquick kitech poskytuje optimální koncentraci chaotropických solí (dokážou přerušit vodíkové vazby mezi molekulami vody) a pH pro adsorpci DNA na QIAquick membránu. Adsorpce DNA na křemíkovou membránu závisí také na pH, kdy při pH 7,5 dosahuje 95% a při vyšším pH je značně snížena. Všechny QIAquick kity obsahují stejnou QIAquick rotační kolonku a jednotlivé pufry jsou optimalizovány pro danou aplikaci. Pufr QG v QIAquick Gel Extraction kitu rozpouští agarózové gel a poskytuje vhodné podmínky pro navázání DNA na křemíkovou membránu. QG pufr obsahuje i integrovaný pH indikátor, který je při pH ≤ 7,5 žlutý. Pokud je pH vyšší než 7,5, barva roztoku se změní na oranžovou až fialovou. V takovém případě může být pH roztoku upravena pomocí malého objemu 3 molárního roztoku acetátu sodného (pH 5.0). pH indikátor nijak neinterferuje s DNA adsorpcí a je kompletně odstraněn při promývacím kroku. Na křemíkovou membránu se nenavážou primery, ionty, enzymy, nukleotidy, agaróza, barviva, ethidium bromid, oleje ani detergenty a jejich kvantitativní odstranění je zajištěno ethanol obsahujícím pufrem PE v promývacím kroku.

QIAquick Gel Extraction Kit je navržen pro extrakci a purifikaci DNA fragmentů o velikosti 70 až 10 000 párů bazí z agarózových gelů v TAE nebo TBE pufru. V jedné kolonce může být zpracováno maximálně 400 mg gelu. Před samotným zahájením extrakce bylo do PE pufru přidáno 80 ml 99.5% ethanolu a otáčky centrifugy nastaveny na 14 000 g, při kterých probíhala každá centrifugace v tomto protokolu.

Po vyřezání a přenesení kousků gelu s cDNA knihovnami do 1,5 ml předem zvážené, nukleáz prosté mikrozkušavky, byla zjištěna hmotnost gelu. Následně byl přidán trojnásobný

objem pufru QG, kde 100 mg gelu $\approx$ 100 μ l QG pufru. Směs QG pufru a gelu byla umístěna na vortex (Eppendorf MixMate Vortex Mixer, Eppendorf AG, Hamburg, Německo) a při 300 otáčkách / min. byl gel za laboratorní teploty do 10 minut dokonale rozpuštěn. Barva roztoku byla žlutá, žádná úprava pH nebyla provedena. Poté byl do roztoku přidán isopropanol v objemu stejném, jako měl původní gel (100 mg gelu $\approx$ 100 μ l isopropanolu) Tento krok zvyšuje výtěžek DNA fragmentů menších než 500 párů bází a větších než 4000 párů bází. Maximální objem roztoku, který možno nepipetovat do kolonek je podle výrobce 800 μ l, ale vzhledem k praxi doporučuji nepipetovat maximálně 750 μ l, aby se předešlo zbytečným ztrátám. Objem roztoku s isopropanolem byl větší, než maximální plnicí objem kolonky, takže po první centrifugaci byl napipetován zbytek roztoku do té samé kolonky a centrifugován ještě jednou 1 minutu. Po každé centrifugaci byl filtrát vyhozen a kolonka umístěna zpět do té samé 2 ml sběrné mikrozkušavky. Následovalo promytí pomocí 750 μ l PE pufru, který byl napipetován na kolonku v sběrné mikrozkušavce, která byla ponechána při laboratorní teplotě po dobu 5 minut a až poté centrifugována 1 minutu. Pak byl filtrát vyhozen, kolonka umístěna zpět do sběrné mikrozkušavky a centrifugována ještě jednou 1 minutu za účelem odstranění zbytkového ethanolu z PE pufru, který by mohl interagovat s dalšími kroky pokusu. Poté následovala eluce. Kolonka byla přemístěna do nové 1,5 ml mikrozkušavky a do středu QIAquick membrány napipetováno 30 μ l vody pro PCR tak, aby byla rozlita po celé ploše membrány. Po 1 minutě stání při laboratorní teplotě byla kolonka 1 minutu centrifugována. Efektivita eluce je závislá na pH, kde maximální efektivita eluce je dosažena v intervalu pH 7,0 až 8,5 a tedy eluční roztok či voda musí mít pH v tomto intervalu. Následně byla kolonka vyhozena a s extrahovanými a přečištěnými knihovnami se pokračovalo v dalším kroku.

4.1.4.9 Finální kontrola a kvantifikace knihoven

Kontrola knihoven po extrakci z gelu byla provedena na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer pomocí Agilent DNA 1000 Kitu. Bylo postupováno stejně, jako je uvedeno v kapitole 4.1.4.6 Kontrola kvality připravených cDNA knihoven, podle pokynů v Agilent DNA 1000 Kit Guide (Agilent Technologies, Inc., Stevens Creek Blvd Santa Clara, CA, USA, <http://sydney.edu.au/medicine/bosch/facilities/molecular-biology/nucleic-acid/DNA1000%20kit%20Guide.pdf>).

Kvantifikace knihoven byla provedena na přístroji Qubit 2.0 Fluorometer pomocí kitu Qubit® dsDNA HS Assay Kit, který umožňuje kvantifikaci DNA snadno a přesně. Je vysoce selektivní pro dvouvláknovou DNA a spolehlivě změří koncentrace v rozsahu 10 pg až 100

ng RNA v 1-20 µl vzorku. Intenzita signálu je závislá na teplotě a měření musí probíhat při laboratorní teplotě. Signál je stabilní 3 hodiny. Kit obsahuje koncentrát reagentie pro měření, pufr pro jeho zředění a předředěné RNA standardy pro kalibraci. Všechny reagentie musí být před měřením vytemperovány na laboratorní teplotu. Bylo postupováno podle protokolu poskytnutého výrobcem. (Qubit™ dsDNA HS Assay Kits, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA, <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp32851.pdf>).

Nejprve byl připraven do plastové zkumavky pracovní roztok pro Qubit zředěním koncentrátu dsDNA HS reagentie dsDNA HS pufrém v poměru 1:200 v množství 200 µl pro každý vzorek a standard. Pro oba měřené vzorky a dva standardy byla připravena 500 µl mikrozkušavka pro PCR. Oba kalibrační standardy byly připraveny smícháním 10 µl roztoku standardu se 190 µl pracovního roztoku. Oba vzorky byly připraveny smícháním 1 µl vzorku se 199 µl pracovního roztoku, promíchány na vortexu a inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 2 minut. Na přístroji byl vybrán program „DNA“, poté „dsDNA High Sensitivity“ a následně bylo postupováno podle instrukcí na obrazovce.

Zjištěné hmotnostní koncentrace byly přepočítány na molární koncentraci pomocí vztahu

$$\frac{\text{Koncentrace v ng / } \mu\text{l} \times 10^6}{(660 \text{ g / mol} \times \text{průměrná délka knihovny v párech bází})} = \text{koncentrace v nM,}$$

kde za průměrnou délku knihovny v párech bází bylo dosazeno 150.

4.1.5 Úpravy knihoven před sekvenováním

Pro dosažení sekvenačních dat nejvyšší kvality je důležité vytvořit optimální hustotu klastrů v každé linii průtokové cely. Před sekvenováním je tedy potřebné nejdříve připravené knihovny kvantifikovat, denaturovat na jednotlivá vlákna DNA a vhodně je naředit, aby byla dosažena správná hustota clusterů na průtokové cele. Na rozdíl od přístroje MiSeq, námi využitý přístroj HiSeq 2000 je neschopen provést i amplifikaci před sekvenováním, proto se pro tento úkol využívá přístroj cBot (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA).

4.1.5.1 Denaturace a ředění

Nejprve byly knihovny zředěny TE pufrém laboratorní teploty na koncentraci 2 nM, roztok krátce zvortexován a stočen na stolní mikrocentrifuze. Dále byly připraveny roztoky pro denaturaci a další ředění. Nejdříve byl hybridizační pufr HT1 rozmražen při laboratorní

teplotě a po rozmražení přemístěn do 4°C. Poté byl připraven 1 ml čerstvého roztoku hydroxidu sodného (NaOH) s koncentrací 0,1 M smícháním 100 µl 1 M zásobního roztoku NaOH s 900 µl vody pro PCR. Společnost Illumina důrazně doporučuje před každou denaturací knihoven připravit čerstvý roztok 1M NaOH. Roztok NaOH může být použit po dobu 12 hodin od přípravy.

Knihovny byly dále denaturovány a zředěny na 20 pM. 10 µl 2 nM roztoku knihoven bylo smícháno v 1,5 ml mikrozkuhavce s 10 µl 0,1 M roztoku NaOH, výsledný roztok krátce zvortexován a stočen při 280 g po dobu 1 minuty. Poté byl roztok inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 980 µl předchlazeného hybridizačního roztoku HT1 a roztok s knihovnami umístěn na led. Pro sekvenování miRNA knihoven byla navržena výsledná koncentrace 6 pM, které bylo dosaženo smícháním 300 µl 20 pM roztoku knihoven se 700 µl předchlazeného hybridizačního roztoku HT1 v 1,5 ml mikrozkuhavce. Výsledný roztok byl promíchán otočením a krátce stočen na stolní centrifuze. Maximální koncentrace NaOH v konečném roztoku může být nejvíc 1 mM.

4.1.5.2 PhiX Spike-In

Denaturovaná Phix kontrola byla připravena stejným postupem jako knihovny – denaturována 0,1 M roztokem NaOH a zředěna hybridizačním pufr HT1 na výslednou koncentraci 6 pM. K 900 µl roztoku zdenaturovaných knihoven bylo přidáno 100 µl roztoku zdenaturované kontroly PhiX, výsledný roztok promíchán otočením, krátce stočen na stolní centrifuze a umístěn na led. Následně byl připraven PCR strip z mikrozkuhovek o objemu 200 µl, mikrozkuhavky očíslovány a do každé z mikrozkuhovek bylo napipetováno 120 µl roztoku knihoven a PhiX kontroly. Celý strip byl poté umístěn na led.

4.1.5.3 cBot

Generace klastrů byla provedena na přístroji cBot pomocí kitu TruSeq SR Cluster Kit v3 (cBot - HS) (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Na přístroji byl nejprve spuštěn úvodní promývací program a po dobu jeho běhu byly rozmrazeny reagenty na laboratorní teplotu. Po proběhnutí promývání bylo postupováno podle instrukcí přístroje a vybrán správný protokol, vložen zásobník s reagenty, čistá průtoková cela, průtokové hadičky a strip s knihovnami. Poté byla zvolena kontrola před během, zda je vše na místě a připraveno. Poté proběhl program generace klastrů, po kterém byla průtoková cela vyjmuta z přístroje a uskladněná v 50 ml flakonci ve skladovacím pufru. Na závěr proběhla kontrola úspěšnosti

běhu a promývání. Optimální hustota klastrů pro sekvenování na přístroji HiSeq 2000 je zhruba 1000 na mm².

4.1.6 Sekvenování

Sekvenování bylo provedeno na přístroji HiSeq 2000 pomocí kitu TruSeq SBS Kit v3 - HS (50 Cyklů) (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Nejprve byly připraveny, rozmrazeny a promíchány všechny reagencie potřebné pro sekvenování. Poté byly prostřednictvím software přístroje zadány parametry daného běhu a podle dalších instrukcí přístroje vložena kazeta s reagenciemi pro sekvenování. Následně byla do přístroje vložena použitá průtoková cela a za pomoci kontrolní kapaliny zkontrolována správná činnost průtokového systému. Při nahrazení kontrolní kapaliny reagenciemi pro sekvenování byl zkontrolován i mrtvý objem. Nyní byla použitá průtoková cela vyměněna za námi připravenou na přístroji cBot, opět byl zkontrolován správný průtok v systému a spuštěn sekvenační běh, který byl sledován v reálném čase na obrazovce přístroje. Po proběhnutí sekvenování byl spuštěn promývací program a u reagentů vyjmutých z přístroje byl zkontrolován úbytek jejich objemu.

4.1.7 Zpracování a úprava sekvenačních dat

Data získaná v sekvenačním runu byla poslána k vyhodnocení bioinformatikovi Mgr. Tomáši Novosádovi, který provedl po všech potřebných úpravách dat a identifikaci všech přítomných transkriptů miRNA diferenční expresní analýzu mezi skupinami C/TEP a P1 pomocí software DESeq2 za využití superpočítače Anselm, který je pod správou vysokoškolského ústavu IT4Innovations Technické Univerzity Báňské - Technické univerzity v Ostravě, Ostrava, Česká republika. ^(Love, Huber, Anders, 2014)

4.2. Výsledky

4.2.1 Změření kvality a kvantity izolované RNA

Změřené hodnoty kvality a kvantity izolované RNA z přístrojů Agilent 2100 Bioanalyzer a Qubit® 2.0 Fluorometer jsou uvedeny v tabulce (tab. 4). S ohledem na použitý kit, pro přípravu knihoven bylo zvoleno počáteční množství 500 ng RNA, což byla polovina maximálního počátečního množství pro daný kit. Protože maximální vstupní objem RNA vzorku byl výrobcem kitu stanoven na 6 µl, minimální koncentrace RNA vzorku mohla být 83,3 ng / µl. Vzhledem k tomu, že 7 vzorků nedosahovalo této koncentrace, byly zakonzentrovány na přístroji Eppendorf centrifugal vacuum concentrator, model 5301 (Eppendorf AG, Hamburg, Německo). Pokud zakonzentrování snížilo objem vzorku pod 6 µl, vzorek byl do tohoto objemu doplněn vodou pro PCR.

Označení vzorku	Koncentrace RNA (ng / µl) (Qubit)	RIN 1	RIN 2	Celková RNA (µg)	Objem 500 ng RNA (µl)	Využití Koncentrátoru	Objem 500 ng RNA 2 (µl)
T4	360,0	8,1	8,5	35,28	1,39	Ne	-
T9	222,5	8,0	8,2	21,80	2,25	Ne	-
T73	49,1	7,4	N/A	2,45	10,18	Ano	5,8
T89	73,0	7,7	N/A	3,65	6,85	Ano	5,7
T97	255,0	7,0	8,4	12,75	1,96	Ne	-
T102	20,8	7,6	3,3	2,04	24,04	Ano	6,0
T131	21,0	8,1	7,6	2,06	23,81	Ano	5,9
T1215	56,0	7,8	7,1	5,49	8,93	Ano	4,5
T118	49,4	7,2	8,7	2,47	10,12	Ano	5,3
T134	45,7	6,6	N/A	2,28	10,95	Ano	6,0
T136	162,5	7,8	8,7	8,12	3,08	Ne	-
T139	188,0	8,3	N/A	18,42	2,66	Ne	-
T140	129,0	8,4	9,0	12,64	3,88	Ne	-
T142	300,0	7,6	8,2	29,40	1,67	Ne	-
T1203	285,0	8,6	8,5	27,93	1,75	Ne	-
T1209	139,5	6,8	8,0	13,67	3,58	Ne	-
T1248	260,0	8,2	9,1	13,00	1,92	Ne	-

Tab. 4: Změřené hodnoty kvality a kvantity izolované RNA z přístrojů Agilent 2100 Bioanalyzer a Qubit® 2.0 Fluorometer. Kvalita RNA byla stanovena dvakrát, poprvé ihned po izolaci (RIN 1) a podruhé těsně před přípravou knihoven (RIN 2). Průměrná koncentrace RNA byla 153,9 ng / µl (20,8; 360,0), průměrný RIN byl 7,9 (3,3; 9,1) a průměrná celková RNA byla 12,56 µg (2,04; 35,28). U některých vzorků nebyl při měření kvality RNA před přípravou knihoven změřen RIN. RIN je vypočítáván pomocí software přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer z celkové elektroforetické křivky, které kvalita nebyla u těchto vzorků pro

spolehlivé určení RIN dostatečná. U vzorku T102 byl změřen RIN = 3,3, avšak tento výsledek byl vyhodnocen jako hrubá chyba a statisticky vyloučen. Objem 500 ng RNA 2 označuje objem daného vzorku po zakoncentrování.

4.2.2 Kvantifikace připravených knihoven

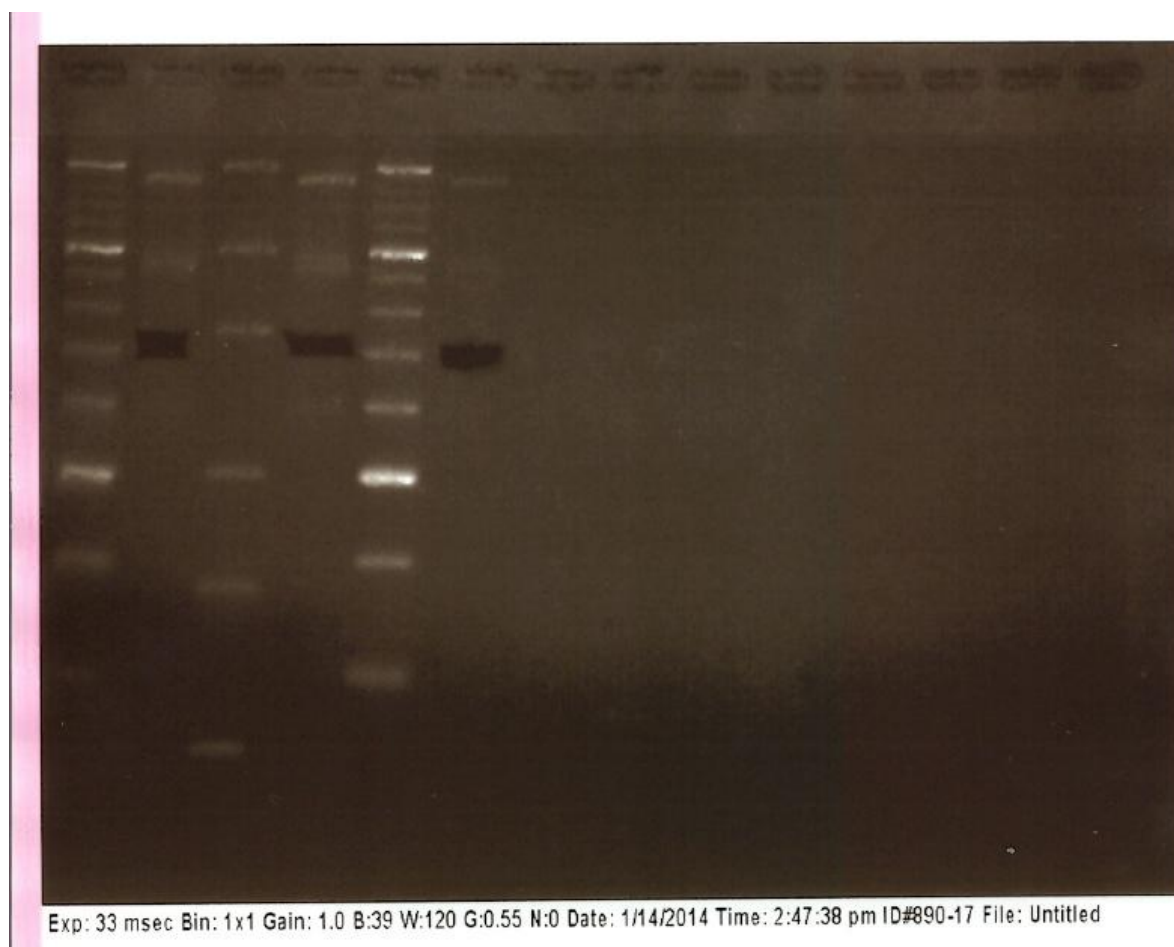
Kvantifikace připravených knihoven byla provedena na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer a jeho software. Změřené údaje a použité indexy pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 5). Ekvimolární množství každé knihovny bylo na základě diskuze zvoleno na 4,5 ng.

Skupina	Označení vzorku	NEBNext index pro Illuminu	Sekvence indexu	Koncentrace připravených knihoven (ng / μ l)	Objem 4,5 ng knihoven (μ l)
P1	T4	10	TAGCTT	3,12	1,44
P1	T9	11	GGCTAC	3,20	1,41
P1	T73	14	AGTTCC	9,02	0,50
P1	T89	15	ATGTCA	5,80	0,78
P1	T97	16	CCGTCC	0,74	6,08
P1	T102	12	CTTGTA	2,30	1,96
P1	T131	13	AGTCAA	1,60	2,81
P1	T1215	17	GTAGAG	1,21	3,72
C/TEP	T118	1	ATCACG	3,47	1,30
C/TEP	T134	2	CGATGT	0,33	13,64
C/TEP	T136	3	TTAGGC	7,58	0,59
C/TEP	T139	4	TGACCA	2,74	1,64
C/TEP	T140	5	ACAGTG	1,23	3,66
C/TEP	T142	6	GCCAAT	1,65	2,73
C/TEP	T1203	7	CAGATC	2,87	1,57
C/TEP	T1209	8	ACTTGA	2,52	1,79
C/TEP	T1248	9	GATCAG	4,11	1,09

Tab. 5: Změřené údaje při kvantifikaci knihoven. Průměrná koncentrace připravených knihoven byla 3,15 ng / μ l (0,33; 9,02). Neobvyklé řazení indexů bylo způsobeno jiným pořadím vzorků při přípravě knihoven.

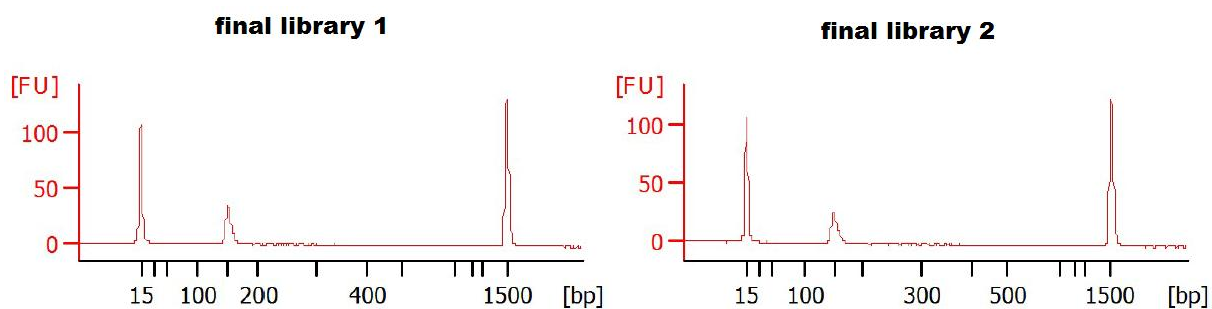
4.2.3 Extrakce knihoven z gelu, jejich finální kontrola a kvantifikace

Po elektroforetické separaci připravených a přečištěných knihoven na 4% agarózovém gelu, byly z něho jednorázovým skalpelem vyřezány obdélníky v liniích 2, 4 a 6 mezi pruhem 140 ladderu O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder, Ready-to-Use 20-300 bp a pruhem 150 ladderu O'GeneRuler Low Range DNA Ladder, Ready-to-Use 25-700 bp (Obr. 5).



Obr. 5: Fotografie 4% agarózového gelu, z kterého byly vyřezány obdélníky v liniích 2, 4 a 6 mezi pruhem 140 ladderu O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder, Ready-to-Use 20-300 bp a pruhem 150 ladderu O'GeneRuler Low Range DNA Ladder, Ready-to-Use 25-700 bp.

Po extrakci knihoven z gelu byly tyto ještě jednou zkontrolovány na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer. Změřené elektroforetické křivky jsou na obrázku (Obr. 6).

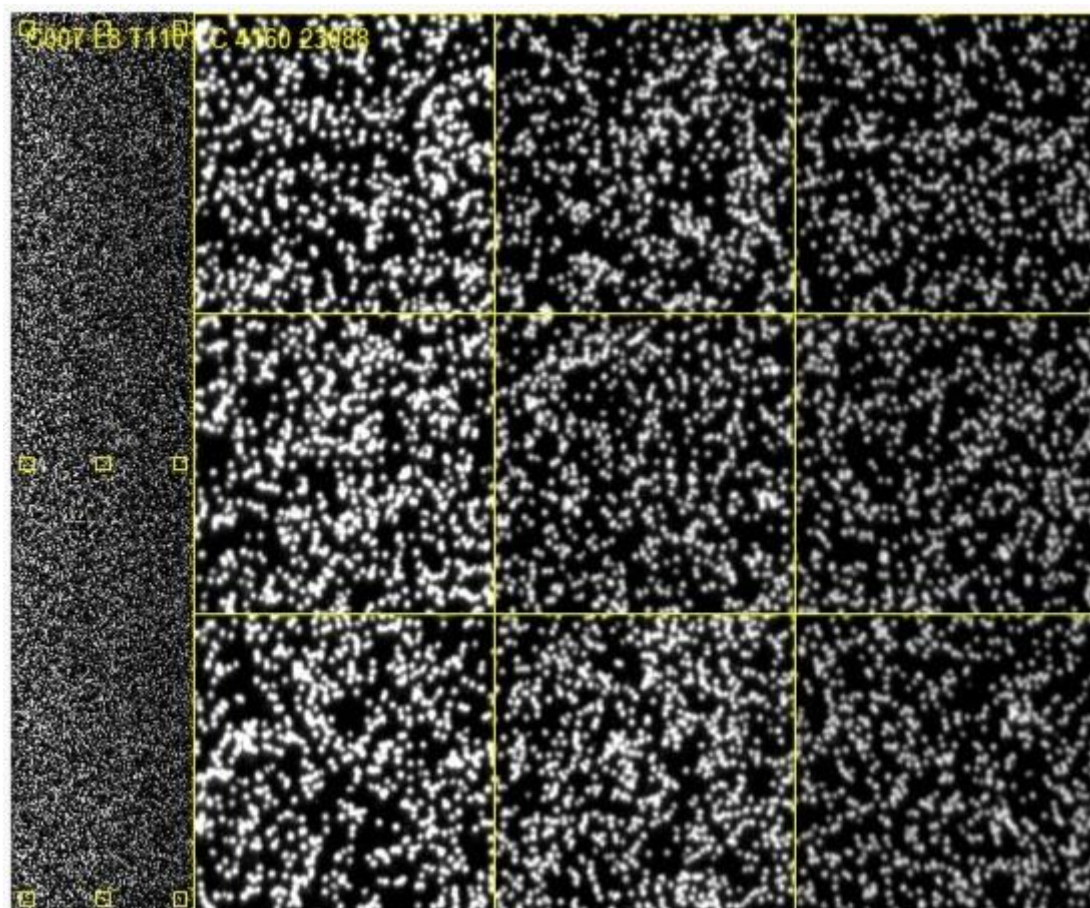


Obr. 6: Změřené elektroforetické křivky finální kontroly knihoven. Knihovny byly změřeny ze statistických důvodů dvakrát

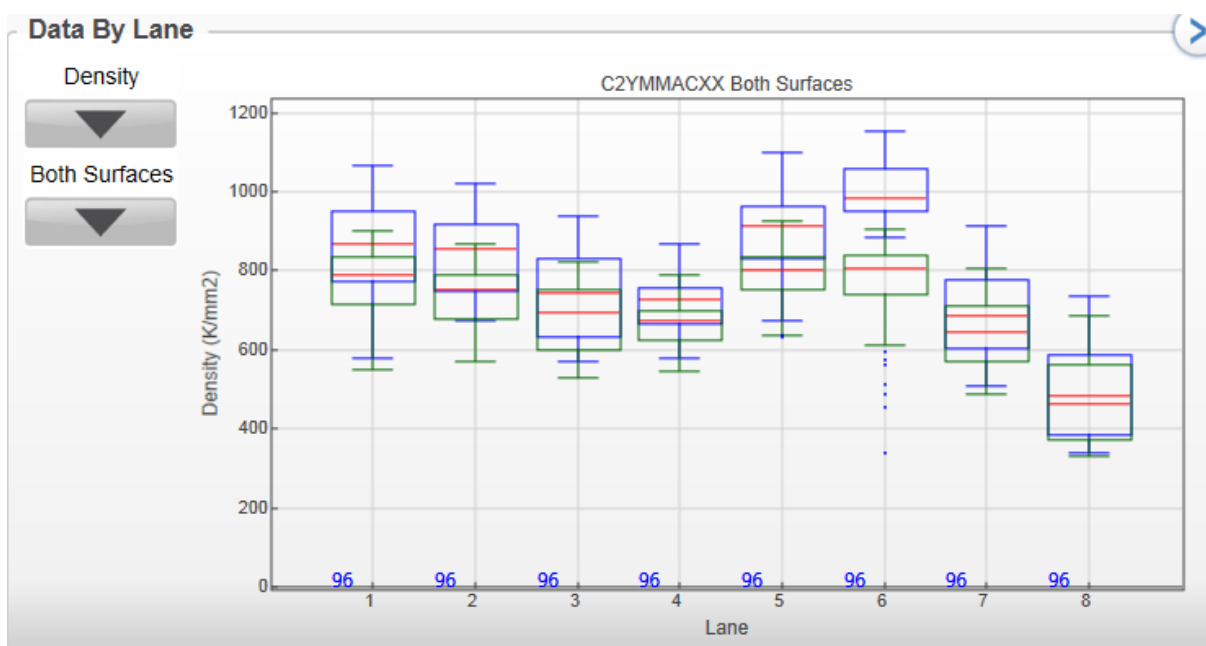
Po zkontrolování byly knihovny kvantifikovány pomocí přístroje Qubit 2.0 Fluorometer, na kterém byla změřena koncentrace 1,45 ng / μ l (14,6 nM), podle které byly knihovny následně ředěny na 2 nM.

4.2.4 Sekvenování

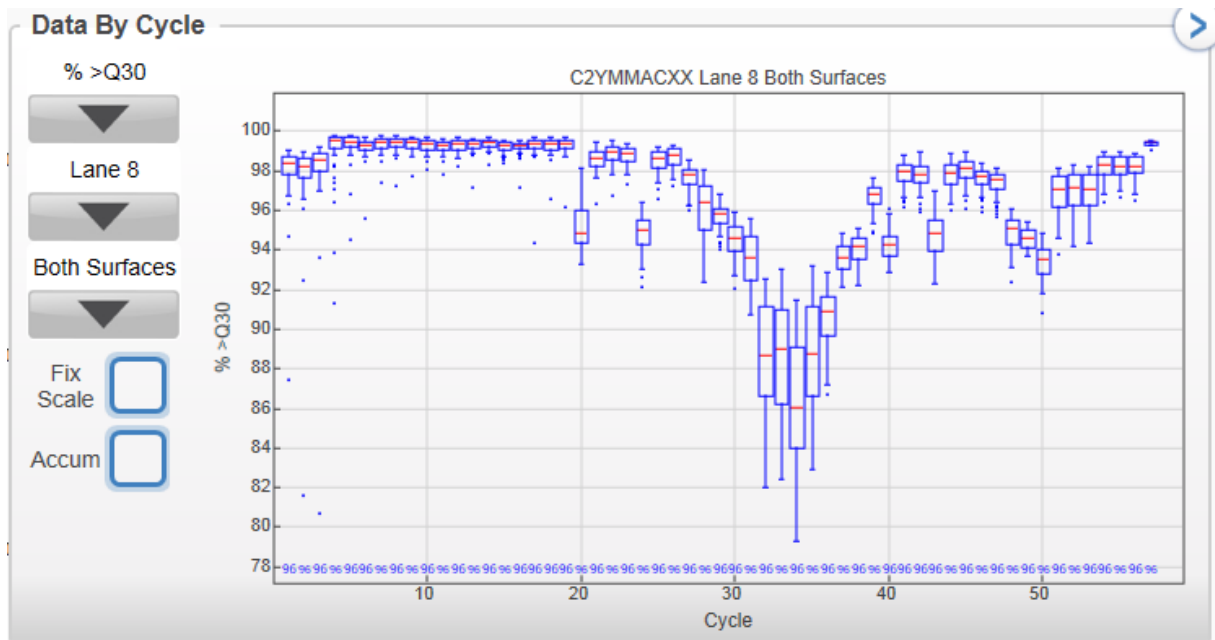
Průběh a kvalita sekvenování jsou zobrazeny na obrázcích (Obr. 7, 8, 9, 10 a 11). Knihovny připraveny z miRNA vzorků byly v linii 8.



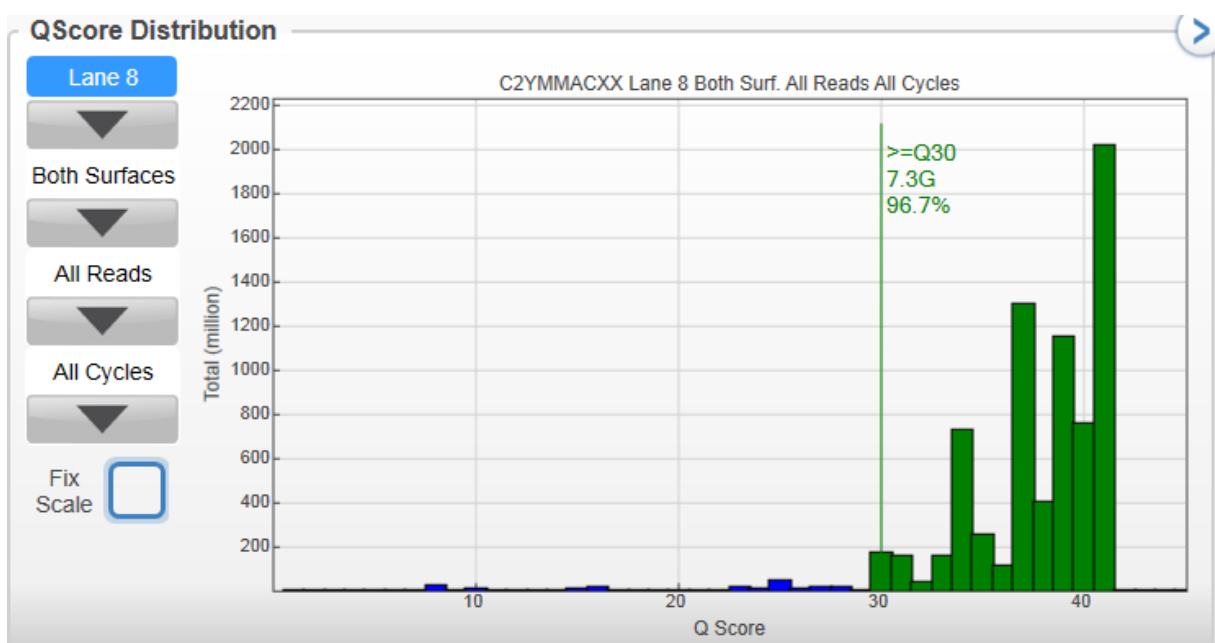
Obr. 7: Průměrná hustota klastrů v linii 8 činila $496\,000 \pm 113\,000$ na mm^2 .



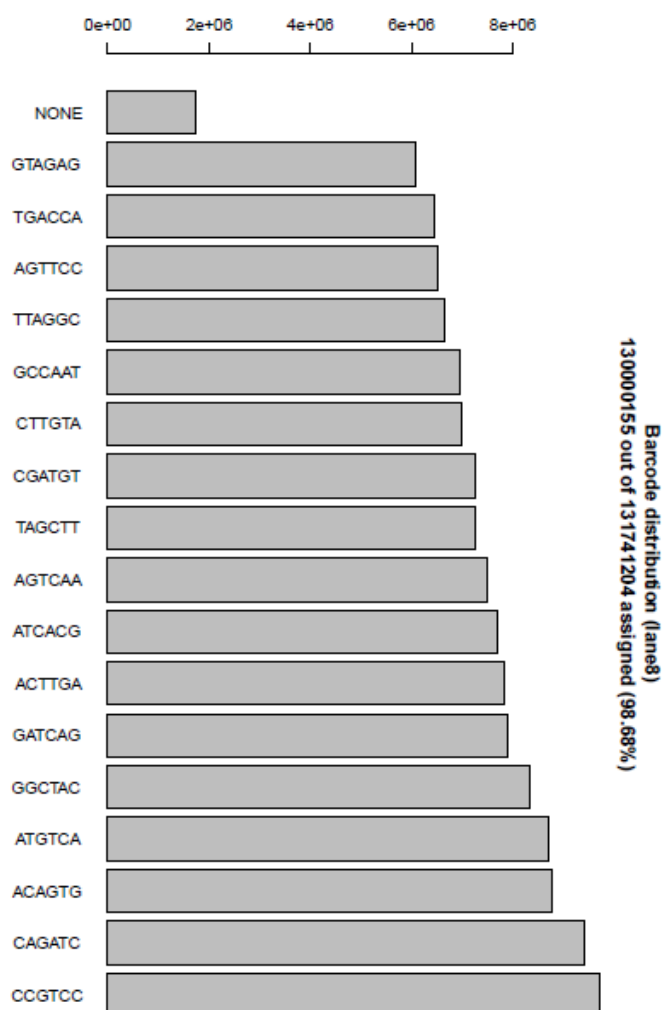
Obr. 8: Rozptyl hustoty klastrů ve všech liniích. Modře jsou označeny všechny klastry, zeleně klastry, které vyhověli softwarovému kvalitativnímu filtru, červená čára představuje medián.



Obr. 9: Procentuální kvalita čtení v každém cyklu v linii 8. %>Q30 znamená, že pravděpodobnost, že byla v daném místě přečtena špatná báze je nižší než 1:1000. Kvalita klesla po 20. cyklu, protože tam končí sekvence vzorku (průměrná délka miRNA je jen 22 nukleotidů) a začíná adaptérová sekvence.



Obr. 10: Distribuce skóre kvality pro linii 8. Daný graf popisuje počty cyklů, které dosáhli dané kvality. Jak z něj vyplývá, nejvíc cyklů dosáhlo nejvyšší měřitelné skóre kvality Q42 a procentuální poměr všech kvalitních cyklů se skóre kvality vyšším a rovným Q30 je 96,7%.



Obr. 11: Distribuce barkódů (indexů) v linii 8. Z daných dat vyplývá, že nejčastěji osekvenovaný index je CCGTCC (NEBNext index č. 16), kterým byl označen vzorek T97. Všechny indexy jsou poměrně rovnoměrně zastoupeny, co znamená, že byly poměrně rovnoměrně zastoupeny i jednotlivé vzorky.

4.2.5 Vyhodnocení sekvenačních dat

Celkem bylo ve všech vzorcích obou porovnávaných skupin zjištěno 2593 různých typů krátkých RNA molekul, z kterých byl u 138 zaznamenán statisticky významný rozdíl v expresi ($p \leq 0,05$) mezi skupinami C/TEP a P1. Srovnání míry exprese vybraných miRNA a jejich prekurzorů mezi těmito skupinami jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 7, 8 a 9).

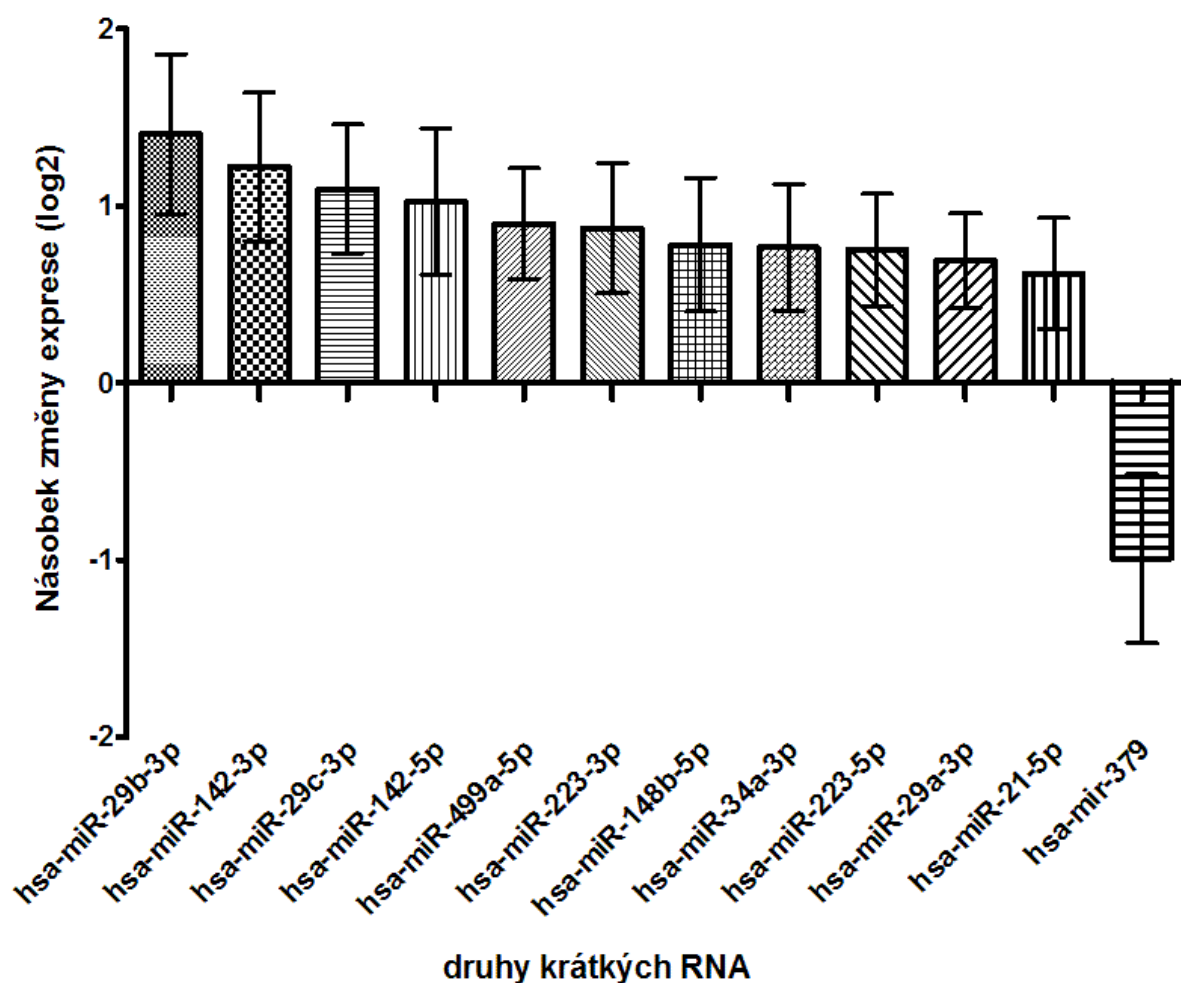
#	mikroRNA	Normalizovaný průměr počtu čtení	Násobek změny exprese (log2)	Standardní chyba	Násobek změny exprese	P-hodnota
1	hsa-miR-548ar-3p	5,021	1,534	0,432	2,896	<0,001
2	hsa-miR-141-3p	4,421	1,527	0,454	2,882	0,001
3	hsa-miR-519d-3p	4,205	1,487	0,476	2,803	0,002
4	hsa-miR-202-5p	2,145	1,472	0,454	2,775	0,001
5	hsa-mir-548e	2,462	1,421	0,460	2,677	0,002
6	hsa-mir-215	29,721	1,408	0,435	2,655	0,001
7	hsa-miR-29b-3p	3739,583	1,406	0,453	2,650	0,002
8	hsa-mir-520f	1,474	1,373	0,471	2,590	0,004
9	hsa-miR-6502-5p	2,280	1,314	0,464	2,486	0,005
10	hsa-mir-3910-1	3,576	1,311	0,445	2,481	0,003
11	hsa-miR-548e-5p	2,328	1,300	0,483	2,463	0,007
12	hsa-mir-3945	1,219	1,259	0,482	2,394	0,009
13	hsa-miR-142-3p	2013,713	1,220	0,419	2,330	0,004
14	hsa-miR-4680-5p	0,744	1,190	0,470	2,281	0,011
15	hsa-mir-466	3,050	1,185	0,473	2,274	0,012
16	hsa-miR-556-5p	3,529	1,165	0,481	2,242	0,015
17	hsa-miR-3910	11,301	1,155	0,454	2,227	0,011
18	hsa-mir-3910-2	2,482	1,154	0,469	2,226	0,014
19	hsa-miR-9-5p	64,430	1,148	0,369	2,216	0,002
20	hsa-mir-142	42,808	1,130	0,448	2,188	0,012
21	hsa-miR-32-3p	19,769	1,122	0,337	2,176	0,001
22	hsa-miR-517a-3p	6,588	1,117	0,478	2,169	0,019
23	hsa-miR-29c-3p	785,655	1,096	0,363	2,138	0,003
24	hsa-miR-4802-5p	9,329	1,076	0,401	2,108	0,007
25	hsa-miR-200a-3p	69,817	1,076	0,367	2,107	0,003
26	hsa-mir-4777	9,223	1,067	0,441	2,095	0,016
27	hsa-miR-517b-3p	6,448	1,066	0,464	2,094	0,022
28	hsa-mir-7705	0,584	1,064	0,439	2,090	0,015
29	hsa-miR-548v	1,886	1,062	0,480	2,088	0,027
30	hsa-miR-188-3p	1,787	1,060	0,462	2,084	0,022
31	hsa-miR-429	10,175	1,041	0,349	2,057	0,003
32	hsa-miR-184	74,759	1,031	0,482	2,043	0,032
33	hsa-miR-142-5p	3855,640	1,023	0,413	2,032	0,013
34	hsa-miR-548k	87,814	1,021	0,331	2,029	0,002
35	hsa-miR-129-1-3p	4,315	1,018	0,464	2,025	0,028
36	hsa-miR-340-3p	276,853	1,011	0,351	2,016	0,004
37	hsa-miR-4661-5p	8,838	1,009	0,482	2,012	0,036
38	hsa-miR-518b	1,930	1,004	0,482	2,005	0,037
39	hsa-miR-7705	3,622	0,972	0,431	1,961	0,024
40	hsa-miR-219b-5p	1,564	0,969	0,469	1,957	0,039
41	hsa-mir-934	2,310	0,964	0,475	1,951	0,042
42	hsa-miR-4717-5p	0,441	0,949	0,428	1,930	0,027
43	hsa-miR-548e-3p	74,656	0,943	0,350	1,923	0,007
44	hsa-miR-3065-3p	8,657	0,932	0,476	1,909	0,050
45	hsa-miR-3145-3p	0,931	0,931	0,462	1,906	0,044
46	hsa-miR-32-5p	767,765	0,926	0,423	1,899	0,029

#	mikroRNA	Normalizovaný průměr počtu čtení	Násobek změny exprese (log2)	Standardní chyba	Násobek změny exprese	P-hodnota
47	hsa-miR-129-2-3p	73,171	0,923	0,459	1,896	0,044
48	hsa-miR-9-3p	5,008	0,921	0,406	1,893	0,023
49	hsa-miR-511-3p	234,161	0,920	0,347	1,892	0,008
50	hsa-miR-374a	74,267	0,901	0,393	1,867	0,022
51	hsa-miR-499a-5p	121,139	0,900	0,313	1,866	0,004
52	hsa-miR-4677-3p	38,409	0,885	0,366	1,847	0,016
53	hsa-miR-520d-5p	0,595	0,882	0,414	1,843	0,033
54	hsa-miR-338-3p	18,637	0,876	0,414	1,835	0,035
55	hsa-miR-223-3p	1427,010	0,874	0,369	1,832	0,018
56	hsa-miR-340	178,040	0,865	0,367	1,821	0,018
57	hsa-miR-1277-3p	5,684	0,854	0,432	1,808	0,048
58	hsa-miR-651-5p	54,363	0,854	0,409	1,808	0,037
59	hsa-miR-598-3p	67,297	0,832	0,330	1,780	0,012
60	hsa-miR-1278	47,865	0,831	0,335	1,779	0,013
61	hsa-miR-588	0,313	0,829	0,415	1,777	0,045
62	hsa-miR-30d-3p	16,877	0,812	0,369	1,756	0,028
63	hsa-miR-29a	511,254	0,810	0,300	1,753	0,007
64	hsa-miR-27a-3p	45778,202	0,784	0,308	1,722	0,011
65	hsa-miR-148b-5p	7,734	0,781	0,377	1,719	0,038
66	hsa-miR-34a-3p	10,106	0,764	0,356	1,698	0,032
67	hsa-miR-223-5p	92,097	0,753	0,317	1,686	0,018
68	hsa-miR-3607-5p	23,383	0,729	0,357	1,658	0,041
69	hsa-miR-30e-5p	9414,779	0,724	0,345	1,651	0,036
70	hsa-miR-3912-3p	26,319	0,722	0,337	1,649	0,032
71	hsa-miR-27a	124,164	0,705	0,321	1,630	0,028
72	hsa-miR-29a-3p	21284,312	0,690	0,266	1,613	0,010
73	hsa-miR-148b	108,518	0,671	0,288	1,592	0,020
74	hsa-miR-374b-5p	859,089	0,634	0,290	1,551	0,029
75	hsa-miR-628-5p	37,652	0,627	0,315	1,544	0,046
76	hsa-miR-449a	15,642	0,626	0,296	1,543	0,034
77	hsa-miR-21-5p	1125298,578	0,619	0,315	1,536	0,049
78	hsa-miR-660-5p	3140,067	0,596	0,265	1,511	0,024
79	hsa-miR-1271-5p	309,421	-0,545	0,279	0,685	0,050
80	hsa-let-7e-5p	6049,167	-0,594	0,296	0,662	0,045
81	hsa-miR-574-3p	1728,206	-0,607	0,247	0,656	0,014
82	hsa-miR-193a-5p	1207,254	-0,630	0,291	0,646	0,030
83	hsa-miR-7706	66,554	-0,668	0,302	0,629	0,027
84	hsa-miR-1180-3p	272,426	-0,679	0,321	0,625	0,034
85	hsa-miR-744-5p	1468,564	-0,688	0,346	0,621	0,047
86	hsa-miR-574-5p	45,272	-0,708	0,350	0,612	0,043
87	hsa-miR-1292-5p	12,766	-0,713	0,356	0,610	0,045
88	hsa-miR-320a	5444,130	-0,718	0,233	0,608	0,002
89	hsa-miR-320b	251,168	-0,736	0,246	0,601	0,003
90	hsa-miR-320a	3070,346	-0,783	0,264	0,581	0,003
91	hsa-miR-485-5p	193,344	-0,795	0,350	0,576	0,023
92	hsa-miR-6511b-3p	12,078	-0,803	0,370	0,573	0,030

#	mikroRNA	Normalizovaný průměr počtu čtení	Násobek změny exprese (log2)	Standardní chyba	Násobek změny exprese	P-hodnota
93	hsa-miR-320c	38,024	-0,824	0,309	0,565	0,008
94	hsa-miR-370-3p	2177,175	-0,831	0,412	0,562	0,044
95	hsa-miR-133a-1	72,194	-0,833	0,383	0,561	0,030
96	hsa-miR-3158-3p	52,242	-0,834	0,388	0,561	0,032
97	hsa-miR-34c-5p	1243,826	-0,846	0,378	0,556	0,025
98	hsa-miR-377-5p	67,668	-0,856	0,375	0,552	0,022
99	hsa-miR-365a-5p	61,204	-0,859	0,347	0,551	0,013
100	hsa-miR-494	0,399	-0,875	0,429	0,545	0,042
101	hsa-miR-3200-5p	2,911	-0,888	0,442	0,540	0,045
102	hsa-miR-320d	10,247	-0,888	0,349	0,540	0,011
103	hsa-miR-382-5p	489,581	-0,898	0,376	0,537	0,017
104	hsa-miR-6813-5p	0,637	-0,906	0,461	0,534	0,049
105	hsa-miR-4649	0,689	-0,907	0,460	0,533	0,049
106	hsa-miR-3064	3,415	-0,908	0,443	0,533	0,041
107	hsa-miR-133a-3p	85,868	-0,908	0,374	0,533	0,015
108	hsa-miR-139-3p	169,763	-0,918	0,406	0,529	0,024
109	hsa-miR-92b-5p	48,879	-0,923	0,387	0,527	0,017
110	hsa-miR-34c-3p	16,243	-0,940	0,387	0,521	0,015
111	hsa-miR-34b-3p	16,548	-0,940	0,438	0,521	0,032
112	hsa-miR-4715-3p	0,818	-0,942	0,476	0,520	0,048
113	hsa-miR-4728-3p	0,450	-0,946	0,437	0,519	0,031
114	hsa-miR-4685-3p	3,949	-0,949	0,463	0,518	0,040
115	hsa-miR-210-3p	2443,884	-0,962	0,447	0,513	0,031
116	hsa-miR-6734-5p	1,840	-0,962	0,476	0,513	0,043
117	hsa-miR-6513	1,343	-0,969	0,483	0,511	0,045
118	hsa-miR-4667-5p	1,018	-0,979	0,482	0,507	0,042
119	hsa-miR-3150b-3p	0,547	-0,985	0,439	0,505	0,025
120	hsa-miR-193b-3p	1187,105	-0,986	0,376	0,505	0,009
121	hsa-miR-379	3,367	-0,991	0,479	0,503	0,038
122	hsa-miR-193b-5p	66,374	-0,992	0,351	0,503	0,005
123	hsa-miR-765	1,356	-0,998	0,469	0,501	0,033
124	hsa-miR-182-5p	533,013	-1,022	0,431	0,492	0,018
125	hsa-miR-493	1,156	-1,025	0,482	0,491	0,033
126	hsa-miR-412-5p	35,231	-1,029	0,439	0,490	0,019
127	hsa-miR-4446-3p	0,682	-1,032	0,442	0,489	0,020
128	hsa-miR-3187-3p	1,131	-1,046	0,481	0,484	0,030
129	hsa-miR-6780a-5p	0,495	-1,065	0,450	0,478	0,018
130	hsa-miR-206	2,275	-1,114	0,476	0,462	0,019
131	hsa-miR-323a-5p	1,279	-1,116	0,482	0,461	0,021
132	hsa-miR-210-5p	42,366	-1,123	0,463	0,459	0,015
133	hsa-miR-939-5p	1,780	-1,151	0,473	0,450	0,015
134	hsa-miR-4732	1,122	-1,179	0,480	0,442	0,014
135	hsa-miR-544b	0,863	-1,211	0,457	0,432	0,008
136	hsa-miR-496	1,924	-1,245	0,483	0,422	0,010
137	hsa-miR-6735-5p	1,175	-1,314	0,483	0,402	0,007
138	hsa-miR-3617	1,573	-1,321	0,476	0,400	0,005

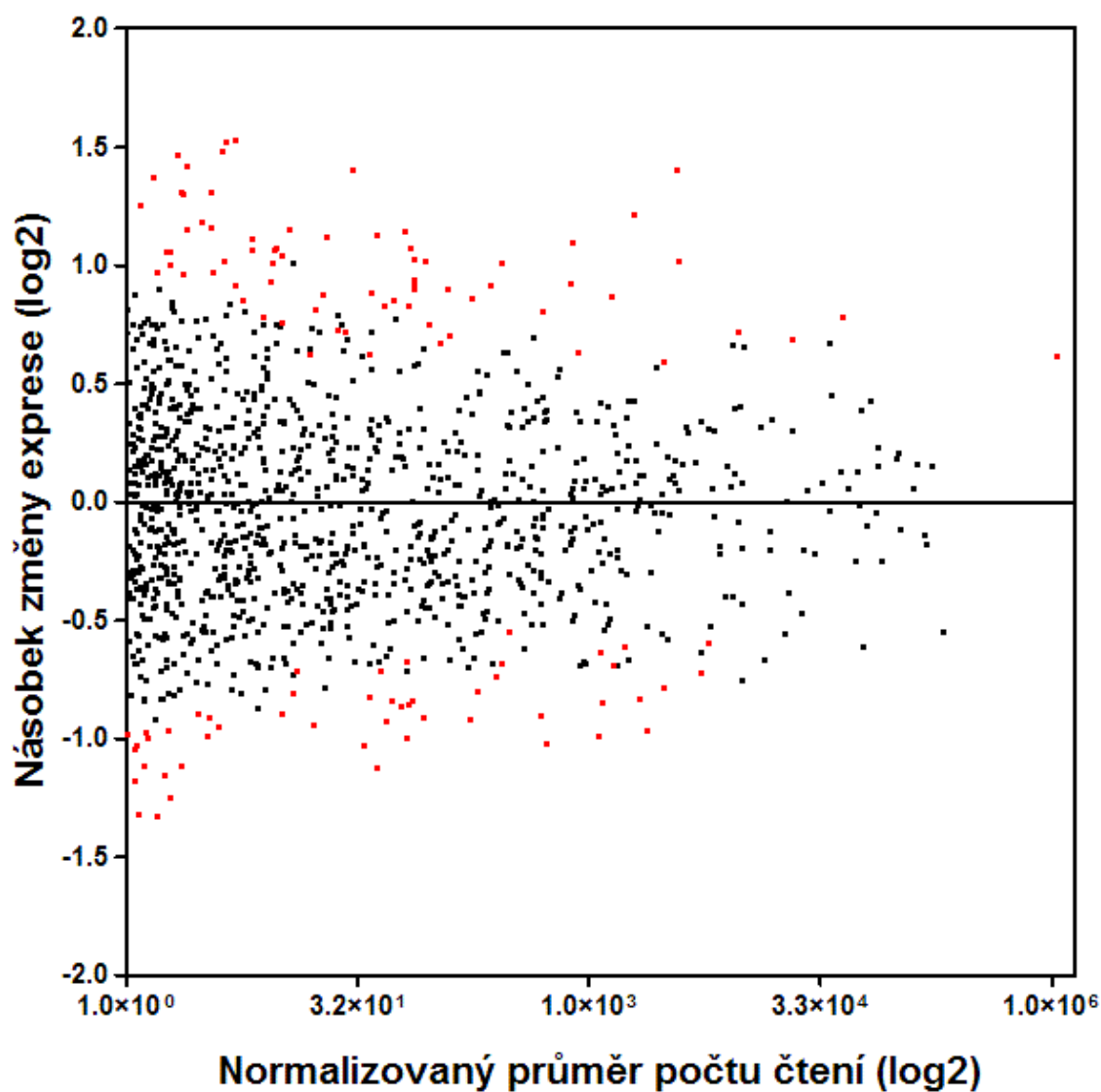
Tab. 7,8 a 9: Srovnání míry exprese vybraných miRNA a jejich prekurzorů mezi skupinami C/TEP a P1. Data jsou seřazena podle násobku změny exprese. Normalizovaný průměr počtu čtení vyjadřuje průměrný počet přečtení dané sekvenční v jednom vzorku (u jednoho pacienta). Log2 násobku změny exprese vyjadřuje, kolikrát se exprese dané miRNA změnila u P1 skupiny v porovnání s C/TEP skupinou. Zatímco kladný log2 násobku změny exprese vyjadřuje vyšší expresi dané miRNA u skupiny P1, záporný log2 násobku změny exprese vyjadřuje nižší expresi dané miRNA u této skupiny v porovnání se skupinou C/TEP. Standardní chyba je uvedena pro výpočet Log2 násobku změny exprese. Násobek změny exprese vyjadřuje, kolikrát se exprese dané miRNA změnila u P1 skupiny v porovnání s C/TEP skupinou. (Například, násobek změny exprese rovný 2,000 by vyjadřoval, že exprese dané miRNA byla dvojnásobná u skupiny P1 v porovnání se skupinou C/TEP.)

V grafu na obrázku (Obr. 13) jsou znázorněny log2 násobky změn expresí u vybraných miRNA, které mají vliv na zánětlivou reakci.



Obr. 13: Graf znázorňující log2 násobků změn expresí u vybraných miRNA, které mají vliv na zánětlivou reakci. Chybové úsečky představují standardní chybu.

V grafu na obrázku (Obr. 14) představuje každý zjištěný typ miRNA či jejího prekursoru jeden bod. Tento graf vyjadřuje závislost log2 násobku změny exprese mezi skupinami P1 a C/TEP od log2 normalizovaného průměru počtu čtení.



Obr. 14: Graf závislosti log2 násobku změny exprese mezi skupinami P1 a C/TEP od log2 normalizovaného průměru počtu čtení. Červeně jsou zobrazeny miRNA a jejich prekursori se statisticky významnou mírou změny exprese ($p \leq 0,05$).

5. Diskuze

Voperování totální kloubní endoprotézy se stává stále častějším řešením těžkého poškození kloubů následkem úrazu či nemoci. Dlouhodobé užívání implantátu je však limitováno vícerymi mechanizmy selhání, mezi které patří infekce, labilita implantátu, aseptická osteolýza a aseptické uvolnění. V současnosti se aseptická osteolýza stává jednou z nejčastějších příčin selhání kloubního implantátu. Jedná se o postupné odbourávání kostní hmoty prostřednictvím vícerych typů buněk včetně imunitních, což může vyústit až v aseptické uvolnění kloubní endoprotézy z kosti. Předpokládaná hlavní příčina aseptické osteolýzy tkví v chronické zánětlivé reakci na otěrové částice uvolňované z endoprotézy jejím denním používáním, což má za následek destrukci kostní tkáně prostřednictvím zvýšení osteoklastogeneze a aktivity osteoklastů. Přestože se výrobci kloubních implantátů snaží snížit riziko aseptické osteolýzy využitím nových materiálů a dizajnů endoprotéz, v současnosti je jednou z klíčových podmínek pro přijetí kloubní náhrady vrůst kostní tkáně do pórovitého povrchu endoprotézy. Víceré studie prokázaly, že tento proces je závislý na mnoha faktorech, mezi které patří regulace kostní homeostázy i vliv imunitního systému. Také bylo zjištěno, že mezi nositeli kloubních náhrad se vyskytují individuální rozdíly v míře tolerance k této náhradě, z čeho možno usuzovat, že vnímavost k aseptické osteolýze může být podmíněna i individuální genetickou výbavou jednotlivých nositelů. (Holt et.al., 2007)

5.1. Vliv miRNA regulace na aseptickou osteolýzu

Vliv miRNA regulace na procesy spojené s aseptickou osteolýzou je v současnosti téměř neprozkoumaná oblast. K dnešnímu dni existuje jen několik prací, které se tímto tématem zabývají. V jedné z nich byl odhalen vliv miR-21 na regulaci diferenciace osteoklastů prostřednictvím RANK-RANKL signální kaskády. V této studii bylo zjištěno, že miR-21 podporuje diferenciaci osteoklastů prostřednictvím nepřetržitého udržování funkce transkripčního faktoru c-fos/AP-1, který ovlivňuje expresi genů spojených s procesem osteoklastogeneze. (Sugatani, Vacher, Hruska, 2011) V další studii byla zkoumána míra exprese miR-21 v periprostetické tkáni u zvířecích modelů, kterým byly implantovány do této tkáně otěrové částice z endoprotézy. Bylo zjištěno, že otěrové částice mohou způsobit značnou osteolýzu a míra exprese miR-21 se jejich působením může rychle zvednout. Oproti kontrolní skupině byla exprese miR-21 v těchto modelech přibližně sedminásobná a aktivita osteoklastů

přibližně desetinásobná. V této studii byla také navržena možnost využití konkrétní miRNA jako terapeutického cíle pro onemocnění s výskytem osteolýzy, včetně osteolýzy následkem chronické zánětlivé reakce na otěrové částice z endoprotézy.^(Zhou, Liu, Cheng, 2012) Bylo také prokázáno, že potlačení diferenciace a proliferace osteoklastů může být efektivní cestou k prevenci aseptické osteolýzy^(Horowitz, Purdon, 1995) a k tomuto účelu je možno použít i inhibitor miR-21.^(Zhou, Liu, Cheng, 2012) V další studii bylo potvrzeno, že účinnou terapií aseptické osteolýzy může být i přímé využití konkrétních, lokálně aplikovaných miRNA, které jsou schopny účinně inhibovat expresi prozánětlivých cytokinů, kterými jsou VEGF, TNF- α , IL-1 β nebo RANKL.^(Zhang et.al., 2011) Kromě těchto miRNA mohou mít na aseptickou osteolýzu podstatný vliv i jiné miRNA, které zatím nebyly popsány.

5.2. Využití NGS pro miRNA profilování

Next Generation Sequencing je nová metoda využitelná pro miRNA profilování, pomocí které je možno získat i ta data, která jsou jinými metodami nedosažitelná. Kromě nesporných výhod této metody, jakými jsou vysoká citlivost, široký dynamický rozsah detekce nebo přesnost při diferenční analýze exprese, její největší nevýhoda je současně i její největší předností, a to obrovské množství generovaných dat. V těchto datech může být při jejich efektivním softwarovém zpracování nalezeno množství sekvencí miRNA, například s nízkou mírou exprese, jejichž možný vliv na studovaný biologický problém může být klíčový a zatím nebyl popsán v odborné literatuře. Pomocí NGS může být objeven i vliv těch miRNA, které původně vůbec nebyly očekávány v dané studii. Vzhledem ke stále většímu rozšíření NGS technologií ve světě a nedávno zjištěným poznatkům o značné míře vlivu miRNA regulace na živé soustavy je možné očekávat, že už v blízké budoucnosti se miRNA profilování pomocí NGS stane běžnou praxí a přispěje tak ke komplexnímu porozumění procesů miRNA regulace v biologických systémech.^(Tam et.al., 2014)

5.3. Přínos této práce

Tato práce je zaměřena na zjištění a porovnání expresních profilů vybraných miRNA u dvou skupin pacientů s totální endoprotézou kolenního kloubu, lišících se důvodem reoperace za využití technologie Next Generation Sequencing. Pacienti ve skupině P1 byli nuceni podstoupit reoperaci kloubní náhrady následkem aseptické osteolýzy, kdežto pacienti

ze skupiny C/TEP podstoupili reoperaci z jiných důvodů než je aseptické uvolnění. Pomocí experimentů popsaných v této práci bylo identifikováno celkem 138 typů mikroRNA a jejich prekurzorů, jejichž míra exprese se statisticky významně lišila ($p \leq 0,05$) mezi porovnávanými skupinami P1 a C/TEP. Bylo zjištěno, že ve skupině P1 došlo u 78 miRNA ke statisticky významnému zvýšení exprese a u 60 miRNA ke statisticky významnému snížení exprese při porovnání se skupinou C/TEP.

Mezi miRNA se zjištěnou zvýšenou expresí byly tyto vybrané miRNA, které se podílejí na zánětlivé imunologické reakci: miR-21, miR-29, miR-34a, miR-142, miR-148b, miR-223 a miR-499a.

Bylo prokázáno, že miR-21 je vlivná miRNA, která se podílí na množství fyziologických i patologických procesů. Její nejznámější funkcí je schopnost podpořit proliferaci nádorových buněk a poskytnout jim odolnost vůči apoptóze.^(Krichevsky, Gabriely, 2009) Nedávné studie se zaměřily na prozkoumání jejího vlivu na funkci a regulaci monocytů a makrofágů, u kterých bylo zjištěno, že exprese miR-21 je významně zvýšena při aktivaci monocytů.^(Sheedy et.al., 2009) MiR-21 může sloužit i jako jeden z mediátorů signálu uvolněného stimulací klíčových cytokinů a řídit diferenciaci monocytů na osteoklasty.^(Zhou, Liu, Cheng, 2012) MiR-21 má zásadní vliv i na alergický zánět plic, kde je jejím molekulárním cílem IL12p35, cytokin přispívající k polarizaci Th lymfocytů k Th2 lymfocytům.^(Lu, Munitz, Rothenberg, 2009) Tato miRNA je zapojena i do procesu fibrotizace, kde prostřednictvím TGF- β signalizace funguje jako zesilující obvod a podporuje další fibrotizaci.^(Zhu et.al., 2013) V této diplomové práci bylo zjištěno, že miR-21 byla mohutně exprimována u obou studovaných skupin. Její míra exprese byla víc než 1,5× vyšší u skupiny P1, což je ve shodě s odbornou literaturou. U aseptické osteolýzy je zánět, fibrotizace i aktivita osteoklastů mnohem vyšší než u běžného nositele kloubní endoprotézy. MiR-29 může napomáhat při resetování buněčných proteinových profilů jako odpovědi na vnější podnět u zánětlivé reakce. U miR-29 byla zjištěna i funkce nádorového supresoru v plicním epitelu.^(Fabbry et.al., 2007) Další zjištěná miRNA, miR-34a, se podílí na regulaci apoptózy. Bylo prokázáno, že miR-34a/b/c jsou součástí mechanismu tumor supresoru p53, který v odpovědi na poškození DNA zvyšuje expresi všech členů miR-34 rodiny, zastavuje buňky v G1 cyklu a spouští apoptózu.^(He et.al., 2007) V jiné studii byl prokázán vliv miR-34a na urychlení zrání B-lymfocytů zvýšením míry přeměny z pro-B-lymfocytů na pre-B-lymfocyty.^(Hashimi et.al., 2009) MiR-142 je spojena se systémovou lupus erythematosus a lupénkou. Bylo také zjištěno, že miR-142 zvyšuje degranulaci žírných buněk^(Yamada et.al., 2014) a v regulačních T-lymfocytech snižuje produkci cAMP.^(Huang et.al., 2008) U miR-148 byl prokázán její vliv na DNA hypometylací u systémové lupus erythematosus a také její tumor supresorová funkce.^(Song et.al., 2011) Rostoucí evidence ukazuje, že funkce miR-223 spočívá v omezování zánětu jako prevenci k příliš vysokým vedlejším škodám na vlastní tkáni. Také

zabraňuje onkogenní myeloidní transformaci.^(Haneklaus et.al., 2013) Přibližně 1,8× zvýšená míra exprese této miRNA u pacientů ze skupiny P1 naznačuje, že u pacientů s aseptickou osteolýzou probíhá i snaha imunitního systému o regulaci zánětlivé reakce jako následek poškození vlastní tkáně zánětem. U miR-449a bylo prokázáno, že tato miRNA specificky a kvantitativně reguluje expresi lymphoid enhancer-binding factor-1, který je exprimován při chondrogenезi a reguluje diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk.^(Paik et.al., 2012) Statisticky významné, téměř 1,9-násobné zvýšení míry exprese této miRNA u pacientů v P1 skupině naznačuje, že při aseptické osteolýze dochází i ke regenerativním procesům.

Mezi miRNA, u kterých byla zjištěna snížená exprese, byla miR-379, která se podílí na regulaci buněčného cyklu a její přímý molekulární cíl je IL-11, prozánětlivý interleukin, který stimuluje osteoklasty a tím zvyšuje osteolýzu a přispívá k destrukci kostní tkáně.^(Pollari et.al, 2012) Míra exprese miR-379 byla u pacientů v P1 skupině snížena téměř dvojnásobně.

5.4. Budoucí výzkum

Naše studie nominovala další miRNA, jejichž míra exprese byla statisticky významně zvýšena nebo snížena ještě větší mírou, než tomu bylo u miR-21, která se prokazatelně podílí na procesu aseptické osteolýzy.^(Zhou, Liu, Cheng, 2012) Všechny tyto miRNA jsou potencionální diagnostické markery nebo terapeutické cíle a měly by proto být předmětem dalšího studia. Identifikace vlivných miRNA účastnících se procesu aseptické osteolýzy může být prvním krokem k identifikaci jejich mRNA cílů, pomocí kterých může být pochopen celý mechanismus této patologie. Výzkum v této oblasti má jasné terapeutické využití, protože znalost procesů vedoucích k iniciaci aseptické osteolýzy by mohla vést až k návrhu možných terapeutických přístupů a účinné profylaktické léčby, což bude mít značně pozitivní vliv na život mnoha nositelů kloubních endoprotéz.

6. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zjistit a porovnat expresní profily vybraných miRNA u dvou skupin pacientů s totální endoprotézou kolenního kloubu, lišících se důvodem reoperace za využití technologie Next Generation Sequencing. Pacienti ve skupině P1 byli

nucení podstoupit reoperaci z důvodu aseptického uvolnění kloubní náhrady následkem aseptické osteolýzy, kdežto pacienti ze skupiny C/TEP podstoupili reoperaci z jiných důvodů než je aseptické uvolnění. Pomocí experimentů popsanych v této práci bylo identifikováno ve všech vzorcích celkem 2593 různých typů mikroRNA a jejich prekurzorů, z kterých byl u 138 z nich zaznamenán statisticky významný rozdíl v míře exprese ($p \leq 0,05$) mezi skupinami C/TEP a P1. Bylo zjištěno, že ve skupině P1 došlo u 78 miRNA ke statisticky významnému zvýšení exprese a u 60 miRNA ke statisticky významnému snížení exprese při porovnání se skupinou C/TEP. Ve skupině P1 byly kromě miRNA s již známou funkcí v zánětlivé odpovědi identifikovány i statisticky významné změny exprese u jiných miRNA, jejichž funkce u aseptické osteolýzy ještě není známá a jako potencionální diagnostické markery nebo terapeutické cíle by měly být předmětem dalšího studia.

7. Abecední seznam použité literatury

- ALIDOUSTI, H., M. TAYLOR a N. W. BRESSLOFF. Do Capsular Pressure and Implant Motion Interact to Cause High Pressure in the Periprosthetic Bone in Total Hip Replacement?. *Journal of Biomechanical Engineering*. 2011, roč. 133, č. 12, s. 121001. DOI: 10.1115/1.4005455. Dostupné z: <http://biomechanical.asmedigitalcollection.asme.org/article.aspx?doi=10.1115/1.4005455>
- ALIDOUSTI, H., M. TAYLOR a N. W. BRESSLOFF. Periprosthetic wear particle migration and distribution modelling and the implication for osteolysis in cementless total hip replacement. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2014, roč. 32, č. 1, s. 225-244. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2014.01.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S175161611400006X>
- ALTUVIA, Y., P. LANDGRAF, G. LITHWICK, N. ELEFANT, S. PFEFFER, A. ARAVIN, M. J. BROWNSTEIN, T. TUSCHL a H. MARGALIT. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Research*. 2005, roč. 33, č. 8, s. 2697-2706. DOI: 10.1093/nar/gki567. Dostupné z: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gki567>
- ALVAREZ-LAFUENTE, R., B. FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, S. DE MIGUEL, J. A. JOVER, R. ROLLIN, E. LOZA, D. CLEMENTE a J.R. LAMAS. Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2005, roč. 64, č. 9, s. 1357-1359. DOI: 10.1136/ard.2004.033514. Dostupné z: <http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/ard.2004.033514>

- ARORA, M., E. K. CHAN, S. GUPTA a A. D. DIWAN. Polymethylmethacrylate bone cements and additives: A review of the literature. *World Journal of Orthopedics*. 2013, roč. 4, č. 2, s. 67-74. DOI: 10.5312/wjo.v4.i2.67. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/2218-5836/full/v4/i2/67.htm>
- ASPENBERG, P. a H. VAN DER VIS. Migration, particles, and fluid pressure. A discussion of causes of prosthetic loosening. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1998, roč. 352, č. 1, s. 75-80.
- BECK, R. T., K. D. ILLINGWORTH a K. J. SALEH. Review of periprosthetic osteolysis in total joint arthroplasty: An emphasis on host factors and future directions. *Journal of Orthopaedic Research*. 2012, roč. 30, č. 4, s. 541-546. DOI: 10.1002/jor.21554. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jor.21554>
- BELLINI, C. M., F. GALBUSERA, R. G. CERONI a M. T. RAIMONDI. Loss in mechanical contact of cementless acetabular prostheses due to post-operative weight bearing: a biomechanical model. *Medical Engineering & Physics*. 2007, roč. 29, č. 2, s. 175-181. Dostupné z: [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350-4533\(06\)00046-4](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350-4533(06)00046-4)
- BEREZIKOV, E., W.-J. CHUNG, J. WILLIS, E. CUPPEN a E. C. LAI. Mammalian Mirtron Genes. *Molecular Cell*. 2007, roč. 28, č. 2, s. 328-336. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.09.028. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276507006697>
- BigDye ® Direct Cycle Sequencing Kit: Protocol. APPLIED BIOSYSTEMS. Life technologies [online]. 2014 [cit. 2014-04-13]. Dostupné z: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_091370.pdf
- BLÜML, S., M. BONELLI, B. NIEDERREITER, A. PUCHNER, G. MAYR, S. HAYER, M. I. KOENDERS, W. B. VAN DEN BERG, J. SMOLEN a Kurt REDLICH. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis*. 2011, roč. 63, č. 5, s. 1281-1288. DOI: 10.1002/art.30281. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.30281>
- BRAUN, T. a J. ZWERINA. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research*. 2011, roč. 13, č. 4, s. 235. DOI: 10.1186/ar3380. Dostupné z: <http://arthritis-research.com/content/13/4/235>
- Browse miRBase by species. THE UNIVERSITY OF MENCHESTER. MirBase [online]. 20. vyd. 2013 [cit. 2014-04-09]. Dostupné z: <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>
- CAI, X., Ch. HAGEDORN a B. R. CULLEN. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004, roč. 10, č. 12, s. 1957-1966. DOI: 10.1261/rna.7135204. Dostupné z: <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.7135204>
- CAICEDO, M. S., R. DESAI, K. MCALLISTER, A. REDDY, J. J. JACOBS a N. J. HALLAB. Soluble and particulate Co-Cr-Mo alloy implant metals activate the inflammasome danger signaling pathway in human macrophages: A novel mechanism for implant debris reactivity. *Journal of Orthopaedic Research*. 2009, roč. 27, č. 7, s. 847-854. DOI: 10.1002/jor.20826. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jor.20826>

- CATELAS, I. a J. J. JACOBS. Biologic activity of wear particles. Instructional course lectures. 2010, roč. 59, č. 1, s. 3-16.
- Compare Sequencing Platforms. ILLUMINA, Inc. Illumina [online]. 2014 [cit. 2014-04-13]. Dostupné z: <http://www.illumina.com/systems/sequencing-platform-comparison.ilmn?sciid=2014107IBN2>
- ČIHÁK, R. Anatomie 1. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 2001. ISBN 80-716-9970-5.
- DANECEK, P., Ch. NELLAKER, R. E. MCINTYRE, J. E. BUENDIA-BUENDIA, S. BUMPSTEAD, C. P. PONTING, J. FLINT, R. DURBIN, T. M. KEANE a D. J. ADAMS. High levels of RNA-editing site conservation amongst 15 laboratory mouse strains. Genome Biology. 2012, roč. 13, č. 4, s. 26. DOI: 10.1186/gb-2012-13-4-r26. Dostupné z: <http://genomebiology.com/2012/13/4/R26>
- DIXON, A. HLA B27 and risk of ankylosing spondylitis. British Medical Journal. 1978, roč. 2, č. 6142, 961–962.
- DOUGADOS, M., A. GUEGUEN, M. NGUYEN, L. BERDAH, M. LEQUESNE, B. MAZIERES a E. VIGNON. Radiological progression of hip osteoarthritis: definition, risk factors and correlations with clinical status. Annals of the Rheumatic Diseases. 1996, roč. 55, č. 6, 356–362. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1010186/pdf/annrheumd00351-0024.pdf>
- DOWSON, Duncan. New joints for the millenium: Wear control in total replacement hip joints. In: The Institution of Mechanical Engineers: The James Clayton Memorial lecture 2000 [online]. 2000 [cit. 2014-04-06]. Dostupné z: <http://www.imeche.org/docs/default-source/presidents-choice/jc08.pdf?sfvrsn=0>
- EULALIO, A., E. HUNTZINGER, T. NISHIHARA, J. REHWINKEL, M. FAUSER a E. IZAURRALDE. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. RNA. 2008, roč. 15, č. 1, s. 21-32. DOI: 10.1261/rna.1399509. Dostupné z: <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.1399509>
- FABBRI, M., *et.al.* MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007, roč. 104, č. 40, s. 15805-15810. DOI: 10.1073/pnas.0707628104. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0707628104>
- FAHLGREN, A., M. P. G. BOSTROM, X. YANG, L. JOHANSSON, U. EDLUND, F. AGHOLME a P. ASPENBERG. Fluid pressure and flow as a cause of bone resorption. Acta Orthopaedica. 2010, roč. 81, č. 4, s. 508-516. DOI: 10.3109/17453674.2010.504610. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/17453674.2010.504610>
- FALLER, M. a F. GUO. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms. 2008, roč. 1779, č. 11, s. 663-667. DOI: 10.1016/j.bbagrm.2008.08.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874939908001776>

- FERRARINI, M., M. MORETTO, J. A. WARD, N. ŠURBANOVSKI, V. STEVANOVIĆ, L. GIONGO, R. VIOLA, D. CAVALIERI, R. VELASCO, A. CESTARO a D. J. SARGENT. An evaluation of the PacBio RS platform for sequencing and de novo assembly of a chloroplast genome. *BMC Genomics*. 2013, roč. 14, č. 1, s. 670. DOI: 10.1186/1471-2164-14-670. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/670>
- FIORENTINO, F., A. BIRICIK, S. BONO, L. SPIZZICHINO, E. COTRONEO, G. COTTONE, F. KOKOCINSKI a C-E. MICHEL. Development and validation of a next-generation sequencing–based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertility and Sterility*. 2014, roč. 282, č. 14, s. 99-105. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.01.051. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028214000995>
- FLICEK, P. a E. BIRNEY. Sense from sequence reads: methods for alignment and assembly. *Nature Methods*. 2009, roč. 6, č. 11s, s. S6-S12. DOI: 10.1038/nmeth.1376. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.1376>
- FRIEDMAN, R. C., K. K.-H. FARH, C. B. BURGE a D. P. BARTEL. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*. 2008, roč. 19, č. 1, s. 92-105. DOI: 10.1101/gr.082701.108. Dostupné z: <http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.082701.108>
- FUJII, J., S. NIIDA, Y. YASUNAGA, A. YAMASAKI a M. OCHI. Wear debris stimulates bone-resorbing factor expression in the fibroblasts and osteoblasts. *Hip International*. 2011, roč. 21, č. 2, s. 231-237. DOI: 10.5301/HIP.2011.7977. Dostupné z: <http://www.hip-int.com/Navigator.action?cmd=navigate>
- FULLER, C. W., L. R. MIDDENDORF, S. A. BENNER, G. M. CHURCH, T. HARRIS, X. HUANG, S. B. JOVANOVIČ, J. R. NELSON, J. A. SCHLOSS, D. C. SCHWARTZ a D. V. VEZENOV. The challenges of sequencing by synthesis. *Nature Biotechnology*. 2009, roč. 27, č. 11, s. 1013-1023. DOI: 10.1038/nbt.1585. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt.1585>
- GALLO, J., S.B. GOODMAN, Y.T. KONTTINEN, M.A. WIMMER a M. HOLINKA. Osteolysis around total knee arthroplasty: A review of pathogenetic mechanisms. *Acta Biomaterialia*. 2013, roč. 9, č. 9, s. 8046-8058. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.05.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706113002377>
- GARDNER, D. L. Problems and paradigms in joint pathology. *Journal of Anatomy*. 1994, roč. 184, č. 3, 465–476. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1259955/pdf/janat00140-0021.pdf>
- GILLES, A., E. MEGLÉCZ, N. PECH, S. FERREIRA, T. MALAUSA a J.-F. MARTIN. Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics*. 2011, roč. 12, č. 1, s. 245. DOI: 10.1186/1471-2164-12-245. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/245>
- GOELDNER, I., T. L. SKARE, I. T. DE MESSIAS REASON, R. M. NISHIHARA, M. B. SILVA a S. R. DA ROSA UTIYAMA. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in rheumatoid arthritis patients and relatives from Brazil. *Rheumatology*. 2010, roč. 49, č. 8, s. 1590-1593. DOI: 10.1093/rheumatology/keq134. Dostupné z: <http://www.rheumatology.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/rheumatology/keq134>

- GOODMAN, S. B., E. GIBON a Z. YAO. The basic science of periprosthetic osteolysis. Instructional course lectures. 2013, roč. 62, č. 1, s. 201-206. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3766766>
- GRAY, H., S. STANDRING, H. ELLIS a B. BERKOVITZ. Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice. 39th ed. / . New York: Elsevier Churchill Livingstone, c2005. ISBN 04-430-7168-3.
- GREENFIELD, E. M. a J. BECHTOLD. What other biologic and mechanical factors might contribute to osteolysis?. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2008, roč. 16, č. S1, s. 56-62.
- GREGORY, R. I., T. P. CHENDRIMADA a R. SHIEKHATTAR. MicroRNA Biogenesis: Isolation and Characterization of the Microprocessor Complex. MicroRNA Protocols. New Jersey: Humana Press, 2006, roč. 342, č. 1, s. 33-47. DOI: 10.1385/1-59745-123-1:33. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/1-59745-123-1:33>
- GRIFFITHS-JONES, S. The microRNA Registry. Nucleic Acids Research. 2004, roč. 32, č. 90001, s. 109D-111. DOI: 10.1093/nar/gkh023. Dostupné z: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkh023>
- GULLAPALLI, R. R., M. LYONS-WEILER, P. PETROSKO, R. DHIR, M. J. BECICH a W. A. LAFRAMBOISE. Clinical Integration of Next-Generation Sequencing Technology. Clinics in Laboratory Medicine. 2012, roč. 32, č. 4, s. 585-599. DOI: 10.1016/j.cll.2012.07.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272271212000881>
- HALL, N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. Journal of Experimental Biology. 2007, roč. 210, č. 9, s. 1518-1525. DOI: 10.1242/jeb.001370. Dostupné z: <http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.001370>
- HANEKLAUS, M., M. GERLIC, L. A. J. O'NEILL a S. L. MASTERS. MiR-223: infection, inflammation and cancer. Journal of Internal Medicine. 2013, roč. 274, č. 3, s. 215-226. DOI: 10.1111/joim.12099. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/joim.12099>
- HARRINGTON, C. T., E. I. LIN, M. T. OLSON a J. R. ESHLEMAN. Fundamentals of Pyrosequencing. Archives of Pathology. 2013, roč. 137, č. 9, s. 1296-1303. DOI: 10.5858/arpa.2012-0463-RA. Dostupné z: <http://www.archivesofpathology.org/doi/abs/10.5858/arpa.2012-0463-RA>
- HART, F. D. Arthropathies and allied disorders. British Medical Journal. 1969, roč. 2, č. 5658, s. 675-677. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1983658/pdf/brmedj02036-0053.pdf>
- HART, Ch., D. LIPSON, F. OZSOLAK, T. RAZ, K. STEINMANN, J. THOMPSON a P. M. MILOS. Single-Molecule Sequencing. Methods in Enzymology. 2010, roč. 472, č. 1, s. 407-430. DOI: 10.1016/S0076-6879(10)72002-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687910720024>
- HASHIMI, S. T., J. A. FULCHER, M. H. CHANG, L. GOV, S. WANG a B. LEE. MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation. Blood. 2009, roč. 114, č. 2, s. 404-414. DOI: 10.1182/blood-2008-09-179150. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2008-09-179150>

- HAWKINS, P. a K. V. MORRIS. RNA and transcriptional modulation of gene expression. *Cell Cycle*. 2008, roč. 7, č. 5, s. 602-607. DOI: 10.4161/cc.7.5.5522. Dostupné z: <http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/5522>
- HE, L. a G. J. HANNON. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*. 2004, roč. 5, č. 7, s. 522-531. DOI: 10.1038/nrg1379. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg1379>
- HE, L., *et.al.* A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007, roč. 447, č. 7148, s. 1130-1134. DOI: 10.1038/nature05939. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature05939>
- HENDRIX, R. W., R. L. WIXSON, N. A. RANA a L. F. ROGERS. Arthrography after total hip arthroplasty: a modified technique used in the diagnosis of pain. *Radiology*. 1983, roč. 148, č. 3, s. 647-652.
- HERT, D. G., Ch. P. FREDLAKE a A. E. BARRON. Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: A comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis*. 2008, roč. 29, č. 23, s. 4618-4626. DOI: 10.1002/elps.200800456. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200800456>
- HOLT, G., C. MURNAGHAN, J. REILLY a R. M. MEEK. The biology of aseptic osteolysis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2007, roč. 460, č. 1, s. 240-252.
- HOROWITZ, S. M. a M. A. PURDON. Mediator interactions in macrophage/particulate bone resorption. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1995, roč. 29, č. 4, s. 477-484. DOI: 10.1002/jbm.820290407. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.820290407>
- HOU, Q., S. HAUPT, J. T. KREUZER, A. HAMMITZSCH, F. PROFT, C. NEUMANN, J. LEIPE, M. WITT, H. SCHULZE-KOOPS a A. SKAPENKO. Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2014. Publikováno elektronicky před tiskem. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204377. Dostupné z: <http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/annrheumdis-2013-204377>
- HU, K., C. WANG a X. ZHANG. High pressure may inhibit periprosthetic osteogenesis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2010, roč. 28, č. 3, s. 289-298. DOI: 10.1007/s00774-009-0137-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00774-009-0137-8>
- HUANG, B., *et.al.* MiR-142-3p restricts cAMP production in CD4 CD25⁺ T cells and CD4 CD25⁺ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO reports*. 2008, roč. 10, č. 2, s. 180-185. DOI: 10.1038/embor.2008.224. Dostupné z: <http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.1038/embor.2008.224>
- HUANG, Y.-F., S.-Ch. CHEN, Y.-S. CHIANG, T.-H. CHEN a K.-P. CHIU. Palindromic sequence impedes sequencing-by-ligation mechanism. *BMC Systems Biology*. 2012, roč. 6, č. 2, s. S10. DOI: 10.1186/1752-0509-6-S2-S10. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1752-0509/6/S2/S10>

- CHEN, K. a N. RAJEWSKY. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature Reviews Genetics*. 2007, roč. 8, č. 2, s. 93-103. DOI: 10.1038/nrg1990. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg1990>
- CHIU, R., W. J. BOYLE, J. MEEK, T. SMEAL, T. HUNTER a M. KARIN. The c-fos protein interacts with c-JunAP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell*. 1988, roč. 54, č. 4, s. 541-552. DOI: 10.1016/0092-8674(88)90076-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867488900761>
- CHURCH, G. M. Genomes for All. *Scientific American*. 2006, roč. 294, č. 1, s. 46-54. DOI: 10.1038/scientificamerican0106-46. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/scientificamerican0106-46>
- INGHAM, E., T. R. GREEN, M. H. STONE, R. KOWALSKI, N. WATKINS a J. FISHER. Production of TNF- α and bone resorbing activity by macrophages in response to different types of bone cement particles. *Biomaterials*. 2000, roč. 21, č. 10, s. 1005-1013. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00261-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961299002616>
- JELSOFT ENTERPRISES LTD. SEQanswers: the next generation sequencing community [online]. 2014 [cit. 2014-04-15]. Dostupné z: <http://seqanswers.com>
- KADOYA, Y., P. A. REVELL, N. AL-SAFFAR, A. KOBAYASHI, G. SCOTT a M. A. R. FREEMAN. Bone formation and bone resorption in failed total joint arthroplasties: Histomorphometric analysis with histochemical and immunohistochemical technique. *Journal of Orthopaedic Research*. 1996, roč. 14, issue 3, s. 473-482. DOI: 10.1002/jor.1100140318. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jor.1100140318>
- KAUFMAN, A. M., C. I. ALABRE, H. E. RUBASH a A. S. SHANBHAG. Human macrophage response to UHMWPE, TiAlV, CoCr, and alumina particles: Analysis of multiple cytokines using protein arrays. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008, 84A, č. 2, s. 464-474. DOI: 10.1002/jbm.a.31467. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.31467>
- KAWAHARA, Y., M. MEGRAW, E. KREIDER, H. IIZASA, L. VALENTE, A. G. HATZIGEORGIOU a K. NISHIKURA. Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Research*. 2008, roč. 36, č. 16, s. 5270-5280. DOI: 10.1093/nar/gkn479. Dostupné z: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkn479>
- KAWAJI, H. *et al.* Comparison of CAGE and RNA-seq transcriptome profiling using clonally amplified and single-molecule next-generation sequencing. *Genome Research*. 2014, roč. 24, č. 4, s. 708-717. DOI: 10.1101/gr.156232.113. Dostupné z: <http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.156232.113>
- KIM, J.-W., H. C. KIM, G. M. KIM, J. M. YANG, J. D. BOEKE a K. NAM. Human RNA lariat debranching enzyme cDNA complements the phenotypes of *Saccharomyces cerevisiae* dbr1 and *Schizosaccharomyces pombe* dbr1 mutants. *Nucleic Acids Research*. 2000, roč. 28, č. 18, s. 3666-3673. DOI: 10.1093/nar/28.18.3666. Dostupné z: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/28.18.3666>

- KNIERIM, E., B. LUCKE, J. M. SCHWARZ, M. SCHUELKE, D. SEELOW a M. T. P. GILBERT. Systematic Comparison of Three Methods for Fragmentation of Long-Range PCR Products for Next Generation Sequencing. PLoS ONE. 2011, roč. 6, č. 11, s. e28240. DOI: 10.1371/journal.pone.0028240. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0028240>
- KREK, A., D. GRÜN, M. N POY, R. WOLF, L. ROSENBERG, E. J EPSTEIN, P. MACMENAMIN, I. DA PIEDADE, K. C GUNSALUS, M. STOFFEL a N. RAJEWSKY. Combinatorial microRNA target predictions. Nature Genetics. 2005, roč. 37, č. 5, s. 495-500. DOI: 10.1038/ng1536. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng1536>
- KRICHEVSKY, A. M. a G. GABRIELY. MiR-21: a small multi-faceted RNA. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2009, roč. 13, č. 1, s. 39-53. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x>
- KURTZ, S. M., *et.al.* M. International survey of primary and revision total knee replacement. International Orthopaedics. 2011, roč. 35, č. 12, s. 1783-1789. DOI: 10.1007/s00264-011-1235-5. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00264-011-1235-5>
- KUSENDA, B., M. MRAZ, J. MAYER a S. POSPISILOVA. MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. Biomedical Papers. 2006, roč. 150, č. 2, s. 205-215. DOI: 10.5507/bp.2006.029. Dostupné z: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2006.029.html>
- LAGOS-QUINTANA, M., R. RAUHUT, W. LENDECKEL a T. TUSCHL. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. Science. 2001, roč. 294, č. 5543, s. 853-858. DOI: 10.1126/science.1064921. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1064921>
- LANDER, E. S. Initial impact of the sequencing of the human genome. Nature. 2011, roč. 470, č. 7333, s. 187-197. DOI: 10.1038/nature09792. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09792>
- LEE, C.-T., T. RISOM a W. M. STRAUSS. Evolutionary Conservation of MicroRNA Regulatory Circuits: An Examination of MicroRNA Gene Complexity and Conserved MicroRNA-Target Interactions through Metazoan Phylogeny. DNA and Cell Biology. 2007, roč. 26, č. 4, s. 209-218. DOI: 10.1089/dna.2006.0545. Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/dna.2006.0545>
- LEWIS, B. P., I. SHIH, M. W. JONES-RHOADES, D. P. BARTEL a Ch. B. BURGE. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. Cell. 2003, roč. 115, č. 7, s. 787-798. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)01018-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867403010183>
- LIND, E. F. a P. S. OHASHI. Mir-155, a central modulator of T-cell responses. 2014, roč. 44, č. 1, s. 11-15.
- LINNARSSON, S. Recent advances in DNA sequencing methods – general principles of sample preparation. Experimental Cell Research. 2010, roč. 316, č. 8, s. 1339-1343. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.02.036. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482710000984>

- LIU, L., Y. LI, S. LI, N. HU, Y. HE, R. PONG, D. LIN, L. LU a M. LAW. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012, roč. 2012, č. 1, s. 1-11. DOI: 10.1155/2012/251364. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/251364>
- LOVE, M. I., W. HUBER a S. ANDERS. Differential analysis of count data - the DESeq2 package. *BioRxiv: the preprint server for biology*. 2014. Publikováno elektronicky před tiskem. DOI: 10.1101/002832. Dostupné z: <http://biorxiv.org/content/early/2014/02/19/002832.full.pdf>
- LU, T. X., A. MUNITZ a M. E. ROTHENBERG. MicroRNA-21 Is Up-Regulated in Allergic Airway Inflammation and Regulates IL-12p35 Expression. *The Journal of Immunology*. 2009, roč. 182, č. 8, s. 4994-5002. DOI: 10.4049/jimmunol.0803560. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0803560>
- LUND, E. a J.E. DAHLBERG. Substrate Selectivity of Exportin 5 and Dicer in the Biogenesis of MicroRNAs. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2006, roč. 71, č. 1, s. 59-66. DOI: 10.1101/sqb.2006.71.050. Dostupné z: <http://symposium.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/sqb.2006.71.050>
- MANDELIN, J., T. F. LI, M. LILJESTRÖM, M. E. KROON, R. HANEMAAIJER, S. SANTAVIRTA a Y. T. KONTTINEN. Imbalance of RANKL/RANK/OPG system in interface tissue in loosening of total hip replacement. *The Bone & Joint Journal*. 2003, roč. 85, č. 8, s. 1196-1201.
- MARDIS, E. R. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*. 2011, roč. 470, č. 7333, s. 198-203. DOI: 10.1038/nature09796. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09796>
- MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*. 2008, roč. 24, č. 3, s. 133-141. DOI: 10.1016/j.tig.2007.12.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952508000231>
- MARTIN, J. A. a Z. WANG. Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics*. 2011, roč. 12, č. 10, s. 671-682. DOI: 10.1038/nrg3068. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg3068>
- MAZIERE, P a A ENRIGHT. Prediction of microRNA targets. *Drug Discovery Today*. 2007, roč. 12, č. 11-12, s. 452-458. DOI: 10.1016/j.drudis.2007.04.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644607001493>
- MCPHERSON, J. D. Next-generation gap. *Nature Methods*. 2009, roč. 6, č. 11s, s. S2-S5. DOI: 10.1038/nmeth.f.268. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.f.268>
- MEDVEDEV, P., M. STANCIU a M. BRUDNO. Computational methods for discovering structural variation with next-generation sequencing. *Nature Methods*. 2009, roč. 6, č. 11s, s. S13-S20. DOI: 10.1038/nmeth.1374. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.1374>
- MERRIMAN, B., ROTHBERG Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis*. 2012, roč. 33, č. 23, s. 3397-3417. DOI: 10.1002/elps.201200424. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201200424>

- METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 2009, roč. 11, č. 1, s. 31-46. DOI: 10.1038/nrg2626. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg2626>
- MIAO, C.-G., Y.-Y. YANG, X. HE, T. XU, Ch. HUANG, Y. HUANG, L. ZHANG, X.-W. LV, Y. JIN a J. LI. New advances of microRNAs in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, with a focus on the crosstalk between DNA methylation and the microRNA machinery. *Cellular Signalling*. 2013, roč. 25, č. 5, s. 1118-1125. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.01.024. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656813000351>
- MILOS, P. Helicos BioSciences. *Pharmacogenomics*. 2008, roč. 9, č. 4, s. 477-480. DOI: 10.2217/14622416.9.4.477. Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/14622416.9.4.477>
- MITRA, S., K. FÖRSTER-FROMME, A. DAMMS-MACHADO, T. SCHEURENBRAND, S. BISKUP, D. H. HUSON a S. C. BISCHOFF. Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD 16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics*. 2013, roč. 14, č. 5, s. S16. DOI: 10.1186/1471-2164-14-S5-S16. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/S5/S16>
- MRAZ, M. *et.al.* MicroRNA-650 expression is influenced by immunoglobulin gene rearrangement and affects the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012, roč. 119, č. 9, s. 2110-2113. DOI: 10.1182/blood-2011-11-394874. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-11-394874>
- MURCHISON, Elizabeth P a Gregory J HANNON. MiRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Current Opinion in Cell Biology*. 2004, roč. 16, č. 3, s. 223-229. DOI: 10.1016/j.ceb.2004.04.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067404000547>
- NAGARAJAN, N. a M. POP. Sequencing and Genome Assembly Using Next-Generation Technologies. *Methods in Molecular Biology*. 2010, roč. 673, č. 1, s. 1-17. DOI: 10.1007/978-1-60761-842-3_1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-842-3_1
- NAKASHIMA, Y., D. H. SUN, M. C. TRINDADE, W. J. MALONEY, S. B. GOODMAN, D. J. SCHURMAN a R. L. SMITH. Signaling pathways for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression in human macrophages exposed to titanium-alloy particulate debris in vitro. *The Journal of bone and joint surgery*. 1999, roč. 81, č. 5, s. 603-615.
- Nanopore DNA sequencing. OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES. Nanoporetech [online]. 2014 [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: <https://www.nanoporetech.com/news/movies#movie-24-nanopore-dna-sequencing>
- NATRAJAN, R. a J. S. REIS-FILHO. Next-generation sequencing applied to molecular diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2011, roč. 11, č. 4, s. 425-444. DOI: 10.1586/erm.11.18. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/erm.11.18>

- NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina®. NEW ENGLAND BIOLABS, Inc. New England Biolabs [online]. 2014 [cit. 2014-04-13]. Dostupné z: <https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/FAC109E8FD1341339AEADA0A081814C7/Datacards%20or%20Manuals/manualE7300.pdf>
- NIELSEN, R., J. S. PAUL, A. ALBRECHTSEN a Y. S. SONG. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nature Reviews Genetics*. 2011, roč. 12, č. 6, s. 443-451. DOI: 10.1038/nrg2986. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg2986>
- PAIK, S., H. S. JUNG, S. LEE, D. S. YOON, M. S. PARK a J. W. LEE. MiR-449a Regulates the Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells Through Direct Targeting of Lymphoid Enhancer-Binding Factor-1. *Stem Cells and Development*. 2012, roč. 21, č. 18, s. 3298-3308. DOI: 10.1089/scd.2011.0732. Dostupné z: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2011.0732>
- PAL, G. K. a P. PAL. *Textbook of Practical Physiology*. 1. vyd. Himayatnagar, India: Orient Longman Private Limited, 2003. ISBN 81-250-2021-7. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=CcJvliesgp8C&pg=PA387#v=onepage&q&f=false>
- PICHIORRI, F. *et.al.* Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 Impairs the p53/MDM2 Autoregulatory Loop in Multiple Myeloma Development. *Cancer Cell*. 2010, roč. 18, č. 4, s. 367-381. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.09.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610810003429>
- PLACE, R. F., L.-C. LI, D. POOKOT, E. J. NOONAN a R. DAHIYA. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, roč. 105, č. 5, s. 1608-1613. DOI: 10.1073/pnas.0707594105. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0707594105>
- PLENGE, R. *et. al.* M.TRAF1–C5 as a Risk Locus for Rheumatoid Arthritis — A Genomewide Study. *New England Journal of Medicine*. 2007, roč. 357, č. 12, s. 1199-1209. DOI: 10.1056/NEJMoa073491. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa073491>
- POLLARI, S., S.-K. LEIVONEN, M. PERÄLÄ, V. FEY, S.-M. KÄKÖNEN, O. KALLIONIEMI a P. RAMESHWAR. Identification of MicroRNAs Inhibiting TGF- β -Induced IL-11 Production in Bone Metastatic Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*. 2012, roč. 7, č. 5, s. e37361. DOI: 10.1371/journal.pone.0037361. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0037361>
- POP, M. a S. L. SALZBERG. Bioinformatics challenges of new sequencing technology. *Trends in Genetics*. 2008, roč. 24, č. 3, s. 142-149. DOI: 10.1016/j.tig.2007.12.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016895250800022X>
- REN, W. P., D. C. MARKEL, R. ZHANG, X. PENG, B. WU, H. MONICA a P. H. WOOLEY. Association between UHMWPE particle-induced inflammatory osteoclastogenesis and expression of RANKL, VEGF, and Flt-1 in vivo. *Biomaterials*. 2006, roč. 27, č. 30, s. 5161-5169. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.04.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206003231>

- RIZZO, J. M. a M. J. BUCK. Key Principles and Clinical Applications of "Next-Generation" DNA Sequencing. *Cancer Prevention Research*. 2012, roč. 5, č. 1, s. 887. DOI: 10.1158/1940-6207. Dostupné z: <http://cancerpreventionresearch.aacrjournals.org/content/5/7/887.long#ref-65>
- ROBERTSSON, O., H. WINGSTRAND, U. KESTERIS, K. JONSSON a R. ONNERFÄLT. Intracapsular pressure and loosening of hip prostheses. Preoperative measurements in 18 hips. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 1997, roč. 68, č. 3, s. 231-234.
- RODRIGUEZ, A., S. GRIFFITHS-JONES S, J. L. ASHURST JL, a A. BRADLEY A. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Research*. 2004-09-13, roč. 14, č. 10a, s. 1902-1910. DOI: 10.1101/gr.2722704. Dostupné z: <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.2722704>
- SALMENA, L., L. POLISENO, Y. TAY, L. KATS a P. P. PANDOLFI. A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language?. *Cell*. 2011, roč. 146, č. 3, s. 353-358. DOI: 10.1016/j.cell.2011.07.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411008129>
- SANGER, F., G. M. AIR, B. G. BARRELL, N. L. BROWN, A. R. COULSON, J. C. FIDDES, C. A. HUTCHISON, P. M. SLOCOMBE a M. SMITH. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature*. 1977, roč. 265, č. 5596, s. 687-695. DOI: 10.1038/265687a0. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/265687a0>
- SATO, T., T. HARA, S. MORI, H. SHIRAI a S. MINAGI. Threshold for Bone Resorption Induced by Continuous and Intermittent Pressure in the Rat Hard Palate. *Journal of Dental Research*. 1998, roč. 77, č. 2, s. 387-392. DOI: 10.1177/00220345980770020701. Dostupné z: <http://jdr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/00220345980770020701>
- SCOTT, D. L., F. WOLFE a T. W. J. HUIZINGA. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 2010, roč. 376, č. 9746, s. 1094-1108. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60826-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610608264>
- SEMLITSCH, M. a H. G. WILLERT. Properties of implant alloys for artificial hip joints. *Medical and Biological Engineering and Computing*. 1980, roč. 18, č. 4, s. 511-520.
- SHABALINA, S a E KOONIN. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in Ecology*. 2008, roč. 23, č. 10, s. 578-587. DOI: 10.1016/j.tree.2008.06.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169534708002437>
- SHAH, S. P. *et.al.* Mutation of FOXL2 in Granulosa-Cell Tumors of the Ovary. *New England Journal of Medicine*. 2009, roč. 360, č. 26, s. 2719-2729. DOI: 10.1056/NEJMoa0902542. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0902542>
- SHEEDY, F. J., *et.al.* Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nature Immunology*. 2009, roč. 11, č. 2, s. 141-147. DOI: 10.1038/ni.1828. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.1828>

- SHIRTLIFF, M. E. a J. T. MADER. Acute Septic Arthritis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, roč. 15, č. 4, s. 527-544. DOI: 10.1128/CMR.15.4.527-544.2002. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.15.4.527-544.2002>
- SCHADT, E. E., S. TURNER a A. KASARSKIS. A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*. 2010, roč. 19, č. R2, s. R227-R240. DOI: 10.1093/hmg/ddq416. Dostupné z: <http://www.hmg.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/hmg/ddq416>
- SIEBERT, S., M. D. ROBINSON, S. C. TINTORI, F. GOETZ, R. R. HELM, S. A. SMITH, N. SHANER, S. H. D. HADDOCK, C. W. DUNN a J. JAEGER. Differential Gene Expression in the Siphonophore *Nanomia bijuga* (Cnidaria) Assessed with Multiple Next-Generation Sequencing Workflows. *PLoS ONE*. 2011, roč. 6, č. 7, s. e22953. DOI: 10.1371/journal.pone.0022953. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022953>
- SINGH, R., B. HAHN a A. HOSSAIN. Contribution of novel microRNAs in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The Journal of Immunology*. 2013, roč. 190, č. 1, s. 51.5.
- SOFKA, C. M., H. G. POTTER, R. S. ADLER a H. PAVLOV. Musculoskeletal Imaging Update: Current Applications of Advanced Imaging Techniques to Evaluate the Early and Long-Term Complications of Patients with Orthopedic Implants. *HSS Journal*. 2006, roč. 2, č. 1, s. 73-77. DOI: 10.1007/s11420-005-0131-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11420-005-0131-1>
- SONG, Y.-X., *et.al.* MicroRNA-148b is frequently down-regulated in gastric cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation. *Molecular Cancer*. 2011, roč. 10, č. 1, s. 1. DOI: 10.1186/1476-4598-10-1. Dostupné z: <http://www.molecular-cancer.com/content/10/1/1>
- STANCZYK, J., D. M. L. PEDRIOLI, F. BRENTANO, O. SANCHEZ-PERNAUTE, Ch. KOLLING, R. E. GAY, M. DETMAR, S. GAY a D. KYBURZ. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis*. 2008, roč. 58, č. 4, s. 1001-1009. DOI: 10.1002/art.23386. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.23386>
- SUGATANI, T., J. VACHER a K. A. HRUSKA. A microRNA expression signature of osteoclastogenesis. *Blood*. 2011, roč. 117, č. 13, s. 3648-3657. DOI: 10.1182/blood-2010-10-311415. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-10-311415>
- SUGIYAMA, D., K. NISHIMURA, K. TAMAKI, G. TSUJI, T. NAKAZAWA, A. MORINOBU a S. KUMAGAI. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2009, roč. 69, č. 1, s. 70-81. DOI: 10.1136/ard.2008.096487. Dostupné z: <http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/ard.2008.096487>
- SUN, D-H., M. C. D. TRINDADE, Y. NAKASHIMA, W. J. MALONEY, S. B. GOODMAN, D. J. SCHURMAN a R. L. SMITH. Human serum opsonization of orthopedic biomaterial particles: Protein-binding and monocyte/macrophage activation *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2003, 65A, č. 2, s. 290-298. DOI: 10.1002/jbm.a.10477. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.10477>

- SUN, G., J. YAN, K. NOLTNER, J. FENG, H. LI, D. A. SARKIS, S. S. SOMMER a J. J. ROSSI. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA*. 2009, roč. 15, č. 9, s. 1640-1651. DOI: 10.1261/rna.1560209. Dostupné z: <http://rnajournal.cshlp.org/cgi/doi/10.1261/rna.1560209>
- TALMO, C. T., A. S. SHANBHAG a H. E. RUBASH. Nonsurgical management of osteolysis: challenges and opportunities. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2006, roč. 453, č. 1, s. 254-264.
- TAM, S., R. DE BORJA, M.-S. TSAO a J. D. MCPHERSON. Robust global microRNA expression profiling using next-generation sequencing technologies. *Laboratory Investigation*. 2014, roč. 94, č. 3, s. 350-358. DOI: 10.1038/labinvest.2013.157. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/doi/10.1038/labinvest.2013.157>
- TAMAKI, Y., Y. TAKAKUBO, K. GOTO, T. HIRAYAMA, K. SASAKI, Y. T. KONTTINEN, S. B. GOODMAN a M. TAKAGI. Increased Expression of Toll-like Receptors in Aseptic Loose Periprosthetic Tissues and Septic Synovial Membranes Around Total Hip Implants. *The Journal of Rheumatology*. 2009, roč. 36, č. 3, s. 598-608. DOI: 10.3899/jrheum.080390. Dostupné z: <http://www.jrheum.org/cgi/doi/10.3899/jrheum.080390>
- TANG, F., C. BARBACIORU, Y. WANG, E. NORDMAN, C. LEE, N. XU, X. WANG, J. BODEAU, B. B. TUCH, A. SIDDIQUI, K. LAO a M. A. SURANI. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature Methods*. 2009, roč. 6, č. 5, s. 377-382. DOI: 10.1038/nmeth.1315. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/doi/10.1038/nmeth.1315>
- THOMPSON, J. F. a P. M. MILOS. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. *Genome Biology*. 2011, roč. 12, č. 2, s. 217. DOI: 10.1186/gb-2011-12-2-217. Dostupné z: <http://genomebiology.com/content/12/2/217>
- TOMANKOVA, T., M. PETREK, J. GALLO a E. KRIEGOVA. MicroRNAs: Emerging Regulators of Immune-Mediated Diseases. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2012, roč. 75, č. 2, s. 129-141. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2011.02650.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3083.2011.02650.x>
- TORTORA, G. J., B. DERRICKSON. Principles of anatomy and physiology. Hoboken, NJ: John Wiley, 2009. ISBN 04-700-8471-5.
- TUAN, R. S., F. Y. LEE, T. Y. KONTTINEN, J. M. WILKINSON a R. L. SMITH. What are the local and systemic biologic reactions and mediators to wear debris, and what host factors determine or modulate the biologic response to wear particles?. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2008;16 Suppl 1:S42-8., roč. 16, S1, s. 42-48. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2714366>
- UMILE, G. L., M. LOPPINI, C. CATERINA FUMO, G. RIZZELLO, W.S. KHAN, N. MAFFULLI a V. DENARO. Osteoarthritis: New Insights in Animal Models. *The Open Orthopaedics Journal*. 2012, roč. 6, č. 1, s. 558-563. DOI: 10.2174/1874325001206010558. Dostupné z: <http://benthamscience.com/open/openaccess.php?toorthj/articles/V006/SI0503TOORTHJ/558TOORTHJ.htm>

- van VLIET, A. H. M. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. *FEMS Microbiology Letters*. 2010, roč. 302, č. 1, s. 1-7. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01767.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6968.2009.01767.x>
- WANG, X. J., J. L. REYES JL, N. H. CHUA a T. GAASTERLAND. Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biology*. 2004, roč. 5, č. 9, s. R65. DOI: 10.1186/gb-2004-5-9-r65.
- WEN, H. a J. F. BAKER. Vitamin D, Immunoregulation, and Rheumatoid Arthritis. *Journal of Clinical Rheumatology*. 2011, roč. 17, č. 2, s. 102-107. DOI: 10.1097/RHU.0b013e31820edd18. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>
- WILLERT, H. G. *et.al.* Metal-on-Metal Bearings and Hypersensitivity in Patients with Artificial Hip Joints: A Clinical and Histomorphological Study. *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)*. 2005, roč. 87, č. 1, s. 28-36. DOI: 10.2106/JBJS.A.02039pp. Dostupné z: <http://jbjs.org/article.aspx?doi=10.2106/JBJS.A.02039pp>
- WILLERT, H. G. Fixation of endoprostheses with or without cement? *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*. 1993, roč. 131, č. 6, s. 601-609.
- WILLIAMS, A. E. Functional aspects of animal microRNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008, roč. 65, č. 4, s. 545-562. DOI: 10.1007/s00018-007-7355-9. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-007-7355-9>
- WINTER, J., S. JUNG, S. KELLER, R. I. GREGORY a S. DIEDERICH. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*. 2009, roč. 11, č. 3, s. 228-234. DOI: 10.1038/ncb0309-228. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncb0309-228>
- YAMADA, Y., K. KOSAKA, T. MIYAZAWA, K. KURATA-MIURA a T. YOSHIDA. MiR-142-3p enhances FcεRI-mediated degranulation in mast cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014, roč. 443, č. 3, s. 980-986. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.078. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X13021499>
- ZHANG, W., X. PENG, T. CHENG a X. ZHANG. Vascular endothelial growth factor gene silencing suppresses wear debris-induced inflammation. *International Orthopaedics*. 2011, roč. 35, č. 12, s. 1883-1888. DOI: 10.1007/s00264-011-1252-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00264-011-1252-4>
- ZHERNAKOVA, D. *et.al.* DeepSAGE Reveals Genetic Variants Associated with Alternative Polyadenylation and Expression of Coding and Non-coding Transcripts. *PLoS Genetics*. 2013, roč. 9, č. 6, s. e1003594. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003594. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1003594>
- ZHOU, L., X. LI, Q. LIU, F. ZHAO a J. WU. Small RNA transcriptome investigation based on next-generation sequencing technology. *Journal of Genetics and Genomics*. 2011, roč. 38, č. 11, s. 505-513. DOI: 10.1016/j.jgg.2011.08.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1673852711001470>

- ZHOU, X., J. RUAN, G. WANG a W. ZHANG. Characterization and Identification of MicroRNA Core Promoters in Four Model Species. PLoS Computational Biology. 2007, roč. 3, č. 3, s. e37. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0030037. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.0030037>
- ZHOU, Y., Y. LIU a L. CHENG. MiR-21 expression is related to particle-induced osteolysis pathogenesis. Journal of Orthopaedic Research. 2012, roč. 30, č. 11, s. 1837-1842. DOI: 10.1002/jor.22128. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jor.22128>
- ZHU, H., *et.al.* MicroRNA-21 in Scleroderma Fibrosis and its Function in TGF- β -Regulated Fibrosis-Related Genes Expression. Journal of Clinical Immunology. 2013, roč. 33, č. 6, s. 1100-1109. DOI: 10.1007/s10875-013-9896-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10875-013-9896-z>