

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Detekce vybraných miRNA u pacientek s „triple-negativním“ karcinomem prsu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Aneta Brisudová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Mária Janíková, Ph.D.
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

Vznik této práce byl podpořený grantem NV16-31997A Diagnostické a prognostické dopady korelace miRNA expresního profilu s morfologickou heterogenitou u "triple-negative" karcinomů prsu (2016-2019, MZ0/NV).

V Olomouci dne

Bc. Aneta Brisudová

Poděkování

Ráda bych poděkovala především Mgr. Márii Janíkové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, cenné rady, ochotu, trpělivost a velmi vstřícný přístup. Také bych ráda poděkovala prof. MUDr. Zdeňkovi Kolářovi, Csc., MUDr. Markétě Kolečkové, doc. Mgr. Janu Bouchalovi, Ph.D., Mgr. Michale Bezděkové, Ph.D., Mgr. Zuzaně Pastorkové za poskytnutí materiálů, praktických zkušeností a cenných rad a všem z kolektivu Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc za vstřícnost při zpracování experimentální části a přátelský přístup. Mé poděkování patří také Mgr. Kateřině Štaffové a MUDr. Josefovi Srovnalovi, Ph.D. z Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc za poskytnutí materiálů důležitých pro zpracování experimentální části.

Velké poděkování patří také mému manželovi a rodičům, kteří mě vždy podporovali, uklidňovali a dodávali mi pozitivní energii. Za podporu děkuji samozřejmě celé rodině a přátelům.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Aneta Brisudová
Název práce	Detekce vybraných miRNA u pacientek s „triple-negativním“ karcinomem prsu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Mária Janíková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Nádorová onemocnění představují celosvětový problém. Vzhledem k jejich neustále se zvyšující incidenci je velké množství výzkumů zaměřeno na vývoj diagnostických, prognostických a prediktivních znaků se snahou o zlepšení a usnadnění diagnostiky a následné léčby. Tato práce je zaměřena na studium karcinomu prsu, který představuje nejčastěji diagnostikovaný typ nádorového onemocnění u žen. Konkrétně se zabývá „triple-negativním“ karcinomem prsu (TNBC), který je charakteristický nízkou expresí estrogenových a progesteronových receptorů a receptorů pro lidský epidermální růstový faktor 2. Velké omezení diagnostiky TNBC představuje nedostatečné množství biologických markerů. Cílem této práce je detekce vybraných miRNA, které se liší profilem genové exprese v různých morfologických entitách přítomných v nádoru. Tato nádorová heterogenita odráží jak odlišné chování jednotlivých buněčných typů, tak i odezvu na terapii.

Na základě výsledků získaných z analýzy jednotlivých morfologických struktur pomocí mikročipové analýzy bylo vybráno 8 miRNA (miR-200c-3p, miR-205-5p, miR-150-5p, miR-185-5p, miR-155-5p, miR-4417, miR143-3p, miR-182-5p), jejichž heterogenní exprese byla následně ověřena metodami ISH a RT-qPCR. Různé hladiny exprese vybraných miRNA jsou pravděpodobně výsledkem odlišného stupně diferenciaci. Identifikace molekul zapojených do procesů diferenciaci a dediferenciaci v nádorech může pomoci odhalit mechanismus regulace karcinogeneze, a tím přispět k nalezení nových cílů vhodných pro terapii.

Klíčová slova	Karcinom prsu, TNBC, miRNA, PCR, <i>in situ</i> hybridizace
Počet stran	69
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Aneta Brisudová
Title	Detection of selected miRNAs in patients with "triple-negative" breast cancer
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and Faculty Hospital Olomouc
Supervisor	Mgr. Mária Janíková, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

Cancer disease represents a major global problem. Because of ever-increasing incidence, many researchers are focused on development of diagnostic, prognostic and predictive factors to improve diagnosis and therapy. This thesis is focused on breast cancer study, most frequently diagnosed type of cancer in women. Specifically, it is focused on "triple-negative" breast cancer (TNBC) which is characterised by low expression of estrogen and progesterone receptors and human epidermal growth factor receptor 2. Insufficient amount of biological markers is the main limitation of TNBC diagnosis. The aim of this thesis is detection of selected miRNAs that differ in gene expression profile in various morphological entities present in the tumor. Tumor heterogeneity reflects both, the different behavior of individual cell types and the response to therapy.

8 miRNAs (miR-200C-3p, miR-205-5p, miR-150-5p, miR-185-5p, miR-155-5p, miR-4417, miR143-3p, miR-182-5p) were selected by microarray analysis of individual morphological structures. Their heterogeneous expression was verified by ISH and RT-qPCR methods. Aberrant expression profiles of that miRNAs are probably result from a different degree of differentiation. Identification of molecules involved in differentiation and dedifferentiation of tumors can reveal the mechanism of regulation of carcinogenesis, thereby help to find new targets for therapy.

Keywords	Breast cancer, TNBC, miRNA, PCR, <i>in situ</i> hybridization, PCR
Number of pages	69
Number of appendices	1
Language	Czech

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Karcinom prsu	2
2.1.2	Klasifikace a diagnostika karcinomu prsu	4
2.1.3	Typy karcinomu prsu	7
2.1.4	Receptory spřažené s karcinomem prsu	12
2.1.5	Význam genů <i>BRCA1</i> a <i>BRCA2</i>	13
2.2	Nádorová heterogenita	18
2.3	Léčba	18
2.3.1	Cílená terapie rakoviny prsu	20
2.4	miRNA	22
2.4.1	Historie miRNA	23
2.4.2	Biosyntéza miRNA	24
2.4.3	RNA interference	25
2.5	Úloha miRNA v karcinomu prsu.....	26
2.5.1	Úloha miRNA v „triple-negativním“ karcinomu prsu.....	27
2.6	Metody detekce miRNA.....	28
2.6.1	Polymerázová řetězová reakce.....	29
2.6.2	In situ hybridizace	32
2.6.3	Technologie mikročipů	33
3	Experimentální část.....	35
3.1	Materiál	35
3.1.1	Použité přístroje a nástroje.....	35
3.1.2	Software pro zpracování výsledků.....	35
3.1.3	Enzymy a chemikálie	36
3.1.4	Složení roztoků.....	37
3.1.5	Biologický materiál.....	38
3.2	Metody.....	40
3.2.1	Mikročipová analýza.....	40
3.2.2	„In situ“ hybridizace.....	40
3.2.3	Dot blot	42
3.2.4	Izolace celkové RNA	43

3.2.5	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí	45
3.2.6	Statistická analýza	47
4	Výsledky	48
4.1	Mikročipová analýza	48
4.2	<i>In situ</i> hybridizace	48
4.3	Dot blot	50
4.4	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí	51
5	Diskuze	55
6	Závěr	58
7	Literatura	59
8	Seznam použitých zkratk	67

Cíle práce

Teoretická část

1. Vypracování literární rešerše na téma karcinom prsu, zejména „triple-negativní“ karcinom prsu, nádorová heterogenita a mikroRNA.

Experimentální část

1. Optimalizace metody “in situ hybridizace“ (ISH) pro detekci vybraných miRNA.
2. Analýza vybraných miRNA u souboru pacientek metodou ISH.
3. Analýza vybraných miRNA u souboru pacientek metodou RT-qPCR.
4. Zpracování získaných výsledků

1 Úvod

Karcinom prsu je jedno z nejčastěji diagnostikovaných nádorových onemocnění u žen, proto je velmi důležité včasné vyšetření, stanovení diagnózy a následné prognózy, což výrazně přispívá k prodloužení života pacienta. V současné době je primární vyšetření založeno především na mamografii, sonografii a rentgenu.

Léčba karcinomů zaznamenala v posledních letech velký vzestup, existují však případy, kdy je konvenční léčba nedostatečná. Důležitou roli hrají tzv. prediktivní faktory, napomáhající předpovídat odpověď pacienta na léčbu. V případě karcinomu prsu mezi ně patří přítomnost estrogenových a progesteronových receptorů a receptorů pro lidský růstový faktor 2. V případě jejich nadexprese je stanovena léčba založená především na zablokování těchto receptorů nebo potlačení syntézy receptorových ligandů. „Triple-negativní“ karcinom, který je charakteristický nízkou expresí zmíněných receptorů, je v současné době léčen především chemoterapií, radioterapií a chirurgickým zákrokem.

Po objevu miRNA v roce 1993 byl studován jejich vliv na důležité buněčné procesy včetně regulace vývoje buňky, proliferace, diferenciace, apoptózy, přenosu signálu a dalších obranných procesů. Účastní se mnoha stěžejních buněčných procesů, a tak vytváří charakteristický profil odrážející jak tkáňovou specifitu, tak vývojový stupeň buňky. Změna jejich regulace vede k poruchám buňky s následky v podobě autoimunitních onemocnění a rakoviny. MiRNA, jako regulační molekuly, zastávají v buňce důležitou roli jako onkogeny nebo nádorové supresory. Expresní změny specifických miRNA jsou velmi informativní a mohou být použity k identifikaci tkáně původu diferencovaného karcinomu. U TNBC jsou miRNA asociované s mnoha procesy nevyhnutelnými pro progresi onemocnění. Díky tomu mohou být potenciálními markery diagnostiky „triple-negativního“ karcinomu prsu.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Karcinom prsu

Karcinom prsu (BC) je jedno z nejčastěji diagnostikovaných nádorových onemocnění u žen. Jedná se o komplexní onemocnění s různými biologickými a klinickými vlastnostmi. Navzdory odlišnostem jsou všechny typy maligních karcinomů schopné invaze do okolních struktur a tvorby vzdálených metastáz. K léčbě operabilních stádií nemoci, i v rámci paliativní léčby inoperabilních či metastatických nálezů, jsou využívány chemoterapie a radioterapie. Odpověď na tyto metody je obvykle středně senzitivní (Adam, *et al.*, 2004).

Výskyt karcinomu prsu ve většine zemí roste a i přes současné snahy o prevenci se předpokládá v příštích letech další vzrůst. Předpoklad vzrůstu výskytu BC vychází ze zvyšování rizikových faktorů v populaci, mezi které patří odsouvání těhotenství do pozdního věku, krátké nebo žádné kojení, menší počet těhotenství, pozdější nástup menopauzy, obezita a konzumace alkoholu (Howell *et al.*, 2014). Více než 80% pacientů onemocní mezi 50 a 70 rokem života, s nejvyšší incidencí v 65 letech. Výskyt BC u pacientů mladších 35 let je přibližně 2%, avšak průběh je obvykle mnohem rychlejší, agresivnější a prognosticky nepříznivý (Anders *et al.*, 2008). Karcinomy prsu u mladých žen vyžadují nadstandardní postupy v diagnostice a léčbě. Včasná diagnóza a určení prognózy může vést k pozitivní reakci na léčbu a zvýšení pravděpodobnosti přežití pacientky. Reakce na medikaci a léčbu je dána mnoha klinickými a patologickými faktory, jakými jsou např. věk pacienta, fáze onemocnění a celková povaha nádoru (Yadav *et al.*, 2015). Karcinomy prsu obvykle vznikají z duktální hypertrofie a následně se vyvíjí jako benigní nádory nebo metastazující karcinomy. Jedná se o chronické onemocnění s mnohaletým průběhem.

2.1.1.1 Sporadické a hereditární karcinomy

Podle etiologických faktorů se mohou karcinomy dělit na sporadické a hereditární. Většina (více než 90%) BC je sporadického původu (Yang & Lippman, 1999). Narodí od hereditárních karcinomů, kde příčinou onemocnění je obvykle jeden genetický faktor s vysokou penetrací, sporadické karcinomy se vyvíjí postupně vlivem mnoha faktorů.

Všechny podílející se faktory obvykle kooperují a zvyšují náchylnost k jedné nebo více specifickým malignitám.

Sporadické karcinomy jsou, na rozdíl od hereditárních, častěji způsobeny mutacemi v somatických buňkách. Většinou není znám celý mechanismus nezbytný ke způsobení malignity. Bylo identifikováno množství rizikových faktorů zodpovědných za vývoj karcinomů, mezi které patří fyzikální a chemické činitele, včetně vlivu radiace, toxinů, hormonů a dalších endogenních faktorů (Kinzel & Vogelstein, 1998). Také řada biologických faktorů jako věk (Burzynski, 2003), obezita (Schoen *et al.*, 1999), imunitní stav (Polterauer *et al.*, 2007) a socioekonomické vlivy, např. etnická příslušnost (Tiwari *et al.*, 2007).

Hereditární neboli dědičné karcinomy jsou podmíněny přenosem mutovaného genu v zárodečné linii s inaktivovanou jednou alelou tohoto genu. Na molekulární úrovni se jedná o autozomálně recesivní dědičnost, neboť k projevům nemoci dochází pouze při mutaci obou alel. V cílové tkáni dochází k mutaci druhé alely velmi často, což vede ke komplexní inaktivaci genu. Z hlediska klinické genetiky se tedy jedná o autozomálně dominantní dědičnost s neúplnou penetrací, kdy jedna mutovaná alela z páru přináší vysoké riziko vzniku nádoru a vykazuje dominantní typ dědičnosti. Onemocnění se tak rozvíjí u naprosté většiny pacientek s příslušnou zárodečnou mutací (Thompson & Thompson, 2004).

Hlavní geny, jejichž mutace predisponují ke vzniku karcinomu prsu, jsou *BRCA1* a *BRCA2* („breast cancer“ 1 a 2), avšak pouze 10-40% procent všech hereditárních karcinomů je způsobeno jejich mutacemi. Většina z nich vzniká v důsledku mutace jiného genu asociovaného s BC. K rozvoji hereditárních karcinomů dochází obvykle již v mladém věku pacienta. U nositelů mutace v jednom z *BRCA* genů je pravděpodobnost projevu až 80%, až o 50% je také zvýšené riziko vzniku karcinomu vaječníků, a častější jsou i ostatní národová onemocnění, jako karcinom tlustého střeva, slinivky, žlučových cest, prostaty a maligní melanomy. Incidence hereditárních karcinomů stále stoupá, např. výskyt BC způsobených mutací *BRCA2* se během minulého století zvýšil až čtyřnásobně. (Ford *et al.*, 1994; Loman *et al.*, 2001; Tryggvadottir *et al.*, 2006; Zimovjanová, 2009).

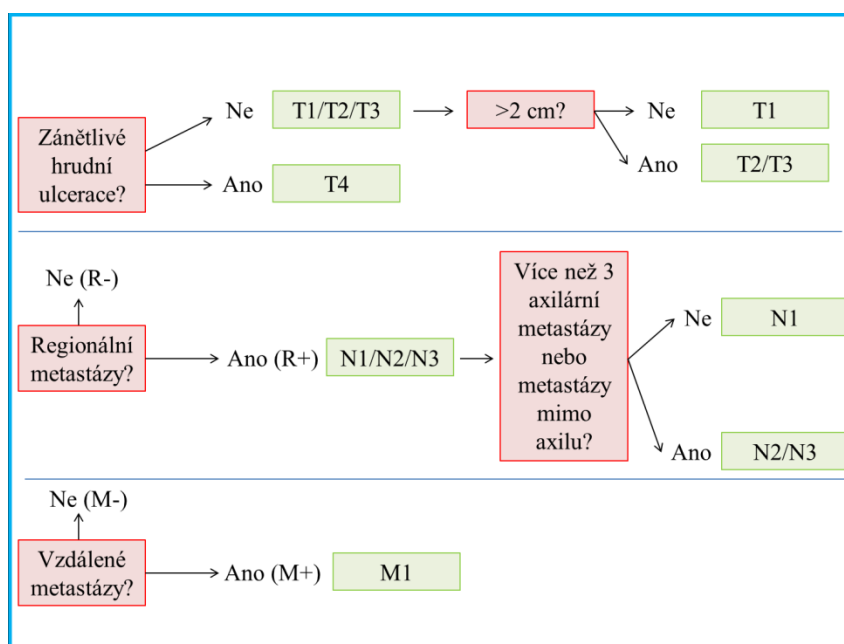
2.1.2 Klasifikace a diagnostika karcinomu prsu

Klasifikace karcinomu prsu podle světové zdravotnické organizace (WHO) je důležité hledisko pro stanovení diagnózy a následné prognózy. Vztahuje se jak k ženskému, tak k mužskému pohlaví. V případě výskytu více primárních nádorů ve tkáni prsu je obvykle klasifikován nádor s největším rozsahem. U oboustranných nádorů prsu je každý klasifikován samostatně. Stádia karcinomu prsu jsou vyjádřena jako čísla na stupnici od 0 do IV podle jeho charakteru, např. velikosti karcinomu a míry invaze do okolních tkání. Poskytují informace pro nastavení budoucí léčby a vychází z určení tří parametrů (Obr. 1):

T – Rozsah primárního nádoru

N – Přítomnost (R+) nebo nepřítomnost (R-) metastáz v regionálních mízních uzlinách

M – Přítomnost (M+) nebo nepřítomnost (M-) vzdálených metastáz



Obrázek 1: TNM klasifikace karcinomu prsu. T – rozsah primárního nádoru, N – Přítomnost (R+) nebo nepřítomnost (R-) metastáz v regionálních mízních uzlinách, M – Přítomnost (M+) nebo nepřítomnost (M-) vzdálených metastáz. (Převzato a upraveno Brierley et al., 2017).

Karcinomy se v TNM systému klasifikují dvěma způsoby. Klinická klasifikace (cTNM) je určena na základě klinického vyšetření a zobrazovacích vyšetřovacích metod před léčbou. Patologická klasifikace (pTNM) je založena na nálezech před léčbou a je

doplněna histopatologickým vyšetřením karcinomu po operaci (Sobin & Wittekind, 2002, Adam *et al.*, 2004).

Pro klinické stanovení stádia charakteru ložiska předoperačně se využívají tyto metody:

T – mamografie, sonografie + invazivní metody k verifikaci a charakterizaci ložiska

N – palpce, sonografie

M – RTG plic, sonografie jater, scintigrafie kostí (místa nejčastějšího výskytu metastáz)

Vyšetření lze popřípadě doplnit dalšími zobrazovacími metodami jako CT plic, jater, skeletu.

Patologická klasifikace (pTNM) se stanovuje pooperačně a definuje zejména výskyt rizikových faktorů, pooperační diagnózu a prognózu u pokročilejších karcinomů (Adam *et al.*, 2004).

Na základě všech vyšetření a předchozí anamnézy pacienta stanoví lékař stádium onemocnění. Specifická stádia onemocnění tedy vyjadřují pokročilost karcinomu prsu a jsou rozdělena do těchto skupin (Adam *et al.*, 2004; www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/staging#stage0):

Stádium 0

- Neinvazivní karcinom „*in situ*“, maligní buňky jsou jednoznačně přítomny, ale nedochází k infiltraci do okolních tkání

Stádium I

- Invazivní karcinom prsu – nádorové buňky infiltrují do okolní prsní tkáně
 - IA – velikost karcinomu je menší než 2 cm a nerozšířil se mimo prsní tkáň do lymfatických uzlin
 - IB – velikost karcinomu je menší než 2 cm a v lymfatických uzlinách jsou malé skupiny nádorových buněk o velikosti 0,2 – 2 mm

Stádium II

- Invazivní karcinom prsu
 - IIA – velikost karcinomu je 2 – 5 cm a nejsou napadeny okolní tkáně nebo je velikost karcinomu menší než 2 cm a rozšířil se do 1-3

lymfatických uzlin, kde jsou malé skupiny nádorových buněk o velikosti > 2 mm

- IIB – velikost karcinomu je 2 – 5 cm a rozšířil se do 1-3 lymfatických uzlin, kde jsou malé skupiny nádorových buněk o velikosti < 2 mm nebo je karcinom větší než 5 cm, ale neinfiltroval do okolních tkání

Stádium III

- Invazivní karcinom prsu
 - IIIA – velikost karcinomu je větší než 5 cm nebo se nachází nádorové buňky ve 4-9 lymfatických uzlinách
 - IIIB – karcinom jakékoli velikosti, který se rozšířil do hrudní stěny nebo na kůži prsu a způsobil otok
 - IIIC – karcinom jakékoli velikosti, který se rozšířil do 10 a více lymfatických uzlin v podpaží nebo se nádor jakékoli velikosti rozšířil do nadklíčkových, podklíčkových a podpažních uzlin

Stádium IV

- Karcinom, který se rozšířil mimo prsní tkáň a blízké lymfatické uzliny do dalších orgánů (plíce, vzdálené lymfatické uzliny, játra, mozek)

Stejně jako je pro diagnostiku karcinomu prsu důležité určit stádium, je také důležité určit stupeň. Stupeň BC je popis toho, jak se liší nádorové buňky od normálních. Je určen z mikroskopického pozorování vzorku tkáně. Patolog se zaměří na specifické rysy buněk a určí stupeň od 1 do 3 (Dvořák *et al.*, 2004).

Stupeň 1 (nízký)

- nádorové buňky jsou dobře diferencované, podobně jako normální buňky
- pomalejší růst a proliferace

Stupeň 2 (střední)

- nádorové buňky jsou středně diferencované

Stupeň 3 (vysoký)

- nádorové buňky jsou špatně diferencované až nediferencované, mají abnormální tvar
- rychlejší růst a proliferace, šíří se agresivněji než buňky stupně 1 a 2

2.1.3 Typy karcinomu prsu

Karcinom prsu je obvykle dělen do čtyř hlavních skupin podle profilu genové exprese: luminální-A, luminální-B, HER2 (receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2) pozitivní a „triple-negativní“ (Tab. 1) (Sotiriou *et al.*, 2009; Weigelt *et al.*, 2010).

Tabulka 1: Charakteristika molekulárních podtypů karcinomu prsu

Molekulární typ – dle IHC	Molekulární typ – dle genové exprese	Expres ER PR HER2	Molekulární markery	Proliferace
Luminální-A	Luminální	ER ⁺⁽⁻⁾ PR ^{+/-} HER2 ⁻	CK	nízká/vysoká
Luminální-B	Luminální	ER ⁺⁽⁻⁾ PR ^{+/-} HER2 ⁺		nízká/vysoká
HER2-pozitivní	HER2-pozitivní	ER ^{-/(+)} PR ^{-/(+)} HER2 ⁺	CK5/6 ^{+/-} EGFR ^{+/-}	vysoká
TNBC	Bazální typ (basal-like)	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻	CK5/6 ⁺ EGFR ⁺	vysoká
	S nízkou expresí kladinu (claudin-low)	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻	CK5/6 ^{+/-} EGFR ^{+/-}	vysoká
	Normal-like	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻	CK5/6 ⁻ EGFR ⁻	vysoká

CK – cytokeratin, EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru, ER – estrogenový receptor, PR – progesteronový receptor, HER2 – receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2, - negativní, + pozitivní, +/- příležitostně pozitivní, +(-) obvykle pozitivní s možností negativního výsledku, -(+) obvykle negativní s možností pozitivního výsledku. (Převzato a upraveno Weigelt *et al.*, 2010; Navrátil *et al.*, 2015).

První dvě skupiny jsou charakteristické změnou hormonální hladiny, z čehož plyne možnost využití hormonální léčby. Dále lze karcinom prsu rozdělit dle vzhledu a charakteru růstu nádorových buněk (duktální, lobulární, mucinózní, tubulární, atd.), dle charakteru růstu nádoru (*in situ*, invazivní), histopatologického stupně diferenciacce (stupeň 1-3), vztahu nádoru k cévám (lymfangioinvaze, invaze do krevních cév) a vztahu k okolním strukturám (kůže, svaly). Na základě této charakteristiky je následně určena histopatologická diagnóza (Adam *et al.*, 2004; Ryška *et al.*, 2015).

Nejčastěji diagnostikovaným karcinomem prsu je luminální ER (estrogenový receptor) pozitivní (ER⁺) typ, který reprezentuje více než 70% všech onemocnění rakoviny prsu. Tato skupina je charakteristická relativně vysokou expresí mnoha genů exprimovaných prsními luminálními buňkami (geny asociované s ER, luminální cytokreatiny a další luminální markery) (Yersal & Bartuca; 2014). Přítomnost ER je spjata s příznivou prognózou díky pozitivní odezvě na endokrinní terapii cílenou na dráhu ER zahrnující modulátory selektivních estrogenových receptorů (SERMs), regulátory selektivních estrogenových receptorů (SERDs) a inhibitory aromatáz (AIs) (Abdel-Hafiz, 2017).

2.1.3.1 Karcinom prsu typu luminální-A

Tento typ karcinomu reprezentuje 50 - 60% všech karcinomů prsu. Obvykle mají nízký histologický stupeň, nízkou mitotickou aktivitu a zahrnují specifické histologické typy s dobrou léčebnou prognózou. Luminální-A karcinom je charakteristický expresí luminálních epitelových cytokeratinů (CK), ER1 markerů a genů asociovaných s funkcí ER a PR, jako například *LIVI* (skupina zinkových transportérů) (Carey, 2010).

2.1.3.2 Karcinom prsu typu luminální-B

Luminální-B karcinomy prsu zahrnují 15 - 20% všech typů karcinomů prsu. Vzhledem k typu luminální-A, mají agresivnější povahu, vyšší histologický stupeň, vyšší míru proliferace a horší prognózu (Creighton, 2012). Celková agresivita karcinomů prsu typu

luminální-B je srovnatelná s karcinomy HER2-pozitivními, které jsou definované jako vysoce agresivní. Luminální-B karcinomy vykazují horší výsledky a hůře reagují na endokrinní léčbu ve srovnání s typem luminální-A. Naopak, lepší odpovědi je u karcinomů typu luminální-B docíleno při léčbě klasickou chemoterapií (Rouzier *et al.*, 2005; Bhargava *et al.*, 2010).

Tumory ve skupině ER negativní (ER-) a nebo ER/PR negativní (ER/PR-) jsou dále děleny na HER2 pozitivní a „triple-negativní“ (TNBC).

2.1.3.3 Karcinom prsu HER2-pozitivní

HER2-pozitivní karcinom prsu je charakteristický vysokou expresí genu *HER2* a ostatních genů z rodiny receptorů pro epidermální růstový faktor (ErbB) (Tsutsui *et al.*, 2003). Zaujímají 15 - 20% všech typů karcinomů prsu. HER2 patří do skupiny receptorových tyrosinových kináz a je kódovaný *HER2* genem, proto-onkogenem lokalizovaným na chromosomu 17q12. Po vazbě ligandu na další členy rodiny ErbB, např. HER3 nebo HER4 dojde k dimerizaci a transfosforylaci extracelulárních domén. Tyto fosforylované tyrosinové zbytky interagují s četnými intracelulárními signalizačními molekulami, tzv. druhými posly (second messengers), což vede k aktivaci signálních drah specifických kináz a k transportu signálu k dalším signálním proteinům. Cílovými molekulami této signální dráhy jsou transkripční faktory regulující mnoho genů zapojených do buněčné proliferace, apoptózy, diferenciaci, angiogeneze, invaze buňky a vzniku metastáz (Monsey *et al.*, 2010; Gutierrez & Schiff; 2011).

Ve srovnání s luminálními karcinomy vykazuje HER2-pozitivní karcinom prsu agresivnější biologické chování a klinické vlastnosti provázené horší prognózou.

2.1.3.4 „Triple-negativní“ karcinom prsu

„Triple-negativní“ karcinom prsu (TNBC) patří do skupiny nádorů prsu, které se klinicky vyznačují vysokou agresivitou a častými vznikem orgánových metastáz a lokálních recidiv. Jeho podíl mezi karcinomy prsu je přibližně 10-20% (Lü *et al.*, 2017).

Tento typ karcinomu je charakteristický nízkou expresí ER, PR a HER2. Vzhledem k těmto vlastnostem nemůže být léčen současnými cílenými terapiemi, zaměřenými na tyto receptory. Pro svoji agresivní povahu je doprovázen jednou z nejhorších prognóz ze všech subtypů karcinomů prsu. Kvůli nedostatku účinných terapeutických cílů je v současné době jedinou možností chemoterapie, radioterapie a chirurgický zákrok (Mathe *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015).

Nejvýznamnějšími faktory rizika vzniku TNBC jsou přítomnost mutace v *BRCA1* genu (Amirikia *et al.*, 2011; Pijpe *et al.*, 2012) a další biologické faktory. Například ženy, které nikdy nerodily a/nebo nekojily, vykazovaly až dvojnásobné riziko výskytu karcinomu prsu než ženy, které kojily alespoň 12 měsíců. Avšak vyšší počet porodů s velmi krátkou dobou kojení riziko TNBC naopak zvyšují (Jernstöm *et al.*, 1999).

Další charakteristickou vlastností je zvýšená exprese EGFR (receptoru epidermálního růstového faktoru), transmembránové tyrosin kinázy z rodiny ErbB (Nielsen *et al.*, 2004). Důležitým faktorem pro diagnostiku karcinomu prsu jsou také cytokeratiny 5/6 (CK5/6). CK5/6 jsou obvykle exprimovány v populacích ER-karcinomů prsu a ve srovnání s CK5/6- (cytokeratin negativní) karcinomy, mají zvýšenou schopnost tvorby mammosféry a jsou odolné vůči chemoterapii a endokrinní terapii (Knox *et al.*, 2014).

TNBC se dělí na několik podtypů. Největší podíl TNBC představují tzv. basal-like karcinomy, méně pak tzv. normal-like karcinomy a claudin-low karcinomy (Navrátil *et al.*, 2015).

2.1.3.4.1 Basal-like (Bazální karcinom prsu)

Bazální karcinom prsu zahrnuje 8 - 16 % všech typů karcinomu prsu. Tyto karcinomy jsou obvykle spojeny s vyšším histologickým stupněm, přítomností centrálních nekrotických a fibrotických částí a nápadnými infiltráty. Bazální karcinomy se vyznačují mimořádně vysokou mitotickou a proliferační aktivitou. Většina těchto karcinomů patří do skupiny duktálních karcinomů prsu provázených agresivní klinickou povahou a vysokou mírou metastáz do mozku a plic (Heitz *et al.*, 2009; Navrátil *et al.*, 2015).

Rakha & Ellis definovali v roce 2009 množství bazálních myoepitelových markerů a určili čtyři, které jsou základní pro diagnostiku, a to CK5/6, CK14, CK17 a EGFR, kdy se v případě detekce minimálně dvou těchto markerů jedná o bazální karcinom. Naopak, bazální karcinomy neexprimují receptory ER, PR a HER2, charakteristické u luminálních typů nádorů (Heitz *et al.*, 2009). Díky tomuto faktu lze bazální karcinomy zařadit do skupiny „triple-negativních“ karcinomů prsu. Termín „triple-negativní“ a bazální karcinom nejsou zcela totožné, ačkoli jsou některými autory zaměňovány (Kreike *et al.*, 2007; Weigelt *et al.*, 2010a).

Bazální karcinomy prsu jsou také charakteristické častými mutacemi genu *TP53* (tumor protein 53), důležitého pro regulaci buněčného cyklu (Vogelstein & Kinzler, 1992). Jsou typické i změnami drah buněčných signalizačních molekul, včetně mitogen-aktivovaných proteinkináz (MAPK), fosfatidylinositol-3-kináz (PI3K), serin/threoninových kináz (Akt) a cytoplazmatickou a jadernou akumulací β -cateinu. Všechny tyto abnormality byly definovány jako markery pro budoucí léčbu (Criscitiello *et al.*, 2012). Mnohé výzkumy prokázaly, že bazální typ karcinomu zahrnuje přibližně tři čtvrtiny rakoviny prsu způsobené mutací genu *BRCA1* (Foulkes *et al.*, 2004).

2.1.3.4.2 Normal-like (Karcinom typu normální prsní tkáň)

Tyto tumory zaujímají 5-10% TNBC, jsou typické expresí genů charakteristických pro adiposní tkáň. Genový profil normal-like karcinomů je odlišný od ostatních TNBC a buňky jsou podobné zdravým buňkám prsní tkáň (Choccalingam *et al.*, 2012). Prognóza tohoto typu karcinomu je v konceptu karcinomů prsu podobná bazálním karcinomům, bez reakce na léčbu chemoterapií. Vzhledem k tomu, že profil genové exprese normal-like karcinomů je ER-, PR- a HER2- jej lze klasifikovat jako „triple-negativní“ (Knox *et al.*, 2014; Yersal & Bartuca, 2014).

2.1.3.4.3 Claudin-low

Karcinomy typu claudin-low tvoří přibližně 5% všech karcinomů prsu a vyznačují se vysokou expresí mezenchymových proteinů a nízkou genovou expresí proteinů claudin 3, 4, a 7 a Ca^{2+} dependentního glykoproteinu E-cadherinu důležitého pro tvorbu adherentních spojů mezi buňkami. Stejně jako ostatní TNBC je profil genové exprese u claudin-low karcinomů ER, PR a HER2 negativní (Prat *et al.*, 2010, Navrátil *et al.*, 2015).

2.1.4 Receptory spřažené s karcinomem prsu

Více než 70% karcinomů prsu je označovaných jako hormonálně pozitivní. Karcinomy exprimují geny kódující ER a/nebo PR a jejich růst, vývoj a progres je ovlivněna signální dráhou hormonálních receptorů (Sotiriou *et al.*, 2009; Weigelt *et al.*, 2010). Díky tomu byly vyvinuty endokrinní terapie zacílené právě na tyto receptory a jejich signální dráhy. Jedná se o základní typ léčby tohoto typu karcinomu prsu. Ovšem i endokrinní terapie má svá omezení, její účinnost výrazně omezuje postupný vznik rezistence organismu (Higgins & Baselga, 2011).

Hormony jsou signální molekuly, které hrají důležitou roli v různých biologických procesech, včetně růstu, diferenciaci, fyziologie a reprodukce živých organismů. Jedná se o chemické látky, které mají specifický regulační efekt na cílové buňky, tkáně a celé orgány. Tyto molekuly jsou nejčastěji produkovány endokrinními žlázami a dále transportovány do cílových orgánů prostřednictvím krevního řečiště. Hormony cestují krevním řečištěm až k cílovým buňkám, kde dojde k vazbě přes specifické buněčné receptory (Lodish *et al.*, 2000; Alberts, 2008). Nedostatečná, nebo naopak nadměrná hladina hormonů v organismu, je často spojována s různými onemocněními, jako například diabetes nebo rakovina. Hormony zprostředkovaná buněčná signalizace patří mezi nejdůležitější ligandem zprostředkovanou signalizací, která předává signály pro růst a vývoj mnohobuněčných eukaryot (Łącka & Czyżyk, 2008).

Estrogenové receptory (ER) a progesteronové receptory (PR) jsou jaderné hormonální receptory působící jako transkripční faktory, které regulují expresi cílových genů zapojených v procesech proliferace prsních epitelových buněk (Daniel *et al.*, 1987), diferenciaci (Hofseth *et al.*, 1999), buněčné migrace a apoptózy (Razandi *et al.*,

2000). Mechanismus přímého působení estrogenu na jadernou DNA zahrnuje vazbu kompatibilního hormonu na nukleární ER, které se následně společně s transkripčními faktory váží na regulační oblasti cílových genů, což způsobí aktivaci genové exprese (Levin, 2002). Estrogenové receptory a progesteronové receptory jsou také uváděny jako hlavní faktory přispívající k malignitě prsních tkání, a proto jsou jejich signální dráhy často studovány jako terapeutické cíle ER⁺/PR⁺ karcinomu prsu. Nesprávná regulace ER a PR je úzce spojena s iniciací a invazí karcinomu prsu (Greene *et al.*, 1984; Mosselman *et al.*, 1996; Zafrani *et al.*, 2000).

Receptor pro lidský růstový faktor 2 (HER2) je receptor z rodiny tyrosinových proteinkináz ErbB (receptor rodiny epidermálních růstových faktorů – HER/EGFR/ERBB) kódovaný *ERBB2* genem. Nadexprese tohoto genu způsobuje nadměrný růst buněk a potlačení apoptózy, čímž je iniciován vývoj a proliferace HER2⁺ karcinomu prsu (Lewis Phillips *et al.*, 2008). Povrch buněk HER2 pozitivního karcinomu je charakteristický přítomností přibližně dvou milionů HER2 proteinových receptorů, což je přibližně sto krát víc než u zdravých buněk (Sauter *et al.*, 2009). Příchod terapií zacílených na HER2 významně zvyšuje pravděpodobnost přežití pacientů s HER2⁺ karcinomem. Tyto terapie zahrnují například použití monoklonálních protilátek, inhibitorů aromatáz a tyrosinkináz (Blackwell *et al.*, 2010; De Abreu *et al.*, 2014).

2.1.5 Význam genů *BRCA1* a *BRCA2*

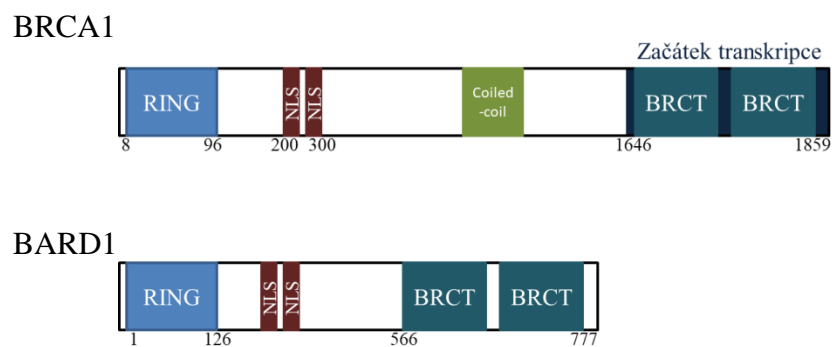
V minulých letech došlo k významnému pokroku při identifikaci genů odpovědných za dědičnou predispozici k rakovině prsu. V rodinách s vysokým rizikem výskytu tohoto onemocnění je známo, že bylo často způsobeno mutací v genech *BRCA1* nebo *BRCA2*. Poškození těchto genů predisponuje nositele k vývinu mnoha typů nádorových onemocnění, mimo karcinomu prsu a vaječníků, také například karcinomu pankreatu a prostaty. Díky tomu je možné identifikovat pacienty se sklony k výskytu tohoto typu onemocnění. Tito pacienti nesou dědičnou (hereditární) mutaci zárodečné linie v jedné alele genu *BRCA* s tím, že v somatických buňkách následně dochází ke ztrátě heretozygotnosti (LOH). Nedostatečná funkce genů *BRCA1/2* vede k poruše opravy dvouvláknových zlomů (DSB) DNA a zvýšení rizika propagace karcinomů, což

naznačuje, že se jedná o tumor supresorové geny (ACOG Committee on Practice Bulletins, 2009).

Mezi oběma geny existuje velká podobnost, obsahují mnoho exonů s nejdelším exonem 11, translace začíná v exonu 2, obsahují kódující sekvence bohaté na AT (adenin-tymin) a velikost genomové DNA je přibližně 70kb (Tavtigian *et al.*, 1996). Produkty *BRCA1/2* genů jsou silně polární proteiny. Kromě nich existuje nespočet genů zapojených do oprav poškození DNA, jejichž mutace zvyšují riziko vzniku rakoviny, například tumor supresorový gen *ATM* („Ataxia Telangiectasia Mutated“) lokalizovaný na chromozomu 11, který kóduje serin-threoninovou protein kinázu ATM, udržující genomovou integritu. ATM lze považovat za hlavní přenašeč signálu při DSB. Kooperuje s dalšími tumor supresorovými proteiny včetně *BRCA1/2* nebo *p53* (Maya *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002). Tumor supresorový protein *p53* o délce 393 aminokyselin je kódovaný genem *TP53* lokalizovanémna chromozomu 17. Tento protein má funkci jako transkripční faktor zabráňující vzniku nádorů. Díky degradaci zprostředkované ubiquitin ligázou Mdm2 („Mouse double minute 2 homolog“) je *p53* přítomný v buňce ve velmi nízké hladině. Při poškození DNA dojde k akumulaci *p53* v jádře a díky posttranslačním modifikacím (fosforylaci, acetylaci) přechází *p53* z latentní formy do aktivní. Aktivní forma *p53* disociuje od Mdm2 a transaktivuje sadu cílových genů, které zastaví buněčný cyklus nebo indukují apoptózu. Po zastavení buněčného cyklu dojde k opravě poškozené DNA a opětovnému spuštění normálního cyklu. V případě, že je DNA vážně poškozena, spustí *p53* apoptózu a tím potlačí přenos poškozené DNA na dceřiné buňky. Např. u syndromu *Li-Fraumeni* zapříčiňuje zárodeční mutace tohoto genu nádorové bujení již v mladém věku a 50% riziko rozvinutí karcinomu prsu během života (Vogelstein & Kinzler, 1992; Adam *et al.*, 2004; Lacroix *et al.*, 2006).

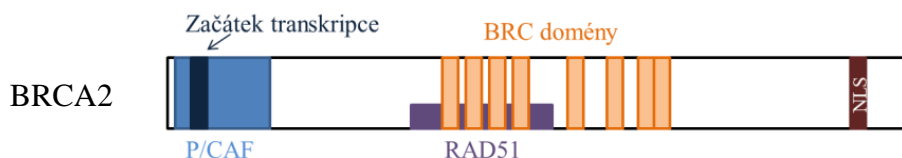
Gen *BRCA1* (breast cancer 1), složený z 24 exonů, byl identifikován v roce 1990 na dlouhém raménku chromozomu 17 (17q21) (Hall *et al.*, 1990). *BRCA1* kóduje protein o délce 1863 aminokyselin s hmotností 220kDa, působící jako tumor supresor. Hlavním úkolem proteinu *BRCA1* je oprava dvouvláknových DNA zlomů mechanismem homologní rekombinace (HR). Potlačení proteosyntézy *BRCA1* zapříčiněné mutací *BRCA1* může způsobit narušení kontrolních bodů buněčného cyklu, apoptózy, regulace transkripce, konformace chromatinu a následný vznik nádorového bujení (Miki *et al.*, 1994). Protein *BRCA1* je složen z RING („really interesting new gene“) domény, tandemových jaderných lokalizačních signálů (NLS), coiled-coil domény (prstencového

vinutí) a dvou BRCT (BRCA1 C-terminální) domén. RING a BRCT domény se vyznačují častým výskytem mutací, které jsou spojené s vývojem karcinomu prsu a vaječníků. RING doména má v komplexu s BARD 1 (BRCA1-asociovaný protein obsahující RING doménu 1) E3 ubiquitin-ligásovou aktivitu, jejichž fyziologické cíle nejsou zcela známe (Obr. 2). Při mutaci v RING doméně dojde k potlačení schopnosti vázat BARD1 a stabilita obou proteinů je tímto výrazně snížena (Hashizume *et al.*, 2001). C-terminální doménu proteinu tvoří tandemové BRCT fosfopeptid-vážící domény, zprostředkující interakce s klíčovými vazebnými partnery BRCA1, kterými jsou CtIP (C-terminální vazebný protein 1), ABRA1 (BRCA1-A komplex/ABRAXAS) a BRIP1 (BRCA1 interakční protein C-terminální helikáza 1), které jsou důležité pro koncentraci BRCA1 v subjaderných ložiskách přítomných po poškození DNA (Obr. 4) (Yu *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007).



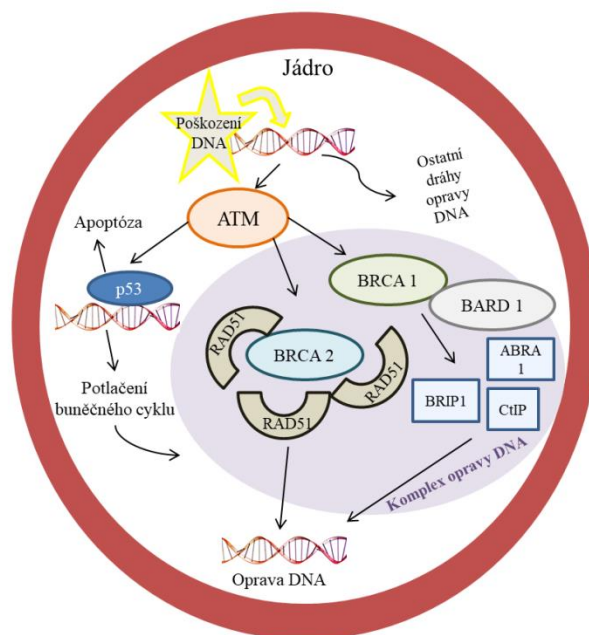
Obrázek 2: Schématické znázornění struktury *BRCA1* & *BARD1*. RING – “really interesting new gene“ doména, NLS – jaderný lokalizační signál, Coiled coil – doména prstencového vinutí, BRCT–BRCA1 C-terminální interakční doména, počátek transkripce na C- terminální doméně BRCA1 (převzato a upraveno Karami & Mehdipour, 2013).

Tým Wooster *et al.*, 1994 prokázal, že karcinomy, u kterých nebyla nalezena příčinná (kauzální) mutace v *BRCA1* genu, mohou být spojeny s mutací jiného genu lokalizovaného na dlouhém raménku chromozomu 13 (13q12.13), známého jako *BRCA2* („breast cancer“ 2). Je složený z 27 exonů rozmístěných na cca. 70kb genomové DNA. Většina mutací je pozorována v exonu 10 a 11. Na 3' konci exonu 11 se vyskytuje oblast nazývaná OCCR („ovarian cancer cluster region“), jejíž mutace výrazně zvyšuje riziko vzniku karcinomu vaječníků. *BRCA2* kóduje protein o délce 3418 aminokyselin. Pro správnou funkci *BRCA2* je kritická C-koncová doména obsahující BRC (BRCA2 interakční doména), P/CAF (p300/CBP-asociovaný faktor) – transkripční koaktivátor a sekvence počátku transkripce (Obr. 3). Podobně jako *BRCA1*, je protein *BRCA2* silně polární, přibližně jedna čtvrtina residuí je silně kyselá nebo zásaditá (Tavtigian *et al.*, 1996). BRC doména, obdobná BRCT doméně *BRCA1* proteinu, zprostředkovává vazbu s reparačními proteiny a DNA, což umožňuje opravu dvouvláknových zlomů DNA mechanismem homologní rekombinace (HR). Základním krokem HR je nahromadění *RAD51* (DNA opravný protein *RAD51* homolog 1) rekombinázy k odhaleným jednovláknovým DNA přesahům vytvořeným během dvouvláknového zlomu. Interakce *BRCA2* s *RAD51* je zprostředkována pomocí BRC domény a *RAD51* interakční domény (Obr. 3) na C-koncové doméně (Bork *et al.*, 1996; Mizuta *et al.*, 1997). Tvoří se vysoce uspořádaná helikální nukleoproteinová vlákna, která vyhledávají homologní sekvence na nepoškozené sesterské chromatidě vedoucí k tvorbě rekombinantních meziproduktů a následné opravě DNA (Obr. 4). Buňky s defektním *BRCA2* mají sníženou schopnost tvorby nukleoproteinových vláken a vykazují sníženou účinnost opravy dvouvláknových zlomů DNA (Connor *et al.*, 1997).



Obrázek 3: Schématické znázornění struktury *BRCA2* & *RAD51*. P/CAF – p300/CBP-asociovaný faktor, BRC – *BRCA2* interakční domény, *RAD51* – interakční doména důležitá pro opravu dvouvláknových zlomů DNA, NLS – jaderný lokalizační signál, počátek transkripce na N-koncové doméně *BRCA2* (převzato a upraveno Welsh *et al.*, 2000).

V minulých letech bylo identifikováno více než 2000 odlišných mutací v genech *BRCA1/2*, zahrnující delece, inserce a bodové mutace v kódujících i nekódujících sekvencích. Nejobvyklejším typem mutace je posun čtecího rámce způsobený bodovou insercí nebo delecí, předčasné ukončení translace nebo poškození místa sestřihu vedoucí k syntéze nefunkčních BRCA proteinů (Kwong *et al.*, 2011; Mehrgou & Akouchekian, 2016).



Obrázek 4: Schéma funkce BRCA 1/2 proteinů a dalších proteinů účastnících se opravy DNA. Po poškození DNA dojde k aktivaci signální kaskády a přenesení signálu prostřednictvím ATM k regulačním molekulám buňky. Kaskáda aktivuje tumorové supresory, které potlačí propagaci a proliferaci buňky s poškozenou DNA. Buněčný cyklus je zastaven a DNA je opravena. V případě velkého poškození DNA dochází k apoptóze. Tumor supresory: ATM - ataxia telangiectasia mutated, BRCA 1/2 – breast cancer 1/2, BARD 1 - BRCA1-asociovaný protein, RAD51 - DNA opravný protein RAD51 homolog 1, ABRA1 - BRCA1-A komplex/ABRAXAS, CtIP - C-terminální vazebný protein 1, BRIP1 - BRCA1 interakční protein C-terminální helikáza 1, p53 – transkripční faktor

2.2 Nádorová heterogenita

Výzkumy zabývající se malignitami ukázaly, že v rámci jednoho nádoru se může vyskytovat více fenotypově a funkčně heterogenních buněk. Heterogenita je jev objevující se u všech typů nádorů. Je důsledkem genetických a epigenetických změn nebo změn způsobených vlivem vnějšího prostředí (Nowell 1976; Baylin & Jones, 2011). Heterogenní nádory jsou chápány jako: populačně heterogenní u různých pacientů, intratumorálně-prostorově heterogenní v rámci jednoho nádoru, anebo časově heterogenní, odrážející variabilitu v průběhu času v rámci jednoho nádoru (Welch 2016). V případě intratumorálně heterogenních nádorů histologické studie odhalily rozsáhlou variabilitu v morfologii. Dexter *et al.*, 1978 uvádí, že u nádoru prsních žláz myši odhalili přítomnost odlišných buněčných typů, které se výrazně lišily růstovými vlastnostmi, expresí antigenů, karyotypem a odezvou na terapeutické látky. Tato vlastnost byla později potvrzena také u lidských nádorů prsu (Fiegl *et al.*, 1995), které vykazují intratumorové odlišnosti v expresi klinických biomarkerů, jako například hormonálních receptorů (ER, PR) (Davis *et al.*, 1984) a míru amplifikace genu *HER2* (Pertschuk *et al.*, 1999). Nádorová heterogenita bývá vysvětlována modelem karcinogeneze z kmenových buněk, ve kterém nádorové kmenové buňky diferencují na nádorové buňky, které nejsou onkogenní a vytvářejí tak hierarchickou organizaci. Výskyt kmenových buněk je v dospělém organismu poměrně vzácný, jedná se převážně o klidové nediferencované buňky, které mají kapacitu pro neomezené sebe obnovování a tvorbu morfologicky různorodých dceřiných buněk (Al-Hajj *et al.*, 2004). V průběhu let dochází k mutacím v těchto kmenových buňkách vlivem vnitřních i vnějších faktorů a dochází ke vzniku rakovinových kmenových buněk (CSC). Během vývoje karcinomu však může dojít k opakovaným mutacím buněk diferencovaných z kmenových nádorových buněk, což vede k podstatné genetické diverzifikaci mezi jednotlivými klony buněk v primárním nádoru (Dontu *et al.*, 2003).

2.3 Léčba

Léčba karcinomu prsu je téměř vždy kombinovaná. Je nutné využít více přístupů jako léčby regionální (operace) a léčby systémové (chemoterapie, cílená terapie). Stanovení léčby se odvíjí od TNM klasifikace a dalších prognostických faktorů. Důležitou roli

přestavují i prediktivní faktory, které jsou částečně shodné s prognostickými, ale zdaleka nejsou zcela totožné. Předpovídají pravděpodobnost úspěšné odezvy na předepsanou léčbu. Patří mezi ně např. exprese ER a PR, při jejichž pozitivitě je možné očekávat příznivou odezvu na hormonální léčbu. S metodami molekulární biologie, jako kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT-qPCR), mikročipová analýza nebo sekvenování nové generace (NGS), dosáhla diagnostika a léčba rakoviny prsu významného vývoje (Adam *et al.*, 2004; Bertoli *et al.*, 2015; Tung *et al.*, 2015).

Způsob léčby karcinomu prsu se stanovuje specificky pro každého pacienta. Na stanovení léčebného plánu se podílí mnoho lékařů včetně klinického onkologa, chirurga, patologa a dalších odborníků. V případě, že je primární nádor operabilní, je prvním krokem ablativní léčba neboli chirurgické odstranění nádoru. Dále je nasazena tzv. adjuvantní léčba, jejímž cílem je zničení případných nádorových mikrosložek. V případě, kdy je nádor neoperabilní, nebo jen částečně operabilní, je nasazena tzv. neoadjuvantní léčba, jejímž cílem je umožnění operability (zmenšení nádoru, případně uzlin) a zničení případných mikrosložek nádoru (Adam *et al.*, 2004, <http://www.rakovinaprso.cz/lecba/lecebny-plan/>). Následující postupy jsou aplikovány jako podpůrná léčba nebo v případě, že je dosavadní léčba neúčinná:

Kompetitivní léčba

Léčba cílená na hormonální receptory pomocí antiestrogenů. Mechanismus účinku spočívá zejména v blokování ER, což zablokuje vazbu estrogenu na receptor. Mezi antiestrogeny patří např. tamoxifen.

Inhibiční léčba

Je založena na inhibici syntézy estrogenů prostřednictvím inhibice enzymu aromatázy, který se účastní konečné konverze androgenů na estrogeny.

Aditivní léčba

Spočívá v blokaci předního laloku hypofýzy a poklesu gonadotropinů.

2.3.1 Cílená terapie rakoviny prsu

Pokroky v genomice a transkriptomice umožnily lépe porozumět biologii nádorových buněk a identifikovat biomarkery podílející se na jejich vzniku. Jak již bylo zmíněno, ER, PR a HER2 patří mezi známé biomarkery hodnocené při diagnóze. Jejich exprese pomáhá při určení optimálního terapeutického přístupu k léčbě.

2.3.1.1 Hormonální receptory

Estrogenové receptory jsou v prsních žlázách exprimované ve dvou izoformách, ER α a ER β . ER α je primárně zapojen do procesu patogeneze, včetně vzniku karcinomu prsu. Na tomto poznatku je založena endokrinní terapie ER⁺ karcinomů. Používaná léčiva jsou rozdělena do dvou tříd: selektivní modulátory estrogenových receptorů (SERMs) tamoxifen, reloxifen, toremifen a inhibitory aromatáz (AI) letrozol, anastrozol a exemestan. SERMs regulují signalizaci prostřednictvím vazby na ER. Např. tamoxifen se váže na ER a potlačuje dělení buněk a proliferaci (Patani *et al.*, 2013; De Abreu *et al.*, 2014). AI blokují biosyntézu estrogenu vazbou na aromatázy, enzymy syntetizující estrogen z mužského testosteronu (den Hollander *et al.*, 2013).

Progesteronové receptory se dosud využívají pouze jako prognostické markery, nikoli prediktivní. Hodnotí se, zda jsou v karcinomu PR exprimovány nebo je exprese potlačena. PR⁻ je spojováno s horší celkovou prognózou u ER⁺ karcinomů. Vysoká hladina exprese PR určuje podskupinu pacientů ER⁺ s největší pravděpodobností úspěšné odezvy na hormonální léčbu (Horwitz & McGuire, 1975; Hefti *et al.*, 2013).

2.3.1.2 HER2

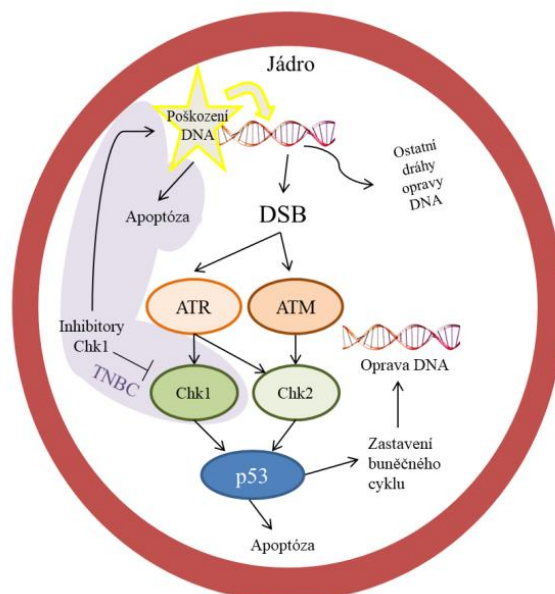
HER2 jsou skupina tyrosin kináz, podílející se na regulaci proliferace buněk, přežití a dalších procesech důležitých při karcinogenezi. K léčbě HER2⁺ karcinomů jsou používána léčiva cílená na HER2, jako např. monoklonální protilátka trastuzumab (Herceptin). Herceptin se váže na extracelulární doménu HER2 receptoru a inhibuje dimerizaci HER2 s dalšími členy rodiny ErbB. Potlačením dimerizace dojde

k zablokování jeho kinázové signalizační aktivity. Tato léčba byla schválena v kombinaci s chemoterapií a jinými léčivy (včetně AI) u pacientů s pokročilým HER2 pozitivním karcinomem prsu (Blackwell *et al.*, 2010; De Abreu *et al.*, 2014). Tato cílená léčiva inhibují růst nádorů a indukují apoptózu.

2.3.1.3 TNBC

Ačkoliv TNBC představuje typ karcinomu prsu charakteristický nedostatečnou expresí ER, PR a HER2, v některých případech je spojen s poškozením funkce tumor supresorových *BRCA 1/2* genů, zodpovědných za opravu dvouvláknových zlomů DNA, což vede k jejich hromadění. Jednou z cest, které buňka v tomto případě využívá k opravě poškozené DNA, je mechanismus opravy jednovláknových zlomů (SSB). Pro udržování integrity genomu buňky jsou zdedučené enzymy PARP (poly [ADP ribóza] polymerázy), především PARP1. Nádorová tkáň s defektní HR je citlivější k blokaci oprav SSB prostřednictvím PARP inhibitorů. Ani jeden z procesů samostatně (SSB nebo DSB) obvykle nevede k apoptóze, avšak jejich kombinace vyvolává syntetickou letalitu nádorových buněk. Americká společnost pro klinickou onkologii (ASCO) představila v roce 2017 Olaparib, PARP inhibitor, který prokazatelně zpomaluje růst metastazujícího karcinomu prsu u pacientů s mutací *BRCA1* a/nebo *BRCA2* genů (Schultz *et al.*, 2003; Rouleau *et al.*, 2010; Robson *et al.*, 2017).

U více než 80% TNBC jsou zaznamenány somatické mutace genu *TP53*. Po narušení dvouvláknové DNA dojde signalizační kaskádou ATM-Chk2, ATR-Chk1/2 (Obr. 5) k aktivaci p53. ATR (příbuzný „ataxia telangiectasia“ a Rad3) kinázy váží proteinové komplexy rekrutované na jednovláknových zlomech a aktivují Chk1 (kináza 1 kontrolního bodu) a Chk2 (kináza 2 kontrolního bodu). Chk proteiny udržují správný průběh replikace DNA a zablokování jejich funkce inhibitory Chk1 u TNBC buněk s mutantním *TP53* zvyšuje citlivost na látky poškozující DNA, např. deriváty platiny (Obr. 5). Tato léčba je stále ve vývoji, neboť u některých typů karcinomů byla pozorována její toxicita (Scenci *et al.*, 2000; Bryant *et al.*, 2014; Sakurikar & Eastman, 2015). Momentálně je inhibitor Chk1 LY2606368 zařazen do testování ve II. fázi klinických zkoušek (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02203513>).



Obrázek 5: Aktivace signální kaskády při poškození DNA. Účast proteinu p53 při poškození DNA. Po poškození DNA a vzniku dvouvláknových zlomů (DSB) dojde k aktivaci signální kaskády ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53. P53 indukuje apoptózu nebo pozastaví buněčný cyklus, než dojde k opravě DNA. Po opravě DNA je buněčný cyklus opět spuštěn. U TNBC s defektním genem *TP53* je podpořena inhibice Chk1, což způsobí nahromadění poškození DNA a následnou apoptózu. ATM - ataxia telangiectasia mutated, ATR - příbuzný „ataxia telangiectasia“ a Rad3, Chk1/2 – (kináza 1/2 kontrolního bodu), p53 – transkripční faktor, TNBC – „triple-negativní“ karcinom prsu

Kromě toho existuje řada sloučenin, které se testují v souvislosti s léčbou TNBC, ale jejich využití v klinické praxi je stále diskutabilní.

2.4 miRNA

Lidská DNA v buňce obsahuje přibližně 20 000 protein kódujících genů, zaujímajících minoritní prostor v genomu (necelá 2 %). Většina DNA tedy nekóduje sekvenci proteinů a označuje se jako tzv. nekódující DNA. Relativně nedávno se však zjistilo, že velkou část genomu představují geny, které jsou přepisovány do tzv. nekódujících RNA (ncRNA) (<https://www.encodeproject.org/>), které jsou obvykle, podle velikosti, děleny do dvou skupin na krátké ncRNA a dlouhé ncRNA. Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) jsou definovány jako třída důležitých heterogenních ncRNA o délce minimálně 200 nukleotidů, které tvoří největší část lidského transkriptomu. Krátké nekódující RNA (sncRNA) jsou malé molekuly RNA, kratší než 200 nukleotidů, se specifickými funkcemi v organismu, např. tRNA (transferová RNA), rRNA (ribosomální RNA), miRNA (mikroRNA) a siRNA (malé interferující RNA) (Numata *et al.*, 2003).

U člověka jsou z nekódujících RNA nejlépe prozkoumány třídy sncRNA zvané mikroRNA (miRNA). Lee & Ambros, 2001 prokázali, že tyto malé molekuly RNA mají schopnost vázat se na mediátorovou RNA (mRNA) na základě komplementarity bází. Vytvoření dvouvláknové molekuly RNA vede k degradaci nebo blokaci translace mRNA do cílového proteinu. V rostlinných i živočišných organismech byly identifikovány tisíce ncRNA, vysoce konzervované v příbuzných druzích (Lee & Ambros 2001; Llave *et al.*, 2002; Rhoades *et al.*, 2002; Anastasiadou *et al.*, 2019).

MikroRNA (miRNA) jsou jednovláknové, endogenní, vysoce konzervované RNA o délce ~22 nukleotidů, jejichž funkcí je regulace genové exprese pomocí specifické vazby na homologní části mRNA (mechanismus RNA interference). MiRNA váže mRNA, templát pro proteiny, enzymy, transkripční faktory a další regulační proteiny, a potlačí jejich translaci. Takto se miRNA podílejí na regulaci vývoje buňky, proliferaci, diferenciaci, apoptóze, přenosu signálu a dalších obranných procesech (Reinhart *et al.*, 2002; Miska, 2005). Rozmanitost a množství cílů miRNA nabízí velkou míru kombinačních možností regulace. Molekuly mRNA mohou být cílené jednou miRNA, nebo celou skupinou různých miRNA. Díky tomu tvoří složitou regulační síť integrovanou do vývojových procesů buňky (Lau *et al.*, 2001; Cui *et al.*, 2006).

2.4.1 Historie miRNA

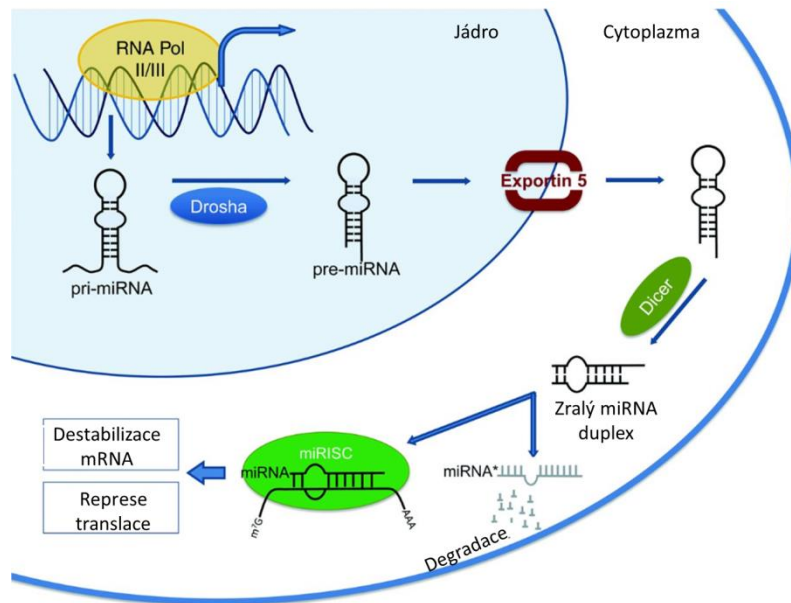
První miRNA *lin-4* byla objevena roku 1993 v *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) v laboratoři Victora Ambrose, týmem profesorky R.C. Lee (Lee *et al.*, 1993). V té době však ještě nebyl znám pojem miRNA, který byl poprvé popsán v časopise Science až v roce 2001 (Lagos-Quintana *et al.*, 2001). Tým Lee *et al.*, 1993 popsal, že genomová sekvence *LIN-4* nekóduje protein, ale malé molekuly RNA, které jsou funkčním produktem tohoto genu. MiRNA *lin-4* působí jako regulátory hladiny proteinu LIN-14 v buňce. Váží se komplementárně k sedmi repetitivním sekvencím na 3'UTR (3' nepřekládaný region) *lin-14* mRNA, což způsobí pokles hladiny proteinu LIN-14 v buňce prostřednictvím RNA-RNA interakce. Protein LIN-14 se účastní embryogeneze a časně fáze larválního vývoje (L1) *C. elegans*. Později je v L1 fázi aktivovaná exprese genu *LIN-4* a transkripty jsou komplementárně vázány k sekvencím *lin-14* mRNA. Tato interakce vede k poklesu proteinu LIN-14, přechodu z fáze L1 do fáze L2 a expresi

genů specifických pro další larvální vývoj. Lin-4 reprezentuje skupinu regulátorů genové exprese prostřednictvím malých „antisense“ (protisměrných) RNA.

V roce 2000 byla u *C. elegans* objevena druhá molekula miRNA, známá jako let-7 (lethal-7). Regulace prostřednictvím let-7 vede k přechodu z larválního stádia k dospělci. Ztráta aktivity genu *LET-7* vede k expresi larválních genů ve stádiu dospělého, zatímco zvýšení hladiny vede k předčasné expresi genů dospělého během larvální fáze. *LET-7* kóduje miRNA o velikosti 21 nukleotidů, komplementární k 3'UTR mRNA lin-14, lin-28, lin-41, lin-42 a daf-12, kódující proteiny zapojené do regulace vývoje *C. elegans* (Reinhart *et al.*, 2000).

2.4.2 Biosyntéza miRNA

Biosyntéza miRNA probíhá ve sledu mnoha reakcí. V jádře je gen pro miRNA transkribován RNA-polymerázou II. Výsledkem transkripce je primární miRNA (pri-miRNA), která je zpracována na ~70 nukleotidovou prekurzorovou miRNA (pre-miRNA) proteinovým komplexem složeným z RNAza III endonukleázy Drosha, Pasha a dsRNA-vazebnými proteiny (dsRBDs). Pre-miRNA vytvoří vlásenkovou strukturu s 5'-fosfátem a 3'-přesahem a je přenesena do cytoplazmy pomocí jaderného exportéru RanGTP/EXP5 (exportin 5), kde je rozpoznána enzymem Dicer. Dicer štěpí pre-miRNA a uvolní dvouvláknovou miRNA. MiRNA duplex je, po štěpení enzymem Dicer, začleněn do proteinového komplexu rodiny Ago (Argonaut). Následně dochází k degradaci jednoho vlákna duplexu, zatímco druhé vlákno zůstává vázáno v Ago komplexu jako zralá miRNA. Ta vytváří nukleoproteinový komplex RISC (RNA-indukovaný umlčovací komplex), který hraje důležitou roli při posttranskripční regulaci genové exprese, neboli RNA interferenci (RNAi, Obr. 6) (Hutvagner *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). Geny pro miRNA se běžně vyskytují v klastrech napříč celým genomem, nejčastěji v intergenových oblastech a intronech (Czech & Hannon, 2011).



Obrázek 6: Schématické znázornění syntézy miRNA v buňce a její zapojení do RNAi. Syntéza pri-miRNA v jádře RNA polymerázou II/III, sestřih pri-miRNA enzymem Drosha a vznik pre-miRNA. Export pre-miRNA do cytoplazmy jaderným exportním systémem Exportin 5. Vytvoření zralého miRNA duplexu enzymem Dicer. Rozvolnění duplexu, zabudování vedoucího vlákna do miRISC komplexu a současná degradace „passenger“ vlákna. Postranskripční regulace genové exprese vazbou na mRNA (převzato a upraveno Donadeu *et al.*, 2012).

2.4.3 RNA interference

RNA interference je důležitý mechanismus pro regulaci genové exprese buňky. Jedná se o umlčování translace prostřednictvím vazby malých, komplementárních RNA na 3'UTR mRNA. V lidských buňkách se vyskytuje šest tříd RISC komplexů. Jsou složeny z proteinů Dicer, PACT (interferonem indukovaný dsRNA dependentní protein kinázový aktivátor A) a TRBP (HIV-1 transaktivační RNA-vazebný protein), navázaných na čtyři středové Ago proteiny (Ago 1-4), z nichž Ago 2 štěpí cílovou mRNA (Chendrimada *et al.*, 2005). Ago proteiny mají schopnost vázat malé 19-30 nt dlouhé RNA molekuly a rozpoznají mRNA, která má být umlčena RISC komplexem. Dvouvláknová miRNA je pouze přechodná forma tvořena z „passenger“ vlákna a zralého vlákna miRNA (také vedoucí vlákno). MiRNA duplex je rozvolněn a vedoucí vlákno je začleněno do proteinového komplexu RISC, kde funguje jako řídicí molekula pro posttranskripční umlčování genové exprese vazbou na mRNA. K umlčování dochází dvěma posttranskripčními mechanismy, destabilizací mRNA anebo represí

translace. Stupeň komplementarity mRNA-miRNA je rozhodující pro způsob procesu regulačního mechanismu. Vysoký stupeň komplementarity umožňuje katalyzovanou degradaci mRNA, zatímco nízký stupeň komplementarity aktivuje mechanismus represe translace cílové mRNA (Park et al., 1994; Paddison *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004).

2.5 Úloha miRNA v karcinomu prsu

MiRNA není důležitá pouze pro vývoj organismu a diferenciaci, hraje také významnou roli při přenosu signálu, vývoji orgánů, interakci s virem a karcinogenezi. Nepostradatelnost miRNA byla potvrzena, mimo jiné, v regulaci savčího imunitního systému. Změna regulace může vést k jeho poruchám s následky v podobě autoimunitních onemocnění a rakoviny. MiRNA, jako regulační molekuly, zastávají v buňce důležitou roli jako onkogeny nebo nádorové supresory. Calin *et al.*, 2002 jako první ve své studii prokázali spojení miRNA s lymfocytovou leukémií, konkrétně miR-15 a miR-16. U většiny pacientů s tímto onemocněním, ve srovnání se zdravými jedinci, nebyly tyto miRNA přítomny. Z toho vyplývá, že pravděpodobně obě miRNA jsou zapojeny do patogeneze lymfocytové leukémie jako tumor supresory. Také Johnson *et al.*, 2005 studovali vliv miRNA na karcinogenezi. Z jejich výsledků bylo patrné, že miRNA let-7 reguluje expresi protoonkogenu RAS (protein ze skupiny malých GTPáz) a potlačuje tak jeho funkci. Ztráta let-7 vedla k nadměrné expresi RAS, což podpořilo růst buněk a přispělo ke karcinogenezi karcinomu plic.

Pomocí technologie mikročipu popisuje Liu *et al.*, 2004a metodu profilování genové exprese miRNA u lidských a myších buněk. Každý karcinom prsu má specifický vzorec pro expresi miRNA. Mnoho miRNA je, ve srovnání se zdravou tkání, umlčených, nebo naopak nadexprimovaných. Prostřednictvím miR-155, jedné z nejúčinnějších miRNA potlačujících apoptózu v lidských T-buňkách u leukémie a karcinomu prsu, dochází k blokaci aktivity kaspázy-3, cysteinproteázy, účastníci se programované buněčné smrti (Ovcharenko *et al.*, 2007; Faraoni *et al.*, 2009). Stějně tak miR-21, dobře známý onkogen potlačující apoptózu, jehož exprese je u karcinomu prsu výrazně zvýšena. Regulací cílových genů vede k invazi karcinomu a tvorbě vzdálených metastáz (Wang *et al.*, 2010).

EMT (Epitelovo-mezenchimová tranzice) je iniciální událost progresu BC. Jedním z klíčových regulátorů je β -Catenin, který se jako transkripční faktor váže na promotor genu miR-182 a zvyšuje jeho expresi. Zvýšená hladina miR-182 zesílí represi cílových genů včetně RECK („Reverse inducing cysteine rich protein with kazal“). V normálních buňkách slouží RECK jako tkáňový inhibitor pro matrixovou metaloproteinázu-9 (MMP-9). Při zvýšené expresi MMP-9 dochází k proliferační aktivitě nádoru, invazi nádorových buněk a tvorbě metastáz (Chiang *et al.*, 2013).

Aberantní exprese miRNA je výsledkem nesprávné regulace mnoha mechanismů. Jedním z nich je vznik abnormalit, kdy je tumorigeneze často doprovázena chromozomálními aberacemi, jako jsou delece, amplifikace a translokace v místech výskytu genů pro miRNA. Dalším příkladem může být vliv epigenetických faktorů, mezi které patří např. hypermetylace CpG sekvencí v promotorech genů. Posledním příkladem je regulace zpracování miRNA. Aberantní exprese miRNA je, kromě rychlosti transkripce pri-miRNA, dána efektivitou zpracování prekurzorů. V řadě nádorů byly pozorovány snížené úrovně exprese enzymů Dicer nebo Drosha, které jsou hlavními enzymy podílejícími se na zpracování miRNA (Calin *et al.*, 2004; Bommer *et al.*, 2007; Sevignani *et al.*, 2007; Lehmann *et al.*, 2008).

2.5.1 Úloha miRNA v „triple-negativním“ karcinomu prsu

Jak již bylo zmíněno, miRNA se jako regulační molekuly účastní mnoha stěžejních buněčných procesů, a tak jejich hladina exprese vytváří charakteristický profil odrážející jak tkáňovou specifitu, tak vývojový stupeň buňky. Expresní změny specifických miRNA jsou velmi informativní a mohou být použity k identifikaci tkáně původu dediferencovaného karcinomu. U TNBC jsou miRNA asociované s mnoha procesy nevyhnutelnými pro progresi onemocnění, např. přechod epitelových buněk na mezenchymové buňky v procesu EMT, přechod nádorových buněk do stádia kmenových buněk (Cancer stem cells – CSC), migrace a vývoj metastáz. Jedná se o „přeprogramování“ zásadních mechanismů v buňce. Tyto procesy jsou nezbytné pro šíření rakovinných buněk (Sethi *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2013; Piasecka *et al.*, 2018).

Rodina miRNA-200, složená z miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 a miR-429 jsou dobře známé negativní regulátory přechodu EMT. Mnohé studie prokázaly, že exprese miRNA-200 je u karcinomu TNBC velmi potlačena, obzvláště v metastazujících TNBC, což potvrdilo jejich tumor supresorovou účinnost (Korpál *et al.*, 2008; Humphries *et al.*, 2014; Piasecka *et al.*, 2018).

Typickou vlastností TNBC je vznik nejvíce agresivních metastatických karcinomů, velmi často rezistentních na radio- a chemoterapii díky vytváření samoregulačních CSC. Kvůli potlačení biosyntézy miR-205, jednoho z hlavních regulátorů kmenových buněk, včetně CSC, dochází k EMT a vzniku CSC. Studie prokázaly výrazně nižší podíl CSC v nádorové mase u myši se zvýšenou aktivitou miR-205 (Bojmar *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2013; Chao *et al.*, 2014). Expresní profil miRNA má vliv také na rezistenci na léčbu radio- a chemoterapií. Ouyang *et al.*, 2014 říkají, že nadexprese miR-155-5p, miR-21-3p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-183-5p a potlačení exprese miR-10b-5p, miR451a, miR-125b-5p, miR-31-5p, miR-195-5p je spojeno se zvýšenou rezistencí na tuto léčbu.

Navzdory mnohým studiím a pokrokům ve vývoji individuální terapie molekulárního podtypu „triple-negativního“ karcinomu prsu nebylo dosud dosaženo významného průlomu. Důležitým poznatkem byl objev změny expresního profilu miRNA v nádorových buňkách, což může sloužit jako užitečný diagnostický a prognostický faktor. Například skupina Schultz *et al.*, 2003 pozorovala, že snížení exprese *BRCA1* pomocí specifické miRNA vede ke zlepšení odpovědi na léčbu PARP inhibitory, čímž naznačili možné zapojení miRNA v reakci na léčbu karcinomu prsu. I přes tyto nové poznatky je v současné chvíli léčba TNBC stále založena převážně na konvenční chirurgii, radioterapii a chemoterapii (Piasecka *et al.*, 2018).

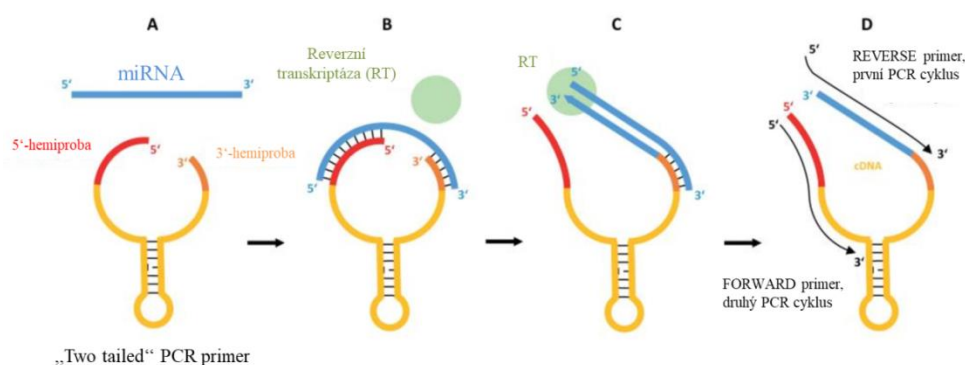
2.6 Metody detekce miRNA

Analýza profilu genové exprese miRNA je nezbytná pro pochopení jejich komplexní role v buňce. V této kapitole popisují metody detekce miRNA včetně polymerázové řetězové reakce, „*in situ*“ hybridizace a technologie mikročipů, které byly využity i v praktické části této práce.

2.6.1 Polymerázová řetězová reakce

Jedna z nejužívanějších metod molekulární diagnostiky používaná v klinických laboratořích je amplifikace genů pomocí PCR, představena Kary Mullis v roce 1980. Je založena na syntéze DNA „*in vitro*“, tedy ve zkumavce. Enzym DNA polymeráza syntetizuje nový řetězec DNA, komplementární k templátovému vlákně. Protože DNA polymeráza je schopna přidávat nukleotidy pouze na 3'-OH je hlavním krokem PCR navržení primerů, krátkých oligonukleotidů, komplementárních k cílové sekvenci nukleových kyselin. Díky PCR primerům je možné vymezit určitou sekvenci templátové DNA, která má být namnožena. Na konci několika cyklů (cca 35) se specifická sekvence DNA namnoží do milionů kopií, tzv. ampliconů. Jedná se o vysoce citlivou metodu, která několikanásobně zmnoží cílové úseky DNA cílový gen. (Mullis *et al.*, 1986).

MiRNA jsou velmi malé molekuly (~22 bp), což je obvyklá délka běžného PCR primeru. Sekvence miRNA v rámci jedné rodiny mohou být velmi podobné, lišící se pouze v jedné bázi. Podléhají různým post-transkripčním modifikacím, a tím se mohou lišit v nukleotidovém složení na jednom nebo obou koncích, což komplikuje kvantifikaci miRNA. Jedním z řešení je dvoustupňová „two tailed“ RT-qPCR, kde se reverzní transkripce provádí se specifickými primery o délce ~50nt, obsahující dvě hemiproby komplementární k miRNA. Zbylá část primeru je uspořádaná do vlásenkové struktury pro potlačení nespecifických interakcí. Po hybridizaci je spuštěna reverzní transkripce od 3'-hemiproby a dochází k syntéze nového vlákna cDNA (Obr. 7). cDNA je kvantifikovaná konvenční qPCR (kvantitativní PCR) využívající fluorescenční značky (Androvic *et al.*, 2017).



Obrázek 7: Znárodnění „two tailed“ RT-qPCR. A: „Two tailed“ primer obsahující 2 hemiproby propojené vlásenkovou sekvencí. B: vazba hemiproby na miRNA a tvorba stabilního komplexu. C: Vazba reverzní transkriptázy na 3' konec hybridizovaného primeru a vytvoření cDNA. D: Amplifikace cDNA metodou qPCR s využitím dvou specifických primerů. Převzato a upraveno Androvic *et al.*, 2017.

2.6.1.1 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (RT-qPCR)

Metodou kvantitativní PCR, se kterou jsme pracovali v experimentální části, je možné průběžně sledovat množství amplifikovaného produktu během jednotlivých cyklů. Zaznamenání amplifikace je založeno na emisi světla fluorescenčními značkami, navázanými na amplifikované cDNA. Změna intenzity fluorescence je přímo úměrná množství produktu (Bustin, 2004).

Výchozím materiálem pro RT-qPCR je RNA, která je v prvním kroku transkribována do komplementární DNA (cDNA) enzymem reverzní transkriptázou (RT). cDNA je následně použita jako templát pro qPCR. Metoda je využívána pro analýzu genové exprese, validaci mikročipů, genetické testování a výzkum různých onemocnění (<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>).

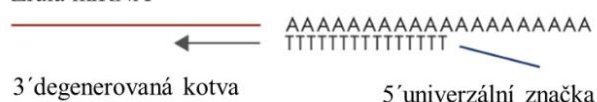
V experimentální části byl využit miRCURY LNA miRNA PCR Starter Kit (Qiagen) pro RT-qPCR. LNA („locked nucleic acid“) je modifikovaný RNA nukleotid, který tvoří vazbu mezi 2'-kyslíkem a 4'-uhlíkem. Vzniká konjunktivní konformace, která významně zvyšuje hybridizační vlastnosti oligonukleotidů. Tato souprava obsahuje miRCURY SYBR Green Master Mix pro PCR amplifikaci a kvantifikaci produktu

v reálném čase. Detekce je založena na vazbě barviva SYBR Green na vlákno DNA (Obr. 8). Tento komplex barvivo-DNA absorbuje modré světlo a následně emituje světlo zelené. Toho se dá následně využít i pro kontrolu kvality výsledného PCR amplikonu analýzou křivky tání (<https://www.qiagen.com/us/shop/pcr/primer-sets/mircury-lna-mirna-pcr-starter-kit/#productdetails>).

Syntéza cDNA pro všechny miRNA

Syntéza prvního vlákna cDNA (RT)

Zralá miRNA



Dva LNA miRNA specifické primery pro qPCR

PCR amplifikace v reálném čase

miRNA specifický „forward“ primer



Tříhodinový pracovní postup



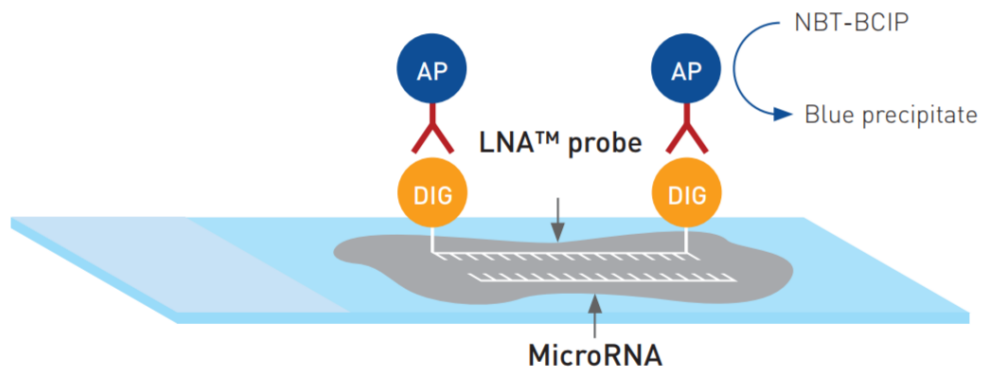
Obrázek 8: Schéma principu RT-qPCR s využitím miRCURY LNA miRNA PCR Starter Kit (Qiagen). Syntéza cDNA z templátové miRNA a amplifikace cDNA za účasti specifických PCR primerů. Detekce je založena na vazbě barviva SYBR Green na vlákno DNA a následné emisi zeleného světla (převzato a upraveno z <https://www.qiagen.com/us/shop/pcr/primer-sets/mircury-lna-mirna-pcr-starter-kit/#productdetails>).

2.6.2 In situ hybridizace

Metoda „*in situ*“ hybridizace napomáhá lokalizaci specifické sekvence nukleotidů na cílové nukleové kyselině (DNA, RNA) přímo na jejím přirozeném místě výskytu v buňce nebo ve tkáni. Vychází z poznatku, že molekula DNA je složena z bází (adenin, thymin, guanin, cytosin) a nukleosid trifosfátů, mezi jednotlivými bázemi vznikají slabé vazebné interakce, tzv. vodíkové vazby, které umožňují vznik dvouvláknové šroubovice DNA (α -helix). Pokud dojde vlivem tepla nebo chemikálií k přerušení vodíkových vazeb mezi bázemi, struktura α -helixu je narušena a dojde k denaturaci (rozvolnění) DNA. V případě návratu k příznivějším podmínkám má dvoušroubovice schopnost se znovu remodelovat a tato schopnost tvoří základ pro molekulární hybridizaci.

V této metodě jsou využívány značené molekuly DNA nebo RNA (sondy) pro identifikaci a kvantifikaci cílové sekvence v biologickém vzorku. Tyto sondy jsou vysoce specifické a hybridizují pouze s komplementárními vlákny nukleových kyselin. V rámci této metody se buňky nebo tkáně studují v co nejpřirozenějších podmínkách, kdy je do vzorku vnesena značená sonda a za specifických podmínek dojde k hybridizaci s cílovou sekvencí molekuly nukleové kyseliny. Sonda je obvykle značená radioaktivní, chemickou nebo biologickou značkou (Gall & Pardue, 1969).

V experimentální části byl využitý miRCURY LNATM microRNA ISH Optimization Kit (FFPE). Tento kit se používá pro detekci miRNA „*in situ*“ hybridizací v tkáňových parafinových vzorcích fixovaných formalínem (FFPE). Prvním krokem je odmaskování miRNA pomocí proteinázy-K, což umožňuje přístup hybridizačních sond. Specifické sondy LNATM jsou dvojité značeny digoxigeninem (DIG) na 5' a 3' konci. Po hybridizaci je na vzorky aplikována primární protilátka anti-DIG, kongujovaná s alkalickou fosfatázou (AP). AP přemění AP substrát 4-nitro-modré tetrazolium–5-bromo-4-chloro-3'-indolylfosfát (NBT-BCIP) na tmavě modrý precipitát (Obr. 9). Na závěr jsou jádra dobarvena jadernou červení, která umožní lepší histologické rozlišení vzorku. Distribuce modrého zbarvení je následně studována pod mikroskopem a vyhodnocena patologem (<https://www.qiagen.com/us/shop/pcr/primer-sets/mircury-lna-mirna-ish-optimization-kits/?akamai-feo=off&clear=true#productdetails>).



Obrázek 9: Schématické znázornění principu microRNA ISH. Hybridizace specifické sondy komplementární k analyzované miRNA, značené na 3' a 5' konci digoxigeninem. Navázání anti-DIG protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou (AP). Přeměna AP substrátu NBT-BCIP na modrý precipitát (převzato a upraveno z <https://www.qiagen.com/us/shop/pcr/primer-sets/mircury-lna-mirna-ish-optimization-kits/#productdetails>)

2.6.3 Technologie mikročipů

Technologie spočívá v ukládání mnoho různých sekvencí DNA a RNA na malý povrch, obvykle skleněný čip. Různé geny nebo RNA jsou distribuované na čipu v řádcích a sloupcích tak, že známe polohu každého z nich. Tato technologie má mnohem větší kapacitu pro studium genů než například výše zmíněná metoda PCR.

V určitém čase jsou některé geny kódující miRNA transkribované a produkováné v mnoha kopiích a pomocí mikročipů můžeme vyhodnotit profil jejich genové exprese. Změny v expresním profilu napomáhají pochopení procesů v buňce při patogenezi různých onemocnění, a tím mohou miRNA působit i jako biomakery různých typů onemocnění, včetně rakoviny.

Analýza miRNA technologií mikročipů poskytuje komplexní detekci miRNA ze všech organismů přítomných v miRNA databázi miRBase (<http://www.mirbase.org/>). Pro výběr kandidátních miRNA pro účely této práce byl použitý miRNA 3.0 array chip společnosti Affymetrix. Čipy Affymetrix využívají značení RNA biotin-streptavidinem. Po izolaci RNA je analýza zahájena syntézou poly (A) konce, následuje ligace biotinové značky a hybridizace na mikročipovou destičku. Po hybridizaci jsou čipy skenovány a data jsou vyhodnocena pomocí software, např. miRNA QC Tool (Dee & Getts, 2011).

Existuje řada dalších metod a přístupů využívaných pro analýzu miRNA (např. sekvenování nové generace – NGS), které však v této práci nejsou zmíněny. Tyto technologie umožňují kromě samotné analýzy exprese miRNA i identifikaci nových miRNA, určení jejich sekvence, či mutační analýzu.

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Použité přístroje a nástroje

Automatické pipety (Eppendorf)

Centrifuga 5424 (Eppendorf)

Centrifuga LMC-3000 (Biosan)

ImmEdge™ pero (Vectorlabs)

Digestoř MCS-Avantgarde (Thermo Scientific Fisher)

DNA/RNA UV-sterilní box UVC/T-AR (Biosan)

Fotoaparát v mobilním telefonu (Samsung J5 2016)

Hybridizér S245130 220V (Dako)

Nano Drop ND-1000 (NanoDrop Technologies)

Ohříváč heater DB2D (Dri-Block®)

Optický mikroskop s fotoaparátem DP71 (Olympus)

Termostat Heraeus Incubator (Thermo Scientific)

Termocykler LightCycler® 480 (Roche)

Termocykler Vapo Protect MasterCycler Pro-S (Eppendorf)

Třepačka Sky Line Digital Orbital Shaker S-3.16L (ELMI)

Vlhkostní komůrka

Vortex-Genie 2SI-0236 (The Scientific Industries)

3.1.2 Software pro zpracování výsledků

LightCycler® 480 1.5.1 (Roche)

Statistica 12 (StatSoft)

3.1.3 Enzymy a chemikálie

Použité kity

- miRCURY LNATM microRNA ISH Optimization Kit (FFPE) (Exiqon)
 - LNATM miRNA sonda, dvojitě značená DIG; LNATM scrambled miRNA sonda, dvojitě značená DIG; LNATM U6 snRNA sonda, značená DIG, miRNA ISH pufr (2x); proteináza K
- AllPrep® DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen)
 - PKD pufr; Proteináza K; RLT pufr; FRN pufr; RPE pufr; Dnáza I bez RNáz; RDD pufr; voda bez nukleáz (DEPC)
- miRCURY[®] LNA[®] miRNA PCR Kit (Qiagen)
 - miRCURY RT reakční pufr (5x); miRCURY RT enzym mix (10x)–Mg²⁺, RT primery, dNTP; UniSp6 RNA Spike-in Template, voda bez nukleáz (DEPC); miRCURY SYBR Green PCR master mix – miRCURY SYBR Green PCR pufr, dNTP mix, QuantiNova[®] DNA polymeráza (Taq DNA polymeráza, protilátka QuantiNova, QuantiNova guard);

Protilátka

- Ovčí anti-Digoxigenin-Alkalická fosfatáza Fab fragmenty (Roche)

Zalévací médium

- Eukitt[®] (Sigma aldrich)

Další chemikálie: 30% BSA (Sigma), C₆H₅O₇Na₃ · 2H₂O, EDTA, Etanol (70%, 96%, 99,9%), DEPC voda (voda s přísadkou dietylu polykarbonátu), ddH₂O, Jaderná červeň (Sigma aldrich), KCl, KH₂PO₄, Levamisol (Fluka), NaCl, NBT-BCIP tablety (Roche), Ovčí sérum (Jackson Immunoresearch), Tris-HCl (pH 7,4), Tween 20 (Sigma), Xylen

3.1.4 Složení roztoků

10x Fosfátový pufr (PBS)

- 1,37 M NaCl
- 27 M KCl
- 18 mM KH₂PO₄

Doplněno DEPC na konečný objem 1 l

10x Fosfátový pufr s Tweenem 20 (PBS-T)

- 1,37 M NaCl
- 27 M KCl
- 18 mM KH₂PO₄
- 1 ml Tween 20

Doplněno DEPC na konečný objem 1 l

10x SSC pufr

- 1,5 M NaCl
- 0,15 M C₆H₅O₇Na₃ · 2H₂O

Doplněno DEPC na konečný objem 1 l

Blokovací roztok

- 10 ml PBS-T
- 200 µl ovčího séra
- 330 µl 30% BSA

KTBT pufr

- 50 mM Tris-HCl
- 150 mM NaCl
- 10 mM KCl

Doplněno DEPC na konečný objem 1 l

Pufr pro proteinázu K

- 5 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,4)
- 2 ml 0,5 M EDTA
- 0,2 ml 5 M NaCl

Doplněno DEPC na konečný objem 1 l

Protilátka anti-DIG v ředícím roztoku

- 5 ml PBS-T
- 200 µl ovčího séra
- 5 ml PBS
- 330 µl 30% BSA
- 52,65 µl Ovcí anti-Digoxigenin-AP Fab fragmenty

Substrát pro alkalickou fosfatázu

- NBT/BCIP tableta
- 20 µl Levamisolu
- 10 ml DEPC vody

Roztok proteinázy K

- 0,75 µl proteinázy K
- 1 ml proteínáza K pufru

3.1.5 Biologický materiál

V rámci této diplomové práce bylo použito 20 tkáňových bloků fixovaných ve formalinu a zalitých do parafinu (FFPE) získaných od 20 pacientek s „triple-negativním“ karcinomem prsu a pocházejících z let 2012 - 2015. Tyto bloky byly získány z archivu Ústavu klinické a molekulární patologie, který je součástí Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Všechny analyzované pacientky podepsali informovaný souhlas s využitím jejich biologického materiálu pro výzkumné účely. Všech 20 bloků bylo zpracováno pomocí ISH metody. Následně byl materiál získaný od 5 pacientek analyzován pomocí RT-qPCR.

Metodou RT-qPCR bylo analyzováno 17 vzorků různé morfologie od 5. pacientek s TNBC (Tab. 2).

Tabulka 2: Přehled tkáňových vzorků pro analýzu RT-qPCR

Bioptické číslo	Orientační číslo	Morfologie
H843/15	14	Celý tkáňový řez
	14N	Normální dukty
	14T2	Karcinom s medulárními rysy
	14T3	Atypický medulární karcinom tubulární struktury
H14961/15	16T1	Světlobuněčná/apokrinní diferenciace, periferie
	16T2	Světlobuněčná/apokrinní diferenciace, centrálně
	16T3	CIS, lymfocytární infiltrát
H2449/15	17	Celý tkáňový řez
	17N	Normální dukty
	17T1	Invazivní složka
	17T2	Buněčné monstrozity
H15272/15	21T1	Světlobuněčná/apokrinní diferenciace
	21T2	CIS
	21T3	Lymfocytární infiltrát
H15741/13	4N	Normální dukty
	4T1	Invazivní mikropapilární karcinom v blízkosti hyalinizovaného centra
	4T2	Invazivní mikropapilární karcinom po obvodu ložiska

CIS – karcinom „*in situ*“

3.2 Metody

3.2.1 Mikročipová analýza

Mikročipová analýza na čípech miRNA 3.0 array chip (Affymetrix) byla vykonána na Ústavu molekulární a translační medicíny po izolaci celkové RNA kitem AllPrep® DNA/RNA FFPE (Qiagen) z buněk získaných z FFPE řezů po laserové mikrodisekci (laserový mikrodisektor PALM MicroTweezers ZEIS). Laserovou mikrodisekci provedli 2 patologové (prof. MUDr. Z. Kolář, CSc. a MUDr. M. Kolečková) z Ústavu klinické a molekulární patologie, a to z důvodu sledování nádorové heterogenity u TNBC, což je cílem projektu, v rámci kterého byla tato diplomová práce uskutečněna.

3.2.2 „*In situ*“ hybridizace

Pomocí „*in situ*“ hybridizace (ISH) byla analyzována exprese kandidátních miRNA: miR-200C-3p, miR-205-5p, miR-150-5p, miR-185-5p, miR-155-5p, miR-4417, miR143-3p, miR-182-5p vybraných na základě výsledků mikročipové analýzy u tkáňových vzorků získaných od 20. pacientek s TNBC. Pro optimalizaci podmínek maximalizace poměru signálu k šumu byla použita ISH „scrambled“ sonda jako negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola byla použita sonda pro U6 snRNA, která je vysoce konzervovaná a stabilně exprimovaná ve všech buňkách.

Z FFPE bloků byly nařezány řezy o tloušťce 5-6 μm a nanoseny na podložná skla Superfrost Plus® (Thermo Scientific). Pro přilnutí řezů ke sklíčku byla tato umístěna na 1 hod do termostatu při 56 °C.

„*In situ*“ hybridizace byla zahájena deparafinací FFPE vzorků pacientek s TNBC 3x 5 min v xylenu. Následně byly promyty 10 s 99,9% etanolem a zavodněny postupným promytím po 5 min v 99,9% etanolu, 96% etanolu a nakonec v 70% etanolu. Takto rehydratované řezy byly umístěny na 5 min do 1x PBS pufu.

Po rehydrataci byly vzorky inkubovány 15 min s roztokem proteinázy K při 37°C pro degradaci bílkovin a zpřístupnění nukleových kyselin. Po 15 minutách byly promyty 2x3 min v PBS a opět dehydratovány po 1 min v 70% etanolu, 96% etanolu

a 99,9% etanolu. Po dehydrataci byly řezy ponechány při pokojové teplotě až do úplného vyschnutí (15 min).

Mezi tím byl připraven hybridizační mix (Tab. 3). 2x miRNA ISH pufr a DEPC voda byly smíchány v poměru 1:1 a uloženy do chladu. Všechny použité sondy byly denaturovány 4 min při 90°C a krátce centrifugovány. Ke každé takto aktivované sondě byl přidán vychlazený 1x miRNA ISH pufr.

Tabulka3: Příprava hybridizačního mixu pro ISH

Sonda	Výsledná koncentrace [nM]	Objem sondy [μl]	1x miRNA ISH pufr [ml]	Ředění
LNA TM U6 snRNA	50	4	2	1:500
LNA TM scrambled miRNA	40	3,2	2	1:625
miR-200C-3p	40	3,2	2	1:625
miR-205-5p	40	3,2	2	1:625
miR-150-5p	60	4,8	2	1:417
miR-185-5p	80	6,4	2	1:313
miR-155-5p	80	6,4	2	1:313
miR-4417	40	3,2	2	1:625
miR-143-3p	40	3,2	2	1:625
miR-182-5p	80	6,4	2	1:313

Na jednotlivé vzorky bylo aplikováno 25 μl hybridizačního mixu. Každý řez byl překryt parafilmem a umístěn do hybridizéru na 5 min při 60°C a 15 h při 37°C. Po hybridizaci byl odstaněn parafilm a řezy byly promyty v SSC pufru podle následujícího schématu (Tab. 4).

Tabulka 4: Schéma promývání FFPE vzorků pacientek s TNBC v SSC pufru

Krok	1	2	3	4	5	6	7
Koncentrace SSC pufru	5x	5x	1x	1x	0,2x	0,2x	0,2x
Čas [min]	5	5	5	5	5	5	5
Teplota [°C]	22	50	50	50	50	50	22

Pro zabránění rozmytí následujících roztoků byla kolem řezů aplikovaná hydrofobní bariéra pomocí ImmEdgeTM pera a skla byla přemístěna do vlhkostní komůrky. Po nanesení bariéry byly řezy 15 min inkubovány v blokovacím roztoku a následně 60 min v ředícím roztoku s anti-DIG-AP protilátkou při pokojové teplotě. Následně byly řezy promyty 3x 3 min v PBS-T a poté byl nanesen substrát pro AP. Vzorky byly inkubovány 120 min při 37°C ve tmě. Reakce AP substrátu byla zastavena inkubací 2x5 min v KTBT pufru. Následovalo promytí 2x1 min v DEPC vodě.

Pro kontrast byla jádra dobarvena přefiltrovaným roztokem jaderné červeně (1 min). Poté byly vzorky promývány 10 minut pod tekoucí vodou a nakonec opět dehydratovány po 1 min v 70% etanolu, 96% etanolu a 99,9% etanolu.

Nakonec byly vzorky montovány do zalévacího média a překryty krycím sklíčkem. Výsledky byly vyhodnoceny pod optickým mikroskopem a obrázky byly zhotoveny fotoaparátem DP71 (Olympus).

3.2.3 Dot blot

Pro detekci správnosti značení ISH sond digoxigeninem byla použita metoda imobilizace na membráně dot blot. Touto metodou byla ověřena funkčnost sond miR-182-5p a miR-155-5p. Jako pozitivní kontrola byla použita sonda miR-255-5p. Ze sond miR-155-5p a miR-255-5p byla vytvořena koncentrační řada 20 nM, 40 nM, 60 nM a 80 nM a ze sondy 182-5p koncentrační řada 20 nM, 40 nM, 80 nM, 100 nM, 150 nM. Koncentrační řady byly připraveny obdobně jako v Tab.3.

V prvním kroku byla připravena nitrocelulózová membrána o velikosti 6x4 cm, která byla ekvilibrována 10 minut v 2x SSC pufru a následně umístěna na filtrační papír. Ve druhém kroku byl na membránu nanesen 1 µl vzorku ve formě kapky. Poté bylo na

membránu působeno 36 sec ultrafialovým světlem a po zafixování vzorků byla membrána promyta 2x5 min v PBS-T. Následně byla membrána blokována 30 min při pokojové teplotě v 10x blokovacím roztoku. Po odstranění blokovacího roztoku byla membrána inkubována s ovčí anti-DIG protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou na třepačce 30 min při pokojové teplotě. Poté byla promyta 2x5 min v PBS-T. Následně byl na membránu aplikován AP substrát NBT-BCIP a celá nádoba byla překryta alobalem. Po 30 min inkubace byla reakce zastavena přidáním KTBT pufru. Membrána byla vysušena a výsledky byly vyhodnoceny a vyfoceny fotoaparátem v mobilním telefonu.

3.2.4 Izolace celkové RNA

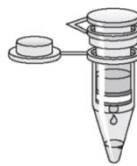
K izolaci celkové RNA byl využit kit AllPrep® DNA/RNA FFPE (Qiagen).

Celé FFPE řezy od 2 pacientek s TNBC umístěné do mikrozkušavek byly deparafinovány inkubací v 1 ml xylenu. Po přidání xylenu byly vzorky vortexovány po dobu 30 sec a centrifugovány při plné rychlosti 2 min. Poté byl supernatant odpipetován a přidán 1 ml 99,5% etanolu, opět byly vzorky 30 sec vortexovány a 2 min centrifugovány. Postup s etanolem byl zopakován a následně byl supernatant odpipetován a vzorky vysušeny 10 min při pokojové teplotě (případně déle, až do úplného vyschnutí).

Po vysušení byl pelet resuspendován ve 150 µl PKD pufru a následně bylo přidáno 10 µl proteinázy K. Po promíchání byly vzorky inkubovány 15 min při 56 °C a poté prudce schlazeny inkubací na ledu po dobu 3 min. Následovala centrifugace (20 000g, 15 min) a přenesení filtrátu do čisté mikrozkušavky, kde byl inkubován 15 min při 80 °C. Po krátké centrifugaci bylo přidáno 320 µl RLT pufru a 1120 µl 99,5% etanolu. Takto připravené vzorky byly filtrovány pomocí centrifugačních kolonek RNeasy MinElute spin column (Obr. 10) umístěných v čistých mikrozkušavkách. Po centrifugaci (8000g, 15 sec) byl odstraněn filtrát a na kolonku bylo přidáno 350 µl FRN pufru. Vzorky byly znovu centrifugovány (8000g, 15 sec) a filtrát byl odstraněn. Na kolonku byla přidána směs 10 µl DNase I a 70 µl RDD pufru. Vzorky byly inkubovány 15 min při pokojové teplotě a poté byl přidán FRN pufr. Po centrifugaci (8000g, 15 sec) byla kolonka umístěna do čisté mikrozkušavky a na ni aplikováno 500 µl RPE pufru.

Tento krok byl zopakován. Kolonka byla umístěna do čisté mikrokumavky, která byla otevřená a centrifugovaná 5 min při plné rychlosti. Opět byla kolonka umístěna do čisté mikrokumavky a po přidavku 30 μ l vody bez RNáz a centrifugaci při plné rychlosti po dobu 1 min byla celková RNA uvolněna z membrány do mikrokumavky. Takto připravená RNA byla zmrazena při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Stejný postup izolace celkové RNA z mikrodisekovaných vzorků byl použit i na Ústavu molekulární a translační medicíny.



Obrázek 10: Centrifugační kolonka RNeasy MinElute spin column

3.2.4.1 Měření koncentrace RNA

Po izolaci celkové RNA byla změřena koncentrace pomocí spektrofotometru NanoDrop v modulu Nucleic Acids. Pro měření byl použit 1 μ l vzorku izolované RNA a jako blank byla použita voda. Koncentrace byla změřena při 260 nm a čistota byla vyjádřena jako poměr absorbancí A_{260}/A_{280} . Čistá RNA tedy absorbuje při 260 nm a jiné absorbance odpovídají přítomnosti kontaminantů (nežádoucích látek). U nekontaminované RNA by se měl poměr absorbancí pohybovat mezi hodnotami 2-2,2 (<http://www.mgp.cz/files/nd8000-manual.pdf>).

3.2.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí

Celková RNA, získaná viz. 3.2.4, byla dále analyzována metodou RT-qPCR. Bylo analyzováno 17 vzorků 5. pacientek s TNBC: 2 RNA byly izolovány z celých tkáňových řezů a zbylých 15 RNA bylo získáno z Ústavu molekulární a translační medicíny, kde byly tyto RNA primárně vyizolovány pro účely mikročipové analýzy.

3.2.5.1 Reverzní transkripce

Pro reverzní transkripci byl použit kit miRCURY[®] LNA[®] miRNA PCR (Qiagen).

Mikrozkumavka s lyofilizovanou UniSp6 RNA spike-in byla krátce centrifugována a doplněna 80 μ l vody bez nukleáz (DEPC). Po promíchání a krátké centrifugaci byla ponechána 30 min na ledu. Všechna izolovaná templátová RNA byla ředěna na konečnou koncentraci 5 ng/ μ l DEPC vodou. Podle Tab. 5 byl připraven mix pro reverzní transkripci.

Tabulka 5: Reakční mix pro reverzní transkripcijednoho vzorku

	5x miRCURY RT pufr	DEPC voda	10x miRCURY RT enzyme Mix	UniSp6 RNA spike-in	RNA templát	Celkový reakční objem
Objem [μl]	2	4,5	1	0,5	2	10

Reakční mix byl vortexován a krátce centrifugován. Cyklus reverzní transkripce byl spuštěn v termocykleru Vapo Protect podle protokolu s následujícími kroky: inkubace 60 min při 42°C, 5 min při 95°C a prudké schlazení na 4°C. Vzorky pak byly uchovány při -20 °C.

3.2.5.2 Kvantitativní PCR

Pro kvantitativní PCR (qPCR) byl použit kit miRCURY[®] LNA[®] miRNA PCR (Qiagen). Pomocí této metody byly kvantifikovány miR-155-5p a miR-182-5p. MiR-103-3p byla výrobcem doporučená endogenní kontrola. UniSp6 Spike-in byla použita jako kontrola úspěšného průběhu reverzní transkripce a samotné qPCR.

Mikrozkumavky s lyofilizovanými PCR primer mixy byly krátce centrifugovány a doplněny 220 μl DEPC vody. Takto připravené byly ponechané 20 min při pokojové teplotě, následně byly vortexovány a krátce centrifugovány. Komplementární DNA získaná při reverzní transkripci (viz kapitola 3.2.5.1) byla naředěna vodou bez nukleáz v poměru 1:59. Poté byl připraven reakční mix (Tab. 6).

Tabulka 6: Reakční mix pro qPCR jednoho vzorku

	2x miRCURY SYBR Green Master Mix	PCR primer mix	cDNA templát (1:59)	Voda bez nukleáz	Celkový reakční objem
Objem [μl]	5	1	3	1	10

Reakční mix byl pro každý vzorek a každou miRNA připraven v triplikátech a pak byl po 10 μl rozpipetován do 96 jamkové PCR destičky, která byla přikryta průhlednou fólií. Poté byla destička centrifugována (2 min, 1200 g) a umístěna do systému LightCycler® 480 Real-Time PCR (Roche, CT, USA). Program qPCR byl spuštěn podle Tab. 7.

Tabulka 7: Podmínky qPCR cyklu

	Počáteční aktivace	Denaturace	Annealing	Analýza křivky tání
Čas [s]	120	10	60	
Teplota [°C]	95	95	56	95
Počet cyklů		40		

Získané výsledky byly analyzovány pomocí programu LightCycler® 480 1.5.1 (Roche).

3.2.6 Statistická analýza

Výsledky mikročipové analýzy a RT-qPCR byly porovnány programem Statistica 12. Byl stanoven Spearmanuv korelační koeficient, který udává korelaci mezi výsledkami z Affymetrix a RT-qPCR. Koeficient nabývá hodnot 0-1, kdy hodnoty nad 0,6 jsou považovány za silně korelující. Určena hladina významnosti byla $p \leq 0,05$.

4 Výsledky

4.1 Mikročipová analýza

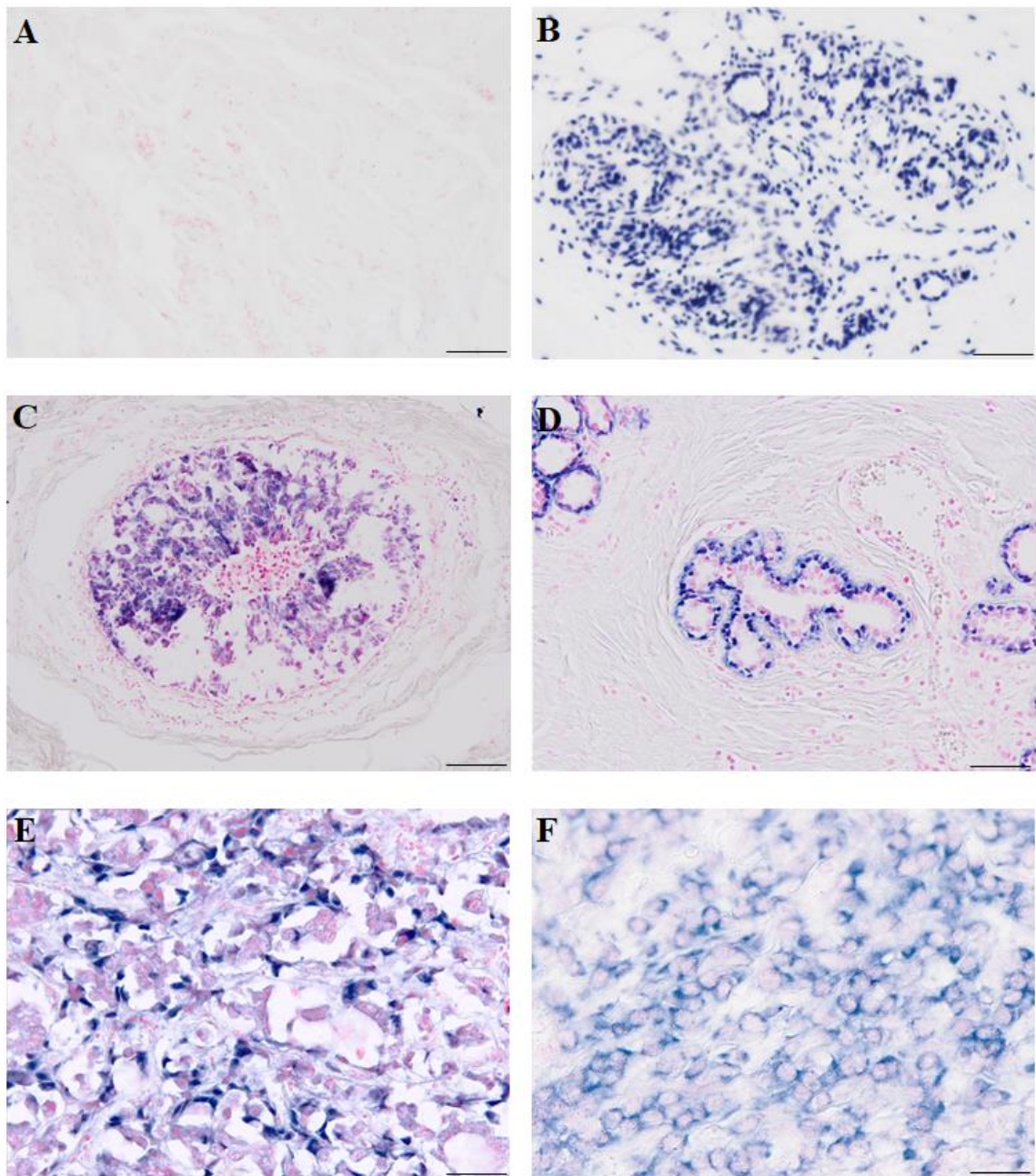
Mikročipová analýza na čípech miRNA 3.0 array chip (Affymetrix) byla vykonána na Ústavu molekulární a translační medicíny po izolaci celkové RNA z buněk získaných z FFPE řezů po laserové mikrodisekci. Na základě nejvýraznějších rozdílů hladiny exprese v konkrétních morfologických strukturách přítomných u pacientů s TNBC bylo vybráno osm kandidátních miRNA (Tab. 8). Některé z nich mají funkci jako onkogeny nebo tumor-supresory nejen u „triple-negativního“ karcinomu prsu (2.5.1). Lokalizace exprese těchto miRNA v jednotlivých tkáních byla následně ověřena metodou ISH, případně byly jejich hladiny detekovány pomocí RT-qPCR.

Tabulka 8: Kandidátní miRNA s deregulovanou expresí u pacientek s TNBC.

miRNA	200C-3p	205-5p	150-5p	185-5p	155-5p	4417	143-3p	182-5p
--------------	---------	--------	--------	--------	--------	------	--------	--------

4.2 *In situ* hybridizace

Hlavním cílem této experimentální práce byla vizualizace reálné distribuce vybraných miRNA ve 20 tkáňových vzorcích získaných od 20 pacientek s „triple-negativním“ karcinomem prsu. Vzorky byly fixované ve formalínu a zalité do parafínu (FFPE). Metodou „*in situ*“ hybridizace (ISH) byla analyzována distribuce osmi kandidátních miRNA: miR-200C-3p, miR-205-5p, miR-150-5p, miR-185-5p, miR-155-5p, miR-4417, miR143-3p, miR-182-5p vybraných na základě výsledků mikročipové analýzy. Jednotlivé miRNA byly ve tkáních TNBC identifikovány pomocí sond značených digoxigeninem, který byl následně rozpoznán specifickou protilátkou anti-DIG konjugovanou s alkalickou fosfatázou. Po přidání AP substrátu (NBT-BCIP) byl na jednotlivých vzorcích pozorován modrý precipitát odpovídající specifické lokalizaci cílových miRNA ve tkáních. Jádra byla vizualizována pomocí jaderné červeně (červený precipitát) (Obr. 11).



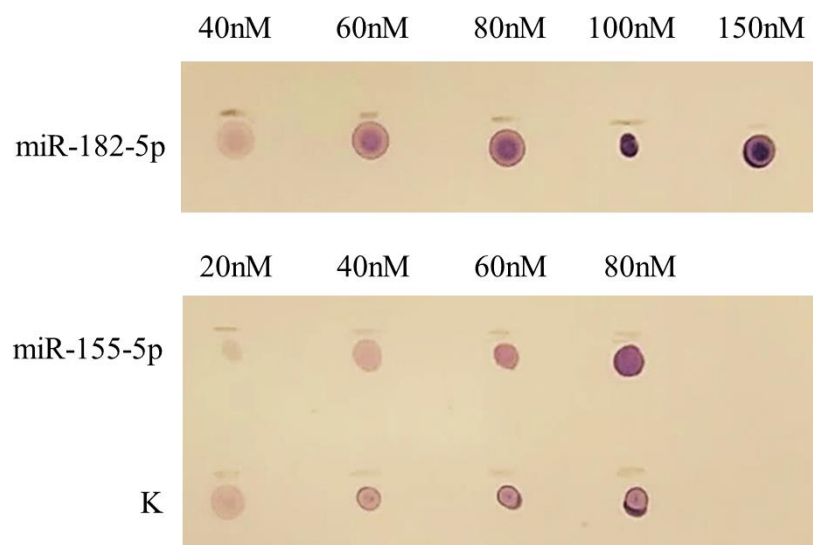
Obrázek 11: Příklad výsledku barvení reálné distribuce vybraných miRNA ve tkáňových vzorcích pacientek s „triple-negativním“ karcinomem prsu. A – negativní kontrola „scrambled“; B – pozitivní kontrola U6 snRNA, C – miR-185-5p pozitivita CIS; D – miR-205-5p pozitivita myoepitelii; E – miR-4417 pozitivita kmenových buněk; F – miR-200C-3p pozitivita cytoplazmy nádoru. Měřítka odpovídá C: 100 μ m; D, E: 50 μ m; F: 20 μ m

U šesti kandidátních miRNA miR-200C-3p; miR-205-5p; miR-150-5p; miR-185-5p; miR-4417 a miR-143-3p byla pozorována reálná distribuce miRNA v cílové tkáni patientek s TNBC odpovídající výsledkům získaných z mikročipové analýzy. Zbylé dvě miRNA miR-155-5p a miR-182-5p se nepodařilo detekovat a bylo nutné provést další analýzu. Tato zahrnovala ověření správného značení sond digoxigeninem metodou dot blot a ověření exprese těchto miRNA ve tkáních metodou RT-qPCR.

Jelikož je tato diplomová práce pouze součástí většího projektu, kompletní výsledky z mikročipové analýzy a histologické hodnocení nabarvených preparátů, na kterých jsem se osobně neúčastnila, nejsou v této práci uvedeny. Jsou zde uvedeny pouze závěry dílčích analýz nevyhnutelné k dalšímu směřování této práce.

4.3 Dot blot

Protože výsledky ISH u testovaných miRNA miR-182-5p a miR 155-5p neodpovídaly výsledkům mikročipové analýzy, resp. tyto miRNA nebyly vůbec detekovatelné, bylo nutné ověřit správnost značení ISH sond pro miR-182-5p a miR-155-5p digoxigeninem. K ověření byla využita metoda imobilizace na membráně dot blot. Jako pozitivní kontrola byla použita sonda pro miR-205-5p, jelikož funkčnost této sondy byla ověřena v předchozím postupu ISH (Obr. 11D). Testované sondy byly ve formě kapky imobilizovány na membránu a inkubovány s anti-DIG protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou. Po přidání AP substrátu NBT-BCIP byla vyhodnocena přítomnost modrého precipitátu. Bylo zjištěno, že testované sondy miR-182-5p i miR-155-5p jsou správně značeny digoxigeninem a výsledky korelují s pozitivní kontrolou (Obr. 12). Proto jsme se v případě těchto dvou „problematických“ miRNA následně zaměřili na detekci jejich hladiny exprese ve tkáni pomocí výrazně citlivější metody RT-qPCR.



Obrázek 12: Ověření správnosti značení ISH sond pro miR-182-5p a miR-155-5p digoxigeninem. Membrána s imobilizovanými sondami inkubována s anti-DIG protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou. Po přidání AP substrátu NBT-BCIP byl pozorován modrý precipitát, což potvrdilo správné značení testovaných sond. K- pozitivní kontrola miR-205-5p

4.4 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí

Pro potvrzení výsledků mikročipové analýzy byla po ověření samotné exprese vybraných miRNA ve tkáních provedena RT-qPCR. Celková RNA byla izolována ze 17 vzorků (Tab. 2) pocházejících od pěti pacientek s „triple-negativním“ karcinomem prsu. Čistota a koncentrace izolované RNA ze vzorků (14, 17) byla ověřena pomocí spektrofotometru Nano Drop. Koncentrace zbylých 15 vzorků (14N, 14T2, 14T3, 16T1, 16T2, 16T3, 17N, 17T1, 17T2, 21T1, 21T2, 21T3, 4N, 4T1, 4T2) byla poskytnuta z Ústavu molekulární a translační medicíny. Průměrná koncentrace všech těchto RNA byla 50,97 ng/μl (medián = 20,68 ng/μl; minimálně 8,92 a maximálně 457,3 ng/μl). Čistota (A_{260}/A_{280}) vzorku 14 byla 2,01 a čistota vzorku 17 byla 2,00, což svědčí o kvalitní izolaci čisté RNA

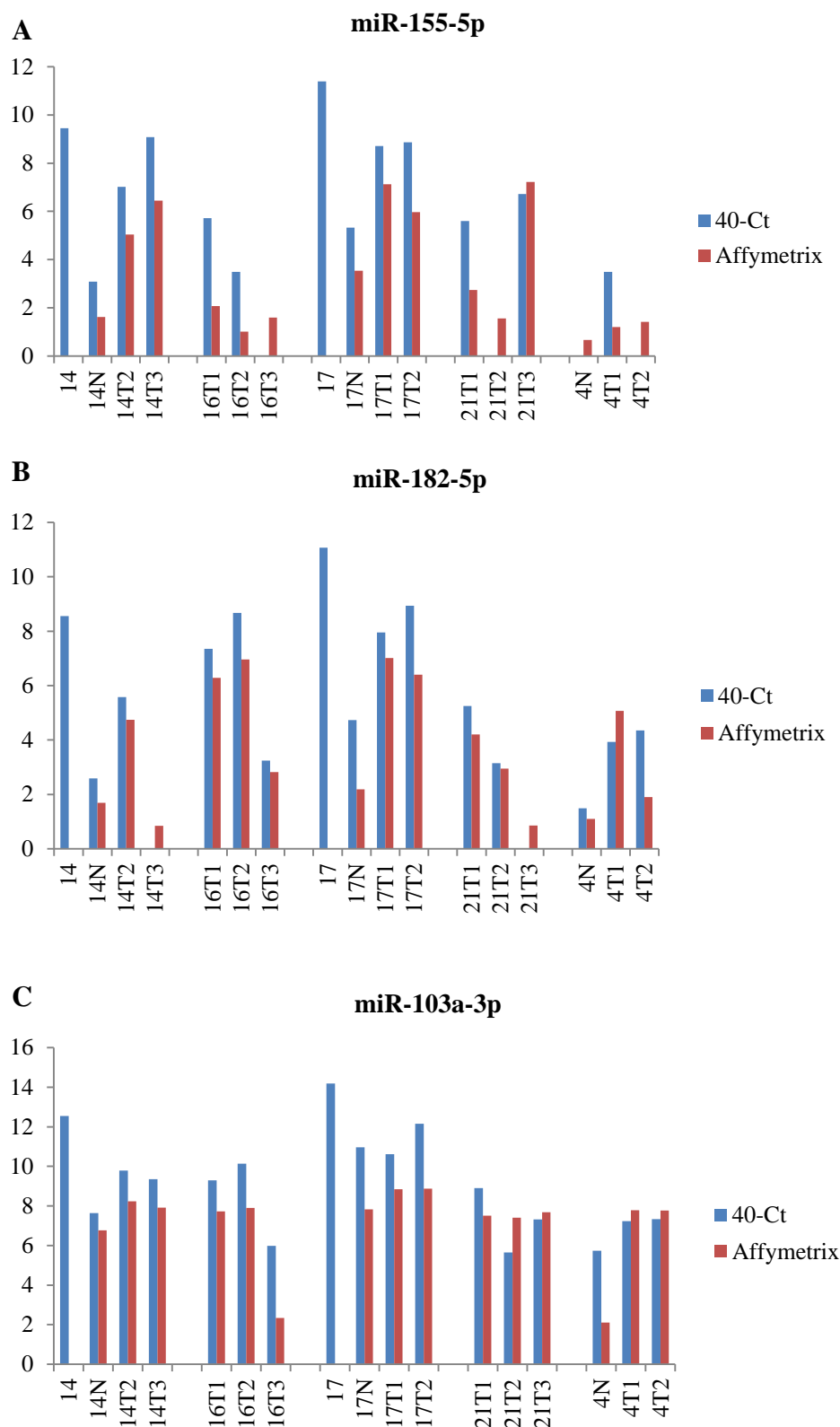
Hladina exprese byla detekována pro dvě kandidátní miRNA miR-155-5p a miR-182-5p, které se nepodařilo objektivně analyzovat metodou ISH. cDNA po reverzní transkripci byla relativně kvantifikována s využitím specifických primerů pro miR-155-

5p a miR-182-5p a fluorescenční barvičky SYBR green. Pro qPCR byla jako endogenní kontrola, stanovená výrobcem kitu, použita miR-103a-3p, a jako kontrola samotného průběhu reakce byla použita UniSp6 spike-in. Relativní kvantifikace analyzovaných miRNA měla být stanovena metodou $2^{\Delta\Delta Ct}$ vůči kontrole miR-103a-3p, avšak hladiny její exprese, pro námi vyšetřovanou prsní tkáň, nesplňovali obecné kritérium stabilní exprese, proto byly při analýze získaných výsledků využity přímo průměrné Ct hodnoty (Přílohy, Tab. S1). Hladiny exprese analyzovaných miR-155-5p, miR-182-5p a miR-103a-3p byly v jednotlivých morfologických strukturách zvýšeny, resp. sníženy podobně, jako v případě výsledků získaných z mikročipové analýzy (Obr. 13). Pomocí korelační analýzy bylo zjištěno, že výsledky RT-qPCR odpovídají výsledkům získaným z Affymetrix ($p < 0,001$). Spearmanův korelační koeficient potvrzuje signifikantní korelaci ($R_s > 0,6$) mezi výsledky těchto dvou metod analýzy exprese miR-155-5p, 182-5p a miR-103a-3p (Obr. 14).

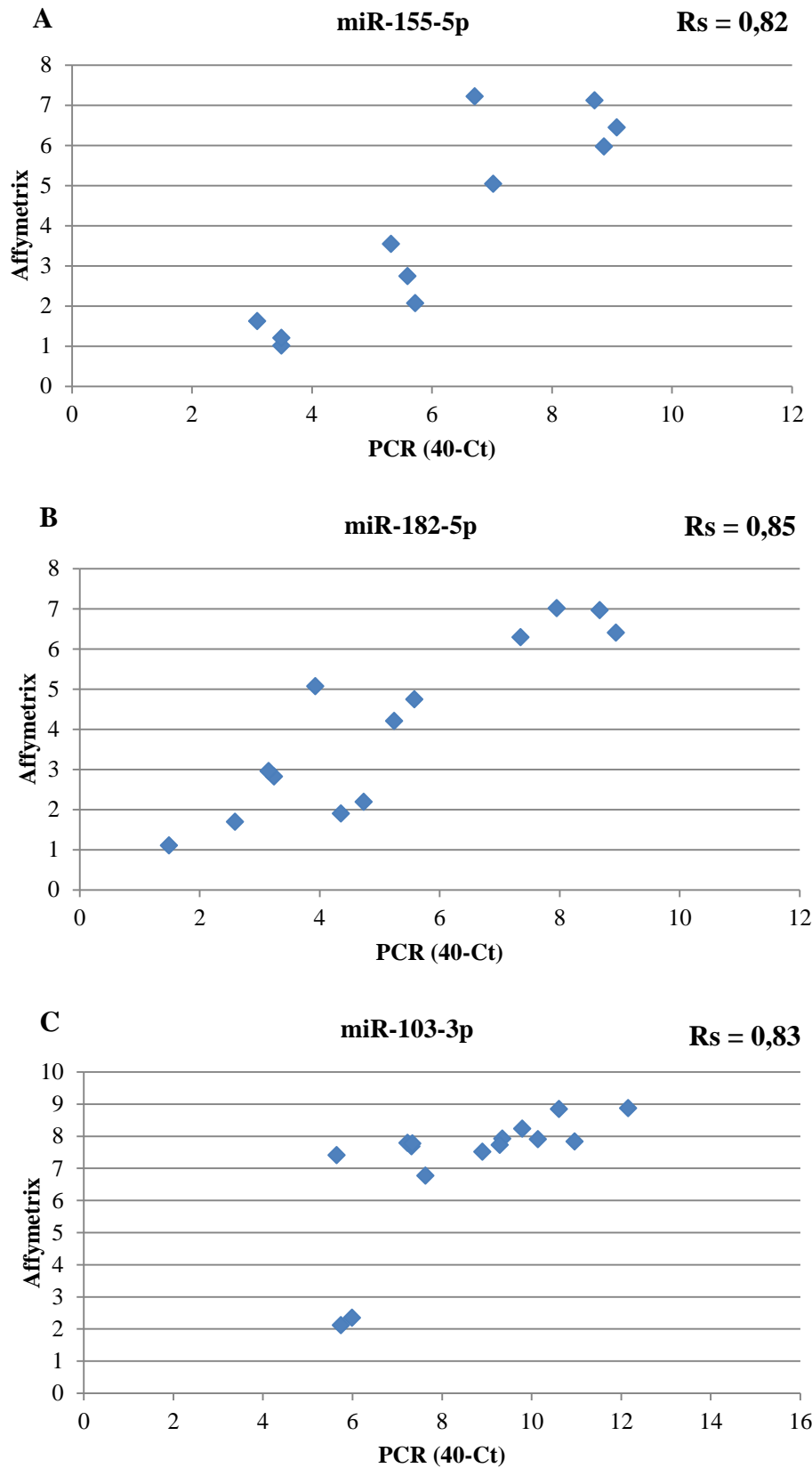
Výsledky této práce identifikují vybrané miRNA jako možné diagnostické markery v jednotlivých morfologických typech TNBC. Tyto výsledky jsou zhrnuty v Tab. 9.

Tabulka 9: Shrnutí morfologií s pozitivní expresí vybraných miRNA u pacientek s „triple-negativním karcinomem prsu“

miRNA	Morfologie s pozitivní expresí
miR-200c-3p	CIS, nádorové buňky, fibroblasty
miR-205-5p	Myoepitelie
mir-150-5p	Makrofágy, fibroblasty, nádorové buňky, lymfocyty
miR-185-5p	CIS, fibroblasty
miR-4417	CIS, lymfocyty, fibroblasty, kmenové buňky, jádérka, makrofágy
miR143-3p	Lymfocyty, stromální buňky
miR-155-5p	Karcinom s medulárními a tubulárními rysy, invazivní složky a buněčné monstrozity, lymfocytární infiltrát
miR-182-5p	Karcinom s medulárními rysy, světlobuněčná/apokrinní diferenciací, invazivní složky a buněčné monstrozity



Obrázek 13: Relativní hladina exprese vybraných miRNA ve vzorcích pacientek s TNBC získaná metodou RT-qPCR a Affymetrix. A – miR-155-5p, B – 182-5p, C – miR-103a-3p. U vzorků 14 a 17 získaných z tkáňových řezů byla stanovena analýza genové exprese pouze metodou RT-qPCR. 40-Ct – 40 cyklů RT-qPCR minus hodnota průměrné Ct. Affymetrix – mikročipová analýza exprese vybraných miRNA.



Obrázek 14: Grafické znázornění Spearmanova korelačního koeficientu porovnávajícího hladiny exprese miR-155-5p (A), miR-182-5p (B) a miR-103a-3p (C) stanovené metodami RT-qPCR a mikročipovou analýzou.

5 Diskuze

Karcinom prsu je jedno z nejčastěji diagnostikovaných nádorových onemocnění u žen, a proto v současné době probíhá velmi aktivní snaha o identifikaci nových diagnostických a prognostických biomarkerů. Především pak u „triple-negativního“ karcinomu prsu, který je charakteristický svojí agresivní povahou a špatnou odpovědí na léčbu. Proto je důležité onemocnění včas rozpoznat a diagnostikovat. Jedním z těchto potenciálních diagnostických markerů je detekce miRNA s aberantní expresí. MiRNA jsou důležité regulační molekuly, ovlivňující posttranskripční mechanismy genové exprese. Jejich aberantní exprese tedy často vede k narušení buněčného cyklu a vzniku patologického stavu buňky (Adam, *et al.*, 2004; Paddison *et al.*, 2002; Mathe *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015).

Hlavním cílem této práce bylo detekovat a analyzovat miRNA s odlišnou expresí v jednotlivých morfologických strukturách u pacientek s „triple-negativním“ karcinomem prsu pro získání obrazu reálné distribuce těchto vybraných miRNA ve tkáni. Karcinomy prsu vykazují extrémní variabilitu označovanou jako nádorová heterogenita. Díky tomu jsou děleny do mnoha kategorií. Pochopení regulace profilu genové exprese a znalost heterogenity nádoru je důležitý krok k pochopení mechanismu karcinogeneze a progresu karcinomu v prstní tkáni (Dexter *et al.*, 1978).

U šesti kandidátních miRNA miR-200C-3p; miR-205-5p; miR-150-5p; miR-185-5p; miR-4417 a miR-143-3p se podařilo vizualizovat reálnou distribuci ve tkáních pacientek s TNBC metodou ISH. Tyto miRNA by tedy mohly být použity jako potenciální biomarkery při diagnostice „triple-negativního“ karcinomu prsu. U dvou kandidátních miRNA miR-155-5p a miR-182-5p nebyla distribuce touto metodou detekována, a proto bylo nutné ověřit výsledky exprese získané mikročipovou analýzou pomocí RT-qPCR. Následně byly tyto výsledky vzájemně korelovány. Z korelační analýzy vyplynulo, že stanovení hladin vybraných miRNA pomocí RT-qPCR odpovídá výsledkům získaným z mikročipové analýzy. Proto se jako možné vysvětlení neúspěšné vizualizace těchto miRNA metodou ISH jeví nedostatek morfologických struktur charakteristických pro zvýšenou expresi těchto miRNA ve tkáňových řezech. Nejpravděpodobněji se v tomto případě jedná o „vykrájení“ řezů, protože dané parafinové bloky se použily jak pro samotnou diagnostiku, tak pro mikrodisekci, a také pro další metody (např. imunohistochemie), které byly v rámci projektu vykonány. Je tedy možné, že tyto

nádory, původně menší než 2 cm, už byly při analýze miR-155-5p a miR-182-5p spotřebovány. Dalším možným důvodem by mohlo být nedodržení podmínek postupu bez přítomnosti RNáz, ale vzhledem k tomu, že zbytek sond specificky detekoval analyzované miRNA, jeví se tato možnost jako nepravděpodobná.

Obě tyto miRNA jsou již definovanými onkogeny. Jejich zvýšená exprese v nádorových buňkách podporuje vznik a proliferaci nádorových buněk. Výsledky odpovídají dřívějším studiím, které prokázaly zvýšenou expresi miR-155-5p u TNBC, která např. bývá spojená s lékovou rezistencí na bufalin, kardiotonický steroid s protinádorovými schopnostmi. Bufalin vyvolává apoptózu TNBC buněk, která je však díky zvýšené hladině miR-155-5p v cílových buňkách potlačena (Ouyang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). Přesný mechanismus regulační dráhy miR-182-5p v TNBC buňkách nebyl dosud definován a však při mnoha kvantitativních analýzách byla prokázána jejich výrazně zvýšená exprese ve srovnání se zdravou tkání a propagace EMT u BC (Chiang *et al.*, 2013; Calvano Filho *et al.*, 2014). Dalšími TNBC miRNA onkogeny jsou také miR-150, jejichž zvýšená exprese podporuje růst BC a potlačuje apoptózu vazbou receptoru P2X7 (P2X purinoceptor 7). P2X7 je ATP-dependentní iontový kanál, zapojený do tvorby membránových pórů (Huang *et al.*, 2013).

Dalším typem miRNA regulujících karcinogenezi TNBC jsou tumor-supresory, mezi které patří miR-143-3p, které potlačují proliferaci nádorových buněk vazbou na LIMK1 (LIM kináza 1). LIMK1 reguluje polymerizaci aktinu a inaktivaci aktin vazebného faktoru CFL1 (Kofilin 1), který depolymeraci aktinu vyvolává (Li *et al.*, 2017). Dalším příkladem jsou miR-200 a miR-205, které potlačují funkci transkripčních faktorů ZEB1 („Zinc finger E-box binding homeobox 1“) a ZEB2, vyvolávajících EMT proces iniciující progresi BC (Gregory *et al.*, 2008). EMT je potlačen také miR-4417 a v nádorových buňkách se sníženou expresí této miRNA dochází ke zvýšené proliferaci, migraci a tvorbě metastáz (Wong *et al.*, 2019). Mezi tumor-supresory patří také miR-185, jejichž snížená exprese byla potvrzena u mnoha karcinomů včetně TNBC. Cílem této miRNA je transkripční faktor E2F6 (E2F transkripční faktor 6) a metyltransferáza DNMT1 (DNA metyltransferáza 1), které mají důležitou roli při regulaci buněčného cyklu (Tang *et al.*, 2014). MiR-103a-3p navržena jako endogenní kontola RT-qPCR nesplňovala obecné kritérium stabilní exprese, takže nebyla použita pro stanovení relativní kvantifikace metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$, ale byla statisticky analyzována jako jedna ze zkoumaných miRNA ve vztahu k TNBC. Polyarchou *et al.*, 2012 uvádí, že miR-103

inhibuje formaci CSC a tvorbu mamosféry. Rozdílnou expresi jsme pozorovali v případě miR-185-5p, miR-200c-3p a miR-4417. Dle literatury jsou tyto miRNA označeny jako tumor-supresory, ale v našem případě byly detekovány i v nádorových buňkách. To by mohlo souviset s tím, že námi vyšetřované vzorky byly odebrané v dřívějším stádiu karcinogeneze (kvůli možnosti sledování kompletního nádoru obsahujícího odlišné morfologie na 1 řezu byly nádory menší než 2 cm), kdy ještě nedošlo k plnému rozvoji procesů a mechanismů charakteristických pro agresivní nádory. Je známo, že karcinogeneze je postupný a řízený proces, ve kterém v určité posloupnosti dochází k aktivaci onkogenů a deaktivaci tumor-supresorů, což charakterizuje i jednotlivá vývojová stadia nádoru (od hyperplazie až po metastatický karcinom) (Fearon & Vogelstein, 1990). Právě tento posloupný mechanismus karcinogeneze by mohl vysvětlit expresi miR-185-5p, miR-200c-3p a miR-4417 přítomnou i v nádorových buňkách.

Vzhledem k povaze není možné v případě TNBC nastavit účinnou cílenou léčbu prostřednictvím detekce hormonálních receptorů a receptoru pro lidský epidermální růstový faktor 2, jako je tomu u ostatních karcinomů prsu (Mathe *et al.*,2015; Yang *et al.*,2015). Proto díky nedostatečnému množství jiných diagnostických a prognostických markerů je identifikace miRNA s aberantní expresí u TNBC poměrně rozšířená a neustále se vyvíjí snahy o zařazení analýzy těchto molekul jak do diagnostiky, tak i do terapeutických přístupů. Tato práce tedy nabízí 8 kandidátních miRNA molekul, které by měly být dále testovány k ověření jejich vztahu k TNBC.

6 Závěr

V teoretické části této práce byla vypracována literární rešerše zabývající se karcinomem prsu, mikroRNA a jejich zapojení do patogeneze. Práce byla zaměřena na „triple-negativní“ karcinom prsu, který je pro svoji agresivní povahu doprovázen jednou z nejhorších prognóz a kvůli nedostatku účinných terapeutických cílů je v současné době obtížné tento typ diagnostikovat a zvolit vhodnou cílenou léčbu.

Experimentální část byla zaměřena na analýzu kandidátních miRNA s aberantní expresí v jednotlivých morfologických strukturách u pacientek s „triple-negativním“ karcinomem prsu. U šesti kandidátních miRNA miR-200C-3p; miR-205-5p; miR-150-5p; miR-185-5p; miR-4417 a miR-143-3p se podařilo detekovat reálnou distribuci ve tkáních pacientek s TNBC metodou ISH, která odpovídala výsledkům mikročipové analýzy. Tyto miRNA by mohly být použity jako potenciální biomarkery při diagnostice „triple-negativního“ karcinomu prsu. U dvou kandidátních miRNA miR-155-5p a miR-182-5p nebyla distribuce detekována, a proto bylo nutné ověřit správnost značení hybridizačních sond metodou dot blot, která správné značení potvrdila. Nakonec byl výsledek genové exprese mikročipovou analýzou Affymetrix ověřen pomocí RT-qPCR. Výsledky byly porovnány statistickou analýzou a je patrné, že je mezi nimi významná statistická korelace.

7 Literatura

- Abdel-Hafiz H.A. (2017): Epigenetic mechanism of tamoxifen resistance in luminal Breast Cancer. *Diseases* **5**, E16.
- ACOG Committee on Practice Bulletins. (2009): Hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *Gynecologic oncology* **113**, 6-11.
- Adam Z., Vaniček J., Vorlíček J. a kolektiv (2004): Karcinom prsu. In: *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. 2.*, aktualizované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 213-230.
- Al-Hajj M., Becker M.W., Wicha M., Weissman I., Clarke M.F. (2004): Therapeutic implications of cancer stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development* **14**, 43-47.
- Alberts B. (2008): Molecular biology of the cell. 5th edition ed. New York: Garland science. ISBN 978-0-8153-č105-5
- Amirikia K.C., Mills P., Bush J., Newman L.A. (2011): Higher population-based incidence rates of triple-negative breast cancer among young African-American women: implications for breast cancer screening recommendations. *Cancer* **117**, 2747-2753
- Anastasiadou E., Jacob L.S., Slack F.J. (2019): Non-coding RNA networks in cancer. *Nature Reviews Cancer* **18**, 5-18.
- Anders C.K., Hsu D.S., Broadwater G., Acharya C.R., Foekens J.A., Zhang Y., Wang Y., Marcom P.K., Marks J.R., Febbo P.G., Nevins J.R., Potti A., Blackwell K.L. (2008): Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancer with shared patterns of gene expression. *Journal of clinical Oncology* **26**, 3324-3330.
- Androvic P., Valihrač L., Elling J., Sjoback R., Kubista M. (2017): Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic acids research* **45**, e144.
- Bertoli G., Cava C., Castiglioni I. (2015): MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics* **5**, 1122-1143.
- Bhargava R., Beriwal S., Dabbs D.J., Ozbek U., Soran A., Johnson R.R., Brufsky A.M., Lembersky B.C., Ahrendt G.M. (2010): Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy: a single institutional experience with 359 cases. *Cancer* **116**, 1431-1439.
- Blackwell K.L., Burstein H.J., Storniolo A.M., Rugo H., Sledge G., Koehler M., Ellis C., Casey M., Vukelja S., Bischoff J., Baselga J., O'Shaughnessy J. (2010): Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology* **28**, 1124-1130.
- Bojmar L., Karlsson E., Ellegård S., Olsson H., Björnsson B., Hallböök O., Larsson M., Stål O., Sandström P. (2013): The role of microRNA-200 in progression of human colorectal and breast cancer. *PloS one* **8**, e84815.
- 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., Fearon E.R. (2007): p53-mediated activation of miRNA 34 candidate tumor-suppressor genes. *Current biology* **17**, 1298-1307.
- Bork P., Blomberg N., Nilges M. (1996): Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nature genetics* **13**, 22-23.
- Brierley J., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. (2017): TNM classification of malignant tumours. Eight edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. ISBN 9781119263562
- Bryant C., Rawlinson R., Massey A.J. (2014): Chk1 inhibition as a novel therapeutic strategy for treating triple-negative breast and ovarian cancers. *BMC cancer* **14**, 570.
- Burzynski S.R. (2003): Gene silencing – a new theory of aging. *Medical Hypotheses* **60**, 578-583.
- Bustin S.A. (2004): A-Z of quantitative PCR. *International University Line* **5**, 4-29.
- Calin G.A., Dumitru C.D., Shimzu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., 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. *Proceeding 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. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 2999-3004.

Calvano Filho C.M., Calvano-Mendes D.C., Carvalho K.C., Maciel G.A., Ricci M.D., Torres A.P., Filassi J.R., Baracat E.C. (2014): Triple-negative and luminal A breast tumors: differential expression of miR-18a-5p, miR-17-5p, and miR-20a-5p. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **35**, 7733-7741.

Carey L.A. (2010): Through a glass darkly: advances in understanding breast cancer biology. *Clin Breast Cancer* **10**, 188-195.

Chendrimada T-P., Gregory R.I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shiekhattar R. (2005): TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740-744.

Creighton C.J. (2012): The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics* **6**, 289-297.

Connor F., Bertwistle D., Mee P.J., Ross G.M., Swift S., Grigorieva E., Tybulewicz V.L., Ashworth A. (1997): Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation. *Nature genetics* **17**, 423-430.

Criscitello C., Azim H.A., Schouten P.C., Linn S.C., Sotiriou C. (2012): Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology* **23**, 13-18.

Czech B., Hannon G.J. (2011): Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nature reviews. Genetics* **12**, 19-31.

Daniel C.W., Silberstein G.B., Strickland P. (1987): Direct action of 17 beta-estradiol in mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography. *Cancer research* **47**, 6052-6057.

Davis B.W., Zava D.T., Locher G.W., Goldhirsch A., Hartmann W.H. (1984) Receptor heterogeneity of human breast cancer as measured by multiple intratumoral assays of estrogen and progesterone receptor. *European journal of cancer & clinical oncology* **20**, 375-382.

De Abreu F.B., Schwartz G.N., Wells W.A., Tsongalis G.J. (2014): Personalized therapy for breast cancer. *Clinical genetics* **86**, 62-67.

Den Hollander P., Savage M.I., Brown P.H. (2013): Targeted therapy for breast cancer prevention. *Frontiers in oncology* **23**, 250.

Dexter D.L., Kowalski H.M., Blazar B.A., Fligel Z., Vogel R., Heppner G.H. (1978) Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer research* **38**, 3174-3181.

Donadeu F.X., Schauer S.N., Sontakke S.D. (2012): Involvement of miRNA in ovarian follicular and luteal development. *The journal of endocrinology* **215**, 323-334.

Dontu G., Al-Hajj M., Abdallah W.M., Clarke M.F., Wicha M.S. (2003): Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Proliferation* **36**, 59-72.

Dvořák K., Lukáš Z., Fabián P., Doubek M., Dvořáková D., Adam Z. (2004): Patomorfologie maligních chorob. Brno: Masarykova univerzita, 50-71.

Faraoni I., Antonetti F.R., Cardone J., Bonmassar E. (2009): miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochemica et biophysica acta* **1792**, 497-505.

Fearon E.R., Vogelstein B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-67.

Fiegl M., Tueni C., Schenk T., Jakesz R., Gnant M., Reiner A., Rudas M., Pirc-Danoewinata H., Marosi C., Huber H. (1995) Interphase cytogenetic reveals a high incidence of aneuploidy and intra-tumor heterogeneity in breast cancer. *British journal of cancer* **72**, 51-55.

Ford D., Easton D.F., Bishop D.T., Narod S.A., Goldgar D.E. (1994): Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast cancer linkage consortium. *Lancet* **19**, 692-695.

Foulkes W.D., Brunet J.S., Stefansson I.M., Straume O., Chappuis P.O., Bégin L.R., Hamel N., Goffin J.R., Wong N., Trudel M. (2004): The prognostic implication if the basal-like (cyclin

E^{high}/p27^{low}/p53⁺/glomeruloid-microvascular-proliferation⁺) phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Cancer research* **64**, 830-835.

Greene G.L., Sobel N.B., King W.J., Jensen E.V. (1984): Immunochemical studies of estrogen receptors. *Journal of steroid biochemistry* **20**, 51-56.

Gregory P.A., Bert A.G., Peterson 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.

Gutierrez C., Schiff R. (2011): HER2: biology, detection, and clinical implications. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **135**, 55-62.

Hall J.M., Lee M.K., Newman B., Morrow J.E., Anderson L.A., Huey B., King M.C. (1990): Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* **250**, 1684-1689.

Hashizume R., Fukuda M., Maeda I., Nishikawa H., Oyake D., Yabuki Y., Ogata H., Ohta T. (2001): The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by breast cancer-derived mutation. *The journal of biological chemistry* **276**, 14537-14540.

He L., Hannon G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics* **5**, 522-531.

Hefti M.M., Hu R., Knoblauch N.W., Collins L.C., Haibe-Kains B., Tamimi R.M., Beck A.H. (2013): Estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast cancer is not a reproducible subtype. *Breast cancer research* **15**, R68.

Heitz F., Harter P., Lueck H.J., Fissler-Eckhoff A., Lorenz-Salehi F., Scheil-Bertram S., Traut A., su Bois A. (2009): Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancer exhibit an elevated risk and earlier occurrence of cerebral metastases. *European Journal of cancer* **45**, 2729-2798.

Higgins M.J., Baselga J. (2011): Targeted therapies for breast cancer. *The journal of clinical investigation* **3**, 797-803

Hofseth L.J., Raafat A.M., Osuch J.R., Pathak D.R., Slomski C.A., Haslam S.Z. (1999): Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **84**, 4559-4565.

Horwitz K.B., McGuire W.L. (1975): Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. *Science* **189**, 726-727.

Howell A., Anderson A., Clarke R.B., Duffy S.W., Evans D.G., Garcia-Closas M., Gescher A.J., Key T.J., Saxton J.M., Harvie M.N. (2014): Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast cancer research* **16**, 446.

Huang S., Chen Y., Wu W., Ouyang N., Chen J., Li H., Liu X., Su F., Lin L., Yao Y. (2013): miR-150 promotes human breast cancer growth and malignant behavior by targeting the proapoptotic purinergic P2X7 receptor. *PLoS one* **8**, e80707.

Humphries B., Wang Z., Oom A.L., Fisher T., Tan D., Cui Y., Jiang Y., Yang C. (2014): MicroRNA-200b targets protein kinase C α and suppresses triple-negative breast cancer metastasis. *Carcinogenesis* **35**, 2254-2263.

Chao C.H., Chang C.C., Wu M.J., Ko H.W., Wang D., Hung M.C., Yang J.Y., Chang C.J. (2014): MicroRNA-205 signaling regulates mammary stem cell fate and tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation* **124**, 3093-3106.

Chiang C.H., Hou M.F., Hung W.C. (2013): Up-regulation of mir-182 by β -Catenin in breast cancer increases tumorigenicity and invasiveness by targeting the matrix metalloproteinase inhibitor RECK. *Biochimica et biophysica acta* **1830**, 3067-3076.

Choccalingam C., Rao L., Rao S. (2012): Clinico-pathological characteristic of triple negative and non triple negative high grade breast carcinomas with and without basal marker (CK5/6 and EGFR) expression at a rural tertiary hospital in India. *Breast cancer: basic and clinical research* **6**, 21-29.

Jernstöröm H., Lerman C., Ghadirian P., Lynch H.T., Weber B., Garber J., Daly M., Olopade O.I., Foulkes W.D., Earner E., Brunet J.S., Narod S.A. (1999): Pregnancy and the risk of early breast cancer in carriers BRCA1 and BRCA2. *Lancet* **354**, 1846-1850.

- Johnson S.M., Grosshans H., Shingara J., Byrom M., Jarvis R., Cheng A., Labourier E., Reinert K.L., Brown D., Slack F.J. (2005): RAS regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120**, 635-647.
- Karami F. Mehdipour P. (2013): A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. *BioMed research international*, online 928562.
- Kinzel K.W., Vogelstein B. (1998): Familial cancer syndromes: the role of caretakers and gatekeepers. *The genetic basis of human cancer*, 241-244.
- Knox A.J., Scaling A.L., Pinto M.P., Bliesner B.S., Haughian J.M., Abdel-Hafiz H.A., et al (2014): Modeling luminal breast cancer heterogeneity: combination therapy to suppress a hormone receptor-negative, cytokeratin 5-positive subpopulation in luminal disease. *Breast cancer research* **16**, 418.
- Korpál M., Lee E.S., Hu G., Kang Y. (2008): The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *The journal of biological chemistry* **283**, 14910-14914.
- Kreike B., van Kouwenhove M., Horlings J., Weigelt B., Peterse H., Bartelink H., van de Vijver M.J. (2007): Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast cancer research* **9**, 9952-9969.
- Kwong A., Ng E.K., Tang E.Y., Wong C.L., Law F.B., Leung C.P., Chan A., Cheung M.T., To M.Y., Ma E.S., West D.W., Ford J.M. (2011): A novel de novo BRCA1 mutation in Chinese woman with early onset breast cancer. *Familial cancer* **10**, 233-237.
- Lacroix M., Taillon R.A., Leclercq G. (2006): p53 and breast cancer, an update. *Endocrine-related cancer* **13**, 293-325.
- Łącka K., Czyżyk A. (2008): Hormones and the cardiovascular system. *Endokrynologia Polska* **59**, 420-433.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. (2001): Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**, 853-858.
- Le T.D., Liu L., Zhang J., Liu B., Li J. (2015): From miRNA regulation to miRNA-TF co-regulation: computational approaches and challenges. *Briefing in Bioinformatics* **16**, 475-96.
- 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 R.C., Ambros V. (2001): An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 862-864.
- Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Rädmark O., Kim S., Kim V.N. (2003): The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-419.
- Lehmann U., Hasemeier B., Christigen M., Müller M., Römermann D., Länger F., Kreipe H. (2008): Epigenetic inactivation of microRNA gene *hsa-mir-9-1* in human breast cancer. *The Journal of pathology* **214**, 17-24.
- Levin E.R. (2002): Cellular function of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* **67**, 471-475.
- Lewis Phillips G.D., Li G., Dugger D.L., Crocker L.M., Parsons K.L., Mai E., Blättler W.A., Lambert J.M., Chari R.V., Lutz R.J., Wong W.L., Jacobson F.S., Koeppen H., Schwall R.H., Kenkare-Mitra S.R., Spencer S.D., Sliwkowski M.X. (2008): Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer research* **68**, 9280-9290
- Li D., Hu J., Song H., Xu H., Wu C., Zhao B., Xie D., Wu T., Zhao J., Fang L. (2017): miR-143-3p targeting Lim domain kinase 1 suppresses the progression of triple-negative breast cancer cells. *American journal of translational research* **9**, 2276-2285.
- Lim S., Becker A., Zimmer A., Lu J., Buettner R., Kirfel J. (2013): SNAI1-mediated epithelial-mesenchymal transition confers chemoresistance and cellular plasticity by regulating genes involved in cell death and stem cell maintenance. *PloS one* **8**, e66558.
- Liu C.G., Calin G.A., Meloon B., Gamliel N., Sevignani C., Ferracin M., Dumitru C.D., Shimzu M., Zupo S., Dono M., Alder H., Bullrich F., Negrini M., Croce C.M. (2004a): An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues.

Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**, 9740-9744.

Liu J., Carmell M.A., Rivas F.V., Marsden C.G., Thomson J.M., Song J.J., Hammond S.M., Joshua-Tor L., Hannon G.J. (2004): Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437-1441.

Llave C., Kasschau K.D., Rector M.A., Carrington J.C. (2002): Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *The Plant Cell* **14**, 1605-1619.

Lodish H.B.A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2000): Molecular cell biology. 4. New York: W.H. Freeman and Company

Loman N., Johannsson O., Kristofferson U., Olsson H., Borg A. (2001): Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in population-based series of early-onset breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **93**, 1215-1223.

Lu J., Ye X., Fan F., Xia L., Bhattacharya R., Ballister S., Tozzi F., Sceusi E., Zhou Y., Tachibana I., Maru D.M., Hawke D.H., Rak J., Mani S.A., Zweidler-McKay P., Ellis L.M. (2013): Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1. *Cancer Cell* **23**, 171-185.

Lü L., Mao X., Shi P., He B., Xu K., Zhang S., Wang J. (2017): MicroRNAs in the prognosis of triple-negative breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine* **96**, e7085

Mathe A., Scott R.J., Avery-Kiejda K.A. (2015): MiRNA and other epigenetic changes as biomarkers in triple negative breast cancer. *International journal of molecular sciences* **16**, 28347-28376

Maya R., Balass M., Kim S.T., Shkedy D., Leal J.F., Shifman O., Moas M., Buschmann T., Ronai Z., Shiloh Y., Kastan M.B., Katzir E., Oren M. (2001): ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes & development* **15**, 1067-1077.

Mehrgou A. & Akouchekian M. (2016): The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran* **30**, 369.

Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P.A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L.M., Ding W., et al., (1994): A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66-71.

Miska E.A. (2005): How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Current opinion in genetics & development* **15**, 563-568.

Mizuta R., LaSalle J.M., Cheng H.L., Shinohara A., Ogawa H., Copeland N., Jenkis N.A., Lalande M., Alt F.W. (1997): RAB22 and RAB136/mouse BRCA2: proteins that specifically interact with the RAD51 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 6927-6932.

Monsey J., Shen W., Schlesinger P., Bose R. (2010): Her4 and Her2/neu Tyrosine Kinase Domains Dimerize and Activate in a Reconstituted *In Vitro* System. *Journal of biological chemistry* **285**, 7035-7044.

Mosselman S., Polman J., Dijkema R. (1996): ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters* **392**, 49-53.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51**, 263-273.

Navrátil J., Fabian P., Palácová M., Petráková K., Vyzula R., Svoboda M. (2015). Triple negativní karcinom prsu. *Klinická Onkologie* **28**; 405-415.

Nielsen T.O., Hsu F.D., Jensen K., Chenag M., Karaca G., Hu Z., Hernandez-Boussard T., Livasy C., Cowan D., Dressler L., Akslen L.A., Ragaz J., Gown A.M., Gilks C.B., van de Rijn M., Perou C.M. (2004): Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research* **10**, 5367-5374.

Numata K., Kanai A., Saito R., Kondo S., Adachi J., Wilming L.G., Hume D.A., Hayashizaki Y., Tomita M. REIKEN Group, GSL Members (2003): *Genome research* **13**, 1301-1306.

Ouyang M., Li Y., Ye S., Ma J., Lu L., Ly W., Chang G., Li X., Wang S., Wang W. (2014): MicroRNA profiling implies new markers of chemoresistance of triple-negative breast cancer. *PLoS one* **9**, e96228.

Ovcharenko D., Kelnar K., Johnson C., Leng N., Brown D. (2007): Genome-scale microRNA and small interfering RNA screens identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis pathway. *Cancer research* **67**, 10782-10788.

Paddison P.J., Caudy A.A., Hannon G.J. (2002): Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 1443-1448.

Park H., Davies M.V., Langland J.O., Chang H.W., Nam Y.S., Tartaglia J., Paoletti E., Jacobs B.L., Kaufman R.J., Venkatesan S. (1994): TAR RNA-binding protein is an inhibitor of the interferon-induced protein kinase PKR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 4713-4717.

Patani N., Martin L.A., Dowsett M. (2013): Biomarkers for the clinical management of breast cancer: international perspective. *International journal of cancer* **133**, 1-13.

Pertschuk L.P., Axiotis C.A., Feldman J.G., Kim Y.D., Karavattayhayil S.J., Braithwaite L. (1999) Marked intratumoral heterogeneity of the proto-oncogene Her-2/neu determined by three different detection systems. *The breast journal* **5**, 369-374.

Pijpe A., Andrieu N., Easton D.F., Kesminiene A., Cardis E., Noguès C., Gauthier-Villars M., Lasset C., Fricker J.P., Peock S., Frost D., Evans D.G., Eeles R.A., Paterson J., Manders P., van Asperen C.J., Ausems M.G., Meijers-Heijboer H., Thierry-Chef I., Hauptmann M., Goldgar D., Rookus M.A., van Leeuwen F.E. (2012). Exposure to diagnostic radiation and risk of breast cancer among carriers of BRCA1/2 mutations: retrospective cohort study (GENE-RAD-RISK). *British Medical Journal* **345**, e5660-e5660

Piasecka D., Braun M., Kordek R., Sadej R., Romanska H. (2018): MicroRNA in regulation of triple-negative breast cancer progression. *Journal of cancer research and clinical oncology* **144**, 1401-1411.

Polterauer S., Grimm C., Tempfer C., Sliutz G., Speiser P., Reinthaller A., Hefler L.A. (2007): C-reactive protein is a prognostic parameter in patients with cervical cancer. *Gynecologic Oncology* **107**, 114-117.

Polytarchou C., Iliopoulos D., Struhl K. (2012): An integrated transcriptional regulatory circuit that reinforces the breast cancer stem cell state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 14470-14475.

Prat A., Parker J.S., Karginova O., Fan C., Livasy C., Herschkowitz J.I., He X., Perou C.M. (2010): Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research* **12**, R68.

Rakha E.A., Ellis I.O. (2009): Triple-negative breast cancer: review. *Pathology* **41**, 40-47.

Razandi M., Pedram A., Lvin E.R. (2000): Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Molecular endocrinology* **14**, 1434-1447.

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.

Rhoades M.W., Reinhart B.J., Lim L.P., Burge C.B., Bartel B., Bartel D.P. (2002): Prediction of plant microRNA targets. *Cell* **110**, 513-520.

Robson M., Im S.A., Senkus E., Xu B., Domchek S.M., Masuda N., Delaloge S., Li W., Tung N., Armstrong A., Wu W., Goessl C., Runswick S., Conte P. (2017): Olaparib for metastatic breast cancer in patients with germline BRCA mutation. *The New England journal of medicine* **377**, 523-533.

Rouleau M., Patel A., Hendzel M.J., Kaufmann S.H., Poirier G.G. (2010): PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature Reviews Cancer* **10**, 239-301.

Rouzier R., Perou C.M., Symmans W.F., Ibrahim N., Cristofanilli M., Anderson K., Hess K.R., Stec J., Ayers M., Wagner P., Morandi P., Fan C., Rabiul I., Ross J.S., Hortobagyi G.N., Pusztai L. (2005): Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical Cancer Research* **11**, 5678-5685.

- Ryška A., Hovorková E., Sobande F., Rozkoš T., Laco J., Hornychová H. (2015): Naděje a úskalí molekulární klasifikace karcinomu prsu. *Česko-slovenská patologie* **51**, 26-32.
- Sakurikar N., Eastman A. (2015): Will targeting Chk1 have a role in the future of cancer therapy? *Journal of clinical oncology* **33**, 1075-1077.
- Sauter G., Lee J., Bartlett J.M., Slamon D.J., Press M.F. (2009): Guidelines for human epidermal growth factor receptor testing: biologic and methodologic considerations. *Journal of clinical oncology* **10**, 1323-1333.
- Screnci D., McKeage M.J., Galettis P., Hambley T.W., Palmer B.D., Baguley B.C. (2000): Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of series of platinum drugs. *British Journal of Cancer* **82**, 966-972.
- Schoen R.E., Tangen C.M., Kuller L.H., Burke G.L., Cushman M., Tracy R.P., Dobs A., Savage P.J. (1999): Increased blood glucose and insulin, body size, and incident colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 1147-1154.
- Sempre L.F., Freemantle S., Pitha-Rowe I., Moss E., Dmitrovsky E., Ambros V. (2004): Expression profiling of mammalian miRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome biology* **5**, R13.
- Sethi S., Sakar F.H., Ahmed Q., Bandyopadhyay S., Nahleh Z.A., Semaan A., Sakr W., Munkarah A., Ali-Fehmi R. (2011): Molecular markers of epithelial-to-mesenchymal transition are associated with tumor aggressiveness in breast carcinoma. *Translational oncology* **4**, 222-226.
- Sevignani C., Calin G.A., Nnadi S.C., Shimizu M., Davuluri R.V., Hyslop T., Demant P., Croce C.M., Siracusa L.D. (2007): MicroRNA genes are frequently located near mouse cancer susceptibility loci. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **104**, 8017-8022.
- Schultz N., Lopez E., Saleh-Gohari N., Helleday T. (2003): Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic acids research* **31**, 4959-4964.
- Sobin, L. H. a Wittekind C. (2002): *TNM - klasifikace zhoubných novotvarů*. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky. ISBN 80-7280-391-3.
- Sotiriou C., Pusztai L. (2009): Gene-expression signatures in breast cancer. *The New England journal of medicine* **360**, 790-800.
- Tang H., Liu P., Yang L., Xie X., Ye F., Wu M., Liu X., Chen B., Zhang L., Xie X. (2014): miR-185 suppresses tumor proliferation by directly targeting E2F6 and DNMT1 and indirectly upregulating BRCA1 in triple-negative breast cancer. *Molecular cancer therapeutics* **13**, 3185-3197.
- Tavtigian S.V., Simard J., Rommens J., Couch F., Shattuck-Eidens D., Neuhausen S., Merajver S., Thorlacius S., Offit K., Stoppa-Lyonnet D., Belanger C., Bell R., Berry S., Bogden R., Chen Q., Davis T., Dumont M., Frye C., Hattier T., Jammulapati S., Janecki T., Jiang P., Kehrer R., Leblanc J.F., Mitchell J.T., McArthur-Morrison J., Nguyen K., Peng Y, Samson C, Schroeder M., Snyder S.C., Steele L., Stringfellow M., Stroup C., Swedlund B., Swense J., Teng D., Thomas A., Tran T., Tranchant M., Weaver-Feldhaus J., Wong A.K., Shizuya H., Eyfjörd J.E., Cannon-Albright L., Tranchant M., Labrie F., Skolnick M.H., Weber B., Kamb A., Goldgar D.E. (1996): The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 17q-linked kindreds. *Nature genetics* **12**, 333-337.
- Thompson J., Thompson M.W. (2004): Genetika a zhoubné bujení. In: *Klinická genetika.*, Vol. 6, (Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F.), TRITON, Praha, 313-315.
- Tiwari A., Yeo T.K., Riris S., Moghal M., Williams S., Meleagros L. (2007): The distribution and pathological staging of colorectal cancers in ethnic groups. *Anticancer research* **27**, 2957-2959.
- Tryggvadottir L., Sigvaldason H., Olafsdottir G.H., Jonasson J.G., Jonsson T., Tulinius E., Eyfjörd J.E. (2006): Population-based study of changing breast cancer risk in Icelandic BRCA2 mutation carriers, 1920-2000. *Journal of the National Cancer Institute* **98**, 116-122.
- Tsutsui S., Ohno S., Murakami S., Kataoka A., Kinoshita J., Hachitanda Y. (2003): Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer. *American Journal of Surgery* **185**, 165-167.

Tung N., Battelli C., Allen B., Kaldate R., Bhatnagar S., Bowles K., Timms K., Garber J.E., Herold C., Ellisen L., Krejdosky J., DeLeonardis K., Sedgwick K., Soltis K., Roa B., Wenstrup R.J., Hartman A.R. (2015): Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. *Cancer* **121**, 25-33.

Vogelstein B. & Kinzel K.W. (1992): p53 function and dysfunction. *Cell* **70**, 523-526.

Wang B., Matsuoka S., Ballif B.A., Zhang D., Smogorzewska A., Gygi S.P., Elledge S.J. (2007): Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science* **316**, 1194-1198.

Wang F., Zheng Z., Guo J., Ding X. (2010): Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecologic oncology* **119**, 586-593.

Wang Q., Li C., Zhu Z., Teng Y., Che X., Wang Y., Ma Y., Wang Y., Zheng H., Liu Y., Qu X. (2016): miR-155-5p antagonizes the apoptotic effect of bufalin in triple-negative breast cancer cells. *Anti-cancer drugs* **27**, 9-16.

Weigelt B., Geyer F.C., Reis-Filho J.S. (2010a): Histological types of breast cancer: how special are they? *Molecular Oncology* **4**, 192-208.

Weigelt B., Mackay A., A'hern R., Natrajan R., Tan D.S., Dowsett M., Ashworth A., Reis-Filho J.S. (2010): Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *The Lancet oncology* **11**, 339-349.

Welsh P.L., Owens K.N., King M.C. (2000): Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends in genetics* **16**, 69-74.

Welch D.R. (2016) Tumor heterogeneity. *Cancer research* **76**, 4-6.

Yadav B.S., Chanana P., Jhamb S. (2015): Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World Journal of Clinical Oncology* **6**, 252-263.

Wooster R., Neuhausen S.L., Mangion J., Quirk Y., Ford D., Collins N., Nguyen K., Seal S., Tran T., Averill D. (1994): Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* **265**, 2088-2090.

Wong C.K., Gromisch C., Ozturk S., Papageorgis P., Abdolmaleky H.M., Reinhard B.M., Thiagalingam A., Thiagalingam S. (2019): MicroRNA-4417 is a tumor suppressor and prognostic biomarker for triple-negative breast cancer. *Cancer biology & therapy* **28**, 1-8.

Xu B., O'Donnell A.H., Kim S.T., Kastan M.B. (2002): Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer research* **62**, 4588-4591.

Yang F., Zhang W., Shen Y., Guan X. (2015): Identification of dysregulated microRNAs in triple-negative breast cancer (review). *International Journal of Oncology* **46**, 927-932.

Yang X., Lippman M.E. (1999): BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **54**, 1-10.

Yersal O., Bartuca S. (2014): Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology* **10**, 412-424.

Yu X., Chini C.C., He M., Mer G., Chen J. (2003): The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science* **302**, 639-642.

Zafrani B., Aubriot M.H., Mouret E., De Crémoux P., De Rycke Y., Nicaolas A., Boudou E., Vincent-Salomon A., Magdelénat H., Sastre-Garau X. (2000): High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinoma: comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases. *Histopathology* **37**, 536-545.

Zimovjanová M. (2009): Hereditární karcinom prsu – příklad vzácnější formy karcinomu prsu v populaci. *Onkologie* **6**, 348-350.

8 Seznam použitých zkratk

ABRA - BRCA1-A komplex/ABRAXAS

AI - Inhibitor aromatáz

AP - Alkalická fosfatáza

ATM - „Ataxia Telangiectasia Mutated“

BARD - BRCA1-asociovaný protein obsahující RING doménu 1

BC - Rakovina prsu

BRC - BRCA2 interakční doména

BRCA - „Breast cancer“

BRCT - BRCA1 C-terminální

BRIP - BRCA1 interakční protein C-terminální helikáza 1

cDNA - Komplementární DNA

CFL1 - Kofilin 1

CIS - Karcinom „*in situ*“

CK - Cytokinin

CpG - Cytosin-fosfát-guanin

CSC - Rakovinové kmenové buňky

CT - Počítačová tomografie

CtIP - C-terminální vazebný protein 1

DEPC - Voda s přísávkem dietylu polykarbonátu

DIG - Digoxigenin

DNMT1 - DNA metyltransferáza 1

DSB - Dvouvláknový zlom

dsRBD - dsRNA-vazebný protein

E2F6 - E2F transkripční faktor 6

EGFR - Receptor epidermálního růstového faktoru

EMT - Epitelovo-mezenchimová tranzice

ER - Estrogenový receptor

ErbB - Rodina receptorů pro epidermální růstový faktor

FFPE - Tkáňové parafinové vzorky fixované formalínem

HER2 - Receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2

HR - Homologní rekombinace

Chk - Kináza kontrolního bodu buněčného cyklu

ISH - „*In situ*“ hybridizace

LET-7 - „Lethal-7“

LIMK1 - LIM kináza 1

LIN-4 - První objevená miRNA

LIV1 - Zinkový transportér z rodiny LIV1

LNA - „Locked nucleic acid“

LOH - Ztráta heretozygotnosti

Mdm2 - „Mouse double minute 2 homolog“

MAPK - Mitogen-aktivovaná proteinkináza

miRNA - MikroRNA

MMP-9 - Matrixová metaloproteináza-9

NBT-BCIP - 4-nitro-modré tetrazolium– 5-bromo-4-chloro-3'-indolylfosfát

NGS - Sekvenování nové generace

NLS - Jaderný lokalizační signál

OCCR - „Ovarian cancer cluster region“

P2X7 - P2X purinoceptor 7

PACT - Interferonem indukovaný dsRNA dependentní protein kinázový aktivátor A

PARP - Poly [ADP ribóza] polymeráza

PCR - Polymerázová řetězová reakce

PI3K - Fosfatidylinositol-3-kináz

P/CAF - p300/CBP-asociovaný faktor

PR - Progesteronový receptor

RAD51 - DNA opravný protein RAD51 homolog 1

RECK - „Reverse inducing cysteine rich protein with kazal“

RING - „Really interesting new gene“

RISC - RNA-indukovaný umlčovací komplex

RNAi - RNA interference

RT - Reverzní transkriptáza

RT-qPCR - Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí

RTG - Rentgen

SERDs - Regulátory selektivních estrogenových receptorů

SERMs - Modulátory selektivních estrogenových receptorů

SSB - Jednovláknový zlom

TNBC - „Triple-negativní“ karcinom prsu

TNM - Klasifikace karcinomu prsu podle světové zdravotnické organizace WHO

3' UTR - 3' nepřekládaný region

ZEB - „Zinc finger E-box binding homeobox“