



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Sledování heterogenity exprese microRNA
asociovaných s lékovou rezistencí
u histologických subtypů nemalobuněčného
karcinomu plic (NSCLC)**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Tereza Hasová
Studijní program:	N1501 - Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. MUDr. MVDr. Jozef Škarda, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2017

BIOLOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Tereza Hasová
Název práce	Sledování heterogenity exprese microRNA asociovaných s lékovou rezistencí u histologických subtypů nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC)
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav klinické a molekulární patologie Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Doc. MUDr. MVDr. Jozef Škarda, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	<p>Hlavním cílem diplomové práce bylo sledování heterogenity exprese microRNA asociovaných s lékovou rezistencí u histologických subtypů nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). Dále byla srovnána exprese vybraných typů miRNA v primárních nádorech NSCLC bez metastáz a s metastázemi do lymfatických uzlin. Byly zjištěny snížené exprese miR-1909, miR-3197, miR-4463, miR-4433, miR-4774-3p a miR-4659b-5p u vzorků pacientů s metastázemi oproti zvýšené expresi daných microRNA u vzorků pacientů bez metastáz. Zvýšené hladiny exprese u vzorků pacientů s metastázemi byly zjištěny miR-362-5p, miR-1244, miR-660 a miR-26b oproti snížené expresi daných microRNA u vzorků pacientů bez metastáz. Dále z našich výsledků nebyla zjištěna žádná exprese tumor supresorové miR-34a v nádorové oblasti, a ani u normálního tkániva, proto nebylo možné porovnat rozdíly v expresi mezi jednotlivými oblastmi tumoru. Výraznou heterogenitu v expresi jsme zjistili u miR-21, která má onkogenní charakter. Exprese miR-21 byla výrazná v centrální části tumoru. V periferní oblasti byla exprese nižší, v normálním plicním tkanivu jsme nepozorovali téměř žádnou expresi.</p>
Klíčová slova	heterogenita, microRNA, nemalobuněčný karcinomu plic
Počet stran	99
Jazyk	Český

BIOLOGICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Tereza Hasová
Title of thesis	Monitoring heterogeneity of microRNAs expression associated with multi-drug resistance in histological subtypes in non-small cell lung cancer (NSCLC)
Type of thesis	Master
Department	Department of Clinical and Molecular Pathology Palacký University of Olomouc
Supervisor	Doc. MUDr. MVDr. Jozef Škarda, Ph.D.
The year of presentation	2017
Abstract	<p>The main topic of this thesis is heterogeneity of microRNAs expression monitoring associated with multi-drug resistance in histological subtypes in non-small cell lung cancer (NSCLC). Other expression of selected microRNA in prime tumors in non-small cell lung cancer without metastasis and with metastasis into lymphatic nodes was compared. Down-regulation of expression of miR-1909, miR-3197, miR-4463, miR-4433, miR-4774-3p and miR-4659b-5p was founded at samples on patients with metastasis in lymphatic nodes in comparison with patients without metastasis, who had up-regulation expression of these microRNA. Up-regulation of expression of miR-362-5p, miR-1244, miR-660 and miR-26b was founded at samples on patients with metastasis in lymphatic nodes in comparison with patients without metastasis, who had down-regulation expression of these microRNA. Further from our results there was not found any expression of tumor suppression miR-34a in tumor and neither in normal tissues, therefore it was not possible to compare differences in expression between individual areas of the tumor. We found strong heterogeneity at miR-21, which has oncogene character. Expression of miR-21 was strong in the central area of the tumor. Expression was lower in peripheral area, we did not see any expression in normal lung tissue.</p>
Keywords	heterogeneity , microRNA, non-small cell lung cancer
Number of pages	99
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně pod vedením
Doc. MUDr. MVDr. Jozefa Škardy, Ph.D., s použitím citované literatury.

V Olomouci dne

Podpis.....

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. MUDr. MVDr. Jozefu Škardovi, Ph.D., za poskytnutý čas, cenné rady a připomínky a také za poskytnuté konzultace potřebné k vypracování této práce. Děkuji Mgr. Zuzaně Pastorkové za pomoc při realizaci experimentální části, poskytnuté materiály a cenné rady. Děkuji Mgr. Lence Radové, Ph.D., za statistické zpracování výsledků mikročipové analýzy. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu pracoviště Ústavu klinické a molekulární patologie v Olomouci za ochotu pomoci při řešení experimentální části.

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíle práce	9
3	Teoretická část	10
3.1	Obecné charakteristiky MicroRNA	10
3.2	Biogeneze microRNA	11
3.3	Zapojení microRNA v patogenezi nádorových onemocnění	13
3.3.1	Necitlivost k signálům řídící buněčný cyklus	14
3.3.2	Angiogeneze	15
3.3.3	Neomezený replikační potenciál	17
3.3.4	Apoptóza	18
3.3.5	Šíření metastáz	19
3.4	Prognostický a prediktivní význam microRNA u pacientů s NSCLC	20
3.4.1	MicroRNA-21	24
3.4.2	MicroRNA-126	25
3.4.3	MicroRNA-155	26
3.4.4	MicroRNA-182	27
3.4.5	MicroRNA-203	28
3.4.6	MicroRNA-205	29
3.4.7	MicroRNA-210	29
3.4.8	MicroRNA-224	30
3.4.9	Let-7	31
3.4.10	MicroRNA-34a	33
3.4.11	MicroRNA-145	34
3.5	Nádorová heterogenita	35
3.6	Léková rezistence	36
4	Experimentální část	39
4.1	Materiál	39
4.1.1	Použité chemikálie	39
4.1.2	Použité roztoky	39
4.1.3	Biologický materiál	40

4.1.4	Použité přístroje	40
4.2	Metodika	41
4.2.1	Příprava parafínových bločků	41
4.2.2	Izolace celkové RNA z parafínových bločků.....	41
4.2.3	Stanovení koncentrace RNA	43
4.2.4	Příprava vzorku na mikročipovou analýzu.....	43
4.2.5	In situ hybridizace.....	44
5	Výsledky.....	47
5.1	Analýza microRNA	47
5.1.1	Srovnání expresí vybraných microRNA u vzorků pacientů s metastázemi do lymfatických uzlin a vzorků pacinetu bez metastáz.....	47
5.1.2	MicroRNA z mikročipové analýzy, jejichž exprese měla nejvýznamnější signifikanci	49
5.1.3	Souhrn cílových genů regulovaných jednotlivými miRNA asociovanými s výskytem metastáz do lymfatických uzlin	52
5.2	In situ hybridizace.....	55
5.2.1	Detekce exprese miR-21 a miR-34a z různých míst tumoru NSCLC	55
6	Diskuze.....	62
7	Závěr	75
8	Seznam zkratek.....	76
9	Seznam citací	81
10	Přílohy	98

1 Úvod

Jedním z problémů efektivní protinádorové terapie NSCLC je rezistence vůči radioterapii a chemoterapii. V současné době rozlišujeme dva typy rezistencí, primární a sekundární. Primární typ rezistence se vyskytuje u maligních buněk, kdy se tyto buňky stávají rezistentní vůči chemoterapii při primární léčbě. Sekundární rezistence vzniká až v průběhu cytostatické léčby. Velkým problémem je mnohočetná léková rezistence, která byla popsána jako zkřížená rezistence mezi protinádorovými léčivými s tím rozdílem, že se léčiva již odlišovala mechanismem účinku a strukturálně (Nosková a kol., 2000a). V této souvislosti je nutno zmínit také problematiku nádorové heterogenity, která nesporně přispívá k lékové rezistenci. Na rozvoji progresu negenetické nádorové heterogenity se podílí i microRNA. MikroRNA jsou jednořetězcové RNA o přibližné velikosti 21-23 nukleotidů. Patří mezi nejvíce prozkoumanou skupinou malých RNA. Krátké nekódující RNA jsou evolučně konzervované a svojí funkcí negativně ovlivňují genovou expresi na posttranskripční úrovni (Ratner a kol., 2010). Jsou rozmístěny po celém genomu. Odhaduje se, že by mohly tvořit 2-5 % lidských genů (Paranjape a kol., 2009). MicroRNA jsou v patogenezi nádorových onemocnění zapojeny, že buď fungují jako onkogen, který suprimuje translaci tumor supresoru, nebo jako nádorový supresor, který suprimuje translaci onkogenu (Sotiropoulou a kol., 2009; Santarpia a kol., 2010). MicroRNA nejsou zapojeny pouze v nádorové patogenezi jako nádorové supresory či onkogeny, ale podílí se na regulaci buněčných systémů. Při alteraci exprese miRNA dochází k rozvoji výše uvedené nádorové heterogenity, což pravděpodobně přispívá k maligní transformaci prekursorů nádorových buněk a k urychlení růstu nádoru (Hanahan a Weinberg, 2000; Voorhoeve, 2010; Brock a kol., 2009).

V rámci diplomové práce byly studovány expresní profily microRNA, které jsou zapojeny do patogeneze nemalobuněčného karcinomu plic. Dané téma je v první části zpracováno v podobě literární rešerše. Experimentální část se zabývá expresními profily microRNA a jejich možnými cílovými geny také sledování nádorové heterogenity v různých lokalizacích centrální a periferní části adenokvadrálního karcinomu jednoho pacienta. Získaná data by mohla poskytnout nové informace o problematice zapojení microRNA do patogeneze NSCLC

2 Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše
2. Izolace RNA z primárních nádorů NSCLC (nemalobuňčných karcinomů plic metastázemi do lymfatických uzlin a bez metastáz do lymfatických uzlin)
3. Detekce microRNA asociovaných s lékovou rezistencí z různých míst spinocelulárního karcinomu a adenokarcinomu
4. Statistické zpracování výsledků

..

3 Teoretická část

3.1 Obecné charakteristiky MicroRNA

MikroRNA jsou jednořetězcové RNA o přibližné velikosti 21-23 nukleotidů. Krátké nekódující RNA jsou evolučně konzervované a svojí funkcí negativně ovlivňují genovou expresi na posttranskripční úrovni (Ratner a kol., 2010). MicroRNA nalezneme jak u rostlin, tak i u živočichů. Jsou rozmístěny po celém genomu. Odhaduje se, že by mohly tvořit 2-5 % lidských genů (Paranjape a kol., 2009). Důkazy do dnešní doby poukazují na účasti v regulaci exprese přibližně 10-30 % lidských genů kódujících proteiny. MiRNA sice vznikají transkripcí z genů v DNA, ale následně již nedochází k jejich translaci v protein. Plně funkční miRNA vznikají z primárního transkriptu neboli pri-miRNA, která se následně páruje s některými vlastními komplementárními bázemi. Následně funkční miRNA jsou komplementární k určitým molekulám mRNA, a tímto způsobem jsou schopny regulovat výrobu proteinů, které kódují mRNA. Vazbou na cílovou mRNA dochází ke štěpení a degradaci cílové mRNA nebo k inhibici translatované cílové mRNA do proteinu. (Vencken a kol., 2015). Jak je již popsáno výše, miRNA mají schopnost posttranskripční regulace a kontroly. Jsou schopny ovlivňovat proliferaci, diferenciaci, apoptózu, z čehož plyne, že mohou ovlivňovat i procesy mnohočetné lékové rezistence. Patří mezi silné regulátory složitých procesů. Vědecké publikace ukazují řadu důkazů, kdy miRNA mohou fungovat jako onkogeny, kdy aktivují a podporují maligní potenciál nebo fungují jako tumorsupresorové geny se schopností blokace maligního potenciálu (Hanahan a Weinberg, 2000; Chan a kol., 2011). Pro nádorové buňky je charakteristická pozměněná hladina exprese microRNA ve srovnání se zdravou tkání. Změny v expresních profilech miRNA byly detekovány u karcinomu plic, prostaty, prsu, endometria či žaludku. Pro jednotlivé podtypy karcinomu je možno rozlišit různé miRNA s odlišnými expresními profily. Důsledky změn exprese by právě mohly vést k progresi nádorových onemocnění. Z hlediska studia různých onemocnění jsou významné jednonukleotidové polymorfismy (SNP), které se mohou nacházet v genech a podílet se na kódování proteinů a vést tak k jejich ovlivnění. Tyto SNP mohou mít funkci i u microRNA a tím pro nás představovat ideální kandidáty pro identifikaci nádoru a jeho následné prognózy. Jednonukleotidové polymorfismy mohou narušovat sekvenci microRNA a tím vést k rozvoji rizika nádoru. Jako běžný diagnostický

marker se využívá mRNA, která ale oproti microRNA má menší stabilitu. (Paranjape a kol., 2009; Slabý a kol., 2012).

První identifikované miRNA byly geny lin-4 a lin-7 u modelového organismu *Caenorhabditis elegans*. Lin-4 a lin-7 mají významné uplatnění v regulaci vývoje a pravděpodobně prostřednictvím regulace translace mRNA koordinují microRNA přechody mezi jednotlivými fázemi larválního vývoje (Lee a kol., 1993; Reinhart a kol., 2000). Je-li lin-4 nebo lin-7 inaktivovaný, epiteliální buňky podstoupí další dělení. Abnormální proliferace buněk patří mezi jeden ze znaků nádorové transformace (Lu a kol., 2005).

3.2 Biogeneze microRNA

Pri-miRNA jsou velké molekuly primární RNA, které jsou prekurzory miRNA, jenž jsou přepsány pomocí RNA polymerázy II. Geny pro miRNA obsahují vlastní promotory. Pri-miRNA jsou následně upraveny do vlásečkové struktury v jádře. V jádru jsou tyto prekurzory pri-miRNA pomocí komplexu Drosha/Pasha sestříhány na pre-miRNA (Lee a kol., 2002). Pre-miRNA má velikost do 70 nukleotidů. Pasha je protein vázající dsRNA nazývaný také jako DGCR8. Tyto dvě komponenty Drosha a DGCR8 mikroprocesorového komplexu pracují kooperativně a navzájem se regulují. Množství celkové miRNA reguluje aktivitu i hladinu komplexu. Drosha sleduje kontrolu hladiny DGCR8 štěpením vláseček přítomných v mRNA tohoto genu, indukuje jeho degradaci a tím vytváří zpětnou vazbu redukcující hladiny DGCR8, pokud je aktivita mikroprocesorového komplexu dostatečná. DGCR8 má funkci stabilizační na ribonukleázu Drosha s interakcí s jeho prostřední doménou. Důležitý je poměr komplexu daných komponent. Zvýšená hladina DGCR8 by vedla k dramatické inhibující aktivitě ribonukleázy Drosha. Tato pre-miRNA je následně pomocí Exportinu 5 transportována do cytoplazmy. Jedná se o GTP-dependentní transportní protein. XPO5 je schopen rozeznat dvounukleotidový přesah, který je zanechán ribonukleázou Drosha na 3' konci vlásečkové struktury pre-miRNA. Jak je již zmíněno výše, jedná se energicky závislý transport, dochází zde k vazbě GTP na malý protein Ran, který má GTPázovou aktivitu, a je též součástí transportního mechanismu (Gregory a kol., 2004; Slabý a kol., 2012). Exportin 5 je potřebný pro jaderný export a biologickou aktivitu pre-miRNA (Yi a kol., 2003). XPO5 patří mezi členy rodiny karyopherinů řadící se mezi nukleocytoplazmatické faktory. Karyopheriny se uplatňují v jaderném exportu. Následně v cytoplazmě je pre-miRNA rozpoznána a upravena druhou RNázy III z komplexu Dicer. Dicer daný

prekurzor sestřihne na krátké duplexy RNA a získáme maturované dvouřetězcové miRNA. Jeden z řetězců je degradován a druhý z řetězců je navázán komplex RISC, jedná se o multiproteinový komplex miRNA-induced silencing complex. Řetězec, který je inkorporován do multiproteinového komplexu nazýváme „guide strand“. Řetězec, který je degradován nazýváme „passenger strand“ nebo též miRNA*. Důležitá je stabilita řetězce, která rozhoduje o osudu řetězce na 5´konci. U duplexu miRNA/miRNA* je vedoucí řetězec je ten, který je méně stabilní na 5´konci (Winter a Diederichs, 2011; Slabý a kol., 2012). Velký význam u miRNA má 5´konec, je důležitý pro biologickou funkci, podílí se na stabilitě a správném vložení do miRISC komplexu. Zpracování prekurzorových struktur pomocí Drosha a Dicer enzymů není vždy identické, a může tedy vést ke vzniku různých izoform miRNA, což je důsledek rozdílných zakončení i rozdílných osudů pro tyto miRNA. V různých tkáních se může poměr miRNA/miRNA* měnit. Příkladem mohou být různá vývojová stadia nebo nádorová transformace. Stovky biologických cílů může být právě ovlivňováno jednou miRNA (Winter a kol., 2009). Vlákno miRNA se přednostně udržuje ve funkčním miRISC komplexu. Realizace její funkce je umožněna vazbou na neúplně komplementární místa v rámci 3´UTR cílových mRNA. Na kontrole transportu, metabolismu mRNA, stabilitě a účinnosti translace se podílí a kontrolují 3´UTR oblasti. Jsou významné i tím, že obsahují vazebná místa pro řadu regulačních proteinů a miRNA, což poukazuje na vysoce dynamickou regulaci kombinačního charakteru (Krol a kol., 2010; Newman a kol., 2010; Slabý a kol., 2012). Funkci komplexu miRISC na cílové mRNA je realizována ribonukleázou Dicer, dvěma proteiny vázajícími dvouřetězcovou RNA, TRBP a interferonem indukovaný aktivátor závislý na dvouřetězcové RNA (PACT) a dále Argonautové proteiny, kdy tyto komponenty jsou součástí komplexu miRISC. Bylo zjištěno, že pokud dojde utlumení TRBP a PACT, dochází k obecnému snížení účinnosti posttranskripční regulace genové exprese. (Gregory a kol., 2004; Haase a kol., 2005; Lee a kol., 2006; Slabý a kol., 2012). Doména PAZ umožňuje interakci proteinů argonautové rodiny vazbou na 3´konec jednořetězcové maturované miRNA. Doména PIWI, která interaguje s 5´konce vedoucího řetězce, je hlavně katalytickou podjednotkou, která se uplatňuje na cílové mRNA. PIWI je druhou rodinou argonautových proteinů, které se vyskytují především v zárodečných nebo kmenových hematopoetických buňkách, dále pak AGO je také proteinová rodina, která má zásadní význam pro funkci komplexu miRISC, jsou nutné pro vlastní posttranskripční tlumení a obsahuje vysoce konzervované vazebné domény, které jsou popsány výše tedy PAZ a PIWI. Proteiny argonautové rodiny dělíme do dvou rodin. Rodina AGO má čtyři členy. Člen AGO2 může navíc indukovat tlumení translace v případě neúplné komplementarity vazby miRNA:mRNA. Právě proteiny Argonautové

rodiny mají řadu funkcí, podílejí se na zpracování miRNA, jsou efektorovými proteiny komplexu miRISC, v němž zajišťují degradaci, destabilizaci nebo translační inhibici cílové mRNA (MacRae a kol., 2008; Hutvagner a kol., 2008; Diederichs a kol., 2007). Co se týká biologického poločasu a rozpadu microRNA, máme zatím málo informací o degradaci jednotlivých microRNA ve srovnání s biogenezí (Chatterjee a kol., 2011; Slabý a kol., 2012).

3.3 Zapojení microRNA v patogenezi nádorových onemocnění

První studií, při kterých bylo zjištěno zapojení miRNA v patogenezi nádorů, pochází ze studie chronické lymfocytární leukémie. Onemocnění je nejspíše způsobeno delecí v chromozomálním lokusu 13q14. Jedná se o delecii, která byla pozorována u více než 50 % pacientů s CLL. Jde o nejčastější chromozomální abnormalitu. Studie Calina a kol. (2002) poukazují, že miR-15 a miR-16, které byly lokalizovány na daném lokusu, měly pozměněnou expresi a většinou byly u CLL sníženy exprimovány nebo dokonce odstraněny. U CLL byl detekován prekurzor pre-mir-15, což poukazovalo na neefektivní miR-15 (Calin a kol., 2002).

Studie Karube a kol. (2005), která se zabývala problematikou změn u Diceru a komplexu Drosha. Změny Diceru a komplexu Drosha, které jsou důležité komponenty ke zpracování microRNA, souvisí právě se změnami jejich exprese. Pro analýzu bylo použito 67 vzorků pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic v různých stádiích. Z dané studie byly získány výsledky, které poukazují na jistou korelaci mezi expresí Diceru a komplexu Drosha v NSCLC. Výsledky v dané studii ukázaly, že nízká exprese Diceru se vyskytovala u špatně diferencovaných tumorů ve srovnání s vyšší expresí Diceru. Dicer je potřebný pro zpracování a generování plné formy microRNA, proto tedy nelze vyloučit, že by právě snížená exprese Diceru mohla vést k posttranskripčnímu mechanismu, který například snižoval expresi let-7a také dalších microRNA u nádorových buněk. Právě hladiny let-7 byly sníženy u pacientů s karcinomem plic. Díky výsledkům z dané studie, by právě snížená exprese Diceru mohla vést k rozvoji karcinomu plic, protože Dicer má zásadní roli v biologických procesech (Karube a kol., 2005).

Podle studie Hanahana a Weinberga (2010) je nádorová buňka charakterizována šesti základními vlastnostmi, které se liší od zdravé nenádorové buňky. Mezi tyto vlastnosti nádorové buňky patří soběstačnost v produkci růstových faktorů, necitlivost k faktorům zastavující buněčný

cyklus, nereagují na apoptotické mechanismy, neomezený replikační potenciál, podpora angiogeneze a schopnost tvorby a šíření metastáz. Během následujících let daní autoři doplnili k těmto základním informacím další čtyři vlastnosti nádorové buňky. Mezi tyto vlastnosti patří únik před imunitním systémem, deregulace energetického metabolismu, genomová nestabilita, mutace a nádorem vyvolaný zánět (Hanahan a Weinberg, 2000; Hanahan a Weinberga, 2011). Tyto znaky jsou společné pro všechny nádory.

3.3.1 Necitlivost k signálům řídící buněčný cyklus

Jednou z vlastností nádorových buněk je necitlivost k signálům, které zastavují buněčný cyklus. Nádorové buňky mají zvýšenou senzitivitu k nízkým koncentracím růstových signálů. Zastavení buněčného cyklu je obvykle zprostředkováno pomocí proteinu Retinoblastomu a jeho podjednotek. Na zablokování exprese genu, které jsou nutné k průběhu buněčného cyklu, se podílí Rb proteiny, které jsou v hypofosforylovaném stavu schopny tlumit transkripční faktory E2F. Právě vyřazením Rb proteinů v nádorové buňce například mutací, delecí či patologickou hyperfosforylací dochází k indukci transkripce genů vedoucí k proliferaci prostřednictvím transkripčních faktorů E2F. Transkripční faktory E2F jsou důležité regulátory genů, mohou iniciovat proliferaci buněk, tak i buněčnou smrt. E2F proteiny se podílí na regulaci buněčného cyklu. Účastní se replikace DNA i progresu buněčného cyklu. Jsou indukovány na přechodu G1/S fáze a vstupu do buněčného cyklu, ale geny jsou v nízkých koncentracích exprimovány i během klidového stavu. Základní klasifikace genů je na aktivátory nebo represory transkripce na základě strukturních a funkčních vlastností. Osm genů E2F kódují devět hlavních typů proteinů (Iaquinta a Lees, 2007). Regulace buněčného cyklu ve spojení s microRNA je popisována na posttranskripční úrovni. Pomocí řady miRNA dochází k regulaci aktivity transkripčních faktorů E2F na posttranskripční úrovni. Klastri-miR-17-92, který je lokalizovaný na chromozomu 13q31.1 je důležitý v integraci signálů během G1 fáze rozhoduje o tom, zda budou signály interpretovány jako proliferativní nebo apoptotické. Dalším důležitým klastrem je klastri-miR-106b-25, který je lokalizovaný na chromozomu 7q22.1. Transkripční aktivací klastru 17-92 dochází prostřednictvím onkogenu MYC, současně dochází k tlumení transkripčních faktorů E2F a kontrole hladiny MYC, tím to se vytvoří zpětná negativní vazba, protože dochází jak aktivaci onkogenu MYC, tak i aktivace klastru. U nádorových buněk se setkáváme s vysokou aktivitou onkogenu MYC, což vede k narušení předchozího kontrolního mechanismu a výsledkem je

nekontrolovatelná buněčná proliferace (Coller a kol., 2007;). U karcinomu štítné žlázy a hepatocelulárního karcinomu byly detekovány zvýšené hladiny miR-221 a miR-222, které přímo cílí na P27KIP1. Tímto mechanismem opět nádorové buňky unikají před zástavou buněčného cyklu (Chu a kol., 2008; Visone a kol., 2007; Fornari a kol., 2008). V reakci na poškozenou DNA p21Cip1 indukující zástavu buněčného cyklu, jsou tlumeny členové rodiny klastru miR-106b-25 (Petrocca a kol., 2008).

3.3.2 Angiogeneze

Novotvorba cév je přísně kontrolována pro-angiogenními faktory a anti-angiogenními faktory. U nádorových buněk se setkáváme s porušenou rovnováhou mezi těmito faktory. Při porušení rovnováhy mezi pro- a anti-angiogenními faktory jsou schopny maligní buňky rychleji růst, protože nádorová tkáň má dostatek kyslíku a živin. U řady solidních nádorů byla zjištěna zvýšená exprese či aktivace receptorových tyrozin-kináz nebo receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor – VEGFR a růstový faktor odvozený od krevních destiček – PDGFR. VEGFR hraje klíčovou roli v rozvoji nádorů, protože usnadňuje novotvorbu a růst krevních cév. PDGFR je zapojen do procesů růstu pojivových tkání a hojení ran (Slabý a kol., 2012). Epidermální růstový faktor je členem rodiny receptorů erbB. Tento růstový faktor je exprimován v řadě lidských tkání a podílí se na regulaci řady procesů jako je proliferace, diferenciací a vývoj organismu. Významnou roli v procesu angiogeneze má také epidermální růstový faktor EGF. U většiny nádorových buněk byla zvýšená funkce receptoru epidermálního růstového faktoru EGFR, u receptorů erbB rodiny, a také u tyrozin kináz. Abnormálně zvýšená funkce těchto komponent souvisí progresí a horší prognózou u nádorových onemocnění. Horší prognóza nádorových onemocnění je podpořena odolností k chemoterapii a radiační terapii, při nadměrné expresi EGFR, která se vyskytuje v řadě solidních nádorů (Crujisen a kol., 2005; Webster a kol., 2008).

Na maligní transformaci se podílí signální dráha EGFR a její komponenty. Mezi významný protein zapojený do této signální dráhy patří onkogen KRAS, jehož aktivace se podílí na úniku nádorové buňky od závislosti na růstových faktorech. Byla popsána miR-7, která je schopná koordinovaně regulovat právě signální dráhu EGFR. Daná problematika byla zkoumána u karcinomu plic, karcinomu prsu a kolorektálního karcinomu. Dále pak miR-128b, která patří mezi přímé regulátory EGFRu nemalobuněčného karcinomu plic (Webster a kol., 2008; Weiss a kol., 2008).

Zapojení miRNA v procesu regulaci angiogeneze, bylo také studováno na myších modelech. Studované myši měly pomocí homologní rekombinace u genu Diceru deletované první dva exony. Tento knock-out vedl k podstatným defektům v angiogenezi v průběhu embryogeneze. Studie potvrdila, že Dicer je nezbytný pro normální vývoj myši. Zajímavé u studie Yanga a kol. (2005) bylo, že Dicer u myších embryí vykonává určitou funkci při zpracování miRNA, která reguluje hladiny exprese některých kritických angiogenních regulátorů v buňce. Mutantní knock-outovaná embrya a jejich žloutkové vaky měly defekty v tvorbě krevních cév. Z uvedených výsledků vyplývá, že Dicer může hrát roli v regulaci angiogeneze embryí, prostřednictvím zpracování miRNA (Yang a kol., 2005). Důležitými faktory při angiogenezi jsou faktory indukované hypoxií HIF. Jelikož nádorové buňky jsou spojeny s hypoxickým prostředím, které vede k nekróze a aktivaci signálních drah závislých právě na HIF. Aktivace endoteliálních buněk angiogenními faktory vede k proliferaci a tvorbě nových cév. U nádorových buněk dochází k neovaskularizaci, díky které je umožněno takovému buňkám rychleji růst. Řada studií poukazuje na zapojení miRNA do regulace těchto procesů.

Studie Kulshreshtha a kolektivu (2007), která byla založena na mikročipovém profilování poukázala, že některé miRNA (miR-23, -24, -26, -27, -103, -107, -181, -210, -213) jsou indukovány při nedostatku kyslíku. Hypoxie je jedním z modulátorů exprese jednotlivých miRNA. Zajímavostí je, že většina miRNA indukované hypoxií jsou nadměrně exprimované v různých typech nádorů. Řada miRNA může fungovat tak, že buď spínají v buňce anti-apoptický program, který vede k jejímu přežití nebo mohou fungovat na programu angiogeneze. Mezi miRNA, které pravděpodobně spínají anti-apoptický program se řadí miR-23, miR-107, miR-210. V nádorových buňkách miR-126 přímo reprimuje expresi VEGF-A a indukuje zástavu buněčného cyklu v G1 fázi. Vše bylo studováno u modelu karcinomu plic, jak *in vivo*, tak *in vitro*. Studie odhalila, že miR-126 může mít funkci nádorového supresoru (Kulshreshtha a kol., 2007; Slabý a kol., 2012). MiR-126 je přirozeně komplementární k VEGF a touto interakcí je schopna inhibovat expresi VEGF v buňkách nádoru. Výsledky studií poukazují na sníženou expresi miR-126 v řadě nádorových linií převážně u karcinomu plic, kdy ve studii byly použity buněčné linie karcinomu plic SPC-A1, Y-90 a A549. V buňkách A549 byla exprese miR-126 nízká. Podle výsledků dané studie absence miR-126 v buňkách A549 souvisela s vysokou úrovní exprese VEGF-A. Po umělém navýšení exprese miR-126 bylo pozorováno celkové snížení plicní nádorové hmoty. Liu a kolektiv (2009) zjistili, že miR-126 by mohla být slibným vodítkem při léčbě nádorů plic. V dané studii byla pomocí lentiviru zprostředkována exprese miR-126 a ta následně inhibovala expresi VEGF-A proteinu, buněčnou proliferaci a tím růst nádoru, jak *in vivo*, tak *in vitro*. Jinak je tomu však s expresí dané miRNA v endoteliálních buňkách, kdy byla hladina miR-

126 navýšena v průběhu angiogeneze. MiR-126 byla zkoumána *in vivo* modelovém organismu zebrafish, protože u daného organismu není potřeba pro životaschopnost fungující kardiovaskulární systém v pokročilejších stádiích embryogeneze. Studie poukázala, že v endoteliálních buňkách během angiogeneze je exprese miR-126 nejen zvýšená, ale také je schopna reprimovat negativní regulátory signální dráhy VEGF (Kulshreshtha a kol., 2006; Liu a kol., 2009; Fish a kol., 2008).

3.3.3 Neomezený replikační potenciál

Mezi další vlastnost nádorové buňky patří neomezený replikační potenciál. Buněčné stárnutí neboli senescence je reakcí buňky na stresové signály. Senescence je fyziologický proces. Klíčovou roli v procesu senescence hrají p53, p16INKa, Rb, p53 a p16INKa jsou zapojeny do protinádorového mechanismu buňky. Problémem je, že u obnovitelných tkání, kde je zapojena řada mechanismů jako jsou opravy, regenerace a schopnost obnovy, dochází k vyššímu riziku vzniku hyperproliferativních onemocnění, jimž může být například rakovina. Pro vznik nádorového onemocnění je důležitým krokem šíření somatické mutace, která bývá pravděpodobně získána během replikací DNA. Obranný mechanismus pak tvoří tumor supresorové geny. Máme řadu podnětů, které vyvolávají senescenci buňky, jako jsou genetické defekty, změny exprese proteinů či epigenetické změny, které jsou způsobeny farmakologickými činidly. Již zmíněné odlišné podněty urychlující senescenci buňky jsou regulovány pomocí p53 a Rb tumor supresorových proteinů (Campisi, 2005). Nezbytnou funkcí proteinu p53 je reakce na senescenci na krátkých telomerách, poškození DNA a dále pak zvýšená exprese některých nádorových supresorových genů. Je značný rozdíl mezi apoptózou a senescencí. I přestože jsou tyto dva děje v kritických krocích řízeny pomocí p53. Při apoptóze dochází k odumírání poškozených nebo potenciálních onkogenních buněk. Naopak senescence je procesem, kdy dochází k zastavení proliferace takovýchto buněk, ale nedochází k odstranění tkání. Je řada hypotéz, jak dochází ke stárnutí buňky. Jednou z nich je funkce syntézy DNA, nedostatek telomerázy, která má funkci přidávání telomerázových repetitivních přímo na telomery. Primárním mechanismem, který byl zkoumán po řadu let, bylo právě replikační stárnutí neboli zkracování telomer. Bylo zjištěno, že stárnutí není omezeno pouze na replikační vyčerpání. Stárnoucí fenotyp buněk je vyvolán řadou stimulů, jako jsou mitogenní signály, expresí onkogenu, poškozením DNA či zkracováním telomer. Pro reakci na tyto stimuly v procesu senescence je potřeba p53. Zmíněné stimuly mohou být aktivovány například oxidativním stresem buňky, kdy dochází k poškození DNA.

Může docházet uněkterých případůk zrychlenému zkracování telomery, ale nemusí tak být vždy. Jedním z vyjmenovaných stimulů jsou právě onkogeny, které mohou vyvolat nezávislé stárnutí telomer v reakci na onkogeny, z nichž jsou právě aktivované RAS a RAF (Itahana a kol., 2001). Společným rysem těchto stimulů je, že usnadňují nádorovou transformaci a jsou jejím potenciálním induktorem. Jak je již zmíněno výše, tak u stárnoucího fenotypu dochází k nevratnému zastavení buněčné proliferace. U stárnoucích buněk dochází ke změně metabolismu a morfologie. P53 patří mezi důležité regulátory reakce. Studie ukazují, že inaktivace proteinu p53 nebo pRB vede k prodloužení replikačního potenciálu buněk, pokud dochází k inaktivaci obou proteinů, prodlužuje se replikační potenciál ve větší míře. Pokud je protein p53 nefunkční, nepodaří se buňkám dojít k senescenci. Daný děj je typický pro buňky, které nadměrně exprimují onkogenní RAS a dále také zvýšená exprese transkripčního faktoru E2F1. Protein p53 detekuje zkrácení telomer, pomocí podobného mechanismu, který využívá při detekci poškozené DNA. V senescenci hrají klíčovou roli i miRNA, které jsou aktivované pomocí p53. Na modulaci signální dráhy E2F se podílí rodina miR-34 (Slabý a kol., 2012; Negrini a kol., 2009).

3.3.4 Apoptóza

Apoptóza je důležitý fyziologický děj, který se uplatňuje v mnoha biologických procesech jako je udržení homeostázy či v průběhu vývoje organismu. Na procesu apoptózy se podílí řada stimulů, z nichž jedny mohou být apoptotické signály, které přichází buď z vnitřního prostředí buňky, nebo z extracelulárního prostředí. Za signály přicházející z vnitřního prostředí, které řadíme mezi apoptotické signály, patří aktivaci onkogenů, reaktivní kyslíkové radikály či poškození DNA. Za extracelulární stimuly lze považovat například faktory smrti jako TNF α , TRAIL, FAS ligand, ztráta signálu podporující přežívání buněk. Pro proces apoptózy jsou důležité kaspázy, které se uvnitř buňky nachází v neaktivní formě. K aktivaci kaspáz dochází pomocí pro-apoptických signálů. Poté následuje řada kroků, které vedou k apoptóze dané buňky. Co se týká role miRNA v procesu apoptózy, tak některé studie potvrzují regulační význam miRNA u apoptózy (Hanahan a Weinberg, 2000; Hanahan a Weinberg, 2011; Slabý a kol., 2012). Za studovanou miRNA ve spojení danou problematikou byla rodina miR-34 a její členové miR-34a, miR-34b a miR-34c. MiR-34a je přepisována z větší transkripční jednotky lokalizované na chromozomu 1p36. MiR-34b a miR-34c jsou generovány z bicistronického transkriptu na chromozomu 11q23. Je známo, že protein p53 je

tumor-supresor, který aktivuje řadu genů, které kódují proteiny a řídí buněčný cyklus. Protein p53 bývá často mutovaný u nádorových buněk. Je zjištěno, že reguluje rodinu miR-34, právě proto v nádorových buňkách mohou být nalezeny miR-34 ve snížené hladině způsobenou mutací p53 či epigeneticky. Bylo zjištěno, že k miR-34a se váže p53 prostřednictvím promotorového elementu genu pro danou miRNA. MiR-34a může být vnímána jako pro-apoptický transkripční cíl p53, protože bylo zjištěno, že inaktivace miR-34a znemožňuje apoptózu, která by byla závislá na p53. Lze říct, že exprese rodiny miR-34 odráží stav p53. Jako další z cílů miR-34 a byl identifikovaný BCL2 (Bommer a kol., 2007; He a kol., 2007; Hermeking, 2007; Tarasov a kol., 2007). MiR-34a je také negativním regulátorem N-MYC protoonkogenu, což bylo zjištěno na základě studií, kdy u buněk neuroblastomu s amplifikovaným MYCN byla detekována ztráta miR-34a, pravděpodobně způsobené delací oblasti 1p36. Pokles spontánní apoptózy vykazovaly kmenové embryonální buňky, které postrádaly gen pro miR-34. Na základě zjištěných poznatků a studií o rodině miR-34, lze tuto rodinu miRNA považovat za nádorové supresory, které jsou zapojeny do regulace apoptózy (Raver-Shapira a kol., 2007; Chang a kol., 2007; Welch a kol., 2007; Wei a kol., 2008). Dalšími miRNA jsou miR-15 a miR-16, které se uplatňují jako regulátory anti-apoptického BCL2, který patří do rodiny proteinů, které mají jak pro-apoptické, tak i anti-apoptické geny. Tyto geny se zásadně podílí na regulaci vnitřní dráhy apoptózy. Další významnou miRNA, která je zapojena do procesu apoptózy je miR-133. Jedná se o miRNA, která jako jediná je schopna snižovat hladiny kaspázy 9 (Cory a kol., 2002; Danial a kol., 2004; Xu a kol., 2011; Lynam-Lennon a kol., 2008).

3.3.5 Šíření metastáz

Šíření metastáz v organismu je několikastupňový proces. MicroRNA mohou ovlivňovat jednotlivé kroky tohoto procesu, a to buď že jednotlivé microRNA tento proces podporují nebo potlačují. Proces epiteliálně-mezenchýální tranzice je charakterizován redukcí buněčných adhezí, změnou polarizace epiteliálních buněk. V procesu invaze a rozvoje metastatického potenciálu u transformované nádorové buňky má velký význam právě epiteliálně-mezenchýální tranzice.

Rodina miR-200 má potenciál negativně regulovat ZEB1/2 a tím inhibovat EMT. Bracken a kolektiv (2008) zjistili, že mezi rodinou miR-200 a ZEB1/2 existuje regulační smyčka, jenž umožňuje přesnou kontrolu nad epiteliálně-mezenchýální tranzicí. Zahájení metastatické kaskády by mohlo být způsobeno právě sníženou expresí miR-200, což by vedlo k sepnutí EMT u nádorových buněk.

Protože má rodina miR-200 schopnost tlumit ZEB1/2 a tím inhibovat EMT, tak je schopna inhibovat počáteční stadia kaskády metastáz a tím působí proti-metastaticky, ale u nádorových buněk, jež jsou již v pokročilých stádiích, působí pro-metastaticky a daný proces podporuje. Proti-metastatické účinky má miR-31, která působí na všech úrovních v procesu tvorby metastáz. MiR-31 reguluje rozdílné cílové mRNA. Další geny, které jsou posttranskripčně tlumeny pomocí miR-31, jsou RDX, ITGA5 a RHOA (Gregory a kol., 2008; Park a kol., 2008; Bracken a kol., 2008; Dykxhoorn, 2010).

Mir-122 patří mezi nejvíce zastoupenou microRNA v jaterní tkáni. Představuje přibližně 70 % z celé skupiny miRNA. Řadí se tedy mezi jaterně specifickou miRNA, ale byla nalezena i v srdci. Funkce miR-122 bývá u primárních nádorů specificky potlačena, což souvisí s horší prognózou daného onemocnění. Pokud dojde ke ztrátě miR-122, dochází ke zvýšení migračního a invazivního potenciálu buněk hepatocelulárního karcinomu. Daná studie byla zakončena závěrem, že miR-122 je důležitým faktorem v procesech migrace a invaze (Coulouarn a kol., 2009).

Proti-metastatické účinky má miR-31, která působí na všech úrovních v procesu tvorby metastáz. MiR-31 reguluje rozdílné cílové mRNA. Další geny, které jsou post-transkripčně tlumeny pomocí miR-31 jsou RDX, ITGA5 a RHOA (Dykxhoorn, 2010).

3.4 Prognostický a prediktivní význam microRNA u pacientů s NSCLC

Jedním ze závažných nádorových onemocnění je karcinom plic, který je nejčastější příčinou úmrtí na onkologické onemocnění. Jeden z faktorů přispívajících rozvoji karcinomu plic je kouření tabákových produktů. Přibližně u 80-90 % kuřáků se později rozvíjí karcinom plic. Riziko nemoci se následně zvyšuje u celoživotních kuřáků, kdy se dané riziko může zvyšovat 20x-30x více ve srovnání s nekuřákem. Polycyklické aromatické uhlovodíky a nitrosaminy obsažené v tabákovém kouři řadíme mezi specifické karcinogeny. Nitrosaminy z toxikologického hlediska představují nejškodlivější částí tabákového kouře. Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou v organismu člověka metabolizovány na reaktivní substance a díky tomu mají prokancerogenní charakter. Pro onemocnění jako je karcinom plic, je příznačné, že přibližně tři čtvrtiny onemocnění je diagnostikováno v pokročilém a často v neoperabilním stádiu. Tento poznatek je negativním faktorem pro dlouhodobé přežívání pacientů s karcinomem plic. Pro léčbu různých typů nádorů

máme řadu postupů od chemoterapie, radioterapie až po cílenou biologickou léčbu. Existují dvě hlavní formy karcinomu plic, malobuněčný karcinom neboli SCLC (small cell lung cancer) a nemalobuněčný karcinom plic NSCLC (non-small cell lung cancer). S malobuněčným karcinomem plic se setkáváme asi u 20 % pacientu s karcinomem plic, ale u nemalobuněčného karcinomu se jedná až o 80 % pacientů s karcinomem plic. Nemalobuněčný karcinom je dále pak členěn na podtypy jako jsou adenokarcinomy, dlaždicobuněčný (skvamozní, epidermatoidní) karcinom a velkobuněčný karcinom. Rozdíly mezi malobuněčným a nemalobuněčným karcinomem jsou značné. U malobuněčného karcinomu můžeme pozorovat rychlý růst a vyšší citlivost k radioterapii či chemoterapii, naopak pro nemalobuněčný karcinom, až na jisté výjimky, je typický pomalejší růst a horší odpověď na chemoterapii a radioterapii (Minna a kol., 2002; Skříčková a kol., 2008; Zhu a kol., 2016)

Jako u řady nádorových onemocnění, tak i u karcinomu plic má velký význam identifikace specifických profilů miRNA a následně jejich detekce v časných stádiích onemocnění. Často dochází ke srovnávání krevních sér zdravých jedinců a pacientů s karcinomem plic. Příkladem může být exprese miR-1254 a miR-574-5p, které měly zvýšené hladiny v séru u pacientů s časným stadiem nemalobuněčného karcinomu plic (Foss a kol., 2011). Další studie poukazuje na skupinu různých sérových microRNA, které měly u dlouhodobě přežívajících pacientů pozměněnou expresi. Experimenty ukázaly, že microRNA v plazmě nejsou vázány na žádné buňky a nejsou ani spojeny se zbytky buněčných struktur (Mitchell a kol., 2008). MicroRNA se v plazmě vyskytují jako volné molekuly. Podstatné je, že profily exprese cirkulujících miRNA souvisí s různými patologickými, jako jsou nejen nádorová onemocnění. Významná práce Mitchella a kolektivu (2008) přispěla k rozvoji potenciálního využití cirkulujících miRNA jako nádorových biomarkerů v krevním séru. Byla zkoumána stabilita microRNA v krevní plazmě. MicroRNA, které jsou přítomny v krevní plazmě v určité podobě, jsou zde chráněny před účinkem endogenních ribonukleaz, následně nepodléhají biodegradaci při opakovaném zmrazení a rozmrazení, jsou tedy stabilní i za laboratorní teploty po dobu 24 hodin. Srovnání hladin microRNA mezi krevní plazmou a sérem bylo také studováno, protože složení krevní plazmy a krevního séra se liší. Bylo zjištěno, že výsledky hladin miRNA získaných z krevní plazmy a krevního séra vzájemně korelují (Mitchell a kol., 2008). Studie Zhu a kolektivu (2016) se zabývala cirkulujícími microRNA v krevním séru pacientů s NSCLC, jejich výsledky poukázaly na zvýšenou hladinu miR-182, miR-183, miR-210 a na sníženou hladinu miR-126 ve srovnání se zdravou kontrolou (Zhu a kol., 2016).

Bylo studováno pět microRNA miR-155, miR-17-3p, let-7a-2, miR-145 a miR-21, jenž byly použity pro další analýzu přežití pacientů s karcinomem plic. Důvod použití daných miRNA byla odlišná exprese v nádorové plicní tkáni oproti nenádorové plicní tkáni. Pro každou z těchto pěti miRNA byl vypočten poměr exprese karcinomu plic s odpovídající expresí zdravé plicní tkáně a následně byly klasifikovány v závislosti na poměru exprese. Byla použita analýza přežití Kaplan-Meier. Výsledky ukázaly, že pacienti s adenokarcinomem s vysokou expresí miR-155 nebo s nízkou expresí let-7a-2 měli horší přežití ve srovnání s pacienty s nízkými hodnotami exprese miR-155 a vysokými hodnotami let-7a-2. Byla provedena RT-PCR, pro potvrzení prognostického významu miR-155 a let-7a-2u pacientů s adenokarcinomem (Yanaihara a kol., 2006). V dané studii bylo zjištěno, že molekulární profil miRNA v plicním adenokarcinomu koreluje s přežitím pacientů. Výsledky dané studie měly poukázat na to, že expresní profily jednotlivých miRNA mohou být pro nás prognostickým diagnostickým vodítkem u léčby karcinomu plic (Yanaihara a kol., 2006).

Ve studii Davidsona a kol. (2010) byla pozorována snížená exprese miR-218 u obou podtypů NSCLC, a to v spinocelulárním karcinomu a adenokarcinomu (Davidson a kol., 2010). Exprese miR-218 byla výrazně snížena u pacientů kouřících tabákové produkty. Dané zjištění nám poskytuje podporu tvrzení, že miR-218 by mohla být zapojena do karcinogeneze způsobené tabákem. Výsledky ukazují, že kouření tabákových produktů má vliv na genovou expresi bronchiálního epitelu v dýchacích cestách. Ve studii bylo zjištěno, že miRNA je zapojena do regulace genové exprese v reakci na cigaretový kouř v dýchacích cestách. Při expozici bronchiální epitelální buňky cigaretovému extraktu došlo ke snížení hladiny miR-218 (Schembri a kol., 2009; Davidson a kol., 2010).

Raponi a kolektiv (2009) se snažili identifikovat expresní profily miRNA u spinocelulárního karcinomu plic. Podle studie byly členové klastru miR-17-92 vysoce exprimovány v plicním spinocelulárním karcinomu. Zvýšená exprese v nádorové tkáni byla pozorována i u miR-106a-363, miR-93-106b a miR-182-183 (Raponi a kol., 2009).

Studie Yu a kol. (2010) se zabývala časným odhalením adenokarcinomu a dlaždicobuněčného karcinomu. U pacientů využila panelu miRNA, jenž by měly být přítomné ve sputu pacienta. Podle výsledků byly nalezeny miR-21, miR-182, miR-200b a miR-375 se zvýšenou hladinou a snížená hladina byla pozorována u miR-486, miR-126 a miR-145 u adenokarcinomu ve srovnání se zdravou tkání. Pro odlišení adenokarcinomu od zdravé nenádorové tkáně byly ze sputa

vybrány miR-21, miR-486, miR-375 a miR-200bs 80,6 % senzitivitou a 91,7 % specifitou (Yu a kol., 2010).

Ve studii Xinga a kol. (2010) se snažili o identifikaci miRNA, jenž by mohly mít význam jako biomarkery pro studium raného stádia spinocelulárního karcinomu plic. Mezi microRNA, jenž měly zvýšenou expresi u dlaždicobuněčného karcinomu oproti nenádorové kontrole, patřily miR-205, miR-210 a miR-708. Tyto tři miRNA byly analyzovány ve sputu. V dané studii vykazovaly miR-205, miR-210 a miR-708 nejlepší predikci pro rozlišení pacientů s dlaždicobuněčným karcinomem od zdravých jedinců s 96% specifitou a 73% senzitivitou. Snížené množství bylo pozorováno u dlaždicobuněčného karcinomu u miR-126, miR-139 a miR-429 ve srovnání se zdravou kontrolou (Xing a kol.,2010).

Tab. 1: Deregulované microRNA v plicní tkáni v nejméně dvou nezávislých studiích. Převzato ze Slabý a kolektiv, 2012.

	Yanaihara	Yu	Yanaihara	Raponi	Xing
miR-21	↑	↑	↑		
miR-155	↑		↑		
miR-182		↑		↑	
miR-191	↑		↑		
miR-203			↑	↑	
miR-205			↑		↑
miR-210	↑		↑	↑	↑
miR-126	↓	↓			↓
miR-224	↓		↓	↑	
miR-145	↓	↓			

Zvýšená hladina v nádorové tkáni ↑

Snížená hladina v nádorové tkáni ↓

3.4.1 MicroRNA-21

MiR-21 byla jednou z prvních microRNA, která byla objevena v lidském genomu (Cai a kol., 2004). Současné studie poukazují, že miR-21 se chová jako onkogenu, protože potlačuje funkci několika tumor supresorových genů, a následně podporuje růst a invazi nádorových buněk a další šíření metastáz (Qian a kol., 2009). Je vhodným kandidátem pro studie a zkoumání. Vyskytuje se v širokém množství solidních nádorů. Ve většině typů nádorů byla miR-21 vysoce exprimována (Selcuklu a kol., 2009). Studie na buňkách glioblastomů poukázala, že při zvýšené expresi se miR-21 chová jako antiapoptotický faktor. Inhibice miR-21 vedla k aktivaci kaspáz, což následně přispělo k apoptotické smrti buněk v různých buněčných liniích glioblastomu (Chan a kol., 2005).

PTEN a RECK patří mezi významné regulátory mnohostupňového vzniku plicního karcinomu, dále také patří mezi přímé cíle miR-21 (Xu a kol., 2014)

Do jisté míry je do rozvoje rakoviny zapojená signální dráha PTEN/PI3K. Svoji aktivitu PTEN protein ztrácí mutací, delací nebo metylací promotoru. Studie Blanco-Aparicio a kol. (2007) zjistila na myších modelech, že exprese AKT nejen obnovuje onkogenní tumorogenezi, ale zároveň zvyšuje nádorovou agresivitu (Blanco-Aparicio a kol., 2007).

Shen a kol. (2014) zjistili, že zvýšená exprese miR-21 a snížená exprese proteinu Pten v nádorových tkáních u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic negativně koreluje s kratším intervalem bezpříznakového období (DFS). Pomocí qRT-PCR zjistili, že na rozdíl od normální tkáně měla nádorová tkáň vyšší expresi miR-21. Pomocí imunohistochemie a imunoblotingu byl zkoumán vztah mezi expresí miR-21 a Pten. Pten protein patří mezi důležité cíle miR-21. Zjistili, že ve srovnání normální tkáně s nádorovou bylo množství Pten proteinu značně sníženo v nádorové tkáni. Naopak při nízkých hladinách miR-21 tkáních je exprese Pten proteinu zvýšena. Tyto výsledky poukazují na nepřímou úměrnost hladiny exprese miR-21 a úrovně Pten proteinu v tkáních nemalobuněčného plicního karcinomu (Shen a kol., 2014).

Studie Wei a kolektivu (2001) získala výsledky za použití RT-PCR, ve kterých se miR-21 v krevní plazmě jeví jako významný biomarker v předčasné diagnostice NSCLC a také jako prediktivní biomarker senzitivity k chemoterapii cisplatinou. Daná studie byla zaměřená především na měření plazmatické hladiny miR-21, která určovala vztah k časné diagnostice NSCLC (Weia kol., 2001).

3.4.2 MicroRNA-126

MiR-126 byla identifikována jako prognostický faktor u některých typů solidních nádorů. Studie ukázaly, že miR-126 je exprimována v endotelu. Pro prognózu onemocnění u pacientu s NSCLC je dané zjištění velice významné. MiR-126 má značný vliv na angiogenezi. U NSCLC byla prokázána ko-exprese s vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem. Další studie poukázaly na vliv miR-126 při inhibici růstu nádorových buněk. Úroveň exprese miR-126 koreluje se špatným přežitím. Význam a exprese miR-126 se může u různých typů nádorového onemocnění lišit, ale je zřejmé, že kde nalezneme sníženou expresi miR-126, tak zde pravděpodobně působí jako potencionální nádorový supresor (Lønvik a kol., 2014).

Lønvik a kol.(2014) studovali prognostickou hodnotu regulátorů microRNA Diceru a Droshi v nemalobuněčném karcinomu plic. Tím, že se Dicer, Drosha a miRNA podílejí na diferenciaci a růstu buňky, a tak mohou mít vliv na tumorogenezi. Další studie, které se zabývaly Dicerem nebo Droshou potvrdily, že tyto dva regulátory v dráhách miRNA mají pozitivní či negativní účinek v nádorové transformaci. Ve studii bylo zjištěno, že zvýšená exprese Diceru je spojována s lepší prognózou. Pro mnoho typů nádoru je miRNA sníženě exprimována, což poukazuje na tumor supresorové účinky miRNA. Je známo, že VEGF patří mezi důležité faktory angiogeneze. Podle současné studie Kenneth Lønvik a kolektivu (2014), že exprese Drosha a miR-126 naznačovala špatné přežívání pacientů. Bylo zjištěno, že DROSHA nepatří mezi dobré prognostické ukazatele celkového přežití u pacientů, jelikož účinky Drosha mohou být ovlivněny různými miRNA zapojených do nádorové angiogeneze. *In vitro* experimenty prokázaly, že pouze Dicer snižuje angiogenezi. Výsledky studie, za použití imunohistochemie poukazují na různou přítomnost Diceru a Drosha u nádorových buněk. Je také možné, že tyto dva enzymy by mohly být důležité pro rozvoj nemalobuněčného karcinomu plic (Lønvika kol., 2014).

Pomocí bioinformatiky byla identifikována cílová doména miR-126 EGFL7 neboli epidermální růstový faktor. Tento faktor je zapojen do procesů migrace buněk, do řady buněčných reakcí a tvorbě krevních cév. Cílem Suna a kol. (2010) bylo zjistit potencionální vztah mezi proliferací buněk plicního karcinomu a miR-126. Většina studií, zabývajících se miR-126 ve spojitosti s nádorovým onemocněním, potvrdila, že miR-126 hraje klíčovou roli v tvorbě nádorů, ale také v progresi nádoru a metastáz. Studie Zhanga a kol. (2008) poukázala, že MiR-126 se cíleně zaměřuje na IRS-1 (inzulínový receptor-substrát 1) u buněk rakoviny prsu (Suna a kol., 2010).

Jak již bylo zmíněno na začátku, tak EGFL7 je epidermálním růstovým faktorem. V řadě vědeckých výzkumů byl EGFL7 identifikován jako údajný sekreční faktor, který je produkován buňkami cévního endotelu. Jelikož je produkován buňkami cévního endotelu je vysoce exprimován v endoteliálních buňkách a vaskulárních tkáních a také hraje jistou roli v regulaci vaskulární tumorogeneze. Byla použita reportérová konstrukce, která nám ukázala, že 3'-UTR EGFL7 měl přímé vazebné místo pro miR-126, proto se tým vědců spolu se Suna (2010) domnívá, že inhibice proliferace buněk u nemalobuněčného karcinomu plic miR-126, by mohla být zprostředkována pomocí exprese EGFL7. Výsledky studie Suna a kolektiv (2010) zjistily pomocí průtokové cytometrie kvantitativní RT-PCR a Western blottingu zvýšenou produkci EGFL7 při nadměrné expresi miR-126 v lidských buňkách nemalobuněčného karcinomu plic (Suna a kol., 2010; Zhang a kol., 2008).

3.4.3 MicroRNA-155

Bylo zjištěno, že různé druhy rakoviny, kardiovaskulárních chorob či virových onemocnění je spojeno s deregulací miR-155. MiR-155 je zapojena i v procesech zánětu. Má klíčovou roli v modulaci buněčné a humorální imunitní odpovědi. MiR-155 je více exprimována v aktivovaných B a T buňkách, makrofázích a dendritických buňkách. O'Connell a kolektiv (2007) studovali pomocí mikročipové technologie identifikaci microRNA, které byly indukovány v primárních myších makrofázích po vystavení cytokinu INF-beta v případě miR-155 došlo k navýšení exprese. MiR-155 má význam i u neoplastických chorob, bylo zjištěno, že je jednou z významných miRNA postalčující apoptózu u lidských T buněk leukémie Jurkat a v MDA-MB-453 buněk rakoviny prsu (O'Connell a kol., 2007)

Mezi přímé cíle miR-155 patří několik transkripčních genů kódujících transkripční regulační proteiny, proteinové receptory, kinázy, jaderné a vazebné DNA proteiny (Faraoni a kol., 2009).

Je známo, že miR-155 má funkci onkogenu. Toto zjištění by mohlo identifikovat spojení mezi zánětem a rakovinou (O'Connell a kol., 2007). Změna v expresi miR-155 jsou velice zásadní. Daná miR je zapojena v různých biologických, fyziologických ale i patofyziologických procesech, jako je krvetvorba, ale i zánětech či v imunitě (Faraoni a kol., 2009). Dosavadní studie exprese miR-155 jsou odlišné. Některé studie prokázaly, že zvýšená exprese miR-155 souvisí se špatným přežíváním u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. Na druhou stranu jiné studie nepotvrdily nějak

zásadní význam pozmeněné či zvýšené exprese miR-155 s přežíváním u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic.

3.4.4 MicroRNA-182

MiR-182 patří mezi další miRNA, jenž má u nemalobuněčného karcinomu plic pozmeněné hladiny exprese. U nádorových buněk funguje miR-182 jako onkogenní miR, což vede k zvýšené proliferaci těchto buněk. MiR-182 je také zapojená do procesu lékové rezistence, proto jsou zde jisté domněnky, že právě pozmeněná exprese dané miRNA, a to především zvýšená exprese by mohla souviset s odolností NSCLC na chemoterapii, i přestože přesný molekulární mechanismus zapojení dané miRNA do rezistence nám zatím není znám (Ning a kol., 2014)

Na ovlivnění transkripce i translace řady genů a následně modulaci řady signálních drah se podílí nádorový supresor PDCD4, který je důležitý pro programovanou buněčnou smrt. Zatím nejsou příliš prozkoumány cesty regulace toho supresoru, ale byly identifikovány některé miRNA jako miR-21, které se přímo zaměřuje na PDCD4. Exprese PDCD4 může být negativně regulována právě miR-21 u nádoru prsu prostaty a vaječníků (Ning a kol., 2014). V další studii bylo prokázáno, že PDCD4 je přímým cílem miR-182. Bylo zjištěno, že miR-182 má zvýšenou expresi, zatímco nádorový supresor PDCD4 je sníženež exprimován v nádorových buněčných liniích karcinomu plic. Výsledky studie ukázaly, že v buňkách adenokarcinomu plic je miR-182 onkogenní miRNA a hraje roli jako negativní regulátor PDCD4 (Wang a kol., 2014).

Souvislost mezi daným nádorovým supresorem PDCD4 a miR-182 je taková, že daná miR nejspíše může hrát roli v chemorezistenci A549 buňkách a to tak, že sníženež exprimuje PDCD4. Při srovnání hladin miR-182 v buněčné linii lidského karcinomu plic A549 a buněčné linie NHBE, kdy tato linie představovala normální buňky epitelu lidských bronchů, byla ve výsledku zjištěna zvýšená hladina miR-182 v buněčné linii A549 ve srovnání s buněčnou linií NHBE. Tyto výsledky mohou být využity připotencionální léčbě nemalobuněčného karcinomu plic (Ning et al., 2014). Další studie poukazuje na miR-182, kdy byla její exprese zvýšené exprimována v adenokarcinomu, tak i v dlaždicobuněčném karcinomu (Guana kol., 2012).

3.4.5 MicroRNA-203

Protein kináza C (PKC) je serin/threonin kináza, která je zapojena do procesů jako je přenos signálů, především těch, které se podílí na proliferaci, diferenciaci a apoptóze. Rodina Protein kináz C zahrnuje několik isoform. Jednou z těchto isoform je protein PKC α , jehož hladiny jsou významně zvýšeny u buněčných linií NSCLC-H1355, A549, H1703, H157 a H1155 ve srovnání s buňkami epitelu plicNHBE. Naopak hladiny exprese miR-203 byly významně sníženy v tkáni karcinomu plic v porovnání s normální tkání plic. MiR-203 má vliv na regulaci buněčné proliferace, apoptózy a migraci buněk plicního karcinomu. Výsledky dané studie ukazují, že miR-203 reguluje expresi PKC α , jak na úrovni transkriptu, tak i na úrovni proteinu. Na základě výsledků Wang a kolektivu (2013) byl PKC α identifikován jako jeden z cílů miR-203. Podle výsledků dané studie, lze říci, že navýšením exprese miR-203, by vedlo k umlčení PKC α , což by mohlo být využito v terapii karcinomu plic (Wang a kol., 2013).

Jako jeden z cílů miR-203 byl identifikován gen LASP-1. Bylo zjištěno, že LASP-1 bývá nadměrně exprimován v primárních tkáních NSCLC a buněčných liniích. Daná exprese úzce korelovala s velikostí nádoru a také zvýšená exprese u karcinomu prsu, vaječníků, žaludku, hepatocelulárního karcinomu. Pozměněná exprese korelovala s horší prognózou pacienta. LASP-1 se nejspíše podílí na podpoření nádorového bujení, migrace a invaze buněk NSCLC. Migrace a invaze jsou významné pro progresi a rozvoj metastáz u karcinomů. Výsledky dané studie ukazují, že zvýšená exprese LASP-1 u NSCLC má klíčovou roli v procesu proliferace karcinomu, a také migrace a invaze *in vitro*. Závěr studie naznačuje, že LASP-1 a exprese miR-203 by mohly být použity jako prognostické ukazatele u NSCLC a také jako slibné molekulární cíle pro vývoj léčby NSCLC (Zhenga a kol., 2016).

Mezi inhibitory apoptózy patří survivin. Jedná se o inhibitor, který je nadměrně exprimován v nádorech ve srovnání s normální tkání. Proto i zvýšená hladina survivinu je spojena s horší prognózou, recidivou a lékovou rezistencí u NSCLC a u některých dalších karcinomů. Stále není příliš jasný mechanismus zvýšené hladiny survivinu v NSCLC, ale jsou zde jisté předpoklady, že snížení hladiny survivinu by mohlo vést ke zvýšení chemoterapeutického účinku při léčbě NSCLC. Výsledky studie zjistily, že miR-203 bývá často snížena z důvodu methylace promotoru v NSCLC, což nepřímo koreluje s expresí survivinu a DNMT1. Tyto výsledky podporují myšlenku důležitosti specifických miRNA v regulaci exprese survivinu. Jako následný nový terapeutický cíl lze

považovat schopnost indukovat expresi miR-203 a tím efektivně snížit expresi survivinu. V dané studii bylo zjištěno, že zvýšení DNMT1 negativně koreluje s expresí miR-203. Stále je ale zatím nejasné, jak dysregulovaný DNMT1 konkrétně umlčuje miR-203 u NSCLC. K vývoji nových přístupů pro zvýšení epigenetické chemoterapeutické účinnosti vůči NSCLC by mohla přispět signální osa DNMT1-miR-203-survivin (Wang a kol., 2016).

3.4.6 MicroRNA-205

MiR-205 se nalézá v oblasti 1q32.2. Jedná se o microRNA, jejíž zvýšené hladiny byly pozorovány u karcinomu hlavy a krku, ale taky v karcinomu plic, prostaty či u slinivky břišní. Ve studii Markoua a kolektivu (2008) byla hodnocena exprese miR-205 u pacientů s NSCLC pomocí metody RT-PCR. Prognostický význam dané microRNA byl studován na 48 párových vzorcích s NSCLC, které byly odebrány při chirurgickém zákroku pacientů bez chemoterapie. V dané studii byla souběžně zkoumána i miR-21. Byla zjištěna zvýšené exprese miR-21 v 52 % tedy u 25 párových vzorků a zvýšená exprese miR-205 v 64,6 % u 31 párových vzorků. Jednotlivé hladiny microRNA byly porovnány v tkáních NSCLC oproti tkáním, které odpovídaly nenádorové tkáni s expresí U6 (Markou a kol., 2008).

3.4.7 MicroRNA-210

MiR-210 je dalším členem rodiny microRNA, která byla zkoumána v souvislosti s NSCLC. Ve studii Li a kolektivu (2013) byly zkoumány sérové hladiny miR-210 u pacientů s NSCLC, jenž byli léčeni na bázi cisplatin. Mechanismus zvýšení hladiny miR-210 není ještě zcela objasněn. Některé údaje z předešlých studií poukazují na souvislost se signální dráhou hypoxie indukovaným faktorem. Dosavadní výzkumy u karcinomu prsu ukázaly, že hladiny miR-210 jsou regulovány HIF-1a (Camps a kol., 2008). Sérové hladiny miR-210 byly u pacientů s NSCLC zvýšené ve srovnání se sérovými hladinami miR-210 u zdravých jedinců. Dle výsledků dané studie bylo zjištěno, že sérová hladina miR-210 byla zvýšená především u NSCLC ve III. a IV. stádiu onemocnění ve srovnání s I. a II. stádiem NSCLC (Li a kol., 2013).

Osugia kolektiv (2015) se ve své studii zabývali prognostickým významem exprese miR-210, která může být indukována hypoxií u pacientů NSCLC. Buněčná reakce na hypoxii je pravděpodobně zprostředkována prostřednictvím změn v cílené expresi genu. Na hypoxii je buněčná odpověď zprostředkována pomocí hypoxii vyvolávajícího faktoru-1 neboli HIF-1. HIF-1 se skládá z podjednotek alfa a beta. HIF-1 alfa je u nádorových buněk vysoce exprimován, v důsledku toho hypoxie intratumorální a genetické změny ovlivňují rozhodující onkogeny a tumor supresorové geny. Nadměrná exprese HIF-1 alfa bývá často spojována s horším přežitím pacientů. Proto jsou jisté snahy o vyvinutí inhibitorů HIF-1 alfa jako nové terapeutické látky pro pacienty s různými typy karcinomů. Daná studie ukázala ve svých výsledcích, že miR-210 souvisí se špatnou prognózou pacientů adenokarcinomem plic. MiR-210 by mohla být využita jako neinvazivní biomarker pro diagnózu a prognózu různých typů karcinomu (Osugi a kol., 2015).

3.4.8 MicroRNA-224

Daná studie se zabývala miR-224, zda má podíl na vzniku a rozvoji NSCLC. U některých malignit byla miR-224 objevena s pozměněnou expresí. Nízká exprese miR-224 byla zjištěna u karcinomu dutiny ústní a karcinomu vaječníků. Ke studiu byly využity primární nádorové vzorky a buněčné linie nemalobuněčného karcinomu, které byly kvantitativně hodnoceny pomocí RT-PCR. Pomocí dalších testů byl zkoumán vliv miR-224 na proliferaci, invazi a schopnosti migrace buněk NSCLC. Získané výsledky poskytly informaci o miR-224, která se vyskytovala ve snížené hladině ve čtyřech buněčných liniích nemalobuněčného karcinomu plic-A549, H460, 95Da H358 v porovnání s normální bronchiální buněčnou linií epitelu 16HBE. Buněčná linie A549 vykazovala nejnižší hladiny miR-224 ze všech uvedených linií, proto byla použita pro další studiu. Při *in vitro* pokusech bylo zjištěno, že při obnově exprese miR-224 v nádorové buněčné linii nemalobuněčného karcinomu plic A549, vykazovala daná microRNA protinádorové účinky. Výsledky *in vitro* testů ukázaly, že miR-224 měla přímý vliv na nádorovou buněčnou linii A549a to především tak, že ovlivnila migraci a invazi buněk. Výsledky byly detekovány pomocí qRT-PCR a normalizovány prostřednictvím U6. Studie Zhua a kolektiv (2014) ukazuje jako jediná z níže uvedených studií na sníženou expresy miR-224 (Zhu a kol., 2014).

Další studie ve svých výsledcích poukazuje na to, že MiR-224 je významně zvýšeně regulována v nemalobuněčném karcinomu plic, a funguje tedy jako onkogenní miR. Daná miRNA

podporuje buněčnou migraci, proliferační kapacitu, invazi a růst tumoru, dané fakty byly zjištěny *in vitro* *in vivo*. V dané studii byly identifikovány přímé cíle miR-224. Těmi cíli jsou TNF α indukovaný protein 1 a SMAD4. Aberentní exprese miR-224 je nejspíše řízena hypometylací její promotorové oblasti a aktivací ERK signální dráhy v nemalobuněčném karcinomu plic (Cui a kol., 2015).

Podle studie exprese miR-224 negativně korelovala s expresí CASP7 a CASP3 ve vzorcích pacientů s NSCLC. CASP7 a CASP3 jsou efektorové kaspázy, jež jsou aktivovány iniciačními kaspázami, což vede k následnému provedení apoptózy a štěpení substrátu. Obě kaspázy spolu souvisí. Snížená exprese CASP3 byla zjištěna u NSCLC, kdy se jednalo o zapojení dané regulace u lymfatických uzlin, souvislost i s horší prognózou a chemorezistencí u NSCLC. Ve studii Okouoyo a kolektivu (2004) bylo zjištěno, že změny v apoptotické signalizaci by mohly přispívat k rezistenci. Studie Okouoyo a kolektivu (2004) využívala rezistentní a citlivé modely NSCLC *in vitro* a *in vivo*. Aberentní mutace CASP7 by mohla být kritickým faktorem pro v reakci na chemoterapii vůči plicnímu a prsnímu karcinomu.

Mir-224 se podílí na rozvoji a patogenezi NSCLC právě zaměřením na CASP7 a CASP3. Studie Cui a kolektivu (2015) zjistila, že u nemalobuněčného karcinomu plic se aktivace NF- κ B signalizace podílí na regulaci miR-224 a také studie poukazuje na jakousi osu dysregulace NF- κ B/miR-224/CASP3,7, jež může hrát významnou roli v rozvoji a progresi plicního karcinomu (Cui a kol., 2015; Okouoyo a kol., 2004, Lin a kol., 2013, Li a kol., 2016).

3.4.9 Let-7

Let-7 a lin-4 řídí regulaci genové exprese v průběhu vývoje *Caenorhabditis elegans*. Působí jako represory svých cílových genů. Let-7 je časově exprimována, a její mutace vedou k předčasné terminální diferenciaci buněk švu (Lau a kol., 2001). Let-7 je slabě exprimována u karcinomu plic, což nám naznačuje, že by mohla být potenciálním nádorovým supresorem (Calin a kol., 2004; Takamizawa a kol., 2004).

Ve spojení s NSCLC je rodina let-7 jednou z nejvíce prozkoumaných miRNA. Ve studii Takamizawa a kol. (2004) byla studována snížená exprese Let-7 v lidském karcinomu plic. Následně bylo zjištěno *in vitro*, že zvýšená exprese let-7 v buněčné linii A549 adenokarcinomu inhibuje růst buněk. Jedná se o jednu z prvních studií, která se zabývala sníženou expresí let-7 a důsledky toho

snížení. Ve studii zahrnovala tkáňové vzorky adenokarcinomů, dlaždicových karcinomů, velkých karcinomů a adenoskvamózní karcinomů. Byla pozorována snížená exprese *let-7in vivo* tak i *in vitro* buňkách lidského karcinomu plic. Snížená hladina *let-7* u karcinomu plic ve spojení s krátkou dobou přežitím vedl k následnému zkoumání biologického významu *let-7* v rozvoji karcinomu plic (Takamizawa a kol., 2004).

Ve studii Johnsona a kol. (2005) bylo zjištěno, že *let-7* má komplementární místa pro geny Ras v oblasti 3'UTRs. Snížená aktivita v *let-7* v HeLa buňkách měla za následek zvýšení hladiny proteinu RAS. *Let-7* se nachází v primárních plicních nádorech buněčných linií rakoviny ve snížené hladině. Nadměrná exprese RAS nejspíše přispívá k rozvoji lidských karcinomů. Tím, že *let-7* má v plicních nádorech snížené hladiny dochází ke ztrátě kontroly nad RAS, což následně vede k nadměrné expresi toho proteinu a přispívá k rozvoji plicního karcinomu. Daná studie ukazuje, že některé genové regiony, které bývají často odstraněny u pacientů s karcinomem plic. Zvýšení exprese *let-7* by mohlo vést k inhibici buněčného růstu karcinomu. Také se nám zde ukazuje jakýsi mechanismus, kdy RAS je onkogenem a často bývá nadměrně exprimován v nádorové plicní tkáni se sníženou hladinou *let-7* (Johnson a kol., 2005).

MHG2 je gen, který bývá spojován s karcinomy. U vývoje plodu se můžeme setkat s vyšší expresí MHG2 proteinů, ale v lidské tkáni dospělého se s expresí setkáváme zřídka, často dokonce exprese chybí. Jeden z členů MYC rodiny MYCN funguje jako pozitivní regulátor LIN28B, který je znám jako represor *let-7* rodiny. Protein LIN28 se váže na pre-*let-7* a následně zabraňuje zpracování *let-7* do zralých microRNA prostřednictvím vazby k Diceru1. Ztráty microRNA *let-7* mohou vést k zvýšené expresi MHG2, která následně může vést k snížené expresi CDKN2 (Eide a kol., 2016). Ve studii Nishino a kolektivu (2008) se píše, že pokud dojde k snížení exprese genů nádorového supresoru CDKN2A, tak je prokázáno, že MHG2 je zapojen do obnovy kmenových buněk (Nishino a kol., 2008). V dané studii byl prozkoumán význam MYCN, HMGA2, CDKN2A a DICER1 u NSCLC. Z výsledků byla prokázána korelace mezi hladinou exprese mRNA MYCN a HMGA2 a Dicerem 1 a společná exprese HMGA2 a MYCN, měly významný dopad na přežití. I přesto je potřeba ještě dané zjištění potvrdit na větší části podskupin buněk u NSCLC (Eide a kol., 2016)

Ve studii Huanga a kolektivu (2016) byla použita syntetická microRNA *let-7b*, kdy reaktivovala TAM / TIDCs působící jako agonista TLR-7 a potlačující produkci IL-10 *in vitro*. U nádorových onemocnění bývá terapeutická účinnost snížena imunosupresivním prostředím nádoru. Nalezme zde infiltrující imunitní buňky, s nádorem spojené makrofágy (TAM) či dendritické

infiltrující buňky (TIDCs), které hrají významnou roli v imunosupresi u nádoru. Na potlačení aktivace T-buněk a proliferace se podílí TAM s IL-12 a IL-10, a následně podporují angiogenezi vylučováním IL-10, TGF a velkého množství pro-angiogenních faktorů. Pro terapeutické cíle mají makrofágy a dendritické buňky zásadní vliv pro ovlivnění mikroprostředí nádoru. Následně na myších modelech karcinomu prsu bylo zjištěno, že při injekčním vpravení let-7b pomocí vektoru, došlo k přeprogramování funkce makrofágů či infiltrujících dendritických buněk následně a ke změně supresivního mikroprostředí nádoru a k inhibici růstu nádoru (Huang a kol., 2016).

3.4.10 MicroRNA-34a

MiR-34a se nachází v chromozomální oblasti 1p34. MiR-34a je považována za nádorový supresor, neboť cílí na geny, jenž jsou zapojeny do buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy v různých nádorech. Byla zjištěna pozměněná regulace miR-34a u karcinomu prsu, hepatocelulárního karcinomu, karcinomu střeva a plic. Daná microRNA byla v nádorech v nízkých hladinách. Ve studii Honga a kolektivu (2015) byly zjištěny významné korelace mezi miR-34a a cílovými geny c-Met a CDK6 ve vzorcích pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. Podle studie se exprese miR-34a lišila v různých podtypech NSCLC. U pacientů se spinocelulárním karcinomem a invazí do lymfatických uzlin byla zjištěna nižší hladina exprese miR-34a. U adenokarcinomu byla hladina exprese miR-34a výrazně vyšší než u skvamózních buněk nádoru. a II. stádia. Podle výsledků dané studie byla pozorována vyšší exprese CDK6 mRNA u karcinomů s nižší miR-34a. Tedy exprese miR-34a nepřímo koreluje s CDK6 expresí. U exprese c-Met byla zjištěna nepřímá korelace s miR-34a. Podle dané studie lze miR-34a brát jako nezávislý prognostický marker u pacientů s adenokarcinomem plic (Hong a kol., 2015).

MiR-34a může být vnímána jako pro-apoptický transkripční cíl p53, protože bylo zjištěno, že inaktivace miR-34a znemožňuje apoptózu, která by byla závislá na p53. Lze říct, že exprese rodiny miR-34 odráží stav p53. Jako další z cílů miR-34 byl identifikovaný BCL2 (Bommer a kol., 2007; He a kol., 2007; Hermeking, 2007; Tarasov a kol., 2007). MiR-34a je také negativním regulátorem N-MYC protoonkogenu, což bylo zjištěno na základě studií, kdy u buněk neuroblastomu s amplifikovaným MYCN byla detekována ztráta miR-34a, pravděpodobně způsobené delací oblasti 1p36. Pokles spontánní apoptózy vykazovaly kmenové embryonální buňky, které postrádají gen pro miR-34. Na základě zjištěných poznatků a studií o rodině miR-34 lze tuto rodinu miRNA považovat

za nádorové supresory, které jsou zapojeny do regulace apoptózy (Raver-Shapira a kol., 2007; Chang a kol., 2007; Welch a kol., 2007; Wei a kol., 2008).

Hladiny exprese microRNA-34a byly zkoumány u buněčných linií karcinomu plic a to u H1299, A549, SPCA-1 a HCC827. Při srovnání hladin expresí u nádorových buněčných linií se zdravou epiteliální tkání plic BEAS-2B byly zjištěny nízké hladiny exprese miR-34a u buněčných linií NSCLC. Exprese dané microRNA byla zjištěna pomocí qRT-PCR. Nízké hladiny miR-34a byly pozorovány u vyšších stadií NSCLC. Pro objasnění role a funkce miR-34a byla daná miR transfekována do H1299 buněk, a následně byla pozorována inhibice proliferace buněk dané nádorové linie. Hladiny mRNA TGF β R2 negativně korelovaly s hladinou exprese miR-34a v tkáni NSCLC. V dané studii výsledky ukázaly, že mezi přímé cílové geny miR-34a patří TGF β R2, který byl regulován u H1299 buněk NSCLC. Závěr dané studie poukazuje, že miR-34a je nádorovým supresorem, který by mohl inhibovat proliferaci a spustit apoptózu s přímým cílením TGF β R2 v H1299 (Ma a kol., 2015).

3.4.11 MicroRNA-145

MicroRNA hrají významnou roli v regulaci invaze a metastázování nádorových buněk. S daným problémem byla studována miR-145, kdy byla pozorována nižší exprese dané miR v NSCLC. *In vitro* buněčné linie karcinomu plic A549 miR-145 potlačovala migraci a invazi buněk. V dané studii se sledovala exprese i miR-10b, jenž vykazovala zvýšenou expresi a u buněčné linie A549 podporovala migraci a invazi buněk *in vitro*. Exprese daných miR byla zkoumána v primární nádorové tkáni, které byly spojovány s metastázováním do lymfatických uzlin. Výsledky dané studie ukazují, že podíl miR-10b a miR-145 na metastázování u NSCLC je značný a proto se tyto microRNA mohou jevit jako onkogeny nebo tumor supresorové geny. (Li a kol., 2016). Funkce miR-145 byla již zkoumána i u jiných typů nádorů, kdy byla zjištěna její snížená exprese a schopnost inhibice růstu nádorových buněk a invaze s cílením na několik genů, jako je například c-myc a mucin. Ve studii Sachdeva a kol. (2009) se zabývali studiem miR-145 jako možným tumor supresorovým genem, který je nejspíše zapojen do fosfoinositid-3 -kináza (PI-3K) / Akt a p53 drah. Výsledky v dané studii ukazují, že miR-145 může hrát roli v posttranskripční regulaci c-Myc přes p53 (Sachdeva a kol, 2009). Podle další studie Sachdeva a Mo (2010) se miR-145 chová jako nádorový supresor a podílí se na inhibici růstu nádoru. MiR-145 byla schopna potlačit metastázování prostřednictvím umlčení genu mucinu

1 (MUC1). Tím, že miR-145 cílí na MUC1 došlo ke snížení b-kateninu a kadherinu 11, jenž následně přispělo k potlačení invaze a metastáz. Ve studii byl jako přímý cíl miR-145 identifikován MUC1, kdy byly využity luciferázové reportéry nesoucí 3´-netraslatované oblasti MUC2 s Western blottingem a imunofluorescencí. Daná studie byla provedena na metastatických buněčných liniích karcinomu prsu MDA-MB-231 a LM2-4142 (Sachdeva a Mo, 2010).

3.5 Nádorová heterogenita

Narušení řady regulačních systémů dává vznik nádorovým buňkám. Jak je již zmíněno výše v patogenezi nádorů, tak nádorové buňky jsou schopny ovlivňovat buněčný cyklus a tím získat neomezený růst, jsou schopny podporovat angiogenezi, vyhnout se apoptóze, ale také migrovat do vzdálených míst v těle (Hanahan a Weinberg, 2000).

Náhodné genetické a epigenetické změny jsou selektovány během šesti až desíti klonálních expanzí. Dochází hromadění genetických a epigenetických změn a ty následně vedou k produkci vysoce maligního fenotypu lidských nádorových buněk (Brock a kol., 2009)

Z důvodu náhodných změn se může u populace buněk, která je geneticky identická, vyskytnout nádorová heterogenita. Jelikož microRNA nejsou zapojeny v nádorové patogenezi pouze jako nádorové supresory či přímo aktivující či inaktivující onkogeny, ale podílí se na regulaci řady buněčných systémů. Je důležité si uvědomit, že pouze negenetická heterogenita nedává vznik buněčnému fenotypu nádorů, ale také se na něm podílí genetické mutace. Genetické a negenetické variace nemusí být nutně na sobě závislé (Voorhoeve, 2010; Brock a kol., 2009)

Jedním z problémů pro úspěšnou prognózu a léčbu nádorových onemocnění je intratumorální heterogenita. U různých pacientů s nádory stejného původu, se můžeme setkat s intratumorální heterogenitou. Intratumorální heterogenita se může projevat jako variability v genetickém i epigenetickém stavu, morfologie nádoru, ale také v genu a exprese proteinu. Je pravděpodobné, že nádorová heterogenita uděluje nádorům jakési výhody. Výhodami jsou například přizpůsobení se změnám podmínek mikroprostředí nebo změna maligního potenciálu. Nádorová heterogenita byla objevena u řady karcinomu (Gerashchenko a kol., 2013). Snížená účinnost cílené terapie byla zaznamenána u nemalobuněčného karcinomu plic ve spojení s nádorovou heterogenitou. U daného onemocnění byla nádorová heterogenita spojena s mutantním stavem,

amplifikací nebo pozměněnou expresi EGFR, kdy došlo k následnému snížení účinku cílené léčby NSCLC. Podle výsledků dané studie byla u pacientů s mnohočetnými plicními uzly pozorována vyšší nádorová heterogenita v EGFR mutaci. Daný výsledek byl vysvětlen přítomností více než jednoho primárního nádoru. Ve shrnutí studie je zmíněno, že u asijských pacientů s adenokarcinomem se můžeme setkat s heterogenitou v podobě EGFR mutace, ale v menší míře oproti pacientům s mnohočetnými plicními uzly, u kterých se vyskytovala výrazně vyšší míra heterogenity (Chen a kol., 2012).

Ve studii Raychaudhuri a kol. (2014) byla zkoumána intratumorální heterogenita hladin exprese miRNA v primární nádorové tkáni prsu a mezi axilárními lymfatickými uzlinami zahrnující vždy jednoho pacienta. Vzorky pro analýzu byly odebrány od 16 pacientů z různých míst tumoru. Cílem studie bylo porovnat a posoudit míru heterogenity expresí miRNA u vzorků prsního karcinomu. Byly studovány hladiny exprese miR-210, miR-10b, miR-31 a miR-335. První dvě miRNA byly vybrány z důvodu pro-metastatického potenciálu, naopak miR-31 a miR-335 z důvodu anti-metastatického potenciálu u prsního karcinomu. Z výsledků byla zjištěna značná intratumorální heterogenita miRNA exprese s průměrnou CV 40% (30% až 51%) v rámci primárních karcinomů prsu av různých metastázích lymfatických uzlin 40% (26% až 55%) od stejného pacienta. Dané výsledky byly v souladu pro dané miRNA, které byly studovány (CV, 51% pro miR-31, 44% pro miR-335, 30% pro miR-10ba 33% pro miR-210). Bylo zajímavé, že v rámci definovaných zón karcinomu prsu byl rozsah nádorové heterogenity podobný. Změny ve složení buněčné nádorové tkáně by mohly být jedním z vysvětlení rozdílné exprese miRNA u intratumorální heterogenity. Tyto rozdíly byly zjištěny pomocí *in situ* hybridizace. Závěr studie poukazuje, že pro stanovení profilu exprese miRNA u intratumorální heterogenity, by vzorky měly být odebrány z různých primárního nádoru nebo odebrání vzorků z několika nádorů, které jsou následně zapojeny do lymfatických uzlin pro následné odvození expresního profilu miRNA z metastáz (Raychaudhuri a kol., 2014).

3.6 Léková rezistence

Jedním z problémů protinádorové léčby je, že nádorové buňky mají schopnost být po určité době působení rezistentní vůči cytotoxickým látkám. Daný mechanismus pak vede k selhávání léčby. Máme dva typy rezistencí, primární a sekundární. Primární typ rezistence se vyskytuje u maligních buněk, které se stávají rezistentní vůči chemoterapii při primární léčbě. Sekundární rezistence vzniká

až v průběhu cytostatické léčby. U sekundární rezistence jsou nádorové buňky citlivé vůči chemoterapii, ale postupně se stávají rezistentní a účinnost chemoterapie klesá. U nádorových buněk může nastat stav, kdy buňka ztratí svoji citlivost k jedné cytotoxické látce a zároveň vzniká rezistence vůči strukturálně podobnému cytostatiku, v daném případě se jedná o zkříženou rezistenci. Velkým problémem je mnohočetná léková rezistence, která byla popsána u některých případech jako uvedená zkřížená rezistence mezi protinádorovými léčivy s tím rozdílem, že se léčiva již odlišovala mechanismem účinku a strukturálně. Mezi mechanismy dávající vznik rezistenci nádorové buňce vůči protinádorové léčbě jsou změny farmakokinetiky, změny cytotkinetiky a změny ve struktuře a funkci buňky (Nosková a kol., 2000a).

Dlouhodobě používanou látkou k léčbě NSCLC bývá Paclitaxel, který se využívá jako samotné činidlo nebo v kombinaci s dalšími léčivy vykazuje významnou aktivitu vůči nemalobuněčnému karcinomu plic. Problémem je, že se zvyšuje odolnost vůči Paclitaxelu a daný krok vede k selhávání léčby u NSCLC. V dané studii bylo zjištěno, že umlčením miR-203 dochází k zvýšené expresi survivinu, který patří mezi inhibitory apoptózy a je u řady karcinomu nadměrně exprimován. Survivin hraje klíčovou roli v citlivosti buněk NSCLC na Paclitaxelu. Entinostat vykazuje také silnou protinádorovou aktivitu, poukazují to studie zabývající se karcinomem prsu. Výsledky studie Wang a kolektivu (2016) poukázaly, že přidáním Entinostatu k režimu na bázi Paclitaxelu vede u některých pacientů NSCLC se zvýšeným DNMT1 nebo Survivinem mohou vykazovat významně zlepšení v léčbě. (Wang a kol., 2010; Wang a kol., 2016).

Gemcitabin je dalším léčivem, které se využívá při standardní léčbě nemalobuněčného karcinomu. Dané léčivo je analogem deoxycytidinu, zasahuje do syntézy DNA a je silným inhibitorem syntézy DNA. Jedná se o proléčivo, protože pro svoji farmakologickou aktivitu potřebuje postupně fosforylované kinázy. (Alvarellos a kol., 2014). U pacientů s NSCLC se může lišit odezva k léčbě Gemcitbinem. Daný fakt může být dán různými variacemi genu genetickými polymorfismy, které jsou zapojeny do dráhy Gemcitbinem (Li a kol., 2012). Na replikaci DNA se podílí DNA polymeráza. DNA polymeráza alfa a její podjednotka B, podílející se na iniciaci replikace chromozomální DNA je kódována genem POLO2. Některé studie poukázaly na to, že různé varianty genu POLO2 mohou zlepšovat prognózu u pacientů s NSCLC. POLA2 mohou být považovány za nový gen, jenž by mohl způsobovat rezistenci vůči gemcitabinu. Jelikož se jedná o gen, který je zapojen do syntézy DNA, tak snížení jeho exprese by mohlo vést ke zvýšené regulaci genů, které jsou důležité při syntéze a opravě

DNA. Důležité jsou další studie těchto genů a je nutné studovat jejich polymorfismy, zda jsou přítomny interakce mezi nimi (Li a kol., 2012; Wiela kol., 2005; Koh a kol., 2016).

4 Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Použité chemikálie

- Amid kyseliny mravenčí (CH_3NO) - Sigma Aldrich, USA
- DNAsa - Recover All™ Total nucleic acid isolation kit (AM 1975), ThermoFisher, USA
- 99,5 % Ethanol – Fagron, Česká Republika
- Eukitt – SigmaAldrich, USA
- Hsa-miR-21 sonda – Exiqon, USA
- Hsa-miR-34a sonda – Exiqon, USA
- Nuclear Fast Red™- SigmaAldrich, USA,
- Paraformaldehyd - Sigma Aldrich, USA
- Proteinasa – Recover All™Totalnucleic acid isolationkit (AM 1975), ThermoFisher, USA
- ProteinázaK - ThermoFisher, USA
- RNaseZAP™ - Sigma Aldrich, USA
- ScrambledmicroRNA sonda – Exiqon, USA
- Tween-20, Sigma Aldrich, USA
- U6 snRNA kontrolní sonda -Exiqon, USA
- Wash 2 /3 - Sigma Aldrich, USA
- Wash 1 - Sigma Aldrich, USA
- Xylen – MicroChem, USA

4.1.2 Použité roztoky

- BCIP - InHyb In situHybridization (ISH) Kit, BioChain, USA
- Blokovací roztok (Blokingsolutin) - InHyb In situHybridization (ISH) Kit, BioChain, USA
- DEPC vody (diethylpyrokarbonát) - ThermoFisher, USA

- DNAsapufn- Recover All™ Total nucleic acid isolation kit (AM 1975), ThermoFisher, USA
- Eluční roztok (ElutionSolution) - Recover All™ Total nucleic acid isolation kit (AM 1975), ThermoFisher, USA ThermoFisher, USA
- Hybridizačníroztok - InHyb In situHybridization (ISH) Kit, BioChain, USA
- Izolační aditivum(Isolationadditive) - Recover All™ Total nucleic acid isolation kit (AM 1975), ThermoFisher, USA
- NTB - InHyb In situHybridization (ISH) Kit, BioChain, USA
- PBS - 0,14M NaCl; 3μM KCl; 9μM Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 1μM KH₂PO₄; pH=7,4
- Prehybridizačníroztok - InHyb In situHybridization (ISH) Kit, BioChain, USA
- Proteinasa K pufr - ThermoFisher, USA
- 10x pufr alkalická fosfatáza - InHyb In situHybridization (ISH) Kit, BioChain, USA
- 20xSSC pufr - - InHyb In situHybridization (ISH) Kit, BioChain, USA
- Štěpící pufr (Digestion Buffer) - Recover All™ Total nucleic acid isolation kit (AM 1975), ThermoFisher, USA

4.1.3 Biologický materiál

V diplomové práci pro experimentální část byly použity do formalínu fixované a parafínem zalité vzorky nemalobuněčného karcinomu plic. Vzorky pocházely z archívu Ústavu klinické a molekulární patologie, která je součástí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci. Vzorky tkání pocházely z let 1998-2011 od pacientů, kteří byli operováni na Chirurgickém oddělení Fakultní nemocnice v Olomouci. Celkem bylo analyzováno 34 vzorků pocházejících od pacientů s různých typů NSCLC. Vzorky byly odebrány od 17 mužů a 5 žen. U pacientů se vyskytovaly tři histologické subtypy NSCLC – 8 ADC a 11 SCC a 1 LCC. Metastázy do LU se vyskytovaly u 14 pacientů, u 10 pacientů nebyly metastázy v době diagnózy zjištěny. U zbylé části pacientů nebyly kompletní klinické údaje v době studie k dispozici.

4.1.4 Použité přístroje

- Centrifuga 5424 -Eppendorf,Něměcko
- Inkubátor HeraeusB12 - Gemini BV, Nizozemí

- Lázeň vodní třepací WiseBath® WSB – Wisdlaboratoryinstruments, Německo
- Nanodrop ND-1000 - NanoDrop Technologies, Wilmimngton, Delaware, USA)
- Termoblok - Techne, UK
- Třepačka Vortex-gene 2 – ScientificIndustries, USA

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava parafínových bločků

Při operaci byl odebrán materiál od pacientů s NSCLC a byl vložen do formalínu. Následně po zpracování patologem byl vzorek tkáně přesycen alkoholy, xylenem a na závěr parafínem. Připravený materiál byl zalit do parafínových bločků a nechal se ztuhnout. Bločky byly použity pro izolaci RNA, kdy na mikrotomu byly nařezány tenké řezy o tloušťce 10-20 μm . Pro *in situ* hybridizaci byly použity tenké řezy tkání fixované na podložní sklo.

4.2.2 Izolace celkové RNA z parafínových bločků

Na Ústavu klinické a molekulární patologie byly zhotoveny laborantkami tenké řezy o tloušťce 4 mikronů pro jednotlivé vzorky plicní tkáně a následně byla provedena izolace celkové RNA pomocí izolačního kitu RecoverAll™ TotalNucleic acid.

Daný experiment zahrnoval čtyři důležité kroky: deparafinizaci, štěpení proteasou, izolace nukleové kyseliny, štěpení nukleasou a finální purifikaci RNA.

Nakrájený řez tkáně byl vložen do 1,5 ml mikrozkušavky a k němu byl přidán 1 ml 100 % xylenu. Vzorek byl krátce zvortexován a následně zcentrifugován, aby se tkáň dostala do xylénu. V termobloku byl vzorek zahřát při 50 °C na dobu 3 minut, aby došlo k rozpuštění parafínu. Při laboratorní teplotě po dobu 2 minut byl vzorek centrifugován při 20 000 rpm a RT. Po vyjmutí vzorku z centrifugy byl opatrně odstraněn xylén. Ke vzorku byl přidán 1 ml 100% ethanolu o RT. Vzorek byl rychle zvortexován a zcentrifugován na dobu 2 minut při 20 000 rpm při RT. Byl odstraněn ethanol. Znovu byl přidán 100% ethanol v objemu 1 ml ke vzorku. Vzorek byl rychle dán na vortex a poté do centrifugy na 2 minuty při 20 000 rpm při RT. Byl odstraněn ethanol. Vzorek byl ponechán na vzduchu

15-45 minut při RT, kde se nechal vyschnout. Tkáň vzorku se nacházela v deparafinovaném a odvodněném stavu.

Následně bylo přidáno ke vzorku 200 μ l Štěpícího pufru a 4 μ l proteasy. Vzorek byl mírně stočen, aby došlo k úplnému promíchání. Poté byl inkubován v termoblotu 30 min při 50 °C a dalších 15 min při 80 °C.

K naštěpenému vzorku byl přidán Master mix, který obsahoval 260 μ l Izolačního aditiva a 550 μ l 100% ethanolu. Pomocí pipety byl master mix promíchán. Do sběrné zkumavky s filtrem byl přemístěn vzorek v objemu 700 μ l. Poté proběhla centrifugace na dobu 30 s při 10 000 rpm za RT. Objem, který prošel přes kolonku, byl odstraněn. Daný krok byl opět zopakován se zbytkem vzorku. Následně byl na stejnou kolonku napipetováno 700 μ l promývacího pufru Wash1. Zkumavka byla zcentrifugována na dobu 30 s při 10 000 rpm za RT. Objem, který prošel přes kolonku, byl odstraněn. Opět na stejnou kolonku bylo aplikováno 500 μ l promývacího pufru Wash 2 /3, následně proběhla centrifugace na dobu 30 s při 10 000 rpm za RT. Objem, který prošel přes kolonku, byl odstraněn. Kolonka byla znovu zcentrifugována na dobu 30 s při 10 000 rpm za RT. Z kolonky byla odstraněna veškerá tekutina.

Na střed filtru byl napipetován master mix obsahující 50 μ l nuclease-free vody, 6 μ l 10x DNase pufru a 4 μ l DNase. Inkubace zkumavky s master mixem trvalo 30 min při RT.

Na filtr bylo aplikováno 700 μ l promývacího pufru Wash 1, zkumavka se nechala inkubovat 30-60 s při RT. Následně vzorek byl zcentrifugován při na dobu 30 s při 10 000 rpm. Objem, který prošel přes kolonku, byl odstraněn. Na stejnou kolonku bylo nanášeno 500 μ l promývacího pufru Wash 2 /3 na dobu 30 s při 10 000 rpm za RT. Objem, který prošel přes kolonku, byl odstraněn. Pro odstranění zbylé tekutiny byl vzorek zcentrifugován na 1 min při 10 000 rpm. Filtr byl vložen do nové zkumavky. Do středu filtru bylo nanášeno 60 μ l elučního roztoku. Proběhla inkubace na dobu 1 min při RT, následovala centrifugace při 20 000 rpm. Byla odstraněna kolonka a dno zkumavky obsahovalo eluát celkové RNA

K naštěpenému vzorku tkáň byl přidán Master mix obsahující 240 μ l Izolačního aditiva a 550 μ l 100 % ethanolu a pipetováním byl promíchán. Do sběrné zkumavky byla vložena kolonka s filtrem, kde bylo napipetováno 700 μ l vzorku. Následně proběhla centrifugace při 10 000 rpm, RT a po dobu 30 s. Objem, který prošel přes kolonku, byl odstraněn, kolonka byla opět vložena do zkumavky a napipetován zbytek vzorku. Poté opět centrifugace při 10 000 rpm, RT a po dobu 30

s a objem, který prošel přes kolonku, byl odpipetován. Na stejnou kolonku bylo napipetováno 700 μ l promývacího pufru Wash 1 a objem zkumavky byl zcentrifugován 30 s při 10 000 rpm a RT. Objem, který prošel přes kolonku, byl odpipetován. Opět bylo na stejnou kolonku naneseo 500 μ l promývacího pufru Wash 2 /3, centrifugace 30 s při 10 000 rpm a RT a objem, který prošel, byl odstraněn. Poté ještě centrifugace 30 s, aby byla z kolonky odstraněna veškerá tekutina.

Do středu filtru byl napipetován připravený master mix s DNázou obsahující 50 μ lnuclease-free water, 6 μ l 10x DNase pufru a 4 μ l DNase. Zkumavky se nechaly inkubovat 30 min při RT. Poté bylo na filtr naneseo 700 μ l promývacího roztoku Wash 1 a zkumavka se nechala inkubovat 30-60 s při RT a následně se zcentrifugovala 30 s při 10 000 rpm. Objem, který prošel přes kolonku, byl odpipetován. Opět na stejnou kolonku bylo naneseo 500 μ l promývacího pufru Wash 2 /3, centrifugace 30 s při 10 000 rpm a RT a objem, který prošel, byl odstraněn. Poté ještě centrifugace zkumavky s filtrem 1 min při 10 000 rpm, aby byl odstraněn zbytek tekutiny. Filtr byl přenesen do nové zkumavky a na něho bylo naneseo 60 μ l elučního roztoku o RT do středu filtru. Po inkubaci po dobu 1 min při RT proběhla centrifugace při maximálních otáčkách (20 000 rpm). Kolonka byla následně odstraněna a na dně zkumavky byl již eluát celkové RNA.

4.2.3 Stanovení koncentrace RNA

Pomocí Nanodropu ND-100 byla spektrofotometricky měřena koncentrace vyizolované RNA. Pro vlastní měření byl použit 1 μ l eluátu získaný izolaci. Eluční roztok byl použit jako blank. Dle poměru absorbance při vlnových délkách 260/280 a 260/230 byla hodnocena kvalita vyizolované RNA. Ideální rozmezí poměru vlnových délek 260/280 byl měl být 1,8 -2,0. Koncentrace pro jednotlivé RNA vzorku jsou uvedeny v tabulce (Příloha 1).

4.2.4 Příprava vzorku na mikročipovou analýzu

Obecně se mikročipové platformy využívají k nalezení genů, které se odlišně exprimují za různých podmínek a získávají tak pozměněný expresní profil. Přímá hybridizace využívámRNA bez potřeby amplifikace vzorku RNA. Metoda je založená na hybridizaci nukleové kyseliny mezi cílovými molekulami a sondami. U daného experimentu je důležitý výběr sond a příprava vzorku. Princip metody je založený na microRNAoligonukleotidové sondě, která je imobilizovaná na podložní sklíčko

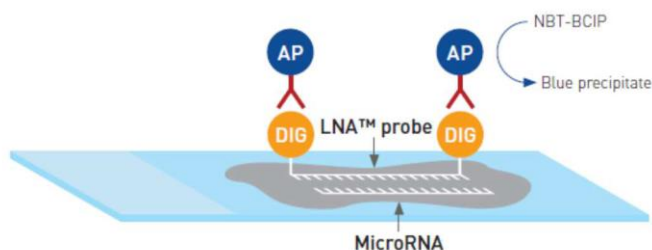
v předem definované pozici. Pro daný experiment byla využita platforma reprezentována firmou Affymetrix. (Slabý a kol., 2012)

Mikročipy byly zhotoveny na Ústavu Molekulární a translační medicíny v Olomouci. Biostatistické zpracování mikročipové analýzy a kontrolu čipů provedla Mgr. Lenka Radová, Ph.D., ze Středoevropského technologického ústavu v Brně.

4.2.5 *In situ* hybridizace

Za standartní laboratorní metody užívané pro detekci miRNA řadíme hybridizace *in situ*, northern blot a různé modifikace qRT-PCR. Krátká délka, vzájemná sekvenční podobnost a tkáňově či vývojově specifická exprese microRNA vede k zhoršení experimentální detekce.

V diplomové práci byla pro vizualizaci genové exprese a její lokalizaci ve specifických vzorcích NCSLC použita *in situ* hybridizace (ISH). ISH patří mezi nejběžnější metody vizualizace genové exprese a její lokalizace. Pomocí ISH jsme schopni studovat prostorovou distribuci kandidátních miRNA na buněčné a subbuněčné úrovni. Tato histologická analýza nám usnadňuje pochopení role miRNA v biologických a molekulárních procesech (Boye ,2012, Jørgensen a kol. ,2010; Slabý a kol., 2012).



Obr. 1 : Princip *In situ* hybridizace za použití LNATM sondy. Převzato z miRCURY LNATM microRNA ISH Optimization Kit (FFPE), Instructionmanual v2.0

Tkáň z parafinových bločků od jednotlivých pacientů s NSCLC byla nařezána na velmi tenké řezy pomocí mikrotomu. Tenké řezy tkáňe byly fixovány na podložní sklíčko.

Prvním krokem byla příprava vzorku na hybridizaci. Sklíčko s řezem bylo přemístěno do zkumavek a dvakrát promyto xylenem po dobu 15 minut při RT. Vzorek byl rehydratován v 100% ethanolu po 5 minutách při RT. Poté byl přemístěn do zkumavky s 80% ethanolem po dobu 5 minut a posledním krokem bylo přemístění vzorku do zkumavek se 70% ethanolem po dobu 5 minut při RT. Po rehydrataci ethanolem bylo sklíčko s řezem umístěno do zkumavky s DEPC vodou na dobu 5 minut při RT.

Následovala inkubace vzorku s 4% Paraformaldehyd v PBS po dobu 20 minut při RT.

Následně byl vzorek dvakrát promyt v PBS po 5 minutách. Sklíčko s řezem bylo přemístěno na papírový ubrousek a nechalo se lehce oschnout. Byla nakreslena hydrofobní bariéra okolo vzorku s použitím DAKO – tužky. Nutno dbát, aby vzorek úplně nevyschl.

Následně byla použita vlhkostní komůrka. Na její dno bylo aplikováno malé množství DEPC vody pro zachování vlhkosti vzorku. Sklíčko bylo umístěno do vlhkostní komůrky. Vzorky byly inkubovány s 499 μ l proteinasového pufru a 0,8 μ l proteinasy K při 37 °C v tkáňových boxech po dobu 10 minut. Poté bylo sklíčko se vzorkem přemístěno z vlhké komůrky do zkumavky obsahující 0,2% Glycin v PBS po dobu 30 s za RT. Vzorek byl dvakrát promyt v PBS po dobu 5 minut při RT.

Následně byl vzorek přemístěn opět do zkumavky s 4% Paraformaldehyd v PBS po dobu 15 minut při RT. Sklíčko s řezem bylo přemístěno do zkumavky obsahující PBS po dobu 5 minut při RT.

Po přípravě vzorku následovala hybridizace. Na dno vlhkostní komůrky bylo aplikováno malé množství 50% amidu kyseliny mravenčí s 50% 5xSSC.

Vzorek byl přemístěn z PBS na papírové ubrousky, kde byl osušen a pak přemístěn do vlhkostní komůrky. Na sklíčko bylo aplikováno 150 μ l prehybridizačního roztoku na dobu 3,5 hodiny při RT. Těsně před skončením inkubace byl připraven hybridizační mix, který obsahoval sondu a hybridizační roztok. Vzorek byl přemístěn zpět do vlhkostní komůrky.

Sondy pro jednotlivé miRNA bylo nutné aktivovat. Množství sondy pro danou miR bylo napipetováno do mikrozkušavky a aktivováno při 90°C v termobloku po dobu 4 minut. Po aktivaci sondy byla sonda přidána k hybridizačnímu roztoku. Objemy jednotlivých sond a hybridizačního roztoku jsou shrnuty v tabulce (Příloha 2). Po uplynutí inkubační doby byl ze vzorku odstraněn prehybridizační roztok a aplikován hybridizační mix.

Následně byl vzorek inkubován v inkubátoru při 55°C po dobu 15 hodin.

Následující den probíhaly promývací kroky. Byla zapnuta vodní lázeň na 45 °C. Vzorek byl z vlhkostní komůrky přemístěn do zkumavek s 2xSSC. Zkušavka byla inkubována ve vodní lázni při 45 °C po dobu 10 minut. Následně byl vzorek přemístěn do zkumavek, kde se nacházel roztok 1,5xSSC při na

45 °C na dobu 10 minut. Posledním promývacím krokem bylo přemístění vzorku z 1,5xSSC do zkumavky s 0,2xSSC. Zkumavka se vzorkem obsahující 0,2xSSC byla přemístěna do vodní lázně s teplotou 37 °C na dobu 20 minut, daný postup byl s 0,2xSSC byl poté zopakován znovu.

Na dno vlhkostní komůrky bylo aplikováno menší množství DEPC vody, pro zachování vlhkosti.

Vzorek byl přemístěn do vlhkostní komůrky. Do oblasti vzorku bylo aplikováno 100 µl blokovacího roztoku na dobu 1,5 hod za RT.

Detekce spočívala v inkubaci sklíčka se vzorkem s 249µl PBS a 0,8 µl protilátky AP-conjugated anti-digoxigenin. Vzorek byl inkubován ve vlhkostní komůrce po dobu 4 hodin při RT. Po inkubaci byl vzorek přemístěn do zkumavek s PBS na dobu 10 minut při RT, daný krok bylo nutno provést 3x. Vzorek byl dvakrát promyt v pufru s alkalickou fosfatázou po 5 minutách za RT.

Bylo smícháno 254 µl alkalické fosfatázy se 2 µl NBT a 1 µl BCIP. Daný roztok byl aplikován do oblasti vzorku. Vzorek byl přemístěn do vlhkostní komůrky, která se obalila alobalem. Nutno vzorek inkubovat ve tmě po dobu 20 hod při RT.

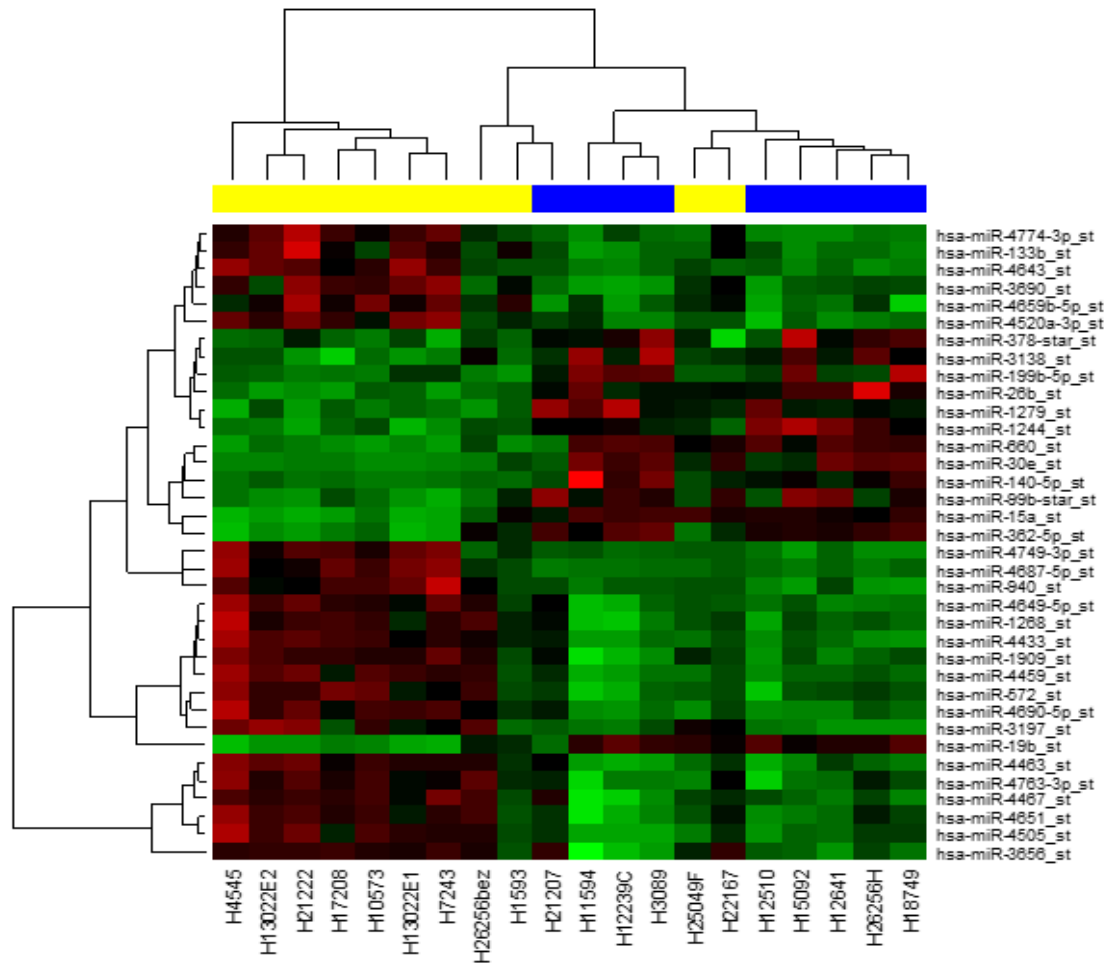
Vzorek byl následně promyt v PBS s 0,1 % Tween-20 dvakrát na dobu 4 minut při RT. Poté byl promytý dvakrát v DEPC vodě na dobu 3 minut při RT. Vzorek se nechal chvíli osušit na vzduchu. Poté do oblasti vzorku bylo aplikováno 200 µl Nuclear Fast Red barvičky na dobu 3 minut za RT. Poté byl vzorek přemístěn do kyvetys vodou, kde došlo k odmytí barvičky. Opět se vzorek nechal vyschnout na vzduchu. Pro fixaci nabarveného vzorku bylo pomocí Pasteurovy pipety aplikováno montážní medium Eukitt do oblasti vzorku a překryto krycí sklem. Následující den byl vzorek analyzován a vyfocen.

5 Výsledky

5.1 Analýza microRNA

5.1.1 Srovnání expresí vybraných microRNA u vzorků pacientů s metastázemi do lymfatických uzlin a vzorků pacientů bez metastáz

Kritériem pro srovnání exprese bylo rozdělení pacientů na dvě skupiny podle přítomnosti metastáz do lymfatických uzlin a nepřítomnosti metastáz do lymfatických uzlin u nemalobuněčného karcinomu plic. Hierarchický klastrogram ukazuje odlišné exprese microRNA v různých vzorcích nemalobuněčného karcinomu plic. Diferenciální exprese microRNA ukazuje intenzitu červeně a zeleně. Červené zbarvení poukazuje na zvýšenou expresi microRNA a zelené zbarvení na sníženou expresi microRNA v NSCLC.



Obr. 2: Rozdílně exprimovaných 36 microRNA mezi pacienty s NSCLC s odlišným stádiem a typem NSCLC. **Zeleně** zbarveny jsou geny se **sníženou** expresí, **červeně** jsou zbarveny geny se **zvýšenou** expresí. Sloupce reprezentují jednotlivé pacienty s NSCLC, řádky reprezentují miRNA. **Žlutě** označený řádek odpovídá pacientům s NSCLC **bez metastáz**, **modře** označený řádek odpovídá pacientům NSCLC **s metastázemi** do lymfatických uzlin.

Tab. 2: Vybrané microRNA z mikročipové analýzy, jejichž exprese se statisticky nejvíce lišila u pacientů s metastázami do lymfatických uzlin a u pacientů bez metastáz do lymfatických uzlin.

	microRNA	p -hodnota
1.	hsa-miR-362-5p	0,000779
2.	hsa-miR-1244	0,010148
3.	hsa-miR-1909	0,010148
4.	hsa-miR-3197	0,010148
5.	hsa-miR-4463	0,010148
6.	hsa-miR-660	0,010148
7.	hsa-miR-4433	0,010148
8.	hsa-miR-4774-3p	0,010148
9.	hsa-miR-4659b-5p	0,010148
10.	hsa-miR-26b	0,012658

Expresе miR-362-5p, miR-1244, miR-1909, miR-3197, miR-4463, miR-660, miR-4433, miR-4774-3p, miR-4659b-5p, miR-26b se výrazně lišily u nádorů s metastázami v porovnání s nádory bez metastáz. Snížené hladiny exprese miR-1909, miR-3197, miR-4463, miR-4433, miR-4774-3p a miR-4659b-5p byly zjištěny ze vzorků u pacientů s metastázami do lymfatických uzlin oproti zvýšené expresi daných microRNA u pacientů bez metastáz. U miR-362-5p, miR-1244, miR-660 a miR-26b měly zvýšenou expresi u vzorků pacientů s metastázami do lymfatických uzlin oproti snížené expresi těchto microRNA u pacientů bez metastáz.

5.1.2 MicroRNA z mikročipové analýzy, jejichž exprese měla nejvýznamnější signifikanci

Základem pro mikročipová analýza RNA izolované od pacientů, kteří se lišili odlišným stádiem a typem NSCLC. Jednotliví pacienti se lišili přítomností metastáz do lymfatických uzlin a nepřítomností metastáz do lymfatických uzlin. Daná analýza poskytla velké množství dat, proto bylo vybráno deset microRNA s nejvíce signifikantními hodnotami v Tab. 2. Následně byly pro jednotlivé microRNA vyhledávány cílové geny prostřednictvím databází Targetscan a miRDB. Jednotlivé databáze pro vyhledávání genů se mohou lišit hodnotami „score“.

Databáze Targetscan vyhledává cíle pro jednotlivé microRNA na základě přítomnosti konzervovaných oblastí, které odpovídají oblasti pro danou microRNA. Předpovědi cílových genů jsou hodnoceny na základě kumulativního váženého context+ scores. Pro databázi Targetscan platí, že čím nižší je celkové skóre predikovaného genu pro microRNA, tím je daný výsledek reprezentativnější.

MiRDB je databází, která se využívá pro predikci cílů microRNA a funkčních anotací. Zjištěné cíle v miRDB byly predikovány pomocí nástroje bioinformatiky MirTarget, jenž byl vyvinut na základě analýzy tisíců miRNA. U databáze miRDB platí, že čím vyšší je celkové skóre predikovaného genu pro microRNA, tím je daný výsledek reprezentativnější.

Tab. 3: Skóre z databází Targetscan a MiRDB pro microRNA s vybranými cílovými geny

MicroRNA	Cílový gen	miRDB	Targetscan
MiR-362-5p	SUCNR1	-	-0,52
MiR-362-5p	CENPK	60	-0,54
MiR-362-5p	AKT3	60	-0,11
MiR-362-5p	PKC α	79	-
MiR-362-5p	TGFB2	74	-
MiR-1244	MAP3K2	99	-0,11
MiR-1244	TNFAIP8L2	83	-0,70
MiR-1244	C9	51	-0,37
MiR-1244	CCNE2	79	-0,39
MiR-1244	IL-33	79	-
MiR-1909	TSPAN9	98	-1,41
MiR-1909	FOXO4	100	-0,74
MiR-3197	IGFBP5	61	-0,59
MiR-3197	FOXP2	84	-0,48
MiR-660	ARHGAP36	97	-0,47
MiR-660	PCDH9	96	-0,05
MiR-4463	CLDN1	100	-1,24
MiR-4463	AMOT	99	-0,28
MiR-4433	TP53INP2	99	-0,60
MiR-4433	CYTH3	90	-0,15
MiR-4774-3p	SEPT7	87	-0,27
MiR-4774-3p	PCDH9	88	-
MiR-4659b-5p	RSF1	98	-0,28
MiR-4659b-5p	VASH2	78	-0,30
MiR-26b	CDK2AP1	97	-0,28
MiR-26b	AMOT	97	-0,11

5.1.3 Souhrn cílových genů regulovaných jednotlivými miRNA asociovanými s výskytem metastáz do lymfatických uzlin

Jednou z microRNA, která vykazovala nejvyšší signifikanci byla miR-362-5p. Jako cílový gen dané microRNA našla databáze Targetscan membránový protein SUCN1, který patří do rodiny receptorů spážených s G -proteinem (Gilissen a kol., 2016). Mezi přímé cíle dané miR patří i CENPK, který patří mezi rodinu proteinů CEPN. AKT3 byl dalším identifikovaným cílem miR-362-5p. Jedná se o izoformu AKT, která patří mezi Ser/Thr kinázy a je zapojena do procesů buněčné proliferace a přežití (Kim a kol., 2016). Protein kináza C alfa (PKC α) byla také identifikována prostřednictvím databází jako cílový gen dané microRNA. PKC α je zapojena do řady signálních drah u karcinomu plic a byla studována ve spojitosti s miR-203 (Wang a kol., 2013). Mezi predikované cíle se zařadil i TGF- β , který je zapojen v procesech proliferace a diferenciaci buněk v apoptóze. Je zapojený i do patologických procesů jako je astma, plicní fibróza, chronické onemocnění ledvin a rakovina (Ki a kol., 2015).

MiR-1244 byla již dříve studována ve spojitosti s karcinomem plic. Její exprese byla výrazně snížena u nádorových buněčných linií A549 nemalobuněčného karcinomu plic. MiR-1244 byla studována ve spojitosti s lékovou rezistencí (Li a kol., 2016). Jako predikovaný cíl miR-1244 byla zvolena MAP3K2, která patří do rodiny proteinových kináz serin/threonin. Daná kináza často přednostně aktivuje jiné kinázy, které jsou zapojeny do signální dráhy MAP kinázy. MAP3K2 bývá u řady nádorových onemocnění zvýšeně exprimována (Yu a kol., 2015). Dalším identifikovaným cílem pro danou miR byl TNFAIP8L2. Jedná se o tumor nekrotizující faktor- α -indukovaný protein 8 - like-2, který patří mezi členy rodiny TNFAIP8 rodiny. Členové rodiny TNFAIP8 se podílí na negativní regulaci přirozené a získané imunity (Li a kol., 2015; Wang a kol., 2017). Jako další cíl byl databázemi predikován CCNE2. Cykliny E1 a E2 jsou důležité během přechodu mezi G1 a S fází buněčného cyklu. U různých typů nádorových onemocnění byl cyklin E2 detekován ve vyšších hladinách oproti normální zdravé tkáni (Chen a kol., 2015). Posledním ze zmíněných predikovaných cílů miR-1244 je interleukin 33 patřící do rodiny cytokinů IL-1. Je uvolňován z poškozených tkání také se primárně podílí na indukci 2. typu imunitních reakcí (Wang a kol., 2016).

Cílovým proteinem pro miR-1909 byl identifikován TSPAN9, který patří do rodiny glykoproteinů. Doposud nejsou zcela objasněny funkce tetraspaninů, ale například u karcinomu žaludku byla zjištěna snížení exprese TSPAN 9 oproti jeho expresi v přilehlé nenádorové tkáni (Feng a kol., 2016). Další identifikovaným cílem prostřednictvím databází byl FOXO4, který patří do rodiny

FOXO. Členové rodiny mají doménu „Forkhead box“, která je schopna vázat různé sekvence, které mohou pozitivně a negativně regulovat genovou expresi (Li a kol., 2016).

Pro miR-3197 byl jako jeden z cílů zjištěn IGFBP5. Jedná se o inzulinový růstový faktor vázající protein 5. Patří mezi členy rodiny, kteří fungují jako důležité regulátory IGF signální dráhy. Daný protein má podíl na růstu a proliferaci buňky, ale je také zapojen do patologických procesů zahrnující rozvoj metastáz u nádoru (Gregory a kol., 1999; Miyakoshi a kol., 2001; Hao a kol., 2004; Yu a kol., 2016). Dalším identifikovaným cílem pro miR-3197 byl člen rodiny FOX. FOXP2 patří do rodiny FOX, která je zapojená do procesů zahrnující diferenciaci, proliferaci, apoptózu a invazi buněk. Vyřazení nebo ztráta členů rodiny FOX může vést k rozvoji karcinogeneze (Jia a kol., 2016).

Pomocí databází byl pro miR-660 identifikovaným cílem ARHGAP36. Je členem rodiny Rho GAP. Byl studován ve spojitosti se signální dráhou Hedhehog, která hraje klíčovou roli jako regulátor při embryogenezi a při tkáňové homeostázi. Pozměněná exprese ARHGAP36 byla nalezena u meduloblastomu (Rack a kol., 2014; Eccles a kol., 2016). Dalším cílem miR-660 byl predikován PCDH9. Jedná se o protokadherin 9, který patří mezi členy rodiny protokadherinů a kadherinů. Jejich úkolem je zprostředkování adheze mezi buňkami. Protokadherin 9 byl zkoumán ve spojitosti s maligními gliomy. Jeho exprese byla významně snížena u maligních gliomů ve srovnání s normální mozkovou tkání. Alterovaná exprese byla spojována s horší prognózou pro pacienty s maligním gliomem (Wang a kol., 2017).

Pro miR-4463 byl identifikován jako cíl CLDN1. Jedná se o kladin. Klaudiviny vytváří těsné spoje a fungují jako bariéregulující průtok vody, iontů a různých makromolekul vedoucí k udržení homeostázi buněk. Klaudiviny jsou předmětem mnoha studií. Například u plicního adenokarcinomu bylo zjištěno, že kratší doby přežití se vyskytovaly u nižších hladin a exprese proteinů CLDN1. Zvýšená exprese CLDN1 byla zjištěna u adenokarcinomu a vedla k příznivé prognóze u pacientů s karcinomem plic (Chao kol., 2009; Zhang a kol., 2013; Moldvay a kol., 2017). Dalším cílem pro miR-4463 byl identifikován protein AMOT. Jedná se o Angiomotin, který se podílí na regulaci angiogeneze, tím že zvyšuje migraci u endoteliálních buněk. Daný protein funguje i jako regulátor fyziologických procesů zahrnující diferenciaci, embryogenezi a endoteliální buněčnou migraci a invazi (Yu a kol., 2013; Jang a kol., 2016).

Tumorový protein p53 indukovaný jaderným protein 2 byl identifikován jako jeden z potenciálních cílů miR-4433. Daný protein se podílí na regulaci transkripce a také přispívá k regulaci bazální autofágie. Byl studován ve spojení s liposarkomem. Bylo zjištěno, že nižší exprese

TP53INP2 se vyskytovala u buněčné linie SW872-S oproti expresi v SW872. Buněčná linie SW872-S se lišila od SW872, že vykazovala mnohem vyšší schopnost proliferace buněk. Bylo také zjištěno, že snížená exprese TP53INP2 byla spojena s maligní progresí u buněčných linií a primárních tkání liposarkomu (Hu a kol., 2017). Jako další potenciální cíl pro miR-4433 byl pomocí databází vyhledán cytohezin 3. Cytohezin 3 patří mezi vysoce homologní členy rodiny cytohezinů, které jsou vícedoménové cytoplazmatické proteiny. Některé studie prokázaly zapojení cytohezinů do fyziologických ale i patologických procesů. Patří také mezi významné cytoplazmatické aktivátory receptorůsignalizace tyrozin kinázu epidermálního růstového faktoru a inzulinového receptoru (Fu a kol., 2014).

Pro miR-4774-3p byl predikován jako cílový protein septin 7. Septiny jsou skupina proteinů, které jsou zapojené do mnoha buněčných funkcí jako je segregace chromozomů, opravy DNA, apoptóza či migrace. Jsou také spojovány s fyziologickými či patologickými procesy. Septiny se do popředí dostávají i z důvodu studia s nádorovými onemocněními. Ve studii Zhanga a kol. (2016) bylo zjištěno, že SEPT7 se chová jako onkogen v regulaci karcinomu prsu prostřednictvím aktivace signální dráhy ERK (Zhang a kol., 2016). Dalším cílem byl identifikovaný protokadherin 9, stejně jako u miR-660. Jeho exprese byla významně snížena u maligních gliomů ve srovnání s normální mozkovou tkání. Alterovaná exprese byla spojována s horší prognózou pro pacienty s maligním gliomem (Wang a kol., 2017).

Pro miR-4659b-5p jako jeden z cílů identifikovaný pomocí databází byl RDF1, který podle některých studií bývá spojován s agresivnějším typem karcinomu vaječníku. U nemalobuněčného karcinomu plic byl RFS1 nalezen ve zvýšené hladině oproti hladině mRNA RSF1 u normální přilehlé plicní tkáni (Li a kol., 2012). Jeden z dalších identifikovaných cílů pro danou miR byl VASH2. Vasohibin zahrnuje dva členy Vasohibin 1 a2. Vasohibin 1 byl nalezen v cytoplazmě endoteliálních buněk a byl identifikován jako negativní regulátor angiogeneze. Vasohibin 2 je považován za homologa VASH1. Exprese VASH2 byla prokázána u některých typů nádorových onemocnění (Tu a kol., 2017).

Poslední významnou microRNA byla miR-26b. Hladiny miR-26b byly studovány u buněčných linií NSCLC. Ve studii Lianga a kol. (2015) bylo zkoumáno, zda tumor supresorový gen PTEN je přímým cílem miR-26b. PTEN se nachází ve snížené expresi u NSCLC, což následně vede k invazi buněk a zvýšenému růstu nádoru. Zajímavým zjištěním je, že miR-26bu karcinomu prsu se nachází exprimována v nízkých hladinách, což vede k snížení životaschopnosti buněk a následné indukci apoptózy. Ve studii a výsledcích Liang a kol. (2015) miR-26b má onkogenní roli u NSCLC (Liu a kol.,

2011; Liang a kol., 2015; Soria a kol., 2002; Zhang a kol., 2010). Jeden z cílů pro miR-26b byl identifikován protein AMOT stejně jako u výše zmíněné miR-4463. Jedná se angiomotin, který se podílí na regulaci angiogeneze tím, že zvyšuje migraci u endoteliálních buněk. Daný protein funguje i jako regulátor fyziologických procesů zahrnující diferenciaci, embryogenezi a endoteliální buněčnou migraci a invazi (Yu a kol., 2013; Jang a kol., 2016). Jako další z cílů pro microRNA-26b byl identifikovaný prostřednictvím databázi CDK2AP1. Podle některých studií funguje jako inhibitor CDK2, jenž má následně vliv na buněčný cyklus a to především na přechodu mezi fázemi G1/S. Některé studie poukazují na to, že právě exprese CDK2AP1 koreluje s metastázemi a přežitím pacientů s karcinomem. Zhong a Xiong (2015) se zabývala souvislostmi mezi miR-205 a CDK2AP1 u spinocelulárního karcinomu hrtanu. Jsou zde i jisté názory, že CDK2AP1 by mohla přispívat ke vzniku různých typů malignit, například karcinomu jícnu, dutiny ústní, prostaty a žaludku (Zhong a Xiong, 2015).

5.2 In situ hybridizace

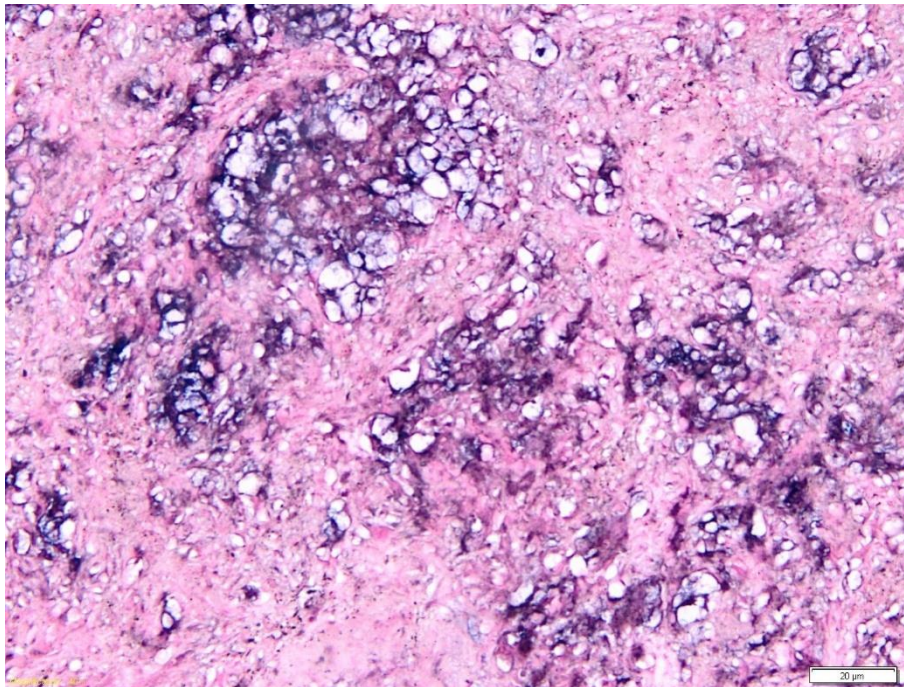
Pro sledování nádorové heterogenity byla použita tkáň pocházející od jednoho pacienta s NSCLC, která zahrnovala různé typy tumoru. Byla provedena *in situ* hybridizace z různých míst tumoru. Byla detekována exprese miR-21 a miR-34a v centru a periférii nádorové tkáně a následně z okolní zdravé plicní tkáně.

5.2.1 Detekce exprese miR-21 a miR-34a v různých místech tumoru NSCLC

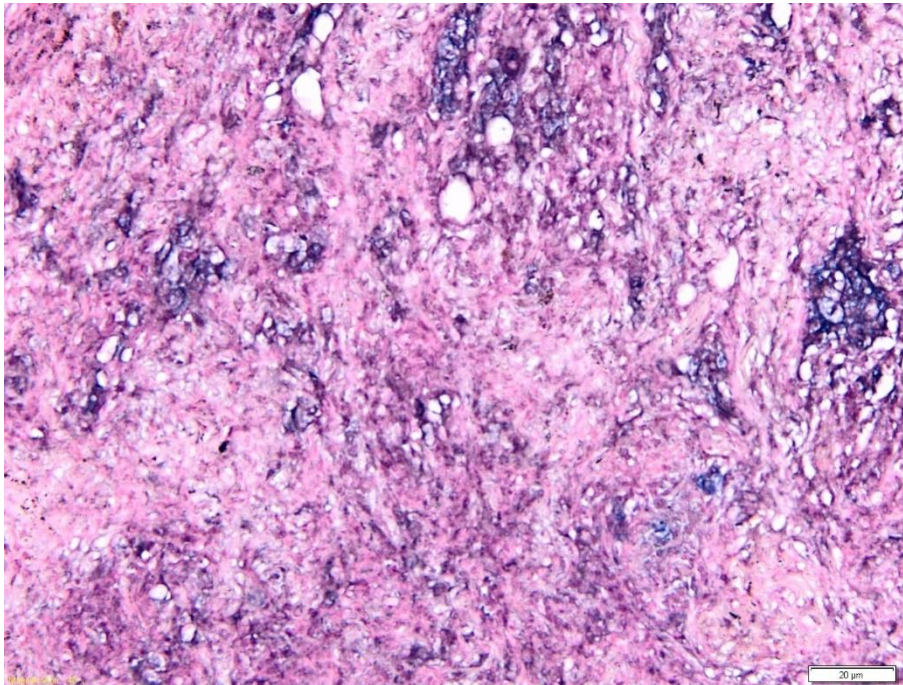
Byla hodnocena exprese miR-21 a miR-34a v centrální a periferní oblasti adenokarcinomu plic a u přilehlé normální plicní tkáně. Experiment byl proveden na čtyřech formalínem fixovaných a do parafínu zalitých vzorcích, které pocházely od jednoho pacienta. Před samotnou *in situ* hybridizací byly vzorky deparafinovány.

Z našich výsledků nebyla zjištěna žádná exprese tumor supresorové miR-34a v nádorové oblasti a ani u normálního tkániva, proto nebylo možné porovnat rozdíly v expresi mezi jednotlivými oblastmi tumoru. Výrazné barevné rozdíly jsme okometricky pozorovali u miR-21, která má

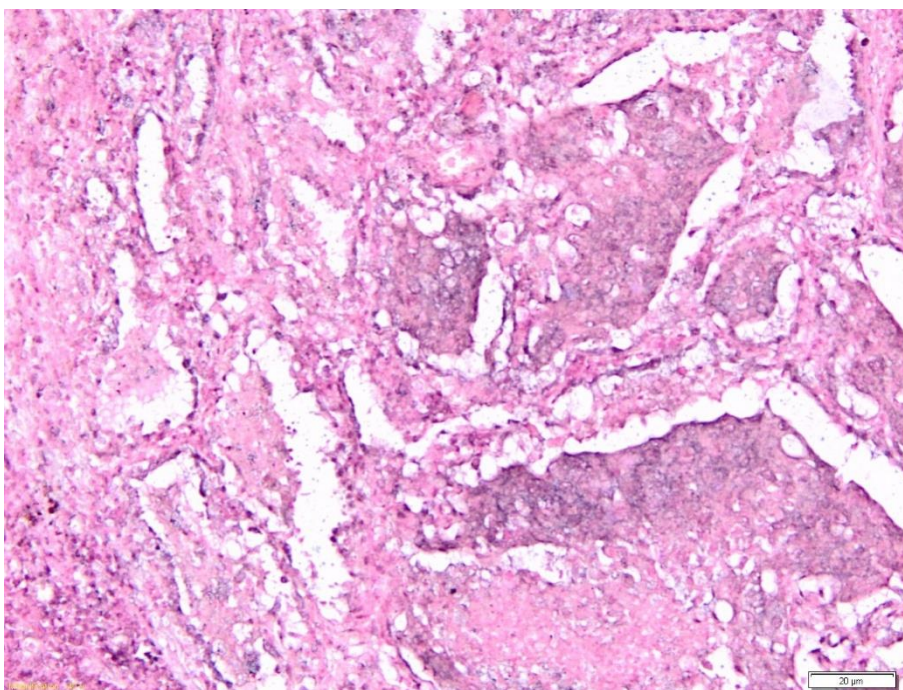
onkogenní charakter. Expres miR-21 byla výrazná v centrální části tumoru. V periferní oblasti byla exprese nižší a v normálním plicním tkanivu jsme nepozorovali téměř žádnou expresi.



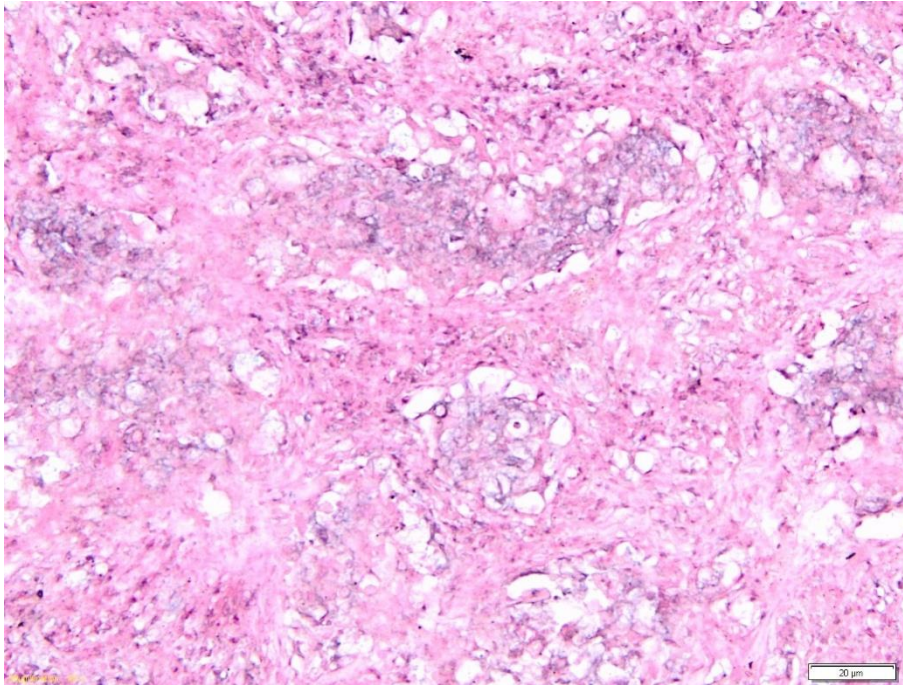
Obr. 2: Expres miR-21 v centru adenoskvamozního karcinomu při zvětšení 100x



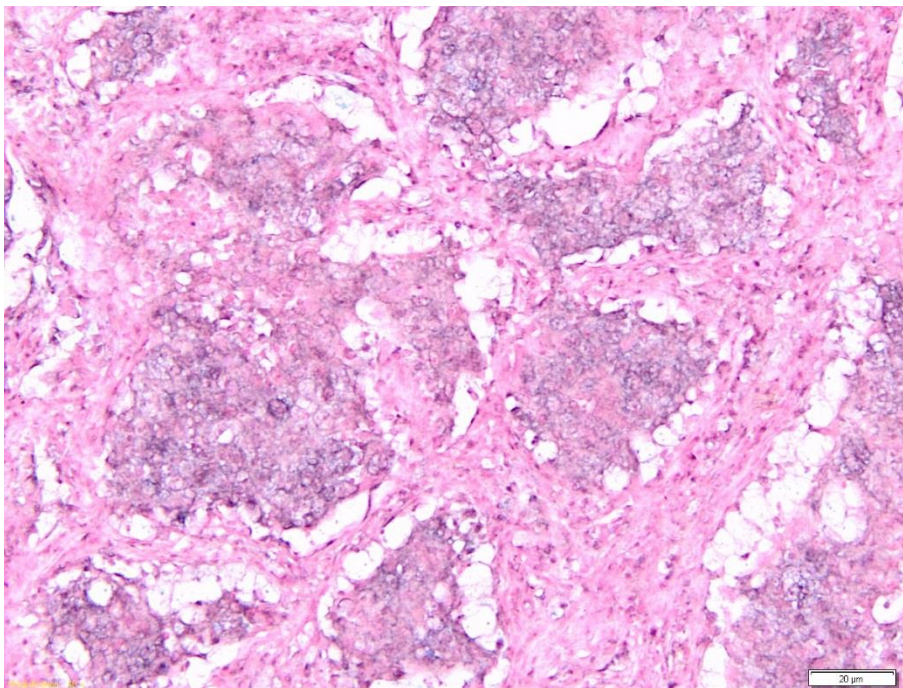
Obr. 3: Expres miR-21 v centru adenoskvamozního karcinomu při zvětšení 100x



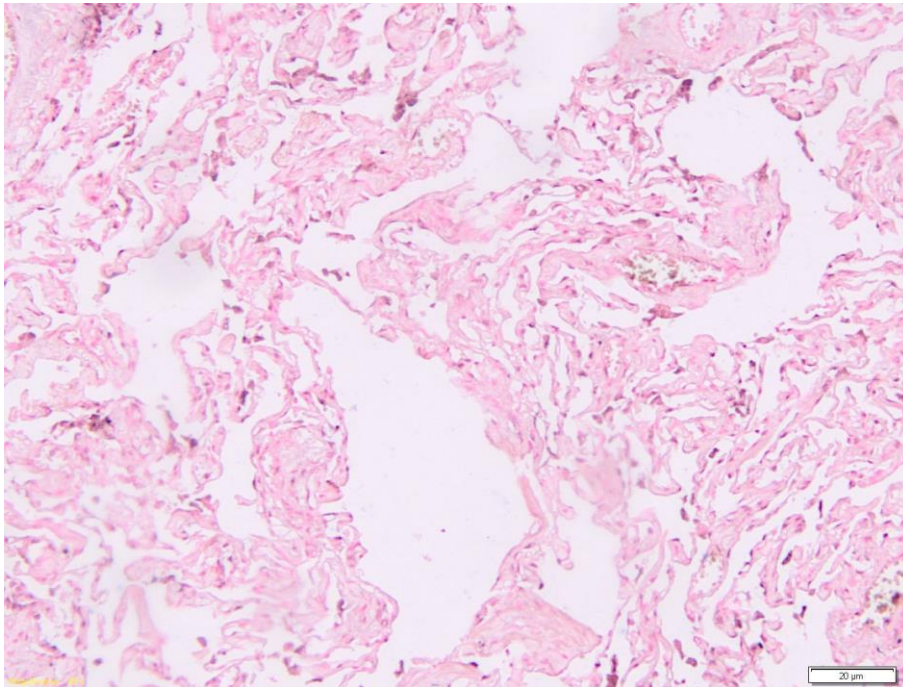
Obr. 4: Expres miR-21 v periferní části adenoskvamozního karcinomu při zvětšení 100x



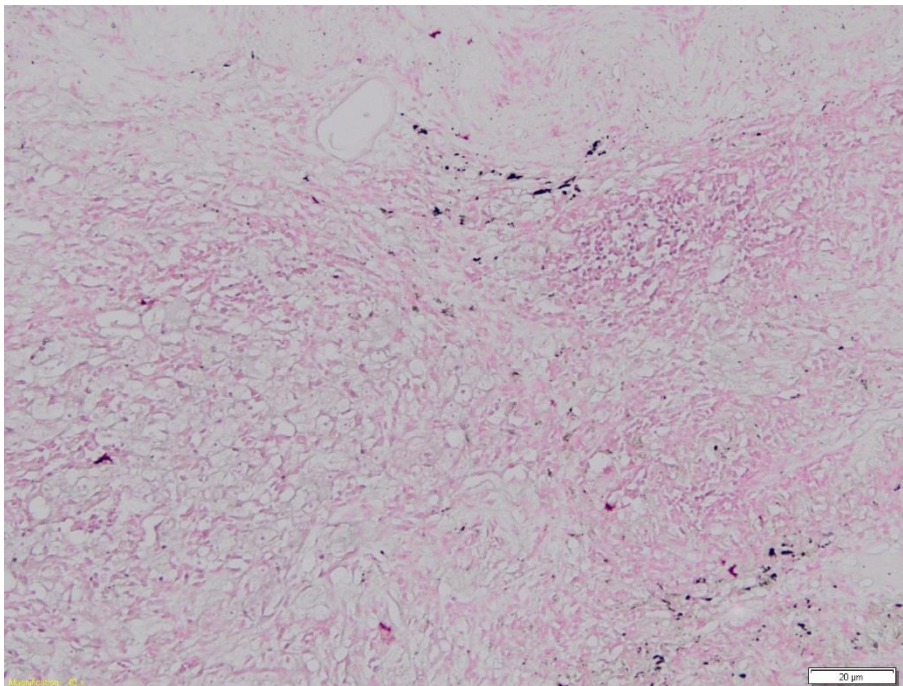
Obr. 5: Expresse miR-21 v periferní části adenoskvamozního karcinomu při zvětšení 100x



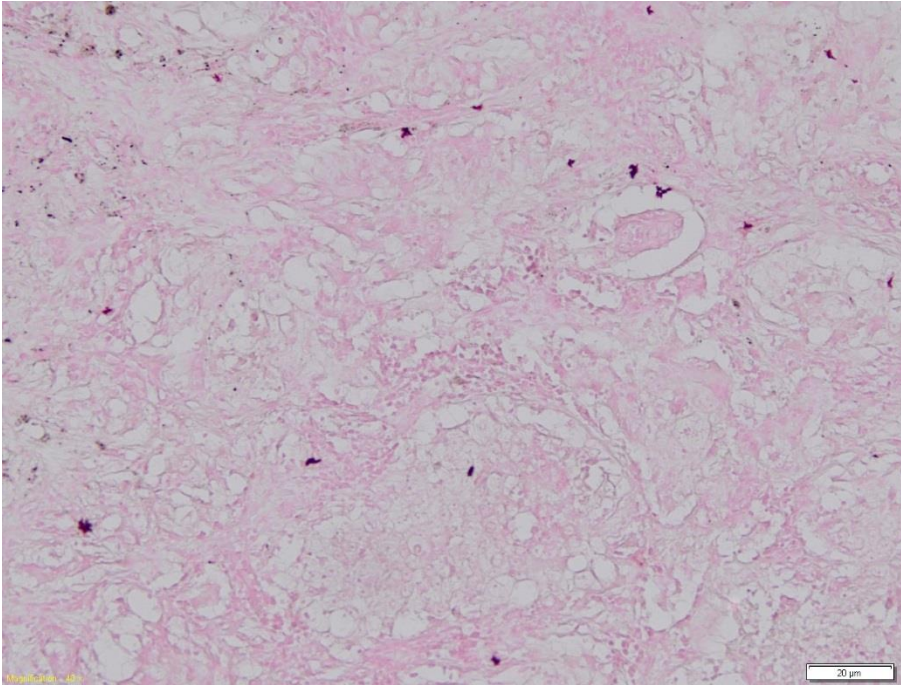
Obr. 6: Expresse miR-21 v periferní části adenoskvamozního karcinomu při zvětšení 100x



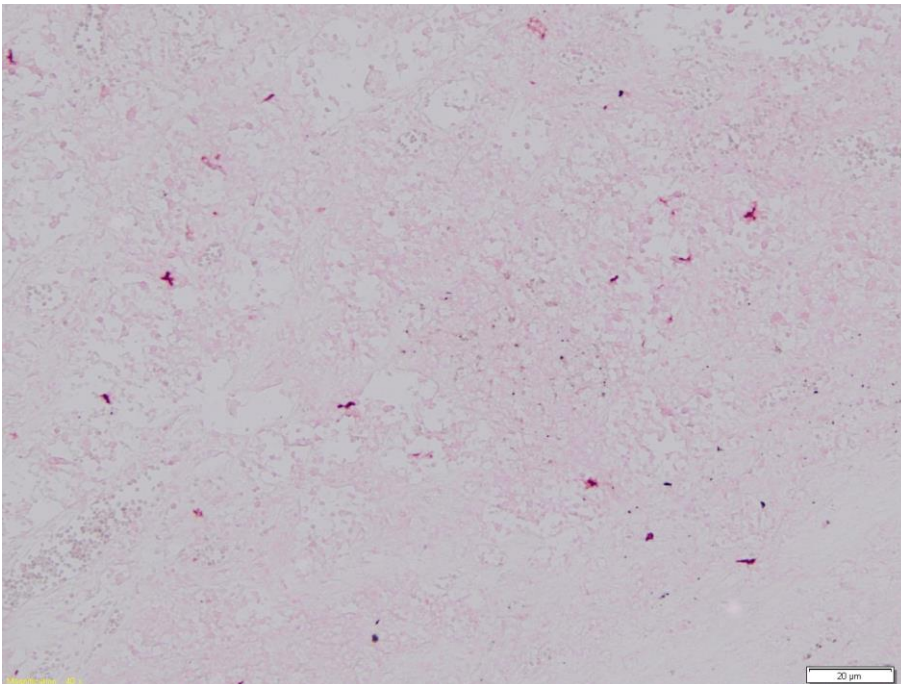
Obr. 7: Expres miR-21 v normální plicní tkáni při zvětšení 100x



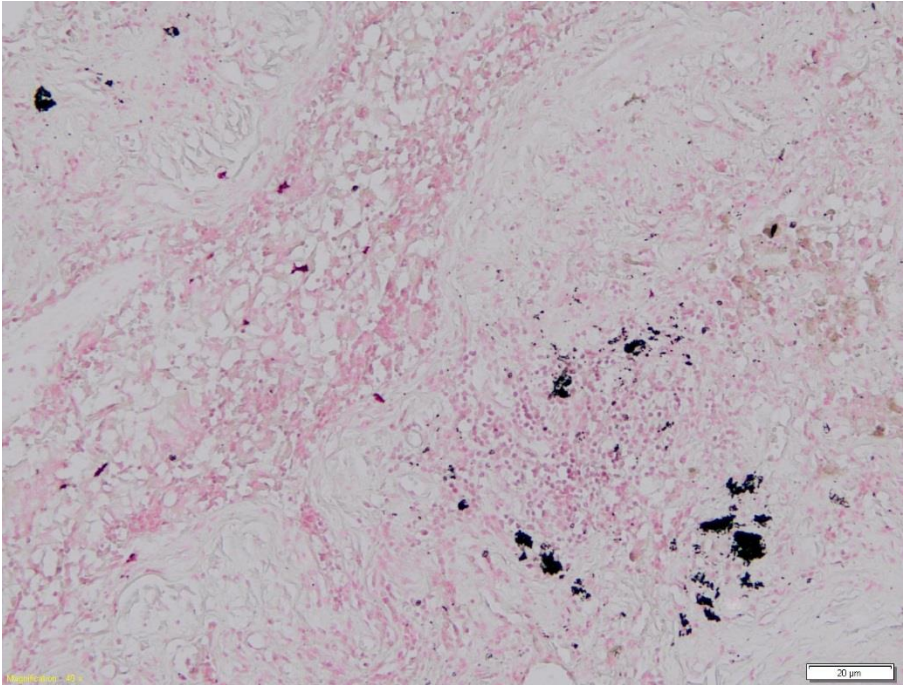
Obr. 8: Expres miR-34a v centrální části adenoskvamozního karcinomu zvětšení 100x



Obr. 9: Expresse miR-34av periferní části adenoskvamozního karcinomu při zvětšení 100x



Obr. 10: Expresse miR-34av periferní části adenoskvamozního karcinomu při zvětšení 100x



Obr. 11: Expres miR-34a v normální plicní tkáni při zvětšení 100x

6 Diskuze

Nemalobuněčný karcinom plic patří mezi bronchogenní karcinomy a vytváří tak velkou skupinu plicních karcinomů, který tvoří přibližně 75-85 procent všech plicních karcinomů. Zbylá procenta zahrnují malobuněčné karcinomy plic (Skřičková J. a kol., 2008). Hlavním problémem v terapii NSCLC je pomalý růst nádoru a časný nástup metastáz. Z uvedeného důvodu nebyly doposud vyvinuty metody spolehlivé diagnostiky nemalobuněčných karcinomů plic ve stádiích bez metastáz.

Jedním z dalších problémů efektivní protinádorové terapie NSCLC je rezistence vůči radioterapii a chemoterapii. V této souvislosti je nutno zmínit také problematiku nádorové heterogenity, která nesporně přispívá k lékové rezistenci. Na rozvoji progresu negenetické heterogenity se podílí i microRNA. MicroRNA nejsou zapojeny pouze v nádorové patogenezi jako nádorové supresory či onkogeny, ale podílí se na regulaci buněčných systémů. Při alteraci exprese miRNA dochází k rozvoji heterogenity, což pravděpodobně přispívá k maligní transformaci prekurzorů nádorových buněk a urychlení růstu nádoru (Hanahan a Weinberg, 2000; Voorhoeve, 2010; Brock a kol., 2009). Intratumorální heterogenita se může projevovat jako variability v genetickém vybavení nádoru, jiných epigenetických mechanismech a morfologií nádoru. Je pravděpodobné, že nádorová heterogenita uděluje nádorům jakési výhody. Výhody jsou například přizpůsobení se změnám podmínek mikroprostředí nebo změna maligního potenciálu, což může vést ke snížené účinnosti protinádorové terapie. Nádorová heterogenita byla studována u karcinomu plic, kolorektálního karcinomu, karcinomu žaludku, glioblastomu a u prsního karcinomu (Gerashchenko a kol., 2013). U NSCLC byla nádorová heterogenita spojena s výskytem různých mutací, amplifikací nebo pozměněnou expresi EGFR, kdy došlo k následnému snížení účinku cílené léčby NSCLC inhibitory EGFR. Dané výsledky lze vysvětlit přítomností více než jednoho nádorového klonu (Chen a kol, 2012).

Jak již bylo naznačeno výše, jedním z problémů protinádorové léčby je fakt, že nádorové buňky mají schopnost být po určité době působení rezistentní vůči cytotoxickým látkám. Daný mechanismus pak vede k selhávání léčby. V současné době rozlišujeme dva typy rezistencí na protinádorovou léčbu - primární a sekundární. Primární typ rezistence se vyskytuje u maligních buněk, kdy se stávají rezistentní vůči chemoterapii při primární léčbě. Sekundární rezistence vzniká až v průběhu cytostatické léčby. U sekundární rezistence jsou nádorové buňky citlivé vůči

chemoterapii, ale postupně se stávají rezistentní a účinnost chemoterapie klesá. U nádorových buněk může nastat stav, kdy buňka ztrácí citlivost k jedné cytotoxické látce a zároveň vznikne rezistence vůči strukturálně podobnému cytostatiku. V tomto případě se jedná o zkříženou rezistenci. Velkým problémem je mnohočetná léková rezistence, která byla popsána u některých případech jako uvedená zkřížená rezistence mezi protinádorovými léčivy s tím rozdílem, že se léčiva již odlišovala mechanismem účinku a strukturou. Mezi mechanismy dávající vznik rezistenci nádorové buňce vůči protinádorové léčbě jsou také změny farmakokinetiky, změny ve struktuře a funkci buňky (Nosková a kol., 2000a). V neposlední řadě se na nádorové rezistenci vůči chemoterapii podílí také změna expresního profilu vybraných typů miRNA.

Jednou z efektivních metod studia expresního profilu miRNA je mikročipová analýza. Z analýzy bylo množství dat, proto bylo vybráno deset microRNA, jejichž exprese se statisticky nejvíce lišila u pacientů s metastázami do lymfatických uzlin a u pacientů bez metastáz do lymfatických uzlin u NSCLC.

První microRNA, která měla statisticky významnou expresi a lišila se u pacientů s metastázami do lymfatických uzlin, byla miR-362-5p. Pro miR-362-5p byly vyhledány cílové geny, které by pravděpodobně mohla ovlivnit. Prozatím nebyla nalezena publikace, která by se zabývala funkcí miR-362-5p ve spojení s NSCLC. Bylo by tedy vhodné danou microRNA více studovat v rámci zapojení do progresu s NSCLC a také ve spojení s jejími predikovanými cíli.

Cílové geny pro danou miRNA byly vyhledávány pomocí dvou databází miRDB a Targetscan. Tyto dvě databáze byly vybrány na základě vědeckých publikací. První identifikovaný cíl pro miR-362-5p pomocí databáze Targetscan byl SUCNR1. Jedná se o membránový protein, patřící do rodiny receptorů spřažených s G-proteinem. Většina dostupných léčiv se zaměřuje na receptory spřažené s G-proteinem. Je tomu tak, protože v lidském genomu představují největší skupinu membránových proteinů podílejících se na přenosu signálu přes biologické membrány. Daný receptor je klasifikován jako receptor pro vzácná onemocnění. Zapojení intracelulárních drah SUCNR1 je ve stadiu studia (Gilissen a kol., 2016). SUCNR1 ve spojení s nemalobuněčným karcinomem plic nebyl doposud studován.

Jako další predikovaný cíl miR-362-5p byl nalezen CENPK. Rodina proteinů CEPN zahrnuje nejméně 16 nehistonových proteinů, které jsou rozděleny do funkčních skupin a mezi tuto skupinu patří CENPK. Bylo zjištěno, že u karcinomu vaječníků se nachází pozměněná exprese proteinu CENPK. Výsledky studie ukázaly zvýšenou expresi proteinu v plicích, ledvinách a ovariální nádorové

tkáni oproti normální zdravé tkáni. Daná studie se domnívala, že právě tyto výsledky by mohly být spojovány s vývojem nádorových onemocnění. Proto dále analyzovaly mRNA CENPK pomocí RT-PCR u tří normálních buněčných linií a u tří nádorových linií vaječníků CENPK. Byla zjištěna zvýšená exprese proteinu CENPK u buněčných linií karcinomů vaječníků – TOV-21G, OC314 a TOV-112D. Dále ve studii byla navržena a syntetizována CENPK siRNA sekvence, která knock-downovala efektivitu CENPK v buněčné karcinogenní linii vaječníků TOV-112D. Výsledky byly hodnoceny pomocí kvantitativní RT-PCR. Buňky, které byly transfekované pomocí siRNA CENPK vykazovaly sníženou transkripci mRNA CENPK ve srovnání se siRNA u netransfekovaných buněk, které byly použity jako kontrola. Pomocí RNAi bylo zjištěno, že buňky TOV-112D po transfekci mířené proti proteinu CENPK snížily svoji životaschopnost a významně došlo k snížení růstu buněk karcinomu vaječniku. Výsledky poukázaly, že protein CENPK má nejspíše onkogenní funkci v procesu rozvoje karcinomu plic (Lee a kol., 2015). CENPK patří mezi jeden z cílů miR-362-5p a byl již studován u problematiky NSCLC je možné, že právě daná miR se může podílet na regulaci CENPK u NSCLC.

Jako další predikovaný cíl pro danou miR byla identifikována AKT3. Akt se řadí mezi Ser/Thr kinázy a je zapojena do procesů buněčné proliferace a přežití. Savčí buňky exprimují tři různé izoformy: Akt1, Akt2 a Akt3, které ale mají vysokou sekvenční homologii. Ve studii byla zkoumána úloha Akt v mitochondriích specifickým knock-downem Akt v karcinomu močového měchýře a v buňkách plicního karcinomu A549. K významnému navýšení mitochondriální hmoty došlo při knock-downu izoform Akt1 a Akt3 v buněčných liniích karcinomu močového měchýře. K závažným mitochondriálním dysfunkcím a strukturálním změnám došlo při knock-downu Akt3. Akt3 mělo za následek snížení mitochondriální respirace. K zhoršení mitochondriální respirace došlo i při knockdown Akt3 u buněk karcinomu plic A549. Výsledky naznačily, že izoformy Akt jsou důležité pro správné fungování mitochondriální respirace v lidských nádorových buňkách. Zatím není znám přesný mechanismus mitochondriální funkce prostřednictvím Akt3, ale další studie by mohly poskytnout novou strategii pro léčbu nádorových onemocnění s cílením na rodinu proteinů Akt (Kim a kol., 2016). Doposud nejsou dostupné publikace zabývající se změnami exprese Akt3, který by mohly být spojeny regulací prostřednictvím miR-362-5p u NSCLC

Dalším identifikovaným cílem pro danou microRNA byl PKC α . Protein kináza C alfa je protein, který je zapojený do řady signálních drah u karcinomu plic. Ve studii Wanga a kolektivu (2013) bylo zjištěno, že PKC α je jeden z možných cílů pro miR-203. Experimentálně zjistili, že miR-203 je také přímým regulátorem PKC α . PKC α jako předpokládaný cíl miR-203 byl zjištěn pomocí

predikčních databází - TargetScan, PicTar a Miranda. V karcinomech plic byly zjištěny rozdílné exprese miR-203 a PKC α oproti normální plicní tkáni. Bylo zjištěno, že zacílení na PKC α prostřednictvím miR-203 hraje důležitou roli v regulaci procesů jako je buněčná proliferace, migrace buněk plicního karcinomu a apoptóze. Studie poukazuje, že snížením exprese PKC α prostřednictvím miR-203 vede k modulaci biologických procesů v buňkách plicního karcinomu. MiR-203 má v karcinomu plic sníženou expresi oproti normální plicní tkáni. Závěrem dané studie poukazuje na negativní regulaci PKC α prostřednictvím miR-203 u plicního karcinomu. Následná terapeutická strategie, která by vedla ke zvýšení exprese miR-203 nebo umlčení PKC α by mohla vést ku prospěchu pacientů s karcinomem plic (Wang a kol., 2013). Zajímavé je, že pozměněná exprese miR-203 se podílela na ovlivnění PKC α , proto je možné, že i miR-362-5p se může podílet na regulaci PKC α u NSCLC, tím že patří mezi jeden z jejich cílů.

Posledním z predikovaných cílů byl TGF β 2. Signální dráhy TGF- β jsou považovány za rozhodující mediátory v různých procesech buňky. Bylo zjištěno, že transformující růstový faktor- β je zapojený do onemocnění, která jsou spojována s imunitou. Signální dráha TGF- β je zapojena v procesech proliferace a diferenciaci buněk a v apoptóze. Je zapojený i do patologických procesů jako je astma, plicní fibróza, chronické onemocnění ledvin a rakovina.

Tři isoformy TGF- β 2 a TGF- β R2 ze tří TGF- β bývají spojovány s chronickým onemocněním ledvin a renální fibrózou. Zánětlivé procesy a fibrogenese vedou k selhávání ledvin a jejich následnému trvalému poškození. Studie se zabývala jednonukleotidovými polymorfismy u TGF- β R2 ve spojení s terminálním stadiem onemocnění ledvin. Výsledky dané studie mohou mít jistá omezení, protože byl použit menší soubor pacientů. Bylo zjištěno, že genomové varianty u TGF- β R2 mohou být spojovány s konečným stádiem onemocnění ledvin (Ki a kol., 2015). Prozatím nebyla nalezena vědecká publikace, která by se zabývala funkcí miR-362-5p ve spojení s NSCLC. Bylo by tedy vhodné danou microRNA více prostudovat v zapojení do progresu s NSCLC a také ve spojení s jejími predikovanými cíli.

Dalším studovanou microRNA byla miR-1244. Daná miR byla již studována ve spojitosti s karcinomem plic. Studie Li a kol. (2016) se zabývala klíčovou rolí miR-1244 v buněčné linii A549, jež byla rezistentní vůči cisplatině. Pomocí qRT-PCR byla posuzována exprese miR-1244 u buněčné linie A549 a u rezistentní buněčné linie A549 vůči cisplatině. MiR-1244 měla významně sníženou expresi v buněčné linii A549, jež byla rezistentní vůči cisplatině. Pomocí průtokové cytometrie byl dále sledován efekt miR-1244 na apoptózu. Množství apoptotických buněk bylo zvýšeno po

transfekci buněk linie A549/DDP danou miRNA. Toto zjištění naznačuje, že právě miR-1244 by mohla indukovat apoptózu v buňkách nemalobuněčného karcinomu plic. V dané studii se také zabývali molekulárními cíli miR-1244. Bylo zjištěno, že jeden z cílových genů miR-1244 vykazoval sníženou expresi především NEDD4. Při umlčení NEDD4 došlo k navýšení bazální hladiny TP53, což způsobilo větší odezvu na poškozenou DNA, proto také v této studii následně analyzovali hladinu exprese TP53 pomocí qPCR. TP53 je tumor supresorový gen, jenž se nachází v řadě nádorových onemocnění v mutovaném stavu. Je tomu tak i u karcinomu plic, podle dosavadních studií se domnívá, že právě mutace TP53 vede k získání nebo udržení lékové rezistence. Následně bylo zjištěno, že TP53 je byl nadměrně exprimován v buňkách linie A549/DDP při transfekci miR-1244. Dané výsledky ukázaly, že TP53 by mohl být jeden z cílových genů miR-1244. Závěr dané studie poukazuje na to, že signální dráhy, v nichž je miR-1244 zapojena, by mohl ukázat nový směr pro cílenou terapii výše uvedených karcinomů, jenž jsou chemorezistentní vůči léčbě (Li a kol., 2016).

Jedním z dalších predikovaných cílů dané mi RNA určena MAP3K2, která patří do rodiny proteinových kináz serin/threonin. Daná kináza často přednostně aktivuje jiné kinázy, které jsou zapojeny do signální dráhy MAP kinázy. MAP3K2 bývá u řady nádorových onemocnění zvýšeně exprimována. Doposud nejsou známy publikace zabývající se studiem miR-1244 ve spojení s MAP3K2 u NSCLC. Studie Yu (2015) zkoumala úlohu miR-520A-3P v rozvoji NSCLC a následné metastáze. Pomocí qRT-PCR byla zjištěna výrazně snížená exprese dané microRNA v nádoru v porovnání s okolní tkání. Pomocí bioinformatiky byl jako předpovídaný cílový gen pro miR-520A-3P identifikovaná právě kináza MAP3K2. Pomocí western blottingu byl prozkoumán molekulární mechanismus interakce miR-520A-3p, s MAP3K2. Daná interakce se uplatňuje v regulaci pro buněčné apoptózy, diferenciaci buněk a migraci buněk. Výsledky dané studie ukázaly, že zvýšená exprese miR-520A-3p může inhibovat expresi MAP3K2 a kaspázu 3 a tím podporovat expresi bcl-2. Opakem je pak inhibice miR-520A-3p, jenž vede k expresi proteinu MAP3K2 a kaspázy 3, a zároveň snížené expresi bcl-2. (Yu a kol., 2015).

Dalším identifikovaným cílem výše uvedené miRNA je tumor nekrotizující faktor α -indukovaný protein 8-like-2 (TNFAIP8L2 nebo TIPE2). Dosavadní publikace zabývající se studiem exprese daného proteinu ve vzorcích pacientů s NSCLC však nepopisují mechanismus interakce miR-1244 s TNFAIP8L2. Tento protein se řadí mezi členy rodiny TNFAIP8 rodiny, která patří mezi negativní regulátory přirozené a získané imunity. Některé studie poukázaly, že právě exprese toho proteinu

by mohla mít souvislost s agresivitou nádoru, metastazováním a tím i špatnou prognózou u pacientů s karcinomy (Li a kol., 2015; Wang a kol., 2017).

V daných studiích byla zjištěna snížená exprese TNFAIP8L2 u karcinomu plic ve srovnání se zdravou plicní tkání. Naopak při navýšení exprese daného proteinu došlo k snížení proliferace nádorových buněk a jejich invazivního potenciálu. Transfekce TIPE2 vedla k snížení anti-apoptotického proteinu Bcl-XL. Dané studie poukázaly také na to, že TIPE2 by mohl fungovat jako nádorový supresor v rozvoji nemalobuněčného karcinomu plic. (Li a kol., 2015; Wang a kol., 2017).

Dalším z identifikovaných cílů pro miR-1244 byl protein C9, který je součástí komplementu. Protein C9 byl identifikován jako jeden z možných cílů miR-1244. Její exprese je u NSCLC snížena. Z četných studií vyplývá, že se daná miR-1244 může podílet na ovlivnění funkce a procesů, do nichž je zapojen protein C9. Daný protein hraje klíčovou roli v regulaci přirozené a adaptivní imunity. Je známo, že nádorové buňky mají schopnost úniku před imunitním systémem. Jedním z mechanismů úniku je, že nádorové buňky exprimují inhibitory vázané na membráně, které je chrání před účinky komplementu. Komplement je součástí přirozené imunity. Buněčné linie NSCLC mají schopnost produkovat inhibitory komplementu jako je faktor I (FI), faktor H (FH) a C4b-vázací protein (C4BP). Dané inhibitory umožňují tedy nádorovým buňkám NSCLC zvýšenou ochranu před imunitním systémem (Okroj a kol., 2009).

Dalším identifikovaným cílem pro danou microRNA byl CCNE2. Cykliny E1 a E2 se podílí na řízení během buněčného cyklu mezi G1 a S fází. Doposud nejsou zveřejněny studie zabývající se miR-1244 ve spojení s cyklinem E2. Důležitá je však přítomnost a aktivace CDK2 k iniciaci replikace, která fosforyluje Rb protein a další cíle. V různých typech nádorových onemocnění byl cyklin E2 detekován ve vyšších hladinách oproti normálním tkáním. U nemalobuněčných karcinomů plic byla pozorována zvýšená exprese E2 (Chen a kol., 2015).

Posledním z identifikovaných cílů výše uvedené miRNA je IL33. Daný protein byl již studován ve spojitosti s NSCLC, ale doposud nejsou známi publikace zabývající se vztahem miR-1244 a IL-33. IL 33 patří do rodiny IL-1 cytokinů a uvolňuje se při poškození tkání. Primárně se podílí na indukci 2. typu imunitních reakcí. Exprese IL-33 probíhá převážně v jádře epitelálních buněk a endotelálních buněk U nemalobuněčného karcinomu plic byla zjištěna zvýšená exprese IL-33 oproti přilehlé nenádorové plicní tkáni (Wang a kol., 2016). Na druhou stranu studie Akimota a kol. (2016) poukázala na snížené množství IL-33 a IL1RL1 ve vzorcích karcinomu plic a v buňkách oproti normální tkáni a buňkám. Autoři také zjistili, že hladina transkriptu IL-33 a IL1RL1 byla nepřímo

úměrná se stádiem plicního karcinomu a s celkovým přežitím (Wasmer a kol., 2017; Wang a kol., 2016; Akimoto a kol., 2016).

Pro miR-1909 byly vybrány dva cíle Tspan9 a FOXO4. Tetraspaniny jsou proteiny patřící do rodiny glykoproteinů. Funkce tetraspaninů dosud nebyla příliš objasněna. Doposud nebyly zveřejněny žádné publikace týkající se interakce tetraspaninu 9 a miR-1909. Proto by bylo vhodné danou problematiku sledovat ve vzorcích pacientů s NSCLC. Ve vzorcích pacientů s karcinomem žaludku byla zjištěna snížená cytoplazmatická exprese v nádorových buňkách, oproti normální tkáni (Feng a kol., 2016).

FOXO4 patří do rodiny proteinů FOXO, která se skládá se čtyř členů: FOXO1, FOXO3, FOXO4 a FOXO6. Doposud nebyly publikovány studie zabývající se mechanismem vzájemné interakce miR-1909 a FOXO4 u NSCLC. Tyto proteiny používají doménu Forkhead box vázající různé sekvence, které mohou pozitivně a negativně regulovat genovou expresi. Pro zajímavost lze uvést, že jednou z microRNA, která je zvýšeně exprimovaná v buněčných liniích NSCLC a interaguje s FOXO4, je miRNA-150. Při porušení regulace signální dráhy miR-150-FOXO4 u myšího modelu plicního karcinomu došlo k nádorové transformaci a metastázování. Daná deregulace podporovala migraci nádorových buněk a EMT (Li a kol., 2016). Mohli bychom předpokládat možný mechanismus interakce mezi miR-1909 a FOXO4 u NSCLC, tak jako je tomu u výše zmíněné signální dráhy miR-150 a FOXO4.

Pro miR-3197 byly identifikovány dva cíle IGFBP5 a FOXP2. Inzulínový růstový faktor vázající protein 5 (IGFBP5) patří mezi členy rodiny, které patří mezi důležité regulátory IGF signální dráhy. Doposud nejsou známy studie zabývající se vztahem miR-3197 a IGFBP5 u NSCLC. Ve studiích prováděných na vzorcích prostatických karcinomů a karcinomů prsu bylo zjištěno, jak *in vivo*, tak *in vitro* se IGFBP5 podílí na podpoře růstu karcinomu prostaty. V myším modelu karcinomu prsu byly pozorovány 1,5krát vyšší hladiny toho proteinu oproti zdravé nenádorové prsní tkáni (Gregory a kol., 1999; Miyakoshi a kol., 2001; Hao a kol., 2004; Yu a kol., 2016).

Jako potenciální cílový gen pro miR-3197 byl identifikován protein FOXP2. Doposud nejsou známy studie zabývající se vztahem miR-3197 s FOXP2 u pacientů s NSCLC. Členové rodiny FOX bývají zapojeny do mnoha procesů zahrnující diferenciaci, proliferaci, apoptózu a invazi buněk. Právě ztráta nebo vyřazení funkce členů rodiny FOX může vést k rozvoji karcinogeneze. FOXP2 byl zkoumán u buněčné linie SGC7901 karcinomu žaludku. Exprese miR-190 se u karcinomu žaludku jevila významně vyšší oproti normálním epiteliálním buňkám žaludku a okolní tkáni. Výsledky také

ukázaly, že exprese FOXP2 byla v nádorové tkáni snižena oproti normální tkáni. Metody Western blotting a RT-PCR potvrdily, že zvýšená exprese miR-190 vede k snížení exprese FOXP2 a naopak snížená exprese miR-190 vedla k zvýšené expresi FOXP2 na úrovni proteinu. Testy potvrdily, že pozměněná exprese miR-190 u karcinomu žaludku by mohla vést k negativní regulaci FOXP2 a také přispět k rozvoji patologického procesu v signální dráze FOXP2 u karcinomu žaludku. Studie Jia a kol. (2016) se domnívá, že pozměněná exprese miR-190 se na patologických procesech u karcinomu žaludku může podílet prostřednictvím zapojení se do signální dráhy daného proteinu FOXP2, jenž byl identifikovaný jako jeden z jejich cílových genů. Pro ověření dalších faktů a výsledků v dané studii by bylo dobré rozšířit soubor vzorků, jak uvádí samotní autoři. Mohli bychom předpokládat obdobný vztah mezi miR-3197 a FOXP2 u NSCLC, což je potřeba ověřit v rámci dalších studií.

Další sledovanou microRNA v rámci naší studie je miR-4463. Potencionální cíle pro danou miR by mohly být CLDN1 a AMOT. Doposud nebyly publikovány studie, které by se zabývaly regulací miR-4463 ve spojení s CLDN1 u NSCLC. Klaudiny jsou velké adhezni molekuly podílející se na vytváření těsných spojů a fungující jako bariéra regulující průtok vody, iontů a různých makromolekul vedoucí k udržení homeostázy buněk. Byly zkoumány i u karcinomu plic a jsou předmětem více studií. Například u plicního adenokarcinomu bylo zjištěno, že pacienti s nižší hladinou exprese proteinů CLDN1, mají kratší dobu přežití, ve srovnání s pacienty s vyšší expesí daného proteinu. (Chao a kol., 2009; Zhang a kol., 2013). Ve studii Moldvay a kol. (2017) byly použity bronchiální karcinomu plic od pacientů s adenokarcinomem a spinocelulárním karcinomem. Ve studii bylo ukázáno, že snížená exprese CLDN1 vedla k horší prognóze u NSCLC, ale co je zajímavé, že se to týkalo pouze skupiny pacientů se spinocelulárním karcinomem plic. Co se týká celkového přežití pacientů s adenokarcinomem, tak zde nebyla nalezena žádná korelace ve spojení CLDN1, -2, -3, -4, -7.

Angiomotin (AMOT) je protein, který se podílí na regulaci angiogeneze, tím že zvyšuje migraci endoteliálních buněk, čímž se podílí na novotvorbě cév. AMOT má dvě isoformy p80 a p130, které se od sebe navzájem liší nepřítomností a přítomností N^o-terminální domény. Do signální dráhy Hippo-Yap / TAZ je zapojen i protein AMOT p130. Daná signální dráha ovlivňuje proliferaci, diferenciaci a apoptózu, proto je považována za zajímavý možný terapeutický cíl pro léčbu karcinomů. Protein AMOT nebyl u pacientů NSCLC ve spojení s miR-4463 doposud studován.

Studie publikovaná (Yu, 2013) se zabývala expresí AMOT p130 ve vzorcích adenokarcinomu plic a v přilehlém plicním parenchymu. Zvýšená exprese AMOT mRNA byla nalezena v normální plicní tkáni. Snížená exprese proteinu AMOT p130 se objevila u pacientů s adenokarcinomem plic, jež byli mladší <65 let. Bylo analyzováno i přežití jednotlivých pacientů. Skupina pacientů, u nichž nebyla exprese AMOT p130 významně pozměněná, vykazovali delší dobu přežití oproti pacientům se sníženou expresí AMOT p130 (Jang a kol., 2016).

Pro miR-660 byly identifikovány jako cíle ARHGAP36 a PCDH9. První protein patří do rodiny Rho GAP. Doposud nebyly publikovány žádné práce zabývající se interakcí mezi miR-660 a ARHGAP36 v primárních nádorech NSCLC. Jedná se o člena rodiny Rho GAP. Daný protein aktivuje signální dráhu Hedhehog (Hh/Gli), což může vést rozvoji některých nádorových onemocnění, protože daná signální dráha je klíčovým regulátorem při embryogenezi a u tkáňové homeostázy (Rack a kol., 2014; Eccles a kol., 2016).

Protokadherin 9 patří mezi členy rodiny protokadherinů a kadherinů. Jejich úkolem je zprostředkovávat adhezi mezi buňkami. Doposud nebyla publikována studie, která by se zabývala expresním profilem PCDH9 v závislosti na expresi miR-660 u pacientů s NSCLC. Protokadherin 9 byl zkoumán u maligních gliomů. Snížená exprese PCDH9 bývá spojována s horší prognózou u pacientů s maligním gliomem (Wang a kol., 2017). Vyřazením z funkce PCDH9 u gliomových buněčných linií vedlo k zhoršení nádorového fenotypu. Ve studii Wanga a kol. (2017) byl zkoumán vztah mezi miR-215-5p, která se nacházela ve zvýšené expresi u gliomů spolu s PCDH9, který se zde nacházel ve snížené expresi ve srovnání s normální mozkovou tkání. PCDH9 byl také zjištěn jako jeden z potencionálních cílů pro miR-215-5p, která se nejspíše zaměřuje na 3' UTR oblast PCDH9. Bylo zjištěno, že MiR-215-5p se podílela na inhibici exprese PCDH9 v buněčné linii gliomu.

Další významnou microRNA byla miR-4433 a její identifikované cíle byly TP53INP2 a CYTH3. Doposud nebyla publikována studie zabývající se expresí TP53INP2 a jejím ovlivněním prostřednictvím miR-4433 u NSCLC. Tumorový protein p53 indukovaný jaderným proteinem 2 TP53INP2. je funkčním proteinem podílejícím se na regulaci transkripci a také přispívá k regulaci bazální autofágie. Studie Hu a kol. (2017) prokázala snížení počtu autofagozomů a vyšší schopnost proliferace ve spojení se sníženou expresí TP53INP2 u buněčných linií derivovaných z liposarkomu. (Hu a kol., 2017).

Cytohezin 3 je jeden z vysoce homologních členů rodiny Cytohezinů, které jsou vícedoménové cytoplazmatické proteiny zapužené v četných fyziologických i patologických

procesech Fu a kol. (2014). Cytoheziny jsou významné jako cytoplazmatické aktivátory receptoru tyrozin kinázy signalizace u epidermálního růstového faktoru a inzulinového receptoru. Nebyly nalezeny žádné publikace týkající se změn exprese Cytohezinu 3 prostřednictvím miR-4433 u pacientů s NSCLC.

Pro miR-4774-3p byly jako cílové geny identifikovány SEPT7 a PCDH9. Septiny jsou proteiny. Udržují konzervovanou roli v cytokinezi, jsou zapojeny do mnoha buněčných funkcí jako je segregace chromozomů, opravy DNA, apoptóza či migrace. Jsou také spojovány s fyziologickými či patologickými procesy. Septiny se do popředí dostávají i z důvodu studia s nádorovými onemocněními. Například SEPT9 byl zkoumán u lidských nádorů a byl identifikovaný jako jeden z onkogenů u karcinomu vaječnicků, hlavy a krku (Vardi-Oknin a kol., 2013). Studie Zhanga a kol. (2016) se zabývala úlohou septinů v procesech migrace a invaze buněk u karcinomu prsu. Z výsledků dané studie bylo zjištěno, že SEPT7 a SEPT2 se chovaly jako onkogeny v regulaci karcinomu prsu přes aktivaci signální dráhy ERK. Ve studii bylo prokázáno, že SEPT2 a SEPT7 se podílí na podpoření účinku proliferace, migrace a invaze u karcinomu prsu (Zhang a kol., 2016). Septin 7 nebyl doposud studován u nemalobuněčného karcinomu ve spojení s miR-4774-3p.

Protokadherin 9 patří mezi členy rodiny protokadherinů a kadherinů. Jejich úkolem je zprostředkovávat adhezi mezi buňkami. Protokadherin 9 byl zkoumán u maligních gliomů. Nejsou doposud znami publikace zabývající se přímo vztahem mezi miR-4774-3pa protokadherinu 9 u NSCLC.

Pomocí databází Targetscan a miRBD byl zjištěn jako predikovaný cíl PCDH9 pro miR-215-5p, která se nejspíše zaměřuje na 3' UTR oblast PCDH9. MiR-215-5p se podílela na inhibici exprese PCDH9 v buněčné linii gliomu. Agresivní fenotyp buněčné linie gliomu byl podpořen miR-215-5p inhibicí exprese PCDH9, protože PCDH9 hraje důležitou roli v proliferaci, tvorbě nádorů av apoptóze. Pomocí luciferázového testu bylo zjištěno, že cílem miR-215-5p je promotor a 3' UTR oblast PCDH9 a z daného zjištění vyplývá, že miR-215-5p inhibuje expresi PCDH9 na úrovni transkripční a posttranskripční (Wang a kol., 2017). U NSCLC nebyla nalezena publikace zabývající se ovlivněním exprese PCDH9 prostřednictvím miR-4774-3p, jenž na daný protein cílí a je schopna jej do jisté míry ovlivnit. Mohli bychom předpokládat možný mechanismus interakce mezi miR-4774-3pa PCDH9, tak jako je tomu u výše zmíněné miR-215-5p a PCDH9.

Predikované cíle pro miR-4659b-5p byly RSF1 a VASH2. Některé studie ukázaly, že vyšší hladiny mRNA nebo proteinu RSF1 jsou spojovány s nejagresivnějším typem karcinomu vaječnicku.

Protein RSF1 byl studován u NSCLC, ale stále není dostatek studií zabývajících se přímým významem miR-4659b-5p a RSF1 u NSCLC. Studie se zabývala expresí a biologickou funkcí RSF1 u nemalobuněčného karcinomu plic. Hladiny exprese mRNA RSF1 se nacházely ve zvýšené hladině u tkání nemalobuněčného karcinomu plic oproti hladině exprese mRNA RSF1 v normální přilehlé plicní tkáni. Při umlčení RSF1 u buněčných linií H1299 a buněk H460, které předtím vykazovaly vysoké hladiny exprese RSF1 došlo k snížení schopnosti růstu kolonií u buněk nádorových linií. Dané zjištění naznačuje, že RSF1 by mohl podporovat růst buněk karcinomu plic. Při umlčení RSF1 došlo také k snížení hladin fosfo-ERK. Tento výsledek naznačuje, že RSF-1 nejspíše moduluje růst buněk karcinomu plic prostřednictvím aktivace ERK. Proto by RSF-1 mohl být považován za jednoho z kandidátů pro terapeutické cíle u karcinomu plic (Li a kol., 2012). Jak je již zmíněno výše, tak RSF1 byl již u NSCLC studován, ale co se týká spojitosti s miR-4659b-5p, pro niž je protein jedním z cílů, tak nebyly nalezeny žádné publikace týkající se této problematiky.

Vasohibin zahrnuje dva členy, Vasohibin 1 a 2. Vasohibin 1 byl nalezen v cytoplazmě endoteliálních buněk. Byl identifikován jako negativní regulátor angiogeneze. Vasohibin 2 je považován za homologa VASH1. Ve studii Tu a kol. (2017) byla zkoumána exprese Vasohibinu 2 a byl zkoumán jeho mechanismus a funkce na *in vitro* a *in vivo* modelech. Pomocí imunohistochemie byly barveny tkáně pacientů s karcinomem slinivky břišní. Bylo zjištěno, že pacienti s karcinomem pankreatu, kteří byli léčeni chemoterapií gemcitabinem, vykazovali negativní nebo jen slabé barvení VASH2 a také měli výrazně lepší přežití než pacienti, kteří nebyli léčeni chemoterapií. U vzorků karcinomu slinivky břišní se střední až vysokou expresí VASH2 nebyly pozorovány rozdíly v přežití pacientů mezi těmi, kteří absolvovali chemoterapii a mezi těmi, kteří nebyli léčeni. Ve studii bylo provedeno další zhodnocení účinku VASH2 na citlivost pankreatických buněk nádoru k chemoterapii. Byly vytvořeny nádorové buňky pankreatu, které nadměrně exprimovaly VASH2 jednalo se o PANC-1 -VASH2 a buňky pankreatu, které měly výrazně sníženou expresi VASH2 prostřednictvím vlásenkové RNA tedy SW1990-shVASH2. Pomocí imunoblottingu bylo zjištěno, že u buněk SW1990-shVASH2, které měly umlčený VASH2, došlo k vyšší citlivosti na gemcitabin a k zvýšení apoptózy oproti buňkám PANC-1 -VASH2. *In vivo* studie byla provedena na myších. Metabolismu gemcitabinu souvisí s RRM2, který byl zvýšeně exprimován u modelu se zvýšenou expresí VASH2. Naopak u buněčné linie s umlčením VASH2 byla hladina exprese RRM2 snižená. Pomocí imunohistochemie byla ukázána pozitivní souvislost mezi expresí VASH2 a s RRM2 u buněk karcinomu slinivky. Z daných výsledků podle studie vyplývá, že VASH2 je schopen přes zvýšenou expresi RRM2 navodit rezistenci vůči gemcitabinu u buněk karcinomu pankreatu. Nový cíl pro anti-

chemorezistenci terapie gemcitabunem by mohl představovat právě VASH2 u buněk karcinomu pankreatu. Výsledky studie poukázaly na zvýšenou expresi VASH2 v pankreatických buňkách tumoru oproti přilehlé zdravé tkáni. Tato pozměněná exprese byla spojena i s vyšším stupněm karcinomu (Tu a kol., 2017). Doposud nebyla nalezena žádná publikace zabývající se expresí a interakcí VASH2 a 4774-3pu NSCLC.

Poslední významnou microRNA v rámci mikročipové analýzy byla miR-26b, která již dříve byla studována ve spojitosti s karcinomem plic. Liang a kol. (2015) studoval pomocí reverzní transkriptázové polymerázové reakce hladiny miR-26b ve čtyřech buněčných liniích H1299, A549, H661, H1703 a u 10 vzorků pacientů s NSCLC. Bylo také zkoumáno, zda tumor supresorový gen PTEN je přímým cílem miR-26b. PTEN se nachází ve snížené expresi u NSCLC, což následně vede k invazi buněk a zvýšenému růstu nádoru. Při transfekci buněčných linií NSCLC vektorem sekvence PTEN nám analýza pomocí Western blotu ukázala zvýšenou expresi miR-26b v buněčných liniích H1299 a A549 oproti kontrolní nenádorové buněčné linii. Tedy zvýšená exprese PTEN mění účinek miR-26b u NSCLC. Zajímavým zjištěním je, že miR-26b u karcinomu prsu se nachází exprimována v nízkých hladinách, což vede k snížení životaschopnosti buněk a následné indukci apoptózy. U karcinomu prsu miR-26b funguje jako tumor supresorový gen. Ve studii a výsledcích Ling a kol. (2015) miR-26b má onkogenní roli u NSCLC. Rozdílnost výsledků role miR-26b různých typů karcinomu je možno dáno složitým zapojením do signálních drah (Liu a kol., 2011; Liang a kol., 2015; Soria a kol., 2002; Zhang a kol., 2010).

Pro miR-26b byly jako predikované cíle identifikovány AMOT a CDK2AP1. Jak je již psáno výše u miR-4463, tak angiominin je protein, který se podílí na regulaci angiogeneze, tím že zvyšuje migraci u endoteliálních buněk. Nebyla nalezena studie zabývající se miR-26b ovlivněním exprese AMOT v NSCLC.

CDK2AP1 podle některých studií funguje jako inhibitor CDK2, který má vliv na přechod mezi fázemi G1/S v buněčném cyklu. Některé studie poukazují na to, že právě exprese CDK2AP1 koreluje s metastázami a přežitím pacientů se spinocelulárním karcinomem hrtanu Zhong a Xiong (2015). U NSCLC nebyla nalezena publikace zabývající se ovlivněním exprese CDK2AP1 prostřednictvím miR-26b, jenž na daný protein cílí a je schopna jej do jisté míry ovlivnit.

Dalším cílem naší práce bylo hodnocení heterogenity exprese miR-21 a miR-34a v centrální a periferní oblasti adenokarcinomu plic a v přilehlé normální plicní tkáni. Pro experiment byly použity čtyři vzorky adenokarcinomu plic pocházejícího od jednoho

pacienta. Tyto vzorky byly fixované formalínem a zalité v parafínu. Dva vzorky pocházely z periferní oblasti, jeden vzorek z centrální části a jeden vzorek nenádorového plicního tkaniva.

Z našich výsledků nebyla zjištěna žádná exprese tumor supresorové miR-34a v nádorové oblasti a ani u normálního tkaniva, proto nebylo možné porovnat rozdíly v expresi mezi jednotlivými oblastmi tumoru. Výrazné barevné rozdíly jsme okometricky pozorovali u miR-21, která má onkogenní charakter. Exprese miR-21 byla výrazná v centrální části tumoru. V periferní oblasti byla exprese nižší a v normálním plicním tkanivu jsme nepozorovali téměř žádnou expresi.

Naše výsledky jsou v souladu se závěry výše uvedených studií o heterogenitě exprese jednotlivých typů miRNA u karcinomu prsu. Podle našich poznatků studie prokazující heterogenní expresi jednotlivých typů miRNA, nebyla u NSCLC doposud publikována.

7 Závěr

V teoretické části byla vypracována literární rešerše zabývající se doposud publikovanými poznatky o molekulárních mechanismech zapojení microRNA do patogeneze nádorových onemocnění především nemalobuněčného karcinomu plic. V rámci dané rešerše jsem se zaměřila na oblast mnohočetné lékové rezistence, nádorové heterogenity a odhadu metastatického potenciálu.

V experimentální části byla provedena izolace RNA pocházející od pacientů NSCLC, u kterých se vyskytovaly metastázy v lymfatických uzlinách a od pacientů s NSCLC, u kterých se dané metastázy nevyskytovaly. Získaná RNA byla následně použita pro mikročipovou analýzu. Následně bylo ze získaných výsledků vybráno deset microRNA, jejichž exprese se statisticky nejvíce lišila u pacientů s metastázemi do lymfatických uzlin a u pacientů bez metastáz do lymfatických uzlin. Pro deset vybraných microRNA byly pomocí databází MiRDB a Targetscan vyhledány cílové geny, na jejichž regulaci by semohly podílet právě vybrané microRNA. Pro sledování nádorové heterogenity NSCLC byla provedena in situ hybridizace v rámci jednoho pacienta s adenoskvamozním karcinomem. U miR-34a nebyla zjištěna žádná exprese v nádorové tkáni a ani u normálního tkaniva, proto nebylo možné porovnat rozdíly v expresi. Výraznou heterogenitu v expresi jsme pozorovali u miR-21, která se vyskytovala v centrální části tumoru. V periferní oblasti byla exprese již nižší a v normálním plicním tkanivu jsme pozorovali pouze minimální expresi.

Závěrem této práce je, že exprese miR-362-5p, miR-1244, miR-1909, miR-3197, miR-4463, miR-660, miR-4433, miR-4774-3p, miR-4659b-5p, miR-26b se výrazně lišily u nádorů s metastázami v porovnání s nádory bez metastáz. Snížené hladiny exprese miR-1909, miR-3197, miR-4463, miR-4433, miR-4774-3p a miR-4659b-5p byly zjištěny ze vzorků u pacientů s metastázemi do lymfatických uzlin oproti zvýšené expresi daných microRNA u pacientů bez metastáz. MiR-362-5p, miR-1244, miR-660 a miR-26b byla zvýšená exprese u vzorků pacientů s metastázemi do lymfatických uzlin oproti snížené expresi těchto microRNA u pacientů bez metastáz. Toto zjištění by dále mohlo dopomoci k dalšímu výzkumu mechanismu biologického účinku daných microRNA při studii progresu NSCLC. Výsledky získané sledování exprese miR-21 a miR-34a jsou v souladu se závěry uvedených studií o heterogenitě exprese jednotlivých typů miRNA u karcinomu prsu. Podle našich poznatků studie prokazující heterogenní expresi jednotlivých typů miRNA u NSCLC nebyla doposud publikována.

Výše uvedené získané výsledky budou ověřené na větším souboru pacientů v prospektivní studii.

8 Seznam zkratek

ADC –adenokarcinom

AGO - argonautová rodina

AKT –homolog virového onkogenu v-akt odvozeného od myšího thymonu

AKT3 –homolog 3 virového onkogenu v-akt odvozeného od myšího thymonu

ALK –receptorová tyrozin-kináza u anaplastického lymfomu

AMOT – angiomotin

ARHGAP36 – Rho GTPáza aktivační protein 3

BCL2 – negativní regulátor apoptózy (B-cell leukemia/lymphoma 2)

BCL-XL –protein podobný BCL2 typ 1 (BCL2-like 1)

C9 –komponenta komplementu 9

CASP7 – kaspáza 7

CASP3 –kaspáza 3

CCNE2 –cyklin E2

CDK6 –cyklin-dependentní kináza 6

CDK2AP1 – cyklin dependentní kináza asociována s proteinem 1

CDKN2A –inhibitor cylin-dependetní kinázy 2A

CENPK – centromerický protein K

CLDN1 –kludin 1

CLL - chronická lymfocytární leukémie

c-MET – protoonkogen MET (receptor pro hepatocytární růstový faktor)

CYTH3 – cytohezin 3

DEPC - diethyl pyrokarbonát

DGCR8 – DiGeorge syndrome critical region gene 8

DNMT1 –DNA metyl-tranferáza 1

E2F – E2F transkripční faktor

E2F1 –E2F transkripční faktor 1

EGF – epidermální růstový faktor

EGFL7 –epidermální růstový faktor obsahující doménu 7

EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor

EMT - epiteliálně-mezenchiální tranzice

FAS –člen 6 rodiny receptorů nádorových nektotických faktorů

FOXO4 –transkripční faktor O typu „forkhead“ 4

FOXP2 - forkhead box P2

HIF – hypoxií indukovaný faktor

IGFBP5 –inzulínový růstový faktor vazací protein 5

IRS-1 - inzulínový receptor-substrát 1

IL-10 – interleukin 10

IL-12 –interleukin 12

IL-33 – interleukin 33

ISH – In situ hybridizace

ITGA5 –intergrin, α 5

KRAS –lidský homolog virového onkogenu v-Ki-ras2 izolovaného z krysího Kirsten sarkomu

LCC – velkobuněčný karcinom

LIN28B –RNA-vazebný protein LIN28

LU – lymfatické uzliny

MAP3K2 –mitogenem aktivovaná protein kináza kináza 11

MHG2 - High mobility group2

mRNA – mediátorová RNA

miR – microRNA

miRNA – microRNA

MUC1 - mucin 1

MYC – homolog virového onkogenu v-myb izolovaný z myeloblastózy

MYCN – N-MYC protoonkogen

NF- κ B – jaderný faktor κ B

NHBE –Human Bronchial Epithelial Cells

NSCLC –Non Small Cell Lung Cancer – Nematobuněčný karcinom plic

P16INKa –inhibitor 2A cyklin dependentní kinázy

P27KIP1 – inhibitor cyklin-dependentní kinázy 1B

P53 –protein 53

PACT –interferonem indukovaný aktivátor závislý na dvouřetězcové RNA

PCDH9 –protokadherin 9

PDCC4 - protein programované buněčné smrti 4

PDGFR – receptor pro růstový faktor odvozený od krevních destiček

PI3K –fosfatidylinositol-3 -kináza

PKC – protein kináza C

PKC α – protein kináza C alfa

PTEN –fosfátázový a tenzinový homolog

qRT-PCR –kvantitativní reverzně transkriptázová polymérazová reakce

RAS – onkogen RAS

RAF - Ras-associated factor

RB – protein asociovaný s retinoblastomem

RDX – radixin

RECK –protein bohatý na cystein s kazalovými motivy

RHOA – člen A rodiny proteinů podobných RAS

RSF1 - remodeling and spacing factor 1

RT – laboratorní teplota

RT-PCR –revertálně transkriptázová polymerázová řetězová reakce

SCC - spinocelulární karcinom

SEPT7 – septin 7

SMAD4 –lidský homolog genu DPP u Drosophila melanogaster

SNP – jednonukleotidové polymorfismy

SSC – spinocelulární karcinom

SUCNR1 –sukninátový receptor 1

TGFB2 –transformující růstový faktor β 2

TGF β R2 –receptor pro transformující růstový faktor β 2

TNF α – tumor nekrotizující faktor alfa

TNFAIP8L2 –tumor nekrotizující faktor alfa indukující protein 8 -like 2

TP53INP2 - Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 2

TRAIL –člen 10 nadrodiny tumor-nekrotizujících faktorů

TRBP – RNA vazebný protein transaktivující HIV-1 odpověď

TSPAN9 – tetraspanin 9

UTR – netranslatovaná oblast

VASH2 –vasohibin 2

VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor

VEGFR - vaskulární endoteliální růstový faktor

XPO5 – exportin 5

XRN2 – 5'-3' exoribonukleaza2

ZEB1/2 –homeobox vázající E-box zinkového prstu 1 /2

9 Seznam citací

Akimoto M., Hayashi J. I., Nakae S., Saito H., Takenaga K. (2016) Interleukin-33 enhances programmed oncosis of ST2L-positive low-metastatic cells in the tumour microenvironment of lung cancer. *Cell Death and Disease* **7**, e2057.

Alvarellos M. L., Lamba J., Sangkuhl K., Thorn C. F., Wang L., Klein D. J., Altman R. B., Klein T. E. (2014) PharmGKB summary: Gemcitabine Pathway. *Pharmacogenet Genomics* **24**, 564-574.

Bommer G. T., Gerin I., Feng Y., Kaczorowski A. J., Kuick R., Love R. E., Zhai Y., Giordano T. J., Qin Z. S., Moore B. B., MacDougald O. A., Cho K. R., Fearon E. R. (2007) p53-Mediated Activation of miRNA34 Candidate Tumor-Suppressor Genes. *Current Biology* **17**, 1298-1307.

Blanco-Aparicio C., Renner O., Leal J. F. M., Carnero A. (2007) PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* **28**, 1379-1386.

Bracken C. P., Gregory P. A., Kolesnikoff N., Bert A. G., Wang J., Shannon M. F., Goodall G. J. (2008) A Double-Negative Feedback Loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 Family Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer Research* **68**, 7846-7854.

Brock A., Chang H., Huang S. (2009) Non-genetic heterogeneity — a mutation-independent driving force for the somatic evolution of tumours, *Nature Reviews Genetics* **10**, 336-342.

Boye S. N. (2012) MicroRNA In Situ Hybridization, Next-Generation MicroRNA Expression Profiling Technology. *Methods in Molecular Biology* **822**, 67-84.

Cai X., Hagedorn C. H., Cullen B. R. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA a publication of the RNA society* **10**, 1957-1966.

Calin G. A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Kanti R., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C. M. (2002) Frequent deletions and down-

regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 15524-15529.

Calin G. A., Sevignani C., Dumitru C. D., Hyslop T., Noch E., Yendamuri S., Shimizu M., Rattan S., Bullrich F., Negrini M., Croce C. M. (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **101**, 2999-3004.

Campisi J. (2005) Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. *Cell press* **120**, 513-522.

Camps C., Buffa F. M., Colella S., Moore J., Sotiriou C., Sheldon H., Harris A. L., Gleadle J. G., Ragoussis J. (2008) hsa-miR-210 Is Induced by Hypoxia and Is an Independent Prognostic Factor in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* **14**, 1340-1348.

Chan E., Prado D. E., Weidhaas J. B. (2011) Cancer microRNAs: From subtype profiling to predictors of response to therapy. *Trends in Molecular Medicine* **17**, 235-243.

Chan J. A., Krichevsky A. M., Kosik K. S. (2005) MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Research* **65**, 6029-6033.

Chang T-C., Wentzel E. A., Kent O. A., Ramachandran K., Mullendore M., Lee K. H., Feldmann G., Yamakuchi M., Ferlito M., Lowenstein C. J., Arking D. E., Beer M. A., Maitra A., Mendell J. T. (2007) Transactivation of miR-34a by p53 Broadly Influences Gene Expression and Promotes Apoptosis. *Molecular Cell* **26**, 745-752.

Chao Y-C., Pan S-H., Yang S-C., Yu S-L., Che T-F., Lin C-W., Tsai M-S., Chang G-C., Wu C-H., Wu Y-Y., Lee Y-C., Hong T-M., Yang P-C. (2009) Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **179**, 123-133.

Chatterjee S., Fasler M., Büssing I., Großhans H. (2011) Target-Mediated Protection of Endogenous MicroRNAs in *C. elegans*. *Developmental Cell* **20**, 388-396.

Chen D., Guo W., Qiu Z., Wang Q., Li Y., Liang L., Liu L., Huang S., Zhao Y., He X. (2015) MicroRNA-30d-5p inhibits tumour cell proliferation and motility by directly targeting CCNE2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Letters* **362**, 208-217.

Chen Z-Y., Zhonga W-Z., Zhanga X-C., Sua J., Yanga X-N., Chena Z-H., Yanga J-J., Zhoua Q., YanaH-H., Ana S-J., Chena H-J., Jianga B-Y., Mokb T. S., Wua Y-L. (2012) EGFR Mutation Heterogeneity and the Mixed Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors of Lung Adenocarcinomas. *The Oncologist* **17**, 978-985.

Chu I.M., Hengst L., Slingerland J.M. (2008) The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **8**, 253-267.

Cui R., Meng W., Sun H-L., Kim T., Ye Z., Fassan M., Jeon Y-J., Li B., Vicentini C., Peng Y., Lee T. J., Luo Z., Liu L., Xu D., Tili E., Jin V., Middleton J., Chakravarti A., Lautenschlaeger T., Crocea C. M. (2015) MicroRNA-224 promotes tumor progression in nonsmall cell lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **112**, 4288-4297.

Coller H. A., Forman J. J., Legesse-Miller A. (2007) "Myc'ed Messages": Myc Induces Transcription of E2F1 while Inhibiting Its Translation via a microRNA Polycistron. *PLoS Genetics* **3**, e146.

Cory S. a Adams J. M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* **2**, 647-656.

Coulouarn C., Factor V. M., Andersen J. B., Durkin M. E., Thorgeirsson S.S. (2009) Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* **28**, 3526-3536.

Crujisen H., Giaccone G., Hoekman K. (2005) Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies. *International Journal of Cancer* **117**,883-888.

Danial N. N. a Korsmeyer S. J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* **16**, 205-219.

Davidson M. R., Larsen J. E., Yang I. A., Hayward N. K., Clarke B. E., Duhig E. E., Passmore L. H., Bowman R. V., Fong K. M. (2010) MicroRNA-218 Is Deleted and Downregulated in Lung Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* **5**, e12560.

Diederichs S., Haber D. A. (2007) Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell press* **131**, 1097-1108.

Dykxhoorn D. M. (2010) MicroRNAs and Metastasis: Little RNAs Go a Long Way. *Cancer Research* **70**, 6401-6406.

Eccles R. L., Czajkowski M. T., Barth C., Müller P. M., McShane E., Grunwald S., Beaudette P., Mecklenburg N., Volkmer R., Zühlke K., Dittmar G., Selbach M., Hammes A., Daumke O., Klussmann E., Urbé S., Rocks O. (2016) Bimodal antagonism of PKA signalling by ARHGAP36, *Nature Communications* **7**, 12963.

Eide H. A., Halvorsen A. R., Bjaanæs M. M., Piri H., Holm R., Solberg S., Jørgensen L., Brustugun O. T., Kiserud C. E., Helland Å. (2016) The MYCN-HMGA2-CDKN2A pathway in non-small cell lung carcinoma—differences in histological subtypes. *BioMedCentral Cancer* **16**, 1-12.

Faraonia I., Antonettib F. R., Cardonea J., Bonmassarb E. (2009) miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1792**, 497-505.

Feng T., Sun L., Qi W., Pan F., Lv J., Guo J., Zhao S., Ding A., Qiu W. (2016) Prognostic significance of Tspan9 in gastric cancer. *Molecular and Clinical Oncology* **5**, 231-236

Fish J. E., Santoro M. M., Morton S. U., Yu S., Yeh R -F., Wythe J. D., Ivey K. N., Bruneau B. G., Stainier D. Y. R., Srivastava D. (2008) miR-126 Regulates Angiogenic Signaling and Vascular Integrity. *Developmental Cell* **15**, 272-284.

Fornari F., Gramantieri L., Ferracin M., Veronese A., Sabbioni S., Calin G. A., Grazi G.L., Giovannini C., Croce C.M., Bolondi L., Negrini M. (2008) MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **27**, 5651-5661.

Foss K. M., Sima C., Ugolini D., Neri M., Allen K. E., Weiss G. J. (2011) miR-1254 and miR-574-5p: Serum-Based microRNA Biomarkers for Early-Stage Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* **6**, 482-488.

Fu Y., Li J., Feng M-X., Yang X-M., Wang Y-H., Zhang Y-L., Qin W., Xia Q., Zhang Z-G. (2014) Cytohesin-3 is upregulated in hepatocellular carcinoma and contributes to tumor growth and vascular invasion. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **7**, 2123-2132.

Gerashchenko T. S., Denisov E.V., Litviakov N.V., Zavyalova M. V., Vtorushin S. V., Tsyganov M. M., Perelmuter V. M., Cherdyntseva N. V. (2013) Intratumor heterogeneity: Nature and biological significance. *Biochemistry* **78**, 1201-1215.

Gilissen J., Jouret F., Pirotte B., Hanson J. (2016) Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function. *Pharmacology & Therapeutics* **159**, 56–65.

Gregory C. W., Kim D., Ye P., Ercole A. J., Pretlow T. G., Mohler J. L., French F. S. (1999) Androgen receptor up-regulates insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) expression in a human prostate cancer xenograft. *Endocrinology* **140**, 2372-2381.

Gregory P. A., Bert A. G., Paterson E. L., Barry S. C., Tsykin A., Farshid G., Vadas M. A., Khew-Goodall Y., Goodall G. J. (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology* **10**, 593-601.

Gregory R. I., Yan K-P., Amuthan G., Chendrimada T., Doratotaj B., Cooch N., Shiekhattar R. (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235-240.

GuanP., YinZ., LiX., WuW.,ZhouB. (2012) Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **31**, 1-8.

Haase A. D., Jaskiewicz L., Zhang H., Lainé S., Sack R., Gatignol A., Filipowicz W. (2005) TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO reports* **6**, 961-967.

Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57-70.

Hanahan D., Weinberg R.A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674.

Hao X., Sun B., Hu L., Lähdesmäki H., Dunmire V., Feng Y. (2004) Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis. *Cancer* **100**, 1110–1122.

He L., He X., Lim L.P., Stanchina E., Xuan Z., Liang Y., Xue W., Zender L., Magnus J., Ridzon D., Jackson A. L., Linsley P.S., Chen C., Lowe S.W., Cleary M. A., Hannon G. J. (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* **447**, 1130-1134.

Hermeking H. (2007) p53 Enters the MicroRNA World, *Cancer Cell* **12**, 414–418.

Hong J. H., Roh K. S., Suh S-S., Lee S., Sung S. W., Park J. K., Byun J. H., Kang J. H. (2015) The expression of microRNA-34a is inversely correlated with c-MET and CDK6 and has a prognostic significance in lung adenocarcinoma patients. *Tumor Biology* **36**, 9327-9337.

- Hu Y., Li X., Xue W., Pang J., Meng Y., Shen Y., Xu Q. (2017) TP53INP2-related basal autophagy is involved in the growth and malignant progression in human liposarcoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **88**, 562-568.
- Huang Z., Gan J., Long Z., Guo G., Shi X., Wang C., Zang Y., Ding Z., Chen J., Zhang J., Dong L. (2016) Targeted delivery of let-7b to reprogramme tumor-associated macrophages and tumor infiltrating dendritic cells for tumor rejection. *Biomaterials* **90**, 72-84.
- Hutvagner G., Simard M. J. (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 22-32.
- Iaquinta P.J., Jacqueline A. Lees. (2007) Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 649-657.
- Itahana K., Dimri G., Campisi J. (2001) Regulation of cellular senescence by p53. *The FEBS Journal* **268**, 2784-2791.
- Jang S-H., Cho H-D., Lee J-H., Lee H.J., Hong S.A., Cho J., Kim H.J., Oh M-H. (2016) Reduced angiotensin p130 expression correlates with poor prognosis in lung adenocarcinoma. *The Journal of Clinical Pathology*, 1-7.
- Jia W-Z., Yu T., An Q., Yang H., Zhang Z., Liu X., Xiao G. (2016) MicroRNA-190 regulates FOXP2 genes in human gastric cancer. *Oncotargets and Therapy* **9**, 3643–3651.
- Johnson S.M., Grosshans H., Shingara J. B., Jarvis R., Cheng A., Labourier E., Reinert K. L., Brown D., Slack F. J. (2005) RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. *Cell* **120**, 635-647.
- Jørgensen S., Baker A., Møller S., Nielsen B. S. (2010) Robust one-day in situ hybridization protocol for detection of microRNAs in paraffin samples using LNA probes. *Methods* **52**, 375-381.
- Karube Y., Tanaka H., Osada H., Tomida S., Tatematsu Y., Yanagisawa K., Yatabe Y., Takamizawa J., Miyoshi S., Mitsudomi T., Takahashi T. (2005) Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer science* **96**, 111-115.
- Ki H -J., Kim S.Y., Lee S.H., Moon J-Y., Jeong K.H., Lee T.W., Ihm C.G., Kim S.K., Chung J-H., Kang S.W., Kim T.H., Kim Y-H., Kim Y -G. (2015) Transforming growth factor- β receptor 2 gene polymorphisms are associated with end-stage renal disease. *Kidney Research and Clinical Practice* **34**, 93-97.

- Kim M., Kim YY., Jee HJ., Bae SS., Jeong NY., Um JH., Yun J. (2016) Akt3 knockdown induces mitochondrial dysfunction in human cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **48**, 447-453.
- Koh V., Kwan H. Y., Tan W. L., Mah T. L., Yong W. P. (2016) Knockdown of POLA2 increases gemcitabine resistance in lung cancer cells, *BioMed Central Genomics* **17**, 87-96.
- Krol J., Loedige I., Filipowicz W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics* **11**, 597-610.
- Kulshreshtha R., Ferracin M., Wojcik S.E., Garzon R., Alder H., Agosto-Perez F.J., Davuluri R., Liu Ch-G., Croce C.M., Negrini M., Calin G.A., Ivan M. (2007) A MicroRNA Signature of Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 1859-1867.
- Lau N. C., Lim L. P., Weinstein E. G., Bartel D. P. (2001) An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 858-862.
- Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854.
- Lee Y., Hur I., Park S-Y., Kim Y-K., Suh M.R., Kim V. N. (2006) The role of PACT in the RNA silencing pathway. *The EMBO Journals* **25**, 522-532.
- Lee Y., Jeon K., Lee J-T., Kim S.V., Kim V.N. (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal* **21**, 4663-4670.
- Lee Y-C., Huang C-C., Lin D-Y., Chang W-C., Lee K-H. (2015) Overexpression of centromere protein K (CENPK) in ovarian cancer is correlated with poor patients survival and associated with predictive and prognostic relevance. *Peer J* **3**, e1386.
- Li D., Wei Y., Wang D., Gao H., Liu K. (2016) MicroRNA-26b suppresses the metastasis of non-small cell lung cancer by targeting MIEN1 via NF- κ B/MMP-9 /VEGF pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **472**, 465-470.
- Li H., Ouyang R., Wang Z., Zhou W., Chen H., Jiang Y., Zhang Y., Li H., Liao M., Wang W., Ye M., Ding Z., Feng X., Liu J., Zhang B. (2016) MiR-150 promotes cellular metastasis in non-small cell lung cancer by targeting FOXO4. *Scientific Reports* **6**, 39001.

Li L., Schaid D. J., Fridley B. L., Kalari K. R., Jenkins G. D., Abo R. P., Batzler A., Moon I., Pelleymounter L., Eckloff B. W., Wieben E. D., Sun Z., Yang P., Wang L. (2012) Gemcitabine metabolic pathway genetic polymorphisms and response in non-small cell lung cancer patients, *Pharmacogenet Genomics* **22**, 105-116.

Li Q., Dong Q., Wang E. (2012) Rsf-1 is overexpressed in non-small cell lung cancers and regulates cyclinD1 expression and ERK activity, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **420**, 6-10.

Li W., Wang W., Ding M., Zheng X., Ma S., Wang X. (2016) MiR-1244 sensitizes the resistance of non-small cell lung cancer A549 cell to cisplatin, *Cancer Cell International*, 1-7.

Li Y., Li X., Liu G., Sun R., Wang L., Wang J., Wang H. (2015) Downregulated TIPE2 is associated with poor prognosis and promotes cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **457**, 43-49.

Li Y., Li Y., Liu J., Fan Y., Li X., Dong M., Liu H., Chen J. (2016) Expression levels of microRNA-145 and microRNA-10b are associated with metastasis in non-small cell lung cancer. *Cancer Biology and Therapy* **17**, 272-279.

Li Z-H., Zhang H., Yang Z-G., Wen G-Q., Cui Y-B., Shao G-G. (2013) Prognostic significance of serum microRNA-210 levels in non-small-cell lung cancer. *The Journal of International Medical Research* **41**, 1437-1444.

Liang N., Zhou X., Zhao M., Zhao D., Zhu Z., Li S., Yang H. (2015) Down-regulation of microRNA-26b modulates non-small cell lung cancer cells chemoresistance and migration through the association of PTEN, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **47**, 530-538.

Lin Y-F., Lai T-C., Chang C-K., Chen C-L., Huang M-S., Yang C-J., Liu H-G., Dong J-J., Chou Y-A., Teng K-H., Chen S-H., Tian W-T., Jan Y-H., Hsiao M., Liang P-H. (2013) Targeting the XIAP/caspase-7 complex selectively kills caspase-3 –deficient malignancies. *The Journal of Clinical Investigation* **123**, 3861-3875.

Liu B., Peng X-Ch., Zheng X -L., Wang J., Qin Y-W. (2009) MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Lung Cancer* **66**, 169-175.

Liu X-X., Li X-J., Zhang B., Liang Y-J., Zhou C-X., Cao D-X., He M., Chen G-Q., He J-R., Zhao Q. (2011) MicroRNA-26b is underexpressed in human breast cancer and induces cell apoptosis by targeting SLC7A11, *FEBS Letters* **585**, 1363-1367.

Lønvik K., Sørbye S. W., Nilsen M. N., Paulssen R. H. (2014) Prognostic value of the MicroRNA regulators Dicer and Drosha in non-small-cell lung cancer: co-expression of Drosha and miR-126 predicts poor survival. *BMC Clinical Pathology* **14**, 1-11.

Lu J., Getz G., Miska E. A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert B. L., Raymond H. M., Ferrando A. A., Downing J. R., Jacks T., Horvitz H. R., Golub T. R. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834-838.

Lynam-Lennon N., Maher S. G., Reynolds J. V. (2008) The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biological reviews* **84**, 55-71.

Ma Z-L., Hou P-P., Li Y-L., De-Tao Wang D-T., Yuan T-W., Wei J-L., Zhao B-T., Lou J-T., Zhao X-T., Jin Y., Jin Y-X. (2015) MicroRNA-34a inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of non-small cell lung cancer H1299 cell line by targeting TGF β R2. *Tumor Biology* **36**, 2481-2490.

MacRae I. J., Ma E., Zhou M., Robinson C. V., Doudna J.A. (2008) In vitro reconstitution of the human RISC-loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 512-517.

Markou A., Tsaroucha E. G., Kaklamanis L., Fotinou M., Georgoulas V., Evi S. (2008) Prognostic Value of Mature MicroRNA-21 and MicroRNA-205 Overexpression in Non-Small Cell Lung Cancer by Quantitative Real-Time RT-PCR. *Clinical Chemistry* **54**, 1696-1704.

Minna J. D., Roth J. A., Gazdar A. F. (2002) Focus on lung cancer. *Cancer Cell* **1**, 49-52.

Mitchell P. S., Parkin R. K., Kroh E. M., Fritz B. R., Wyman S. K., Pogosova-Agadjanyan E. L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K. C., Allen A., Lin D. W., Urban N., Drescher Ch. W., Knudsen B. S., Stirewalt D. L., Gentleman R., Vessella R. L., Nelson P. S., Martin D. B., Tewari M. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **105**, 10513–10518.

Miyakoshi N., Richman C., Kasukawa Y., Linkhart T.A., Baylink D.J., Mohan S. (2001) Evidence that IGF-binding protein-5 functions as a growth factor. *The Journal of Clinical Investigation* **107**, 73–81.

Moldvay J., Fábrián K., Jäckel M., Németh Z., Bogos K., Furák J., Tizslavicz L., Fillinger J., Döme B., Schaff Z. (2017) Claudin-1 Protein Expression Is a Good Prognostic Factor in Non-Small Cell Lung Cancer, but only in Squamous Cell Carcinoma Cases. *Pathology & Oncology Research* **23**, 151-156.

Negrini M., Nicoloso M. S., Calin G. A. (2009) MicroRNAs and cancer—new paradigms in molecular oncology. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 470-479.

Newman M. A., Hammond S. M. (2010) Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *Genes and development* **24**, 1086-1092.

Ning F-L., Wang F., Li M-L., Yu Z-S., Hao Y-Z., Chen S-S. (2014) MicroRNA-182 modulates chemosensitivity of human non-small cell lung cancer to cisplatin by targeting PDCD4. *Diagnostic Pathology* **9**, 1-5.

Nishino J., Kim I., Chada K., Sean J. (2008) Hmga2 Promotes Neural Stem Cell Self-Renewal in Young but Not Old Mice by Reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* **135**, 227-239.

Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwiertka K. (2000) Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi I. typická MDR, *Klinická onkologie* **13**, 4-9.

Noskova V., Hajdúch M., Mihál V., Cwiertka K. (2000) Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi II. Atypická MDR, *Klinická onkologie* **13**, 10-17.

Paranjape T., Slack F. J., Weidhaas J. B. (2009) MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut* **58**, 1546-1554.

Park S-M., Gaur A. B., Lengyel E., Peter M. E. (2008) The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes and Development* **22**, 894-907.

Petrocca F., Visone R., Rapazzotti Onelli M., Shah M. H., Nicoloso M. S., Martino I. D., Iliopoulos D., Pillozzi E., Liu C-G., Negrini M., Cavazzini L., Volinia S., Alder H., Ruco L. P., Baldassarre G., Croce C. M. (2008) E2F1-Regulated MicroRNAs Impair TGF β -Dependent Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Gastric Cancer. *Cancer Cell* **13**, 272-286.

O'Connell R. M., Taganov K. D., Boldin M. P., Cheng G., Baltimore D. (2007) MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **104**, 1604-1609.

Okouoyo S., Herzer K., Ucur E., Mattern J., Krammer P. H., Debatin K-M., Herr I. (2004) Rescue of death receptor and mitochondrial apoptosis signaling in resistant human NSCLC in vivo. *International Journal of Cancer* **108**, 580-587.

Okroj M., Corrales L., Stokowska A., Pio R., Blom A.M. (2009) Hypoxia increases susceptibility of non-small cell lung cancer cells to complement attack. *Cancer Immunology/Immunotherapy* **58**, 1771-1780.

Osugi J., Kimura Y., Owada Y., Inoue T., Watanabe Y., Yamaura T., Fukuhara M., Muto S., Okabe N., Matsumura Y., Hasegawa T., Yonechi A., Hoshino M., Higuchi M., Shio Y., Suzuki H., Gotoh M. (2015) Prognostic Impact of Hypoxia-Inducible miRNA-210 in Patients with Lung Adenocarcinoma. *Journal of Oncology* **2015**, 316745.

Qian B., Katsaros D., Lu L., Preti M., Durando A., Arisio R., Mu L., Yu H. (2009) High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF- β 1. *Breast Cancer Research and Treatment* **117**, 131-140.

Rack P. G., Ni J., Payumo A. Y., Nguyen V., Crapster J. A., Hovestadt V., Kool M., Jones D. T., Mich J. K., Firestone A. J., Pfister S. M., Cho Y-J., Chen J. K. (2014) Arhgap36-dependent activation of Gli transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 11061-11066.

Raponi M., Dossey L., Jatko T., Wu X., Chen G., Fan H., Beer D. G. (2009) MicroRNA Classifiers for Predicting Prognosis of Squamous Cell Lung Cancer. *Cancer Research* **69**, 5776-5783.

Ratner E.S., Tuck D., Richter C., Nallur S., Patel R.M., Schultz V., Hui P., Schwartz P.E., Rutherford T.J., Weidhaas J.B. (2010) MicroRNA signatures differentiate uterine cancer tumor subtypes. *Gynecologic Oncology* **118**, 251-257.

Raver-Shapira N., Marciano E., Meiri E., Spector Y., Rosenfeld N., Moskovits N., Bentwich Z., Oren M. (2007) Transcriptional Activation of miR-34a Contributes to p53-Mediated Apoptosis. *Molecular Cell* **26**, 731-743.

Raychaudhuri M., Schuster T., Buchner T., Malinowsky K., Bronger H., Schwarz-Boeger U., Höfler H., Avril S. (2014) Intratumoral Heterogeneity of MicroRNA Expression in Breast Cancer, *The Journal of Molecular Diagnostics* **14**, 376-384.

Reinhart B. J., Slack F. J., Basson M., Pasquinelli A. E., Bettinger J. C., Rougvie A. E., Horvitz H. R., Ruvkun G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901-906.

Sachdeva M., Mo Y-Y. (2010) MicroRNA-145 Suppresses Cell Invasion and Metastasis by Directly Targeting Mucin 1. *Cancer Research* **70**, 378-387.

Sachdeva M., Zhu S., Wu F., Wu H., Walia V., Kumar S., Elble R., Watabe K., Mo Y-Y. (2009) p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **106**, 3207-3212.

Santarpia L., Nicoloso M., Calin G.A. (2010) MicroRNAs: a complex regulatory network drives the acquisition of malignant cell phenotype. *Endocrine-related cancer* **17**, 51-75.

Schembri F., Sridhar S., Perdomo C., Gustafson A. M., Zhang X., Ergun A., Lu J., Liu G., Zhang X., Bowers J., Vaziri C., Ott K., Sensinger K., Collins J. J., Brody J. S., Getts R., Lenburg M.E., Spira A. (2009) MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2319-2324.

Schéma principu in situ hybridizace: <https://www.exiqon.com/Is/Documents/Scientific/miRCURY-LNA-microRNA-ISH-Optimization-Kit-manual.pdf>

Staženo: 4. 5. 2017

Selcuklu S. D., Donoghue M. T. A., Spillane Ch. (2009) miR-21 as a key regulator of oncogenetic processes. *Biochemical society transactions* **37**, 918-925.

Shen H., Zhu F., Liu J., Xu T., Pei D., Wang R., Qian Y., Li Q., Wang L., Shi Z., Zheng J., Chen Q., Jiang B., Shu Y. (2014) Alteration in Mir-21/PTEN Expression Modulates Gefitinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One***9**, e103305.

Skřičková J., Tomášková M., Kaplanová J. (2008) Nemalobuněčný karcinom plic, *Onkologická péče* **12**, 5-9.

Slabý O., Svoboda M., Bešše A., Bienertová-Vašků J., Černá K., Doležalová D., Dostálová Merkerová M., Ehrmann J. a kol. (2012) MicroRNA v onkologii, stánky, Galén, ČR. 1-14, 9-10, 16, 21, 38-42, 59-63, 143-153.

Soria J-C., Lee H-Y., Lee J. I., Wang L., Issa J-P., Kemp B. L., Liu D. D., Kurie J. M., Mao L., Khuri F. R. (2002) Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clinical Cancer Research* **8**, 1178-1184.

Sotiropoulou G., Pampalakis G., Lianidou E., Mourelatos Z. (2009) Emerging roles of microRNAs as molecular switches in the integrated circuit of the cancer cell. *RNA* **15**, 1443-1461.

Suna Y., Baia Y., Zhanga F., Wang Y., Guob Y., Guo L. (2010) miR-126 inhibits non-small cell lung cancer cells proliferation by targeting EGFL7. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **391**, 1483-1489.

Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K., Tomida S., Osada H., Endoh H., Harano T., Yatabe Y., Nagino M., Nimura Y., Mitsudomi T., Takahashi T. (2004) Reduced Expression of the *let-7* MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival. *Cancer Research* **64**, 3753-3756.

Tarasov V., Jung P., Verdoodt B., Lodygin D., Epanchintsev A., Mussen A. (2007) Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* **6**, 1586-1593.

Tu M., Li H., Lv N., Xi C., Lu Z., Wei J., Chen J., Guo F., Jiang K., Song G., Gao W., Miao Y. (2017) Vasohibin 2 reduces chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer cells via Jun proto-oncogene dependent transactivation of ribonucleotide reductase regulatory subunit M2, *Molecular cancer* **16**, 1-12.

Vardi-Oknin D., Golan M., Mabeesh N. J. (2013) Forchlorfenuron disrupts SEPT9_{i1} filaments and inhibits HIF-1, *PLoS One* **8**, e73179.

Vencken S. F., Greene C. M., McKiernan P. J. (2015) Non-coding RNA as lung disease biomarkers. *Thorax* **70**, 501-503.

Visone R., Russo L., Pallante P., Martino I.D., Ferraro A., Leone V., Borbone E., Petrocca F., Alder H., Croce C.M., Fusco A. (2007) MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocrine-related cancer* **14**, 791-798.

Voorhoeve P. M. (2010) MicroRNAs: Oncogenes, tumor suppressors or master regulators of cancer heterogeneity? *Biochimica et Biophysica Acta* **1805**, 72-86.

Wang C., Chen Z., Bu X., Han Y., Shan S., Ren T., Song W. (2016) IL-33 signaling fuels outgrowth and metastasis of human lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **479**, 461-468.

Wang C., Chen Q., Li S., Li S., Zhao Z., Gao H., Wang X., Li B., Zhang W., Yuan Y., Ming L., He H., Tao B., Zhong J. (2017) Dual inhibition of PCDH9 expression by miR-215-5p up-regulation in gliomas. *Oncotarget* **8**, 10287-10297.

Wang C., Wang X., Liang H., Wang T., Yan X., Cao M., Wang N., Zhang S., Zen K., Zhang C., Chen X. (2013) miR-203 Inhibits Cell Proliferation and Migration of Lung Cancer Cells by Targeting PKC α , *PLoS One* **8**, e73985.

Wang K., Ren Y., Liu Y., Zhang J., He J.-J. (2017) Tumor Necrosis Factor (TNF)- α -Induced Protein 8-like-2 (TIPE2) Inhibits Proliferation and Tumorigenesis in Breast Cancer Cells. *Oncology Research* **25**, 55–63.

Wang M., Wang Y., Zang W., Wang H., Chu H., Li P., Li M., Zhang G., Zhao G. (2014) Downregulation of microRNA-182 inhibits cell growth and invasion by targeting programmed cell death 4 in human lung adenocarcinoma cells. *Tumor Biology* **35**, 39-46.

Wang S., Huang X., Lee C.K., Liu B. (2010) Elevated expression of erbB3 confers paclitaxel resistance in erbB2-overexpressing breast cancer cells via upregulation of Survivin. *Oncogene* **29**, 4225-4236.

Wang S., Zhu L., Zuo W., Zeng Z., Huang L., Lin F., Lin R., Wang J., Lu J., Wang Q., Lin L., Dong H., Wu W., Zheng K., Cai J., Yang S., Ma Y., Ye S., Liu W., Yu Y., Tan J., Liu B. (2016) MicroRNA-mediated epigenetic targeting of Survivin significantly enhances the antitumor activity of paclitaxel against non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **7**, 37693-37713.

Wasmer M-H., Krebs P. (2017) The Role of IL-33-Dependent Inflammation in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology* **7**, 682.

Webster R. J., Giles K. M., Price K. J., Zhang P. M., Mattick J. S., Leedman P. J. (2008) Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Human Cancer Cells by MicroRNA-7. *The Journal of biological chemistry* **284**, 5731-5741.

Wei J., Gao W., Zhu C.-J., Liu Y.-Q., Mei Z., Cheng T., Shu Y.-Q. (2001) Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chinese Journal of Cancer* **30**, 407-414.

- Wei J. S., Song Y. K., Durinck S., Chen Q-R., Cheuk A. T. C., Tsang P., Zhang Q., Thiele C. J., Slack A., Shohet J., Khan J. (2008) The *MYCN* oncogene is a direct target of miR-34a. *Oncogene* **27**, 5204-5213.
- Weiss G. J., Bemis L. T., Nakajima E., Sugita M., Birks D. K., Robinson W. A., Varella-Garcia M., Bunn P. A., Haney J., Helfrich B. A., Kato H., Hirsch F. R., Franklin W. A. (2008) EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Annals of oncology* **19**, 1053-1059.
- Weizhong Z., Shuohui G., Hanjiao Q., Yuhong M., Xiaohua Y., Jian C., Lisen L. (2011) Inhibition of cytohesin-1 by siRNA leads to reduced IGFR signaling in prostate cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **44**, 642-646.
- Welch C., Chen Y., Stallings R. L. (2007) MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* **26**, 5017-5022.
- Wiel M. A., Costa J. L., Smid K., Oudejans C. B. M., Bergman A. M., Meijer G. A., Peters G. J., Ylstra B. (2005) Expression Microarray Analysis and Oligo Array Comparative Genomic Hybridization of Acquired Gemcitabine Resistance in Mouse Colon Reveals Selection for Chromosomal Aberrations, *Cancer Research* **65**, 10208-10213.
- Winter J., Diederichs S. (2011) MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Methods in Molecular Biology* **676**, 3-22.
- Winter J., Jung S., Keller S., Gregory R. I., Diederichs S. (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* **11**, 228-234.
- Xing L., Todd N. W., Yu L., Fang H., Jiang F. (2010) Early detection of squamous cell lung cancer in sputum by a panel of microRNA markers. *Modern Pathology* **23**, 1157-1164.
- Xu C., Lu Y., Pan Z., Chu W., Luo X., Lin H., Xiao J., Shan H., Wang Z., Yang B. (2011) The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *Journal of Cell Science* **120**, 3045-3052.
- Xu L-F., Wu Z-P., Chen Y., Zhu Q-S., Hamidi S., Navab R. (2014) MicroRNA-21 (miR-21) Regulates Cellular Proliferation, Invasion, Migration, and Apoptosis by Targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in Lung Squamous Carcinoma, Gejiu City, China. *PLoS One* **9**, e103698.

Yanaihara N., Caplen N., Bowman E., Seike M., Kumamoto K., Yi M., Stephens R. M., Okamoto A., Yokota J., Tanaka T., Calin G. A., Liu C-G., Croce C. M., Harris C. C. (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis, *Cancer Cell* **9**, 189-198.

Yang W. J., Yang D. D., Na S., Sandusky G. E., Zhang Q., Zhao G. (2005) Dicer Is Required for Embryonic Angiogenesis during Mouse Development. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 9330-9335.

Yi R. R., Qin Y., Macara I. G., Cullen B. R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and development* **17**, 3011-3016.

Yu F-X., Zhang Y., Park H-W., Jewell J.L., Chen Q., Deng Y., Pan D., Taylor S.S., Lai Z-C., Guan K-L. (2013) Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes development* **27**, 1223–1232.

Yu J., Tan Q., Deng B., Fang C., Qi D., Wang R. (2015) The microRNA-520a-3p inhibits proliferation, apoptosis and metastasis by targeting MAP3K2 in non-small cell lung cancer. *American Journal of Cancer Research* **5**, 802–811.

Yu L., Lu Y., Han X., Zhao W., Li J., Mao J., Wang B., Shen J., Fan S., Wang L., Wang M., Li L., Tang J., Song B. (2016) microRNA-140-5p inhibits colorectal cancer invasion and metastasis by targeting ADAMTS5 and IGFBP5. *Stem Cell Research and Therapy* **7**, 1 -11.

Yu L., Todd N. W., Xing L., Xie Y., Zhang H., Liu Z., Fang H., Zhang J., Katz R. L., Jiang F. (2010) Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. *International Journal of Cancer* **127**, 2870-2878.

Tu M., Li H., Lv N., Xi C., Lu Z., Wei J., Chen J., Guo F., Jiang K., Song G., Gao W., Miao Y. (2017) Vasohibin 2 reduces chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer cells via Jun proto-oncogene dependent transactivation of ribonucleotide reductase regulatory subunit M2. *Molecular cancer* **16**, 1-12.

Zhang J., Du Y-Y., Lin Y-F., Chen Y-T., Yang L., Wang H-J., Ma D. (2008) The cell growth suppressor, mir-126, targets IRS-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **377**, 136-140.

Zhang J-G., Wang J-J., Zhao F., Liu Q., Jiang K., Yang G-H. (2010) MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clinica Chimica Acta* **411**, 846-852.

Zhang N., Liu L., Fan N., Zhang Q., Wang W., Zheng M., Ma L., Li Y., Shi L. (2016) The requirement of SEPT2 and SEPT7 for migration and invasion in human breast cancer via MEK/ERK activation, *Oncotarget* **7**, 61587-61600.

Zhang Z., Wang A., Sun B., Zhan Z., Chen K., Wang C. (2013) Expression of CLDN1 and CLDN10 in lung adenocarcinoma in situ and invasive lepidic predominant adenocarcinoma. *Journal of Cardiothoracic Surgery* **8**, 1-10.

Zheng J., Wang F., Lua S., Wang X. (2016) LASP-1, regulated by miR-203, promotes tumor proliferation and aggressiveness in human non-small cell lung cancer. *Experimental and Molecular Pathology* **100**, 116-124.

Zhong G. a Xiong X. (2015) miR-205 promotes proliferation and invasion of laryngeal squamous cell carcinoma by suppressing CDK2AP1 expression, *Biological Research* **48**, 1-8.

Zhu D., Chen H., Yang X., Chen W., Wang L., Xu J., Yu L. (2014) Decreased microRNA-224 and its clinical significance in non-small cell lung cancer patients. *Diagnostic Pathology* **9**, 1-8.

Zhu W., Zhou K., Zha Y., Chen D., He J., Ma H., Liu X., Le H., Zhang Y. (2016) Diagnostic Value of Serum miR-182, miR-183, miR-210, and miR-126 Levels in Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One* **11**, e0153046.

10 Přílohy

Příloha 1: Koncentrace vyizolované RNA od pacientů s metastazemi LU a pacientů bez metastáz

	Číslo vzorku	Čistota	Množství RNA ng/μl
1.	H21222/99E	2,00	176,00
2.	H25049/10G	1,93	32,2 /56,5
3.	H10573/00G	2,00	137,7
4.	H23022/98E	1,92	126,7
5.	H25049/10F	1,89	64,1
6.	H1593/09N	1,89	64,1
7.	H22167/11N	1,90	114,3
8.	H9414/07G	2,01	181,7
9.	H14761/00A	1,90	79,8
10.	H21222/99C	2,02	327,5
11.	H4704/98E	1,99	278,5
12.	H11155/06F	1,80	62,4
13.	H3461/08A	1,94	38,6
14.	H9345/98B	1,98	130,9
15.	H17449/99D	1,89	56,6
16.	H12813/00	1,84	103,2
17.	H19616/98D	1,92	145,1
18.	H16503/99D	1,90	139,2
19.	H11020/11	1,88	55,7
20.	H1802/10B	1,80	145,1
21.	H7243/00B	1,76	60,7
22.	H4545/99F	1,95	748,6
23.	H26256/10Q	1,99	195,6
24.	H17208/96E	1,77	57,7
25.	H13022/98E	1,95	236,7
26.	H3089/09C	1,95	63,1
27.	H22239/11C	1,99	130,0
28.	H12510/01B	1,93	122,1
29.	H15092/07C	1,99	124,3
30.	H21207/08A	1,96	92,9
31.	H18749/10E	2,01	157,9
32.	H26256/10H	1,90	160,6
33.	H11594/09D	1,97	148,4
34.	H12641/07C	1,96	296,5

Barevně odlišení pacienti byli použiti na mikročipovou analýzu. U žlutě označených pacientů NSCLC se nevyskytovaly metastáze do lymfatických uzlin. U modře označených pacientů s NSCLC

se vyskytovaly metastáze do lymfatických uzlin. U vybraných pacientů s metastázemi a bez metastáz byla porovnávana odlišná exprese jednotlivých microRNA.

Příloha 2: Příprava hybridizačního mixu

Detekovaná microRNA	Celý název sondy (Exiqon)	Množství sondy	Množství hybridizačního pufru
hsa-miR-21	miRCURY LNA™ Detectionprobe, 5`-DIG and 3`-DIG labeled	2,0 µl	200 µl
hsa-miR-34a	miRCURY LNA™ Detectionprobe, 5`-DIG labeled	2,0µl	200 µl
Pozitivní kontrola	LNA™ U6 snRNAprobe, 5' DIG-labeled	1,5µl	200 µl
Negativní kontrola	LNA™ Scramble-miRprobe, double-DIG labeled	1,5µl	200 µl