

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2014**

**Romana Vaňková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Expresse různých miRNA s ohledem na  
výskyt metastáz u karcinomů plic**

**Bakalářská práce**

**Romana Vaňková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2014**

**Vedoucí práce: Mgr. Mária Janíková**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Márie Janíkové a uvedla jsem veškerou použitou literaturu.  
V Lichnově, dne 12. 5. 2014

.....

## Souhrn

Karcinom plic patří mezi zhoubné nádory a celosvětově je nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu. Mezi hlavní příčiny vzniku tohoto nádorového onemocnění patří kouření a v další řadě vlivy vnějšího prostředí (např. azbest, radon nebo těžké kovy).

Nádorové buňky dokáží již v brzké době zakládat tzv. dceřiná ložiska-metastáze, a to pronikáním do cév, kterými se následně dostávají do vzdálených orgánů. Mezi tyto orgány patří nejčastěji mozek, kosti a játra.

V léčbě rakoviny plic se uplatňuje chemoterapie, radioterapie a biologická (cílená) léčba. V současnosti se jako vhodné terapeutické cíle jeví mikroRNA, krátké nekódující molekuly, účastníci se procesu RNA interference, který se podílí na regulaci genové exprese. MiRNA se váží na cílové molekuly mRNA a dle míry komplementarity je tato mRNA buď degradována, nebo je zamezeno její translaci. Detekce hladin miRNA může mít diagnostický, prognostický a prediktivní význam.

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala zjišťováním hladin exprese tří vybraných miRNA u 20 pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic s různým histologickým subtypem. Jednalo se o miR-34a, miR-200b a miR-200c. Tyto miRNA byly vybrány záměrně díky jejich předpokládanému vztahu s metastázemi.

Na základě výsledků získaných pomocí real-time PCR s využitím TaqMan sond byla detekována zvýšená exprese miR-34a u jednoho pacienta (jediného přeživšího pacienta s rozvinutými metastázemi v době stanovení diagnózy v našem souboru) a proto navrhuje, že by miR-34a u pacientů s NSCLC mohla lépe posloužit jako prognostický marker než jako marker metastázování. U miR-200b a miR-200c byla mírně zvýšená exprese pozorována u stejného pacienta a snížena u 19 pacientů, což podporuje hypotézu o jejich funkci jako tumor-supresorů.

## Summary

Lung cancer belongs to malignant tumors and it is the most common cause of cancer death worldwide. The main causes of this disease are smoking and also environmental influences (eg. asbestos, radon or heavy metals).

Tumor cells are able to establish daughter tumors called metastases in the early stages of the disease by their penetration into the blood vessels and subsequently their spreading to distant organs. The most common organs afflicted by metastasis of lung cancer are brain, bones and liver.

Chemotherapy, radiotherapy and biological therapy are used for treatment of lung cancer. At present, microRNAs, short non-coding molecules involved in the process called RNA interference, participating in regulation of gene expression, appear to be a useful therapeutic targets. MiRNAs bind to target mRNA molecules and they degrade or avoid mRNA translation according to the degree of complementarity. Detection of miRNA levels may have diagnostic, prognostic and predictive importance.

I deal with detection of expression levels of three selected miRNAs in 20 patients with non-small cell lung cancer with different histological subtypes in my bachelor thesis, concretely miR-34a, miR-200b and miR-200c. These miRNAs were chosen deliberately thanks to their presumed relationship to the metastasis.

Based on the results obtained by real-time PCR with TaqMan probes increased expression of miR-34a was detected in one patient (the only surviving patient from our group who has developed metastases at the time of diagnosis). Therefore, we suggest that miR-34a could serve as better prognostic than metastatic marker in NSCLC patients. The expression of miR-200b and miR-200c was slightly increased in the same patient and decreased in 19 patients. This observation is in agreement with the claim that these miRNAs function as tumor suppressors.

## **Poděkování**

Ráda bych zde poděkovala své vedoucí práce Mgr. Márii Janíkové, za její čas a pomoc při seznámení se s laboratorními technikami a odborné rady, které mi poskytla při řešení dané problematiky. Také bych ráda poděkovala MUDr. *et* MVDr. Jozefovi Škardovi Ph.D. za poskytnutí finanční podpory pro experimenty. Děkuji také své rodině a přítelovi za podporu a pochopení při vypracovávání této práce.

# Obsah

1. Úvod .....	9
2. Současný stav řešené problematiky .....	10
2.1 Karcinom plic .....	10
2.1.1 Klasifikace maligních nádorů plic .....	11
2.1.2 Současná léčba nemalobuněčného karcinomu plic .....	14
2.1.2.1 Terapeutické přístupy u jednotlivých stádií NSCLC .....	16
2.1.2.2 Druhy terapie .....	17
2.1.2.2.1 Chemoterapie .....	17
2.1.2.2.2 Radioterapie .....	17
2.1.2.2.3 Biologická (cílená) léčba .....	17
2.2 Metastáze .....	18
2.2.1 Charakteristika metastáz .....	18
2.2.2 Mechanismus metastázování .....	19
2.2.2.1 Invaze do ECM .....	20
2.2.2.2 Invaze nádorových buněk do cév .....	21
2.2.2.3 Usídlení nádorových buněk v místech metastáz .....	22
2.2.3 Místa metastáz karcinomu plic .....	22
2.2.3.1 Metastázy v mozku .....	23
2.2.3.2 Metastázy v kostech .....	23
2.2.3.3 Metastázy v játrech .....	23
2.3 MikroRNA .....	24
2.3.1 Historie miRNA .....	24
2.3.2 Mechanismus účinku a funkce miRNA .....	25
2.3.3 Biogeneze miRNA .....	25
2.3.4 Úloha miRNA v nádorech .....	28
2.3.5 Známé miRNA zapojené do metastázování .....	29
2.3.5.1 Charakteristika miR-34a .....	30
2.3.5.2 Charakteristika miR-200b .....	31
2.3.5.3 Charakteristika miR-200c .....	31
3. Cíle práce .....	33

4. Materiál a metodika .....	34
4.1 Materiál .....	34
4.1.1 Biologický materiál.....	34
4.1.2 Reagencie.....	34
4.1.3 Přístroje.....	35
4.2 Metody .....	36
4.2.1 Příprava parafinových bločků.....	36
4.2.2 Příprava tkáňových mikroarrayí (TMA).....	36
4.2.3 Izolace celkové RNA z parafinových bločků .....	36
4.2.4 Stanovení koncentrace RNA.....	38
4.2.5 Reverzní transkripce (RT) .....	38
4.2.6 Preamplifikace s napoolovanými miRNA assays.....	39
4.2.7 Real-time PCR s preamplifikovanými vzorky.....	40
4.2.8 Zpracování výsledků .....	41
5. Výsledky .....	42
6. Diskuze .....	46
7. Závěr .....	48
8. Literatura.....	49
9. Seznam použitých zkratk a symbolů.....	63
10. Přílohy.....	66



# 1. Úvod

Karcinom plic neboli bronchogenní karcinom či plicní rakovina, se řadí mezi pravé maligní (zhoubné) nádory a je to označení pro nádory průdušek, ale i nádory, které vznikají v plicním parenchymu. V anglické literatuře se proto používá termín „lung cancer“, protože jejich klinický obraz je velmi podobný.

Ve světě je bronchogenní karcinom na druhém místě mezi zhoubnými nádory. V České republice je pak na prvním místě u mužů a na druhém až třetím místě mezi zhoubnými nádory u žen. Zatímco incidence i úmrtnost u mužů v ČR dlouhodobě klesá, u žen naopak oba faktory mírně stagnují, což je způsobeno zvýšeným výskytem kouření u mladých žen a větší citlivostí u žen vůči cigaretovému kouři.

Nádorové buňky karcinomu plic jsou schopny již v časném stádiu pronikat do cév, cestovat jimi ke vzdáleným orgánům a následně vytvářet dceřiná ložiska, tzv. metastáze. Plicní karcinom metastázuje nejčastěji do mozku, kostí a jater.

Karcinom plic se v současnosti léčí pomocí chemoterapie, radioterapie a biologickou (cílenou) léčbou. V posledních letech se pro možné terapeutické využití intenzivně studují i krátké nekódující jednořetězcové RNA, tzv. mikroRNA. Krom toho se také jeví jako vhodné biomarkery s dobrým diagnostickým, prognostickým i prediktivním potencí. MikroRNA se spolu s dalšími nekódujícími molekulami (siRNA, snoRNA, shRNA,...) účastní procesu RNA interference, který je organismy využíván k post-transkripčnímu umlčování exprese genů. Malé molekuly se na základě komplementarity naváží na cílovou mRNA a dle míry komplementarity je tato mRNA buď kompletně degradována, nebo je zamezeno její následné translaci.

Regulace genové exprese prostřednictvím malých RNA má význam pro vznik i vlastnosti nádorů. Sledování exprese miRNA v nádorových buňkách může na základě informací získaných z dostupných studií umožnit zpřesnění diagnózy a prognózu nádorových onemocnění, nebo predikovat odpověď pacientů na dostupnou léčbu. Taktéž, díky schopnosti miRNA řídit expresi proteinů, a teda i onkogenů, jsou miRNA považovány za vhodné kandidáty pro terapeutické využití v léčbě nádorů. Proto má jejich studium nezastupitelnou roli na poli výzkumů nádorů.

## 2. Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Karcinom plic

Karcinom plic je hlavní příčinou úmrtnosti na rakovinu po celém světě. Každoročně zemře přibližně 1,3 milionů žen a mužů. U asi 80% pacientů s primárním maligním nádorem se jedná o nemalobuněčný karcinom plic (Grinberg-Rashi *et al.*, 2009; Zandberga *et al.*, 2012). Karcinom plic bývá diagnostikován ve věku 35-85 let a nejčastější výskyt je mezi 55. a 80. rokem života (Skříčková *et al.*, 2008a). Pětileté přežití je pouze u 13 % pacientů s karcinomem plic (Balgkouranidou, 2013), jelikož stále existuje málo specifických biomarkerů pro včasnou diagnózu (Mozzoni *et al.*, 2013).

Mezi hlavní příčiny vzniku onemocnění patří kouření. 85-90 % nemocných s bronchogenním karcinomem jsou kuřáci. Po vykouření 200 000 cigaret (průměrná spotřeba 30 cigaret denně po dobu 19 let) je riziko vzniku onemocnění asi padesátinásobně vyšší a při pokračování v kouření stále stoupá. Riziko vzniku nádorového onemocnění představuje i pasivní inhalace kouře, čemuž jsou vystaveny např. děti z kuřáckých rodin, u kterých může v dospělosti dojít ke vzniku nádoru. U kuřáků navíc hrozí zvýšené riziko vzniku i jiných zhoubných nádorů (např. ústní dutiny, hrtanu, slinivky břišní, ledvin, močového měchýře a hrdla děložního) (Petruželka *et Konopásek*, 2003; Travis *et al.*, 2004).

K dalším etiologickým faktorům patří vlivy vnějšího prostředí. U některých zaměstnání jsou pracovníci v pracovním prostředí vystaveni vyšším expozicím látek, které mohou riziko vzniku nádoru zvyšovat. Mezi ně patří např. azbest, těžké kovy (rtuť, nikl, chrom, arzén atd.), ionizující záření, UV záření a radon. Radon i azbest se ve zvýšeném množství vyskytují i v domácnosti, jelikož jsou součástí stavebních a izolačních materiálů. (Petruželka *et Konopásek*, 2003; Skříčková, 2008a).

Symptomy nemoci se objevují až v pokročilém stádiu, tudíž neexistují žádné „varovné signály“, které by umožnily zachycení choroby v počátku. Mezi nejběžnější příznaky primárního karcinomu plic patří kašel a dále hemoptýza, kdy dochází k vykašlávání krve a pneumonie (zápal plic). Při šíření plicního karcinomu se pak

objevuje dušnost, chrapot, bolest na hrudi, ztráta hlasu nebo syndrom horní duté žíly. V pokročilých stádiích dochází k postižení lymfatických uzlin a k rozvoji vzdálených metastáz (nejčastěji do CNS, skeletu, kostní dřeně a jater) (Petruželka *et* Konopásek, 2003; Skříčková 2008a; Travis *et al.*, 2004; Vorlíček *et al.*, 2006).

### **2.1.1 Klasifikace maligních nádorů plic**

Bronchogenní karcinomy dělíme podle biologického chování, histologického složení a rozsahu a lokalizace. V současné době rozeznáváme několik histologických typů bronchogenního karcinomu (Tab. I). V minulosti mělo největší význam rozdělení na skupinu malobuněčných karcinomů (small cell lung cancer-SCLC) a skupinu nemalobuněčných karcinomů (non-small cell lung cancer-NSCLC), protože z rozdílných biologických vlastností těchto dvou skupin karcinomů vyplýval i rozdílný přístup k léčbě (Skříčková *et al.*, 2008a). V současnosti se již terapie nasazuje podle histologického subtypu a rozsahu onemocnění (Marel, 2012).

*Malobuněčný karcinom* se vyskytuje u 20-25 % všech pacientů s karcinomem plic. Je charakteristický rychlým růstem a sklonem k časnému metastázování do kostí, jater, CNS a nadledvin, což je důvodem omezené chirurgické léčby. Zpočátku je onemocnění velmi senzitivní na protinádorovou léčbu cytostatiky a zářením, později však tato senzitivita přechází v rezistenci, a další průběh již není chemoterapií, ani radioterapií ovlivnitelný.

*Nemalobuněčný karcinom* plic představuje 75-80 % onemocnění všech pacientů s karcinomem plic. Ve srovnání se SCLC vykazuje pomalejší růst a v praxi je tak větší možnost využití chirurgického odstranění, pokud nádor již nevytvořil metastatická ložiska, která se v případě NSCLC zakládají později. K radioterapii a chemoterapii jsou ale málo citlivé (Skříčková, 2011).

Tab. I: Histologické typy bronchogenního karcinomu (Skříčková, 2008b):

<b>Nemalobuněčný karcinom</b>	<b>Adenokarcinom</b>	• Acinární
		• Papilární
		• Bronchoalveolární
		• Solidní hlenotvorný
	<b>Velkobuněčný karcinom</b>	• Obrovskobuněčný karcinom
		• Karcinom z jasných buněk
	<b>Smíšené karcinomy</b>	• Adenoskvamózní karcinom
		• Mukoepidermoidní karcinom
		• Adenoidně cystický karcinom
	<b>Spinocelulární karcinom</b>	
<b>Nediferencovaný karcinom</b>		
<b>Malobuněčný karcinom</b>	<b>Malobuněčný karcinom</b>	
	<b>Intermediární karcinom</b>	
	<b>Kombinovaný karcinom</b>	

Mezi 4 hlavní histologické subtypy patří adenokarcinom (adenocarcinoma-ADC), velkobuněčný karcinom (large cell carcinoma-LCC), spinocelulární karcinom (squamous cell carcinoma-SCC) a malobuněčný karcinom, a to z důvodu, že tyto typy karcinomů tvoří většinu případů onemocnění (Wahbah *et al.*, 2007).

*Adenokarcinom* tvoří asi 40 % bronchiálních nádorů, obvykle je lokalizován v periferních oblastech. Nádor se vyvíjí z výstelky bronchů nebo bronchiálních žlázek. Poslední dobou došlo k vzrůstající incidenci tohoto karcinomu. Ve většině případů lze

ADC pozorovat u kuřáků, ale stále častěji se vyskytuje i u nekuřáků, zvláště u žen. Je charakterizován přítomností glandulárních elementů nebo hleny. Jedná se o heterogenní nádor, a proto může být určení jednotlivých typů tohoto karcinomu někdy obtížné. Bronchoalveolární karcinom se biologickým chováním odlišuje od ostatních typů adenokarcinomů, je méně agresivní formou. Roste podél stěn plicních alveolů a nevykazuje invazivní růst do nádorového stromatu. Dle způsobu šíření se můžeme setkat se solitárním nádorem, multifokální přítomností plicního tumoru nebo s rychle progredující difuzní pneumonickou formou, která často postihuje obě plíce. Bronchoalveolární karcinom se vyskytuje v hlenotvorné a nehlenotvorné variantě, kdy nehlenotvorná mívá obvykle lepší prognózu. Buňky jsou atypické s objemnou cytoplazmou a velkými jádry (Brychtová *et Hlobilková*, 2008; Skříčková *et al.*, 2008; Travis *et al.*, 2004).

*Velkobuněčný karcinom* se vyskytuje u 10-15 % případů. Charakteristickým znakem tohoto nádoru je nepřítomnost diferenciací nádorových buněk dlaždicového nebo glandulárního typu, agresivní růst a špatná prognóza. Některé z velkobuněčných karcinomů obsahují neurosekreční granula. Buňky jsou velké, atypické s vysokou mitotickou aktivitou (Skříčková *et al.*, 2008; Brychtová *et Hlobilková*, 2008).

*Spinocelulární karcinom* tvoří 30-40 % plicních karcinomů. Jeho incidence v současné době nevzrůstá a častěji se vyskytuje u mužů, kuřáků. Před jeho vznikem dochází k dlaždicobuněčné metaplazii bronchiální sliznice. Tento typ karcinomu roste pomalu a odhaduje se, že stádium invazivního růstu nastává až za 3-4 roky. Jedná se o heterogenní nádor, jelikož obsahuje maligní buňky v různém stupni diferenciací. Tyto dlaždicové buňky jsou atypické a v centru ložiska nádoru rohovějí a keratinizují. Rohovění a keratinizace závisí od stupně diferenciací nádoru (s nižším stupněm diferenciací ubývá rohovějí i keratinizace). Spinocelulární karcinom má příznivější prognózu než jiné typy nemalobuněčného karcinomu, jelikož má menší potenciál vytvářet vzdálené metastázy (Brychtová *et Hlobilková*, 2008; Skříčková *et al.*, 2008).

*Malobuněčný karcinom* se vyskytuje u 20-25 % případů. Primární ložisko bývá někdy malé velikosti a je tak obtížně detekovatelné i ve stádiu vzdálených metastáz. Je tvořen drobnými kulatými nebo oválnými buňkami, které obsahují výrazné jádro bez jadérek, malé množství cytoplazmy a neurosekreční granula. V těchto granulech

jsou obsaženy chemické látky zodpovědné za neuroendokrinní aktivitu. Tendence vytvářet lymfogenní i hematogenní metastázy je již v prvních stádiích onemocnění. Rozlišujeme malobuněčný karcinom a kombinovaný malobuněčný karcinom, který obsahuje složky NSCLC (spinocelulární karcinom, adenokarcinom a/nebo velkobuněčný karcinom). Tato smíšená forma má horší prognózu pro pacienta než klasická forma SCLC (Brychtová *et Hlobilková*, 2008; Skříčková *et al.*, 2008; Travis *et al.*, 2004).

### 2.1.2 Současná léčba nemalobuněčného karcinomu plic

Před rozhodnutím o léčbě je potřeba znát rozsah onemocnění. Ten se hodnotí dle mezinárodního systému TNM klasifikace (Tab. II). V tomto systému T značí rozsah primárního nádoru, N stav regionálních mízních uzlin a M vzdálené metastázy. Na základě těchto kritérií jsou odvozena klinická stádia onemocnění (Tab. III). Určení klinického stádia je rozhodující pro stanovení léčebného postupu. Diagnóza časných stádií je ovšem stále obtížná. (Skříčková *et al.*, 2008; Zeman *et al.*, 2006).

Tab. II: Zkrácená TNM klasifikace bronchogenního karcinomu (Zeman *et al.*, 2006):

T	
TX	Pozitivní cytologický nález v bronchiálním sekretu bez určení lokalizace nádoru
T0	Primární tumor neprokázán
TIS	Karcinom <i>in situ</i>
T1	<3 cm, infiltrace nepřesahuje lobární bronchus
T2	>3 cm nebo infiltrace k hilu (do 2 cm od kariny) nebo infiltrace viscerální pleury nebo menší atelektáza
T3	Infiltrace hlavního bronchu blíže než 2 cm ke karině nebo infiltrace některé z okolních struktur (hrudní stěna, perikard, mediastinální pleura, bránice) nebo atelektáza celého plicního křídla
T4	Rozsáhlejší infiltrace než T3, infiltrace kariny, exsudát v pleurální dutině
N	
NX	Postižení regionálních uzlin nelze nestanovit

Pokračování Tab. II.

N0	Bez přítomnosti metastáz v regionálních uzlinách
N1	Metastázy v peribronchiálních a/nebo v hilových uzlinách
N2	Metastázy v mediastinálních uzlinách
N3	Metastázy v kontralaterálních hilových a/nebo ve vzdálených uzlinách
<b>M</b>	
MX	Vzdálené metastázy nelze prokázat
M0	Vzdálené metastázy nejsou přítomny
M1	Vzdálené metastázy jsou přítomny (mozek, játra, kosti apod.)

T: rozsah primárního nádoru; N: stav regionálních mízních uzlin; M: vzdálené metastázy

Tabulka III: Klinická stádia bronchogenního karcinomu (Skříčková *et al.*, 2009):

Okultní karcinom	TX	N0	M0
Stádium 0	Tis	N0	M0
Stádium IA	T1	N0	M0
Stádium IB	T2	N0	M0
Stádium IIA	T1	N1	M0
Stádium IIB	T2, T3	N0, N1	M0
Stádium IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Stádium IIIB	jakékoliv T	N3	M0
	T4	jakékoliv N	M0
Stádium IV	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

T: rozsah primárního nádoru; N: stav regionálních mízních uzlin; M: vzdálené metastázy

### **2.1.2.1 Terapeutické přístupy u jednotlivých stádií NSCLC**

#### *Klinické stádium 0*

Kurativní léčbou je chirurgická resekce. Tento zákrok je doporučován, je-li rozsah nádoru malý a je minimální postižení uzlin (Čoupková H., 2009).

#### *Klinické stádium IA*

Chirurgický resekční zákrok je v tomto případě považován za dostatečně radikální. Při operaci může být odstraněna část nebo celý plicní lalok, oba laloky nebo celé plíce. V případech, kde není možný chirurgický zákrok je indikována radioterapie (Skříčková et al., 2008b; Zeman et al., 2006).

#### *Klinická stádia IB, IIA, IIB, IIIA*

V těchto stádiích je indikována chirurgická léčba s následnou adjuvantní chemoterapií. Pokud není pacient schopný chirurgického zákroku, je podána systémová chemoterapie, nebo kombinace chemoterapie a radioterapie (Skříčková et al., 2008b).

#### *Klinické stádium IIIB*

Stádium je neoperovatelné a naděje na uzdravení malá. Pomocí systémové chemoterapie kombinované se současnou, nebo následnou zevní radioterapií hrudníku lze zmenšit nádor, získat lepší lokální kontrolu a prodloužit přežívání nemocných. Samotná radioterapie je vyhrazena nemocným, u kterých není vhodná chemoterapie (Skříčková et al., 2008a; Skříčková et al., 2008b).

#### *Klinické stádium IV*

Karcinom je léčen systémovou chemoterapií s paliativním záměrem. Radioterapie se používá ke zmírnění příznaků způsobených nádorem a metastázemi (Petruželka et Zatloukal, 2001; Skříčková et al., 2008b).



## **2.1.2.2 Druhy terapie**

### **2.1.2.2.1 Chemoterapie**

Chemoterapie je léčba cytostatiky. Cytostatika jsou léky, které zastavují buněčné dělení a ničí buňky tím, že poškozují genetickou informaci. Nádorové buňky se dělí rychleji, a proto jsou cytostatiky poškozovány více než zdravé buňky. U pokročilejších nádorů se podává s následnou nebo souběžnou radioterapií.

Chemoterapie pokročilého NSCLC by měla obsahovat kombinaci jednoho léku třetí generace (docetaxel, gemcitabin, paklitaxel nebo vinorelbin) s platinovým derivátem (cis-, karboplatina) (Marel, 2012; Skříčková, 2011; Vorlíček *et al.*, 2006).

### **2.1.2.2.2 Radioterapie**

Radioterapie je léčba ionizujícím zářením a je založena na faktu, že většina nádorových buněk je na radiaci citlivější než buňky zdravé tkáně. Cílovou strukturou radiace je DNA, která se po ozáření poškodí. Tento druh léčby je indikován u nemocných, kteří nejsou schopni operace a nemají prokázané vzdálené metastázy (Skříčková, 2011; Vorlíček *et al.*, 2006).

### **2.1.2.2.3 Biologická (cílená) léčba**

Předpokládá se, že v chemoterapii se již dosáhlo maxima a žádná nová cytostatika, ani jejich kombinování, nepřispívají ke zlepšení léčebného efektu a přežívání nemocných. Preparáty biologické léčby působí na nádorové buňky jiným způsobem než klasická chemoterapie. Tento typ léčby se také označuje jako tzv. cílená molekulární terapie, jelikož zasahuje selektivněji do pochodů v nádorové buňce. Využívají se zde nízkomolekulární látky nebo monoklonální protilátky, které vazbou např. na receptory nebo ligandy buněk blokují signální dráhy podporující maligní chování, jako např. dráhy zodpovědné za inhibici apoptózy, za schopnost novotvorby cév a vlastního zásobování nádoru živinami, za nekontrolovatelnou proliferaci nádorových buněk a za jejich schopnost metastázovat.

V léčbě pokročilého NSCLC se používají inhibitory tyrozinkinázového receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR)-erlotinib (Tarceva) a gefitinib

(Iressa). Užitek z této léčby mají jen ti pacienti, u kterých je zvýšená exprese tohoto receptoru, a jsou zároveň nositeli tzv. aktivačních mutací. Jedná se o léčbu perorální, která je ve srovnání s chemoterapií lépe tolerována, především staršími pacienty. Účinnost erlotinibu byla prokázána i u pacientů s mozkovými metastázemi.

Dalším z dostupných preparátů je crizotinib (Xalkori), selektivní inhibitor onkogenu EML4-ALK. Výskyt translokace EML4-ALK je zvýšený v adenokarcinomech nekuřáků, nebo v minulosti lehkých kuřáků.

Kromě výše zmíněných je v biologické léčbě NSCLC využíván i preparát bevacizumab (Avastin). Jedná se o monoklonální protilátku, která blokuje vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF). Tento lék se podává s cytostatiky u nemocných s pokročilým non-SCC. Tato léčba však není doporučována u pacientů s metastázemi do mozku (Marel, 2012; Skříčková, 2011; Skříčková, 2014).

## **2.2 Metastáze**

### **2.2.1 Charakteristika metastází**

Maligní nádory vykazují rychlý růst, šíří se do okolí a vytváří vzdálená dceřina ložiska – tzv. metastázy. Pokud nedojde k jejich včasné léčbě, způsobují smrt pacientů. Nádorový růst se morfologicky projevuje třemi způsoby:

1. Expanzivní růst – mechanicky utlačuje okolí
2. Infiltrativní růst – nádorové buňky vrůstají mezi buňky okolních tkání bez přímého ničení
3. Invazivní růst – vrůstání nádorových buněk do buněk okolních tkání, které jsou tak poškozovány a ničeny

Maligní nádory metastázuji (se šíří v organismu) trojím způsobem:

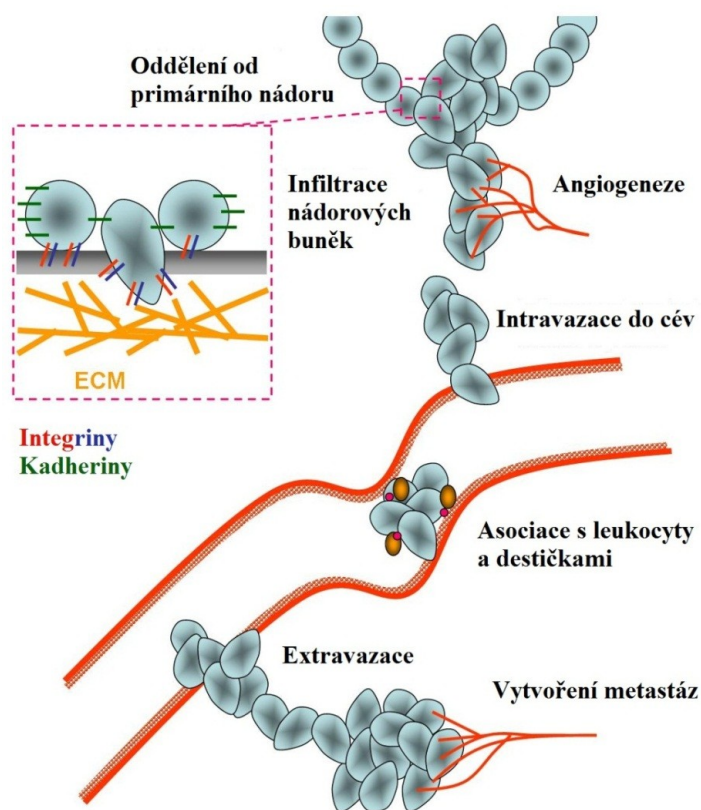
1. pokračujícím místním růstem – metastázy porogenní
2. metastázováním lymfatickými cestami – metastázy lymfogenní
3. metastázováním krevními cestami – metastázy hematogenní

(Mačák *et* Mačáková, 2004; Povýšil *et al.*, 2011; Vorlíček *et al.*, 2006)

## 2.2.2 Mechanismus metastázování

Tkáně jsou organizovány do kompartmentů oddělených od sebe dvěma typy extracelulární matrix (ECM)-bazální membránou a intersticiální tkání. Epitelové buňky jsou normálně silně adherovány k lamině bazální membrány pomocí integrinů a jsou vzájemně propojeny s okolními buňkami. V ECM se nacházejí kolageny, glykoproteiny, proteoglykany ale i regulační proteiny a růstové faktory (Povýšil, 2011; Pupa *et al.*, 2002).

Metastázování je komplexní proces zahrnující několik kroků. Nádorové buňky získávají specifické vlastnosti, díky kterým nabývají metastatický potenciál a mohou se šířit organismem i ve velice časných stádiích nádorového onemocnění. Mezi hlavní kroky procesu vzniku vzdálených metastáz patří: vaskularizace primárního nádoru, uvolnění se a invaze nádorových buněk, intravazace do lymfatických a krevních kapilár, přežití a záchyt v cirkulaci, extravazace z cirkulace, vstup do vzdálených orgánů, kolonizace a růst metastatického ložiska (Slabý *et al.*, 2012; Povýšil, 2011) (Obr. 1).



Obr. 1: Schématické znázornění hematogenní metastázy.

Nejdříve dochází k oddělení buněk z primárního nádoru, poté přechodu přes ECM, intravazace do cév, kde může docházet k asociaci s leukocyty a krevními destičkami. Dále buňky putují cévami, až dochází k interakci s endotelem a následné extravazaci. Posledním krokem je vytvoření metastáz a současná angiogeneze z důvodu nutnosti zásobení živinami a kyslíkem (upraveno dle Guo *et* Giaccotti, 2004).

Na začátku celého tohoto procesu dochází k tzv. iniciaci. Jedná se o změny v struktuře a expresi genů způsobující nepřetržitý růst, přežití a genomickou nestabilitu, čímž nádorové buňky získají, kromě jiného, i schopnost metastázovat (Povýšil, 2011).

Předpokladem pro to, aby vznikl zhoubný nádor, je schopnost buněk rostoucího nádoru uvolnit se ze soudržnosti s ostatními buňkami a následně pronikat přes bazální membrány epitelů i cév. Dalším krokem po iniciaci je tedy invaze do ECM (Perez-Moreno *et al.*, 2003).

#### **2.2.2.1 Invaze do ECM**

K uvolnění buněk ze soudržnosti s ostatními buňkami je potřeba potlačit funkci proteinů mezibuněčných spojů. Hlavní skupinou adhezních molekul jsou kadheriny. Pro epitelové buňky je specifický E-kadherin, který svou extracelulární částí udržuje mezibuněčná spojení. Jeho ztráta zvyšuje schopnost invaze nádorových buněk (Birchmeier *et* Behrens, 1994; Hirohashi, 1998). Při vazbě nádorových buněk k bazální membráně dochází také k změnám v zastoupení integrinů (Schwartz, 2001). Všechny tyto změny jsou součástí tzv. epitelově-mezenchymového přechodu (EMT), kdy epitelová buňka změní svou morfologii v buňku mezenchymovou (Thiery, 2002).

EMT je procesem vratným, jeho opak je nazývaný mezenchymálně-epitelový přechod (MET). Dochází k němu v posledním kroku metastázování při zakládání sekundárního ložiska (vzdálené metastázy) (Zeisberg *et al.* 2005).

Proces pokračuje degradací bazální membrány a intersticiální pojivové tkáně. K tomuto dochází účinkem proteolytických enzymů, které jsou produkovány samotnými nádorovými buňkami, nebo se jejich tvorba indukuje ve stromálních buňkách. Proteolýza tak umožňuje nádorovou invazi remodelací složek bazální membrány a intersticiální matrix a také uvolňováním růstových faktorů, které jsou v ECM

normálně uloženy. Mezi proteázy, které se nejčastěji tohoto procesu účastní, patří katepsiny, urokináza, a především matrixové metaloproteinázy (MMP) (Nakajima *et* Chop, 1991; Povýšil, 2011). MMP jsou skupina zinek-dependentních proteáz, které mají schopnost degradovat v podstatě všechny složky ECM. Tyto enzymy jsou však v buňce přítomny v neaktivní formě a jejich aktivace nastává až po odštěpení jedné z domén MMP a uvolnění zinku z vazby na cystein (Chambers *et* Matrisian, 1997; Kleiner *et* Stetler-Stevenson, 1999). Proteolýza matrix je za normálních podmínek regulována inhibitory, které jsou syntetizovány epitelovými buňkami a jsou vázány v ECM. Patří zde inhibitory metaloproteináz, serpiny a cystaniny. Při nádorové invazi je ale fyziologická rovnováha mezi proteinázovou aktivitou a její inhibicí posunuta směrem k degradaci ECM (Kahari *et* Saarialho-Kere, 1999).

Dalším krokem je migrace nádorových buněk. Jednou ze struktur nádorových buněk jsou cytoplazmatické výběžky (invadopodie), které umožňují jejich průchod ECM (Adams, 2001; Povýšil, 2011).

### **2.2.2.2 Invaze nádorových buněk do cév**

Intravazace neboli přestup nádorových buněk do cév (krevních a lymfatických) je založena na stejném principu jako přestup přes bazální membránu epitelu (Povýšil 2011; Wyckoff *et al.*, 2000). Mnohem snáz pronikají nádorové buňky do těch cév, které se tvoří v místě primárního nádoru *de novo*, v rámci tzv. angiogeneze, jelikož tyto cévy nemají dokonale vytvořené endotelové spoje. Tyto cévy zajišťují rostoucímu nádoru přísun kyslíku a živin (Papetti *et* Herman, 2002; Slabý, 2012; Povýšil, 2011). Významnou roli při tom sehrává hypoxie, díky které je stimulována exprese angiogenních faktorů. Příkladem jsou např. VEGF, FGF (fibroblastový růstový faktor), PDGF (destičkový růstový faktor) a angiopoetin (Benjamin, 1998; Hockel *et* Vaupel, 2001).

Do cévního řečiště vstupují buňky jednotlivě, nebo ve shlucích. Množství nádorových buněk v cévách regulují buňky imunitního systému, které se snaží nádorové buňky likvidovat, a také fyzikální vlastnosti krve, jelikož hydrostatický tlak může porušit stěnu nádorových buněk. Větší šanci na přežití mají ty buňky, které se pohybují v cévním řečišti ve shlucích jako mikroemboly (společně s leukocyty, krevními

destičkami a fibrinem), než ty, které se pohybují samy (Chambers *et al.*, 2001; Povýšil *et al.*, 2011; Wyckoff *et al.*, 2000).

Pouze malá část nádorových buněk, které se nacházely v cévním řečišti, se nakonec uchytí v metastatickém ložisku, protože kromě výše zmíněných událostí dochází k apoptóze indukované ztrátou adheze ke stromálním buňkám nebo působením oxidu dusnatého produkovaného endotelem (Cameron *et al.*, 2000; Povýšil, 2011).

### **2.2.2.3 Usídlení nádorových buněk v místech metastáz**

K vytvoření metastáz musí buňky karcinomu opustit cirkulaci procesem označovaným jako extravazace. Cirkulující nádorové buňky přechází do tkání nejčastěji z nejbližší dostupných cévních kapilár. V kapilárách se buňky zastavují kvůli své velikosti, jelikož jejich průměr může být až dvakrát větší, než je průměr kapiláry. Dalším podnětem pro extravazaci může být i vazba na specifické molekuly v daném orgánu nebo tkáni. V novém prostředí tkáně nebo orgánu dochází k adherenci nádorových buněk k ECM. Pro vlastní tvorbu metastatického ložiska je pak důležité, aby tyto buňky i nadále přežily a proliferovaly (Panes *et Granger*, 1998).

Nádorové buňky uchycené v novém prostředí se formují nejdříve do tzv. mikrometastáz. Mikrometastázy mohou zůstat v klidu po několik let. To je způsobeno rovnováhou počtu nově vznikajících nádorových buněk s počtem buněk zanikajících apoptózou.

Posledním krokem je tedy proměna dormantních mikrometastáz do aktivně rostoucího ložiska, což vyžaduje přísun živin, a proto zde opět dochází k indukci angiogeneze a k další lokální invazi (Luzzi *et al.*, 1998; Varghese *et al.*, 2002).

### **2.2.3 Místa metastáz karcinomu plic**

Karcinom plic se nejčastěji šíří do mozku, kostí, jater, a popřípadě do nadledvin a ledvin (Quint *et al.*, 1996).

### **2.2.3.1 Metastázy v mozku**

Rakovina plic je nejčastějším typem rakoviny, která se šíří do mozku a postihuje přibližně 40% pacientů s rakovinou plic. Příznaky mozkových metastáz se odvíjejí od toho, která část mozku je postižena, kolik ložisek se v mozku nachází a od celkového zdravotního stavu pacienta. Až třetina pacientů je bez příznaků. Mezi hlavní příznaky rozvoje metastáz v mozku patří: bolesti hlavy, záchvaty, ztráta rovnováhy, nevolnost a zvracení, obtíže při chůzi, ztráty koordinace, problémy s řečí, poruchy vidění, ztráta paměti, změna osobnosti, celková únava, slabost na jednu stranu těla. Medián přežití (doba, kdy 50% pacientů žije a 50% zemřelo) u pacientů s rozvinutými mozkovými metastázemi je 4 měsíce (Chi *et* Komak, 2010; Li *et al.*, 2000; Ricciardi *et de* Marinis, 2010; Walbert *et* Gilbert, 2009; Yamanaka, 2009).

### **2.2.3.2 Metastázy v kostech**

Karcinom plic je třetím nejčastějším typem karcinomu, který se šíří do kostí, a postihuje asi 30-40 % pacientů s pokročilou rakovinou plic. Kostí, ve kterých dochází ke vzniku metastáz, jsou páteř, žebra, kosti pánevní a stehenní. Mezi první příznak patří bolest, která je zpočátku vnímána jako svalové napětí nebo natažený sval. Dalším hlavním příznakem jsou zlomeniny, ke kterým může docházet během běžných denních aktivit, a to z důvodu, že napadené kosti jsou ke zlomeninám náchylnější. Je to způsobeno tím, že nádorové buňky nahrazují buňky normální kostní tkáně a kost je tím pádem křehčí. Kromě toho se u těchto pacientů vyskytuje nevolnost, zvracení, žízeň a svalová únava. V důsledku zasažení páteře nádorem dochází ke stlačování míchy, což může mít za následek bolestivou chůzi, slabost a brnění v nohou. Medián přežití takto postižených pacientů je méně než 6 měsíců (Al Husaini *et al.*, 2009; Hirano *et al.*, 2005; Langer *et* Hirsh, 2010; Nackaerts *et al.*, 2008; Sugiura *et al.*, 2008).

### **2.2.3.3 Metastázy v játrech**

Karcinom plic se do jater rozšiřuje asi u 40 % pacientů. Zpočátku jsou bez příznaků a až po nějaké době se objevuje tupá bolest v podžebří, na pravé straně těla. Játra bývají na pohmat zvětšená a tuhá, a objevují se i hlavní symptomy, jako je ztráta chuti a nevolnost. Pokud je metastatické ložisko velké, brání ve funkci žlučovodům

a může se objevit žloutenka. Medián přežití těchto pacientů je méně než 8 měsíců (Dugdale *et al.*, 2012; Nagashima *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 2012).

## 2.3 MikroRNA

MikroRNA (miRNA) jsou malé nekódující RNA o délce přibližně 21-23 nukleotidů, které na post-transkripční úrovni pomocí mechanismu RNA interference (RNAi) regulují genovou expresi. Předpokládá se, že miRNA jsou zapojeny do regulace exprese přibližně 60% savčích genů kódujících proteiny, čímž se podílejí na řízení různých biologických procesů, jako je např. apoptóza, proliferace, diferenciace a metastázování (Alvarez-Garcia *et Miska*, 2005; Ambros, 2004; Friedman *et al.*, 2009).

RNAi je založena na specifickém umlčování genové exprese pomocí krátkých RNA, které na základě homologie k cílové mRNA ji buď degradují, nebo zabraňují její translaci. RNAi probíhá u zvířat, rostlin i hub. Vznikla pravděpodobně jako obrana eukaryot před viry a transpozony (Ciomperlik *et al.*, 2011; Fire *et al.*, 1998; Jorgensen, 1990). Mezi molekuly zprostředkovávající RNAi patří kromě miRNA dále malé interferující RNA (small interfering RNA, siRNA), malé jadéřkové RNA (small nucleolar RNA, sno-RNA), malé vlásenkové RNA (small harpin RNA, shRNA), bifunkční sh-RNA (bifunction sh-RNA, bi-shRNA) nebo PIWI-interagující RNA (PIWI-interacting RNA, piRNA) (Šána *et al.*, 2012). Metody založené na RNAi se v praxi využívají pro studium funkcí genů (Kontrová *et al.*, 2009).

### 2.3.1 Historie miRNA

První miRNA, pojmenována jako *lin-4* (*lineage-4*), byla objevena v roce 1993 při studiu genu *lin-14* hlístice *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Bylo zjištěno, že gen *lin-4*, který se podílí na vývoji *C. elegans* nekóduje protein, ale vede ke vzniku krátkého RNA produktu interagujícího s mRNA genu pro *lin-14* a brání jeho translaci (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993). O několik let později byla objevena další miRNA *let-7* (*lethal-7*), která se, stejně jako *lin-4* podílí na vývoji *C. elegans*. (Reinhart *et al.*, 2000).



V současné době (údaje z června 2013 z verze 20 databáze miRBase) je známo 2652 lidských miRNA a více než 24 tisíc miRNA u 206 různých organismů ([www.miRBase.org](http://www.miRBase.org)).

### 2.3.2 Mechanismus účinku a funkce miRNA

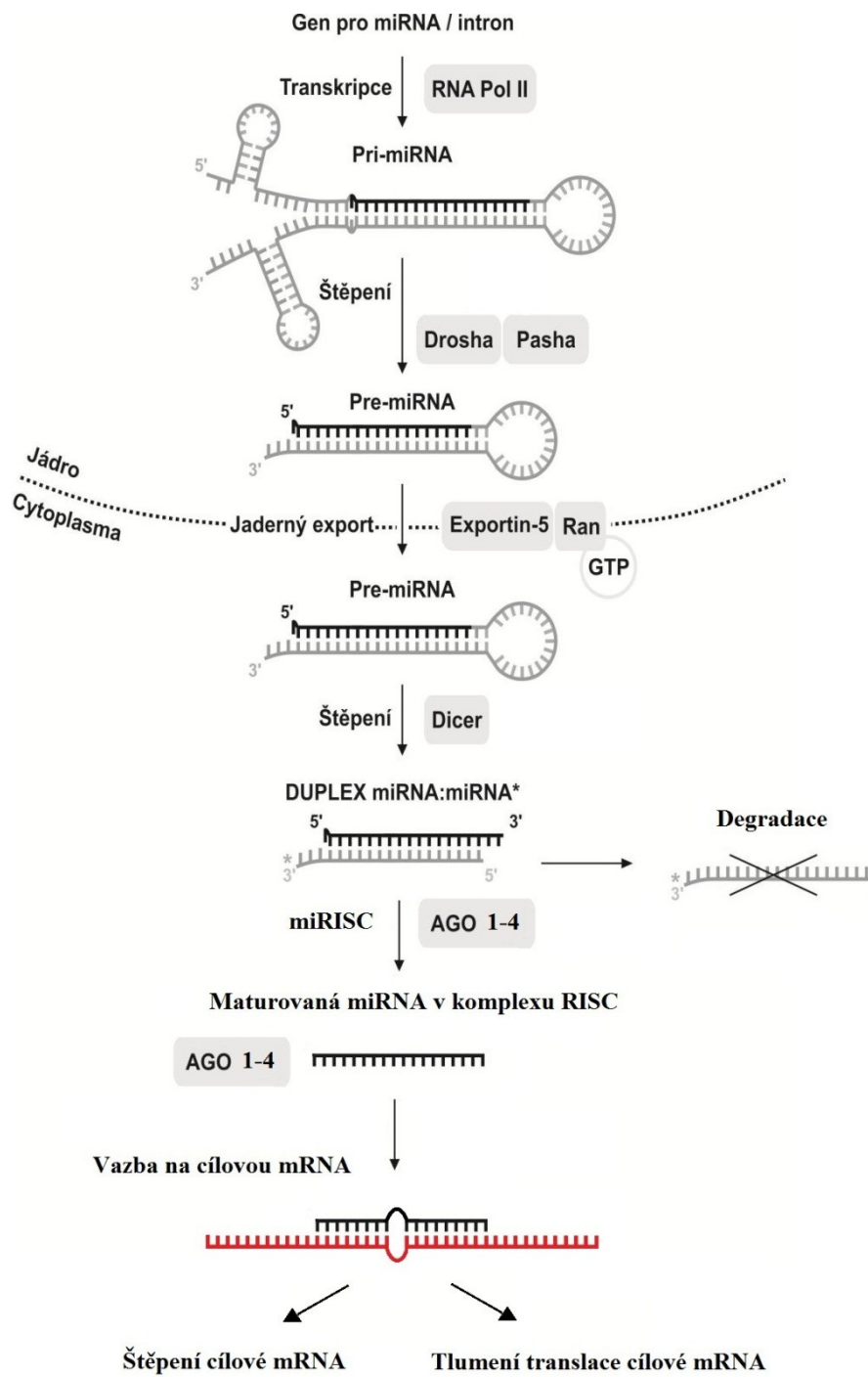
Geny pro miRNA jsou u člověka umístěny na všech lidských chromozomech kromě chromozomu Y. Přibližně polovina těchto genů se vyskytuje v podobě klastrů, které jsou přepisovány jako polycistronní primární transkripty (Kim *et al.*, 2006). Na základě rozmístění v genomu je možno geny pro miRNA rozdělit do několika skupin, kdy přibližně polovina genů pro miRNA se vyskytuje v mezigenových oblastech, asi 40 % genů je lokalizováno v intronových oblastech proteiny kódujících genů nebo genů pro nekódující RNA. Zvláštní skupinou genů pro miRNA jsou tzv. miRtrony, kdy intron přímo odpovídá struktuře pre-miRNA. Poslední skupinou miRNA genů jsou exonové miRNA, které se většinou nacházejí na rozhraní exon-intron v rámci genu pro nekódující RNA (Olena *et al.*, 2010).

Podle nedávných výzkumů geny pro miRNA tvoří asi 3% lidského genomu (Lim *et al.*, 2005) a mohou být zodpovědné za regulaci až 60 % lidských genů kódujících proteiny (Friedman *et al.*, 2009).

### 2.3.3 Biogeneze miRNA

Geny pro miRNA jsou nejdříve transkribovány (přepisovány) pomocí RNA polymerázy II do primárních transkriptů (pri-miRNA), které obsahují 7-methylguanidinovou čepičku na 5' konci a poly (A) konec (polyadenylovou sekvenci) na 3' konci (Lee *et al.*, 2003). Poté jsou pri-miRNA upravovány proteinovým komplexem zvaným mikroprocesorový komplex. Ten je složen z ribonukleázy Drosha a proteinu DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8 gene) u obratlovců (u bezobratlých protein Pasha), který na sebe váže dvouvláknovou pri-miRNA (Gregory *et al.*, 2004). Vzniká 70 nukleotidů dlouhá vlásenka, zvaná prekurzorová miRNA (pre-miRNA), která je následně transportována z jádra do cytoplazmy pomocí proteinu Exportin 5 (XPO5). Energie pro tento transport je zajišťována proteinem Ran s GTPázovou aktivitou (Lund *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2003). V cytoplazmě interaguje

pre-miRNA s endonukleázou DICER a vzniká dvouvláknová miRNA. Následně dochází k jejímu rozvolnění a jeden z řetězců, označovaný jako vedoucí („guide strand“), je začleněn do komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), zatímco druhý řetězec („passenger strand“ / miRNA<sup>\*</sup>) je uvolněn, a ve většině případů degradován. Po inkorporaci vedoucího řetězce (zralé miRNA) do komplexu RISC vzniká tzv. miRNP (microRNA ribonucleoprotein complex) (Maniataki *et* Mourelatos, 2005; Wang *et al.*, 2009). Za účasti proteinu Ago-2, jenž patří do rodiny Argonautových proteinů, které jsou podjednotkami RISC (Ender *et al.*, 2010) dochází k navázání zralé miRNA na cílovou mRNA. Dle míry komplementarity je tato mRNA buď kompletně degradována, nebo je zamezeno její následné translaci (Lim *et al.*, 2005) (Obr. 2).



Obr. 2: Schéma biogeneze mikroRNA (upraveno dle Slabý *et al.*, 2012)

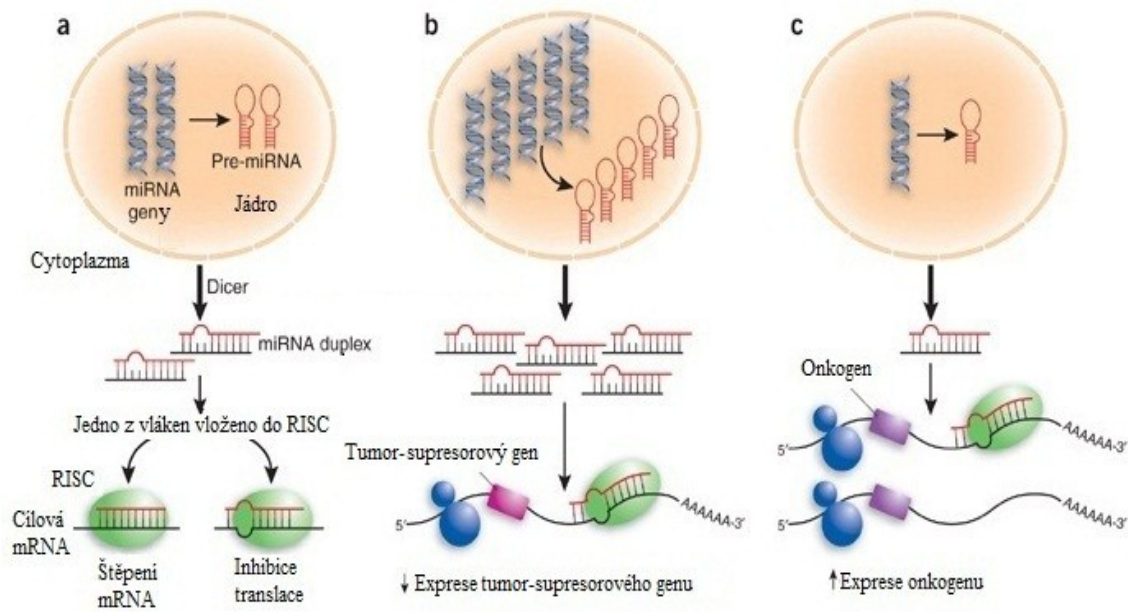
### 2.3.4 Úloha miRNA v nádorech

MikroRNA se, mimo jiné, účastní i procesu kancerogeneze. Jednotlivé miRNA ovlivňují expresi mnoha genů, a jejich deregulace tedy může vyústit v nádorovou transformaci (Jansson *et al.*, 2012). Tento poznatek je navíc podpořen skutečností, že asi 50% genů kódujících miRNA je lokalizováno v místech, které často při nádorových onemocněních podléhají mutacím a zlomům (Bartel, 2004). Navíc, deletované oblasti spojované s kancerogenezí často obsahují geny pro miRNA (Calin *et al.*, 2004).

MiRNA zapojené do kancerogeneze je možné rozdělit na miRNA s charakterem onkogenu nebo miRNA s charakterem tumor-supresoru (Kent *et al.*, 2006) (Obr. 3). MiRNA s charakterem onkogenů (např. miR-155, miR-17-92) zodpovídají za represi tumor-supresorů a jejich hladina exprese je oproti normálním buňkám v nádorových buňkách zvýšena. MiRNA s charakterem tumor-supresorů (např. let-7, miR-15a) jsou naopak zodpovědné za represi onkogenů a jejich hladina je v nádorových buňkách snížena (Zhang *et al.*, 2007).

Exprese miRNA je dnes intenzivně studována, jelikož bylo prokázáno, že hladiny miRNA v normální tkáni jsou odlišné od hladin v nádorové tkáni (Cheng *et al.*, 2005). Profilování exprese miRNA tak může pomoci odhalit už velmi časná stádia rozvoje nádorového bujení (Lu *et al.*, 2005) a zároveň může posloužit i pro upřesnění diagnózy či prognózy onemocnění (Calin *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2008).

Kromě tkáňově specifických expresních profilů vykazují miRNA další vlastnosti (např. vysoká stabilita či snadná detekce), díky kterým se zdají být dobrými nádorovými biomarkery (Chan *et al.*, 2011). Detekce hladin miRNA tak může mít diagnostický (např. miR-205 u NSCLC), prognostický (např. miR-21 u kolorektálního karcinomu) a prediktivní význam (např. miR-497 u karcinomu prsu) (Markou *et al.*, 2008; Schetter *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013).



**Obr. 3: miRNA s charakterem tumor-supresoru a onkogenu:**

a) Pri-miRNA jsou v jádře zpracovávány do pre-miRNA a ty jsou následně exportovány do cytoplazmy, kde jsou pomocí Diceru naštěpeny na krátké dvouvláknové RNA, z kterých jedno vlákno (zralá miRNA) je zabudováno do komplexu RISC, který se následně podílí buď na štěpení cílové mRNA, nebo na inhibici její translace.

b) Hladina exprese miRNA s charakterem onkogenu je v buňkách zvýšena a inhibuje translaci tumor-supresorových genů.

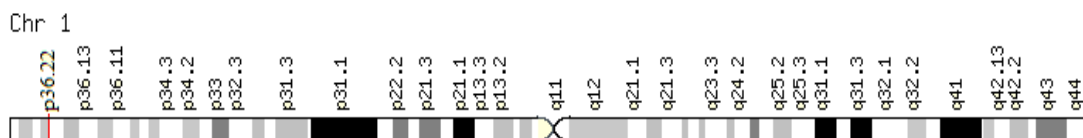
c) Naopak, hladina exprese miRNA s charakterem tumor-supresoru je v buňkách snížena a vede ke zvýšené expresi onkogenů (upraveno dle Caldas *et* Brenton, 2005).

### 2.3.5 Známé miRNA zapojené do metastázování

Je známých spousta miRNA, které se podílejí na metastázování. Na základě literatury se níže uvedené miRNA účastní metastázování významnou mírou, a proto je tato práce zaměřena právě na ně (Brabletz, 2012).

### 2.3.5.1 Charakteristika miR-34a

MiR-34a je členem rodiny miR-34 (miR-34a-c) a patří do skupiny tumor-supresorových miRNA. Gen pro miR-34a je lokalizován na chromozomu 1, v lokusu 1p36.22 (Obr. 4).



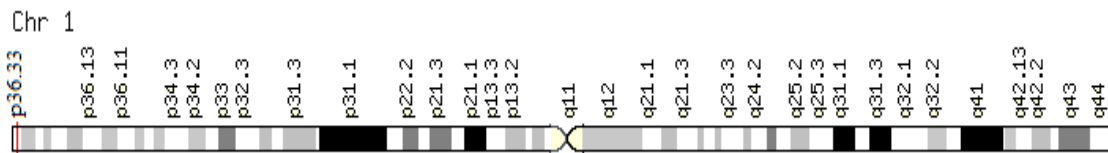
**Obr. 4: Schématické znázornění lidského chromozomu 1 včetně lokusu pro *miR-34a*** (upraveno dle [www.genecards.org](http://www.genecards.org))

Exprese členů rodiny miR-34 je přímo regulována proteinem p53, čímž se podílejí na zastavení buněčného cyklu v důsledku poškození DNA. Mutace p53 je tedy, spolu s častými delecemi oblasti 1p36, zodpovědná za sníženou expresi miR-34a v nádorech (He *et al.*, 2007; Welch *et al.*, 2007). Mezi cíle rodiny miR-34 patří proteiny zodpovědné za řízení buněčného cyklu, jako jsou CDK4, CDK6, cyklin E2 a proteinové transkripční faktory E2F3 a E2F5 (Bommer *et al.*, 2007). Cílem miR-34a je i protein SNAIL 1, který je jedním transkripčních represorů E-kadherinu, díky čemu je zapojen do řízení (Siemens *et al.*, 2011).

Snížená exprese miR-34a je častá například u karcinomu slinivky břišní, osteosarkomu, karcinomu prsu, kolorektálního karcinomu a u neuroblastomu (Chang *et al.*, 2007; Lodygin *et al.*, 2008; Welch *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2012). U pacientů se SCC byla také pozorována snížená exprese miR-34a (Landi *et al.*, 2010). Při zvýšené expresi členů rodiny miR-34 dochází k buněčnému stárnutí a apoptóze (He *et al.*, 2007). Zvýšená hladina byla detekována u chronické B lymfatické leukémie (B-CLL) (Zenz *et al.*, 2009).

### 2.3.5.2 Charakteristika miR-200b

MiR-200b je členem miR-200 rodiny a patří mezi tumor-supresorové miRNA. Gen pro miR-200b je lokalizován na chromozomu 1, v lokusu 1p36.33 (Obr. 5).



**Obr. 5: Schématické znázornění lidského chromozomu včetně lokusu pro *miR-200b*, 1p36.33 (upraveno dle [www.genecards.org](http://www.genecards.org))**

Rodina miR-200 reguluje expresi genů *ZEB 1* a *ZEB 2*, což jsou taktéž represory E-kadherinu, čímž se podílí na řízení procesu EMT uplatňujícího se při vzniku metastáz. E-kadherin patří do skupiny adhezivních molekul a je součástí mezibuněčných spojů. Jeho ztráta zvyšuje invazivitu nádorových buněk (Birchmeier *et Behrens*, 1994; Hirohashi, 1998). Při zvýšené expresi rodiny miR-200 dochází k potlačení exprese *ZEB 1/2*, a tedy vysokým hladinám E-kadherinu (Bendoraitis *et al.*, 2010). Při snížení exprese rodiny miR-200 v nádorech je podporována EMT prostřednictvím nepřímé inhibice E-kadherinu a může tak být spuštěna metastatická kaskáda (Shimono *et al.*, 2009). Bylo tedy potvrzeno, že rodina miR-200 je schopna kontrolovat některé procesy související s EMT, jako je např. ztráta adheze buněk k bazální membráně nebo přestavba buněčného cytoskeletu (Jurmeister *et al.*, 2012). Zvýšená hladina miR-200b zároveň vede k inhibici buněčného růstu a invazivity (Tang *et al.*, 2013).

Snížená exprese miR-200b byla detekována u hepatocelulárního karcinomu, karcinomu prsu a NSCLC (Ceppi *et al.*, 2010; Murakami *et al.*, 2006; O'Day *et al.*, 2010). Zvýšená exprese miR-200b byla pozorována u karcinomu ovaria a u kolorektálního karcinomu (Wyman *et al.*, 2009; Xi *et al.*, 2006).

### 2.3.5.3 Charakteristika miR-200c

Podobně jako miR-200b i miR-200c patří mezi tumor-supresorové miRNA náležící do rodiny miR-200. Gen pro miR-200c je lokalizován na chromozomu 12, v lokusu 12p13.31 (Obr. 6).



**Obr. 6: Schématické znázornění lidského chromozomu 12 včetně lokusu pro *miR-200c*, 12p13.31 (upraveno dle [www.genecards.org](http://www.genecards.org))**

Jeden z možných cílů *miR-200c* je transkripční represor E-kadherinu, ZEB 1. Při snížené expresi *miR-200c* v nádorech dochází k zvýšené expresi genu pro ZEB 1, a tím je potlačena syntéza E-kadherinu (Hurteau *et al.*, 2007). Stejně jako v případě *miR-200b*, zvýšená hladina *miR-200c* zároveň vede k inhibici buněčného růstu a invazivity (Tang *et al.*, 2013). *MiR-200c* zvyšuje citlivost buněk na cytostatika, která interagují s mikrotubuly (např. paklitaxel) (Cochrane *et al.*, 2009).

Snížená hladina *miR-200c* byla pozorována u hepatocelulárního karcinomu a NSCLC (Ceppi *et al.*, 2010; Murakami *et al.*, 2006). Naopak zvýšená exprese byla zaznamenána u karcinomu ovaria, kolorektálního karcinomu, cholangiogenního karcinomu (Meng *et al.*, 2006; Wyman *et al.*, 2009; Xi *et al.*, 2006).

Všechny tyto tři výše zmíněné *miRNA* hrají významnou roli při vzniku metastáz a to proto, že regulují geny (např. ZEB 1/2, SNAIL 1) ovlivňující procesy, uplatňované v metastázování, jako jsou EMT, MET či invaze nádorových buněk (Brabletz, 2012).



### **3. Cíle práce**

1. Vypracování literární rešerše na téma Exprese různých miRNA s ohledem na výskyt metastáz u karcinomů plic.
2. Návrh experimentu na kvantifikaci vybraných miRNA ve vzorcích pacientů s karcinomem plic.
3. Kvantifikace miRNA ve vzorcích pacientů s karcinomem plic s metastázemi a bez metastáz.
4. Analýza výsledků.
5. Porovnání získaných výsledků s dostupnou literaturou.

## 4. Materiál a metodika

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Biologický materiál

Jako materiál do experimentální části bakalářské práce byly použity ve formalínu fixované a parafínem zalité vzorky nemalobuněčného karcinomu plic. Tyto vzorky byly získány z archívu Ústavu klinické a molekulární patologie, který je součástí Fakultní nemocnice Olomouc. Vzorky pocházejí z let 1997-2000 od pacientů, kteří byli operováni na Chirurgickém oddělení Fakultní nemocnice Olomouc. Celkem bylo analyzováno 20 vzorků pacientů s NSCLC, které pocházely od 17 mužů a 3 žen. Z toho 11 pacientů bylo v klinickém stádiu I, II, nebo IIIa a 9 pacientů v klinickém stádiu IIIb, nebo IV. U pacientů byly zastoupeny 3 histologické subtypy-ADC, SCC a LCC. Metastázy se v době diagnózy vyskytovaly u 8 pacientů, u 4 pacientů se vyskytly několik měsíců nebo let po operaci a vůbec nebyly přítomny u 8 pacientů (Tab. IV).

Tab. IV: Charakteristika pacientů s NSCLC

Všichni pacienti	Pohlaví		Věk		Stádium		Histologický podtyp			Metastázy		
	ženy	muži	<60	≥60	I/II/IIIa	IIIb/IV	ADC	SCC	LCC	dg.	rec.	ne.
20	3	17	14	6	11	9	11	8	1	8	4	8

ADC-adenokarcinom; SCC-spinocelulární karcinom; LCC-velkobuněčný karcinom; dg.-v době diagnózy; rec.-v recidivě; ne.-nepřítomny

#### 4.1.2 Reagencie

*Souprava pro izolaci RNA:* RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (složení: Digestion Buffer, Proteasa, Isolation Additive, Wash 1, Wash 2/3, 10x DNase Buffer, DNasa, Elution Solution) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

*Souprava pro reverzní transkripci:* TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (složení: 10x Reverse Transcription Buffer, 100 mM dNTPs (s DTTP), MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/μl, RNase Inhibitor 20 U/μl), (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

*Souprava pro preamplifikaci:* TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

*Souprava pro real-time PCR:* TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG, (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

RT primery (miR-34a, miR-200b, miR-200c a RNU6B) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

MicroRNA Assays (miR-34a, miR-200b, miR-200c, RNU6B) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Nuclease-free water DEPC

Ethanol

Xylén

#### **4.1.3 Přístroje**

Třepačka Vortex-Genie 2S (Scientific Industries, NY, USA)

Mikrocentrifuga PCV-2400 (Grant-bio, NJ, USA)

Box DNA cleaner PCR, DNA/RNA UV cleaner UVC/T-AR (Biosan, Riga, Latvia)

Centrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Centrifuga Centrifuge LMC-3000 (Biosan, Riga, Latvia)

Mikrocentrifuga Uni-fuge, (Carl Roth, Karlsruhe, Germany)

Termostat: Accu Block TM, Digital Dry Bath (Labnet International, NJ, USA)

Thermocycler (Mastercycler) Eppendorf A6 6325 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Galileo CK3500 (Integrated System Engineering S.R.L., Milan, Italy)

Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA)

LightCycler 480®, Real-Time PCR system (Roche, Brandford, CT, USA)

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Příprava parafinových bločků**

Materiál odebraný při operaci byl ihned vložen do formalínu a po dostatečném čase fixace z něho patolog vyřezal kousky, jejichž velikost byla vždy závislá na velikosti vstupního materiálu a na velikosti budoucího parafinového bloku. Následně byl tento materiál přesycen alkoholy, xylénem a nakonec samotným parafínem. Takto zpracovaný materiál byl zalit do jednotlivých parafinových bločků a nechal se ztuhnout. Z těchto bločků byly na mikrotomu nařezány tenké řezy (cca 4  $\mu\text{m}$ ) pro další zpracování (barvení) preparátů.

### **4.2.2 Příprava tkáňových mikroarrayí (TMA)**

Výhoda použití TMA oproti klasickým parafinovým bločkům je hlavně v úspoře materiálu a reagentů, a také možnost vyšetření přímo oblasti, která nás zajímá. TMA je v podstatě tkáňový mikročip. Na našem ústavu byl k přípravě TMA použit poloautomatický systém Galileo CK3500 (Integrated System Engineering S.R.L., Milan, Italy). Z původních parafinových bločků se zalitými tkáněmi, označenými jako donorové bloky, byly pomocí jehly vybrány válečky tkáně, a následně byly přeneseny do čistého parafinového bloku, označeného jako recipientní blok. Oblasti, ze kterých byly jednotlivé válečky vybírány, určil patolog. V našem případě byl připraven recipientní blok o rozměrech 20 x 30 mm, s využitím jehly o průměru 2 mm a celkově TMA obsahovala 24 válečků (6 x 4) z 12 různých oblastí (válečky byly odebrané v dupletech-vždy 2 z jedné oblasti). Z těchto 12 různých oblastí 2 představovali orientační tkáně (např. ze srdce, jater, ledvin, sleziny atd.), a tedy v jednom TMA bylo zastoupeno 10 různých vyšetřovaných oblastí / pacientů. Takto připravené bloky TMA byly následně „zataveny“ v termostatě.

### **4.2.3 Izolace celkové RNA z parafinových bločků**

Pomocí skalpelu byly z parafinových bločků (TMA) vyřezány jednotlivé vzorky plicní tkáně a následně byla u nich provedena izolace celkové RNA pomocí RecoverAll™ Total nucleic acid isolation kitu (Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA). Jednotlivé kroky zahrnovaly deparafinizaci, štěpení proteasou, izolaci nukleové kyseliny, štěpení nukleasou a finální purifikaci RNA.

Vykrojený řez tkáně byl vložen do 1,5 ml eppendorfky a k němu byl přidán 1 ml 100 % xylénu. Po krátkém zvortexování a zcentrifugování byl vzorek zahřát na termobloku 3 min při 50 °C, aby se rozpustil parafín. Poté byl vzorek zcentrifugován 2 min při 20 000 rpm při pokojové teplotě (RT). Následně byl odstraněn xylén a přidán 1 ml 100 % ethanolu o RT. Obsah zkumavky byl zvortexován a zcentrifugován 2 min při 20 000 rpm při RT. Ethanol byl odstraněn a znovu přidán 1 ml 100 % ethanolu. Následně byl obsah zkumavky zvortexován a zcentrifugován 2 min při 20 000 rpm při RT. Ethanol byl opět odstraněn. Deparafinovaná a odvodněná tkáň se nechala 15-45 min vyschnout při RT a poté k ní bylo přidáno 200 µl štěpícího pufru a 4 µl proteázy. Vzorek byl inkubován v termobloku nejprve 30 min při 50 °C a následně 15 min při 80 °C.

K naštěpenému vzorku tkáně byl přidán master mix obsahující 240 µl izolačního aditiva a 550 µl 100 % ethanolu a pipetováním byl promíchán. Do sběrné zkumavky byla vložena kolonka s filtrem, kde bylo napipetováno 700 µl vzorku. Následně proběhla centrifugace při 10 000 rpm, RT a po dobu 30 s. Objem, který prošel přes kolonku, byl odstraněn, kolonka byla opět vložena do zkumavky a napipetován zbytek vzorku. Poté opět centrifugace při 10 000 rpm, RT a po dobu 30 s a objem, který prošel přes kolonku, byl odpipetován. Na stejnou kolonku bylo napipetováno 700 µl promývacího pufru Wash 1 a objem zkumavky byl zcentrifugován 30 s při 10 000 rpm a RT. Objem, který prošel přes kolonku, byl odpipetován. Opět bylo na stejnou kolonku nanášeno 500 µl promývacího pufru Wash 2/3, centrifugace 30 s při 10 000 rpm a RT a objem, který prošel, byl odstraněn. Poté ještě centrifugace 30 s, aby byla z kolonky odstraněna veškerá tekutina.

Do středu filtru byl napipetován připravený master mix s DNázou obsahující 50 µl nuclease-free water, 6 µl 10x DNase pufru a 4 µl DNase. Zkumavky se nechaly inkubovat 30 min při RT. Poté bylo na filtr nanášeno 700 µl promývacího roztoku Wash 1 a zkumavka se nechala inkubovat 30-60 s při RT a následně se zcentrifugovala 30 s při 10 000 rpm. Objem, který prošel přes kolonku, byl odpipetován. Opět na stejnou kolonku bylo nanášeno 500 µl promývacího pufru Wash 2/3, centrifugace 30 s

při 10 000 rpm a RT a objem, který prošel, byl odstraněn. Poté ještě centrifugace zkumavky s filtrem 1 min při 10 000 rpm, aby byl odstraněn zbytek tekutiny. Filtr byl přenesen do nové zkumavky a na něho bylo nanášeno 60  $\mu$ l elučního roztoku o RT do středu filtru. Po inkubaci po dobu 1 min při RT proběhla centrifugace při maximálních otáčkách (20 000 rpm). Kolonka byla následně odstraněna a na dně zkumavky byl již eluát celkové RNA.

#### **4.2.4 Stanovení koncentrace RNA**

Koncentrace vyizolované RNA byla změřena spektrofotometriky na Nanodropu ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). Jako blank byl využit 1  $\mu$ l elučního roztoku. Pro vlastní měření byl použit 1  $\mu$ l eluátu získaný izolací. Kvalita vyizolované RNA byla zhodnocena dle hodnot poměrů absorbance při vlnových délkách 260/280 a 260/230. Poměr vlnových délek 260/280 by se měl ideálně pohybovat v rozmezí 1,8-2,0. Jednotlivé koncentrace RNA jsou uvedeny v tabulce níže (Příloha č.1).

#### **4.2.5 Reverzní transkripce (RT)**

V tomto kroku dochází k přepisu molekul RNA do DNA, konkrétně k získání molekuly cDNA (komplementární DNA). Reakce je katalyzována enzymem reverzní transkriptáza. RT byla provedena pomocí TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kitu (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

V první řadě bylo potřeba napoolovat RT primery a to smícháním vždy stejného objemu primerů (miR-34a, miR-200b, miR-200c a miR-RNU6B). Dalším krokem byla příprava master mixu, a to smícháním následujících komponent: nuclease-free water DEPC, 10x Reverse Transcription Buffer, 100 mM dNTPs, MultiScribe™ Reverse Transcriptase a RNase Inhibitor (Tab. V). Odpovídající objem všech složek pro příslušný počet vzorků byl napipetován do zkumavky, zvortexován a centrifugován, a následně rozpipetován po 7  $\mu$ l do jednotlivých PCR mikrozkuvek. Do těchto zkuvek bylo poté přidáno 5  $\mu$ l vzorku RNA o celkové koncentraci 2 ng/ $\mu$ l (naředěno dle Přílohy č. 1) a 3  $\mu$ l napoolovaných RT primerů. Celá směs byla krátce

zvortexována, zcentrifugována a vložena do termocykléru, kde proběhla reverzní transkripce (Tab. VI).

Tab. V: Složení master mixu

<b>Chemikálie</b>	<b>Objem pro 1 reakci [<math>\mu</math>l]</b>
Nuclease-free water DEPC	4,16
10x Reverse Transcription Buffer	1,50
100 nM dNTPs	0,15
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/ $\mu$ l	1,00
RNase Inhibitor, 20 U/ $\mu$ l	0,19

Tab. VI: Cyklizační schéma pro reverzní transkripci

	<b>Teplota [<math>^{\circ}</math>C]</b>	<b>Čas [min]</b>
1.krok	16	30
2.krok	42	30
3.krok	85	5
Chlazení	4	$\infty$

#### 4.2.6 Preamplifikace s napoolovanými miRNA assays

Jelikož miRNA představují jen malou část z celkové RNA, byl pro zvýšení senzitivity zařazen krok preamplifikace. K preamplifikaci byl použit TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Nejdříve byly napoolované miRNA assays TaqMan sondy, a to smícháním stejného objemu všech miRNA assay sond (miR-34a, miR-200b, miR-200c a miR-RNU6B) do požadovaného objemu doplněného nuclease-free water DEPC 100x. Reakční směs obsahovala napoolované miRNA assay, TaqMan® PreAmp Master Mix a jednotlivé vzorky cDNA (Tab. VII). PCR zkumavky byly zvortexovány, zcentrifugovány a vloženy do termocykléru, kde proběhla preamplifikace (Tab. VIII).

Tab. VII: Složení mixu pro preamplifikaci

Chemikálie	Objem pro 1 reakci [ $\mu$ l]
TaqMan® PreAmp Master Mix (2x)	12,5
Napoolované TaqMan® MicroRNA Assays	6,25
cDNA (RT produkt)	6,25

Tab. VIII: Cyklizační schéma pro preamplifikaci

	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10 min	
Denaturace	95	15 s	14
Annealing + elongace	60	4 min	
Chlazení	4	$\infty$	

#### 4.2.7 Real-time PCR s preamplifikovanými vzorky

Real-time PCR umožnila detekci a kvantifikaci specifického úseku nukleové kyseliny. Byl sledován průběh PCR přímo během reakce pomocí fluorescenční sondy (v mém případě TaqMan sondy), která detekovala množství PCR produktu. K real-time PCR byl použit kit TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG, (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Směs pro PCR byla složena z TaqMan® Universal PCR Master Mixu, nuclease-free water DEPC, příslušné TaqMan® MicroRNA Assays a PCR produktu získaného při preamplifikaci (Tab. IX). PCR produkt bylo třeba nejdříve naředit 1:20 DEPC vodou. Směs v mikrozkuvkách byla krátce zvortexována, zcentrifugována a v triplicátech rozpipetována po 10  $\mu$ l do 96-jamkové PCR reakční destičky. Destička byla utěsněna fólií, zcentrifugována a vložena do přístroje LightCycler 480®, kde proběhla real-time PCR (Tab. X).



Tab. IX: Složení mixu pro real-time PCR

Chemikálie	Objem pro 1 reakci [ $\mu$ l]
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)	15
Nuclease-free water DEPC	6
TaqMan® MicroRNA Assay	1,5
PCR produkt	7,5

Tab. X: Cyklizační schéma pro real-time PCR

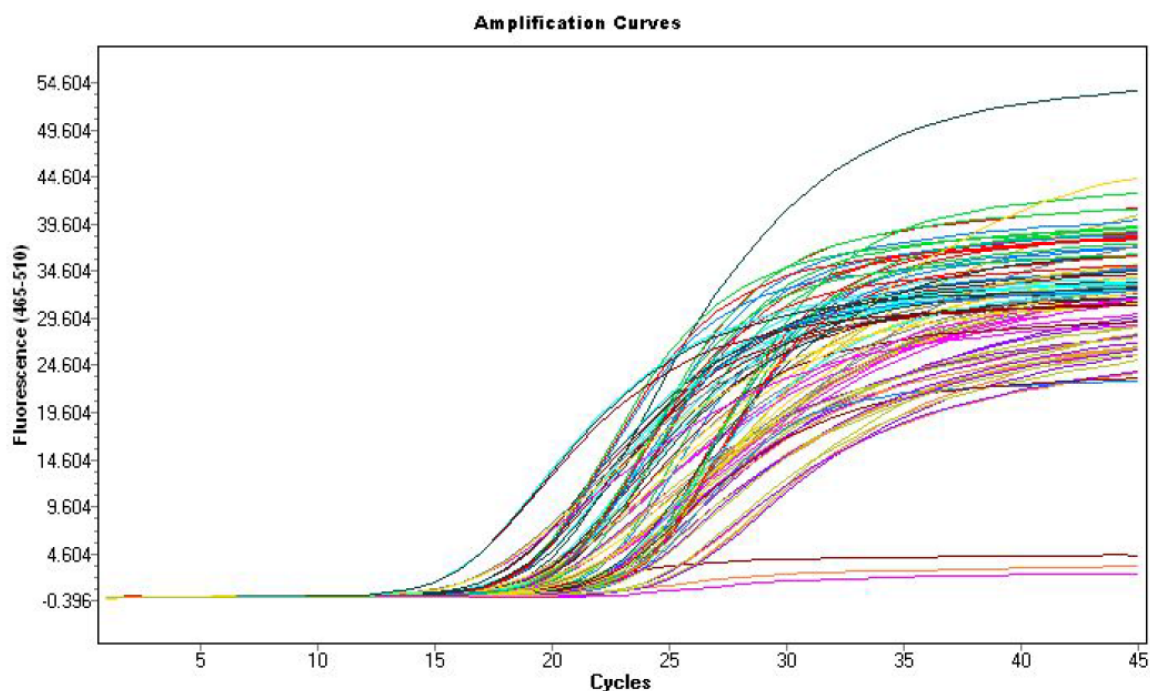
	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10 min	
Denaturace	95	15 s	40
Annealing + elongace	60	1 min	
Chlazení	4	$\infty$	

#### 4.2.8 Zpracování výsledků

Dle hodnot získaných pomocí Light cycler 480<sup>®</sup> softvéru byla následně vypočítána relativní kvantifikace v porovnání s mixem nenádorových, komerčně dostupných celkových RNA Human Lung Total RNAs (AM7968, Lot. 0904002 and 1203010, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a Total RNAs, Lung, Human (540019, Lot. 0006051745 and 0006079356, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (kontrola,  $K_{mix}$ ). Jako endogenní kontrola byla použita malá jaderná RNA U6B (RNU6B). Relativní kvantifikace byla vypočítána pomocí metody  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , dle vzorce:  $2^{-(\Delta ct \text{ vzorku} - \Delta ct \text{ kontroly})}$ , přičemž  $\Delta ct = ct \text{ cílové miRNA} - ct \text{ endogenní kontroly}$ . Bylo určeno zastoupení vzorek pacientů se zvýšenou a sníženou hladinou testovaných miRNA v porovnání s nenádorovou komerční RNA. Z důvodu malého a velice heterogenního souboru pacientů výsledky nebyly podrobeny statistické analýze.

## 5. Výsledky

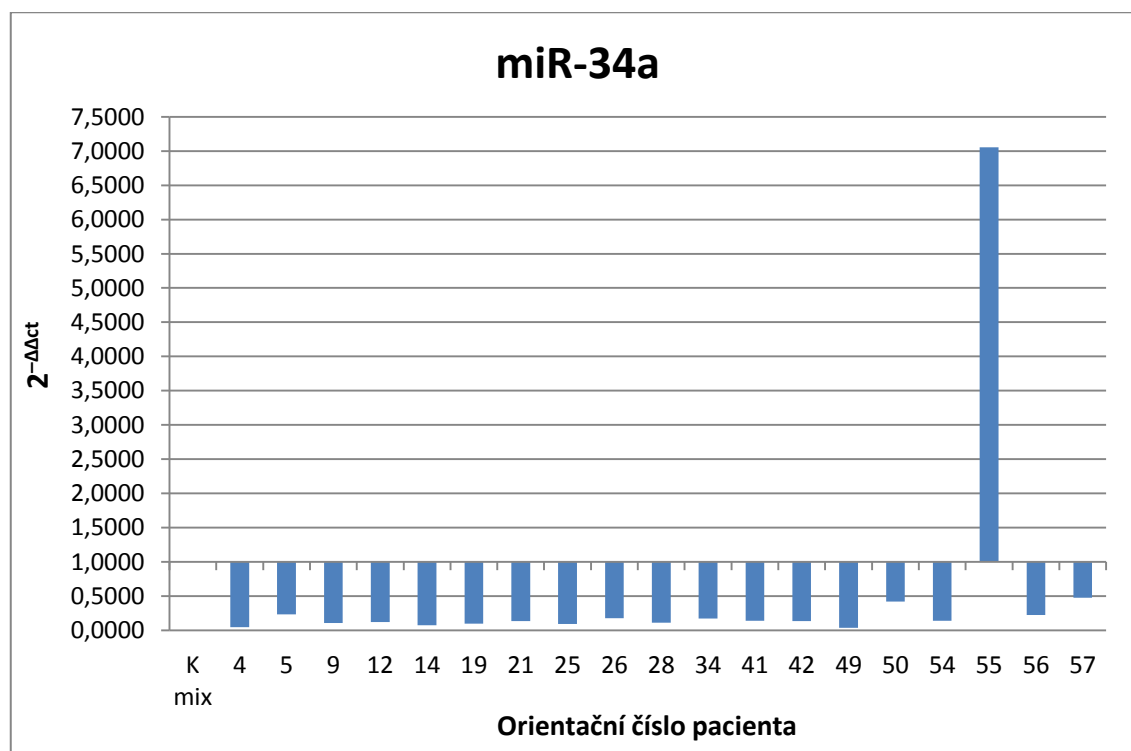
Z 20 vzorků pacientů byla pomocí RecoverAll™ Total nucleic acid isolation kitu (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) z parafinových bločků vyizolována celková RNA. Následně byla na Nanodropu ND-1000 změřena čistota a koncentrace. Koncentrace RNA spolu s ředěním pro reverzní transkripci je uvedena v příloze č. 1. Pomocí TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kitu (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) proběhla reverzní transkripce a tak získaná cDNA byla preamplifikována kitem TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Po naředění 1:20 byl preamplifikovaný PCR produkt použit pro kvantifikaci vybraných miRNA pomocí real-time PCR systému Light cycler 480® a Taq-Man sond. Ukázka výstupu z Lightcycler 480® softvéru je na Obr. 7. Kompletní výsledky z real-time PCR jsou uvedeny v příloze (Příloha č. 2).



**Obr. 7 :** Ukázka výsledných amplifikačních křivek pro jednotlivé vzorky a příslušné sondy. Jde o závislost míry fluorescence v jednotlivých cyklech na vstupním množství sledované miRNA.

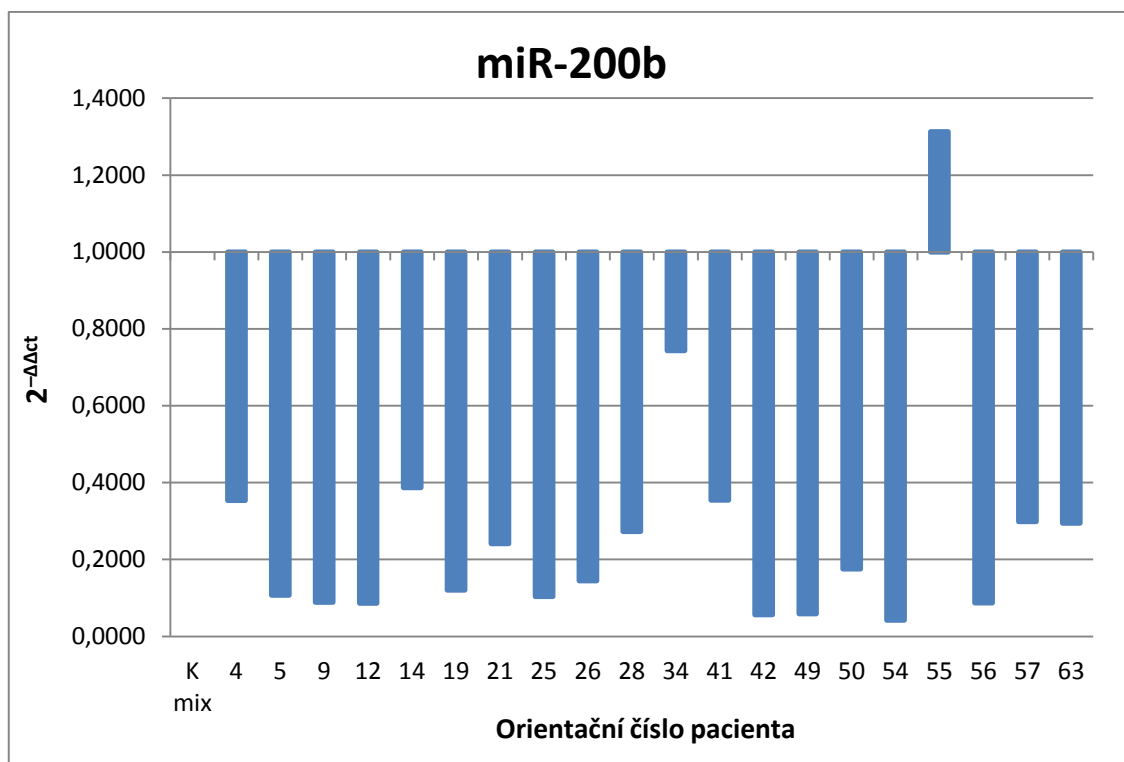
Pomocí hodnot získaných z Light cycler 480<sup>®</sup> softvéru byly vzorky relativně kvantifikovány dle metody  $2^{-\Delta\Delta ct}$  a to podle vzorce  $2^{-(\Delta ct \text{ vzorku} - \Delta ct \text{ kontroly})}$ , přičemž  $\Delta ct = ct \text{ cílové miRNA} - ct \text{ endogenní kontroly}$ . Hladiny vybraných miRNA v nádorových tkáních pacientů (vzorky) byly porovnávány s jejich hladinami v celkových, komerčně dostupných nenádorových RNA Human Lung Total RNAs (AM7968, Applied Biosystems) a Total RNAs, Lung, Human (540019, Agilent Technologies) (kontrola). Jako endogenní kontrola byla použita malá jaderná RNA U6B (RNU6B).

Výsledky výše uvedených výpočtů pro miR-34a, miR-200b a miR-200c u všech 20 pacientů s NSCLC byly zpracovány do grafů (Graf 1-3). Osa x protíná osu y v bodě 1, který představuje  $2^{-\Delta\Delta ct}$  kontroly. Hodnoty nad 1 znamenají zvýšenou expresi a naopak, + hodnoty nižší než 1 představují sníženou expresi sledované miRNA ve vzorcích pacientů.



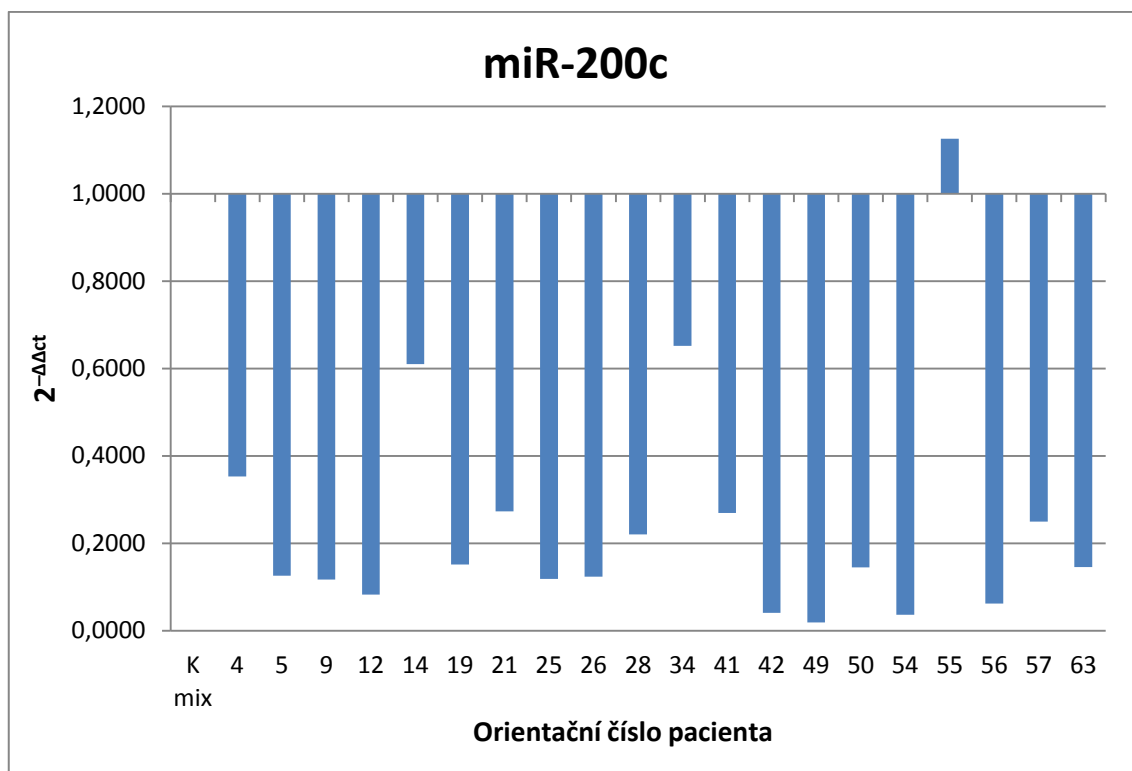
**Graf 1. : Relativní hladiny exprese miR-34a u všech pacientů s NSCLC.**

Z celkového počtu 20 pacientů se u jednoho vyskytla 7 x zvýšená exprese miR-34a vůči kontrole.  $K_{mix}$ -kontrola



**Graf 2. : Relativní hladiny exprese miR-200b u všech pacientů s NSCLC.**

Z celkového počtu 20 pacientů se u jednoho vyskytla mírně zvýšená exprese miR-200b vůči kontrole. K<sub>mix</sub>-kontrola



**Graf 3. : Relativní hladiny exprese miR-200c u všech pacientů s NSCLC.**

Z celkového počtu 20 pacientů se u jednoho vyskytla mírně zvýšená exprese miR-200c vůči kontrole. K<sub>mix</sub>-kontrola

Na základě výsledků bylo tedy zjištěno, že exprese miR-34a byla u 1 pacienta 7x zvýšena oproti kontrolní nenádorové RNA, což představuje 0,2 %. Snížená exprese miR-34a byla detekována u 19 pacientů, což představuje 99,8 %.

Zvýšená exprese miR-200b byla u 1 pacienta, což je 0,2 %. Naopak snížená exprese se projevila u zbylých 19 pacientů, což je 99,8 %.

Stejně tak, zvýšená exprese miR-200c byla naměřena u 1 pacienta, což představuje 0,2 %. Snížená exprese miR-200c byla detekována u 19 pacientů, což představuje 99,8 %.

Hladina exprese všech vyšetřovaných mikroRNA byla zvýšená u jediného pacienta-ve vzorku č. 55.

## 6. Diskuze

RNAi se v posledních letech hojně využívá při studiu genové exprese. Cílem této práce bylo zjistit hladiny genové exprese u vybraných mikroRNA- miR-34a, miR-200b a miR-200c s ohledem na výskyt metastáz u pacientů s karcinomy plic a následně získané výsledky porovnat s dostupnou literaturou. U 20 pacientů byla provedena relativní kvantifikace vybraných mikroRNA. Tato relativní kvantita byla hodnocena oproti nenádorovým RNA, sloužících jako kontrola (Human Lung Total RNAs a Total RNAs, Lung, Human). Soubor pacientů byl vybrán cíleně, jelikož jsme chtěli ověřit, zda námi zvolené miRNA fungují jako markery metastázování, jak uvádí dostupná literatura. Naše získané výsledky však tuto hypotézu nepotvrzují.

V případě miR-34a byla hladina její exprese oproti kontrole u 1 pacienta zvýšena (0,2 %) a u 19 pacientů snížena (99,8 %). Exprese miR-34a bývá na základě literatury deregulována u pacientů s metastázemi. Inhibuje translaci SNAIL 1, represoru E-kadherinu, a tedy induktoru EMT, čímž sehrává významnou roli v utlumování metastatické kaskády (Brabletz, 2012; Siemens *et al.*, 2011). Zvýšená exprese miR-34a bývá pozorována u pacientů s chronickou B lymfatickou leukémií (B-CLL) (Zenz *et al.*, 2009) a indikuje pozitivní prognózu. Naopak snížená hladina exprese této miRNA značí špatnou prognózu. Snížená exprese miR-34a byla popsána např. u pacientů s karcinomem prsu, kolorektálním karcinomem nebo u neuroblastomu (Lodygin *et al.*, 2008; Welch *et al.*, 2007). Naše výsledky ukazují, že exprese miR-34a bývá u většiny pacientů s NSCLC snížena, což může podtrhávat metastatický potenciál tohoto nádorového onemocnění. Jediný pacient, u kterého byla exprese miR-34a zvýšena, se od ostatních odlišoval klinickým průběhem onemocnění. V době stanovení diagnózy v r. 2000 měl onemocnění rozvinuto do stádia IV (se vzdálenými metastázemi), ale i přesto, jako jediný pacient ze skupiny pacientů se stádiem IV, přežil sledované období (do r. 2012). Zbylí pacienti z této skupiny umřeli velice záhy od diagnostikování onemocnění. Na základě tohoto pozorování můžeme tedy souhlasit s literaturou, která tvrdí, že zvýšená exprese miR-34a u pacientů s NSCLC má pozitivní prognostický význam (Gallardo *et al.*, 2009).

Hladiny exprese miR-200b a miR-200c byly mírně zvýšeny u 1 pacienta (0,2 %) a u zbylých 19 byly sníženy (99,8 %). Jednalo se o stejného pacienta, u kterého byla též

zaznamenána zvýšená hladina miR-34a. V dostupné literatuře je uváděna spojitost rodiny miR-200 s metastázemi (Brabletz, 2012; Siemens *et al.*, 2011). Členové rodiny miR-200 regulují některé procesy metastázování, jako jsou EMT a invaze nádorových buněk díky potlačení exprese ZEB 1 a ZEB 2. ZEB 1/2 jsou klíčové transkripční faktory, zodpovědné za represi E-kadherinu, čímž přispívají ke spuštění metastatické kaskády přes aktivaci EMT (Pacurari *et al.*, 2013). Zvýšená exprese členů rodiny miR-200 spojená s vysokými hladinami E-kadherinu byla pozorována u karcinomu ovaria a u kolorektálního karcinomu (Wyman *et al.*, 2009; Xi *et al.*, 2006). Naopak, snížená exprese rodiny miR-200 a inhibice E-kadherinu byla detekována např. u hepatocelulárního karcinomu (Ceppi *et al.*, 2010). Rodina miR-200 se tedy, i na základě našich výsledků jeví jako skupina tumor-supresorů, které jsou zodpovědné za represi onkogenů, a jejichž hladina exprese bývá v nádorových buňkách až několikrát snížena (Zhang *et al.*, 2007).

Dle původní hypotézy navržené podle literatury by měly exprese u námi vybraných miRNA být zvýšeny u pacientů bez rozvinutých metastáz, a sníženy u pacientů s metastázemi. Toto se nám ovšem nepotvrdilo. Může to být způsobeno tím, že exprese miRNA je tkáňově specifická a díky schopnosti řídit expresi mnoha genů tak tyto miRNA v jednotlivých tkáních mohou sehrávat odlišnou úlohu. A i když jsme neprokázali přímý vztah námi vybranými miRNA-miR-34a, miR-200b a miR-200c s metastázemi, ukázalo se, že miR-34a se jeví jako vhodný prognostický marker, a že rodina miR-200 vykazuje pravděpodobně charakter tumor-supresorů.

Dalšími možnými příčinami našich neshodných výsledků s literaturou by mohlo být, že materiál nebyl odebraný z nejvhodnějšího místa nádoru a mohlo se tak jednat o nekrotickou část anebo, ačkoliv by miRNA v parafinových bločcích měly být stabilní, mohly být výsledky ovlivněny i stářím tkáně.

Prognostický význam námi testovaných miRNA je však nutné ověřit na větším souboru pacientů. Zároveň, na základě získaných výsledků, nedoporučujeme sledovat hladiny miR-34a, miR-200b ani miR-200c ve vztahu k metastázám, ale navrhuje se k tomuto účelu najít jiné, vhodnější miRNA, které by byly schopny specifitěji detekovat změny vedoucí k tvorbě metastáz.

## 7. Závěr

Karcinom plic patří mezi nejčastější nádorové onemocnění v České republice. K jeho léčbě se používá radioterapie, chemoterapie a biologická (cílená léčba). V posledních letech se začaly aktivně zkoumat i další možnosti léčby a jednou z nich je RNA interference, která specificky reguluje genovou expresi. Využívá k tomu malé RNA (miRNA, sno-RNA, pi-RNA atd.), které se podílejí na zabránění translace cílené mRNA.

Pro experimentální část jsem si vybrala miR-34a, miR-200b a miR-200c. Tyto miRNA byly vybrány na základě literatury a jejich předpokládaného vztahu k metastázám. Relativně jsem kvantifikovala hladinu jejich exprese u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic.

Z celkového souboru 20 pacientů byla exprese miR-34a zvýšena u 1 pacienta. Nepotvrdilo se tedy, že miR-34a souvisí s metastázemi jako u jiných nádorů (např. karcinomu prsu). Naproti tomu se však ukázalo, že miR-34a by mohla fungovat u metastatických pacientů jako pozitivní prognostický marker.

Expresí miR-200b byla mírně zvýšena u 1 pacienta z celého souboru a stejně tak i hladina exprese miR-200c byla mírně zvýšena pouze u jednoho pacienta. Obě tyto miRNA tedy v nádorech NSCLC vykazují více charakter tumor-supresorů než markerů metastázování.



## 8. Literatura

**Adams, J. C.** (2001): Cell-matrix contact structures. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58(3): 371–92.

**Al Husaini, H., Wheatley-Price, P., Clemons, M., Shepherd, F.A.** (2009): Prevention and Management of Bone Metastases in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 4(2): 251-259

**Alvarez-Garcia, I., Miska, E.A.** (2005): MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 132(21): 4653–4662

**Ambros, V.** (2004): The functions of animal microRNAs. *Nature* 431(7006): 350–355

**Balgkouranidou, I., Liloglou, T., Lianidou, E.S.,** (2013): Lung cancer epigenetics: emerging biomarkers. *Biomarkers in Medicine* 7(1): 49-58

**Bartel, D.P.** (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2): 281-97

**Bendoraitė, A., Knouf, E.C., Garg, K.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., O'Briant, K.C., Ventura, A.P., Godwin, A.K., Karlan, B.Y., Drescher, C.W., Urban, N., Knudsen, B.S., Tewari, M.** (2010): Regulation of miR-200 family microRNAs and ZEB transcription factors in ovarian cancer: Evidence supporting a mesothelial-to-epithelial transition. *Gynecologic Oncology* 116(1): 117–25

**Benjamin, L.E., Hemo, I., Keshet, E.** (1998): A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125(9): 1591–8

**Birchmeier, W., Behrens, J.** (1994): Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochimica et Biophysica Acta* 1198(1): 11–26

**Bommer, G.T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A.J., Kuick, R., Love, R.E., Zhai, Y., Giordano, T.J., Qin, Z.S., Moore, B.B., MacDougald, O.A., Cho, K.R., Fearon, E.R. (2007):** P53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Current Biology* 17(15): 1298–1307

**Brabletz, T. (2012):** To differentiate or not-routes towards metastasis. *Nature Reviews Cancer* 12(6): 425-36

**Brychtová, S., Holbiková, A. (2008):** Histopatologický atlas. Grada publishing, Praha, 112 s

**Caldas, C., Brenton, J.D. (2005):** Sizing up miRNAs as cancer genes. *Nature Medicine* 11(7): 712-4

**Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., Iuliano, R., Palumbo, T., Pichiorri, F., Roldo, C., Garzon, R., Sevignani, C., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., Croce, C.M. (2005):** A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 353(17): 1793-801

**Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. and Croce, C.M. (2004):** Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101(9): 2999-3004

**Cameron, M.D., Schmidt, E.E, Kerkvliet, N., Nadkarni, K.V., Morris, V.L., Groom, A.C., Chambers, A.F., MacDonald, I.C. (2000):** Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Research* 60(9): 2541–6

**Ceppi, P., Mudduluru, G., Kumarswamy, R., Rapa, I., Scagliotti, G.V., Papotti, M., Allgayer, H. (2010):** Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive,

and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer Research* 8(9): 1207-16

**Ciomperlik, J.J., Omarov, R.T., Scholthof, H.B.** (2011): An antiviral RISC isolated from Tobacco rattle virus-infected plants. *Virology* 412(1): 117-24

**Cochrane, D.R., Spoelstra, N.S., Howe, E.N., Nordeen, S.K., Richer, J.K.** (2009): MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents. *Molecular Cancer Therapeutics* 8(5): 1055-66

**Čoupková, H.** (2009) : Nemalobuněčný bronchogenní karcinom. *Diagnosticko-léčebné protokoly Masarykova onkologického ústavu*, 11s

**Dugdale, D. C., Chen, Y. B., Zieve, D.** (2012): Liver metastases. *MedlinePlus Medical Encyclopedia*

**Ender, C., Meister, G.** (2010): Argonaute proteins at a glance. *Journal of Cell Science* 2010;123:1819–23

**Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C.** (1998): Potent and specific genetic interference by double-strandedRNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806-11

**Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., Bartel, D.P.** (2009): Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* 19(1): 92-105

**Gallardo, E., Navarro, A., Viñolas, N., Marrades, R.M., Diaz, T., Gel, B., Quera, A., Bandres, E., Garcia-Foncillas, J., Ramirez, J., Monzo, M.** (2009): miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* 30(11): 1903-9

**Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., Shiekhattar R.** (2004): The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432(7014): 235-40

**Grinberg-Rashi, H., Ofek, E., Perelman, M. Skarda, J., Yaron, P., Hajdúch, M., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Krupsky, M., Simansky, D.A., Ram, Z., Pfeffer, R., Galernter, I., Steinberg, D.M., Ben-Dov, I., Rechavi, G., Izraeli, S.** (2009): The expression of three genes in primary non-small cell lung is associated with metastatic spread to the brain. *Clinical cancer research* 15(5): 1755-61

**Guo, N.L., Wan, Y.W., Tosun, K., Lin, H., Msiska, Z., Flynn, D.C., Remick, S.C., Vallyathan, V., Dowlati, A., Shi, X., Castranova, V., Beer, D.G., Qian, Y.** (2008): Confirmation of gene expression-based prediction of survival in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 14(24): 8213-20

**Guo, W., Giancotti, F.G.** (2004): Integrin signalling during tumour progression. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5(10): 816-26

**He, L., He, X., Lim, L. P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A.L., Linsley, P.S., Chen, C., Lowe, S.W., Cleary, M.A., Hannon, G.J.** (2007): A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447(7148):1130-4

**Hirano, Y., Oda, M., Tsunozuka, Y., Ishikawa, N., Watanabe, G.** (2005): Long-term survival cases of lung cancer presented as solitary bone metastasis. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 11(6): 401-404

**Hirohashi, S.** (1998): Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *American Journal of Pathology* 153(2): 333–9

**Hockel, M., Vaupel, P.** (2001): Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute* 93(4): 266–76

**Hurteau, G. J., Carlson, J. A., Spivack, S. D., Brock, G. J.** (2007): Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer Research* 67(17):7972-6

**Chambers, A. F., Naumov, G.N., Varghese, H.J., Nadkarni, K.V., MacDonald, I.C., Groom, A.C.** (2001): Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surgical Oncology Clinics of North America* 10(2): 243–255

**Chambers, A.F., Matrisian, L.** (1997): Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* 89: 1260–70

**Chan, E., Prado, D.E., Weidhaas, J.B.** (2011): Cancer microRNAs: from subtype profiling to predictors or response to therapy. *Trends in Molecular Medicine* 17(5): 235-43

**Chang, T. C., Wentzel, E. A., Kent, O. A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K.H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C.J., Arking, D.E., Beer, M.A., Maitra, A., Mendell, J.T.** (2007): Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular Cell* 26(5):745-52

**Cheng, A. M., Byrom, M. W., Shelton, J., Ford, L. P.** (2005): Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Research* 33(4): 1290

**Chi, A., Komak, R.** (2010): Treatment of Brain Metastasis from Lung Cancer. *Cancers* 2(4): 2100-37

**Jansson, M.D., Lund, A.H.** (2012): MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology* 6(6): 590-610

**Jorgensen, R.** (1990): Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends in Biotechnology* 8(12): 340-4

- Jurmeister, S., Baumann, M., Balwierz, A., Keklikoglou, I., Ward, A., Uhlmann, S., Zhang, J.D., Wiemann, S., zğür Sahin, Ö. (2012):** MicroRNA-200c represses migration and invasion of breast cancer cells by targeting actin-regulatory proteins FHOD1 and PPM1F. *Molecular and Cell Biology* 32(3): 633-51
- Kahari, V.M., Saarialho-Kere, U. (1999):** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Annals of Medicine* 31(1): 34–45.
- Kent, O. A., Mendell, J. T. A (2006):** Small piece in the cancer puzzle: microRNA as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 25(46): 6188-96
- Kim, V.N., Nam, J.W. (2006):** Genomics of microRNA. *Trends in Genetics* 22(3): 165-73
- Kleiner, D.E., Stetler-Stevenson, W.G. (1999):** Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 43 Suppl: 42–51
- Kontrová, K., Škop, V., Sajdok, J., Zídková, J. (2009):** RNA interference a praktické aspekty jeho využití. *Chemické Listy* 103( 4): 302-9
- Landi, M.T., Zhao, Y., Rotunno, M., Koshiol, J., Liu, H., Bergen, A.W., Rubagotti, M., Goldstein, A.M., Linnoila, I., Marincola, F.M., Tucker, M.A., Bertazzi, P.A., Pesatori, A.C., Caporaso, N.E., McShane, L.M., Wang, E. (2010):** MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clinical Cancer Research* 16(2):430-41
- Langer, C., Hirsh, V. (2010):** Skeletal morbidity in lung cancer patients with bone metastases: demonstrating the need for early diagnosis and treatment with bisphosphonates. *Lung Cancer* 67(1): 4-11
- 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(5): 843-854

- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., Kim, V.N.** (2003): The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425(6956): 415-9
- Li, B., Yu, J., Suntharalingam, M., Kennedy, A.S., Amin, P.P., Chen, Z., Yin, R., Guo, S., Han, T., Wang, Y., Yu, N., Song, G., Wang, L.** (2000): Comparison of three treatment options for single brain metastasis from lung cancer. *International Journal of Cancer* 90(1): 37-45
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., Johnson, J.M.** (2005): Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433(7027): 769-77
- Lodygin, D., Tarasov, V., Epanchintsev, A., Berking, C., Knyazeva, T., Körner, H., Knyazev, P., Diebold, J., Hermeking, H.** (2008): Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* 7(16): 2591–2600
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., Golub, T. R.** (2005): MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435(7043): 834-8
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U.** (2004): Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303(5654): 95-8.
- Luzzi, K. J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F., Groom, A.C.** (1998): Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *American Journal of Pathology* 153(3): 865–873
- Mačák, J., Mačáková, J.** (2004): Patologie. Grada Publishing, Praha, 347 s

**Maniataki, E., Mourelatos, Z.** (2005): A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & Development* 19(24): 2979-90

**Marel, M.** (2012): Vývojové trendy a léčba nemalobuněčného plicního karcinomu. *Postgraduální medicína* 14(9): 989-98

**Markou, A., Tsaroucha, E.G., Kaklamanis, L., Fotinou, M., Georgoulis, V., Lianidou, E.S.** (2008): Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clinical Chemistry* 54(10):1696-704

**Meng, F., Henson, R., Lang, M., Wehbe, H., Maheshwari, S., Mendell, J.T., Jiang, J., Schmittgen, T.D., Patel, T.** (2006): Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 130(7): 2113-29, 2006.

**Mozzoni, P., Banda, I., Goldoni, M., Corradi M., Tiseo M., Acampa, O., Balestra, V., Ampollini, L., Casalini, A., Carbognani, P., Mutti, A.** (2013): Plasma and EBC microRNAs as early biomarkers of non-small cell lung cancer. *Biomarkers* 18 (8): 679-86

**Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K., Urashima, T., Toyoda, H., Okanoue, T., Shimotohno, K.** (2006): Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 25(17): 2537-45

**Nackaerts, K., Harper, P.G., Manegold, C., Ettinger, D.S., Kosmidis, P., Langer, C.J.** (2008): Management of bone metastases from lung cancer: Consensus recommendations from an international panel. *Journal of Clinical Oncology* 26(15): 19080

**Nagashima, A., Abe, Y., Yamada, S., Nakagawa, M., Yoshimatsu, T.** (2004): Long term survival after surgical resection of liver metastasis from lung cancer. *The Japanese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 52(6): 311-3



**Nakajima, M., Chop, A.M.** (1991): Tumor invasion and extracellular matrix degradative enzymes: regulation of activity by organ factors. *Seminars in Cancer Biology* 2(2):178–96

**O'Day, E., Lal, A.** (2010): MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Research* 12(2): 201

**Olena, A.F., Patton, J.G.** (2010): Genomic organization of microRNAs. *Journal of Cellular Physiology* 222(3): 540-5

**Pacurari, M., Addison, J.B., Bondalapati, N., Wan, Y.W., Luo, D., Qian, Y., Castranova, V., Ivanov, A.V., Guo, N.L.** (2013): The microRNA-200 family targets multiple non-small cell lung cancer prognostic markers in H1299 cells and BEAS-2B cells. *International Journal of Oncology* 43(2): 548-60

**Panes, J., Granger, D. N.** (1998): Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 114(5): 1066–90

**Papetti, M., Herman I.M.** (2002): Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 282(5): 947-70

**Perez-Moreno, M., Jamora, C., Fuchs, E.** (2003): Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 112 (4): 535–548

**Petruželka L., Konopásek B.** (2003): Klinická onkologie. Karolinum, Praha, 274s

**Petruželka L., Zatloukal P.** (2001): Karcinom plic. Grada Publishing, Praha, 400 s

**Povýšil, C., Šteiner, I., Horáček, J., Kodet, R., Kolář, Z., Ludvíková, M., Lukáš, Z., Mrhalová, M., Povýšilová, V., Tichý, M.** (2011): Obecná patologie. Praha : Galén, 290 s

**Pupa, S.M., Menard, S., Forti, S., Tagliabue, E.** (2002): New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *Journal of Cellular Physiology*; 192(3): 259–67

**Quint, L.E., Tummala, S., Brisson, L.J., Francis, I.R., Krupnick, A.S., Kazerooni, E.A., Iannettoni, M.D., Whyte, R.I., Orringer, M.B.** (1996): Distribution of distant metastases from newly diagnosed non-small cell lung cancer. *The Annals of thoracic surgery* 62(1): 246-50

**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(6772):901-6.

**Ricciardi, S., de Marinis, F.** (2010): Multimodality management of non-small cell lung cancer patients with brain metastases. *Current Opinion in Oncology* 22(2): 86-93

**Shimono, Y., Zabala, M., Cho, R.W., Lobo, N., Dalerba, P., Qian, D., Diehn, M., Liu, H., Panula, S.P., Chiao, E., Dirbas, F.M., Somlo, G., Pera, R.A., Lao, K., Clarke, M.F.** (2009): Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 138(3): 592-603

**Schetter A.J., Leung S.Y., Sohn J.J., Zanetti, K.A., Bowman, E.D., Yanaihara, N., Yuen, S.T., Chan, T.L., Kwong, D.L., Au, G.K., Liu, C.G., Calin, G.A., Croce, C.M., Harris, C.C.** (2008): MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma *The Journal of the American Medical Association* 299(4): 425-36

**Schwartz, M. A.** (2001): Integrin signaling revisited. *Trends in Cell Biology* 11(12): 466–70

**Siemens, H., Jackstadt, R., Hünten, S., Kaller, M., Menssen, A., Götz, U., Hermeking, H.** (2011): miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell cycle* 10(24): 4256-71

**Skříčková J.** (2014): Léčba karcinomu plic. *Postgraduální medicína* 16(2): 152-158

**Skříčková, J.** (2011): Nádory plic a průdušek. Solen, Olomouc, 26 s

**Skříčková, J., Čoupek, P., Babičková, L., Tomášková, M., Kaplanová, J., Princ, D., Kadlec, B., Špelda, S.** (2008a): Léčebné postupy u nemalobuněčného karcinomu plic. *Klinická onkologie* 21(6): 317- 29

**Skříčková, J., Tomášková, M., Babičková, L., Kaplanová, J.** (2008b): Diagnostika a léčba karcinomu plic ve stáří. *Česká Geriatrická Revue* 6(1): 20-30

**Slabý, O., Svoboda, M., Bešše, A., Bienertová Vašků, J., Černá, K., Doležalová, D., Dostálová Merkerová, M., Ehrmann, J., Faltejsková, P., Hájek, R., Hájková, J., Juráček, J., Krejčík, Z., Kubiczková, L., Kulda, V., Lakomý, R., Lužná, P., Machová Poláková, K., Mayer, J., Mayerová, V., Mráz, M., Musilová, K., Pešta, M., Poprach, A., Pospíšilová, Š., Rádová, M., Šána, J., Ševčíková, S., Štěrba, J., Votavová, H., Vyzula, R.** (2012): MikroRNA v onkologii. Galén, Praha, 324 s

**Sugiura, H., Yamada, K., Sugiura, T., Hida, T., Mitsudomi, T.** (2008): Predictors of survival in patients with bone metastasis of lung cancer. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 466(3): 729-36

**Šána, J., Faltejsková, P., Svoboda, M., Slabý, O.** (2012). Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *Journal of Translational Medicine* 10: 103

**Tang, H., Deng, M., Tang, Y., Xie, X., Guo, J., Kong, Y., Ye, F., Su, Q., Xie, X.** (2013): miR-200b and miR-200c as prognostic factors and mediators of gastric cancer cell progression. *Clinical Cancer Research* 19(20): 5602-12

**Thiery, J. P.** (2002): Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2(6): 442–54

**Travis, W., Brambilla, E., Müller–Hermelink, H.K., Harris, C.** (2004): Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura Thymus and Heart. Lyon: IARC, 26–72

**Ueda, J., Yoshida, H., Mamada, Y., Tani, N., Mineta, S., Yoshioka, M., Kawano, Y., Furuki, H., Koizumi, K., Uchida, E.** (2012): Surgical Resection of Solitary Metastatic Liver Tumor Arising From Lung Cancer: A Case Series. *Hepatogastroenterology*. 59(119): 2307-9

**Varghese, H. J., Davidson, M.T., MacDonald, I.C., Wilson, S.M., Nadkarni, K.V., Groom, A.C., Chambers, A.F.** (2002): Activated Ras regulates the proliferation/apoptosis balance and early survival of developing micrometastases. *Cancer Research* 62(3): 887–891

**Vorlíček, J., Abrahámová, J., Vorlíčková, H.** (2006): Klinická onkologie pro sestry. Grada Publishing, Praha, 328 s

**Wahbah, M., Boroumand, N., Castro, C., El-Zeky, F., Eltorky, M.** (2007): Changing trends in the distribution of the histologic types of lung cancer: a review of 4,439 cases. *Annals of Diagnostic Pathology* 11 (2): 89-96

**Walbert, T., Gilbert, M.** (2009): The role of chemotherapy in the treatment of patients with brain metastases from solid tumors. *International Journal of Clinical Oncology* 14(4): 299-306

**Wang, H. W., Noland, C., Siridechadilok, B.** (2009): Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nature Structural & Molecular Biology* 16(11): 1148-53

**Wang, S., Li, H., Wang, J., Wang, D.** (2013): Expression of microRNA-497 and its prognostic significance in human breast cancer. *Diagnostic Pathology* 8(1): 172

**Welch, C., Chen, Y., Stallings, R. L.** (2007): MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 26(34):5017-22

- Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G.** (1993): Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern-formation in *C. elegans*. *Cell* 75(5): 855-86
- Wyckoff, J. B., Jones, J. G., Condeelis, J. S., Segall, J. E.** (2000): A critical step in metastasis: *in vivo* analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Research* 60(9): 2504–11
- Wyman, S.K., Parkin, R.K., Mitchell, P.S., Fritz, B.R., O'Briant, K., Godwin, A.K., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Tewari, M.** (2009): Repertoire of microRNAs in Epithelial Ovarian Cancer as Determined by Next Generation Sequencing of Small RNA cDNA Libraries *Plos One* 4(4): 5311
- Xi, Y., Formentini, A., Chien, M., Weir, D.B., Russo, J.J., Ju, J., Kornmann, M., Ju, J.** (2006): Prognostic values of microRNAs in colorectal cancer. *Biomark Insights* 2: 113-21
- Yamanaka, R.** (2009): Medical management of brain metastases from lung cancer. *Oncology Reports* 22(6): 1169-76
- Yan, K., Gao, J., Yang, T., Ma, Q., Qiu, X., Fan, Q., Ma, B.** (2012): MicroRNA-34a inhibits the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells both *in vitro* and *in vivo*. *Plos One* 7(3): 33778
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R.** (2003): Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development* 17(23): 3011-16
- Zandberga, E., Kozirovskis, V., Ábols, A., Andrējeva, D., Purkalne, G., Linē, A.** (2012): Cell-free microRNAs as diagnostic, prognostic and predictive biomarkers for lung cancer. *Genes Chromosomes and Cancer* 52(4): 356-69

**Zeisberg, M., Shah, A.A., Kalluri, R.** (2005): Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *The Journal of Biological Chemistry* 280(9): 8094-100

**Zeman M., Antoř, F., Bartoníček, J., Černý, J., Dlouhý, M., Duda, M., Dvořáček, J., Dvořák, J., Fried, M., Gryga, A., Kozler, P., Král, V., Kroó, M., Malec, R., Mazánek, J., Novák, K., Pařízek, J., Plas, J., Pokorný, V., Škába, R., Šnajdauf, J., Šváb, J., Trávníček, V., Tvrdek, M., Valenta, J., Vyhnánek, J., Wechsler, J.** (2006): Speciální chirurgie. Galén, Praha, 575 s

**Zenz, T., Mohr, J., Eldering, E., Kater, A.P., Buhler, A., Kienle, D., Winkler, D., Dürig, J., van Oers, M.H., Mertens, D., Döhner, H., Stilgenbauer, S.** (2009): MiR-34a as part of the chemotherapy resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 113(16): 3801–8

**Zhang, B., Pan, X., Cobb, GP., Anderson, T.A.** (2007): MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology* 302(1): 1-12

#### **Internetové zdroje:**

*GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search* [online]. 2014 [cit. 2014-05-01]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/>

*MiRBase* [online]. 2014 [cit. 2014-05-03]. Dostupné z: <http://www.mirbase.org/>

## 9. Seznam použitých zkratek a symbolů

ADC	adekarcinom
Ago	argonautový protein
bi-shRNA	bifunkční shRNA
cDNA	komplementární DNA
CLL	chronická lymfoidní leukémie
CNS	centrální nervový systém
Ct	prahový cyklus
DEPC	diethylpyrokarbonát
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
dsRNA	dvou-vláknová RNA
ECM	extracelulární matrix
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
EML4-ALK	echinoderm microtubule associated protein like 4-anaplastic lymphoma kinase
EMT	epitelově-mezenchymový přechod
FGF	fibroblastový růstový faktor
GTP	guanosin-trifosfát
LCC	velkobuněčný karcinom
let-7	lethal-7
lin-4	lineage-4
MET	mezenchymálně-epitelový přechod

mRNA	mediátorová RNA
miRNA	mikroRNA
miRNP	mikroRNA ribonukleoproteinový komplex
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic
p53	tumor-supresorový protein p53
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGF	destičkový růstový faktor
piRNA	PIWI-interagující RNA
pre-miRNA	prekurzová mikroRNA
pri-miRNA	primární transkript mikroRNA
q	dlouhé rameno chromozomu
Ran	Ras related nuclear protein
RISC	RNA-indukovaný umlčující komplex
RNA	ribonukleová kyselina
RNAi	RNA interference
RT	pokožová teplota / reverzní transkripce
SCLC	malobuněčný karcinom plic
SCC	spinocelulární karcinom
shRNA	malá vlásenková RNA
SNAIL 1	snail family zinc finger 1
sno-RNA	malá jadéřková RNA
siRNA	malá interferující RNA



SCLC	malobuněčný karcinom plic
UV	ultrafialové záření
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
MMP	matrixové metaloproteinázy
XPO5	exportin-5
ZEB 1	zinc finger E-box-binding homeobox 1
ZEB 2	zinc finger E-box-binding homeobox 2

## 10. Přílohy

Příloha č. 1: Koncentrace a ředění vyizolované RNA

Číslo pacienta	Orientační číslo	Koncentrace RNA [ng/μl]	Čistota	Ředění na 2 ng/μl	
				RNA [μl]	DEPC voda [μl]
H 12988/97	4	83,75	2,00	0,48	19,52
H 14019/97	5	86,60	1,99	0,46	19,54
H 6662/98 -	9	36,30	2,11	1,1	18,9
H 8023/98 -	12	14,75	1,89	2,72	17,28
H 18907/98	14	118,85	1,93	0,34	19,66
H 4727/99	19	118,85	1,91	0,34	19,66
H 7420/99	21	228,35	1,96	0,18	19,82
H 13281/99	25	74,95	2,08	0,53	19,47
H 15256/99	26	63,40	1,96	0,63	19,37
H 17076/99	28	110,25	2,01	0,36	19,64
H 21863/99	34	102,60	1,89	0,39	19,61
H 7803/00	41	79,30	1,89	0,5	19,5
H 8002/00	42	12,30	2,15	3,25	16,75
H 12595/00	49	5,35	1,65	3,74	6,26
H 12813/00	50	99,30	1,87	0,4	19,6
H 14761/00	54	35,50	1,89	1,13	18,87
H 15126/00	55	6,40	1,86	3,13	6,87
H 16055/00	56	216,90	1,94	0,18	19,82
H 16862/00	57	27,80	1,9	1,44	18,56
H 22700/00	63	13,20	2,04	3,03	16,97

Příloha č. 2: Výsledky získané z Lightcycleru 480®

Číslo pacienta	Orientační číslo	miRNA	Ct hodnota	Ct hodnota	Ct hodnota	Průměr Ct	Odchylka
	K <sub>mix</sub>	miR-34a	17,2	17,1	17,1	17,07	0,05
		miR-200b	16,44	16,5	16,53	16,49	0,05
		miR-200c	14,8	14,83	14,86	14,83	0,03
		RNU6B	20,89	20,9	20,9	20,9	0,01
H 12988/97	4	miR-34a	22,8	22,85	22,84	22,83	0,02
		miR-200b	19,24	19,25	19,22	19,24	0,01
		miR-200c	17,56	17,59	17,6	17,58	0,02
		RNU6B	22,12	22,17	22,15	22,14	0,02

<b>Číslo pacienta</b>	<b>Orientační číslo</b>	<b>miRNA</b>	<b>Ct hodnota</b>	<b>Ct hodnota</b>	<b>Ct hodnota</b>	<b>Průměr Ct</b>	<b>Odchylka</b>
H 14019/97	5	miR-34a	19,78	19,83	19,81	19,81	0,02
		miR-200b	20,6	20,51	20,51	20,36	0,26
		miR-200c	18,31	18,53	18,54	18,46	0,13
		RNU6B	21,52	21,56	38,51	21,54	0,02
H 6662/98-	9	miR-34a	21,28	21,31	21,32	21,3	0,02
		miR-200b	20,95	20,96	21,2	20,97	0,04
		miR-200c	18,89	18,92	18,93	18,91	0,02
		RNU6B	21,89	21,9	21,87	21,89	0,01
H 8023/98-	12	miR-34a	20,96	21	20,96	20,98	0,02
		miR-200b	20,81	20,89	20,87	20,86	0,04
		miR-200c	19,23	19,27	19,29	19,26	0,03
		RNU6B	21,68	21,79	21,71	21,73	0,06
H 18907/98	14	miR-34a	23,86	23,88	23,92	23,89	0,03
		miR-200b	20,94	20,93	20,93	20,93	0,01
		miR-200c	18,58	18,64	18,64	18,62	0,03
		RNU6B	23,99	23,98	23,95	23,97	0,02
H 4727/99	19	miR-34a	20,82	20,84	20,84	20,84	0,01
		miR-200b	19,96	19,91	19,95	19,94	0,03
		miR-200c	17,93	17,95	17,98	17,95	0,03
		RNU6B	21,31	21,33	21,25	21,3	0,04
H 7420/99	21	miR-34a	23,7	23,1	23,8	23,08	0,01
		miR-200b	21,62	21,69	21,69	21,67	0,04
		miR-200c	19,93	19,61	19,94	19,83	0,19
		RNU6B	24,3	24	24,3	24,02	0,02
H 13281/99	25	miR-34a	21,87	21,9	21,9	21,89	0,02
		miR-200b	21,11	21,15	21,18	21,15	0,04
		miR-200c	19,26	19,32	19,3	19,3	0,03
		RNU6B	22,25	22,31	22,29	22,29	0,03
H 15256/99	26	miR-34a	20,55	20,57	20,57	20,56	0,01
		miR-200b	20,29	20,26	20,3	20,28	0,02
		miR-200c	18,84	18,87	18,85	18,85	0,02
		RNU6B	21,93	21,91	21,86	21,9	0,04
H 17076/99	28	miR-34a	20,97	20,96	20,98	20,97	0,01
		miR-200b	19,7	19,12	19,15	19,11	0,04
		miR-200c	17,74	17,79	17,76	17,76	0,03
		RNU6B	21,65	21,64	21,64	21,64	0,01
H 21863/99	34	miR-34a	23,71	23,74	23,73	23,73	0,02
		miR-200b	21,6	21	21,1	21,02	0,03
		miR-200c	19,52	19,58	19,56	19,55	0,03
		RNU6B	24,99	24,98	25,3	25	0,03

<b>Číslo pacienta</b>	<b>Orientační číslo</b>	<b>miRNA</b>	<b>Ct hodnota</b>	<b>Ct hodnota</b>	<b>Ct hodnota</b>	<b>Průměr Ct</b>	<b>Odchylka</b>
H 7803/00	41	miR-34a	23,16	23,19	23,18	23,18	0,01
		miR-200b	21,19	21,28	21,22	21,23	0,05
		miR-200c	19,92	20	19,97	19,96	0,04
		RNU6B	24,16	24,11	24,14	24,14	0,03
H 8002/00	42	miR-34a	18,85	18,86	18,84	18,85	0,01
		miR-200b	19,44	19,55	19,55	19,52	0,07
		miR-200c	18,28	18,35	18,32	18,31	0,03
		RNU6B	19,76	19,77	19,76	19,76	0,01
H 12595/00	49	miR-34a	23,8	23,54	23,68	23,43	0,32
		miR-200b	22,14	22,19	22,24	22,19	0,05
		miR-200c	21,95	22,2	22,34	22,16	0,19
		RNU6B	22,51	22,52	22,49	22,51	0,02
H 12813/00	50	miR-34a	18,78	18,79	18,79	18,78	0
		miR-200b	19,42	19,53	19,45	19,47	0,06
		miR-200c	18,9	18,1	18,9	18,09	0
		RNU6B	21,4	21,35	21,33	21,36	0,03
H 14761/00	54	miR-34a	20	20	19,98	20	0,01
		miR-200b	21,1	21,17	21,12	21,13	0,04
		miR-200c	19,63	19,7	19,71	19,68	0,04
		RNU6B	20,96	20,98	20,93	20,96	0,02
H 15126/00	55	miR-34a	19,78	19,78	19,79	19,79	0
		miR-200b	21,62	21,62	21,66	21,63	0,02
		miR-200c	20,16	20,22	20,21	20,2	0,03
		RNU6B	26,39	26,4	26,51	26,43	0,06
H 16055/00	56	miR-34a	22,21	22,24	22,23	22,22	0,01
		miR-200b	23	23,2	23	23	0,01
		miR-200c	21,86	21,82	21,84	21,84	0,02
		RNU6B	23,91	23,89	23,87	23,89	0,02
H 16862/00	57	miR-34a	19	19,6	19,7	19,04	0,04
		miR-200b	19,14	19,17	19,9	19,13	0,04
		miR-200c	17,7	17,73	17,78	17,74	0,04
		RNU6B	21,78	21,81	21,81	21,8	0,02
H 22700/00	63	miR-34a	18,76	18,74	18,78	18,76	0,02
		miR-200b	17,87	17,94	17,92	17,91	0,04
		miR-200c	17,25	17,29	17,26	17,27	0,02
		RNU6B	20,56	20,54	20,55	20,55	0,01