

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI



Lékařská
fakulta

ÚSTAV HISTOLOGIE A EMBRYOLOGIE

MGR. PAVLA LUŽNÁ

**MOLEKULÁRNÍ ZNAKY V DIAGNOSTICE
BARRETTOVA JÍCNU**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

ŠKOLITEL: PROF. MUDR. JIŘÍ EHRMANN, PH.D.

STUDIJNÍ OBOR: ANATOMIE, HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE

OLMOUC, 2013

PALACKY UNIVERSITY IN OLOMOUC



Faculty of Medicine
and Dentistry

DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY

MGR. PAVLA LUŽNÁ

**MOLECULAR MARKERS IN BARRETT'S
ESOPHAGUS DIAGNOSTICS**

DISSERTATION THESIS

SUPERVISOR: PROF. MUDR. JIŘÍ EHRMANN, PH.D.

FIELD OF STUDY: ANATOMY, HISTOLOGY, EMBRYOLOGY

OLOMOUC, 2013

VZNIK DIZERTAČNÍ PRÁCE BYL PODPOŘEN TĚMITO GRANTY

LF_2012_019 Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

NT13585-3/2012 Ministerstvo zdravotnictví České republiky

NS10279-3/2009 Ministerstvo zdravotnictví České republiky

BIOMEDREG CZ 1.05/2.1.00/01.0030 Evropská Unie

MSM6198959205 Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky

MSM6198959216 Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci vypracovala samostatně pod vedením prof. MUDr. Jiřího Ehrmanna, Ph.D. a za použití citované literatury.“

V Olomouci

.....

Mgr. Pavla Lužná

„Jsem seznámena s tím, že tato dizertační práce je majetkem Univerzity Palackého v Olomouci (autorský zákon č. 121/2000 Sb., § 60 odst. 1) a bez jejího souhlasu nesmí být obsah práce použit v jiné publikaci. Souhlasím se zpřístupněním této práce v Univerzitní knihovně Univerzity Palackého v Olomouci.“

V Olomouci

.....

Mgr. Pavla Lužná

Tato dizertační práce vznikla pod záštitou oborové komise Anatomie, histologie, embryologie, ovšem nepojednává o čisté morfologii, která je její primární náplní. Současná filozofie lékařských fakult je taková, že i do čistě morfologických oborů pronikají molekulární metody studia tkání a buněk a přístup k jejich zkoumání se stává „multidisciplinárním“. Dochází k prolínání oborů a témat na úrovni patologie, biologie i fyziologie, což je také případ této dizertace. Její vznik je spjat též s Ústavem biologie a Ústavem klinické a molekulární patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého. Ukazuje se totiž, že díky studiu patologie buňky je mnohdy možné retrospektivně objasňovat význam a funkci vlastní „normální“ tkáně.

Děkuji prof. MUDr. Jiřímu Ehrmannovi, Ph.D. za vedení celé práce, upřímnou komunikaci, ohleduplnost, vstřícnost a úžasnou příležitost publikovat své výsledky na světových kongresech. Dále děkuji doc. RNDr. Vladimíru Divokému, Ph.D. za možnost spolupracovat s Ústavem biologie a za nadstandardní množství konzultací, které mi poskytl. Velmi si toho vážím. Děkuji prof. MUDr. Václavu Lichnovskému, DrSc. za vedení mé dizertační práce v prvních letech studia. Dále děkuji doc. MUDr. Vlastimilu Procházkovi, CSc., MUDr. Janu Gregarovi a RNDr. Vladimíru Kořínkovi, CSc. za odbornou spolupráci a všem pracovníkům Ústavu histologie a embryologie za přijetí do kolektivu. Děkuji též Mgr. Lence Radové, Ph.D. a Mgr. Janě Zapletalové, Ph.D. za statistické zpracování získaných dat a Mgr. Zdeňce Michalíkové – Malínské za pomoc se zpracováním grafických podkladů této dizertační práce.

Nemohu opomenout to, že během studií jsem potkala řadu kolegů, kteří se stali mými kamarády, se kterými jsem strávila mnoho báječných chvil konzultováním témat nejen vědeckých. Děkuji, Bělo E., Sylvo H., Katko Č., Ivanko T., Jitko Š., Evo N., Ivo A., Majo J., Verčo Ž., Jiřinko P., Jano Š., Moniko L., Gabko K., Zuzko P., Lucko T., Jano K., Renato M., Moniko H., Zuzko Ž., Lenko C., Katko S., Alenko Š., Honzo B.

Děkuji z celého srdce svým rodičům za celkovou a zejména pak psychickou podporu v časech, kdy mi nebylo nejlépe. Žádné poděkování za tuto podporu nebude nikdy dostačující. Děkuji za vše své sestře Petře a svému životnímu partnerovi Radku Vyhlídalovi za jeho neskutečnou toleranci a životní filozofii, která mě inspiruje už tolik let.

SOUHRN

Barrettův jícen (BJ) je onemocnění zažívacího traktu, jehož vznik a průběh je významně ovlivněn životním stylem. Přestože většina pacientů s touto chorobou žije desetiletí relativně bez komplikací, u 0,5–1 % z nich je každý rok diagnostikován ezofageální adenokarcinom. Prevalence ezofageálního karcinomu (který může být ovšem diagnostikován taktéž u zcela bezpříznakového pacienta) není nijak dramaticky vysoká. O to závažnější je skutečnost, že počet pacientů s adenokarcinomem v euroatlantické populaci stoupá, zatímco efektivní terapie neexistuje a léčba pacientů zůstává pouze paliativní. Současná medicína zná terapeutické zásahy, které dokáží u prekancerózních stádií onemocnění eliminovat riziko další transformace, ovšem jejich indikace musí být ze zdravotních i ekonomických důvodů řádně opodstatněná. Proto je velmi důležité umět vyhledat mezi pacienty „rizikové“ jedince, pro které je podstoupení této terapeutické intervence žádoucí. S příchodem pokročilých technik molekulární biologie do medicíny započala nová éra v diagnostice chorob. Snahou molekulárních biologů je vždy genetický, epigenetický a proteomický popis těchto onemocnění, které vedou k pochopení jeho podstaty. Některé choroby jsou již poměrně detailně popsány, u jiných popis a zejména vysvětlení podstaty zatím chybí.

Proces karcinogeneze je spojen s poškozením genetické výbavy buněk, což má za následek ztrátu schopnosti korigovat proliferační aktivitu. Jedním z iniciačních kroků tohoto jevu je dlouhodobé působení zánětlivých podnětů. Organismus dokáže těmto vlivům odolávat často i desítky let a záleží na přidružených rizikových faktorech, zda tento stres dokáže kompenzovat. Před 20 lety došlo k převratnému objevu nových regulátorů genové exprese – mikroRNA. Jejich potenciál regulovat až 30 % genů znamená, že jejich role je neopomenutelná v řadě biologických procesů souvisejících s vývojem, diferenciací, nebo programovanou buněčnou smrtí, přičemž deregulace těchto dějů má spojitost se zánikem organismu nebo naopak se ztrátou kontroly nad udržení integrity vlastního genomu.

Cílem této dizertační práce proto bylo nahlédnout do popisu vybraných proteinů zánětlivé dráhy (IL-1 β ; IL-8), která je známým iniciačním krokem transformace epitelu jícnu, zjistit míru odpovědi na poškození DNA (detekce fosforylovaného histonu H2AX na pozici Ser139), které je tímto zánětem vyvoláno a popsat, jak se vlivem těchto změn mění exprese defosforylovaného (aktivního) β -kateninu, který je klíčovou molekulou soudržnosti epitelálních buněk. MikroRNA jsou molekuly, které mohou výhledově sloužit

jako biomarkery vlastního vzniku a progresu mnoha onemocnění. Těchto molekul jsou stovky, proto byly na základě literatury vyselektovány čtyři kandidátní (miR-21, miR-192, miR-196a a miR-203), které byly dále detailněji studovány, přičemž byl kladen důraz na co nejvhodnější interpretaci výsledků pomocí správně zvolených endogenních kontrol. V obou studiích bylo využito relativně snadné dostupnosti archivních bioptických vzorků zalitých do parafínu, jejichž počet umožnil také validaci získaných dat. Při studiu mikroRNA expresních profilů byla tkáň navíc mikrodisekována, čímž byla získána pouze „čistá“ transformovaná buněčná populace, což znamená eliminaci rizika kontaminace vzorku okolní netransformovanou tkání.

Dosažené výsledky vypovídají o tom, že k akumulaci odpovědi na poškození DNA dochází až v pozdním stádiu transformace epitelu, zatímco exprese jednoho ze zánětlivých cytokinů je v průběhu onemocnění kontinuální. U tří ze čtyř studovaných mikroRNA dochází jednoznačně ke změně exprese v transformované tkáni ve srovnání s kontrolou a exprese mikroRNA-196a koreluje také s progresí onemocnění.

Klíčová slova: Barrettův jícen, mikroRNA, real-time PCR, imunohistochemie

SUMMARY

Barrett's esophagus (BE) is the disease of the gastrointestinal tract, whose origin and development is importantly influenced by the lifestyle. Despite the fact that most of the patients live decades with Barrett's esophagus disease, in 0,5–1 % of them there is diagnosed esophageal adenocarcinoma every year. Prevalence of esophageal adenocarcinoma (which can be diagnosed in asymptomatic patient as well) is not dramatically high. Although the number of patients with esophageal adenocarcinoma in the Euroatlantic population is raising, effective therapy does not exist and the treatment remains only palliative. Current medicine knows therapeutical interventions which can in the premalignant stage of the disease eliminate the risk of further cell transformation, but their indication has to be unfounded due to the medical as well as economical reasons. That is why it is very important to know how to find the „hazardous“ individuals among patients, for whom the therapeutic intervention undergoing is desirable. Advanced techniques of molecular biology are bringing to medicine the new approach in disease diagnostics. The effort of molecular biologists is always genetic, epigenetic and proteomic characterization of diseases which leads to understanding of its substance. Some of diseases are quite described, in the others description and especially explanation of their substance is missing.

The process of carcinogenesis is connected with the destruction of the genetic equipment of cells, which leads to the loss of the ability to control the proliferative activity. One of the initiation steps of this phenomenon are long-term inflammation inducements operating. The organism is able to resist to these influences decades very often and it depends on the associated risk factors, if the organism is able to compensate that stress. 20 years ago there an epoch-making event happened – new gene expression regulators – microRNAs were discovered. Their potential to regulate till 30 % of genes means that their role is inalienable in many biological processes related to development, differentiation or programmed cell death and deregulation of these processes is joined by cell death or conversely by loss of the genome integrity self-control.

That is why the aim of this dissertation thesis was to look to the description of selected proteins of the inflammatory signaling pathway (IL-1 β ; IL-8), which is known to be the initial step of the esophageal epithelium transformation, to investigate the rate of answer to the DNA damage response (detection of histone H2AX phosphorylated at the Ser139 position), which is evoked by this inflammation and to describe how the expression

of dephosphorylated (active) β -catenine, which is the crucial molecule of the epithelial cells cohesion, changes. MicroRNAs are molecules which can in the future serve as biomarkers of origin and progression of many diseases. There are hundreds of these molecules, therefore on the literary basis there were selected four candidates (miR-21, miR-192, miR-196a and miR-203), which were studied in detail, and there was a emphasis to interpret the results with correctly selected endogenous controls. In both of the studies we used the relatively easily available formalin fixed and paraffin embedded bioptic samples, and their number enabled validation of the data obtained as well. In addition, in the microRNA study the tissue was microdissected, thereby only the „pure“ population of the transformed cells was acquired and that means the elimination of contamination risk of the sample by the surrounding non-transformed tissue.

The results achieved testify, that the accumulation of the DNA damage response comes until the later stage of the epithelial transformation, whereas the expression of one of the inflammatory cytokines is continual through the disease stages. Expression of three microRNAs out of four is conclusively deregulated in the transformed tissue compared to control and microRNA-196a expression correlates with the disease progression as well.

Keywords: Barrett's esophagus, microRNA, real-time PCR, immunohistochemistry

OBSAH

SOUHRN	7
SUMMARY	9
1 ÚVOD	13
2 TEORETICKÁ ČÁST	16
2.1 BUNĚČNÉ POŠKOZENÍ	16
2.1.1 <i>POŠKOZENÍ DNA</i>	17
2.1.2 <i>ODPOVĚĎ NA POŠKOZENÍ DNA – DNA DAMAGE RESPONSE</i>	17
2.1.3 <i>ODPOVĚĎ NA POŠKOZENÍ DNA A KARCINOGENEZE</i>	18
2.1.4 <i>ZÁNĚT A KARCINOGENEZE</i>	21
2.2 MIKRORNA (miRNA)	22
2.2.1 <i>BIOGENEZE A NOMENKLATURA</i>	22
2.2.2 <i>BIOLOGICKÁ ROLE A MECHANIZMUS ÚČINKU miRNA</i>	24
2.2.3 <i>MIRNA A KARCINOGENEZE</i>	25
2.3 NOVÉ ZNAKY V DIAGNOSTICE ZÁVAŽNÝCH CHOROB	25
2.3.1 <i>BARRETTŮV JÍCEN, ADENOKARCINOM JÍCNU</i>	26
2.4 LASEROVÁ MIKRODISEKCE	31
2.4.1 <i>SYSTÉM VERITAS</i>	31
2.4.2 <i>SYSTÉM MMI CELLCUT</i>	33
3 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	35
3.1 TEORETICKÁ VÝCHODISKA	35
4 MATERIÁL A METODIKA	36
4.1 BIOPSIE SLIZNICE BARRETTOVA JÍCNU - PARAFÍNOVÉ BLOKY	36
4.2 PŘÍPRAVA PARAFÍNOVÝCH ŘEZŮ	37
4.2.1 <i>PRO IMUNOHISTOCHEMICKÉ ZNAČENÍ</i>	37
4.2.2 <i>PRO MIKRODISEKCI</i>	37
4.3 DVOU A TŘÍSTUPŇOVÁ NEPŘÍMÁ IMUNOHISTOCHEMICKÁ METODA	38
4.4 IZOLACE CELKOVÉ RNA Z MIKRODISEKOVANÉ TKÁNĚ	41
4.5 MULTIPLEXNÍ REVERZNÍ TRANSKRIPCE	42
4.6 PREAMPLIFIKACE	43
4.7 KVANTITATIVNÍ PCR V REÁLNÉM ČASE	44
4.7.1 <i>VÝTĚŽNOST qPCR REAKCE</i>	46
4.7.2 <i>VOLBA VHODNÝCH ENDOGENNÍCH KONTROL</i>	46
4.8 VYHODNOCENÍ	47
4.8.1 <i>VYHODNOCENÍ IMUNOHISTOCHEMICKÉHO BARVENÍ, STATISTICKÁ ANALÝZA</i>	47
4.8.2 <i>VYHODNOCENÍ EXPRESE miRNA, RELATIVNÍ KVANTIFIKACE, STATISTICKÁ ANALÝZA</i>	47
5 VÝSLEDKY	48
5.1 IMUNOHISTOCHEMICKÁ STUDIE	48

5.2 MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ STUDIE	57
5.2.1 <i>IZOLACE CELKOVÉ RNA Z MIKRODISEKOVANÝCH VZORKŮ</i>	57
5.2.2 <i>VÝTĚŽNOST QPCR REAKCE</i>	57
5.2.3 <i>VOLBA VHODNÝCH ENDOGENNÍCH KONTROL</i>	58
5.2.4 <i>RELATIVNÍ KVANTIFIKACE GENOVÉ EXPRESE</i>	60
5.2.5 <i>KORELACE HLADIN MIRNA S PROGRESÍ ONEMOCNĚNÍ</i>	60
5.2.6 <i>STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ</i>	61
6 DISKUZE	63
7 ZÁVĚR	69
8 SEZNAM ZKRATEK	70
9 LITERATURA	73
10 SEZNAM PUBLIKACÍ A PREZENTACÍ	92

1 Úvod

Maligní nádory jsou v naší populaci druhou nejčastější příčinou úmrtí (www.who.int; www.uzis.cz; www.svod.cz). Na vzniku těchto onemocnění se podílí především genetické, imunologické a nutriční faktory a faktory vnějšího prostředí. Maligní onemocnění vznikají následkem deregulace signálních drah v buňce.

Životní cyklus zdravé buňky probíhá pod přísnou vnitřní kontrolou. Eukaryotní buňka během svého života prochází buněčným cyklem (BC), kdy replikuje svůj genetický materiál a dělí se. Buněčný cyklus je tvořen dvěma periodami – interfází, kdy buňka roste, akumuluje živiny a duplikuje DNA, a mitózou, kdy se buňka dělí (Baserga, 1985). Základní schéma buněčného cyklu znázorňuje Obr. 1. Fáze buněčného cyklu se označují jako G1 (1. přípravná), S (syntetická), G2 (2. přípravná), M (mitotická). M fáze BC se dělí na dvě úzce spjaté události, mitózu, kdy se chromozomy dělí mezi původní a dceřinou buňku a cytokinezi, kdy nastává rozdělení cytoplazmy (Pardee et al., 1978; Baserga, 1984; Baserga, 1985). U různých buněk se délky jednotlivých fází liší. Každá dceřiná buňka po rozdělení začíná svůj vlastní buněčný cyklus. Aktivace konkrétní fáze buněčného cyklu je závislá na správném průběhu a ukončení fáze předchozí.

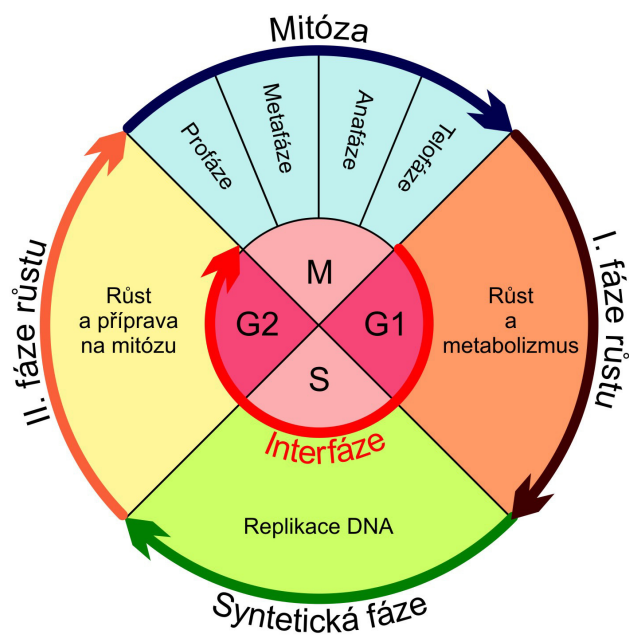
G1 fáze BC trvá od konce mitózy do začátku syntézy DNA. Buňka je nejvíce synteticky aktivní, syntetizuje enzymy nutné pro DNA replikaci a roste. Délka G1 fáze je vysoce variabilní, dokonce u buněk stejného druhu. S fáze začíná syntézou DNA. Po kompletní S fázi jsou všechny chromozomy zdvojeny, každý chromozom má dvě sesterské chromatidy. Transkripce a translace v průběhu této fáze BC probíhá velmi omezeně. Výjimkou je syntéza histonů tvořících opěrný systém dvoušroubovice DNA. U identických buněk trvá tato fáze přibližně stejnou dobu. Nastupující G2 fáze trvá až do mitotického dělení. Probíhá syntéza proteinů, hlavně komponent mikrotubulů podílejících se na buněčném dělení. M fázi BC tvoří karyokineze (rozdělení jádra) a cytokineze (rozdělení cytoplazmy). Karyokinezi lze dále dělit na profázi, metafázi, anafázi a telofázi (Alberts et al., 2005).

Některé buňky mají buněčný cyklus dočasně nebo trvale zastaven, zůstávají ale metabolicky aktivní. Takové se nacházejí v tzv. G₀ neboli klidové fázi. Tato fáze může trvat velmi dlouhou dobu, což je typické pro plně diferencované buňky (např. neurony). Naopak nedostatečně diferencované buňky, které mají poškozenou DNA a nepokračují v dalším vývoji, přechází do tzv. senescence. Je to alternativní stav k programované buněčné smrti, kdy buňka ztrácí schopnost dělit se. Tento stav nastává proto, aby porušená

DNA nebyla dále replikována do dceřiných buněk. Poškození buněk způsobené nejrůznějšími příčinami vyvolává změny, které mohou být podle účinku poškozujícího agens vratné nebo nevratné. Poškození DNA buňky (DNA damage – terminus technikus) patří mezi ta nejvážnější. Má mnoho příčin, od působení chemických látek včetně řady léčiv až po radiační nebo UV záření. Poškození DNA spouští v buňce kaskády signálních drah, které rozhodují o jejím dalším osudu. Správně fungující proces odpovědi na poškození genetické výbavy buňky je klíčový pro udržení genetické integrity organismu. Defekty v signálních drahách odpovědi na poškození DNA znamenají hrozící riziko maligní transformace.

Současná medicína spěje k tomu, aby každý vážně nemocný pacient absolvoval terapii co nejvíce přizpůsobenou jeho individuálním potřebám. Je vyvíjen tlak na hledání specifických markerů a prediktorů, které by dokázaly například u pacientů se zjištěnou prekancerózou vyjádřit vlastní riziko vzniku zhoubného onemocnění nebo v případě jeho rozvinutí odhadnout prognózu jeho vývoje. Mezi potenciální klinické biomarkery nejen nádorových onemocnění patří teprve v devadesátých letech objevené regulátory genetické exprese, krátkořetězcové nekódující RNA – mikroRNA. Jejich nadměrná nebo naopak snížená exprese je hojně diskutována ve vztahu ke karcinogenezi, zjišťuje se také to, zda změna jejich exprese je příčinou nebo následkem vlastní choroby.

Biomedicínské obory si kladou za cíl objasnit mechanismy signálních drah v buňkách a pochopit proces maligní transformace tak, aby bylo možno proti němu zasáhnout co nejdříve, co nejefektivněji a s ohledem na každého pacienta jako individuum. Tomuto poznání však musí bezprostředně předcházet monitorování a popis exprese zúčastněných genů a popis produktů těchto genů (proteinů) v transformovaných buňkách. Jen tak lze v budoucnu zařadit jejich vhodné zástupce na seznam markerů a terapeutických cílů. Dosažení těchto záměrů je příslibem prodloužení a zkvalitnění života pacientů či dokonce jejich úspěšného vyléčení.



Obr. 1 Schéma buněčného cyklu (přepřacováno podle St. Rosemary Educational Institution, 2013).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 BUNĚČNÉ POŠKOZENÍ

Poškození buňky je jakékoliv přetrvávající působení stresových nebo poškozujících faktorů, kdy dochází k poškození některé z buněčných komponent. Základním způsobem jej lze rozdělit na vratné a nevratné. První zahrnuje funkční a morfologické změny, které jsou vratné v případě, že negativně působící stimul je eliminován (např. změna tvaru buňky v závislosti na koncentraci iontů v okolí). Pokud negativní působení přetrvává, poškození se stává nevratným a buňky podstupují morfologické změny známé jako buněčná smrt (nekróza, apoptóza). Příčiny poškození buňky mohou být fyzikální (př. teplota, mechanický stres, ionizační záření), chemické (léky, jedy), biologické (infekční, imunologické) a ty spojené s nedostatkem substrátu (glukózy, kyslíku). Nejcitlivější k poškození jsou DNA a buněčná membrána (Kobb et al., 1996).

Na vzniku poškození buňky se podílejí i biochemické faktory. Například s hypoxií a toxickým poškozením bývá spojováno vyčerpání zásoby ATP a jeho snížená produkce. Organismus má sice možnost přejít na anaerobní glykolytickou dráhu, ale její kapacita je značně omezena. Následkem toho je ohrožena draselno-sodíková pumpa plazmatické membrány, vápenaté ionty vstupují do buňky, zpomaluje se syntéza proteinů, ribozomy se odlučují od endoplazmatického retikula. Buňka v takovém případě často zaniká procesem nekrózy. K mnoha stresujícím stimulům bývají citlivé také membrány mitochondrií. Změna jejich permeability má zásadní vliv na proces oxidativní fosforylace. Ischemie a toxiny jsou schopny vyvolat porušení integrity membrán a již zmíněný přenos vápenatých iontů do cytoplazmy, kde je za normálních podmínek jejich koncentrace velmi nízká. Proces mitochondriální respirace produkuje jako vedlejší produkty reaktivní kyslíkové radikály (ROS), které poškozují lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Taktéž volné radikály uvolňující se během absorpce radiační energie, při metabolismu exogenních chemických látek nebo léků poškozují buňku.

Buňky poškozené natolik, že již není možná jejich oprava, zamezují další progresi buněčného cyklu tím, že buď natrvalo zastaví buněčný cyklus a přejdou do stavu senescence nebo se uchýlí k některému typu buněčné smrti. Buňky se uchylují k apoptóze (programované buněčné smrti) nebo k autofagii (stav, kdy se buňka sama pozře, jde o cestu lyzozomální degradace). Tím je proliferační aktivita zastavena a je zamezeno dalšímu množení buněk vystavených stresu (Kurz et al., 2007; Vicencio et al., 2008). Avšak pokud

dojde k akumulaci poškození v buňce spojených se selháním řízení buněčného cyklu, znamená to riziko nekontrolovaného buněčného dělení.

2.1.1 POŠKOZENÍ DNA

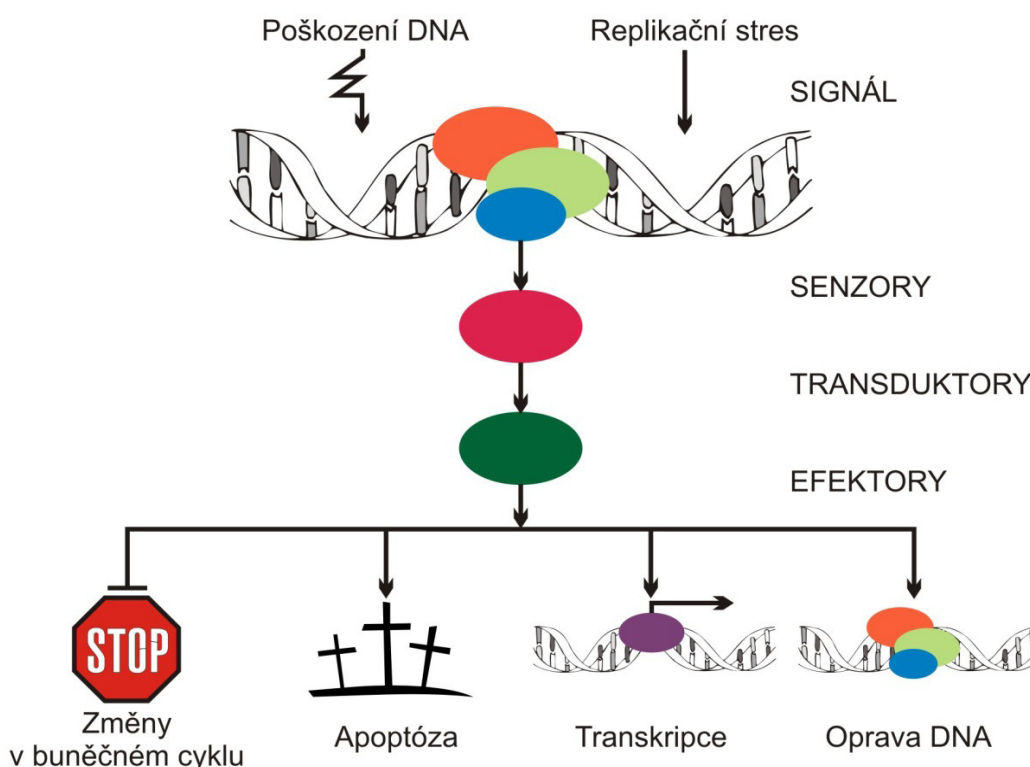
Zvláště závažným poškozením buňky je narušení DNA. Je častým jevem, denně v organismu vzniká více než milion lézí, z nichž podstatná část postihuje DNA (Lodish et al., 2004). Nejzávažnějším případem poškození jsou dvouvláknové zlomy (double strand breaks, DSBs), které jsou vyvolávány jak endogenně, např. kyslíkovými radikály vzniklými při metabolických procesech, zhroucením replikační vidličky, v průběhu meiózy, tak exogenně vlivem radiačního nebo UV záření, chemikáliemi či přímým nebo nepřímým poškozením DNA cytostatiky (Jackson, 2002; Shrivastav et al., 2008). K formaci DSBs mohou vést i jiné léze na DNA (Ohnishi et al., 2009). Poškozená DNA činí buňku geneticky nestabilní, což představuje vážné riziko maligního zvratu. Dvouvláknové zlomy na DNA vedou ke chromozomálnímu přeskupování nebo ztrátě chromozomů, senescenci, karcinogenezi nebo buněčné smrti, dále také k poruchám transkripce a replikace chromozomů (Vilenchik et Knudson, 2003; Czornak et al., 2008). Navíc díky tomu nelze využít komplementární vlákno DNA jako templát pro opravu poškozené DNA. Vznik dvouvláknových zlomů vyvolává v buňce okamžitou reakci. Existují proteiny detekující dvouvláknové zlomy. Ty se přeskupují do jádra buňky, kde vytváří morfologicky detekovatelné jaderné fokusy (Paull et al., 2000; Kobayashi et al., 2004; Kobayashi et al., 2009).

2.1.2 ODPOVĚĚ NA POŠKOZENÍ DNA – DNA DAMAGE RESPONSE

Jednou z nejdůležitějších otázek biologie buněčného cyklu je, jak je buňka schopna pozastavit svůj buněčný cyklus, pokud je vystavena genotoxickému stresu. Kontrolní mechanismy, které udržují integritu organismu, a které kontrolují správné načasování jednotlivých fází BC se označují jako kontrolní body (checkpoints) (Alberts et al., 2005). Tyto kontrolní body mají schopnost pozastavit buněčný cyklus na dobu potřebnou k opravě poškozené DNA, pokud je však poškození neopravitelné, indukují u buňky apoptózu nebo senescenci.

Signální síť kontrolních bodů DNA poškození se skládá ze senzorů, přenašečů a efektorů a jejich klíčovými komponentami jsou PIKKs – kinázy příbuzné

s fosfatidylinositol-3-kinázou: ATM, ATR a DNA-PK (Obr. 2). Jejich substráty jsou schopny pozastavit buněčný cyklus v G1, S nebo G2 fázi, vyvolat opravu DNA nebo buněčnou smrt (Shiloh, 2003; Bakkenist et Kastan, 2004; Bartek et al., 2004; Lukas et al., 2004). Biologický význam DNA damage response (DDR) je spojen s genetickými defekty kontrolních bodů, které jsou zodpovědné za riziko onemocnění novotvarem, imunodeficiencí nebo například neurodegenerativní poruchou.



Obr. 2 **Signalizace vyvolaná poškozením DNA či jiným replikačním stresem** (upraveno podle Zhou et Elledge, 2000).

2.1.3 ODPOVĚĎ NA POŠKOZENÍ DNA A KARCINOGENEZE

Poškození DNA buňky není ojedinělou záležitostí. Za jeden den je jich identifikováno několik tisíc. Většina je včas zachycena a opravena, ale efektivita těchto opravných procesů není stoprocentní (Vilenchik et Knudson, 2000). Pokud nejsou léze řádně opraveny, dochází k chybám při syntéze dceřiné DNA. Takto chybně syntetizovaná DNA je mutovaná a může znamenat počátek maligního bujení. Proto organizmy, které dědí vady v genech pro opravné mechanismy poškozené DNA, mají vyšší riziko vzniku rakoviny. Je pravda, že lidské somatické buňky jsou diploidní a mutované geny jsou

nejčastěji recesivní povahy, avšak recesivní mutantní geny se často exprimují za stavu ztráty heterozygotnosti (LOH), který vzniká při mutacích homologních chromozomů. Mutantní geny se exprimují také při ztrátě chromozomu (aneuploidii) nebo rekombinaci s homologním chromozomem (Bernstein et al., 2002).

Většina mutací má na buňku efekt neutrální nebo ničící, ovšem ne všechny. Některé podporují další růst buňky tím, že se buňky buď dělí, nebo nezanikají včas buněčnou smrtí. Takové buňky mají sklony k množení na úkor okolní tkáně a dávají vznik dalším mutantům (Bernstein et al., 2008). Pokud uvážíme, že v těchto buňkách dojde ke vzniku další mutace, nastane další posílení proliferačního potenciálu oproti nemutovaným elementům. Opakování těchto procesů po dobu několika desetiletí může vést ke vzniku premaligních nebo i maligních lézí.

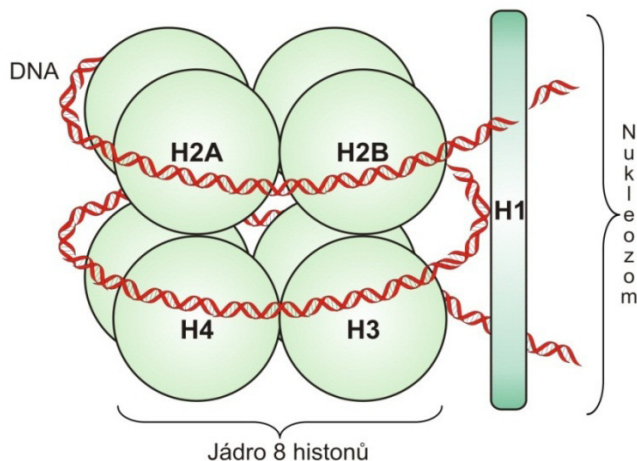
Prvním, kdo studoval souvislost mezi opravou poškozené DNA a rizikem vzniku rakoviny (na buňkách onemocnění *Xeroderma pigmentosum*), byl James Cleaver v roce 1969. Buňky, které studoval, vykazovaly defekt v opravném mechanismu DNA po UV ozáření. Pozdější studie identifikovaly geny *BRCA1* a *BRCA2* (při mutaci vedou k rozvoji rakoviny prsu) jako geny hrající úlohu při opravě DNA a při kontrole buněčného cyklu. Defekty v opravných mechanismech poškozené DNA jsou příčinou vzniku řady malignit (děložní čípek, děloha, plíce, hlava, krk, tlusté střevo, konečník) (Kobayashi et al., 1996; Shackelford et al., 1999; Hecht et Mutter, 2006; Roh et al., 2010). Rovněž u myšičího modelu s defekty v opravě chybného párování bazí u DNA byla sledována nekontrolovatelná proliferace (deWind et al., 1995; Shackelford et al., 1999).

Histon H2AX je členem rodiny H2A histonů, přičemž existuje pět takových rodin. Histony organizují DNA do nukleozomů, které tvoří základní strukturní jednotku chromatinu. Nukleozom se skládá z jádra s osmi proteiny (vždy dva z H2A, H2B, H3 a H4 rodin), 140 párů bazí z DNA navinutých okolo jádra a pátého histonu H1, který funguje jako můstek mezi nukleozomy (Obr. 3). Po vzniku DSBs lézí na DNA je aktivována skupina proteinů, tzv. PI3 kinázová rodina obsahující ATM, ATR a DNA-PK. Jeden z těchto proteinů fosforyluje H2AX v příslušném regionu (Rogakou et al., 1998; Dickey et al., 2009). Fosforylace histonů je velmi dobře detekovatelná běžnými protilátkami, v jádře buňky jsou jasně pozorovatelné body (fokusy), citlivost reakce je velmi vysoká (Sedelnikova et al., 2003). Přítomnost histonu H2AX fosforylovaného na pozici Ser139 (označovaného jako γ -H2AX) je považována za specifický indikátor přítomnosti dvouvláknových zlomů na DNA (Ohnishi et al., 2009). Proto se o γ -H2AX začalo

uvažovat jako o diagnostickém biomarkeru aktivace DDR dráhy s možným klinickým využitím (Sedelnikova et Bonner, 2006).

H2AX histon hraje důležitou roli při „povolávání“ a akumulaci DNA opravných proteinů v místě poškození DNA dvouvláknovým zlomem. Jedná se zejména o tyto proteiny: 53BP1, MDC1, RAD51, BRCA1 a komplex MRE11/RAD50/NBS1, který je kolokalizován s γ -H2AX fokusy (Kobayashi et al., 2002; Petrini et Stracker, 2003; Stewart et al., 2003). γ -H2AX byl poprvé sledován u fixovaných mitotických buněk muntžaka (druh jelenovité zvěře), kdy mitotické chromozomy vykazovaly tvorbu γ -H2AX fokusů již tři minuty po vystavení radiačnímu záření (Bonner et al., 2008). Práce Kobayashiho et al., 2009 demonstruje na H2AX-knockdown buňkách, že k nashromáždění ATM v místě DNA poškození dochází v závislosti na γ -H2AX. Mnoho proteinů opravy DNA (proteinů kontrolních bodů) se akumuluje na rostoucím γ -H2AX fokusu, což může vysvětlovat otevření chromatinové struktury a vytvoření platformy pro akumulaci DDR a reparačních faktorů. Navíc H2AX^{+/-} a H2AX^{-/-} myši thymocyty vykazovaly větší počet chromozomálních aberací (Bassing et al., 2003; Celeste et al., 2003). Všechna tato fakta hovoří pro to, že H2AX může sloužit jako „přístaviště“ pro proteiny zapojené v signálních drahách poškození DNA.

V okamžiku, kdy jsou DSBs opraveny, γ -H2AX fokusy mizí. Čím je ukončena kompletní oprava DNA, zůstává nejasné (zda je to znovuspojení DNA nebo návrat chromatinové struktury do stavu před lézí). Výsledky gelové elektroforézy buněčného obsahu (tzv. comet assay) ukázaly, že fokusy zpravidla mizí po znovuspojení DNA (Mirzayans et al., 2006). Práce Kinnery et al., 2008 poukazuje na fakt, že γ -H2AX hladiny zůstávají zvýšené i po znovuspojení DNA, což naznačuje, že odstranění γ -H2AX může záviset na ostatních krocích, které následují po znovuspojení DNA konců.



Obr. 3 **Struktura nukleozomu s histonem H1.** H1 funguje jako spojovací můstek mezi jednotlivými nukleozomy (upraveno podle: www.fastbleep.com/biology-notes/40/116/1191).

2.1.4 ZÁNĚT A KARCINOGENEZE

Role zánětu v procesu karcinogeneze je jedním z hlavních fenoménů dneška, avšak tato spojitost byla popsána již v 19. století (Balkwill et Mantovani, 2001). Typickým příkladem jsou nádory zažívacího traktu, prostaty nebo kůže (Sarasin, 1999; Kundu et Surh, 2008). Zánět se na karcinogenezi podílí několika mechanismy. Indukuje chromozomální nestabilitu, zasahuje do epigenetických procesů v genech, čímž způsobuje jejich nesprávnou expresi, podporuje proliferaci, stimuluje vaskularizaci v již vzniklém nádoru, podporuje invazi nádorových buněk mimo vlastní tumor a tím metastatický potenciál. V organismu dochází ke zvýšené expresi mediátorů zánětu, především cytokinů, chemokinů, prostaglandinů a NO (Hussain et Harris, 2007; Kundu et Surh, 2008; Porta et al., 2009). Přetrvávající zánět poškozuje kontrolní mechanismy různých signálních drah v buňce, přičemž jeho vliv na karcinogenezi lze pozorovat ve dvou rovinách. Zánětem řízená karcinogeneze je vnějším mechanismem, zatímco sám tumor taktéž produkuje látky způsobující akceleraci nádorového bujení. Tento jev je nazván mechanismem vnitřním (Kundu et Surh, 2012). Zánětlivé procesy v organismu mobilizují množství imunitních buněk, které proti němu aktivně bojují. Zvláště prospěšné jsou tyto obranné reakce v případě mikrobiální infekce nebo buněčného poškození jako takového (Mantovani et al., 2008). Ovšem pokud zánět přetrvává, buňky imunitního systému (neutrofilů, makrofágů, dendritické bb a jiné) začnou produkovat reaktivní kyslíkové a dusíkové radikály, které poškozují DNA, aktivují onkogeny a zároveň inaktivují tumor-supresory. Příkladem je

inaktivace genu *TP53* a současná aktivace onkogenu *Ras* při karcinogenezi kůže (Sarasin, 1999).

2.2 MIKRORNA (MIRNA)

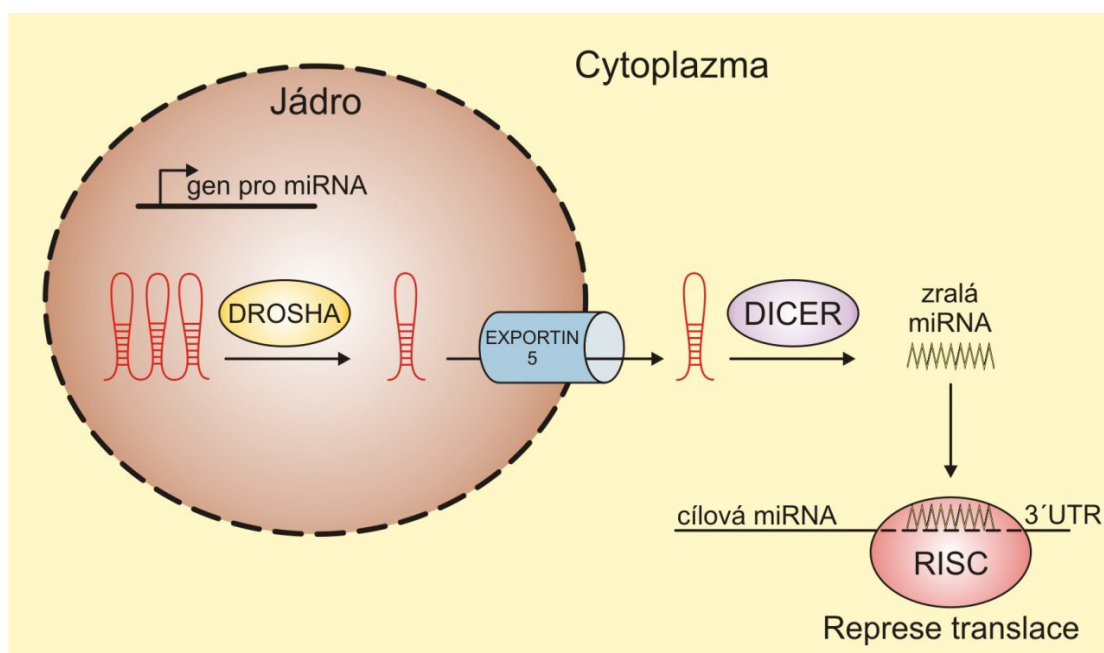
V roce 1993 identifikoval Lee se svými kolegy gen odpovědný za časovou kontrolu postembryonálního vývoje *Caenorhabditis elegans*. Tento gen *lin-4* (*lineage-4*) negativně reguloval hladinu proteinu LIN-14 a způsoboval pokles jeho hladiny v prvním stádiu larvy, tzv. L1. Pomocí klonovacích metod bylo zjištěno, že *lin-4* nekóduje protein, nýbrž dva transkripty, 22 a 61 nukleotidů dlouhé. Dále bylo objeveno, že transkripty jsou částí sekvence komplementární k opakující se sekvenci v 3'UTR (untranslated, nepřeloženém) regionu *lin-14* mRNA. Tato skutečnost potvrdila, že *lin-4* reguluje translaci *lin-14* přes RNA-RNA interakci. O sedm let později byla objevena druhá taková molekula *let-7* (Reinhart et al., 2000). Do dnešní doby byly popsány již stovky takových molekul u virů, červů nebo primátů náhodným klonováním, sekvenováním a výpočetní technikou. Tyto molekuly byly nazvány mikroRNA (miRNA). Jejich objev odstartoval novou kapitolu molekulární biologie a u mnohých biologických procesů objasnil jejich podstatu.

miRNA jsou krátké jednořetězcové okolo 22 nukleotidů dlouhé RNA, které nepodléhají translaci. Jsou přítomny jak v rostlinných, tak živočišných eukaryotech. Dodnes bylo u člověka experimentálně prokázáno přes 1000 miRNA a stále jsou objevovány nové (www.microrna.org). miRNA fungují jako regulátory genové exprese na post-transkripční úrovni (Nilsen, 2007). Biologickými výpočty bylo předpovězeno, že mohou regulovat až 30 % všech genů, jsou proto jednou z největších tříd takových regulátorů (Lim et al., 2003; Lewis et al., 2005). U člověka jsou kódovány 2–5 % genů, jsou obvykle seskupeny a nacházejí se v intronech protein kódujících genů (Bartel, 2004; Chen et al., 2004; Kim et Nam, 2006). Všechny identifikované miRNA jsou uspořádány do databáze vedené institutem Sanger ve Velké Británii (<http://microrna.sanger.ac.uk/>).

2.2.1 BIOGENEZE A NOMENKLATURA

miRNA vznikají z delších prekurzorových molekul s vlásenkovou strukturou, které jsou kódovány miRNA geny. Tyto prekurzorové molekuly jsou 70–100 nukleotidů dlouhé a obsahují jednu nebo více smyček (loops). Prekurzorové molekuly, tzv. primární transkripty (pri-miRNA) obsahují tzv. čepičku a poly-A konec a jsou zpracovávány

proteinovým komplexem DROSHA (RNáza III, u rostlin značeno DCL1), který resekuje vlásečkovou strukturu od zbytku transkriptu za vzniku pre-miRNA produktu (Kim, 2005). DROSHA sice katalyzuje vznik pre-miRNA, ale efektivní úprava této pri-miRNA závisí na proteinovém kofaktoru. Tento kofaktor obsahuje dvě domény (dsRBD) a spojuje se s ribonukleázou za vzniku tzv. mikroprocesorového komplexu (Denli et al., 2004). Tento typ produkce pre-miRNA však není jedinou cestou. Existuje alternativní možnost, která sestřihuje pri-miRNA transkripty za uvolnění intronů, které věrně napodobují strukturu pre-miRNA (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007). Tyto tzv. „mirtrons“ vstupují do procesu úpravy bez pomoci mikroprocesoru. Druhý proces úpravy miRNA prekursoru zahrnuje vystřihnutí terminální smyčky pre-miRNA za vzniku terminálního duplexu miRNA zhruba 22 nukleotidů dlouhého (Bernstein et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Kato et Slack, 2008). Tato reakce ovšem probíhá až po přenosu do cytoplazmy EXPORTINEM-5 a je katalyzována exonukleázou DICER. Jedno z vláken duplexu je zralá jednovláknová miRNA, zatímco komplementární vlákno značené * je obvykle rychle degradováno. I když jsou některé miRNA produkovány ze separátních transkripčních jednotek, většina miRNA je produkována z jednotek, které poskytují více než jeden produkt (Bartel, 2004). Biogeneze miRNA je schematicky zachycena na Obr. 4.



Obr. 4 **Biogeneze miRNA** (upraveno podle Mirnezamiho et al., 2009).

miRNA jsou obvykle označovány jako „miR“, kterému předchází zkratka charakterizující druh, ze kterého pochází. „*hsa*“ značí *Homo sapiens*, „*mmu*“ *Mus*

musculus atd. Jedinou výjimkou, která se u člověka a myši vyskytuje, je rodina *let-7*, která nese svoji původní zkratku „let“ místo „miR“. Každá miRNA má také jednoznačné identifikační číslo a identické miRNA napříč druhy mají toto číslo stejné (př. *hsa-miR-101* a *mmu-miR-101*). miRNA geny se značí kurzívou (*mir*). miRNA paralogy pocházející z jedné původní genové duplikace lišící se pouze jedním nebo dvěma nukleotidy se značí písmenem jako přípona (př. *hsa-miR-23a*, *hsa-miR-23b*) (Griffiths – Jones et al., 2006; Mirnezami et al., 2009).

2.2.2 BIOLOGICKÁ ROLE A MECHANIZMUS ÚČINKU miRNA

Biologická funkce a role miRNA *in vivo* jsou pořád z velké části neobjasněny. Je již známo, že u bezobratlých reguluje miRNA např. časovou organizaci vývoje, diferenciaci neuronů, proliferaci, kontrolu růstu a programovanou buněčnou smrt (Lee et al., 1993; Brennecke et al., 2003; Johnston et Hobert, 2003). U savců je známa jejich role v regulaci embryogeneze, udržování „zásob“ kmenových buněk (Bernstein et al., 2003), diferenciaci hematopoetických buněk (Chen et al., 2004) a vývoji mozku (Miska et al., 2004; Miska, 2005). Dosud jsou data o lidských miRNA spíše popisná, v každém případě je však zřejmé, že deregulace hladin miRNA souvisí s mnoha chorobami včetně maligních. Zatím ale často zůstává nejasné, zda změny exprese miRNA u těchto onemocnění jsou příčinou nebo následkem patologických procesů. Pomocí počítačových technologií již bylo předpovězeno, že existují potenciálně tisíce genů, které mohou být regulovány miRNA, ovšem pouze některé cíle byly funkčně ověřeny (Sassen et al., 2008).

Kvůli efektivitě působení se miRNA spojuje s proteiny do komplexu RISC (RNA induced silencing complex). Taková miRNA má schopnost vázat se na mediátorovou RNA (mRNA) na základě přesné nebo nepřesné komplementarity (Brennecke et al., 2005; Kato et Slack, 2008). Tato vazba v případě přesné komplementarity způsobuje degradaci mRNA, v případě nepřesné komplementarity na 3'UTR (nepřeloženém regionu) inhibici translace (Jackson et Standart, 2007; Pillai et al., 2007). Tato událost má za následek snížení hladiny proteinu cílového genu, přičemž nemusí klesnout hladina mRNA. U člověka miRNA z velké většiny inhibují translaci a pouze zřídka působí degradaci nebo štěpení mRNA. Velikost miRNA kolem 20 párů bazí způsobuje, že jedna miRNA může být komplementární k velkému počtu různých mRNA, proto činí ze skupiny miRNA tak významné regulátory genové exprese.

2.2.3 MIRNA A KARCINOGENEZE

Po objevení krátkořetězcových jednovláknových RNA v roce 1993 začaly být miRNA studovány ve vztahu ke karcinogenezi. Protože miRNA regulují mnoho biologických procesů, změna jejich exprese souvisí s mnoha onemocněními, včetně maligních. První studie informující o vztahu miRNA a rakoviny byla publikována u chronické lymfocytární leukémie (CLL) (Döhner et al., 2000). Autoři definovali dvě miRNA kódované v regionu, kde se u více než poloviny pacientů s CLL vyskytovaly delece. miRNA jsou buď deletované úplně nebo je snížena jejich exprese (Calin et al., 2002). Další důkaz toho, že miRNA jsou spojeny s mnoha chorobami, je fakt, že více než 50 % genů pro miRNA je situováno na fragilních částech chromozomů, kde se integrují viry, vyskytují amplifikace nebo ztráty heterozygotnosti (Calin et al., 2004). Deregulace hladin miRNA byla pozorována u množství malignit, zatím nejčastěji u kolorektálního karcinomu, rakoviny prsu, plic, děložního čípku nebo pankreatu (Yanaihara et al., 2006; Iorio et al., 2008; Schimanski et al., 2009; Wang et al., 2009; Yantiss et al., 2009; Earle et al., 2010; Hu et al., 2010). Expresní profil miRNA dokáže mnohdy výrazně lépe odlišit tumory různého původu oproti klasické mRNA profilační analýze (Lu et al., 2005).

To, že deregulace hladin miRNA je spojena s rakovinou, je dokumentováno řadou studií, otázkou ale zůstává, jakým způsobem deregulovaná miRNA k jejímu vzniku přispívá. Tzv. onkogenní miRNA (označované jako „oncomir“), které negativně regulují genovou expresi, zasahují do signálních drah v buňce, což má za následky autonomní proliferaci, vyhnutí se apoptóze, angiogenezi, invazivitu a metastazování (Hanahan et Weinberg, 2000). Stejný efekt má přitom snížení exprese miRNA s tumor-supresorovými vlastnostmi. Tumor-supresorové miRNA jsou v pevné vazbě s proteinem p53 a např. hladiny miR-34a jsou deregulované u jedné třetiny všech karcinomů kolorekta (He et al., 2007).

2.3 NOVÉ ZNAKY V DIAGNOSTICE ZÁVAŽNÝCH CHOROB

Biomarkery jsou indikátory stavu organismu, které jsou objektivně měřitelné. Informují o stavu organismu (normálním stavu, patogenezi nebo stavu po farmakologické či terapeutické intervenci). Nejhojnější skupinu zauímají biomarkery molekulární (biochemické), typickým příkladem je např. PSA, jehož hladina v krevním séru prudce stoupá při zánětu či karcinomu prostaty. Pro určení definitivní diagnózy bývá však

zavedeno stanovení celé skupiny biomarkerů - molekulárních, dále fyziologických, jejichž měření se zdokonaluje se zdokonalující se technikou (např. průtok krve tepnami) a anatomických, které se opírají o nejmodernější zobrazovací metody (NMR, CT). Biomarkery lze rozdělovat z jiného úhlu pohledu na diagnostické, pomocí nichž se diagnostikuje onemocnění v době, kdy ještě nelze odhalit konvenčními metodami; prognostické, pomocí nichž lze předpovědět agresivitu choroby a následky v případě absence terapie; a biomarkery prediktivní, které informují o pravděpodobné odpovědi pacienta na léčbu a předpovídají budoucí průběh chování choroby (www.biomarkers.org).

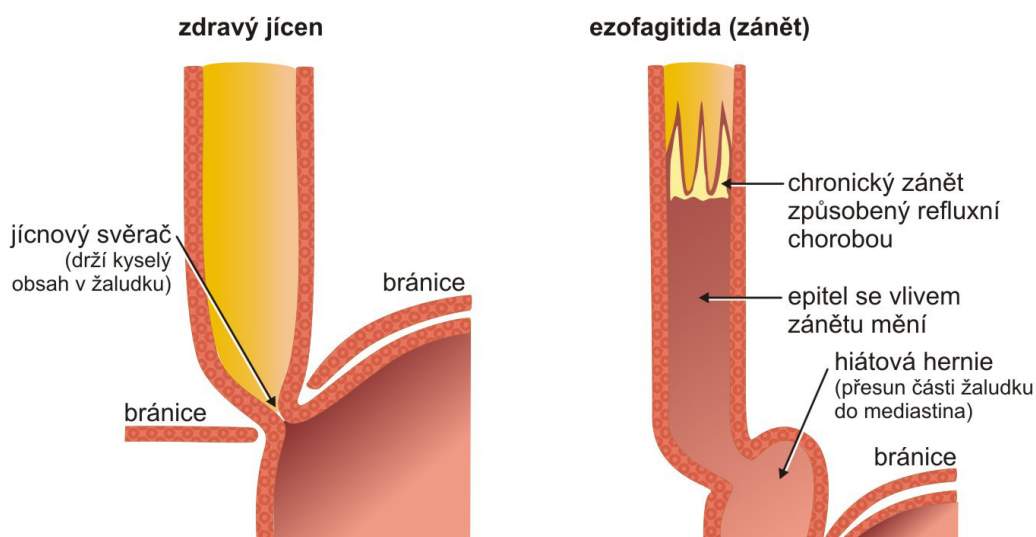
Lékařská diagnostika závažných chorob je v současnosti založena na stanovení více markerů patřících do různých skupin. Výsledky stanovení usnadňují rozhodování o strategii léčby, poskytují informace vedoucí k individuální léčbě bez zbytečné zátěže organismu, která vzniká léčbou nespecifickou. Se zdokonalováním metod molekulární biologie je poznáván genetický a proteinový obsah buňky se vzájemnými interakčními vztahy a výsledky tohoto snažení jsou aplikovány ve vývoji nových diagnostických a léčebných postupů, které řeší příčinu nikoli následek nemoci. Následující text popisuje základní molekulární aspekty u Barrettova jícnu. Na základě těchto poznatků potom praktická část dizertační práce pojednává o hledání nových biomarkerů této choroby s použitím metod imunohistochemie a molekulární biologie.

2.3.1 BARRETTŮV JÍCEN, ADENOKARCINOM JÍCNU

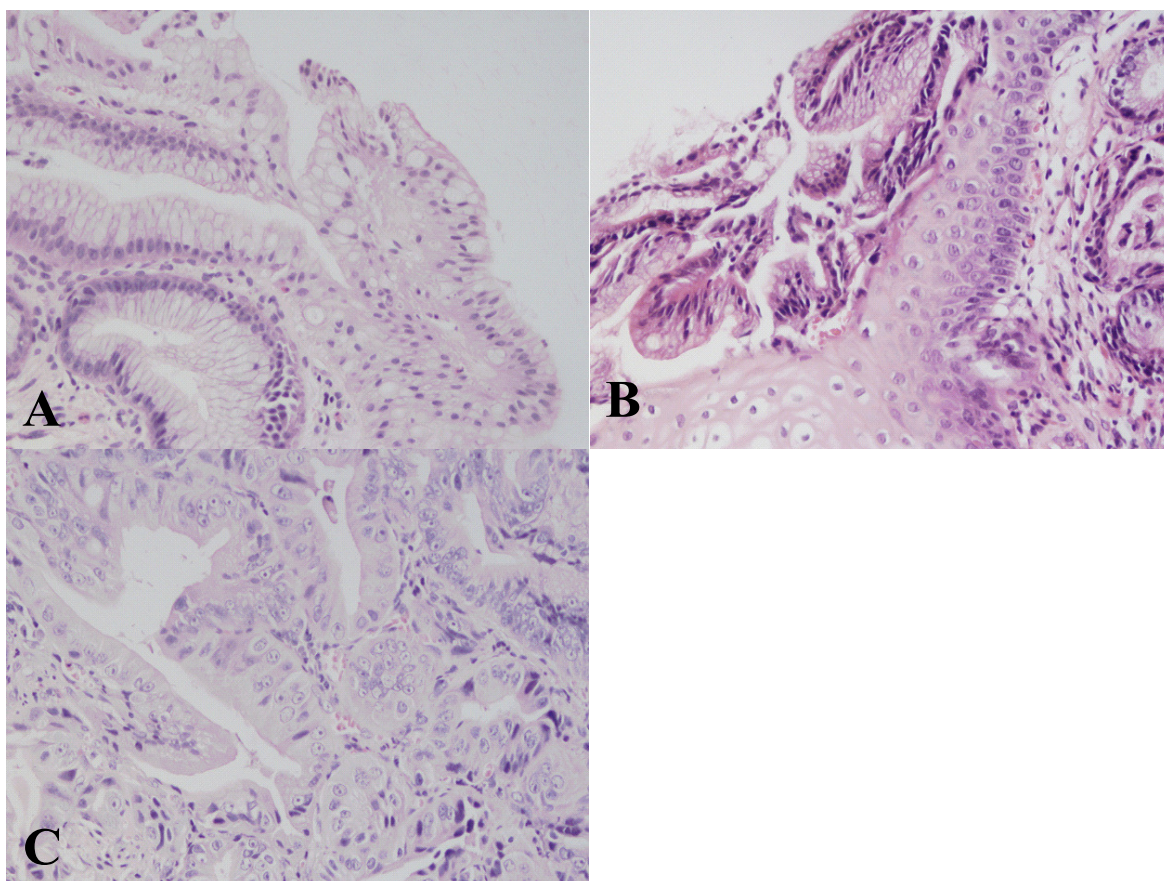
Barrettův jícen (BJ) je onemocnění trávicího traktu, kdy je vrstevnatý dlaždicový epitel distálního úseku jícnu nahrazen epitelem intestinálním (specializovaná intestinální metaplazie). Spolu s gastroezofageální refluxní chorobou (GERD) je prokázáným rizikovým faktorem pro rozvoj adenokarcinomu jícnu (EAC), Obr. 5 (Williams et al., 2006). Mezi další rizikové faktory se řadí přítomnost tzv. hiátové hernie (část žaludku je vyklenuta nad bránici do mediastina), pohlaví, rasa, věk, obezita (Moayyedi, 2008), i když zřejmě působí jako nepřímý faktor přes refluxní chorobu, u skladby stravy a užívání tabáku a alkoholu, které jsou rizikovými faktory pro vznik karcinomu jícnu odvozeného od dlaždicobuněčného epitelu, je spojitost se vznikem adenokarcinomu sporná (Hashibe et al., 2007; DeMeester, 2009; Falk, 2009). Naopak mezi faktory, které mohou organismus před onemocněním chránit, patří paradoxně infekce *Helicobacterem pylori*, bohatá konzumace ovoce a zeleniny nebo užívání kyseliny acetylsalicylové (Falk, 2009). Přesná definice Barrettova jícnu nebyla dlouho jasná, dnes *American College of Gastroenterology* definuje

BJ jako změnu epitelu jícnu jakékoliv délky, která je odhalena endoskopickým a histologickým vyšetřením (Sampliner, 1998; Spechler, 2002), přičemž se odlišují tzv. dlouhosegmentový Barrettův jícen, s délkou více než 3 cm nad gastroezofageální jankcí (přechod jícnu do žaludku) a krátkosegmentový Barrettův jícen s délkou menší než 3 cm. Pokud je endoskopické vyšetření nejasné a bioptické vyšetření odhalí případné okrsky specializované intestinální metaplazie, diagnóza je označena jako ultrakrátký segment. Význam diagnózy ultrakrátkého segmentu zůstává velmi kontroverzní (Spechler, 1997; Ruol et al., 2000; Williams, 2006). Mezi symptomy BJ patří nauzea, zvracení a potíže při polykání, někdy nemusí být patrný žádné symptomy a onemocnění bývá odhaleno při endoskopickém vyšetření indikovaném pro jiné symptomy.

Od 70. let 20. století došlo k významným změnám v epidemiologii novotvarů jícnu jak v Severní Americe, tak v Evropě. Rychleji než u jiných malignit stoupá počet nemocných s adenokarcinomem dolní části jícnu a gastroezofageální jankce, zatímco počet karcinomů vycházejících z vrstevnatého dlaždicového epitelu stagnuje. Příčiny tohoto jevu nejsou objasněny, zdá se ovšem, že velký podíl na tomto fenoménu nese způsob životního stylu (Blot et McLaughlin, 1999). Progrese Barrettova jícnu k adenokarcinomu je histologicky vyjádřena přechodem od metaplazie přes low-grade (LGD) a high-grade (HGD) dysplazii (Obr. 6). Dysplazie je považována za prekursorový stav k malignitě, high-grade dysplazie je již často spojována s adenokarcinomem jícnu, jehož prognóza je téměř vždy velmi špatná. Klinikové proto ve spolupráci s molekulárními biology hledají vhodné prediktivní a diagnostické markery BJ, aby bylo v kombinaci s endoskopickým vyšetřením možné odhalit riziko případné transformace Barrettova jícnu v adenokarcinom včas.



Obr. 5 Schematické znázornění zdravého jícnu a jícnu postiženého zánětem.



Obr. 6 (A) **Histologický obraz Barrettova jícnu** – tzv. intestinální metaplazie (přítomnost pohárkových buněk charakteristických pro střevní epitel), (B) **obraz low-grade dysplazie** a (C) **morfologické znaky buněk hovoří pro diagnózu high-grade dysplazie/ezofageální adenokarcinom.**

2.3.1.1 MOLEKULÁRNÍ ASPEKTY BARRETTOVA JÍCNU

Lagergren et al., 1999 popisuje Barrettův jícn jako komplikaci zánětu, která vzniká na podkladě dlouhodobého působení refluxátu na sliznici jícnu. 6–12 % pacientů s GERD má diagnózu BJ oproti 2 % pacientů, kteří jsou bezpříznakoví. To poukazuje na skutečnost, že zánět je zřejmě důležitým faktorem ve vývoji onemocnění (Falk, 2002). Slack se ve své práci z roku 2000 zabývá obecným vztahem zánětu a patogeneze epiteliálních metaplazií a říká, že zánět je společným mechanismem mnoha metaplazií u epitelů a může být schopen indukovat změnu v kmenových buňkách, ze kterých vzniká jiný druh specializované tkáně. Tkáň Barrettova jícnu je charakteristická vysokými cylindrickými buňkami, které s progresí onemocnění mění své morfologické vlastnosti. S nástupem dysplazie dochází k dalším buněčným změnám, v jádrech lze nalézt více jadérek, stoupá nukleoplazmatický poměr, struktura epitelu se mění. Bylo také dokumentováno, že chronický zánět aktivovaný mimo jiné cytokiny může mít podíl na maligní transformaci BJ a zároveň indukovat a zachovávat DDR (O’Riordan et al., 2005; Acosta et al., 2008; Bartek et al., 2008). Jako další faktor indukující DDR by mohl fungovat transkripční faktor β -katenin, který je klíčovou komponentou Wnt signální dráhy (Maher et al., 2009).

2.3.1.2 BARRETTŮV JÍCN A POŠKOZENÍ DNA

Malignita se z Barrettova jícnu vyvine na základě akumulace abnormalit na úrovni buněčné DNA. Tyto abnormality následně vyvolají fyziologickou nestabilitu. Buňky ztrácejí schopnost zajistit si svou vlastní signalizaci růstu, nepodléhají účinkům inhibitorů proliferace, nezanikají apoptózou, neomezeně se replikují, podporují vznik nového cévního zásobení, narušují okolní tkáň a prolifерují do nových lokalit (Hanahan et Weinberg, 2000; Morales et al., 2002). Zůstává však nevysvětleno, jaké molekulární mechanismy působí při transformaci normálního dlaždicobuněčného epitelu ve specializovanou intestinální metaplazii. Clemons et al., 2007 studoval vliv kyselého prostředí a NO na buněčných liniích odvozených z Barrettova jícnu a adenokarcinomu jícnu. V obou případech zaznamenal vznik dvouvláknových zlomů na DNA pomocí exprese fosforylovaného histonu H2AX a neutrální gelové elektroforézy buněčného obsahu. Olliver et al., 2005 se zabýval rizikovými faktory progresu Barrettova jícnu ve vztahu k poškození DNA. Pomocí gelové elektroforézy zjistil u buněčného obsahu BJ větší poškození DNA v místech metaplazie, než u normálního epitelu jícnu a žaludku. Dále zaznamenal, že vyšší míra poškození DNA u BJ koreluje s vyšším rizikem progresu

v high-grade dysplazii a adenokarcinom jícnu a větší míru poškození DNA spojil rovněž s kouřením. V této studii měly refluxní potíže vliv na zvýšení poškození DNA epitelu jícnu pouze u kontrolních skupin, míra tohoto poškození byla snížena podáním protizánětlivých léků. Tato data poukazují na genotoxický účinek na buňky premaligní léze jícnu a mohla by být jedním z vysvětlení jejich genetické nestability vedoucí k rozvoji adenokarcinomu. Podle této studie je kouření celkem jasným rizikovým faktorem progresu BJ k adenokarcinomu, roli refluxní choroby je však nutné dál detailně sledovat. Další studie (Olliver et al., 2003) identifikovala výraznější poškození DNA ve sliznici Barrettova jícnu oproti normálnímu dlaždicovému epitelu téhož pacienta. Jolly et al., 2004 studoval vliv jednotlivých složek žlučových kyselin a pH na ezofageálních buněčných liniích. Zjistil, že při použití okyselených buněčných médií je indukce dvouvláknových zlomů závislá na čase a pH. Dále zjistil, že specifické složky refluxního obsahu vyvolávají poškození DNA, které může přispívat k iniciaci rozvoje BJ.

2.3.1.3 BARRETTŮV JÍCEN A MIRNA

Před téměř dvaceti lety objevené regulátory genové exprese – mikroRNA se v současné době stávají novým fenoménem v pátrání po spolehlivých biomarkerech velkého množství nejen nádorových onemocnění (Tricoli et Jacobson, 2007; Zhang et Farwell, 2008). Jejich potenciální diagnostický význam je enormní, uvážíme-li rozsah jejich působení, který je pro mnoho miRNA i několik tisíc genů (www.microrna.org; www.mirbase.org).

I u Barrettova jícnu bylo provedeno již několik studií exprese genů pro mikroRNA. Tyto studie lze zatím počítat na desítky. Šlo o mikročipové analýzy s cílem mapovat expresní hladiny miRNA a určit ty s potenciálním diagnostickým významem (Yang et al., 2009; Nguyen et al., 2010). Jiné studie se zabývají konkrétními miRNA, které studují buď ve vztahu zdravá tkáň – léze nebo ve vztahu zdravá tkáň – metaplazie – dysplazie – adenokarcinom. Práce Mathého et al., z roku 2009 srovnává expresi miRNA mezi adenokarcinomem a spinocelulárním karcinomem jícnu s ohledem na délku přežití. Zmiňuje především špatnou prognózu u pacientů se spinocelulárním ezofageálním adenokarcinomem (SCC), kteří mají zvýšenou hladinu miRNA-21 v okolní nenádorové tkáni, a také u pacientů s EAC, kteří mají zvýšenou expresi miR-375 přímo v nádoru. Dále jsou popsány experimenty korelující vztah konkrétních miRNA s progresí Barrettova jícnu i funkční studie o vlivu konkrétních miRNA na expresi jejich cílových genů (Luthra et al.,

2008; Maru et al., 2009). Ovšem častým problémem těchto experimentů je malý počet vzorků. Proto se současným trendem stávají techniky, které dokáží pracovat s archivním materiálem – tkáněmi zalitými do parafínu, které mají potenciál retrospektivního pohledu (Specht et al., 2001; Abrahamsen et al., 2003; Siebolts et al., 2009). mikroRNA jsou sice procesem zpracování při přípravě parafinového bloku fragmentovány, ale jsou to krátké molekuly, které jdou pomocí kvalitních reagensů a přístrojů detekovat. Literární zdroje dokazují, že analýzy exprese genů z tkání zalitých do parafínu velice dobře korelují s analýzami z tkání čerstvých (Li et al., 2007; Xi et al., 2007).

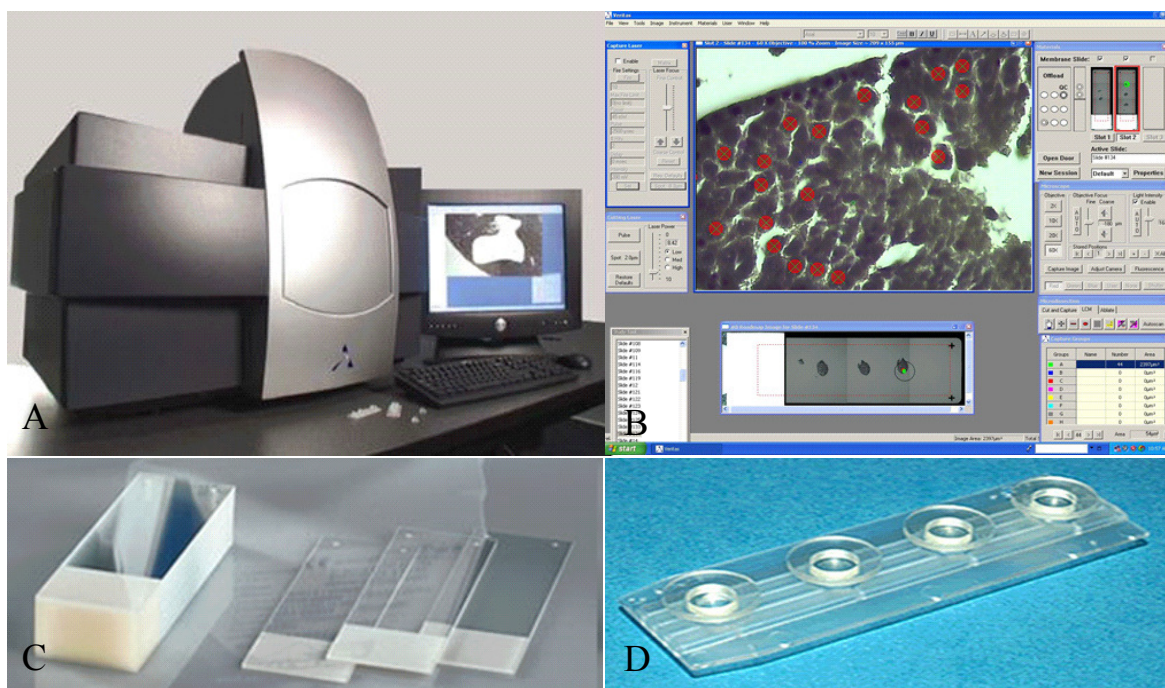
2.4 LASEROVÁ MIKRODISEKCE

Laserová mikrodisekce je metoda přesné izolace buněk z tkání, nejčastěji tkáňových řezů, která je prováděna na základě mikroskopického obrazu. Jejím příchodem v 80. letech minulého století došlo ke značnému zpřesnění molekulárně-biologických analýz, první publikovaná práce o LCM pochází ale až z roku 1996 (Emmert – Buck et al., 1996). Každá studovaná tkáň je heterogenní soubor buněk, který, pokud je použit jako celek, znamená možné zkreslení výsledků molekulárně-biologických analýz (Webb, 2000). Premaligní či maligní léze jsou vždy souborem buněk prostoupeným buňkami mikroprostředí, které jsou při expresních analýzách nechtěnou „příměsí“. Mikrodisekce je proto ideálním nástrojem pro získání čisté buněčné populace, následovaným nejčastěji expresními studii. Je možné mikrodisekovat buňky ze zmrazených řezů, parafinových řezů (Coudry et al., 2007; Nonn et al., 2010), buňky značené imunohistochemicky (Fend et al., 1999), živé buňky z buněčných kultur, a dokonce i chromozomy (www.molecular-machines.com). V předkládané práci byly použity dva typy laserových mikrodisektorů, které jsou popsány níže.

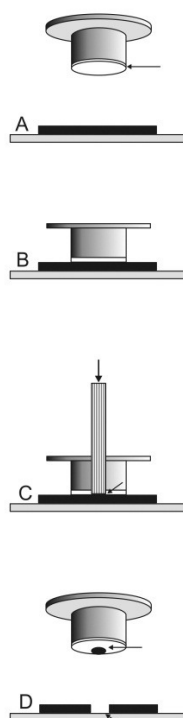
2.4.1 SYSTÉM VERITAS

Jde o uzavřený systém laserového zdroje (UV i IČ), invertovaného mikroskopu a PC systému. Veškeré ovládání přístroje probíhá pomocí počítače. Nosičem tkáně jsou SuperFrost[®] skla. Principem metody je aktivace termoplastické transferové membrány, která je umístěna na speciálním víčku (Obr. 7). Aktivace membrány probíhá pomocí přesně řízeného laserového paprsku v místě výskytu žádané buněčné populace následované přichycením žádaných buněk k této membráně (Obr. 8). Víčko s membránou je poté

nasazeno na mikroskopavku, ve které je nejčastěji lyzační roztok, neboť obvykle se z buněk izolují nukleové kyseliny.



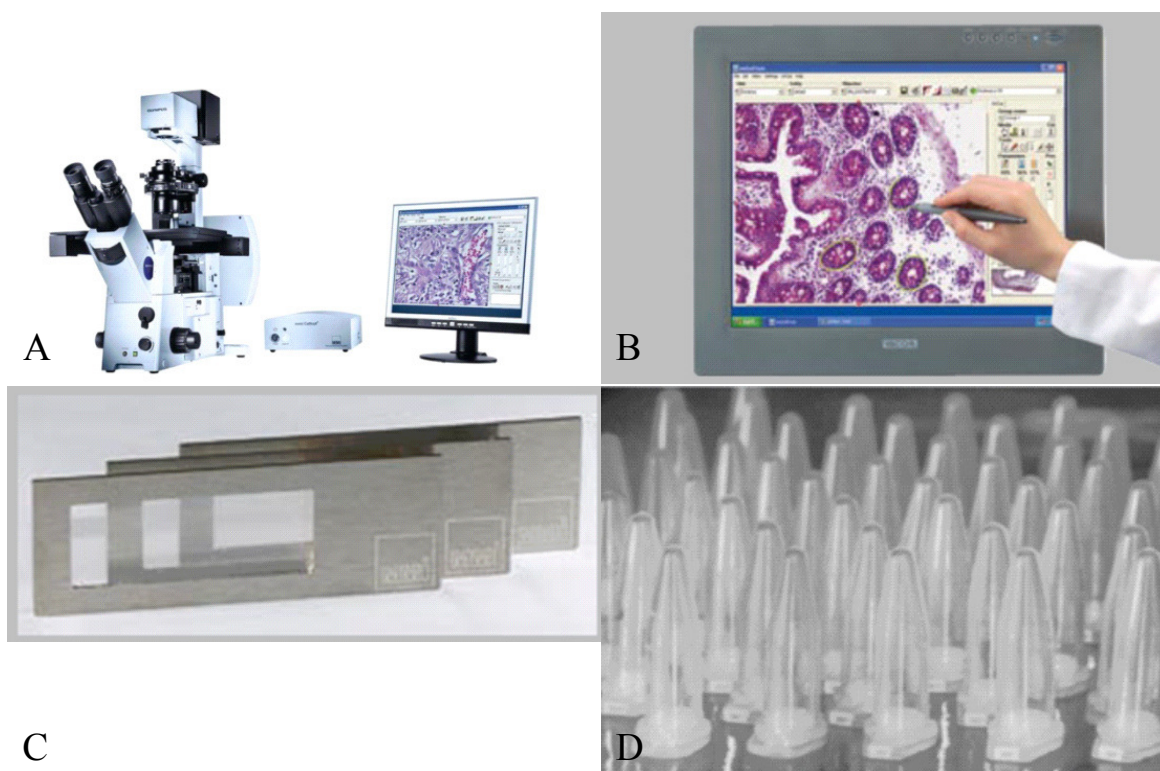
Obr. 7 (A) **Mikrodisektor Arcturus Veritas**, (B) jeho softwarové rozhraní [červená pole = tkáň určená k mikrodisekci (pozn. ilustrační obrázek)], (C) SuperFrost® skla jako nosiče tkáně a (D) víčka s termoplastickou membránou pro záchyt disekovaných buněk.



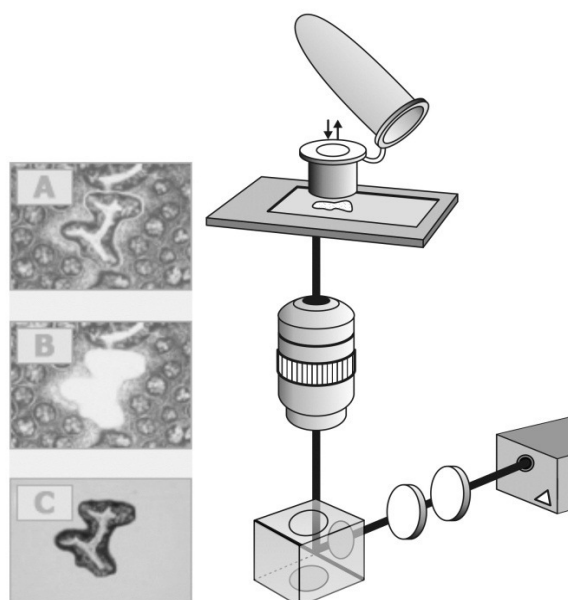
Obr. 8 **Princip mikrodisekce s použitím termoplastické membrány.** (A) Víčko s termoplastickou membránou, která je označena šipkou. (B) Víčko je umístěno nad oblast preparátu určenou k mikrodisekci. (C) Termoplastická membrána je aktivována laserovým paprskem v místě mikrodisekované tkáně. (D) Mikrodisekovaná tkáň je zachycena na membráně víčka, v tomto místě zůstává v preparátu prázdná oblast. Upraveno podle Sluky et al., 2008.

2.4.2 SYSTÉM MMI CELLCUT

Tento systém je tvořen otevřeným inverzním mikroskopem, UV laserovým zdrojem a PC s příslušným softwarem. Nosičem tkáně je hliníkový rámeček pokrytý polyethylentereftalátovou (PET) membránou, která je zcela inertní. Principem metody je „oříznutí“ vybraného okrsku tkáně laserem a její přilnutí ke speciálně upravenému víčku mikroskopu. Ovládání přístroje probíhá rovněž počítačem (Obr. 9, 10). Systém může disekovat i desetitisíce buněk, záleží pouze na velikosti použitých řezů a množství žádaných buněk.



Obr. 9 (A) **Mikrodisektor mmi CellCut**, (B) rozhraní jeho ovládacího softwaru (ilustrační obrázek), (C) membránová skla nesoucí tkáň a (D) mikrozkušavky s adhezním víčkem určené pro sběr disekovaných buněk.



Obr. 10 **Princip mikrodisekce mmi CellCut**. (A) Tkáň je nanesena na inertní PET membránu hliníkového rámečku, obarvena, (B) vyřezána laserovým paprskem a (C) mechanicky adherována na víčko mikrozkušavky se speciálním povrchem. Upraveno podle <http://www.molecular-machines.com/home>.

3 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

I. IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCE VYBRANÝCH PROTEINŮ V TKÁNI BARRETTOVA JÍCNU BĚHEM PROGRESE ONEMOCNĚNÍ A JEJICH VÝZNAM.

II. STANOVENÍ RELATIVNÍ EXPRESE VYBRANÝCH MOLEKUL MIŘNA U MIKRODISEKOVANÝCH VZORKŮ BARRETTOVA JÍCNU ZALITÝCH DO PARAFÍNU A JEJICH VÝZNAM V DIAGNOSTICE ONEMOCNĚNÍ.

3.1 TEORETICKÁ VÝCHODISKA

DDR je běžně aktivovaná u prekanceróz, kdy jsou buňky vystaveny replikačnímu stresu. Tato signalizace funguje jako tumor-supresorová bariéra chránící před progresí do plně maligního stavu. Specifickým markerem aktivované DDR je γ -H2AX (histon H2AX fosforylovaný na pozici Ser139). Dalším faktorem indukujícím DDR by mohl být aktivní (defosforylovaný) β -katenin (klíčový protein Wnt signální dráhy). Kromě onkogenů přispívá k indukci a zachování DDR zánětlivá signalizace a sekrece zánětlivých cytokinů. Chronický zánět v buňce (aktivovaný mimo jiné cytokiny IL-8 a IL-1 β) může mít proto podíl na maligní transformaci BJ.

Proces karcinogeneze všeobecně souvisí s narušením genů, které jsou zodpovědné za správný průběh buněčného cyklu. Na základě těchto faktů byly prozkoumány databáze mirbase.org a microRNA.org spolu s literárními zdroji a byly vyhledány konkrétní miRNA, které by mohly ovlivňovat tyto geny. Díky předchozím imunohistochemickým studiím IL-1 β a IL-8 bylo zjištěno, že může docházet k deregulaci miR-21 resp. miR-203. Literatura rovněž uvádí, že karcinomy zažívacího traktu jsou spojeny se změnou exprese miR-192, a že miRNA-196a má potenciál regulovat inhibitory buněčného cyklu.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 BIOPSIE SLIZNICE BARRETTOVA JÍCNU - PARAFÍNOVÉ BLOKY

Vzorky tkání (parafínové bloky) pacientů z let 2006 – 2010 byly získány z archivu Ústavu klinické a molekulární patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Jejich použití k experimentálním účelům bylo povoleno Etickou komisí LF UP a FN Olomouc. Imunohistochemické barvení γ -H2AX bylo provedeno na 91 pacientech (67 mužů a 24 žen), průměrný věk muže byl 57 let, ženy 59 let. Ostatní barvení byla provedena na vybraném počtu vzorků, neboť množství řezů z parafínových bloků dostupných pro experimentální účely bylo omezené. Do molekulárně-biologické studie bylo zahrnuto 71 vzorků pacientů (48 mužů a 23 žen). Průměrný věk muže byl 54 let, ženy 59 let. Distribuci vzorků uvádí Tab. 1 a 2. Primární diagnóza byla stanovena dvěma nezávislými patology z Ústavu klinické a molekulární patologie. Parafínové bloky byly použity jak pro imunohistochemickou studii, tak pro molekulárně-biologickou analýzu. Každý pacient podepsal informovaný souhlas s použitím vzorků tkáně k experimentálním účelům, případně poskytl lékařům informace o výskytu rizikových faktorů pro onemocnění BJ. Zjišťována byla přítomnost hiátové hernie, nadváhy, kouření, pravidelného pití alkoholu a jakéhokoli onemocnění rakovinou v přímé rodině. Vyhodnocení rizikových faktorů je předmětem jiné dizertační práce.

	ANTIGEN					
	γ -H2AX	IL-1 β	IL-8	β -katenin klon 8E7	β -katenin klon D13A1	β -katenin klon E5
DIAGNÓZA	POČET VZORKŮ					
BJ	39	3	4	7	3	2
LGD	37	4	4	7	3	2
HGD/EAC	15	5	5	8	3	3
	CELKEM VZORKŮ					
	91	12	13	22	9	7

Tab. 1 Počet vzorků zahrnutých do IHC studie a antigeny, které byly v příslušných tkáních značeny.

DIAGNÓZA	POČET VZORKŮ
BJ (NBI)	12
BJ	20
LGD	27
HGD/EAC	12

Tab. 2 Počet vzorků zahrnutých do molekulárně-biologické studie.

Pozn. BJ (NBI) je skupina vzorků, kterou tvoří případy, kdy byla pacientům diagnóza stanovena především na základě endoskopického vyšetření v NBI módu (pomocí světla specifické vlnové délky, které umožňuje detailnější pozorování sliznice), patolog tuto diagnózu podpořil s konstatováním, že jde o BJ, pokud odběr tkáně skutečně proběhl v oblasti nad gastroezofageální juncí. V imunohistochemické studii tvoří BJ (NBI) a BJ vzorky jednu skupinu.

4.2 PŘÍPRAVA PARAFÍNOVÝCH ŘEZŮ

4.2.1 PRO IMUNOHISTOCHEMICKÉ ZNAČENÍ

Sliznice jícnu byla odebírána v průběhu gastroendoskopického vyšetření pacientů na II. Interní klinice – Gastroenterologické a hepatologické FN Olomouc. Vzorek tkáně byl vždy po odběru okamžitě vložen do roztoku 10% Bakerovy tekutiny (šetrnější forma neutrálního formolu), kde byla tkáň fixována 24 hodin. Následovalo vypírání, odvodňování ve vzestupné řadě alkoholů, prosycování parafínem a finální zalití do parafínu. Pro imunohistochemické barvení byly připraveny řezy 3–5 μm silné, které byly naneseny na SuperFrost[®] skla (Menzel Gläser, Braunschweig, SRN) pro snadnější přilnutí tkáně k povrchu.

4.2.2 PRO MIKRODISEKCI

SYSTÉM VERITAS

Pro práci se systémem Veritas byla taktéž použita SuperFrost[®] skla. Veškeré použité chemikálie a plasty byly určeny pro práci s RNA, pracovní plochy byly ošetřeny přípravkem RNase Away (Carl Roth, Karlsruhe, SRN). Na podložní sklo bylo naneseno cca 5 řezů tkáně o tloušťce 8 μm . Řezy byly na 60 minut vloženy do termostatu (58°C), aby ještě lépe přilnuly k povrchu skla a následně byly ponechány v termostatu při 37°C do

druhého dne, kdy byly odparafinovány ve dvou lázních xylenů (po 5 minutách) a hydratovány 100% ethanolem (dvě lázně po 5 minutách). Následovalo barvení hematoxylinem a praní v tekoucí vodě, které trvalo vždy 30 sekund, odvodnění 100% ethanolem, projasnění xylenem a uložení do zkumavky se silikagelem pro dokonalé vysušení. Po vysušení byl preparát mikrodisekovan.

SYSTÉM MMI CELLCUT

Pro práci na tomto přístroji se místo SuperFrost[®] skel používají speciální hliníkové rámečky potažené polyethylentereftalátovou (PET) membránou (Molecular Machines & Industries, Glattbrugg, Švýcarsko). Veškeré práce byly prováděny tak, aby nedošlo ke kontaktu s RNázami. Hliníkové rámečky byly nejdříve ošetřeny UV zářením (30 min), potom byl jejich povrch pokryt poly-L-lysinem (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) a rámečky byly pozvolna vysušeny při 37°C. Následovalo nanesení několika parafinových řezů 8 µm silných a jejich zaschnutí. Dále byly řezy vloženy na 60 min do termostatu (58°C), aby lépe přilnuly. Následovalo barvení kitem pro LCM preparáty (LCM Staining Kit, Ambion/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), které zahrnovalo odparafinování xylenem (3 min), hydrataci sestupnou řadou ethanolů (3× 40 s), barvení kresylovou violetí (40 s), dehydrataci vzestupnou řadou ethanolů (5× 30 s), projasnění xylenem a vysušení silikagelem.

Pozn. Ke každému vzorku určenému k mikrodisekci byl připraven kontrolní řez, který byl obarven hematoxylin-eozinem, a s patologem bylo konzultováno, které léze je vhodné mikrodisekovat.

4.3 DVOU A TŘÍSTUPŇOVÁ NEPŘÍMÁ IMUNOHISTOCHEMICKÁ METODA

Principem imunohistochemické metody je vizualizace antigenu (proteinu) ve tkáni pomocí specifické primární protilátky. Aby bylo dosaženo dostatečné síly signálu, používají se tzv. nepřímé metody, kdy je na primární protilátku navázána protilátka sekundární (nepřímá dvojestupňová metoda), popřípadě protilátka sekundární a na ni ještě streptavidin-peroxidáza (nepřímá trojestupňová metoda). Následující Tab. 3 obsahuje informace o tkáních a protilátkách použitých pro imunohistochemické barvení včetně pozitivních kontrol, na kterých byla ověřena funkčnost protilátek.

ANTIGEN	KLONALITA protilátky	DRUH protilátky	ŘEDĚNÍ	POZITIVNÍ KONTROLA	VÝROBCE
H2AX (pSer139)	poly	R	1:50	myší kostní dřeň 1 h po ozáření 5 Gy	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
β -katenin (non- pSer37/Thr41)	8E7	M	1:100	kolorektální karcinom	Millipore, Billerica, MA, USA
β -katenin (non- pSer33/37/Thr41)	D13A1	R	1:400	kolorektální karcinom	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
β -katenin (celkový)	E-5	M	1:20	kolorektální karcinom	SCBT, Santa Cruz, CA, USA
IL-8	poly	R	1:100	adenokarcinom plic	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
IL-1 β	poly	R	1:100	adenokarcinom plic	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA

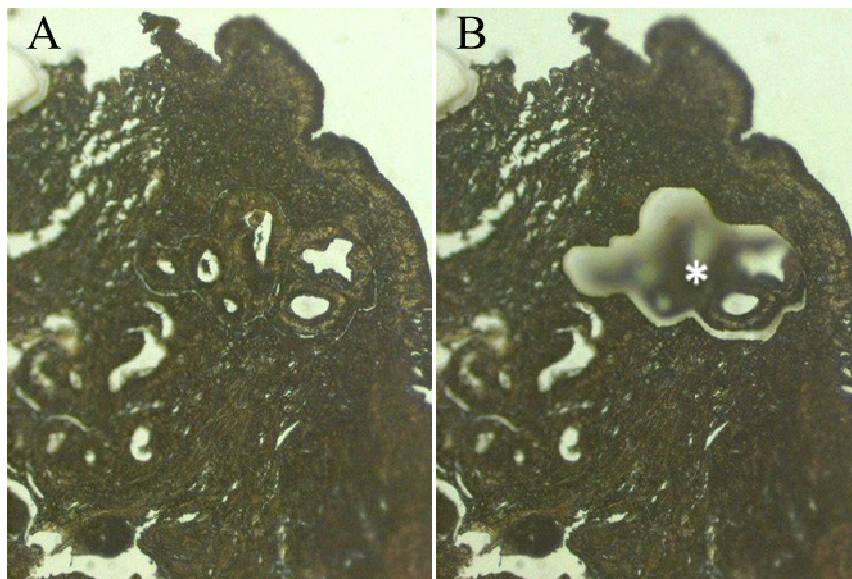
Tab. 3 Použité primární protilátky, jejich klonalita, původ, ředění a druh pozitivní kontrolní tkáně (R=králíci, M=myší, SCBT=Santa Cruz Biotechnology).

POSTUP IMUNOHISTOCHEMICKÉHO BARVENÍ	
odparafinování preparátu v xylenu (dvě lázně)	2 × 5'
odstranění xylenu z preparátu 100% ethanolem	5'
hydratace preparátu 96% ethanolem	5'
oplach dH ₂ O	5'
revitalizace antigenu v 0,01M citrátovém pufru pH6 při 120°C a zvýšeném tlaku	15'
chlazení tkáně po revitalizaci	15'
blok endogenní peroxidázy – 5% H ₂ O ₂ v 0,05M TRIS-HCl	30'
oplach pufr [*]	
primární protilátka v příslušné koncentraci	60' RT
oplach pufr [*]	
sekundární protilátka DAKO EnVision [®] (DAKO, Glostrup, Dánsko) anti-rabbit/mouse (RTU) ^{**}	60' RT
oplach pufr [*]	
chromogen DAB ⁺ (DAKO, Glostrup, Dánsko)	30''–5'
praní v tekoucí vodě	10'
dobarvení jader kamencovým hematoxylinem	
praní v tekoucí vodě	10'
oplach dH ₂ O	
odvodnění 96% ethanolem	5'
odvodnění 100% ethanolem	5'
projasnění xylenem	2 × 5'
montování do Entellanu [®]	

* oplach 2x 5' 0,05M TRIS-HCl pufr^{*} a 1x 5' 0,05M TRIS-HCl pufr^{*} + 0,05% TWEEN20

**Třístupňová nepřímá imunohistochemická metoda byla provedena podle totožného protokolu, pouze sekundární protilátka byla biotinylovaná (druh se odvíjel od druhu primární protilátky) a po jejím oplachu následovala inkubace se streptavidin-peroxidázou (BioGenex, San Ramon, CA, USA; 1:40) po dobu 40 min při RT. Následoval oplach a standardní vizualizace pomocí DAB⁺.

4.4 IZOLACE CELKOVÉ RNA Z MIKRODISEKOVANÉ TKÁNĚ



Obr. 11 Tkáň Barrettova jícnu (bez dysplazie) před (A) a po (B) mikrodisekci. V místě hvězdičky je „vyřezaná“ skupina transformovaných buněk, která byla následně adherována na víčko mikrozkušavky, lyzována a z buněk byla izolována celková RNA obohacená o frakci krátkých miRNA.

K izolaci celkové RNA (obohacené o krátké fragmenty) z tkáně zalité do parafínu je zapotřebí speciálního kitu. Následující protokol popisuje izolaci celkové RNA kitem RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Proces izolace zahrnuje 4 kroky: štěpení proteázou, izolaci nukleové kyseliny, štěpení nukleázou a finální purifikaci. Do mikrozkušavky s oddisekovanými buňkami (ty byly v obou případech mikrodisekce adherovány na víčku) bylo přidáno 100 μ l štěpícího pufru (digestion buffer) a 4 μ l proteázy, mikrozkušavka byla rychle centrifugována. Následovala inkubace vzorku v termostatu 3 h při 50°C, pak dalších 15 min při 80°C. Byl připraven master mix (132 μ l izolačního aditiva + 303 μ l 100% EtOH) a 395 μ l master mixu bylo přidáno ke vzorku. Vzorek byl napipetován na speciální filtr kolonky upevněné do sběrné zkušavky (dodávány s kitem) a centrifugován při 10 000g 30 s. Tekutina, která přešla přes filtr, byla odstraněna a filtr byl vložen znovu do této zkušavky. Na filtr bylo přidáno 700 μ l promývacího roztoku č. 1, zkušavka byla centrifugována 30 s při 10 000g a znovu byla odstraněna tekutina, která přešla přes filtr. Bylo přidáno 500 μ l promývacího roztoku č. 2/3 na filtr, následovala centrifugace 30 sekund při 10 000g. Tekutina, která přešla přes filtr, byla opět odstraněna, filtr byl vložen zpět do zkušavky a centrifugován

dalších 30 s, aby z něj byly odstraněny všechny zbytky tekutiny. Následovala inkubace s DNázou (60 μ l DNázy bylo nanášeno na střed filtru) 30 min při RT podle následující tabulky.

CHEMIKÁLIE	OBJEM (μ l)
10x DNáza pufr	6
DNáza	4
DEPC voda	50

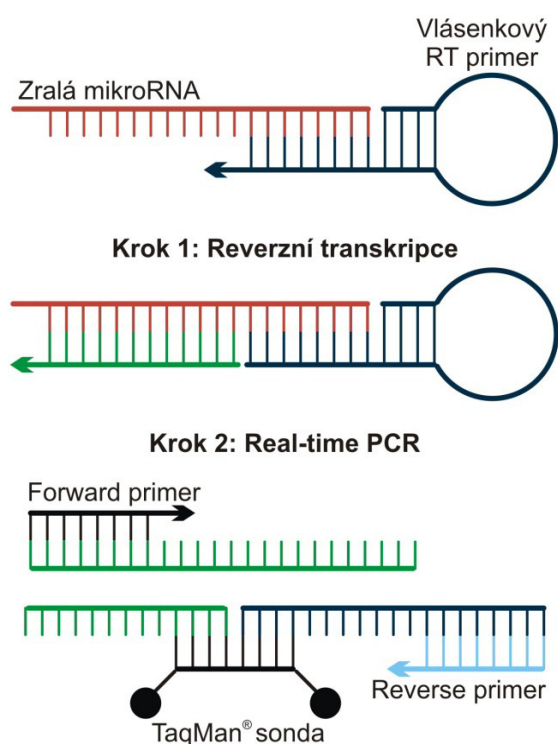
Tab. 4 Složení reakční směsi s DNázou.

Dále bylo na filtr přidáno 700 μ l promývacího roztoku č. 1, inkubováno 30–60 s při RT, centrifugováno 30 s při 10 000g, byla odstraněna tekutina, která přešla přes filtr, a ten byl znovu vložen do zkumavky. Pak bylo na filtr přidáno 500 μ l promývacího roztoku č. 2/3, proběhla centrifugace 30 s při 10 000g, bylo odstraněno to, co přešlo přes filtr a filtr byl znovu do této zkumavky vložen. Krok s promývacím roztokem č. 2/3 byl opakován, pak byl filtr centrifugován 1 min při 10 000g, aby se odstranila zbylá tekutina a filtr byl přemístěn do nové zkumavky. Na filtr bylo nanášeno 60 μ l elučního roztoku o laboratorní teplotě a po 1 minutě byl filtr centrifugován 1 min na maximální otáčky. Eluát obsahoval RNA, kterou však bylo nutno koncentrovat do nižšího objemu po dobu cca 1,5 h na přístroji CentriVap DNA Centrifugal Vacuum Concentrator (Labconco, Kansas City, MI, USA) na finální objem cca 20 μ l. Následně byla změřena koncentrace RNA na přístroji NanoDrop 1000 (Wilmington, DE, USA). RNA byla uskladněna při -80°C v mikrozkušavce DNA LoBind[®] Tube (Eppendorf, Hamburk, SRN) nebo ihned podrobena reverzní transkripci.

4.5 MULTIPLEXNÍ REVERZNÍ TRANSKRIPCE

Před samotnou reverzní transkripcí byla vytvořena směs RT vlásenkových (stem-loop) primerů vybraných mikroRNA a potencionálních endogenních kontrol smísením stejného objemu od každého RT primeru (RNU44, RNU48, RNU66, U47, RNU6B, miR-

16, miR-21, miR-192, miR-196a, miR-203). Každá RT reakce obsahovala 5 ng celkové RNA, přičemž reakční objem byl 7,5 μ l. Bylo napipetováno 3,5 μ l master mixu (0,075 μ l 100mM dNTPs s dTTP; 0,5 μ l MultiScribeTM reverzní transkriptázy, 50 U/ μ l; 0,75 μ l 10x pufru pro reverzní transkripci; 0,095 μ l inhibitoru RNázy, 20U/ μ l; 2,08 μ l DEPC vody), vše součástí kitu TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); 2,5 μ l RNA a 1,5 μ l RT stem-loop RT primer poolu (10 RT primerů o výsledné koncentraci 0,5 \times každý, vše z Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Reverzní transkripce probíhala podle protokolu dodaného výrobcem (30 min při 16°C, 30 min při 42°C, 5 min při 85°C).



Obr. 12 Schéma specifické reverzní transkripce a qPCR reakce s TaqMan[®] sondou společnosti Applied Biosystems/Life Technologies.

4.6 PREAMPLIFIKACE

Aby se předešlo vysokým hodnotám ct, které už od 35. cyklu nebývají považovány za spolehlivé, byl do metodického postupu před samotnou qPCR zařazen preamplifikační krok dle Noutsias et al., 2008, který sníží ct hodnoty, čímž zpřesní celou analýzu. Preamplifikační strategie má ovšem jednu podmínku. Rozdíl ct hodnot stanovovaného

genů a endogenní kontroly před a po preamplifikaci musí být $\leq 1,5$ cyklu. Kontrolními experimenty bylo zjištěno, že podmínka byla v případě této práce splněna. Celkový objem preamplifikační reakce byl 25 μl . Složení reakce uvádí následující tabulka, cyklizační schéma bylo nastaveno takto: 95°C 10 min + 14 cyklů (95°C 15 s + 60°C 4 min).

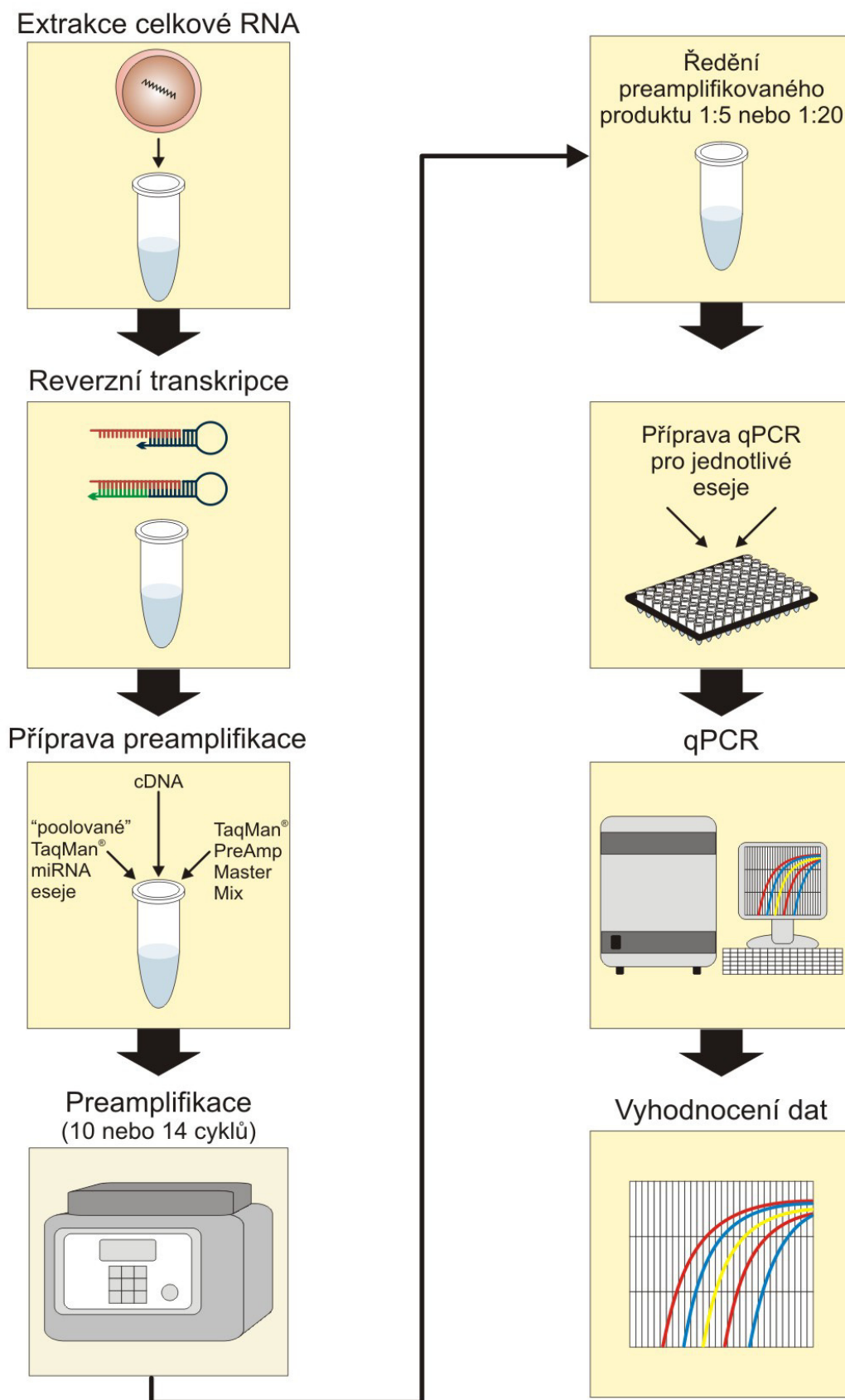
CHEMIKÁLIE/PŮVOD	OBJEM (μl)
TaqMan [®] PreAmp MM (2 \times) Applied Biosystems/Life Technologies; Carlsbad, CA, USA	12,5
mikroRNA esej ředěná TE pufrem (výsledná koncentrace každé eseje byla 0,2 \times) Applied Biosystems/Life Technologies; Carlsbad, CA, USA	6,25
RT produkt + DEPC H ₂ O	6,25

Tab. 5 Předpis preamplifikační reakce.

Pozn. Reverzní transkripce i preamplifikace byly provedeny na přístroji Mastercycler[®] gradient (Eppendorf, Hamburk, SRN).

4.7 KVANTITATIVNÍ PCR V REÁLNÉM ČASE

Celkový objem qPCR reakce byl 10 μl . Reakční směs byla složena z 5 μl TaqMan[®] 2 \times Universal Master Mixu II (No AmpErase UNG), 2 μl H₂O (bez přítomnosti nukleáz), 0,5 μl příslušné TaqMan[®] mikroRNA eseje (vše od Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a 2,5 μl preamplifikovaného templátu. Amplifikační schéma bylo nastaveno podle doporučení výrobce [95°C 10 min, 45 cyklů (95°C 15 s, 60°C 1 min)]. Veškeré qPCR experimenty byly provedeny na systému LightCycler[®] 480 (Roche Applied Science, Penzberg, SRN).



Obr. 13 Obecné schéma pracovního postupu stanovení exprese mikroRNA ve vzorku tkáně zalité do parafínu.

4.7.1 VÝTĚŽNOST QPCR REAKCE

V běžné praxi se při výpočtech relativní kvantifikace genů používá eficeience PCR reakce 2, tedy každým následujícím cyklem se množství produktu zdvojnásobuje. Pro dosažení co možná nejvíce přesných výsledků bylo v této práci kalkulováno i s eficiencí PCR reakce, která byla otestována na komerčně dostupné celkové RNA žaludku (FirstChoice[®] Stomach RNA, Ambion/Applied Biosystems/Life Technologies; Carlsbad, CA, USA), neboť Barrettův jícen je glandulárním typem epitelu s výskytem v distální oblasti jícnu. Plán a složení reakcí byly totožné jako u RNA ze vzorků, včetně preamplifikačního kroku s tím rozdílem, že pro určení eficeience reakce je nutné provést qPCR reakce pro 4 různá vstupní množství RNA. Ty byly zvoleny jako: 10 ng, 5 ng, 1 ng a 100 pg. Eficeience qPCR reakce pro každou jednotlivou mikroRNA esej byla určena směrnici grafu závislosti hodnoty ct na logaritmu koncentrace RNA.

4.7.2 VOLBA VHODNÝCH ENDOGENNÍCH KONTROL

Relativní kvantifikace genů je vždy vyjádřena vůči tzv. endogenní kontrole (referenčnímu neboli housekeepingovému genu), jehož exprese by měla být víceméně stabilní napříč všemi stádii studovaného onemocnění. Výrobce PCR chemikálií, které byly použity ve výše popsaných reakcích, doporučuje své endogenní kontroly. V případě mikroRNA jsou to malé jaderné nebo jadéřkové RNA. Jde o krátké RNA molekuly, které nereprezentují mikroRNA, ale jsou k nim ekvivalentní svou délkou. V literatuře lze nalézt také příklady samotných mikroRNA použitých jako referenčních genů.

Na základě literatury bylo pro relativní kvantifikaci vytipováno 6 potenciálních endogenních kontrol (RNU44, RNU48, RNU66, RNU6B, U47, miR-16). Dvě nejstabilnější endogenní kontroly byly vyhodnoceny na základě volně získané softwarové aplikace geNorm. Aplikace kalkuluje tzv. hodnotu expresní stability (M) jako průměrnou párovou odchylku (V) pro konkrétní gen vzhledem k ostatním studovaným referenčním genům. Postupné vyřazování genů s nejvyšší hodnotou expresní stability umožňuje všechny testované endogenní kontroly seřadit (Vandesompele et al., 2002). Relativní exprese je potom vyjádřena vůči dvěma nejstabilnějším endogenním kontrolám.

4.8 VYHODNOCENÍ

4.8.1 VYHODNOCENÍ IMUNOHISTOCHEMICKÉHO BARVENÍ, STATISTICKÁ ANALÝZA

Hodnocení imunohistochemického barvení Barrettova jícnu bylo provedeno semikvantitativní metodou. Expres vybraných proteinů v tkáni byla hodnocena jako 0 (< 5 pozitivních buněk), + (6–10 % pozitivních buněk), ++ (11–25 % pozitivních buněk) a +++ (26 % a více pozitivních buněk). Dále byla hodnocena lokalizace positivity (jádro, membrána, cytoplazma). Ke statistické analýze dat byl použit software SPSS verze 15 (SPSS Inc., Chicago, USA). Pro porovnání skupin dle positivity H2AX a β -kateninu (klon 8E7) byl použit Fisherův přesný test s Bonferroniho korekcí signifikance. Testy byly prováděny na hladině signifikance 0,05.

4.8.2 VYHODNOCENÍ EXPRESE MIŘNA, RELATIVNÍ KVANTIFIKACE, STATISTICKÁ ANALÝZA

Výsledky experimentů jsou prezentovány jako x-té změny exprese genů. Jde o poměr relativních expresí genů (relativní exprese vyšetřovaného genu v určitém vzorku a relativní exprese stejného genu v kalibrátoru – v tomto případě v normálním zdravém epitelu jícnu). Relativní genová exprese je podílem relativní exprese cílového genu a relativní exprese referenčního (housekeepingového) genu. Číslo, které udává řád změny, vyjadřuje, kolikrát je relativní exprese cílového genu větší nebo menší než relativní exprese tohoto genu v kalibrátoru. Vše lze vyjádřit vzorcem na Obr. 14, který zohledňuje i eficienci qPCR reakce. Výsledky relativní kvantifikace všech 4 genů byly zpracovány a konzultovány s biostatistikem. Pro vyjádření hladiny p byl zvolen neparametrický Kruskal-Wallisův test s mnohonásobným porovnáním. Hladina statistické významnosti byla určena hodnotou $p \leq 0,05$.

$$\text{relativní exprese} = \frac{(E_{\text{ref}})^{C_T \text{ vzorku}}}{(E_{\text{cilový}})^{C_T \text{ vzorku}}} \div \frac{(E_{\text{ref}})^{C_T \text{ kalibrátoru}}}{(E_{\text{cilový}})^{C_T \text{ kalibrátoru}}}$$

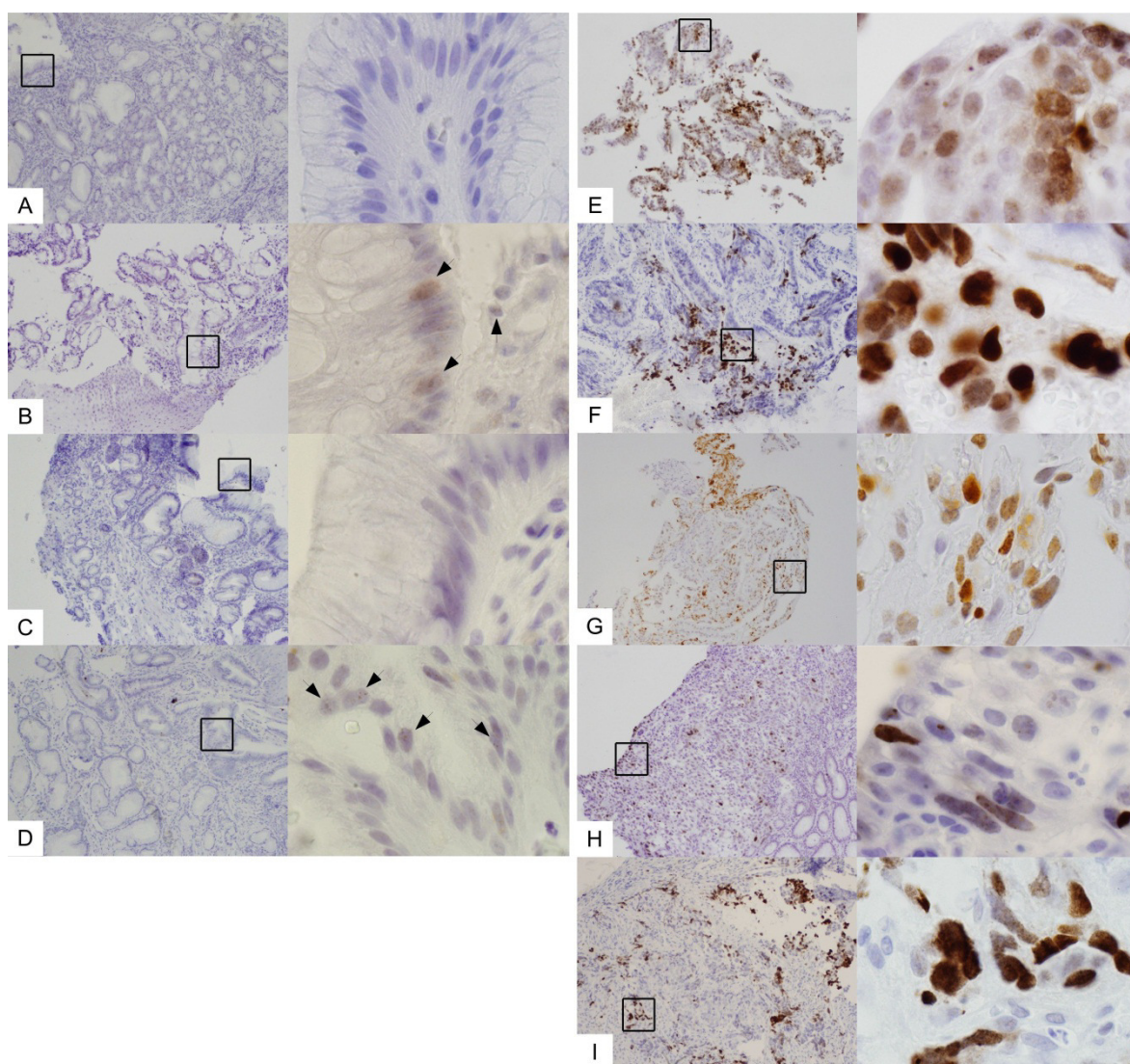
Obr. 14 **Relativní exprese genu je vyjádřena poměrem relativních expresí genu ve vzorku a kalibrátoru.**

ct = „threshold cycle“; cyklus, kdy amplifikační křivka překročí fluorescenční práh umístěný do exponenciální fáze reakce; E = eficeince qPCR reakce; vzorek = vyšetřovaná tkáň; ref = referenční (housekeeping) gen; kalibrátor = normální zdravý epitel jícnu

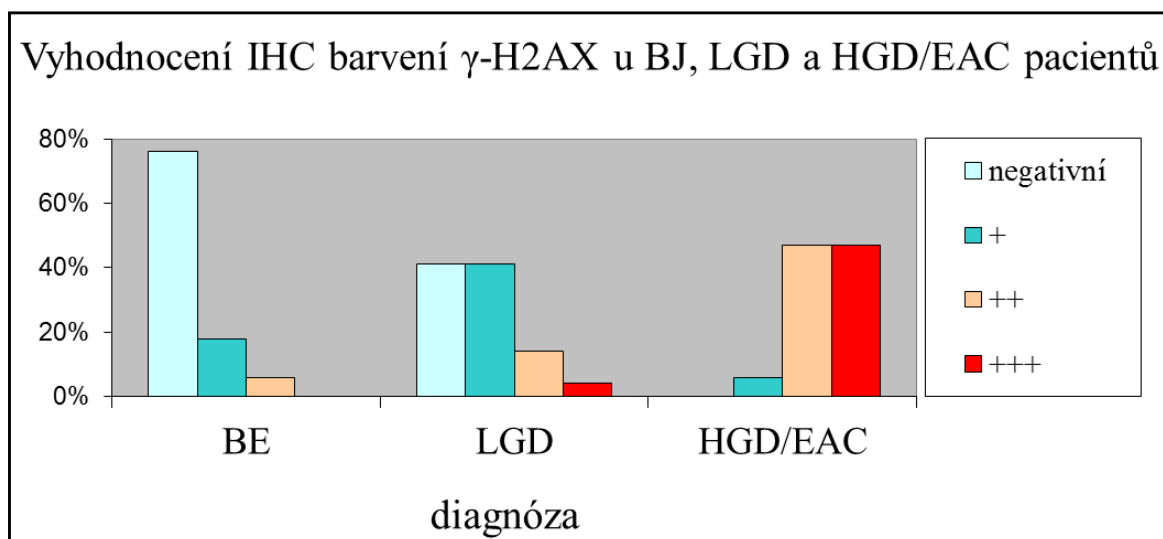
5 VÝSLEDKY

5.1 IMUNOHISTOCHEMICKÁ STUDIE

Imunohistochemická studie 91 bioptických vzorků BJ ve třech stádiích progresu jednoznačně prokázala akumulaci replikačního stresu. Postupný nárůst hladin γ -H2AX od BJ bez dysplazie, přes lehkou dysplazii k adenokarcinomu byl statisticky významný (potvrzeno Fisherovým přesným testem s Bonferroniho korekcí; Graf 1, Tab. 6). Byla pozorována negativní či velmi slabě pozitivní jádra u BJ bez dysplazie a občasná slabá pozitivita jader u LGD (Obr. 15). Rozdíl mezi γ -H2AX barvením u skupin BJ a LGD byl statisticky významný (Tab. 6). Nejvyšší hladina γ -H2AX byla pozorována u HGD/EAC. U HGD/EAC dosáhla akumulace γ -H2AX v průměru 30 % nádorových buněk, přičemž jak u dobře diferencovaných adenokarcinomů, tak u níže diferencovaných byl γ -H2AX signál silný (Obr. 15). Bez ohledu na intenzitu barvení byl počet pozitivních HGD/EAC pacientů statisticky vyšší než u BJ nebo LGD (Tab. 6).



Obr. 15 γ -H2AX může být markerem progresse Barrettova jícnu. Imunohistochemické barvení γ -H2AX napříč progresí onemocnění. U BJ bez dysplazie je γ -H2AX negativní (A) nebo slabě pozitivní (hnědé jaderné fokusy v obrázku B, viz šipky). BJ s fokálním výskytem LGD (snímky C a D) je buď zcela negativní (případ C) nebo slabě pozitivní (D). Ezofageální adenokarcinom – dobře až středně diferencovaný (E–G), či níže diferencovaný (H–I) vykazuje silný γ -H2AX signál. Vpravo je vždy detail příslušného obrázku. Zvětšení: 100 \times (1. a 3. sloupec); 1000 \times (2. a 4. sloupec).

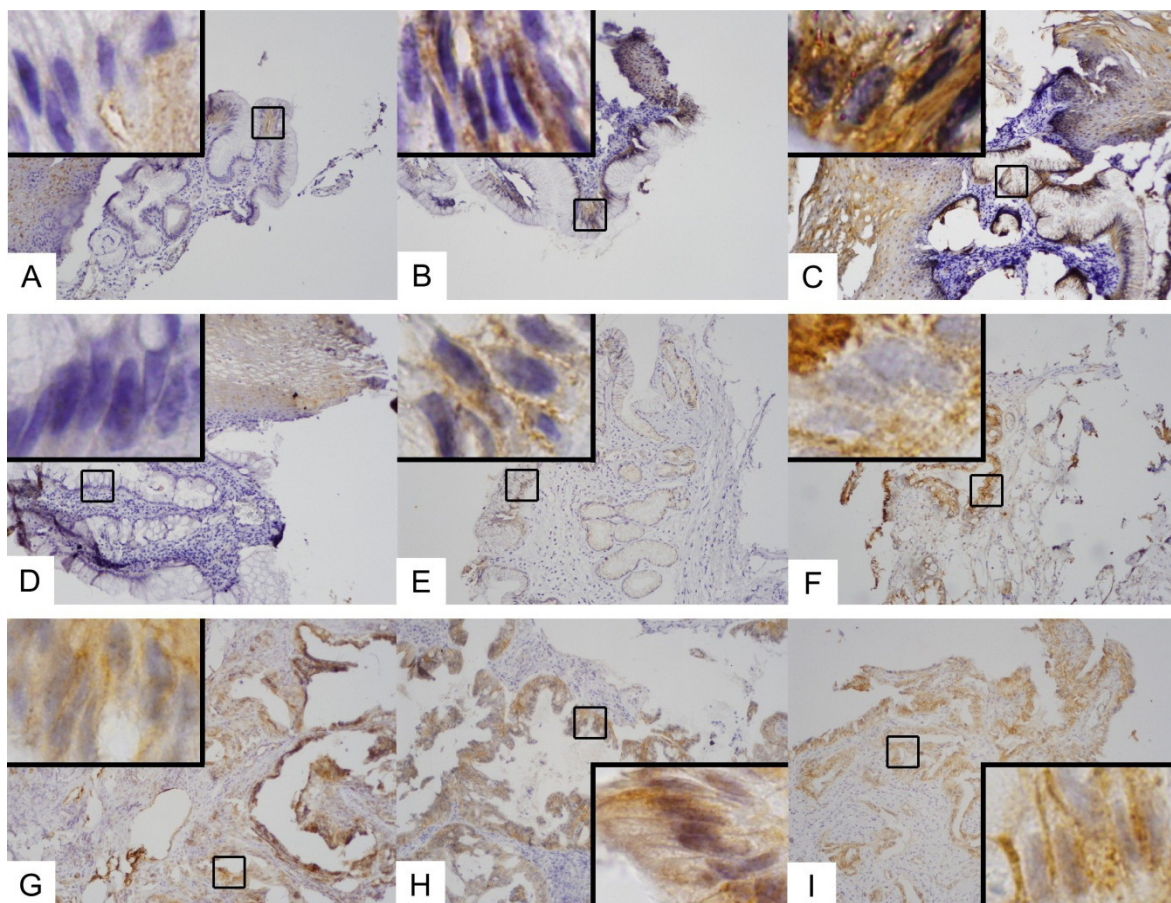


Graf 1 **Distribuce γ -H2AX pozitivita ve třech stádiích BJ.** Imunohistochemické barvení bylo hodnoceno následovně: <5 % pozitivních buněk – negativní; +, 6–10 % pozitivních buněk; ++, 11–25 % pozitivních buněk; +++, \geq 26 % pozitivních buněk.

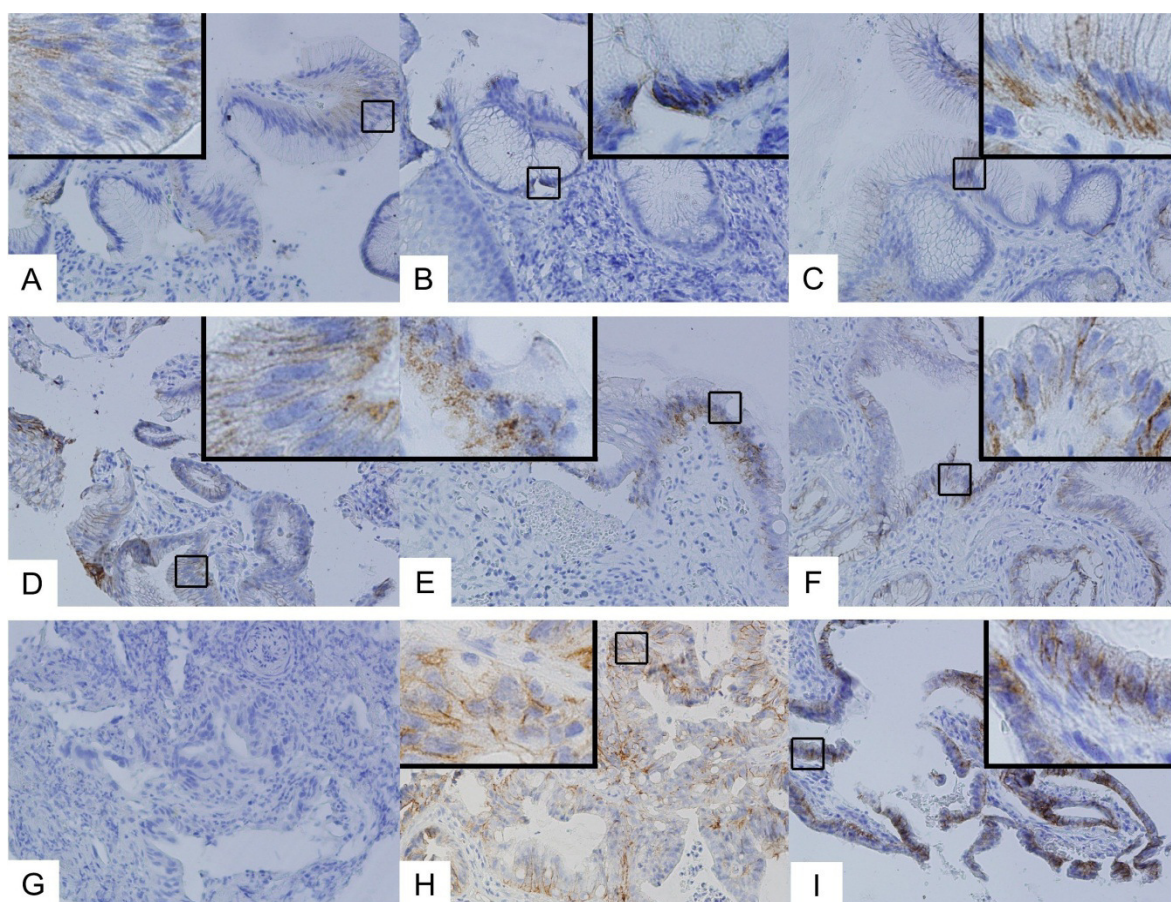
pozitivita γ -H2AX:	+,++,+++	++,+++	+++
BJ vs. LGD	0,014	0,444	n/a
BJ vs. HGD/EAC	<0,0001	<0,0001	<0,0001
LGD vs. HGD/EAC	0,006	<0,0001	0,001

Tab. 6 **Statistická signifikance rozdílů v expresi γ -H2AX u různých stádií BJ.** Statistické vyhodnocení zahrnovalo Fisherův přesný test s Bonferroniho korekcí. n/a, nedostupné.

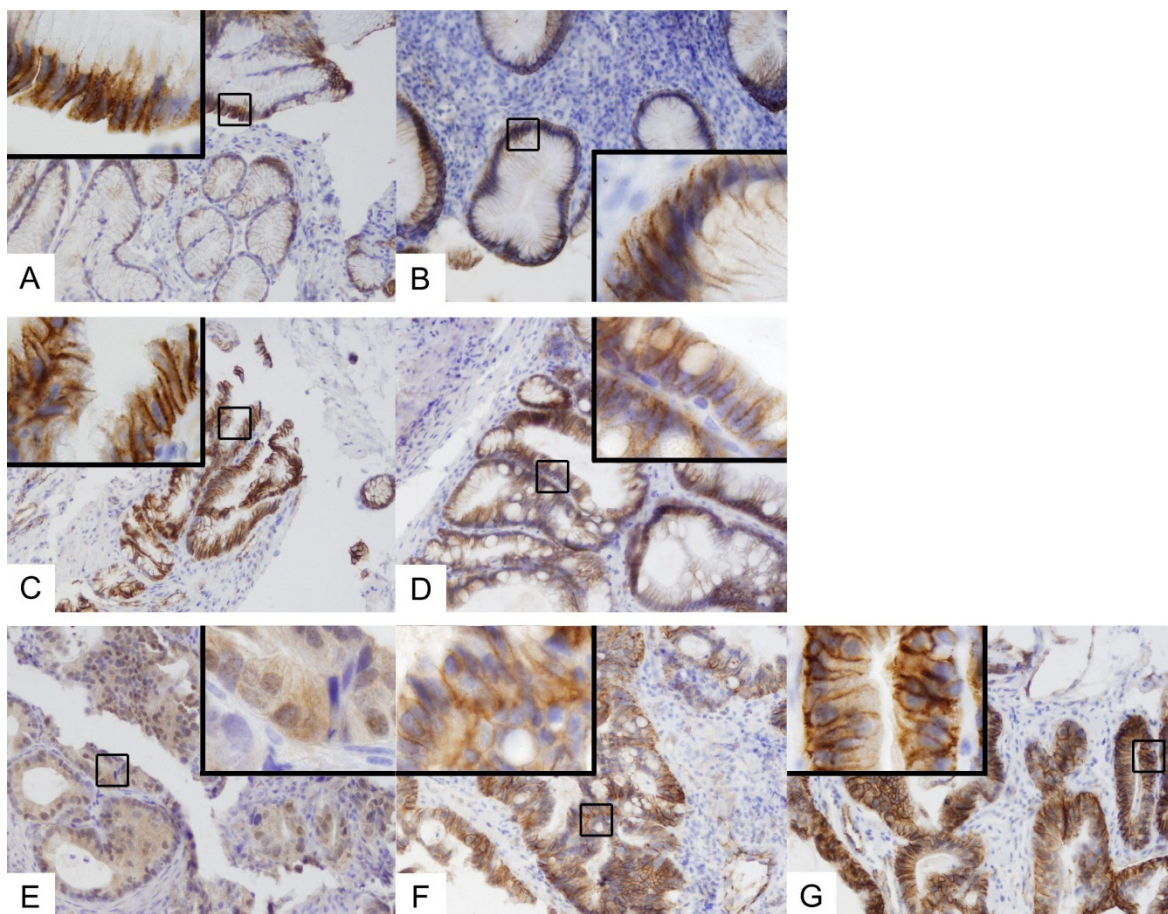
Aktivní (defosforylovaná) forma β -kateninu byla detekována v cytoplazmě ve všech vývojových stádiích choroby, avšak jeho membránová lokalizace byla úzce spjatá s EAC. Protilátky rozpoznávající signalizaci aktivního β -kateninu nedetekovaly signifikantní hladiny proteinu v jádře v žádném ze stádií onemocnění (Obr. 16). Na druhou stranu byla ve vzorcích tkání pozorována jak cytoplazmatická, tak membránová pozitivita. Fisherův přesný test neprokázal statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinami pacientů. Naše data také ukazují, že ve skupině HGD/EAC je membránová pozitivita defosforylovaného β -kateninu významně vyšší než u BJ nebo LGD ($p=0,001$; Fisherův přesný test). Dále bylo analyzováno, zda rozdíly v cytoplazmatické a membránové pozitivitě β -kateninu korelují se stupněm diferenciací nádoru. Fisherův přesný test to nepotvrdil.



Obr. 16 **Expres a lokalizace N-terminálně defosforylované (Ser37 nebo Thr41) formy β -kateninu u BJ s použitím myší protilátky, klon 8E7.** Imunohistochemické barvení vykazuje membránovou a cytoplazmatickou pozitivitu, lokalizace závisí na stupni progresu BJ. (A–C) vrstevnatý dlaždicový epitel s navazujícím cylindrickým epitelem sliznice Barrettova jícnu vykazuje nízkou (A), střední (B) a vysokou (C) hladinu tohoto β -kateninu v cytoplazmě. Taktéž vzorky BJ s lehkou dysplazií zahrnují příklady s nulovou/nízkou (D), střední (E) nebo silnou (F) cytoplazmatickou pozitivitou. Masivní pozitivita cytoplazmy byla pozorována u HGD/EAC (G). V případě dobře (G, H) nebo středně (I) diferencovaného EAC byla pozitivita pozorována nejen v cytoplazmě, ale také v cytoplazmatické membráně. Zvětšení: 100 \times (detaily 1000 \times).

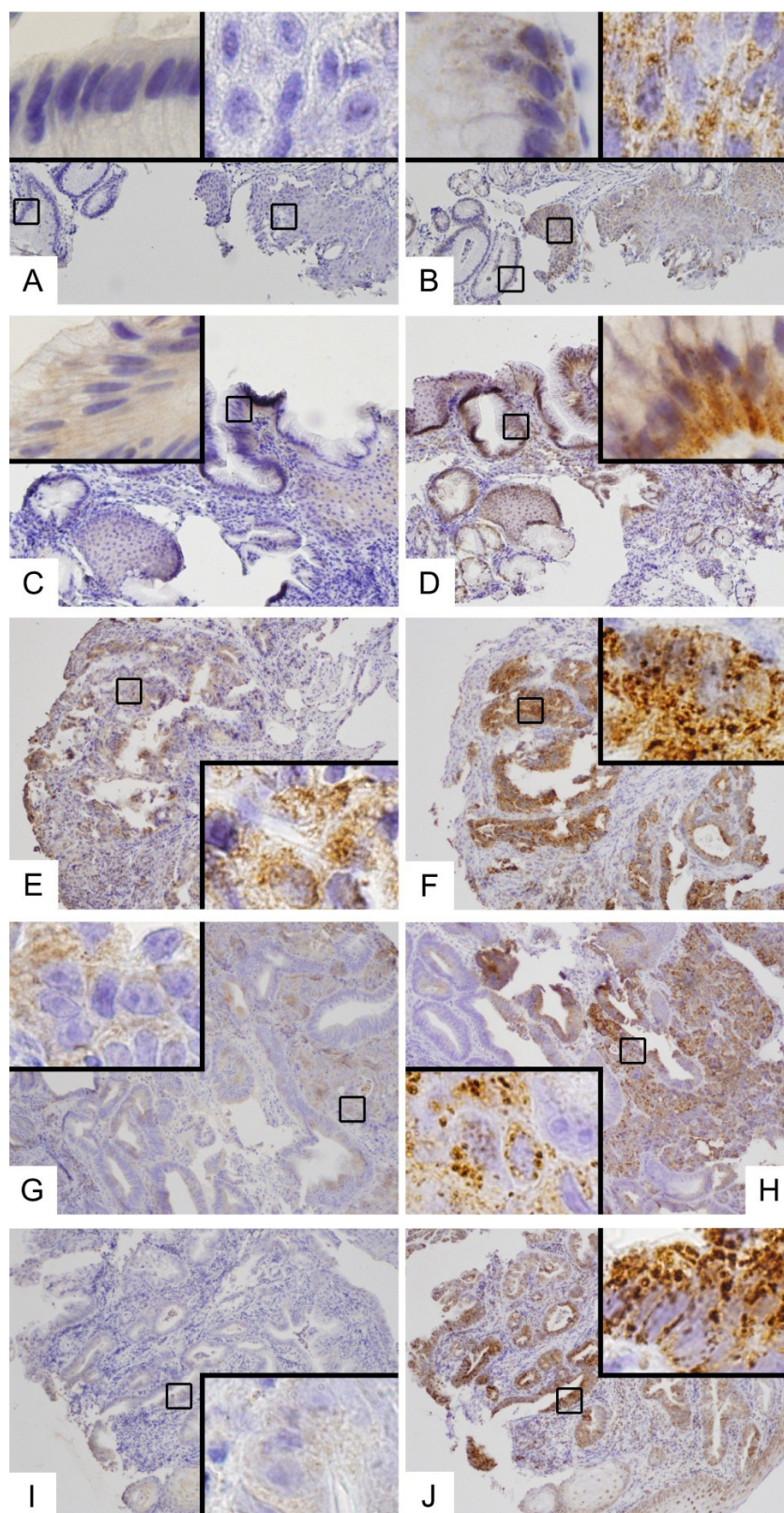


Obr. 17 **Expres a lokalizace N-terminálně defosforylované (Ser37 nebo Thr41) formy β -kateninu u BJ s použitím králičí protilátky, klon D13A1.** Byla detekována jak cytoplazmatická, tak membránová lokalizace proteinu (A–C). Prizmatický epitel sliznice BJ vykazoval slabou cytoplazmatickou (A), střední membránovou (B) a střední cytoplazmatickou (C) pozitivitu β -kateninu. Soubor BJ s lehkou dysplazií zahrnoval vzorky se slabou cytoplazmatickou (D, E) a slabou membránovou (F) pozitivitou. Jeden případ dobře diferencovaného EAC (G) byl negativní, druhý (H) vykazoval slabou jak cytoplazmatickou, tak membránovou pozitivitu. Středně diferencovaný adenokarcinom (I) byl středně pozitivní v cytoplazmatické membráně. Zvětšení: 100 \times (detaily 1000 \times). Vzorky A, C, E, G, H a I odpovídají vzorkům A, C, E, G, H a I barveným klonem protilátky 8E7 z Obr. 16.



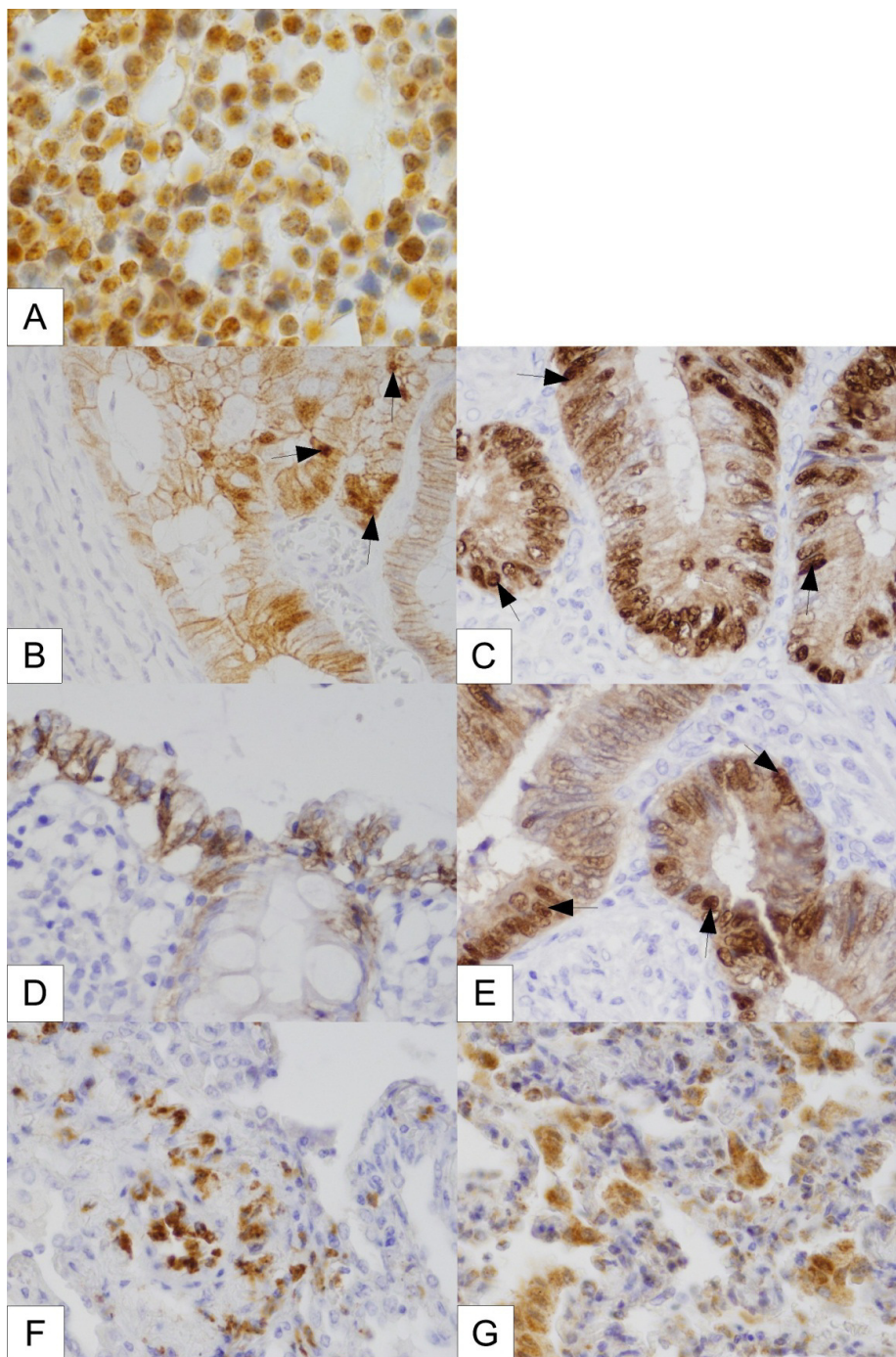
Obr. 18 **Imunohistochemické značení celkového β -kateninu s prokázanou pozitivitou cytoplazmy i plazmatické membrány.** (A, B) Prizmatický epitel sliznice BJ vykazuje vysoký výskyt celkového β -kateninu v cytoplazmě i na membráně, taktéž LGD vykazuje silnou cytoplazmatickou pozitivitu (C, D) a silnou membránovou pozitivitu (C). Robustní cytoplazmatická pozitivita byla pozorována taktéž u dobře diferencovaných adenokarcinomů (E, F) a taktéž u středně diferencovaných (G) se silnou membránovou pozitivitou ve vzorcích (F) a (G). Ve vzorku (E) je patrná velice slabá jaderná pozitivita. Zvětšení: 100 \times (detaily 1000 \times). Vzorky A, D, E, F, and G korespondují se vzorky A, E, G, H a I z Obr. 17.

Postupná aktivace DDR s progresí BJ by mohla být konsekvencí exprese prozánětlivých cytokinů ve studovaných tkáních. Na 13 resp. 12 histologických vzorcích reprezentujících BE, LGD i HGD/EAC byla studována exprese IL-1 β a IL-8. Exprese IL-8 byla zvýšena u BJ, LGD i HGD/EAC; tzn. jak u premaligní, tak i maligní léze. Asociace zvyšující se exprese IL-1 β nebyla takto zřejmá, avšak ze získaných dat je možno na ni taktéž usuzovat. U některých případů BJ byl cytokin IL-1 β negativní, avšak pozitivní v okolní netransformované epitelové tkáni (Obr. 19).



Obr. 19 **Zvýšená exprese IL-8 u BJ.** Vyhodnocení IL-1 β (levý sloupec) a IL-8 (pravý sloupec) pozitivitu zástupců BJ (A–B), BJ s lehkou dysplazií (C–D) a tří vzorků HGD/EAC (E–J). V normálním dlaždicobuněčném epitelu [pravý rámeček v (A)] s navazující metaplazií [levý rámeček v (A)] není produkce IL-1 β detekována, avšak IL-8

pozitivní buňky lze nalézt jak v dlaždicovém, tak prizmatickém epitelu [pravý a levý rámeček v (B)]. Narozdíl od IL-1 β , hladina IL-8 je v tkáni tumoru zvýšená neustále a intenzita je nejsilnější u dobře diferencovaného adenokarcinomu (F). Zvětšení: 100 \times (detaily 1000 \times).



Obr. 20 **Kontrolní imunohistochemické barvení.** (A) γ -H2AX pozitivní jádra buněk myší kostní dřeně 1 hodinu po γ -ozáření dávkou 5 Gy (kobaltový zářič, Teragam, Praha, ČR); imunohistochemická lokalizace aktivního β -kateninu u kolorektálního adenokarcinomu – monoklonální protilátky 8E7 (B) a D13A1 (C). Obě protilátky barví membránu,

cytoplazmu i jádra nádorových buněk (příklady pozitivních jader jsou označeny šipkami). (D, E) Celkový β -katenin u kolorektálního adenokarcinomu (myší protilátka, klon E-5), všechny tři struktury jsou opět pozitivní. Detekce IL-1 β (F) a IL-8 (G) v plicním adenokarcinomu. Zvětšení: 400 \times (s výjimkou vzorku A – 1000 \times).

5.2 MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ STUDIE

5.2.1 IZOLACE CELKOVÉ RNA Z MIKRODISEKOVANÝCH VZORKŮ

Koncentrace vyizolované celkové RNA se pohybovala okolo 10 ng/ μ l, přičemž eluční objem takto získané RNA po zakoncentrování na vakuové centrifuze byl cca 20 μ l. Čistota RNA (A_{260}/A_{280}) se pohybovala mezi doporučenými 1,7 – 2,1; někdy byly hodnoty absorbancí velmi nízké, proto jejich poměr nebyl vyhodnocován. I když u některých vzorků nebyla hodnota čistoty stanovitelná, vzorky byly přesto použity.

5.2.2 VÝTĚŽNOST qPCR REAKCE

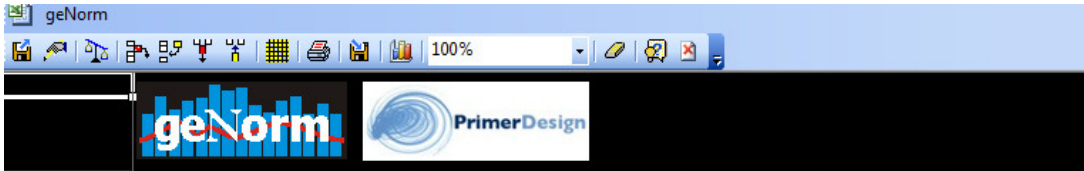
Na základě qPCR experimentů s různými koncentracemi RNA byla pro každou miRNA esej určena ze směrnice kalibrační přímky efieience reakce takto:

ESEJ	EFICIENCE	ESEJ	EFICIENCE
endogenní kontrola		studovaná miRNA	
RNU44	1,978	miR-21	2,059
RNU48	2,137	miR-192	2,024
RNU66	2,035	miR-196a	2,000
RNU6B	2,151	miR-203	1,979
U47	1,981		
miR-16	1,836		

Tab. 7 **Hodnoty efieience qPCR reakce**; modrá = potencionální endogenní kontroly; oranžová = stanovované miRNA.

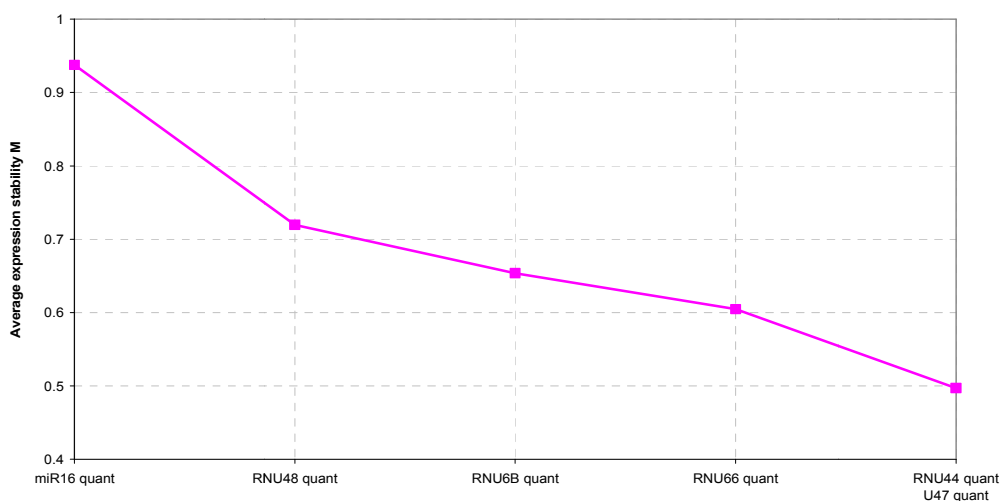
5.2.3 VOLBA VHODNÝCH ENDOGENNÍCH KONTROL

Na základě vložených dat aplikace geNorm vykalkulovala jako dvě nejstabilnější endogenní kontroly RNU44 a U47 (Obr. 21, Graf 2). Naopak za nejméně stabilní housekeepingový gen ze zvolené skupiny byl stanoven gen pro miR-16.

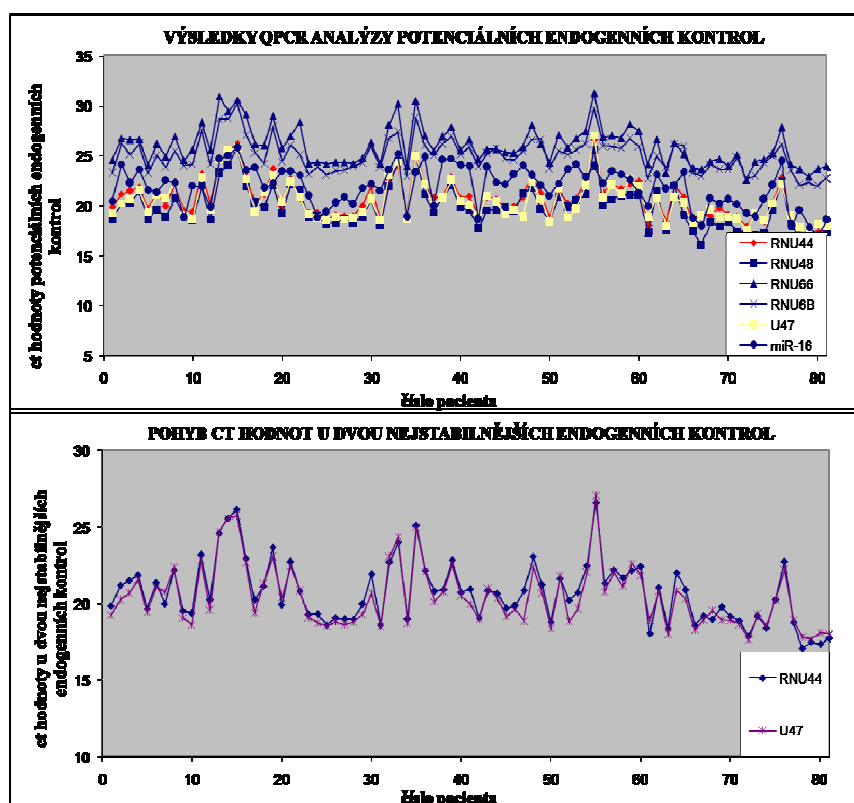


Change Data	RNU44 quant	RNU48 quant	RNU66 quant	RNU6B quant	U47 quant	miR16 quant	Normalisation Factor
5.80E+01	6.82E-02	6.30E-02	1.34E-01	1.08E-01	1.19E-01	6.17E-02	0.5312
5.90E+01	5.01E-02	5.97E-02	4.87E-02	5.02E-02	4.27E-02	8.95E-02	0.3341
6.00E+01	4.22E-02	6.22E-02	8.13E-02	9.29E-02	7.24E-02	1.88E-01	0.4873
6.10E+01	8.28E-01	1.12E+00	8.65E-01	1.06E+00	5.39E-01	4.26E-01	4.6176
6.20E+01	1.05E-01	4.54E-02	1.40E-01	1.93E-01	1.45E-01	6.27E-02	0.6221
6.30E+01	6.57E-01	9.09E-01	1.55E+00	4.59E-01	1.01E+00	1.51E-01	3.8448
6.40E+01	5.49E-02	2.98E-02	1.88E-01	7.62E-02	1.42E-01	1.17E-01	0.5179
6.50E+01	1.18E-01	2.90E-01	4.09E-01	8.94E-02	2.11E-01	5.60E-02	0.9499
6.60E+01	5.57E-01	9.52E-01	1.13E+00	7.01E-01	8.35E-01	8.84E-01	4.9856
6.70E+01	3.78E-01	2.70E+00	1.24E+00	9.12E-01	5.27E-01	1.47E+00	5.9533
6.80E+01	4.40E-01	4.59E-01	6.91E-01	3.59E-01	3.44E-01	2.74E-01	2.4819
6.90E+01	2.52E-01	6.80E-01	5.99E-01	5.46E-01	5.32E-01	3.64E-01	2.8526
7.00E+01	3.94E-01	4.55E-01	9.53E-01	5.44E-01	5.40E-01	2.86E-01	2.9870
7.10E+01	4.65E-01	1.06E+00	4.17E-01	2.16E-01	6.38E-01	3.80E-01	2.8526
7.20E+01	9.28E-01	8.78E-01	2.54E+00	1.14E+00	1.28E+00	6.69E-01	6.8188
7.30E+01	3.80E-01	1.37E+00	6.95E-01	8.89E-01	4.18E-01	8.35E-01	4.2131
7.40E+01	6.35E-01	1.08E+00	6.06E-01	3.26E-01	6.96E-01	2.84E-01	3.3148
7.50E+01	1.81E-01	1.83E-01	3.90E-01	1.91E-01	2.14E-01	1.20E-01	1.2102
7.60E+01	3.30E-02	2.33E-02	6.09E-02	8.04E-02	5.79E-02	2.80E-02	0.2592
7.70E+01	5.06E-01	4.97E-01	8.63E-01	5.58E-01	5.28E-01	1.51E+00	4.1035
7.80E+01	1.58E+00	1.90E+00	1.25E+00	1.77E+00	1.13E+00	5.37E-01	7.6615
7.90E+01	1.20E+00	9.40E-01	2.04E+00	1.42E+00	1.24E+00	1.54E+00	8.2345
8.00E+01	1.34E+00	1.55E+00	1.18E+00	1.88E+00	9.38E-01	2.68E+00	9.1271
8.10E+01	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	6.0625
M < 1.5	0.762	0.938	0.828	0.845	0.879	1.374	

Obr. 21 Stanovení dvou nejstabilnějších referenčních genů v aplikaci geNorm (zeleně je znázorněn nejstabilnější gen RNU44, červeně naopak nejméně stabilní miR-16).



Graf 2 **Stabilita testovaných endogenních kontrol.** Z grafu lze odečíst dvě nejstabilnější endogenní kontroly (RNU44 a U47), které jsou určeny nejnižší průměrnou expresí stabilitou M .



Graf 3, 4 Ct hodnoty šesti potenciálních endogenních kontrol, ct hodnoty dvou nejstabilnějších kontrol RNU44 a U47.

Pozn. k výkyvům velikosti ct hodnot u jednotlivých pacientů dochází pravděpodobně na podkladu ne vždy přesného stanovení koncentrace výchozí RNA, ke kterému může dojít při nízkých koncentracích, což je ovšem eliminováno relativní kvantifikací. Z obou grafů je patrné, že ct hodnoty všech kandidátních genů pro každého jednotlivého pacienta sledují stejný trend.

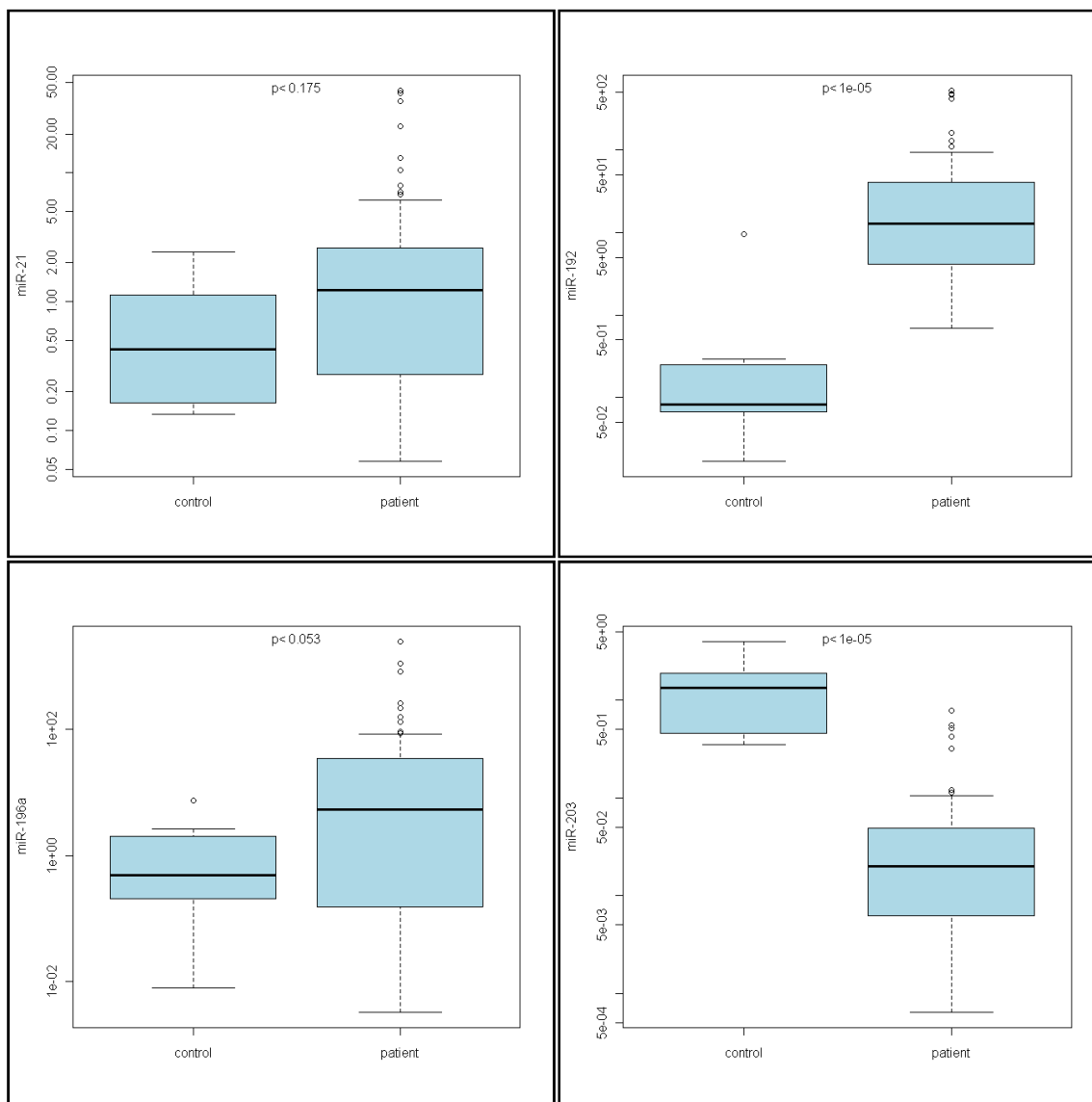
5.2.4 RELATIVNÍ KVANTIFIKACE GENOVÉ EXPRESE

V případě miRNA-21 nebyl u pacientů nalezen trend ve změně exprese této miRNA v závislosti na stupni dysplazie, ani nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v relativní expresi daného genu ve srovnání s kontrolní tkání – zdravým epitelem jícnu ($p < 0,175$). Hladiny mikroRNA-192 byly jednoznačně zvýšené ve všech případech u pacientů v jakémkoli stádiu progresu ve srovnání s kontrolní skupinou. Tato zvýšená exprese byla potvrzena jako statisticky významná ($p < 0,00001$). mikroRNA-196a vykazovala také vyšší expresi u patientských vzorků, která byla rovněž statisticky významná ($p < 0,053$). V případě mikroRNA-203 byla jednoznačně detekovaná statisticky významná podexprese u všech pacientů v porovnání s kontrolou ($p < 0,00001$).

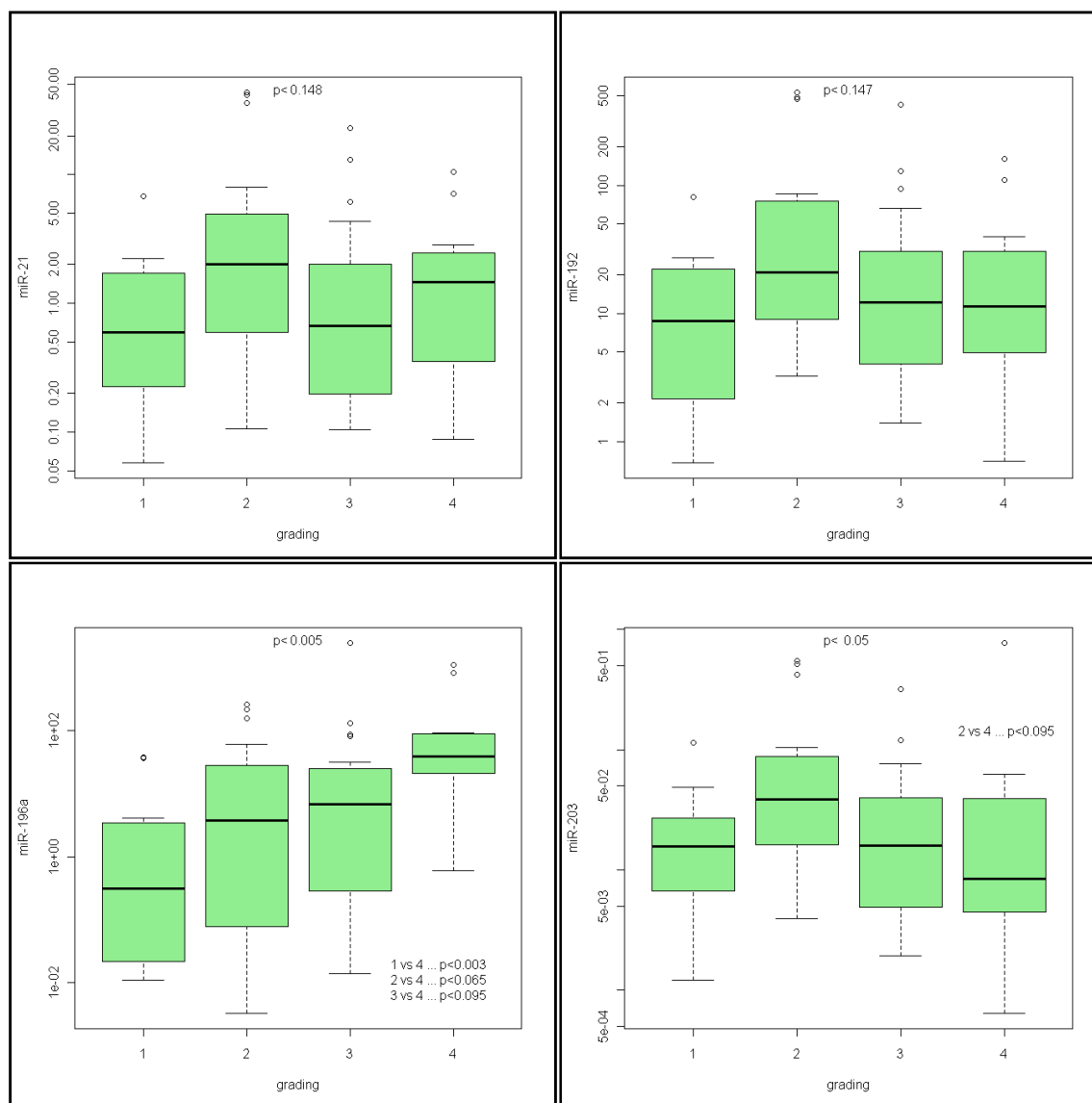
5.2.5 KORELACE HLADIN MI RNA S PROGRESÍ ONEMOCNĚNÍ

Zde bylo dosaženo statisticky významného výsledku v případě miR-196a, která vykazovala závislost stoupající exprese na gradingu onemocnění s $p < 0,005$.

5.2.6 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ



Graf 5 Krabicové grafy vyhodnocující expresi čtyř vybraných miRNA v mikrodisekované tkáni Barrettova jícnu (Barrettův jícen diagnostikovaný na podkladě NBI vyšetření, BJ, LGD, HGD/EAC) ve srovnání s kontrolní tkání. Kontrolní tkání byl vrstevnatý dlaždicový epitel sliznice jícnu zdravých jedinců, kteří podstoupili endoskopické vyšetření z důvodu jiné diagnózy. Bylo použito deset takových vzorků epitelu a tyto vzorky byly spojeny v jeden, aby byla eliminována biologická variabilita. Z grafu jednoznačně vyplývá, že u miR-192 a miR-196a dochází k nárůstu exprese ve vzorcích pacientů ve srovnání s kontrolní tkání, naopak u miR-203 byla u pacientů jednoznačně prokázána její snížená exprese. V případě miR-21 nebyl expresní rozdíl mezi pacienty a kontrolou překvapivě statisticky významný.



Graf 6 Krabicové grafy vyhodnocující korelaci exprese vybraných miRNA s progresí onemocnění v mikrodisekované tkáni Barrettova jícnu. Zatímco předchozí graf představuje statistické porovnání pacientů jako celku vůči kontrole, výše uvedené grafy jsou vyjádřením korelace gradingu onemocnění s expresními profily jednotlivých miRNA. (1 – Barrettův jícen diagnostikovaný na podkladě NBI vyšetření, 2 – BJ, 3 – LGD, 4 – HGD/EAC). Z grafu je patrné, že tato pozitivní korelace byla nalezena v případě miR-196a.

6 DISKUZE

Počátky studia každé choroby zahrnují podrobnou morfológickou charakterizaci postižené tkáně následovanou studiem expresních profilů transformovaných buněk na úrovni nukleových kyselin a proteinů a porovnání těchto výsledků se zdravou kontrolní tkání. Tyto informace jsou neopomenutelné a vysoce cenné, protože umožňují navázat na ně funkčními studii, které změny expresních profilů objasní z hlediska mechanismů, kterými k nim došlo. Jakkoli to může znít nadneseně, tato konsekvence experimentů je cestou vedoucí k nalezení vhodné a účinné terapie, je však třeba uvážit, že výsledky studií jsou aplikovatelné v dlouhodobém horizontu, neboť studie jsou vysoce časově i finančně náročné.

Tak jako u ostatních onemocnění, Barrettův jícn, jeho vznik a progres, která může vést až k ezofageálnímu karcinomu, vzbuzují úsilí vysvětlit, na jakých mechanismech a principech je celý proces transformace sliznice jícnu založen. Mohou vyvstat argumenty, že jen velmi malé procento pacientů s Barrettovým jícnem dospěje během svého života k samotnému adenokarcinomu, existuje však silný protiargument, že podíl EAC v západní společnosti kontinuálně narůstá, procento pětiletého přežití je menší než 20 % a kvalita života pacientů je zpravidla dosti neuspokojivá (Blot et McLaughlin, 1999; Reed, 1999; Sant et al., 2009). Získání validních výsledků funkčních studií, které je nutné dokonale navrhout, je dlouhý proces a aplikace těchto výsledků do klinické praxe otázkou mnoha let. V současné době je proto důležité soustředit se na včasný záchyt onemocnění Barrettovým jícnem, umět odhalit u pacientů míru rizika hrozící buněčné transformace, tyto pacienty více sledovat a zároveň využít jejich bioptické vzorky a nashromáždit co nejvíce genetických a proteomických informací o transformovaných buňkách ezofageálního epitelu. Transformace postižených buněk v metaplastickou, dysplastickou a finálně v maligní tkáň je výsledkem selhání vlastních kontrolních mechanismů, které odvracejí riziko chybné transkripce a následné translace v organizmu každý den nesčetněkrát. Je zřejmé, že každá tkáň má tuto schopnost omezenou, v případě Barrettova jícnu bývá tato schopnost u většiny pacientů zachována po celý život (i u těch rizikových desítky let). U některých pacientů rizikové faktory (jejichž účinky se nesčítají, ale násobí) pro vznik onemocnění převáží a trvale naruší kontrolu buněčného cyklu a high-grade dysplazie či dokonce ezofageální karcinom se u nich vyvine. Jedním z nejvíce diskutovaných rizikových faktorů v případě onemocnění Barrettovým jícnem je životní styl. Jeví se to jako fráze, ale je neoddiskutovatelným faktem, že stravovací návyky dnešní

populace jsou mnohdy naprosto nevyhovující. Jde o množství a kvalitu jídla, ale neméně také o způsob a kulturu jeho konzumace.

Vývoj ezofageálního adenokarcinomu je prototypem tumorigeneze asociované s chronickým zánětem a skutečně se zdá, že tento zánět (GERD, gastroezofageální refluxní choroba) spolu s dalšími negenetickými rizikovými faktory (hiátová hernie, obezita – pacienti s přítomností viscerálního tuku, kouření, alkohol) hraje klíčovou roli ve vývoji preneoplastické léze – Barrettova jícnu, a také v jeho progresi do malignity (O’Riordan et al., 2005; Collepriest et al., 2009; Reid et al., 2010). Kontinuální dráždění vrstevnatého dlaždicového epitelu kyselým obsahem žaludku indukuje náhradu tohoto epitelu za epitel cylindrický, který je sice méně mechanicky odolný, avšak rezistentní vůči nízkému pH prostředí. Spojitost diagnózy BJ a GERD byla známa již v sedmdesátých letech 20. století (Burges et al., 1971).

Je známo, že markery DDR jsou běžně aktivované v premaligních lézích, kdy jsou buňky tkáně (pravděpodobně vlivem onkogenů) vystaveny replikačnímu stresu, vlivem kterého na DNA vznikají dvouvláknové zlomy (Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005). DDR signalizace funguje jako tumor-supresorová bariéra chránící před progresí do plně maligního stavu (Bartkova et al., 2005; Bartek et al., 2007). γ -H2AX je citlivým a specifickým markerem DDR, akumuluje se v buňce velice rychle a je klíčovou molekulou aktivace kontrolního bodu buněčného cyklu indukovaného poškozením DNA (Celeste et al., 2002; Fernandez – Capetillo et al., 2002). DDR asociované markery (včetně γ -H2AX) byly nedávno popsány u BJ (slabá pozitivita, která narůstá se stupněm dysplazie) (von Holzen et al., 2010). V naší studii byla v průběhu progresse onemocnění přes BJ, low-grade dysplazii (LGD) do high-grade dysplazie/(EAC) sledována akumulace fosforylovaného histonu γ -H2AX u 91 pacientů s jednoznačně pozitivní korelací. Při hledání dalších faktorů známých pro indukci DDR a zároveň angažovaných v progresi BJ byla na vybrané podskupině pacientů otestována přítomnost aktivního β -kateninu. Literatura uvádí, že jaderná akumulace aktivní formy β -kateninu (klíčového proteinu Wnt signální dráhy) je signifikantně spojena s přechodem BJ v LGD (Bian et al., 2000). Avšak naše experimenty s protilátkou rozpoznávající N-terminálně hypofosforylovaný β -katenin (klon 8E7) (van Noort et al., 2007) tuto skutečnost nepotvrdily a nukleárně akumulovaná forma nebyla detekována. U přechodu LGD do HGD byla publikována postupná ztráta membránové positivity β -kateninu (Seery et al., 1999). Naše data ukazují naopak signifikantně zvýšenou pozitivitu membrány ve skupině HGD/EAC při barvení klonem 8E7. Toto pozorování je přinejmenším zvláštní, neboť membránovou lokalizaci

aktivního β -kateninu lze experimentálně indukovat ektopickou expresí E-kadherinu (Maher et al., 2009). Nicméně progresse mnoha typů malignit je více charakteristická ztrátou E-kadherinů, než jejich zvýšenou produkcí (Jeanes et al., 2008). V současné době postrádáme pro pozorovaný jev vysvětlení. Na druhou stranu kontrujeme faktem, že rozdíly v imunohistochemickém barvení aktivního β -kateninu mohou být ovlivněny výběrem primární protilátky (van Noort et al., 2007). My sami jsme neúspěšně použili další dva zdroje primárních protilátek. Proto zní logicky ověřit další markery Wnt signální dráhy, než bude učiněn definitivní závěr.

Kromě onkogenních stimulantů, které způsobují náhodnou proliferaci a aktivují DDR dráhu, je známo, že k indukci a zachování DDR přispívá zánětlivá signalizace v mikroprostředí (Acosta et al., 2008; Bartek et al., 2008) a sekrece zánětlivých cytokinů může být naopak aktivovaná DDR dráhou (Bartek et al., 2008; Rodier et al., 2009). Bylo také dokumentováno, že chronický zánět a jeho signalizace v buňce (aktivovaná mimo jiné cytokiny IL-1 β a IL-8) může mít podíl na maligní transformaci BJ (O'Riordan et al., 2005). Pozorovali jsme, že zatímco hladina IL-1 β rostla s progresí onemocnění, hladina IL-8 byla konstitutivně zvýšená. Zároveň bylo prokázáno, že genetické změny spojené s premaligními stádii BJ (včetně Wnt signalizace) nejsou schopny vyvolat vysokou DDR a prozánětlivá signalizace přispívá k aktivaci DDR dráhy v průběhu progresse onemocnění. I jiná dříve publikovaná práce říká, že aktivace NF- κ B a zánětlivých molekul hrají důležitou roli v progresi BJ do adenokarcinomu (O'Riordan et al., 2005). Zdá se tedy, že chronický zánět a signalizace zprostředkovaná prozánětlivými působky mají schopnost nemoc nejen vyvolat, ale participovat také na její progresi, která může vyústit až v ezofageální adenokarcinom. Z těchto faktů vyplývá, že výsledky expresních a proteomických studií mohou vést v budoucnu k cílené terapii a stejně tak, jako O'Riordan se svými kolegy, i naše skupina prokázala, že interleukiny IL-1 β a IL-8 by se mohly stát předmětem terapeutického zájmu.

Jedna z předních skupin genů, na které se současná molekulární biologie soustřeďuje, jsou geny pro mikroRNA, a to především díky svému potenciálu regulovat až 30 % genové exprese v organismu, což představuje tisíce genů všech genových rodin (Lim et al., 2003; Lewis et al., 2005). Protože získat několik desítek bioptických vzorků Barrettova jícnu v krátkém časovém intervalu je špatně realizovatelné, nabízí se možnost získat dostatečné množství tkáně z archivu parafinových bloků, který se nachází na každém pracovišti patologie. Je samozřejmé, že tkáně zalité do parafínu podstoupily pro účely molekulární biologie poměrně nešetrný způsob zpracování, avšak v případě

mikroRNA jsou tyto experimenty realizovatelné, což dokazuje řada relevantních odkazů na literaturu a portfolio chemikálií a technologií, které umožňují FFPE bloky pro tyto účely zpracovat (Specht et al., 2001; Abrahamsen et al., 2003; Doleshal et al., 2008; Siebolts et al., 2009; Nonn et al., 2010). mikroRNA mají také výhodu ve své délce – cca 20 nukleotidů, proto i když je RNA v parafínovém bloku procesem zpracování fragmentována, tyto úseky jsou zhruba 100 bp dlouhé a miRNA tedy plně detekovatelné.

Jak bylo popsáno výše, ať jde o nádorovou, dysplastickou či metaplastickou tkáň, tento soubor buněk je heterogenním systémem, u metaplastické tkáně jde velmi často o izolovaná ložiska. Tato skutečnost vyvolává otázku potenciální kontaminace a možného zkreslení získaných výsledků expresních studií. Pro dosažení co možná největší přesnosti a pro selekci „žádaných“ buněk od buněk „balastních“ bývá proto volena technika laserové mikrodisekce (LCM), poprvé zaváděná v devadesátých letech 20. století (Monajembashi et al., 1986; Emmert – Buck et al., 1996; Liu, 2010), která znamenala výrazné zpřesnění molekulárně-biologických analýz (Fend et Raffeld, 2000; Webb, 2000). LCM je elegantní metodický přístup, přesto je nutno v praxi individuálně řešit mnoho technických problémů spojených s přilnavostí tkáně k nosiči (podložní sklo, PET membrána), v případě malých vzorků tkáně jde často o odlupování okrajových částí preparátu, které jsou mnohdy bohaté na žádaný buněčný materiál. Je nutné optimalizovat největší možnou tloušťku řezu, kterou je laser schopen prořezat s ohledem na uspokojující výtěžek nukleové kyseliny nebo proteinu. Je také potřeba nabýt zkušenosti se studiem architektury tkáně, která musí být před vlastní mikrodisekcí absolutně vysušená (vlivem toho ztmavne a stává se špatně rozpoznatelnou).

Výběr konkrétních miRNA pro studium karcinogeneze Barrettova jícnu byl podpořen stávající imunohistochemickou studií exprese interleukinů, byly studovány databáze miRNA (mirbase.org, microrna.org) a vytipovány mikroRNA, které by mohly ovlivňovat důležité geny procesu transformace epitelu. Dále byla studována literatura a výsledný výběr miRNA souvisel s recentními odkazy uvádějícími nad a podexpresi konkrétních mikroRNA u malignit trávicího traktu. Na základě všech těchto poznatků byly stanovovány tyto konkrétní miRNA: miR-21, miR-192, miR-196a, miR-203. Existují práce pojednávající o expresi mikroRNA v tkáni Barrettova jícnu, avšak obvykle jde o srovnání pouze jednoho určitého stádia onemocnění s kontrolní tkání a studie jsou provedeny na malém souboru pacientů (Maru et al., 2009; Yang et al., 2009; Wijnhoven et al., 2010). Bývají taktéž analyzovány vzorky čerstvé tkáně, které se ovšem obecně problematičtěji uchovávají a zpracovávají.

Je známo, že maligní onemocnění jsou charakteristická deregulací miRNA profilů, pro některá onemocnění jsou dokonce vysoce charakteristické deregulované specifické miRNA (Calin et Croce, 2006). Deregulace miR-196a je spojována s karcinomem pankreatu a prsu, stejně tak jako u některých nádorů zažívacího traktu. Szafranska se svými kolegy publikovala v roce 2008 práci, v níž pojednává o miR-196a, která by v kombinaci s miR-217 mohla sloužit pro separaci maligní od benigní tkáně pankreatu. Dále bylo publikováno, že u relativně dlouho přežívajících pacientů (24 měsíců) hladiny miR-196a negativně korelují s přežitím (Bloomston et al., 2007). Stejně jako Mathé et al. v roce 2009, i naše skupina zjistila, že miR-196a je více exprimovaná u pacientů s Barrettovým jícnem v jakémkoli stádiu ve srovnání s kontrolou. V tomto případě byla zaznamenána také korelace s progresí onemocnění. Navíc ve srovnání se studií Maru et al., 2009 (11 parafinových bloků), naše skupina tento výsledek prokázala na podstatně větším počtu pacientů (71). V případě miR-21 jsou naše výsledky rozporuplné. V nedávné době bylo publikováno, že existuje šest solidních tumorů (plíce, prsa, žaludek, prostata, tlusté střevo, pankreas), kde je hladina této miR jako jediná zvýšená (Kumarswamy et al., 2011). Zvýšenou expresi miR-21 u kolorektálního karcinomu popsal také Slabý et al., 2007. miR-21 byla také popsána jako nezávislý prognostický faktor kolorektálního karcinomu (Schetter et al., 2009). Feber a kolegové popsal v roce 2008 nárůst exprese miR-21 u BJ i EAC, což naše výsledky neukazují. V případě miR-203 autoři publikovali sníženou expresi u EAC, stejně jako my. Saini a jeho kolegové v roce 2011 popsal miR-203 jako antimetastatickou. I naše výstupy hovoří pro to, že miR-203 jeví charakteristiku tumorsupresoru (Luzna et al., 2011). Oproti našemu počtu probandů provedl Feber své experimenty pouze na polovičním počtu pacientů (35) a vzorky nebyly mikrodisekovány. Ke stejnému závěru jako Feber (pro miR-21 a miR-203) došel Mathé et al. v roce 2009, kdy srovnával expresní profily vybraných miRNA u EAC a SCC s okolní nenádorovou tkání. U pacientů s EAC popsal zvýšené hladiny miR-192, což jsme potvrdili také.

Během recenzního řízení vyvstala z redakce časopisu *Diagnostic Pathology* otázka, zda byla součástí našich experimentů konsekvence vzorků všech stádií Barrettova jícnu od jednoho pacienta. Zde je nutné konstatovat, že odběr bioptických vzorků probíhá pomocí moderní obrazové techniky (tzv. NBI) s funkcí přiblížení (zoom) suspektních oblastí, tudíž v případě nálezu jakékoli rizikové léze je indikován zákrok – tzv. radiofrekvenční ablace, kdy dojde k řízené nekróze cylindrického epitelu elektrickým proudem o vysoké frekvenci, přičemž tento je u pacienta přirozeně nahrazen původním dlaždicovým.

Většina studií mapujících genovou expresi nevyhodnocuje data jako absolutní, nýbrž relativizuje je vůči tzv. vnitřní (endogenní) kontrole. Díky tomu lze kvantifikovat geny i u velmi malých koncentrací vstupní RNA, neboť toto stanovení se ve výsledku stává na koncentraci nezávislé. Nonn et al., 2010 použili pro kvantifikaci svých miRNA dvě endogenní kontroly RNU44 a RNU48. Jde o malé jadérové RNA, které jsou pro relativní kvantifikaci vhodné svou délkou. Někteří autoři používají pro relativizaci přímo konkrétní miRNA (Maru a kolegové použili miR-16), jejichž exprese však musí vykazovat ve všech vzorcích náležitou stabilitu. Wong et al., ve své metodické příručce (Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan® MicroRNA Assays) (Applied Biosystems/Life Technologies; Carlsbad, CA, USA) popisuje endogenní kontroly vhodné pro normalizaci miRNA dat s důrazem na jejich pečlivý výběr a prověření jejich expresních profilů, což vedlo i nás k výběru dvou ze šesti takových kandidátních kontrol.

7 ZÁVĚR

- Podařilo se potvrdit, že zánětlivé faktory hrají důležitou roli v rozvoji Barrettova jícnu i jeho progresu, která může vyústit až v ezofageální adenokarcinom, přičemž role IL-1 β je postupná s progresí, zatímco hladina IL-8 je zvýšená již od počátku.
- Nepodařilo se prokázat transkripční úlohu aktivního (defosforylovaného) β -kateninu asociovanou s progresí onemocnění, což bylo ověřeno dvěma různými monoklonálními protilátkami na stejných vzorcích tkáně.
- Fosforylovaný histon γ -H2AX by mohl být potenciálním diagnostickým markerem progresu onemocnění Barrettovým jícnem, jeho výskyt je téměř výhradně asociován s high-grade dysplazií/adenokarcinomem jícnu, přičemž zánětlivé faktory nemají takovou kapacitu, aby vyvolaly DNA damage response v raných stádiích choroby.
- U tří ze čtyř studovaných miRNA byly detekovány změny exprese ve srovnání s kontrolní tkání; v případě miR-192 a miR-196a jde o zvýšenou expresi, u miR-203 o sníženou expresi, z čehož lze usuzovat, že miR-192 a 196a mají v tomto případě charakter onkogenů, zatímco miR-203 tumor-supresoru.
- Míra exprese miR-196a koreluje se stupněm dysplazie onemocnění, může být proto potenciálním markerem progresu.
- Výsledky jsou unikátní rozsahem studovaného souboru (91 pacientů – imunohistochemická analýza γ -H2AX, 71 pacientů – profil miRNA), vzorky reprezentují všechna stadia progresu onemocnění, expresní studie je optimalizována zavedením metody laserové mikrodisekce a na vzorcích zalitých do parafinu, které jsou snadno dostupné a uchovatelné.

Perspektivy dalšího výzkumu

Tato dizertační práce je důkazem provázanosti několika biomedicínských oborů a do budoucna se stává podkladem pro řešení dalších vědeckých projektů při odhalování úlohy miRNA v přirozených procesech v buňce.

8 SEZNAM ZKRATEK

53BP1	p53 vázající protein 1 (p53-binding protein 1)
A	absorbance
ATM	ataxia telangiectasia mutovaný protein (ataxia telangiectasia mutated protein)
ATP	adenosintrifosfát
ATR	ataxia telangiectasia a Rad3-příbuzný protein (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein)
BC	buněčný cyklus
BJ	Barrettův jícn
bp	páry bazí (base pair)
<i>BRCA1</i>	gen 1 rakoviny prsu (breast cancer 1 gene)
<i>BRCA2</i>	gen 2 rakoviny prsu (breast cancer 2 gene)
CLL	chronická lymfocytární leukémie
ct	threshold cycle; cyklus, kdy amplifikační křivka překročí fluorescenční práh umístěný do exponenciální fáze reakce
CT	počítačová tomografie (computer tomography)
DAB ⁺	3,3'-diaminobenzidin ⁺
<i>Dcl-1</i>	Dicer-like 1 gen
DDR	odpověď na poškození DNA (DNA damage response)
DEPC	diethylpyrokarbamát
dH ₂ O	destilovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	na DNA závislá protein kináza
dNTPs	dinukleotidtrifosfáty
DSBs	dvouvláknové zlomy (double-strand breaks)
dsRBD	dvouvláknová RNA-vázající doména (double-stranded RNA-binding domain)
dTTP	deoxythimidintrifosfát
E	eficience
EAC	ezofageální adenokarcinom
EtOH	ethanol

FFPE	formalínem fixované, do parafinu zalité (formalin fixed paraffin embedded)
GERD	gastroezofageální refluxní choroba (gastroesophageal reflux disease)
G ₀	bod buněčného cyklu (gap 0)
G ₁	bod buněčného cyklu (gap 1)
G ₂	bod buněčného cyklu (gap 2)
H2AX	histon H2AX
HGD/EAC	high grade dysplazie/adenokarcinom
<i>Hox</i> geny	geny určující základní strukturu a orientaci organismu
<i>hsa</i>	Homo sapiens
IL	interleukin
IČ	infračervený
LCM	laserová záchytná mikrodisekce (laser capture microdissection)
<i>let-7</i>	jedna z tradičních mikroRNA
LGD	low grade dysplazie
<i>lin-4</i>	jedna z tradičních mikroRNA
LOH	ztráta heterozygotnosti (loss of heterozygosity)
<i>M</i>	expresní stabilita
M	mitóza
MDC1	aktivátor kontrolních bodů buněčného cyklu při poškození DNA (mediator of DNA damage checkpoint protein 1)
mRNA	mediátorová RNA
miRNA	mikroRNA
MM	master mix
<i>mmu</i>	Mus musculus
MRE11	jeden z opravných proteinů u dvouvláknových zlomů na DNA
NBI	endoskopická technika vizualizace tkáně (narrow band imaging)
NBS1	jeden z opravných proteinů u dvouvláknových zlomů na DNA
MNR	nukleární magnetická rezonance
NO	oxid dusnatý
oncomiR	onkogenní mikroRNA
p	hladina významnosti
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PET	polyethylentereftalát

PI3	fosfatidylinositol 3-kinázy
PIKKs	fosfatidylinositol 3-kináza-příbuzné kinázy
poly-A	polyadenyl
pre-miRNA	prekurzorová mikroRNA
PSA	prostatický specifický antigen
qPCR	kvantitativní PCR
RAD50, RAD51	opravné proteiny dvouvláknových zlomů na DNA
RISC	tlumivý komplex indukovaný RNA (RNA-induced silencing complex)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní kyslíkové částice (reactive oxygen species)
RT	pokožová teplota (room temperature)
RT	reverzní transkripce
RTU	připraven k okamžitému použití (ready to use)
S	syntéza
SCC	dlaždicobuněčný karcinom (squamous cell carcinoma)
TE	TRIS-EDTA
UTR	netranslatovaný region (untranslated region)
UV	ultrafialový
<i>V</i>	párová odchylka
γ -H2AX	fosforylovaný H2AX

9 LITERATURA

1. Abrahamsen HN, Steiniche T, Nexø E, Hamilton-Dutoit SJ, Sørensen BS. **Towards quantitative mRNA analysis in paraffin-embedded tissues using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a methodological study on lymph nodes from melanoma patients.** *J Mol Diagn* 2003; **5**(1):34-41.
2. Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Raguz S, Gil J. **Control of senescence by CXCR2 and its ligands.** *Cell Cycle* 2008; **7**(19):2956-2959.
3. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Základy buněčné biologie.** Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2005.
4. Bakkenist CJ, Kastan MB. **Initiating cellular stress responses.** *Cell* 2004; **118**(1):9-17.
5. Balkwill F, Mantovani A. **Inflammation and cancer: back to Virchow?** *Lancet* 2001; **357**(9255):539-545.
6. Bartek J, Lukas C, Lukas J. **Checking on DNA damage in S phase.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**(10):792-804.
7. Bartek J, Hodny Z, Lukas J. **Cytokine loops driving senescence.** *Nat Cell Biol* 2008; **10**(8): 887-889.
8. Bartel DP. **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004; **116**(2):281-297.
9. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, Guldberg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Ørntoft T, Lukas J, Bartek J. **DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis.** *Nature* 2005; **434**(7035):864-870.

10. Baserga R. **The Biology of Cell Reproduction.** Cambridge: MA: Harvard University Press, 1985.
11. Baserga R. **Growth in size and cell DNA replication.** *Exp Cell Res* 1984; **151**(1):1-5.
12. Bassing CH, Suh H, Ferguson DO, Chua KF, Manis J, Eckersdorff M, Gleason M, Bronson R, Lee C, Alt FW. **Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors.** *Cell* 2003; **114**(3):359-370.
13. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Dvorak K, Garewal H. **Field defects in progression to gastrointestinal tract cancers.** *Cancer Lett* 2008; **260**(1-2): 1-10.
14. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H. **DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis.** *Mutat Res* 2002; **511**(2):145-178.
15. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. **Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.** *Nature* 2001; **409**(6818):363-366.
16. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ. **Dicer is essential for mouse development.** *Nat Genet* 2003; **35**(3):215-217.
17. Bian YS, Osterheld MC, Bosman FT, Fontolliet C, Benhattar J. **Nuclear accumulation of beta-catenin is a common and early event during neoplastic progression of Barrett esophagus.** *Am J Clin Pathol* 2000; **114**(4):583-590.
18. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. **MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis.** *JAMA* 2007; **297**(17):1901-1908.

19. Blot WJ, McLaughlin JK. **The changing epidemiology of esophageal cancer.** *Semin Oncol* 1999; **26**(5Suppl 15):2-8.
20. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y. **GammaH2AX and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2008; **8**(12):957-967.
21. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. **Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila.** *Cell* 2003; **113**(1):25-36.
22. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. **Principles of microRNA-target recognition.** *PLoS Biol* 2005; **3**(3):e85.
23. Burgess JN, Payne WS, Andersen HA, Weiland LH, Carlson HC. **Barrett esophagus: the columnar-epithelial-lined lower esophagus.** *Mayo Clin Proc* 1971; **46**(11):728-734.
24. Calin GA, Croce CM. **MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale.** *Cancer Res* 2006; **66**(15):7390-7394.
25. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. **Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(24):15524-15529.
26. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. **Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**(9):2999-3004.
27. Celeste A, Difilippantonio S, Difilippantonio MJ, Fernandez-Capetillo O, Pilch DR, Sedelnikova OA, Eckhaus M, Ried T, Bonner WM, Nussenzweig A. **H2AX**

- haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility.** *Cell* 2003; **114**(3):371-383.
28. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Olaru A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. **Genomic instability in mice lacking histone H2AX.** *Science* 2002; **296**(5569):922-927.
29. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. **MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation.** *Science* 2004; **303**(5654):83-86.
30. Cleaver JE. **Xeroderma pigmentosum: a human disease in which an initial stage of DNA repair is defective.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; **63**(2):428-435.
31. Clemons NJ, McColl KE, Fitzgerald RC. **Nitric oxide and acid induce double-strand DNA breaks in Barrett's esophagus carcinogenesis via distinct mechanisms.** *Gastroenterology* 2007; **133**(4):1198-1209.
32. Collepriest BJ, Ward SG, Tosh D. **How does inflammation cause Barrett's metaplasia?** *Curr Opin Pharmacol* 2009, **9**(6):721-726.
33. Coudry RA, Meireles SI, Stoyanova R, Cooper HS, Carpino A, Wang X, Engstrom PF, Clapper ML. **Successful application of microarray technology to microdissected formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.** *J Mol Diagn* 2007; **9**(1):70-79.
34. Czornak K, Chughtai S, Chrzanowska KH. **Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair.** *J Appl Genet* 2008; **49**(4):383-396.
35. DeMeester SR. **Epidemiology and biology of esophageal cancer.** *Gastrointest Cancer Res* 2009; **3**(2 Suppl):S2-S5.

36. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. **Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex.** *Nature* 2004; **432**(7014):231-235.
37. de Wind N, Dekker M, Berns A, Radman M, te Riele H. **Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer.** *Cell* 1995; **82**(2):321-330.
38. Dickey JS, Redon CE, Nakamura AJ, Baird BJ, Sedelnikova OA, Bonner WM. **H2AX: functional roles and potential applications.** *Chromosoma* 2009; **118**(6):683-692.
39. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. **Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia.** *N Engl J Med* 2000; **343**(26):1910-1916.
40. Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE. **Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.** *J Mol Diagn* 2008; **10**(3):203-211.
41. Earle JS, Luthra R, Romans A, Abraham R, Ensor J, Yao H, Hamilton SR. **Association of microRNA expression with microsatellite instability status in colorectal adenocarcinoma.** *J Mol Diagn* 2010; **12**(4):433-440.
42. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA. **Laser capture microdissection.** *Science* 1996; **274**(5289):998-1001.
43. Falk GW. **Barrett's esophagus.** *Gastroenterology* 2002; **122**(6):1569-1591.
44. Falk GW. **Risk factors for esophageal cancer development.** *Surg Oncol Clin N Am* 2009; **18**(3):469-485.

45. Feber A, Xi L, Luketich JD, Pennathur A, Landreneau RJ, Wu M, Swanson SJ, Godfrey TE, Litle VR. **MicroRNA expression profiles of esophageal cancer.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; **135**(2):255-260.
46. Fend F, Emmert-Buck MR, Chuaqui R, Cole K, Lee J, Liotta LA, Raffeld M. **Immuno-LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis.** *Am J Pathol* 1999; **154**(1):61-66.
47. Fend F, Raffeld M. **Laser capture microdissection in pathology.** *J Clin Pathol* 2000; **53**(9):666-672.
48. Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Celeste A, Ward I, Romanienko PJ, Morales JC, Naka K, Xia Z, Camerini-Otero RD, Motoyama N, Carpenter PB, Bonner WM, Chen J, Nussenzweig A. **DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1.** *Nat Cell Biol* 2002; **4**(12):993-997.
49. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Ditullio RA Jr, Kastriakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C, Halazonetis TD. **Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions.** *Nature* 2005; **434**(7035):907-913.
50. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. **miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature.** *Nucleic Acids Res* 2006; **34**(Database issue):D140-144.
51. Hanahan D, Weinberg RA. **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000; **100**(1):57-70.
52. Hashibe M, Boffetta P, Janout V, Zaridze D, Shangina O, Mates D, Szeszenia-Dabrowska N, Bencko V, Brennan P. **Esophageal cancer in Central and Eastern Europe: tobacco and alcohol.** *Int J Cancer* 2007; **120**(7):1518-1522.
53. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. **A**

- microRNA component of the p53 tumour suppressor network.** *Nature* 2007; **447**(7148):1130-1134.
54. Hecht JL, Mutter GL. **Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis.** *J Clin Oncol* 2006; **24**(29):4783-4791.
55. Hu X, Schwarz JK, Lewis JS Jr, Huettner PC, Rader JS, Deasy JO, Grigsby PW, Wang X. **A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis.** *Cancer Res* 2010; **70**(4):1441-1448.
56. Hussain SP, Harris CC. **Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials.** *Int J Cancer* 2007; **121**(11):2373-2380.
57. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. **A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA.** *Science* 2001; **293**(5531):834-838.
58. Iorio MV, Casalini P, Tagliabue E, Ménard S, Croce CM. **MicroRNA profiling as a tool to understand prognosis, therapy response and resistance in breast cancer.** *Eur J Cancer* 2008; **44**(18):2753-2759.
59. Jackson SP. **Sensing and repairing DNA double-strand breaks.** *Carcinogenesis* 2002; **23**(5):687-696.
60. Jackson RJ, Standart N. **How do microRNAs regulate gene expression?** *Sci STKE* 2007; **367**:re1
61. Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. **Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression?** *Oncogene* 2008; **27**(55):6920-6929.
62. Johnston RJ, Hobert O. **A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 2003; **426**(6968):845-849.

63. Jolly AJ, Wild CP, Hardie LJ. **Acid and bile salts induce DNA damage in human oesophageal cell lines.** *Mutagenesis* 2004; **19**(4):319-324.
64. Kato M, Slack FJ. **microRNAs: small molecules with big roles - *C. elegans* to human cancer.** *Biol Cell* 2008; **100**(2):71-81.
65. Kim VN. **MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**(5):376-385.
66. Kim VN, Nam JW. **Genomics of microRNA.** *Trends Genet* 2006; **22**(3):165-173.
67. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. **Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin.** *Nucleic Acids Res* 2008; **36**(17):5678-5694.
68. Kobayashi J, Antocchia A, Tauchi H, Matsuura S, Komatsu K. **NBS1 and its functional role in the DNA damage response.** *DNA Repair (Amst)* 2004; **3**(8-9):855-861.
69. Kobayashi K, Matsushima M, Koi S, Saito H, Sagae S, Kudo R, Nakamura Y. **Mutational analysis of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2, in sporadic endometrial carcinomas with microsatellite instability.** *Jpn J Cancer Res* 1996; **87**(2):141-145.
70. Kobayashi J, Tauchi H, Chen B, Burma S, Tashiro S, Matsuura S, Tanimoto K, Chen DJ, Komatsu K. **Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **380**(4):752-757.
71. Kobayashi J, Tauchi H, Sakamoto S, Nakamura A, Morishima K, Matsuura S, Kobayashi T, Tamai K, Tanimoto K, Komatsu K. **NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain.** *Curr Biol* 2002; **12**(21):1846-1851.

72. Kobb JP, Hotchkiss RS, Karl IE, Buchman TG. **Mechanisms of cell injury and death.** *Br J Anaesth* 1996; **77**(1):3-10.
73. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. **Regulation and function of miRNA-21 in health and disease.** *RNA Biol* 2011; **8**(5):1-8.
74. Kundu JK, Surh YJ. **Inflammation: gearing the journey to cancer.** *Mutat Res* 2008; **659**(1-2):15-30.
75. Kundu JK, Surh YJ. **Emerging avenues linking inflammation and cancer.** *Free Radic Biol Med* 2012; **52**(9):2013-2037.
76. Kurz T, Terman A, Brunk UT. **Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron.** *Arch Biochem Biophys* 2007; **462**(2):220-230.
77. Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyrén O. **Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma.** *N Engl J Med* 1999; **340**(11):825-831.
78. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. **The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*.** *Cell* 1993; **75**(5):843-854.
79. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. **Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.** *Cell* 2005; **120**(1):15-20.
80. Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O. **Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells.** *BMC Biotechnol* 2007; **7**:36.
81. Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. **Vertebrate microRNA genes.** *Science* 2003; **299**(5612):1540.

82. Liu A. **Laser capture microdissection in the tissue biorepository.** *J Biomol Tech* 2010; **21**(3):120-125.
83. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. **Molecular Biology of the Cell.** New York: WH Freeman, 2004.
84. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. **MicroRNA expression profiles classify human cancers.** *Nature* 2005; **435**(7043):834-838.
85. Lukas J, Lukas C, Bartek J. **Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time.** *DNA Repair (Amst)* 2004; **3**(8-9):997-1007.
86. Luthra R, Singh RR, Luthra MG, Li YX, Hannah C, Romans AM, Barkoh BA, Chen SS, Ensor J, Maru DM, Broaddus RR, Rashid A, Albarracin CT. **MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers.** *Oncogene* 2008; **27**(52):6667-6678.
87. Luzna P, Gregar J, Uberall I, Radova L, Prochazka V, Ehrmann J Jr. **Changes of microRNAs-192, 196a and 203 correlate with Barrett's esophagus diagnosis and its progression compared to normal healthy individuals.** *Diagn Pathol* 2011; **6**:114.
88. Maher MT, Flozak AS, Stocker AM, Chenn A, Gottardi CJ. **Activity of the beta-catenin phosphodestruction complex at cell-cell contacts is enhanced by cadherin-based adhesion.** *J Cell Biol* 2009; **186**(2):219-228.
89. Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM. **Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment.** *Lancet* 2008; **371**(9614):771-783.

90. Maru DM, Singh RR, Hannah C, Albarracin CT, Li YX, Abraham R, Romans AM, Yao H, Luthra MG, Anandasabapathy S, Swisher SG, Hofstetter WL, Rashid A, Luthra R. **MicroRNA-196a is a potential marker of progression during Barrett's metaplasia-dysplasia-invasive adenocarcinoma sequence in esophagus.** *Am J Pathol* 2009; **174**(5):1940-1948.
91. Mathé EA, Nguyen GH, Bowman ED, Zhao Y, Budhu A, Schetter AJ, Braun R, Reimers M, Kumamoto K, Hughes D, Altorki NK, Casson AG, Liu CG, Wang XW, Yanaihara N, Hagiwara N, Dannenberg AJ, Miyashita M, Croce CM, Harris CC. **MicroRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival.** *Clin Cancer Res* 2009; **15**(19):6192-6200.
92. Mirnezami AH, Pickard K, Zhang L, Primrose JN, Packham G. **MicroRNAs: key players in carcinogenesis and novel therapeutic targets.** *Eur J Surg Oncol* 2009; **35**(4):339-347.
93. Mirzayans R, Severin D, Murray D. **Relationship between DNA double-strand break rejoining and cell survival after exposure to ionizing radiation in human fibroblast strains with differing ATM/p53 status: implications for evaluation of clinical radiosensitivity.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; **66**(5):1498-1505.
94. Miska EA. **How microRNAs control cell division, differentiation and death.** *Curr Opin Genet Dev* 2005; **15**(5):563-568.
95. Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, Rakic P, Constantine-Paton M, Horvitz HR. **Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain.** *Genome Biol* 2004; **5**(9):R68.
96. Moayyedi P. **Barrett's esophagus and obesity: the missing part of the puzzle.** *Am J Gastroenterol* 2008; **103**(2):301-303.
97. Monajembashi S, Cremer C, Cremer T, Wolfrum J, Greulich KO. **Microdissection of human chromosomes by a laser microbeam.** *Exp Cell Res* 1986; **167**(1):262-265.

98. Morales CP, Souza RF, Spechler SJ. **Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus.** *Lancet* 2002; **360**(9345):1587-1589.
99. Nguyen GH, Schetter AJ, Chou DB, Bowman ED, Zhao R, Hawkes JE, Mathé EA, Kumamoto K, Zhao Y, Budhu A, Hagiwara N, Wang XW, Miyashita M, Casson AG, Harris CC. **Inflammatory and microRNA gene expression as prognostic classifier of Barrett's-associated esophageal adenocarcinoma.** *Clin Cancer Res* 2010; **16**(23):5824-5834.
100. Nilsen TW. **Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells.** *Trends Genet* 2007; **23**(5):243-249.
101. Nonn L, Vaishnav A, Gallagher L, Gann PH: **mRNA and micro-RNA expression analysis in laser-capture microdissected prostate biopsies: valuable tool for risk assessment and prevention trials.** *Exp Mol Pathol* 2010; **88**(1):45-51.
102. Noutsias M, Rohde M, Block A, Klippert K, Lettau O, Blunert K, Hummel M, Kühl U, Lehmkuhl H, Hetzer R, Rauch U, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP, Volk HD, Kotsch K. **Preamplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies.** *BMC Mol Biol* 2008; **9**:3.
103. Ohnishi T, Mori E, Takahashi A. **DNA double-strand breaks: Their production, recognition, and repair in eukaryotes.** *Mutat Res* 2009; **669**(1-2):8-12.
104. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. **The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*.** *Cell* 2007; **130**(1):89-100.
105. Olliver JR, Hardie LJ, Dexter S, Chalmers D, Wild CP. **DNA damage levels are raised in Barrett's oesophageal mucosa relative to the squamous epithelium of the oesophagus.** *Biomarkers* 2003; **8**(6):509-521.

106. Olliver JR, Hardie LJ, Gong Y, Dexter S, Chalmers D, Harris KM, Wild CP. **Risk factors, DNA damage, and disease progression in Barrett's esophagus.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; **14**(3):620-625.
107. O'Riordan JM, Abdel-Latif MM, Ravi N, McNamara D, Byrne PJ, McDonald GS, Keeling PW, Kelleher D, Reynolds JV. **Proinflammatory cytokine and nuclear factor kappa-B expression along the inflammation-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus.** *Am J Gastroenterol* 2005; **100**(6):1257-1264.
108. Pardee AB, Dubrow R, Hamlin JL, Kletzien RF. **Animal cell cycle.** *Annu Rev Biochem* 1978; **47**:715-750.
109. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. **A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage.** *Curr Biol* 2000; **10**(15):886-895.
110. Petrini JH, Stracker TH. **The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators.** *Trends Cell Biol* 2003; **13**(9):458-462.
111. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. **Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?** *Trends Cell Biol* 2007; **17**(3):118-126.
112. Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Totaro MG, Allavena P, Mantovani A, Sica A. **Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer.** *Immunobiology* 2009; **214**(9-10):761-777.
113. R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing.** Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011. URL <http://www.R-project.org/>.
114. Reed CE. **Surgical management of esophageal carcinoma.** *Oncologist* 1999; **4**(2):95-105.

115. Reid BJ, Li X, Galipeau PC, Vaughan TL. **Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: time for a new synthesis.** *Nat Rev Cancer* 2010; **10**(2):87-101.
116. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. **The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 2000; **403**(6772):901-906.
117. Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WAM, Muñoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J. **Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion.** *Nat Cell Biol* 2009; **11**(8):973-979.
118. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. **DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139.** *J Biol Chem* 1998; **273**(10):5858-5868.
119. Roh SA, Choi EY, Cho DH, Jang SJ, Kim SY, Kim YS, Kim JC. **Growth and invasion of sporadic colorectal adenocarcinomas in terms of genetic change.** *J Korean Med Sci* 2010; **25**(3):353-360.
120. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. **Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing.** *Nature* 2007; **448**(7149):83-86.
121. Ruol A, Parenti A, Zaninotto G, Merigliano S, Costantini M, Cagol M, Alfieri R, Bonavina L, Peracchia A, Ancona E. **Intestinal metaplasia is the probable common precursor of adenocarcinoma in barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia.** *Cancer* 2000; **88**(11):2520-2528.
122. Saini S, Majid S, Yamamura S, Tabatabai ZL, Suh SO, Shahryari V, Chen Y, Deng G, Tanaka Y, Dahiya R. **Regulatory role of miR-203 in prostate cancer progression and metastasis.** *Clin Cancer Res* 2011; **17**(16):5287-5298.

123. Sampliner RE. **Practice guidelines on the diagnosis, surveillance, and therapy of Barrett's esophagus. The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology.** *Am J Gastroenterol* 1998; **93**(7):1028-1032 No abstract available
124. Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F, Capocaccia R; EUROCARE Working Group. **EUROCARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary.** *Eur J Cancer* 2009; **45**(6):931-991.
125. Sarasin A. **The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis.** *Mutat Res* 1999; **428**(1-2):5-10.
126. Sassen S, Miska EA, Caldas C. **MicroRNA: implications for cancer.** *Virchows Arch* 2008; **452**(1):1-10.
127. Schimanski CC, Frerichs K, Rahman F, Berger M, Lang H, Galle PR, Moehler M, Gockel I. **High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells.** *World J Gastroenterol* 2009; **15**(17):2089-2096.
128. Sedelnikova OA, Bonner WM. **GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence.** *Cell Cycle* 2006; **5**(24):2909-2913.
129. Sedelnikova OA, Pilch DR, Redon C, Bonner WM. **Histone H2AX in DNA damage and repair.** *Cancer Biol Ther* 2003; **2**(3):233-235.
130. Seery JP, Syrigos KN, Karayiannakis AJ, Valizadeh A, Pignatelli M. **Abnormal expression of the E-cadherin-catenin complex in dysplastic Barrett's oesophagus.** *Acta Oncol* 1999; **38**(7):945-948.
131. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. **Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress.** *Environ Health Perspect* 1999; **107**(Suppl 1):5-24.

132. Shiloh Y. **ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity.** *Nat Rev Cancer* 2003; **3**(3):155-168.
133. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. **Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice.** *Cell Res* 2008; **18**(1):134-147.
134. Schetter AJ, Nguyen GH, Bowman ED, Mathé EA, Yuen ST, Hawkes JE, Croce CM, Leung SY, Harris CC. **Association of inflammation-related and microRNA gene expression with cancer-specific mortality of colon adenocarcinoma.** *Clin Cancer Res* 2009; **15**(18):5878-5887.
135. Siebolts U, Varnholt H, Drebber U, Dienes HP, Wickenhauser C, Odenthal M. **Tissues from routine pathology archives are suitable for microRNA analyses by quantitative PCR.** *J Clin Pathol* 2009; **62**(1):84-88.
136. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R. **Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer.** *Oncology* 2007; **72**(5-6):397-402.
137. Slack JM. **Stem cells in epithelial tissues.** *Science* 2000; **287**(5457):1431-1433.
138. Sluka P, O'Donnell L, McLachlan RI, Stanton PG. **Application of laser-capture microdissection to analysis of gene expression in the testis.** *Prog Histochem Cytochem* 2008; **42**(4): 173-201.
139. Spechler SJ. **Short and ultrashort Barrett's esophagus-what does it mean?** *Semin Gastrointest Dis* 1997; **8**(2):59-67.
140. Spechler SJ. **Columnar-lined esophagus. Definitions.** *Chest Surg Clin N Am* 2002; **12**(1):1-13.
141. Spechler SJ. **Barrett's esophagus: a molecular perspective.** *Curr Gastroenterol Rep* 2005; **7**(3):177-181.

142. Specht K, Richter T, Müller U, Walch A, Werner M, Höfler H. **Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue.** *Am J Pathol* 2001; **158**(2):419-429.
143. Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ. **MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint.** *Nature* 2003; **421**(6926):961-966.
144. St. Rosemary Educational Institution. **"Cell Cycles: Interphase, Mitosis, Cytokinesis."** <http://schoolworkhelper.net/>. St. Rosemary Educational Institution, Last Update: 2013. Web. Retrieved on: Wednesday 13th February 2013. <http://schoolworkhelper.net/cell-cycles-interphase-mitosis-cytokinesis/>.
145. Szafranska AE, Doleshal M, Edmunds HS, Gordon S, Luttgies J, Munding JB, Barth RJ Jr, Gutmann EJ, Suriawinata AA, Marc Pipas J, Tannapfel A, Korc M, Hahn SA, Labourier E, Tsongalis GJ. **Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues.** *Clin Chem* 2008; **54**(10):1716-1724.
146. Tricoli JV, Jacobson JW. **MicroRNA: Potential for Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis.** *Cancer Res* 2007; **67**(10):4553-4555.
147. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002; **3**(7):RESEARCH0034.
148. van Noort M, Weerkamp F, Clevers HC, Staal FJ. **Wnt signaling and phosphorylation status of beta-catenin: importance of the correct antibody tools.** *Blood* 2007; **110**(7):2778-2779.
149. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasmir E, Morselli E, Ben Younes A, Maiuri MC, Lavandro S, Kroemer G. **Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path-a mini-review.** *Gerontology* 2008; **54**(2):92-99.

150. Vilenchik MM, Knudson AG Jr. **Inverse radiation dose-rate effects on somatic and germ-line mutations and DNA damage rates.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**(10):5381-5386.
151. Vilenchik MM, Knudson AG. **Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**(22):12871-12876.
152. von Holzen U, Chen T, Boquoi A, Richter JE, Falk GW, Klein-Szanto AJ, Cooper H, Litwin S, Weinberg DS, Enders GH. **Evidence for DNA damage checkpoint activation in barrett esophagus.** *Transl Oncol* 2010; **3**(1):33-42.
153. Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzesse JL, Frazier ML, Killary AM, Sen S. **MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease.** *Cancer Prev Res* 2009; **2**(9):807-813.
154. Webb T. **Laser capture microdissection comes into mainstream use.** *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**(21):1710-1711.
155. Wijnhoven BP, Hussey DJ, Watson DI, Tsykin A, Smith CM, Michael MZ; South Australian Oesophageal Research Group. **MicroRNA profiling of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma.** *Br J Surg* 2010; **97**(6):853-861.
156. Williams LJ, Guernsey DL, Casson AG. **Biomarkers in the molecular pathogenesis of esophageal (Barrett) adenocarcinoma.** *Curr Oncol* 2006; **13**(1): 33-43.
157. Wong L, Lee K, Russell I, Chen C. **Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan® MicroRNA Assays.** Application note TaqMan® MicroRNA Assays, 2010.
158. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J. **Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples.** *RNA* 2007; **13**(10):1668-1674.

159. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. **Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis.** *Cancer Cell* 2006; **9**(3):189-198.
160. Yang H, Gu J, Wang KK, Zhang W, Xing J, Chen Z, Ajani JA, Wu X. **MicroRNA expression signatures in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma.** *Clin Cancer Res* 2009; **15**(18):5744-5752.
161. Yantiss RK, Goodarzi M, Zhou XK, Rennert H, Pirog EC, Banner BF, Chen YT. **Clinical, pathologic, and molecular features of early-onset colorectal carcinoma.** *Am J Surg Pathol* 2009; **33**(4):572-582.
162. Zhang B, Farwell MA. **microRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy.** *J Cell Mol Med* 2008; **12**(1):3-21.
163. Zhou BB, Elledge SJ. **The DNA damage response: putting checkpoints in perspective.** *Nature* 2000; **408**(6811):433-439.

microrna.sanger.ac.uk

www.biomarkers.org

www.fastbleep.com/biology-notes/40/116/1191

www.mirbase.org

www.microrna.org

www.molecular-machines.com

www.svod.cz

www.uzis.cz

www.who.int

10 SEZNAM PUBLIKACÍ A PREZENTACÍ

1. PRÁCE SOUVISEJÍCÍ S DIZERTAČNÍ PRACÍ

A) PŮVODNÍ VĚDECKÉ PUBLIKACE IN EXTENSO V DANÉM OBORU UVEŘEJNĚNÉ V ČASOPISECH S IF

1. Luzna P, Gregar J, Uberall I, Radova L, Prochazka V, Ehrmann J. **Changes of microRNAs-192, 196a and 203 correlate with Barrett's esophagus diagnosis and its progression compared to normal healthy individuals.** *Diagnostic Pathology* 2011; **6**:114. (IF 1,638)
2. Takacova S, Slany R, Bartkova J, Stranecky V, Dolezel P, Luzna P, Bartek J, Divoky V. **DNA damage response and inflammatory signaling limit the MLL-ENL-induced leukemogenesis in vivo.** *Cancer Cell* 2012; **21**(4):517-531. (IF 26,566)
3. P Luzna, J Gregar, A Kuba, V Korinek, L Raskova Kafkova, V Divoky, V Prochazka, J Ehrmann Jr. **Histone γ -H2AX is a marker of disease progression in Barrett's Esophagus.** (před odesláním k recenznímu řízení)

B) PŮVODNÍ VĚDECKÉ PUBLIKACE IN EXTENSO UVEŘEJNĚNÉ V OSTATNÍCH RECENZOVANÝCH VĚDECKÝCH ČASOPISECH

1. J. Gregar, V. Procházka, P. Lužná, J. Ehrmann Jr. **Využití NBI v diagnostice a sledování pacientů s Barrettovým jícnem.** *Gastroent Hepatol* 2012; **66**(2):126-132.

C) PŘEHLEDNÉ/SOUBORNÉ VĚDECKÉ PRÁCE UVEŘEJNĚNÉ V OSTATNÍCH RECENZOVANÝCH VĚDECKÝCH ČASOPISECH

1. Pavla Lužná, Jiří Ehrmann Jr. **Laserová mikrodisekce a její praktické aplikace.** *Cesk Patol* 2013; přijato do tisku

D) KAPITOLY V MONOGRAFIÍCH

1. Pavla Lužná, Jiří Ehrmann. **MikroRNA u karcinomu jícnu.** In MikroRNA v onkologii, 1. vydání (Ondřej Slabý et Marek Svoboda, eds.), Praha: Galén, 2012.

E) PUBLIKOVANÁ ABSTRAKTA

1. Lužná P, Kylarová D, Takáčová S, Divoký V, Kašpárková E, Nezhybová E, Piterková L, Ehrmann J Jr. **Mouse model of the DNA damage response.** *Folia Histochem Cytobiol* 2008; **46**(S2):S121. XIIIth International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Gdansk, Poland, 2008. (IF 1,213)
2. Luzna P, Gregar J, Uberall I, Prochazka V, Ehrmann J Jr. **RNA assessment as a new diagnostic and prognostic tool of Barrett's esophagus. Pilot study.** *Histopathology* 2010; **57**(S1):87. 28th International Congress of the International Academy of Pathology, Sao Paulo, Brazil, 2010. (IF 3,569)
3. Luzna P, Gregar J, Uberall I, Prochazka V, Ehrmann J Jr. **MicroRNA assessment as a new diagnostic and prognostic tool of Barrett's esophagus. Pilot study.** *Gastroenterology* 2011; **150**(S1):S219. Conference on Digestive Disease Week 2011, Chicago, IL, USA, 2011. (IF 11,675)
4. Luzna P, Kylarova D, Takacova S, Divoky V, Kasparkova E, Nezhybova E, Piterkova L, Ehrmann J Jr. **Mouse model of the DNA damage response.** *Morphology* 2008 – 44th International Congress on Anatomy and 45th Lojda Symposium on Histochemistry, Olomouc, 2008, ISBN 978-80-244-2061-5.
5. Lužná P, Kuba A, Kafková L, Divoký V, Procházka V, Gregar J, Kořínek V, Ehrmann J Jr. **DNA damage response u Barrettova jícnu.** Konference vědeckých prací studentů DSP 2009, Olomouc, 2009, ISBN 978-80-244-2330-2.
6. Gregar J, Procházka V, Konečný M, Ehrmann J Jr, Lužná P. **Naše zkušenosti s radiofrekvenční ablací Barrettova jícnu.** *Gastroent Hepatol* 2009; **63**(S1):S17. IV. kongres České gastroenterologické společnosti, Praha 2009.
7. Gregar J, Procházka V, Konečný M, Lužná P, Überall I, Ehrmann J Jr. **Vlastní zkušenosti s radiofrekvenční ablací u pacientů s chorobami GIT.** *Gastroent Hepatol* 2010; **64**(S2):S10. 11. Vzdělávací a diskusní gastroenterologické dny, Karlovy Vary, 2010.

8. Gregar J, Lužná P, Überall I, Ehrmann J Jr, Procházka V. **Vlastní zkušenosti s diagnostikou a léčbou Barrettova jícnu.** *Vnitř Lék* 2010; **56(5):455**. XXIX. Dni mladých internistů, Martin, Slovensko, 2010.
9. Lužná P, Gregar J, Überall I, Procházka V, Ehrmann J Jr. **Stanovení MicroRNA jako nových diagnostických a prognostických markerů Barrettova jícnu. Pilotní studie.** Konference vědeckých prací studentů DSP 2010, Olomouc, 2010, ISBN 978-80-244-2562-7.
10. Luzna P, Gregar J, Uberall I, Prochazka V, Ehrmann J Jr. **MicroRNA assessment as a new diagnostic and prognostic tool of Barrett's esophagus. Pilot study.** The 7th Symposium et Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry, The 96th Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology, The 3rd Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians, Olomouc, 2011, ISBN 978-80-87327-59-3.
11. Janíková M, Škarda J, Žižková V, Lužná P, Radová L. **Význam miR21, miR126 a miR205 u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic.** Edukační sborník XXXV. Brněnské onkologické dny a XXV. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky, Brno, 2011, ISBN 978-80-86793-17-7.
12. Janíková M, Škarda J, Žižková V, Lužná P, Radová L. **Expres miR-21, miR-126 a miR-205 u pacientů s NSCLC.** Konference vědeckých prací studentů DSP 2011, Olomouc, 2011, ISBN 978-80-244-2847-5.
13. Gregar J, Procházka V, Lužná P, Ehrmann J Jr, Halašková V, Faldynová V. **Vliv rizikových faktorů u pacientů s Barrettovým jícnem.** *Gastroent Hepatol* 2011; **65(S2):S12**. 32. český a slovenský gastroenterologický kongres, Brno, 2011.
14. Luzna P, Ehrmann J Jr. **Laser capture microdissection as a tool of molecular biology.** The 9th Symposium et Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry, The 99th Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology, The 5rd Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians, Olomouc, 2011, ISBN 978-80-7471-022-3.

15. Zizkova V., Janikova M., Luzna P., Skarda J., Radova L., Kolek V., Kolar Z. **The relationship of selected miRNAs to P-glycoprotein, MRP1 and LRP/MVP mediated drug resistance in non-small cell lung cancer.** The 9th Symposium et Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry, The 99th Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology, The 5rd Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians, Olomouc, 2011, ISBN 978-80-7471-022-3.

F) SEZNAM PŘEDNÁŠEK/POSTERŮ PŘEDNESENÝCH UCHAZEČEM NA VEŘEJNÝCH ODBORNÝCH FÓRECH

1. Lužná P., Kylarová D, Takáčová S, Divoký V, Kašpárková E, Nezhybová E, Piterková L, Ehrmann J Jr, Vargová K, Šefc L. **Myší model poškození DNA v kostní dřeni.** Přednáškový večer Spolku lékařů ČLS JEP v Olomouci, Olomouc, 2008.
2. Lužná P. **Laserová mikrodisekce.** The 7th Symposium et Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry, The 96th Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology, The 3rd Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians, Olomouc, 2011.
3. Lužná P. **Praktické zkušenosti se získáváním RNA z parafínových řezů pomocí mikrodisekce.** Seminář firmy Olympus, Praha, 2012.
4. Lužná P. **MicroRNAs as Diagnostic Tool of Barrett's Esophagus.** Seminář Středoevropského technologického institutu CEITEC, Brno, 2012.
5. P. Luzna, J. Gregar, V. Prochazka, J. Ehrmann jr. **Prediction of NBI endoscopy in diagnosis of dysplastic changes in patients with Barrett's esophagus.** XXXI World Congress of Internal Medicine, Santiago de Chile, Chile, 2012.

2. PRÁCE NESOUVISEJÍCÍ S DIZERTAČNÍ PRACÍ

A) PŮVODNÍ VĚDECKÉ PUBLIKACE IN EXTENSO V DANÉM OBORU UVEŘEJNĚNÉ V ČASOPISECH S IF

1. Jancova P, Anzenbacherova E, Papouskova B, Lemr K, Luzna P, Veinlichova A, Anzenbacher P, Simanek V. **Silybin is metabolized by cytochrome P450 2C8 *in vitro***. *Drug Metab Dispos* 2007; **35**(11):2035-2039. (IF 3,907)

B) PŮVODNÍ VĚDECKÉ PUBLIKACE IN EXTENSO UVEŘEJNĚNÉ V OSTATNÍCH RECENZOVANÝCH VĚDECKÝCH ČASOPISECH

1. Luzna P, Kylarova D, Novak M, Lichnovsky V. **Hematopoietic stem cell separation for experimental purposes--methodic limitations**. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2009; **153**(2):121-123.

E) PUBLIKOVANÁ ABSTRAKTA

1. Takacova S, Bartek J, Luzna P, Divoky V. **Evidence for an anti-cancer barrier in a mixed lineage leukemia mouse model *in vivo***. *Haematologica* 2009; **94**(S2):207. 14th Annual Meeting of the European Hematology Association, Berlin, Germany, 2009. (IF 6,416)
2. Jančová P, Anzenbacherová E, Šiller M, Lemr K, Papoušková B, Lužná P, Tunková A, Křen V, Anzenbacher P, Simanek V. **Metabolism of silybin – a review**. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2010; **154**(4):S7-S8. The Molecular Mechanisms of Selected Pathological Processes in the Cell, Vyškov, 2010. (IF 0,716)
3. Sylvia Takacova, Pavla Luzna, Viktor Stranecky and Vladimir Divoky. **The Potential Role of the Six1/Eya1 Pathway in the Establishment of Leukemia Stem Cells in MLL-ENL – Induced Leukemia**. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2011; **118**(21):1362. (IF 9,898)
4. Jancova P, Anzenbacherova E, Lemr K, Papouskova B, Luzna P, Anzenbacher P, Simanek V, Ulrichova J. **Metabolism of silybin by human liver microsomal cytochromes P450**. 15th International Conference on Cytochromes P450, Bled, Slovenija, 2007, ISBN 978-961-6264-89-1.
5. Lužná P, Kylarová D, Kašpárková E, Wagner F, Erdösová B, Lichnovský V. **Prenatal and postnatal hematopoiesis in mouse**. *Morphology* 2007 – 41st

International Congress of Slovak Anatomical Society and 44th Lojda Symposium on Histochemistry „Progress in Basic, Applied and Diagnostic Histochemistry“, Bratislava, Slovakia, 2007, ISBN 978-80-89305-01-8.

6. Lichnovský V, Novotný R, Erdšosová B, Wagner F, Lužná P. **Early stages of the vascularisation and myofibrillogenesis in the myocardium of the human and murine hearts.** Morphology 2007 – 41st International Congress of Slovak Anatomical Society and 44th Lojda Symposium on Histochemistry „Progress in Basic, Applied and Diagnostic Histochemistry“, Bratislava, Slovakia, 2007, ISBN 978-80-89305-01-8.
7. Wagner F, Lužná P, Erdšosová B, Lichnovský V. **The detection of macrophages during human thymus development.** Morphology 2007 – 41st International Congress of Slovak Anatomical Society and 44th Lojda Symposium on Histochemistry „Progress in Basic, Applied and Diagnostic Histochemistry“, Bratislava, Slovakia, 2007, ISBN 978-80-89305-01-8.
8. Svobodová A, Zdařilová A, Šianská J, Doležal D, Ehrmann J, Lužná P, Vostálová J. **Acute solar UVB exposure affects lymphocyte and skin DNA in SKH-1 hairless mice.** XIII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, 2009, ISBN 978-80-210-4830-0.
9. Lužná P, Kylarová D, Kašpárková E, Erdšosová B, Wagner F, Lichnovský V. **Bcl-2 family in hepatoliental period of hematopoiesis.** 102nd International Meeting of the Anatomische Gesellschaft, Giessen, SRN, 2007.
10. Lužná P, Kylarová D, Kašpárková E, Wagner F, Erdšosová B, Lichnovský V. **Prenatal and postnatal hematopoiesis in mouse.** The 4th Symposium et Workshop on Molecular Pathology, The 90th Slide Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology, The 16th Congress of the Czech Association of Histology Laboratory Technicians, Olomouc, 2008.