

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2018

Tereza Lausová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



MiRNA profilování meningiomů

Bakalářská práce

Tereza Lausová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Mgr. Hanuš Slavík

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

SOUHRN

Meningiomy jsou jedny z nejčastějších nádorů centrální nervové soustavy. Celoživotní riziko vzniku meningiomu u jedince je přibližně 1 %. Meningiomy byly Světovou zdravotnickou organizací (WHO) rozděleny do tří grade I, II a III, přičemž vyšší grade jsou vždy malignější a agresivnější než grade nižší. Navzdory chirurgickému odstranění meningiomů zůstává značné riziko jejich recidivy desítky let po zákroku i u benigních nádorů.

V posledních deseti letech byla značná pozornost věnována roli malých RNA v patogenezi mnoha onemocnění. Malá RNA nejsou překládány do proteinů, ale obvykle regulují jejich expresi. MiRNA jsou malá RNA se značným vlivem na post-transkripční regulaci díky jejich částečné komplementaritě s mRNA kódujícími proteiny. Nedávné výzkumy se zabývaly jejich významem pro diagnostiku a predikci v medicíně. Studie zaměřující se na transkriptomické profilování různých chorob byly úspěšné ve vývoji a testování diagnostických panelů využívajících miRNA.

Cílem tohoto výzkumného projektu bylo vytvořit panel miRNA, který by byl schopný předpovědět budoucí recidivu meningiomu. Vzorky chirurgicky odstraněných meningiomů byly získány z Fakultní nemocnice v Olomouci. Potenciální miRNA biomarkery pro recidivu meningiomů byly identifikovány ve fázi screeningu pomocí microarray analýzy. Expres vybraného souboru miRNA byla následně ověřována ve validační fázi pomocí qPCR. Na základě analýzy výsledků qPCR byl pomocí multivariátní logistické regrese sestaven panel 7 prediktorových miRNA, který byl ověřen pomocí cross-validace. Finální model je schopný předpovědět recidivu meningiomů s 88,5 % přesností.

Získaný diagnostický panel bude dále testován na větším množství vzorků, než během screeningové a první validační fáze. Druhá validační fáze je mimo rozsah této bakalářské práce.

SUMMARY

Meningiomas are one of the most common tumors of the central nervous system. The lifetime risk of developing one is approximately 1 %. Meningiomas have been divided by the World Health Organisation into three grades I, II and III, higher grades being more malign than lower ones. In spite of the fact that meningiomas can be surgically removed, substantial risk of a recurrence remains decades after the surgery even for benign meningiomas.

Great attention has been paid in the last two decades to the role and importance of small RNAs in diseases. Small RNAs are not translated into proteins, but they usually regulate their expression. MiRNAs are small RNAs that have large impact on post-transcription regulation based on their partial homology with protein-coding mRNAs. Recent research has been investigating their diagnostic and predictive abilities. Studies focusing on transcriptomic profiling of different diseases have been successful in developing and testing diagnostic panels of miRNAs.

The goal of this research project was to create a panel of miRNA able to predict that a meningioma will recur in the future. Samples of surgically removed meningiomas were obtained from Faculty Hospital in Olomouc. Potential miRNA biomarkers of meningioma recurrence were identified during screening phase by microarray analysis. These results were further validated by qPCR. Based on these more precise measurements, a panel of 7 predictor miRNAs was identified by multivariate logistical regression and cross-validated. Final model is 88,5 % accurate in predicting meningioma recurrence.

This diagnostic panel will be tested on a larger pool of samples than those of screening and first validation phase. However, the second validation phase is not within the scope of this bachelor thesis.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu, Mgr. Hanuši Slavíkovi, za veškeré rady, připomínky a pomoc, které mi poskytoval v průběhu práce v laboratoři a zpracovávání této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Vrbkové, PhD. za statistické zpracování dat k experimentální části a její trpělivost při vysvětlování použitých výpočetních metod. Mé díky také patří Mgr. Kateřině Štaffové za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a blízkým, kteří mi byli při psaní práce značnou oporou.

Tato bakalářská práce vznikla jako součást projektu financovaného z grantu Ministerstva zdravotnictví AZV 15-29021A na Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Meningiomy.....	3
3.1.1	Anatomie mozkových plen.....	3
3.1.2	Histopatologie.....	4
3.1.3	Incidence a mortalita.....	5
3.1.4	Etiologie.....	7
3.1.5	Recidiva u meningiomů.....	8
3.1.6	Růst a šíření meningiomů.....	8
3.1.7	Mnohočetné meningiomy.....	9
3.1.8	Diagnostika a léčba.....	9
3.2	MikroRNA.....	11
3.2.1	Krátké nekódující RNA.....	12
3.2.2	Nomenklatura miRNA.....	13
3.2.3	Biogeneze miRNA.....	15
3.2.4	Mechanismy regulace genové exprese prostřednictvím miRNA.....	17
3.2.5	MikroRNA a nádorová onemocnění.....	18
3.3	Molekulární charakteristika meningiomů.....	19
3.3.1	Mutace protein-kódujících genů.....	19
3.3.2	Long non-coding RNA v meningiomech.....	21
3.3.3	miRNA v meningiomech.....	21
4	Materiál a metody.....	23
4.1	Biologický materiál.....	23
4.1.1	Vzorky meningiomů pro microarray analýzu.....	23

4.1.2	Vzorky meningiomů pro validační fázi	24
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	24
4.2.1	Chemikálie.....	25
4.2.2	Komerční soupravy	25
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	26
4.4	Použité experimentální postupy	27
4.4.1	Izolace RNA z parafinových řezů meningiomů	27
4.4.2	Spektrofotometrické měření koncentrace RNA	28
4.4.3	Microarray na čipu	29
4.4.4	Reverzní transkripce.....	29
4.4.5	qPCR	31
4.5	Použité výpočetní metody	33
4.5.1	Použité statistické metody pro microarray analýzu	33
4.5.2	Použité statistické metody pro validační fázi experimentu	35
4.5.3	Výpočet změny exprese miRNA	37
5	Výsledky.....	38
5.1	Výběr vzorků pro analýzu	38
5.2	Microarray analýza.....	41
5.3	Validace pomocí qPCR	47
5.3.1	Výběr normalizační miRNA.....	47
5.3.2	Výběr nejlepšího modelu.....	47
5.4	Porovnání výsledků microarray a qPCR	52
6	Diskuze.....	53
7	Závěr.....	55
8	Literatura	56

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADAR1	adenosine deaminase, RNA specific
AGO	Argonaute
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATP	adenosine triphosphate
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
C-P4H(I)	collagen prolyl 4-hydroxylase
CpG	5'-C-phosphate-G-3'
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR ribonucleic acid
CT	computed tomography
Ct	Threshold Cycle
d(T)	Deoxythymidine
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eIF4A	eukaryotic initiation factor 4A
ERK	extracellular regulated MAP kinase
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
GTP	Guanosintrifosfát
GW182	alt. TNRC6A, trinucleotide repeat containing 6A
Gy	Gray
HDAC1	histone deacetylase 1
KLF4	Kruppel like factor 4
LNA	lock nucleic acid
lncRNA	long non-coding RNA
LOOCV	Leave One Out Cross-Validation
MAD	Median Absolute Deviation
MAPKAPK2	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
MEG3	maternally expressed gene 3
miRNA	micro ribonucleic acid
MRI	magnetic resonance imaging
mRNA	messenger ribonucleic acid
ncRNA	non-coding ribonucleic acid
NF2	neurofibromin 2
NGS	next generation sequencing
PABP	Poly(A)-binding protein
PAP	polyadenylační polymeráza
PAZ	Piwi Argonaut and Zwillie
PCR	polymerase chain reaction
PDAS	Primal Dual Active Set
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1
piRNA	piwi-interacting ribonucleic acid
POLR2A	RNA polymerase II subunit A

Poly(A)	polyadenylace
pre-miRNA	precursor micro ribonucleic acid
pri-miRNA	primary micro ribonucleic acid
RanGAP	Ras-related nuclear GTPase activating protein
RanGDP	Ras-related nuclear protein guanosindifosfát
RanGTP	Ras-related nuclear protein guanosintrifosfát
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RMA	Robust Multi-array Average
RNasin	RNase inhibitor
RNáza	ribonukleáza
ROC	Receiver Operating Characteristic
RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	short interfering ribonucleic acid
SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1
SMARCE1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1
SMO	smoothened, frizzled class receptor
sRNA	small ribonucleic acid
SUFU	SUFU negative regulator of hedgehog signaling
T _m	melting temperature
TRAF7	TNF receptor associated factor 7
TUTáza	3'terminální uridylyl transferáza
UTR	untranslated region
WHO	World Health Organisation
XPO5	Exportin5

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma uspořádání mozkomíšních plen a okolních struktur.

Obrázek 2 Histologické subtypy meningiomů (mikroskopické snímky řezů po hematoxylin-eosinovém barvení).

Obrázek 3 Incidence a mortalita zhoubných nádorů mozkomíšních plen v České republice v letech 1977 až 2015.

Obrázek 4 Věková struktura pacientů trpících zhoubnými nádory mozkomíšních plen v České republice.

Obrázek 5 Snímek meningiomu pořízený pomocí magnetické rezonance (MRI).

Obrázek 6 Porovnání sekvencí skutečné miRNA identifikované pomocí NGS a sekvencí ne-miRNA vlásenky.

Obrázek 7 Schéma názvosloví miRNA.

Obrázek 8 Schéma biogeneze miRNA.

Obrázek 9 Rozdělení meningiomů do skupin podle mutací, které se v nich nacházejí.

Obrázek 10 Schéma označení miRNA a následné microarray analýzy.

Obrázek 11 Schéma reakcí vedoucích k reverzní transkripci miRNA.

Obrázek 12 Schéma RT-qPCR reakce.

Obrázek 13 Schéma pipetování qPCR reakcí.

Obrázek 14 Heat mapa exprese 54 miRNA, které splnily podmínky pro zařazení do validační fáze experimentu.

Obrázek 15 Heat mapa exprese 21 miRNA, které splnily zpřísněné podmínky pro validační fázi experimentu.

Obrázek 16 Krabicové diagramy \log_2 intenzity fluorescence pro 4 miRNA, které měly mezi skupinami recidivujících a nerecidivujících pacientů nejvyšší rozlišení (tj. nejvyšší poměr $\Delta m_i / MAD_i$).

Obrázek 17 Heat mapa \log_2 hodnoty exprese pro miRNA, které byly vyhodnoceny jako vhodné pro normalizaci ve validační fázi experimentu.

Obrázek 18 Grafy Ct hodnot qPCR pro 2 kandidátní normalizační miRNA.

Obrázek 19 Graf závislosti odhadu testovací chyby na počtu miRNA prediktorů při Best Subset Selection analýze.

Obrázek 20 ROC („Receiver Operating Characteristic“) křivka pro zjištění ideální cut-off hodnoty pozitivního výsledku testu na základě modelu 7 miRNA.

Obrázek 21 Krabicové diagramy Ct hodnot normalizační miRNA miR-181b-5p a ΔCt hodnot 7 prediktorových miRNA diagnostického modelu.

Obrázek 22 Graf změny exprese miRNA zařazených do diagnostického modelu.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Simpsonova stupnice úrovně chirurgické resekce meningiomu.

Tabulka 2 Srovnání vlastností mikroRNA a siRNA na základě Budak *et al.*, (2016), Ambrose *et al.*, (2003) a Carthew *et al.*, 2009.

Tabulka 3 Přehled informací o pacientech, jejichž vzorky byly použity pro microarray analýzu.

Tabulka 4 Informace o pacientech druhého setu vzorků, určeného pro validaci microarray analýzy pomocí qPCR metody.

Tabulka 5 Tabulka použitých chemikálií, které nebyly součástí komerčně dodávaných souprav pro izolaci a analýzu, a jejich koncentrací.

Tabulka 6 Seznam použitých komerčních souprav pro izolaci a analýzu pomocí microarray a qPCR.

Tabulka 7 Seznam sond použitých pro RT-qPCR. SONDY BYLY DODÁNY FIRMOU THERMO FISHER SCIENTIFIC.

Tabulka 8 Přehled použitých přístrojů a zařízení.

Tabulka 9 Složení lyzačního roztoku použitého pro izolaci RNA ze vzorků.

Tabulka 10 Složení směsi pro polyadenylaci před reverzní transkripcí vzorku.

Tabulka 11 Složení směsi pro přípravu qPCR pomocí TaqMan Fast Advanced Master Mix a sond TaqMan Advanced miRNA Assay.

Tabulka 12 Teplotní profil qPCR reakce pomocí TaqMan Fast Advanced Master Mix a sond TaqMan Advanced miRNA Assay.

Tabulka 13 Výsledky měření na přístroji NanoDrop ND-1000 pro 60 vzorků určených pro microarray analýzu.

Tabulka 14 Výsledky měření na přístroji NanoDrop ND-1000 pro 64 vzorků určených pro validační fázi experimentu.

Tabulka 15 Párování vzorků pro validační fázi experimentu na základě údajů o pacientech.

Tabulka 16 Koncentrace a poměr absorbancí při 260 a 280 nm pro vzorky RNA izolované z arachinoidální tkáně.

Tabulka 17 Soubor 16 miRNA, které byly na základě svých vlastností vybrány pro testování do validační fáze experimentu.

Tabulka 18 Soubor 4 miRNA, které byly vybrány jako normalizační (kontrolní) do validační fáze experimentu.

Tabulka 19 Konečný model recidivy meningiomů se 7 miRNA prediktory.

Tabulka 20 Tabulka situací, které vznikly při LOOCV validaci modelu 7 prediktorových miRNA na souboru 56 vzorků.

Tabulka 21 Vlastnosti prediktivního modelu 7 miRNA při cut-off hodnotě modelu 0,5.

1 ÚVOD

Meningiomy jsou jedny z nejčastějších nádorů postihujících centrální nervovou soustavu. Přestože všechny pocházejí z jednoho typu buněk, vyskytují se u nich četné histologické varianty o různém stupni agresivity (Louis *et al.*, 2016). Meningiomy jsou typické tím, že i po kompletním chirurgickém odstranění často recidivují (Perry *et al.*, 2004).

MiRNA jsou krátké nekódující RNA, jejichž role v nádorových onemocněních je zkoumána teprve přibližně posledních patnáct let (Calin *et al.*, 2002). MiRNA kontrolují translaci mRNA do proteinů a v různých tkáních mají charakteristickou úroveň exprese. Charakteristická změna exprese miRNA je typická rovněž pro mnohé typy nádorů. Z expresních profilů miRNA lze v některých případech diagnostikovat typ nádoru a určit některé jeho vlastnosti (Reddy *et al.*, 2015).

První miRNA profilování u meningiomů bylo provedeno Sayak *et al.* (2009) pouze na benigních WHO I grade meningiomech a bez zkoumání jejich vztahu k recidivě. První studie zabývající se změnou miRNA profilu i mezi recidivujícími a nerecidivujícími meningiomy vznikla v roce 2013 v Číně (Zhi *et al.*), ale ani ta nepřinesla žádný způsob včasné predikce možné recidivy meningiomů.

V současné době tak není k dispozici žádný spolehlivý *in vitro* diagnostický nástroj, jak odlišit meningiomy, které mají vyšší pravděpodobnost recidivy. Cílem tohoto projektu je sestavit a ověřit panel miRNA, který by toto dokázal. Potenciálně může napomoci určit možnou recidivu meningiomu již po první operaci pacienta a umožnit tak přesnější předpověď jeho prognózy.

2 CÍLE PRÁCE

- 1) Vypracování rešerše o charakteristice meningiomů a roli miRNA v jejich patogenezi.
- 2) Analýza archivovaných tkání pacientů s nerecidivujícími i recidivujícími meningiomy pomocí metody microarray a následná validace získaných výsledků za použití qPCR (metodicky izolace nukleových kyselin, metody měření koncentrace a kvality RNA, reverzní transkripce, příprava knihoven na microarray, qPCR).
- 3) Statistické zpracování transkriptomových dat s porovnáním pacientů s benigní formou onemocnění a recidivujícími pacienty. Nalezení vhodných markerů na úrovni miRNA pro diferenciální diagnostiku.

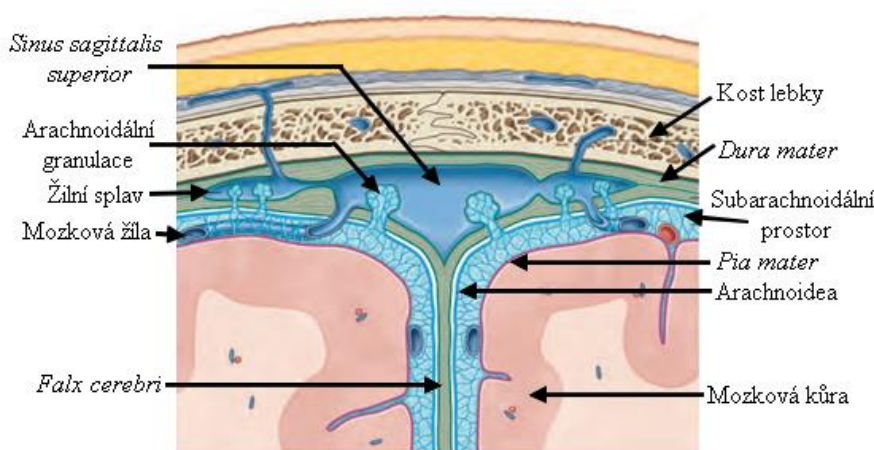
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Meningiomy

Světová zdravotnická organizace (WHO) meningiomy definuje jako „skupinu převážně benigních, pomalu rostoucích novotvarů, které jsou s největší pravděpodobností odvozeny z meningoteliálních buněk arachnoidální vrstvy.“ (WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Louis *et al.*, 2016)

3.1.1 Anatomie mozkových plen

Mozek a míchu obalují tři membrány – *dura mater* (tvrdá plena mozková), arachnoidea (pavučnice) a *pia mater* (měkká plena mozková) (obr. 1). Slouží jako ochrana tkáně centrální nervové soustavy, rozvádí cerebrospinální tekutinu a obsahují vyživující cévy (Standring, 2016).



Obrázek 1 Schéma uspořádání mozkomíšních plen a okolních struktur. Převzato z Gray's Anatomy, Standring, 2016.

3.1.1.1 Dura mater

Dura mater je pevná, fibrózní a převážně acelulární. Tvoří ji propletená kolagenová vlákna s roztroušenými fibroblasty. Organizuje vnitřní prostor lebky do ne zcela oddělených kompartmentů pomocí čtyř sept – *falx cerebri* (mezi mozkovými hemisférami), *falx cerebelli* (mezi hemisférami mozečku), *diaphragma sellae* (překrývající oblast tureckého sedla s hypofýzou) a *tentorium cerebelli* (oddělující mozeček od koncového mozku) (Standring, 2016).

Dura mater obaluje mozek a míchu, dále pak hlavové nervy v oblasti lebky, včetně očních. Od arachnoidey je oddělena subdurálním prostorem. (Standring, 2016).

3.1.1.2 Arachnoidea a pia mater

Arachnoidea zabraňuje průchodu cerebrospinální tekutiny k *dura mater*. Na straně přivrácené k *dura mater* je tvořena 5-6 vrstvami buněk spojených pomocí tzv. tight junction nebo desmozomy. Střední část arachnoidey je tvořena přiléhajícími buňkami propojených desmozomy nebo tzv. gap junction.

Vnitřní část arachnoidey je tvořena svazky kolagenu a méně těsně přiléhajícími buňkami (Standring, 2016).

Arachnoidea narozdíl od *pia mater* neobaluje mozek úplně těsně, a tak mezi oběma membránami vzniká tzv. subarachnoidální prostor vyplněný kolagenovými vlákny a cerebrospinalní tekutinou. Ta je reabsorbována do žil prostřednictvím arachnoidálních granulací (Standring, 2016). Za resorpci cerebrospinalní tekutiny jsou zodpovědné vysoce metabolicky aktivní tzv. „arachnoid cap“ buňky. Právě z arachnoid cap buněk jsou pravděpodobně odvozeny meningiomy (Perry, 2004).

Největší množství arachnoidálních granulací se nachází v oblasti *falx cerebri* odvádějící cerebrospinalní tekutinu do *sinus sagittalis superior* – cévy vedoucí mezi mozkovými hemisférami těsně pod lebeční kostí (Standring, 2016).

Pia mater je průhledná, mikroskopicky tenká membrána těsně obalující mozek, kopírující jeho záhyby (Standring, 2016).

3.1.2 Histopatologie

Meningiomy se rozdělují do tří gradů podle jejich histologie a chování. Toto dělení má svůj význam pro odhad budoucí prognózy a možné terapie pacienta (Louis *et al.*, 2016).

- a) WHO grade I – benigní meningiomy jsou nejčastější. Až 80 % vyoperovaných nádorů spadá do této skupiny pomalu rostoucích nádorů (Perry *et al.*, 2004). Navzdory kompletnímu chirurgickému odstranění mohou recidivovat. Klinické příznaky benigních meningiomů jsou závislé na jejich lokalizaci, jelikož mohou způsobit kompresi nebo dislokaci okolní mozkové tkáně (Smith, 2015). Mohou se vyskytnout invaze do *dura mater*, kosti, měkkých tkání, vedlejších dutin nosních i mezery mezi vnitřní a vnější vrstvou dury. (Perry *et al.*, 2004)
- b) WHO grade II – neboli atypické meningiomy. Tvoří 15-20 % případů vyoperovaných meningiomů (Perry *et al.*, 2004). Podle nejnovějších klasifikací zahrnuje grade II i meningiomy histologicky WHO grade I, u kterých se vyskytne invaze do mozku, protože taková invaze značně zvyšuje riziko recidivy a úmrtí (Louis *et al.*, 2016).

Meningiom je atypický, pokud vykazuje zvýšenou mitotickou aktivitu nebo invazi do mozku. Dále může být diagnostikován, pokud jsou přítomny alespoň 3 z následujících histologických vlastností:

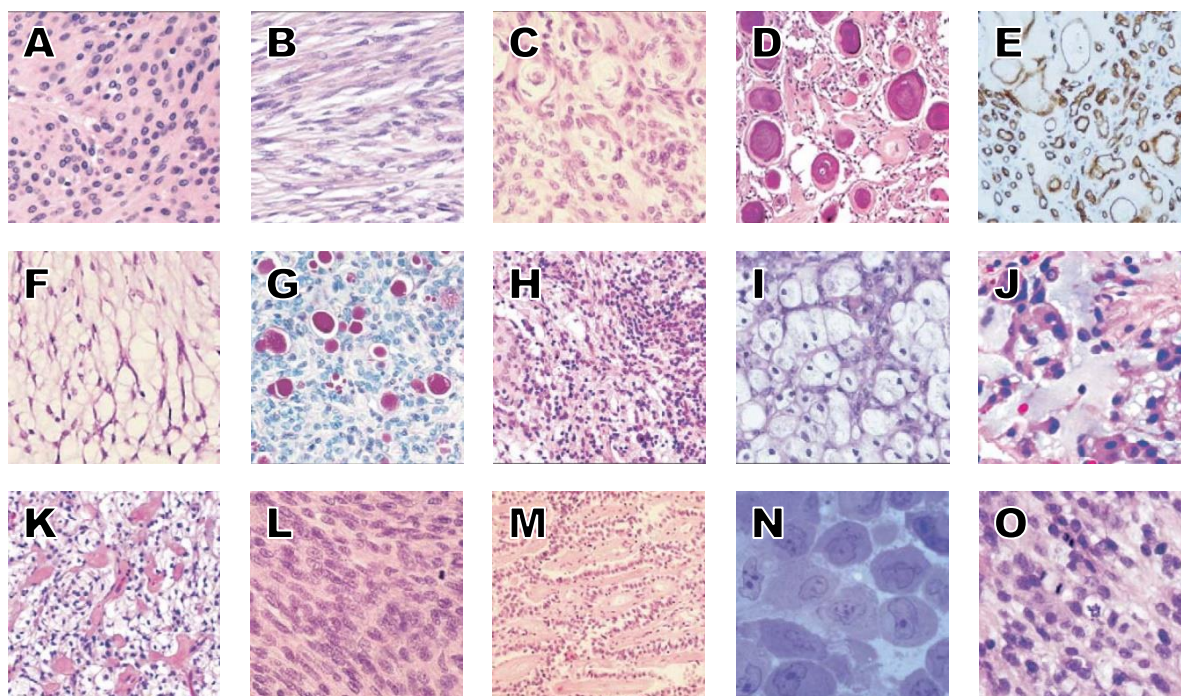
- spontánní nekróza
 - růst v „plátech“
 - prominentní jadérka (tzv. macronucleoli)
 - hypercelularita
 - malé buňky (vysoký poměr velikosti jádra k cytoplazmě) (Louis *et al.*, 2016).
- c) WHO grade III – anaplastické meningiomy. Jejich incidence je velmi nízká, pouze 1-2 % případů z vyoperovaných meningiomů. Dochází u nich ke značné deregulaci buněčného cyklu

a ztrátě diferenciace buněk. Typická jsou místa s výrazně zvýšeným mitotickým indexem. Vyskytují se de novo i jako recidiva meningiomů nižších stupňů. Pro klasifikaci meningiomu jako anaplastického musí mít jednu z následujících charakteristik:

- velmi vysoký mitotický index
- anaplasie – dediferenciace buněk (Mawrin a Perry, 2010)

3.1.2.1 Histologické subtypy meningiomů

Meningiomy se vyznačují velkou různorodostí, v rámci jednoho gradu existuje vždy více histologických forem (obr. 2). U některých histologických variant se vyskytuje unikátní genetický profil. (Marosi *et al.*, 2008). Některé histologické subtypy meningiomů mají vyšší riziko recidivy než jiné, například vzácné chordoidní meningiomy. Podobné tendence mají i agresivní papilární meningiomy, které recidivují až v 55 % případů, se smrtností 50 %.



Obrázek 2 Histologické subtypy meningiomů (mikroskopické snímky řezů po hematoxylin-eosinovém barvení). A – meningoteliální, B – fibrózní, C – přechodný typ, D – psammomatózní s kalcifikovanými tělísky (tmavě růžové), E – angiomatózní s mnoha krevními cévkami (hnědé), F – mikrocystický, G – sekretorický, H – meningiom bohatý na lymfoplazmatocyty, I – metaplastický, J – chordoidní, K – světlobuněčný s cytoplazmou bohatou na glykogen, L – atypický, M – papilární, N – rhabdoidní s velkými buňkami, O – anaplastický s metafázními jádry. Subtypy A až I jsou WHO grade I, subtypy J až L WHO grade II a subtypy M až O jsou WHO grade III. Zdroj Riemenschneider *et al.*, 2007.

3.1.3 Incidence a mortalita

Celoživotní riziko vzniku meningiomů je přibližně 1 %. V USA se jedná o nejčastější nádor centrální nervové soustavy, kde tvoří 36 % těchto nádorů (Louis *et al.*, 2016). Podle Ústavu zdravotnických

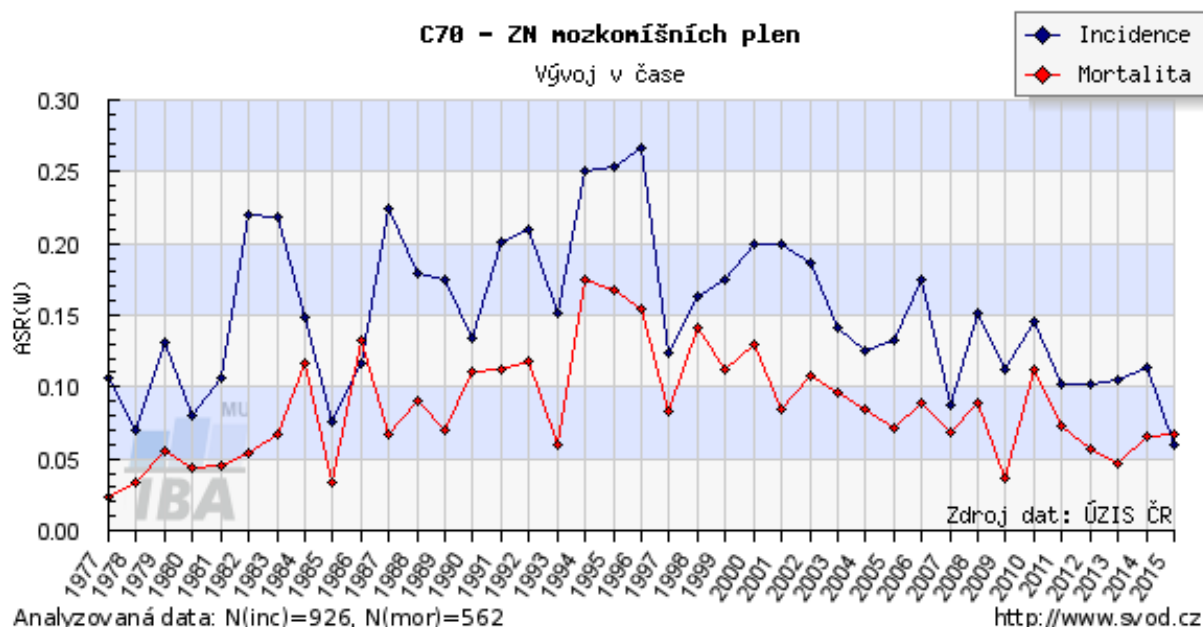
informací a statistiky ČR zhoubnými nádory centrální nervové soustavy v roce 2014 trpělo 3 314 osob a zemřelo na ně 697 pacientů (graf časového vývoje na obr. 3).

Mnoho meningiomů není za života detekováno a je nalezeno při pitvě až ve 2,3 % případů (Pérez-Magán *et al.*, 2012).

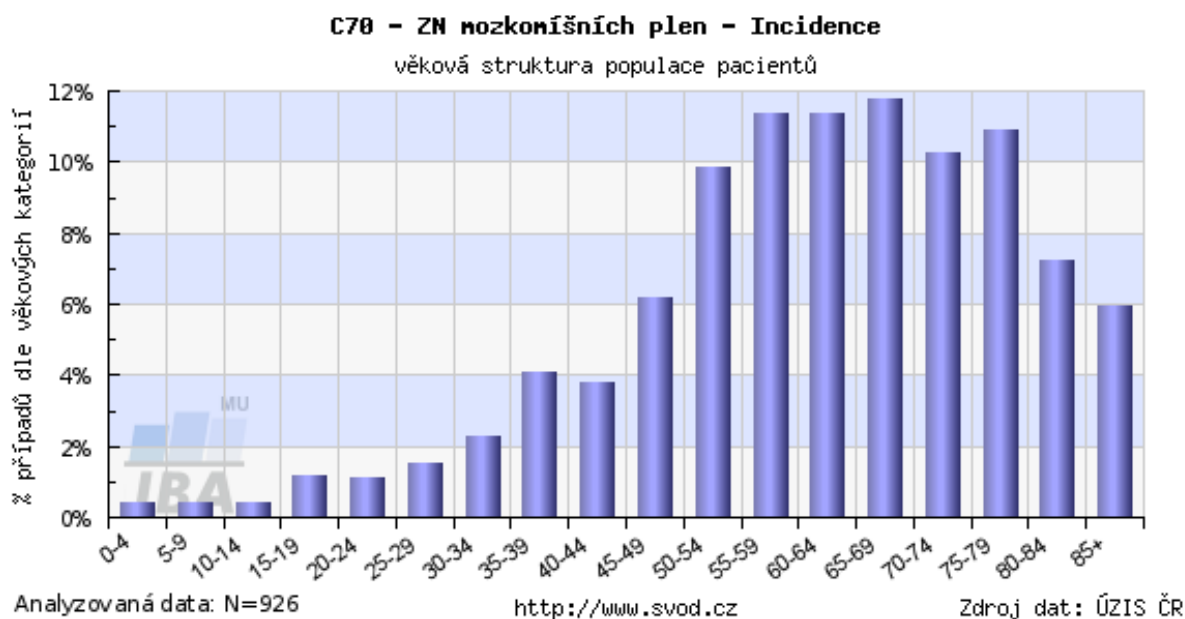
Meningiomy se vyskytují spíše u starší populace – medián věku pacientů je 65 let (obr. 4). Ženy mají vyšší riziko vzniku meningiomů. Zatímco incidence u mužů je 4,8 na 100 000, meningiomy trpí 10,5 ze 100 000 žen. Nejrizikovější je pro ženy přitom období mezi 35-44 lety, kdy se poměr incidence oproti mužům zvýší až na více než 3:1. Výjimkou jsou meningiomy u pacientů mladších 20 let, kde je situace opačná (Smith, 2015). U mužů je také častější výskyt grade II a III meningiomů (Louis *et al.*, 2016).

Dlouhodobá prognóza WHO grade I meningiomů je dobrá. Přes relativně nízkou mortalitu však studie van Alkemade (2012) uvádí dlouhodobé zdravotní pooperační následky. Pouze 33 % pacientů ve studii prováděné van Alkemade *et al.* (2012) se nepotýkalo s žádnými dlouhodobými obtížemi, naopak bolest, potíže se zrakem a kognitivní a motorická omezení pacientů po operaci byly zjištěny u více než 20 % pacientů.

Meningiomy gradu II mají pětileté přežití 97,5 %, zatímco gradu III 67,4 %, podle Wang *et al.* (2016). Medián přežití je podle této studie 167 měsíců pro grade II a 72 měsíců pro gradu III. Oproti dřívějším studiím se jedná o vyšší procento přežití těchto gradů meningiomů.



Obrázek 3 Incidence a mortalita zhoubných nádorů mozkomíšních plen v České republice v letech 1977 až 2015. Modrý bod vyznačuje incidenci, červený bod mortalitu v daném roce. Zdroj grafu: <http://svod.cz>, zdroj dat: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR.



Obrázek 4 Věková struktura pacientů trpících zhoubnými nádory mozkomíšních plen v České republice. Data za období 1977-2002. Zdroj grafu: <http://svod.cz>, zdroj dat: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR.

3.1.4 Etiologie

Meningiomy lze rozdělit na sporadické, tedy ty, které vznikly bez dědičné příčiny, a na dědičné. Sporadické meningiomy tvoří velkou většinu – přes 90 % případů (Smith, 2015). Potvrzeným rizikovým faktorem pro vznik sporadických meningiomů je ionizující záření, zvláště v dětství (Louis *et al.*, 2016).

Mezi dědičné příčiny meningiomů patří neurofibromatóza typu 2. Projevuje se zvýšeným rizikem vzniku meningiomů, stejně jako schwannomů (nádorů vznikajících ze Schwannových buněk) a akustických neuromů (nádorů pocházejících z nervové tkáně mezi vnitřním uchem a mozkem). Jedná se o dominantně dědičnou chorobu postihující gen NF2 (Marosi *et al.*, 2008).

3.1.4.1 Ionizující radiace

U pacientů, kteří obdrželi vysokou dávku radiace během léčby jiných mozkových nádorů, jsou meningiomy častou pozdní komplikací. Medián latence je 24 let (Marosi *et al.*, 2008), celkově se doba objevení meningiomů od ozařování pohybuje mezi 3,5-64 lety. Výjimečně se mohou vyskytnout i případy, kdy se nádor po ozaření objeví velmi rychle, zvláště u mladších pacientů. Tyto meningiomy jsou častěji atypické nebo anaplastické (Choudhary *et al.*, 2006).

3.1.4.2 Hormonální receptory

Ve studiích, které zkoumají souvislost hormonů s výskytem meningiomů, nebylo dosaženo jednoznačného závěru. Ve studii El-Badawy *et al.* (2013) byla zkoumána korelace mezi stupněm meningiomu, proliferčním indexem Ki-67 a přítomností receptoru pro progesteron. Studie zjistila, že

meningiomy, které byly pro progesteronový receptor pozitivní, měly značně nižší proliferační index a převážně nerecidivovaly.

Naopak Hortobágyi *et al.*, 2017 udává, že těhotenství je rizikovým faktorem, výskyt a zvýšený růst meningiomů s graviditou často koreluje. Vyšší koncentrace progesteronu během těhotenství jsou možným důvodem (Smith, 2015). Bylo zjištěno mírně zvýšené riziko meningiomů při užívání endogenních nebo exogenních hormonů. Kojení déle než 6 měsíců naopak riziko snižuje (Louis *et al.*, 2016).

3.1.4.3 Neurofibromatóza typu 2

Nejobvyklejší genetickou příčinou vzniku meningiomů je neurofibromatóza typu 2. Jedná se o dominantně autozomální chorobu, kdy ke vzniku onemocnění stačí jedna poškozená kopie genu NF2. Projevem neurofibromatózy typu 2 je zvýšená incidence nádorů centrální nervové soustavy, mj. i meningiomů. Ke vzniku nádoru dochází tzv. two-hit mechanismem – ve chvíli, kdy je mutací postižena také druhá, původně wild-type alela genu (Smith, 2015).

K vývoji meningiomů dochází přibližně v 50 % případů neurofibromatózy typu 2. Často se objevují mnohočetné a histologicky fibroblastické nebo přechodné typy meningiomů. Fibroblastický vzhled meningiomů je zapříčiněn ztrátou merlinu, produktu genu NF2, který propojuje membránové proteiny a cytoskelet (Galani *et al.*, 2017).

3.1.5 Recidiva u meningiomů

Grade meningiomu je v současné době nejužitečnější (morfologický) prediktor recidivy meningiomů. Benigní meningiomy recidivují přibližně v 5–25 % případů, WHO grade II v 29–59 % případů a WHO grade III až v 94 % případů. Přítomnost jakéhokoli atypického znaku u benigních meningiomů riziko recidivy značně zvyšuje, i když meningiom celkově ještě nesplňuje zařazení do vyššího grade (Louis *et al.*, 2016). Za 5 let dochází k recidivě u 5 % benigních a 40 % atypických meningiomů, do 20 let pak recidivuje až 19 % benigních nádorů (Perry *et al.*, 2004).

3.1.6 Růst a progresse meningiomů

S větším objemem meningiomu korelují vyšší hodnoty mitotického indexu a Ki-67 proliferačního indexu. Při indexu přibližně nad 4 % je riziko recidivy benigního nádoru zvýšené podobné jako u atypického. Obecně platí, že větší a rychleji rostoucí meningiomy recidivují častěji. Nicméně neexistují přesné cut-off hodnoty proliferace, které by byly srovnatelné i mezi jednotlivými laboratořemi (Louis *et al.*, 2016).

Progrese meningiomů je spojena s jejich zařazením do vyššího grade meningiomu. V současné době není mnoho známo o mechanismech progresse (Bi *et al.*, 2017).

3.1.7 Mnohočetné meningiomy

Mnohočetné meningiomy se vyskytují se přibližně u 3 % operovaných případů. Pro vysvětlení jejich vzniku se nabízejí dvě možnosti. Jednou z nich je vyšší riziko vzniku meningiomu z hlediska genetických nebo environmentálních vlivů. U pacientů s poškozeným genem NF2 mohou vzniknout mnohočetné polyklonální meningiomy, když je více buněk aktivováno two-hit mechanismem, ale jedná se jen o velmi výjimečné případy (Louis *et al.*, 2016).

Druhou hypotézou, která vysvětluje častý vznik monoklonálních meningiomů, je šíření již vzniklých meningiomů (Louis *et al.*, 2016). V současné době přesný mechanismus vzniku monoklonálních mnohočetných meningiomů není znám (Torres-Martín *et al.*, 2015).

Bylo zjištěno, že všechny recidivující meningiomy jsou klony původních, chirurgicky odstraněných primárních nádorů (Louis *et al.*, 2016).

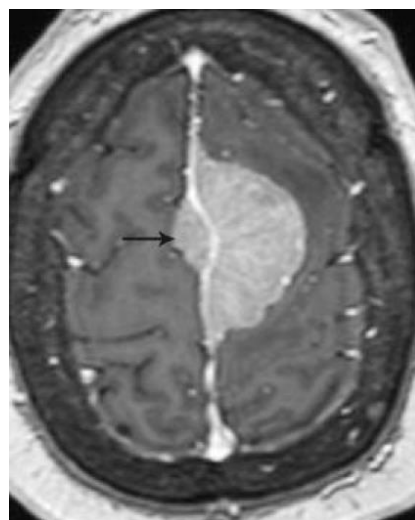
3.1.8 Diagnostika a léčba

3.1.8.1 Diagnostika pomocí symptomů

Vzhledem k mnoha možným lokalizacím meningiomů může kompresí různých částí mozku docházet k odlišným symptomům. Přestože jsou velmi dobře popsány, s rozvojem zobrazovacích technik se pro jejich lokalizaci používají už jen zřídka. Například meningiomy ve frontální části lebky způsobují zrakové obtíže, bolesti hlavy, ztrátu čichu, mentální změny nebo záchvaty, zatímco supraselární meningiomy (lokalizované blízko hypofýzy) hormonální změny (Marosi *et al.*, 2008).

3.1.8.2 Diagnostika pomocí zobrazovacích metod

Mnoho meningiomů je zobrazovacími metodami detekováno náhodně, při vyšetření jiných zdravotních komplikací. Zobrazovací metody mohou odhalit strukturu, velikost a umístění meningiomu a případnou přítomnost komplikací, jako je edém mozku nebo hyperostóza. Při použití speciálních technik lze také odhadnout funkční aspekty meningiomu a předpovědět jeho chování do budoucna (Saloner *et al.*, 2010).



Obrázek 5 Snímek meningiomu pořízený pomocí magnetické rezonance (MRI). Meningiom se nachází na obou částech falx cerebri, menší část je vyznačena šipkou. Zdroj: Saloner *et al.*, 2010

Nejčastěji používané metody jsou CT („computed tomography“, výpočetní tomografie) a MRI („magnetic resonance imaging“, magnetická rezonance) a jejich varianty. Výhodou CT je možnost rozpoznání infiltrace kosti, nevýhodou zase dávka ionizačního záření, kterou pacient obdrží. MRI (obr. 5) na druhou stranu pacienta záření nevystavuje a jeho varianty umožňují rozpoznat agresivnější typy meningiomů od benigních (Saloner *et al.*, 2010).

3.1.8.3 Watch-and-wait

U meningiomů, které byly zjištěny náhodou (a jsou tedy většinou benigní, asymptomatické) není nutné ihned provádět operaci. Místo toho pacient pravidelně dochází na kontrolní skeny, a růst meningiomu je monitorován. Tento přístup je také vhodný u osob staršího věku, u kterých by byla případná operace vysoce riziková, a v případě žádných nebo zvladatelných symptomů (např. záchvaty tlumené podáním léčiv). Rizikem je záměna meningiomu s jiným typem nádoru, zejména metastázemi rakovin plic nebo prsu (Chamberlain, 2015).

3.1.8.4 Operace

Operativní odstranění meningiomu slouží ke zlepšení nebo zachování neurologických funkcí pacienta. Jedná se o standardní postup u většiny meningiomů. Úplné odstranění meningiomu je nezbytné pro maximální zamezení vzniku recidivy (Prada *et al.*, 2015). Úroveň odstranění meningiomu je určována na tzv. Simpsonově stupnici (tab. 1). Jednotlivé stupně odstranění mají různou šanci recidivy meningiomu (Simpson, 1957).

Tabulka 1 Simpsonova stupnice úrovně chirurgické resekce meningiomu. Riziko recidivy meningiomu je závislé na stupni resekce meningiomu, čím méně kompletní odstranění je, tím vyšší šance na recidivu (Simpson, 1957).

Úroveň	Popis	Riziko recidivy
1	Kompletní odstranění včetně resekce postižené kosti a <i>dura mater</i>	9 %
2	Kompletní odstranění s koagulací postižené <i>dura mater</i>	19 %
3	Kompletní odstranění bez koagulace <i>dura mater</i>	29 %
4	Subtotální resekce	44 %
5	Prostá dekomprese, biopsie	-

V současné době je standardem tzv. image-guided operace. Obvykle jsou dostupné tzv. neuronavigační systémy založené na snímcích pořízených před operací („preoperative“). Nevýhodou takového systému je nemožnost podchytit změny v poloze a deformaci nastalé během operace. Pro překonání této limitace je možné použít zobrazovací metody přímo během operace („intraoperative“): MRI, CT, ultrazvuk a fluorescenční barvení meningiomu (Prada *et al.*, 2015).

3.1.8.5 Radioterapie

Radioterapie je jako první možnost léčby využívána zvláště pro meningiomy v obtížně operovatelných oblastech, jako je například báze lební nebo v nebezpečné blízkosti důležitých struktur, například očního nervu. Jako přídatná terapie se radioterapie používá pro meningiomy, které nebyly kompletně odstraněny chirurgicky pro prevenci recidivy. Další možností využití radioterapie je za účelem zpomalení progresu (Rogers *et al.*, 2015).

Využívají se zpravidla dva přístupy. Při stereotaktické radioterapii pacient jednorázově obdrží dávku záření (zpravidla mezi 12 a 16 Gy). Metoda je účinnější pro menší nádory. Frakcionovaná zevní radioterapie spočívá v rozložení vyšší dávky záření (okolo 50 Gy) do několika dní (přibližně po 2 Gy). Výhodou je obvykle nižší míra vedlejších účinků, na druhou stranu ale panuje obava z toho, že tato metoda s sebou nese vyšší riziko vzniku sekundárního nádoru. Toto riziko se podstatně snižuje s rozvojem nových technologií (Rogers *et al.*, 2015). Nicméně u vrozených mutací nádor supresorových genů je snaha se radioterapii úplně vyhnout (Wenya *et al.*, 2016).

3.1.8.6 Chemoterapie

Chemoterapie se v současné době v léčbě meningiomů příliš nevyužívá. Není k dispozici mnoho studií zkoumajících vliv protinádorových léčiv na meningiomy, a ty již existující ukazují spíše jejich zanedbatelný vliv (Chamberlain, 2015).

3.2 MikroRNA

MikroRNA (miRNA) jsou krátké (small, sRNA) nekódující RNA (non-coding, ncRNA) o délce přibližně 22 nukleotidů. Působí jako post-transkripční regulátory genové exprese prostřednictvím interakce s mRNA. Více než 60 % protein-kódujících mRNA u člověka obsahuje minimálně jedno konzervované místo pro navázání miRNA (Ha a Kim, 2014). MiRNA se podílí na širokém spektru procesů, včetně vývoje, diferenciaci, reakcí na stres způsobené patogeny nebo zářením a tumorigenezi (Almeida, 2011).

Informace o první identifikované mikroRNA byly publikovány v roce 1993 na základě spolupráce mezi dvěma laboratořemi. Každá pracovala na výzkumu regulace jiného genu, *lin-4* a *lin-14* v *Caenorhabditis elegans*. Gen *lin-4* – miRNA – nekódoval protein, a negativně reguloval mRNA transkript *lin-14*.

Druhou objevenou mikroRNA byla až v roce 2000 *let-7* regulující gen *lin-41* taktéž v *C. elegans* (Reinhart *et al.*, 2000). Na rozdíl od *lin-4*, *let-7* miRNA je mezidruhově konzervována mezi živočichy, včetně člověka. To podnítilo další zájem o výzkum regulace exprese genů prostřednictvím miRNA (Almeida, 2011).

Definice miRNA zahrnuje kombinaci kritérií včetně experimentální verifikace jejich exprese a biogeneze. Systém vytvořený Ambrosem *et al.* (2003) je využíván pro ověření nově identifikovaných miRNA pro zápis do databáze miRBase, v současnosti největší mikroRNA databáze.

Kritéria exprese:

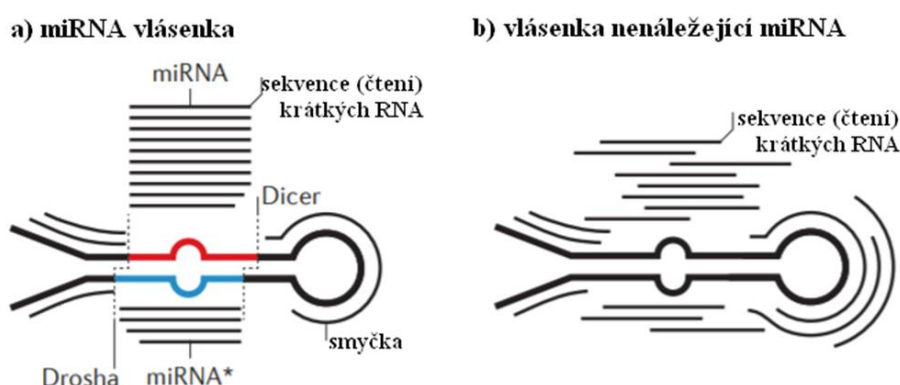
- 1) Detekce RNA transkriptu o délce přibližně 22 nukleotidů.
- 2) Identifikace sekvence o délce přibližně 22 nukleotidů v cDNA knihovně. Tyto sekvence musí přesně odpovídat genomické sekvenci organismu, z něž byly naklonovány.

Kritéria biogeneze:

- 1) Predikce vlásenkové prekurzorové struktury s nejnižší volnou energií. Neměla by obsahovat velké vnitřní smyčky nebo dlouhé nekomplementární, asymetrické úseky.
- 2) Fylogeneticky konzervovaná sekvence miRNA o délce přibližně 22 nukleotidů a jejího vlásenkového prekurzoru. Požadavky na párování jsou stejné jako u kritéria A, ale vlásenka nemusí mít nejnižší možnou volnou energii.
- 3) Zjištění zvýšené akumulace prekurzoru v případě, že je v organismu snížena funkce RNázy Dicer.

Nová mikroRNA musí před zápisem do databáze splňovat dvě z pěti uvedených kritérií, jedno z oblastí exprese a jedno z oblastí biogeneze.

V roce 2011 byla kritéria doplněna o další podmínky. Důvodem bylo odlišení sekvencí jiných sRNA a fragmentů RNA, získaných NGS technologiemi založenými na vícenásobném čtení krátkých sekvencí (obr. 6) (Kozomara a Griffiths-Jones, 2011 a Desvignes *et al.*, 2015).



Obrázek 6 Porovnání sekvencí skutečné miRNA identifikované pomocí NGS a sekvencí ne-miRNA vlásenky. Metody NGS usnadňují objev nových miRNA, ale současně také zvyšují riziko záměny s fragmenty a jinými krátkými RNA. Sekvence skutečných miRNA vykazují konzistentní místa zpracování pomocí Drosha a Dicer a nejčastější čtení bude odpovídat maturované miRNA. Náhodná čtení po celé délce vlásenky značí, že se o miRNA nejedná (převzato z Berezikov, 2011).

Databáze se potýkají s problémem odlišení reálných miRNA sekvencí od nejistých. V roce 2013 proto byla zavedena další kritéria pro „high-confidence“ miRNA – vyšší počet čtení, méně záměn v sekvencích a nižší volná energie vlásenek (Kozomara a Griffiths-Jones, 2013 a Desvignes *et al.*, 2015).

3.2.1 Krátké nekódující RNA

Krátké nekódující RNA jsou RNA dlouhé přibližně 20-30 nukleotidů, které nejsou překládány do proteinů, ale regulují geny a genomy. Ovlivňují buňku na mnoha úrovních, od struktury chromatinu, segregace chromozomů, transkripce, až po zpracování a stabilitu RNA a translaci. Krátké RNA slouží

jako specifické faktory pro navádění efektorových proteinů, zpravidla ze superrodiny proteinů Argonaute (Carthew *et al.*, 2009).

Při identifikaci nových miRNA může dojít k záměně s jinými krátkými RNA vyskytujícími se v buňce. Nejvyšší riziko takové záměny hrozí u příbuzných siRNA (short interfering RNA). Přestože miRNA jsou siRNA značně podobné co do délky i mechanismu regulace, existují mezi nimi značné rozdíly, které shrnuje tab. 2 (Budak *et al.*, (2016), Ambrose *et al.*, (2003), Carthew *et al.*, 2009).

Na rozdíl od miRNA i siRNA, piRNA nevyžadují zpracování Dicerem. Jsou dlouhé 25-30 nukleotidů a exprimované převážně v buňkách germinální linie savců. Jejich funkcí je represe transpozonů a udržení integrity genomu. Jsou generovány z jednovláknových prekurzorů a interagují výhradně s Piwi proteiny, také náležící do superrodiny proteinů Argonaute (Suh, 2011).

Tabulka 2 Srovnání vlastností mikroRNA a siRNA na základě Budak *et al.*, (2016), Ambrose *et al.*, (2003) a Carthew *et al.*, 2009.

Vlastnosti		miRNA	siRNA
Rozdílné	Původ v buňce	Endogenní	Exogenní i endogenní
	Transkripce	RNA polymerázou II, III	RNA polymerázou IV, V
	Zpracování endonukleázou Drosha	Ano	Ne
	Párování v duplexu	Imperfektní párování	Absolutní komplementarita
	Požadavky na komplementaritu cílové mRNA	Reguluje i neúplně komplementární mRNA na základě „seed“ regionu	Pro regulaci vyžaduje (téměř vždy) úplnou komplementaritu s cílovou mRNA
	Původ v genomu	Vznik transkripcí vlastních genů, z intronů (i exonů) protein kódujících genů	Vznik z úseků příbuzných transpozonům a repetit
	Množství produktů z jedné vlásenky	Z jedné vlásenky při biogenezi vzniká jedna, nebo dvě molekuly mikroRNA	Z jedné vlásenky dlouhého dvojevláknového prekurzoru vzniká větší množství siRNA
Společné	Délka vlákna	Přibližně 22 nukleotidů	
	Rozštěpení vlásenky	Zpracování RNázou Dicer	
	Regulační komplex	Regulace mRNA prostřednictvím RISC (RNA-Induced Silencing Complex)	
	Regulační mechanismus	Regulace prostřednictvím degradace mRNA i transkripční represe	

Malé RNA se vyskytují i u prokaryot. Jejich funkcí je regulace translace, většinou pomocí vazby na Shine-Dalgarno sekvenci, kde je translace u prokaryot iniciována. Podobně jako u eukaryot, jsou mRNA následně degradovány (Desnoyers *et al.*, 2013).

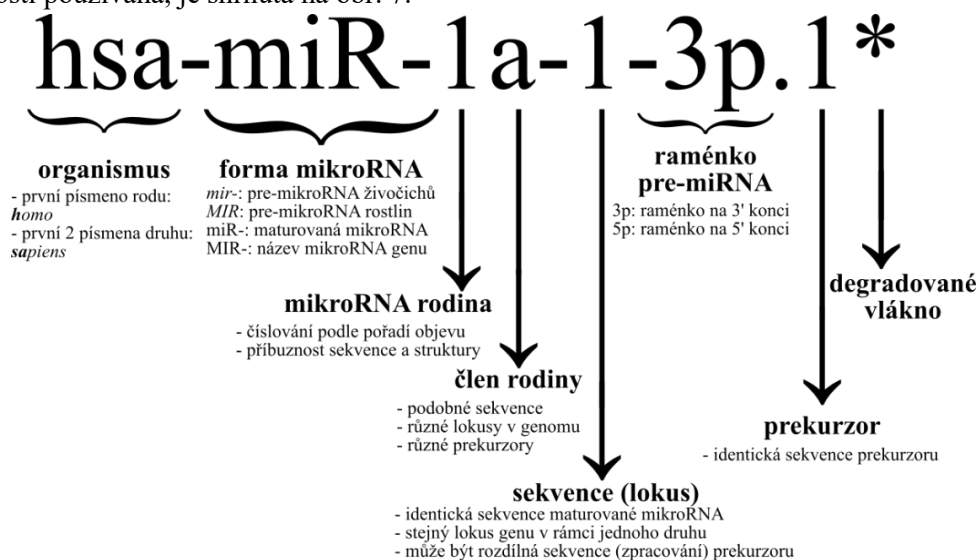
V současnosti nejznámější small RNA prokaryot je crRNA (CRISPR RNA), která slouží jako identifikátor virálních sekvencí v systému CRISPR/Cas9 a zprostředkovává antivirální imunitu bakterií. Tento systém je využíván biologickými výzkumnými laboratořemi pro stále se rozšiřující paletu metod převážně za účelem editace genomu (Rath *et al.*, 2015).

3.2.2 Nomenklatura miRNA

Názvosloví miRNA bylo ustanoveno Ambrosem *et al.* v roce 2003 a je používáno pro anotaci nově objevených miRNA a miRNA rodin. Nové názvy jsou miRNA a miRNA rodinám přiřazovány v průběhu před-publikačního procesu, aby nedošlo k překryvu.

Obecně jsou miRNA shodující se v oblasti nukleotidů 2-8 považovány za příslušníky jedné miRNA rodiny. Příbuzné sekvence jsou generovány převážně genovou duplikací (Ha a Kim, 2014). Genová duplikace může nastat lokálně (tandemově, miRNA zůstávají součástí jednoho transkriptu) nebo nelokálně (miRNA je duplikována na jiný chromozom, zpravidla v důsledku genomové duplikace během evoluce). Změna sekvence duplikované miRNA může vést ke změně cílové mRNA a tím funkce miRNA v organismu (Berezikov, 2011).

V současné době je navrhována revize nomenklatury miRNA, která by brala v potaz i alternativní dráhy biogeneze a zejména byla schopná rozlišit isomiRNA – miRNA pocházející ze shodného prekurzoru, ale s odlišnou sekvencí (Budak *et al.*, 2016). Schéma používané nomenklatury miRNA tak, jak je v současnosti používána, je shrnuta na obr. 7.



Obrázek 7 Schéma názvosloví miRNA. Z názvu miRNA lze vyčíst, z jakého organismu pochází, ke které rodině miRNA náleží a kterým sekvencím v rámci ní se podobá. U miRNA v rámci jednoho druhu je číslem odlišen lokus v genomu a přesná sekvence maturované miRNA. V případě, že shodné miRNA pocházejí z různých prekurzorů, lze je od sebe rozlišit číslem za tečkou. Dále se odlišuje raménko pre-miRNA, z níž maturovaná miRNA pochází a případně, zda se jedná o vedoucí nebo degradované vlákno. Ne vždy zahrnuje název mikroRNA všechny zde popsané prvky. (Zpracováno podle Budak *et al.*, 2016 a Ondřej Slabý, Marek Svoboda, *et al.*, MikroRNA v onkologii, 2012.)

3.2.3 Biogeneze miRNA

Schéma miRNA biogeneze je uvedeno na obr. 8, str. 16.

3.2.3.1 *Transkripce pri-miRNA*

MiRNA pochází z různých oblastí genomu (Hammond, 2015 a Slezak-Prochazka *et al.*, 2013):

- 1) Intergenní miRNA
- 2) Intron protein-kódujícího genu (mirtrony, většina lidských miRNA)
- 3) UTR mRNA protein-kódujícího genu
- 4) Exony nekódujících genů (vzácně)

MiRNA jsou přepisovány pomocí RNA polymeráz II (Lee *et al.*, 2004) a III (Borchert *et al.*, 2006), a jejich transkripty jsou následně podobně jako protein-kódující mRNA polyadenylovány na 3' konci, s 7-methyl-guanosinovou čepičkou na 5' konci (Hammond, 2015).

Transkripce vzniká až 4000 bází dlouhá primární miRNA (pri-miRNA), která tvoří částečně komplementární vlásenku se smyčkou na jednom konci s jednovláknovými přesahy na druhém konci (Hammond, 2015 a Ha a Kim, 2014).

3.2.3.2 *Úprava mikroprocesorem na pre-miRNA*

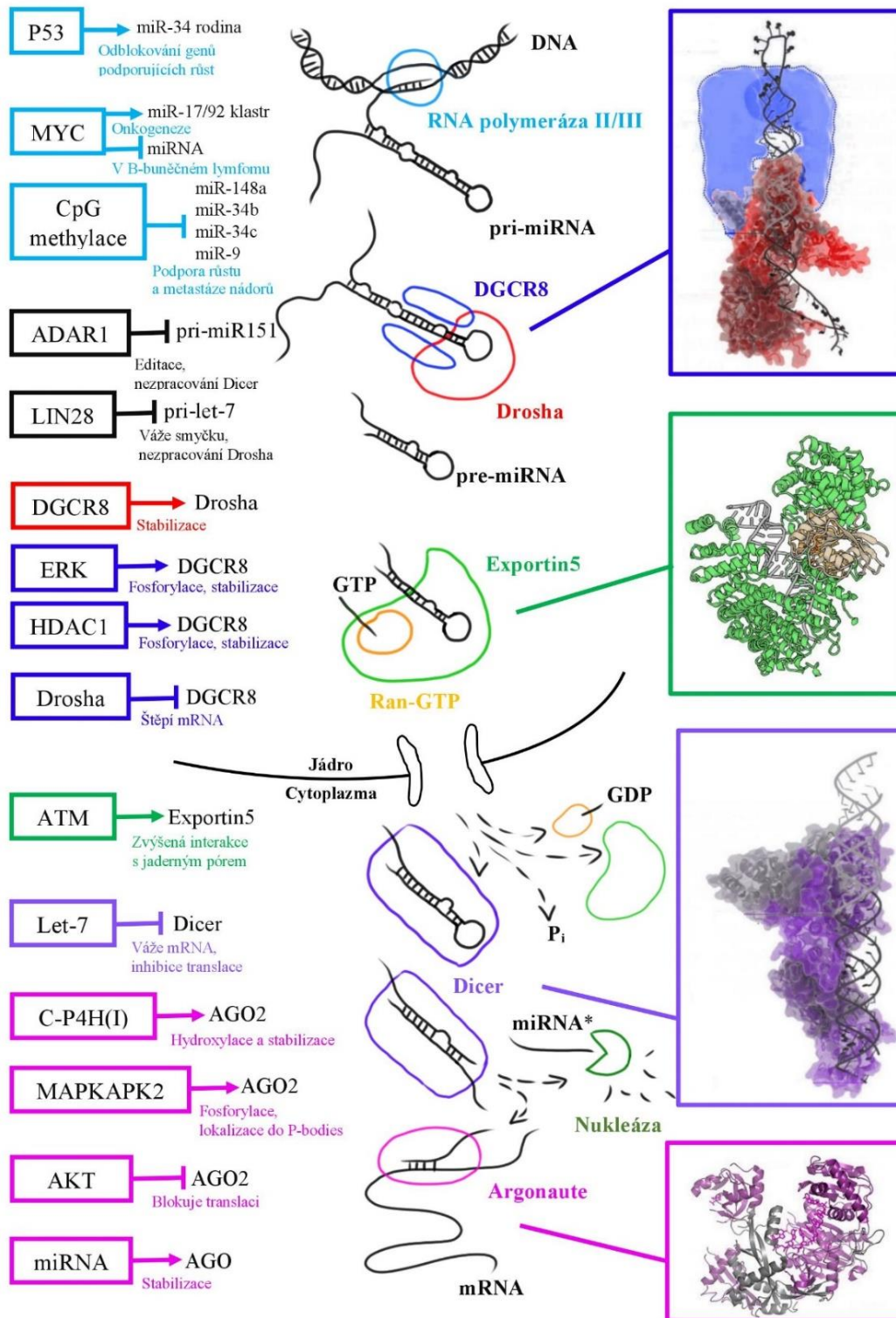
Pri-miRNA (primární miRNA) je rozpoznávána mikroprocesorem, což je heterotrimerní komplex proteinů Drosha a dvou proteinů DGCR8 (Li a Patel 2016). Tento krok probíhá v jádře buď již během, nebo těsně po transkripci pri-miRNA (Hammond, 2015). Mirtrony nejsou zpracovávány mikroprocesorem, ale spliceosomem. (Slezak-Prochazka, 2013).

Drosha je enzym RNáza III, která odštěpí dvojitou oblast pri-miRNA vlásenky. Po této reakci vzniká zhruba 60-80 nukleotidů dlouhá prekurzorová miRNA (pre-miRNA) tvořící vlásenkovou strukturu s dvounukleotidovým přesahem (Li a Patel 2016). Pokud je přesah kratší, je doplněn uridinem pomocí enzymů TUTáz (Kim *et al.*, 2016).

Funkcí DGCR8 je umožnit vazbu enzymu Drosha na dvojitou oblast pri-miRNA tak, aby štěpil ve vzdálenosti přibližně 22 nukleotidů od apikální smyčky a přibližně 11 nukleotidů od bazálního spoje pri-miRNA. (Li a Patel 2016).

3.2.3.3 *Transport pre-miRNA z jádra*

Export pre-miRNA z jádra umožňuje Exportin5 (XPO5) aktivním mechanismem závislým na hydrolyze GTP. Exportin5 interaguje s dvounukleotidovým přesahem na 3' konci pre-miRNA. Komplex pre-miRNA/XPO5/RanGTP je transportován do cytoplazmy skrz jaderný pór. V cytoplazmě dochází k přeměně Ran-GTP na Ran-GDP stimulované pomocí RanGAP a k uvolnění pre-miRNA (Wang *et al.*, 2011).



Obrázek 8 Schéma biogeneze miRNA. Pri-miRNA je prepisována z DNA pomocí RNA polymerázy, zkrácena Drosha na pre-miRNA, která je transportována z jádra pomocí Exportin5 a Ran-GTP. V cytoplasmě je upravena Dicer a v komplexu RISC s Argonaute proteiny blokuje translaci mRNA. Vlevo jsou vyznačeny některé mechanismy regulace biogeneze a jejich účinky. Vpravo jsou vybrané struktury proteinů podílejících se na miRNA biogenezi. Zpracováno podle: Ha a Kim, 2014, strukturní modely: Kwon et al., 2015, Schirle a MacRae, 2012.

3.2.3.4 Maturace mikroRNA v cytoplazmě

Druhé endonukleolytické štěpení pre-miRNA probíhá v cytoplazmě. Dicer je stejně jako Drosha RNáza III, štěpicí dvojitá RNA. PAZ doména endonukleázy Dicer specificky váže dvounukleotidový přesah na 3' konci pre-miRNA vytvořený v jádře endonukleázou Drosha (Ha a Kim, 2014).

Z vlásenky pre-miRNA vzniká duplex dvou miRNA. Dicer štěpí vlásenku v místě smyčky na jednom konci tak, že vzniká přesah na 3' konci (Ha a Kim, 2014).

Vzhledem k tomu, že jednotlivá vlákna miRNA duplexu se mohou lišit specifitou vůči cílovým mRNA, je způsob regulace jejich zařazování do RISC komplexu klíčový. Některá vlákna miRNA duplexů jsou do RISC zařazována se stejnou frekvencí, u jiných dochází k výrazné asymetrii, která se navíc může lišit mezi jednotlivými tkáněmi. K rozevření miRNA duplexu a usnadnění uvolnění vlákna určeného k degradaci (passenger strand) slouží Ago proteiny (Ha a Kim, 2014).

3.2.4 Mechanismy regulace genové exprese prostřednictvím miRNA

MiRNA regulují expresi genů v buňce zejména posttranskripčně. Cílová mRNA může být buď degradována, nebo dojde k potlačení její translace. O osudu mRNA rozhodují tři faktory: do jaké míry je k ní miRNA komplementární, kde se RISC na mRNA navazuje a typ proteinu Ago v RISC (Iwakawa a Tomari, 2015).

U živočichů se vyskytují čtyři typy proteinů Ago (Ago1–Ago4), z nichž pouze Ago2 má schopnost štěpit cílovou mRNA. Na komplex RISC se v mnoha případech navazují další proteiny, které určují způsob miRNA regulace (Iwakawa a Tomari, 2015).

3.2.4.1 mRNA degradace

K mRNA degradaci u živočichů dochází zvláště při úplné komplementaritě miRNA k mRNA, ale také i při částečném párování. Mechanismus degradace mRNA se ale v těchto dvou případech liší (Iwakawa a Tomari, 2015).

Úplná komplementarita miRNA a mRNA umožňuje endonukleolytické štěpení v rámci RISC komplexu. Zvláště živočišná miRNA ale vykazuje neúplnou komplementaritu k cílové mRNA. Rozhodující je tzv. seed region, což je oblast mezi 2. až 7. nebo 2. až 8. nukleotidem (Iwakawa a Tomari, 2015).

Nedokonalé párování znemožňuje degradaci prostřednictvím Ago proteinů. V takovém případě dochází buď k represí translace mRNA (viz dále), nebo k navázání proteinů, které zprostředkovávají deadenylaci a odstranění 7-methyl-guanosinové čepičky z mRNA. Nechráněná mRNA je pak degradována 5'-3' exonukleázami, nejčastěji XRN1 (Iwakawa a Tomari, 2015).

3.2.4.2 *Represe mRNA translace*

K represí translace dochází v iniciačním kroku. U živočichů byly zatím popsány tři možné způsoby translační represe prostřednictvím miRNA (Iwakawa a Tomari, 2015):

- 1) Navázání translačních inhibitorů prostřednictvím multiproteinového komplexu GW182, který přímo interaguje s proteiny Ago.
- 2) Disociace faktoru eIF4A z pre-iniciačního komplexu, který slouží jako helikáza a umožňuje navázání ribozomu a nalezení start kodonu.
- 3) Uvolnění proteinů PABP pomocí GW182, čímž následně nedojde k rozpoznání poly-A řetězce mRNA, a tedy i navedení iniciačního komplexu translace k 3' konci mRNA a start kodonu.

3.2.5 *MikroRNA a nádorová onemocnění*

Vzhledem k obrovskému vlivu miRNA na expresi genů v buňce lze očekávat, že se budou v případě deregulace také značnou mírou podílet na vzniku a vývoji nádorů v těle (He *et al.*, 2005; Lin a Gregory, 2015). Poprvé byl vliv miRNA na tumorigenezi popsán Calinem *et al.* již v roce 2002, spojující delecii MIR-15 a MIR-16 s chronickou lymfatickou leukémií.

MiRNA deregulace hrají klíčovou roli ve vzniku a progresi nádorových onemocnění. A to jak v důsledku inhibice („loss of function“), tak v důsledku funkční změny („gain of function“) miRNA, jejich cílových mRNA nebo proteinů podílejících se na jejich biogenezi (Lin a Gregory, 2015).

MikroRNA mohou mít v buňce onkogenní i tumor supresorovou funkci. Vzhledem k zapojení miRNA do mnoha různých biochemických a signalizačních drah (a obvyklému cílení více než jedné mRNA), může navíc jedna miRNA působit u jednoho typu rakoviny jako onkogenní faktor, zatímco v druhém případě rakovinu potlačovat. Příkladem je miR-29: u rakoviny prsu byla identifikována jako onkogen, ale u rakoviny plic byla zjištěna její zcela opačná funkce (Reddy, 2015).

Bylo zjištěno, že více než polovina miRNA genů se nachází v oblastech, jejichž poškození je často spojováno s různými typy rakoviny, včetně křehkých míst („fragile sites“) na chromozomu. Aberantní exprese genů je v nádorech obvyklá, což potvrzují data z mikroarray analýz (Reddy, 2015). Globálně je však exprese miRNA v nádorech potlačena (Lin a Gregory, 2015).

3.2.5.1 *Klinické využití mikroRNA*

Expresí některých miRNA v určitých nádorech mají charakteristický profil. Této skutečnosti je možné využít pro vývoj diagnostických metod. Z dat miRNA exprese lze vyčíst informace o typu nádoru, jeho progresi a případnou prognózu či predikci léčby. Často bývají profily miRNA získávány z tělních tekutin pomocí málo invazivních metod (Reddy, 2015).

V současnosti probíhají klinická testování diagnostických metod s miRNA jako biomarkery. Například miRNA cirkulující v tělních tekutinách jako míra terapeutické odpovědi na léčbu rakoviny prsu nebo vaječníku, nebo konkrétně miR-10b jako biomarker grade gliomu (Reddy, 2015).

3.2.5.2 Metody detekce miRNA

Detekce miRNA je vzhledem k jejich unikátním vlastnostem sice nenáročná, avšak vyžaduje upravené molekulárně-biologické metody. Problematická je zejména jejich krátká délka (z důvodu nízké T_m – teploty tání – u prob a primerů), vysoká homologie (komplikuje návrh specifických prob a primerů) a velké rozpětí koncentrací (od několika molekul na buňku po desetitisíce) (Dong *et al.*, 2013).

Northern blotting se využívá pro detekci miRNA v malém měřítku. Jeho hlavní nevýhodou je, že je pro detekci potřeba velké množství RNA (řádově μg). Vyšší úroveň citlivosti lze dosáhnout s použitím LNA (lock nucleic acid) prob, které jsou „uzamčené“ pomocí vnitřních vazeb na sacharidové části některých nukleotidů tak, že si udrží optimální konformaci pro hybridizaci a tím zvyšují T_m komplexu (Dong *et al.*, 2013).

Standardním postupem pro měření exprese miRNA je RT-qPCR. Před samotnou qPCR je nutné miRNA přepsat do cDNA. Návrh primerů využívá zpravidla jednu ze dvou strategií: polyadenylaci cDNA a následné použití oligo d(T) primerů nebo vytvoření primerů specifických pro danou miRNA po jejím prodloužení o specifickou konstantní sekvenci. RT-qPCR je vhodnou metodou pro validaci výsledků z microarray a NGS analýz. Řádově detekuje a kvantifikuje i ng miRNA (Dong *et al.*, 2013).

Microarray je vedle NGS standardní technika profilování miRNA, schopná zachytit velké množství různých miRNA i v nízkých koncentracích. Samostatně je ovšem pro kvantifikaci a měření úroveň exprese jednotlivých miRNA nevhodná. Důvodem je nízká specifita u homologních miRNA, špatná optimalizace T_m pro velké množství různých sekvencí a vysoká cena. Dalším problémem je odlišení delších RNA sekvencí (např. pri-miRNA) (Dong *et al.*, 2013).

Sekvenování miRNA se v současné době provádí převážně metodou NGS. Pro predikci nových miRNA ze získaných dat se využívá specializovaný software, např. mirDeep, který vyhledá ve frekvenci čtení znaky specifické pro miRNA. Na základě porovnání sekvencí miRNA a mRNA lze také do určité míry předpovědět možné cíle dané miRNA (Motameny *et al.*, 2010).

3.3 Molekulární charakteristika meningiomů

Vznik, progres a charakteristika meningiomů je řízena genetickými změnami, zejména mutacemi typických genů, ale také změnami jejich exprese. Nejčastější chromozomální změna u meningiomů je monosomie chromozomu 22 (kde se mj. nachází i gen NF2), popřípadě ztráta jeho krátkého raménka. Pro WHO grade II meningiomy jsou typické ztráty chromozomů 1p, 6q, 10, 14q, 18q a 22q, případně zisk genetického materiálu v oblastech 1q, 6q, 9q, 12q, 15q, 17q nebo 20q. WHO grade III meningiomy často vykazují ztráty chromozomů 6q, 10 a 14q (Galani *et al.*, 2017).

3.3.1 Mutace protein-kódujících genů

Mutace v genu NF2 je nejčastější mutací přítomnou v meningiomech. Byly popsány Rutledge *et al.* v roce 1994, ale meningiomy byly asociovány s neurofibromatózou typu 2 již dříve. Mutace NF2 byla

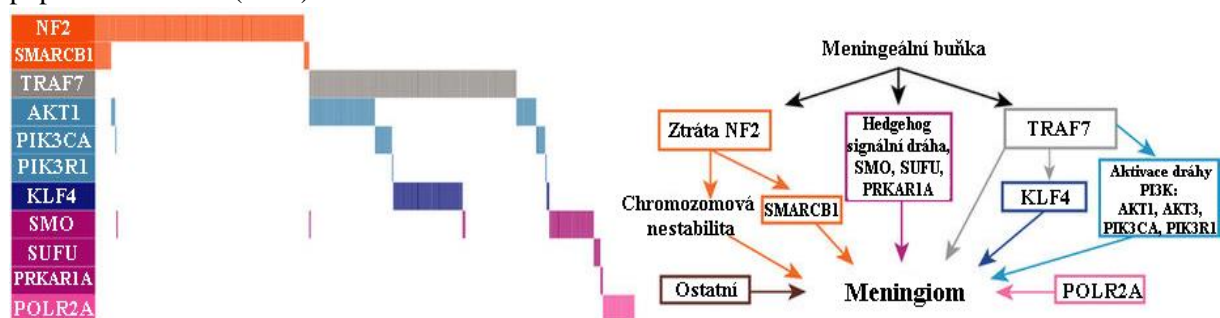
zjištěna u všech tří grade meningiomů. Proto se spekuluje o tom, že vyřazení genu NF2 z funkce hraje roli při vzniku meningiomů, spíše než v jejich progresi (Wenya *et al.*, 2015). Clark *et al.* (2016) popsali častý společný výskyt mutací v genu NF2 a SMARCB1. Ze stejné proteinové rodiny 4.1 jako NF2 pochází i DAL-1, další protein považovaný za faktor při vzniku meningiomů (Gutmann *et al.*, 2000). Gen NF2 kóduje součást aktinového cytoskeletu a fibroblastický charakter benigních meningiomů je spojený s jeho ztrátou (Marosi *et al.*, 2008).

Většina meningiomů je mutovaná v oblasti NF2 genu. Existují ale i mutace, které jsou pro meningiomy typické, a nevyskytují se zároveň s mutací NF2 – nádor tedy vzniká jiným způsobem. Clark *et al.* (2016) navrhli rozdělit tyto tzv. non-NF2 meningiomy do podskupin podle typů vznikajících mutací a drah, které ovlivňují (obr. 9).

AKT1 je důležitý aktivační protein signálních drah PI3K/AKT. Jeho mutace byla popsána Brastianos *et al.* (2013) a Clark *et al.* (2013). Vyskytuje se zároveň s mutací v TRAF7, ale nebyla zjištěna v kombinaci s mutací v KLF4, což je gen podporující dediferenciaci buněk (Clark *et al.*, 2013).

Mutace v genu SMO byla popsána v publikacích Brastianos *et al.* (2013) a Clark *et al.* (2013). Meningiomy s mutovaným SMO vykazovaly zvýšenou expresi a aktivaci Hedgehog signální dráhy (Clark *et al.*, 2013).

Mutace v genu SUFU (suppressor of fused homolog) byla poprvé popsána Aavikko *et al.* u finské rodiny trpící mnohočetnými meningiomy v roce 2012. SUFU je hlavní negativní regulátor v Hedgehog signální dráze u lidí mj. interakcí s GLI1. Záměna argininu za cystein v N-terminální doméně v této mutaci pravděpodobně způsobuje, že terciární struktura proteinu je nestabilní. Dosud popsané mutace v genu SUFU jsou spojovány s agresivními dětskými meduloblastomy. Somatickou mutaci genu SUFU poprvé popsal Clark *et al.* (2016).



Obrázek 9 Rozdělení meningiomů do skupin podle mutací, které se v nich nacházejí. Vlevo: Výskyt mutací v meningiomech ve studii provedené Clark *et al.*, 2016. Jeden sloupec představuje jeden vzorek meningiomu, čárka ve sloupci je výskyt mutace v daném genu. Ve sloupcích je tedy možno sledovat, které mutace se vyskytují v meningiomech společně a které se vzájemně vylučují. Vpravo: Návrh rozdělení meningiomů do skupin na základě molekulárních charakteristik – mutovaných genů drah, kterých se mutace dotýkají a pravděpodobně vedoucích ke vzniku meningiomu. Barvy skupin korespondují mezi oběma obrázky. Převzato a upraveno z Clark *et al.*, 2016.

POLR2A je gen kódující největší katalytickou podjednotku RNA polymerázy II. Genomické mutace postihující RNA polymerázu II zatím nebyly popsány u žádné lidské patologie. Předpokládala se nenahraditelná role RNA polymerázy II v organismu. Clark *et al.* (2016) popsali somatickou mutaci genu POLR2A v meningiomech, u kterých nebyla zjištěna mutace v žádných jiných známých genech spojených se vznikem meningiomů.

Se světlobuněčnými meningiomy je spojována ztrátová mutace v genu SMARCE1. Gen SMARCE1, podobně jako SMARCB1, kóduje protein interagující s chromatinem. V některých případech se jedná o mutaci zárodečných buněk (dědičnost v rodinách), vznik a role mutací v sporadických meningiomech zatím nebyl objasněn (Smith *et al.*, 2017).

V současné době napomáhají detekce mutací v některých genech zařazení meningiomu do WHO grade, případně zpřesnění prognózy s ohledem na očekávanou agresivitu nebo progresi meningiomu (Louis *et al.* 2016).

3.3.2 Long non-coding RNA v meningiomech

MEG3 je lncRNA kódovaná oblastí 14q32. Funguje jako nádorový supresor. Zhang *et al.* (2010) zjistili, že MEG3 je značně exprimovaná v normální arachnoidální tkáni, zatímco její exprese je potlačena v meningiomech. Míra exprese MEG3 v meningiomu navíc koreluje s WHO grade meningiomů – čím nižší množství a exprese MEG3, tím vyšší grade. Exprese MEG3 byla ve studii omezena jak ztrátou kopie genu, tak zvýšenou metylací CpG ostrůvků v promotoru MEG3.

Zhang *et al.* (2010) dále popsali, že v buněčných kulturách odvozených z meningiomů MEG3 stimuluje aktivitu proteinu p53 a inhibuje proliferaci.

3.3.3 miRNA v meningiomech

První studie zjišťující změny exprese miRNA v meningiomech byla provedena Saydam *et al.* v roce 2009. Autoři srovnali expresi 407 známých miRNA ve 14 WHO I grade meningiomech se vzorky normální arachnoidální tkáně. Charakterizovali profil 43 miRNA, jejichž exprese byla v meningiomech deregulována, a charakterizovali mechanismus působení snížené exprese miR-200 na vznik nádoru.

Profil exprese miRNA v meningiomech zjišťovali Zhi *et al.* (2013). Na základě porovnání s okolní tkání identifikovali 14 miRNA se signifikantně změněnou expresí. Snížení nebo zvýšení miRNA v některých případech korelovalo s klinickými faktory, například zvýšená exprese miR-190a byla zjištěna v recidivujících meningiomech.

Zhi *et al.* v roce 2016 dále popsali set šesti miRNA, které by mohly sloužit jako biomarker meningiomů. Jednalo se o cirkulující miRNA v krevním séru. Bylo zjištěno, že zvýšené množství miR-219-5p v séru koreluje s grade meningiomu, přestože v předchozí studii autorů (2013) byla exprese této miRNA v tkáni meningiomů snížena. S vyšší pravděpodobností recidivy byly také spojeny změny koncentrace miR-409-3p a miR-224.

Ludwig *et al.* (2017) srovnávali změnu exprese miRNA mezi histologickými subtypy a grade meningiomů. Získané výsledky srovnávali se známými i možnými mRNA cíli deregulovaných miRNA. Výsledkem studie byl diagnostický model založený na rozdílné expresi miR-222, miR-497, miR-34a* a miR-136 schopný s přesností 82 % rozlišit meningiomy grade I a II.

4 MATERIÁL A METODY

Primárním cílem studie je vytvoření diagnostického panelu na bázi miRNA, pomocí kterého by bylo možné predikovat recidivu meningiomu u pacientů, jimž byl chirurgicky odstraněn primární nádor.

Experiment byl rozdělen do dvou fází. První fáze zahrnovala izolaci RNA z archivních vzorků meningiomů jak recidivujících, tak nerecidivujících pacientů. Následovala analýza pomocí microarray s identifikací miRNA, u nichž došlo mezi recidivujícími a nerecidivujícími vzorky ke statisticky významné změně exprese. Druhá fáze experimentu byla validační. Byla ověřována změna exprese u vybraných miRNA pomocí qPCR. Na základě dat z qPCR byl vytvářen model diagnostického panelu miRNA a byla zjišťována jeho schopnost identifikovat recidivující meningiomy.

4.1 Biologický materiál

Pro všechny analýzy byly používány řezy chirurgicky odstraněných meningiomů ve Fakultní nemocnici Olomouc, fixovaných ve formalinu a uchovaných v parafinu (FFPE) při pokojové teplotě.

4.1.1 Vzorky meningiomů pro microarray analýzu

Bylo použito 30 nepárových vzorků meningiomů získaných od pacientů bez progresse onemocnění a 15 párových vzorků (tedy celkem 30) meningiomů pacientů s alespoň jednou recidivou a progresí. První vzorek v páru je tedy z primárního nádoru a druhý pochází z jednoho z nových nádorů po první operaci u daného pacienta. Další informace o obou skupinách pacientů jsou shrnuty v tab. 3.

Tabulka 3 Přehled informací o pacientech, jejichž vzorky byly použity pro microarray analýzu. Závorky u věku pacientů při diagnóze meningiomů značí odlehle hodnoty, tj. pacienty, kteří měli výrazně nižší věk, než je obvyklé (případové studie).

Skupina bez recidivy s progresí							
		Ženy	Muži	Průměrný věk při diagnóze	Recidiva	Recidiva s progresí	celkem
Grade	I	10	0	(36) 52,7	1	0	10
	II	7	3	(33, 37) 58,1	1	0	10
	III	6	4	(32) 63,5 (99)	2	0	10
celkem		23	7	(32, 33, 36, 37) 59,4	4	0	30
Skupina s recidivou a progresí							
		Ženy	Muži	Průměrný věk při diagnóze	Recidiva	Recidiva s progresí	celkem
Grade	I	2	5	(35, 30) 52,4	7	5	7
	II	4	1	(34) 63	5	5	5
	III	0	1	53	1	1	1
	nespecifikován	1	1	44,5	2	2	2
celkem		7	8	(30, 34, 35) 54,7	15	13	15

U některých pacientů zařazených do nerecidivující skupiny k recidivě došlo, ale meningiom z recidivy není párový, případně není k dispozici vůbec, a proto z něj nemohl být vytvořen párový vzorek jako u recidivujících pacientů.

Jako negativní kontroly bylo použito 5 vzorků arachinoidální tkáně z archivu Fakultní nemocnice v Olomouci, které byly získány při operacích hlavy od pacientů netrpících žádným nádorovým onemocněním.

4.1.2 Vzorky meningiomů pro validační fázi

Ve validační fázi byl použit zcela odlišný set vzorků než pro hybridizaci na microarray. Pro analýzu bylo vybráno 32 vzorků primárních nádorů (získaných při první operaci, před recidivou) od pacientů s recidivou a progresí a 32 vzorků od pacientů bez recidivy a progresse meningiomů. Vzorky jednotlivých skupin byly párovány na základě grade meningiomu a věku, pohlaví, výšky a váhy pacienta. Informace o pacientech jsou shrnuty v tab. 4.

Tabulka 4 Informace o pacientech druhého setu vzorků, určeného pro validaci microarray analýzy pomocí qPCR metody. Závorky u věku pacientů při diagnóze meningiomů značí odlehle hodnoty, tj. pacienty, kteří měli výrazně nižší věk, než je obvyklé (případové studie).

Skupina bez recidivy s progresí							
		Ženy	Muži	Průměrný věk při diagnóze	Recidiva	Recidiva s progresí	celkem
Grade	I	21	7	(25) 52,7	0	0	28
	II	2	2	58	0	0	4
	III	0	0	-	-	-	0
celkem		23	9	(25) 53,5	0	0	32
Skupina s recidivou a progresí							
		Ženy	Muži	Průměrný věk při diagnóze	Recidiva	Recidiva s progresí	celkem
Grade	I	20	8	(35, 21) 51,1	28	2	28
	II	2	2	57,7	4	1	4
	III	0	0	-	-	-	0
	nespecifikován	0	0	-	-	-	0
celkem		22	10	(35, 21) 52	32	3	32

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Pro všechny experimentální metody byly použity komerční soupravy, individuální chemikálie byly používány pouze v případě, že nebyly dodávány společně se soupravou. Pro techniku izolace RNA z parafinových vzorků meningiomů byl optimalizován lyzační roztok, který byl připravován pro každou izolaci zvlášť a jehož složení je uvedeno v popisu metody.

4.2.1 Chemikálie

Pro izolaci a analýzu vzorků byly použity komerční soupravy. Chemikálie, které nebyly jejich součástí a musely být dodány samostatně, jsou uvedeny v tab. 5.

Tabulka 5 Tabulka použitých chemikálií, které nebyly součástí komerčně dodávaných souprav pro izolaci a analýzu, a jejich koncentrací.

Chemikálie	Koncentrace	Výrobce
Chloroform	99 %	Sigma Aldrich
Ethanol	99,9 %	Lach-ner
DEPC ošetřená voda	-	Ambion
Tris pH 7,4	1 mmol/l	Canvax Biotech
TE pufr	0,1×	QIAGEN
SDS	10 %	Sigma Aldrich
EDTA	0,5 mol/l	Sigma Aldrich
Proteináza K	10 mg/ml	Bioline
RNAsin	10 000 U	Promega

4.2.2 Komerční soupravy

Pro izolaci vzorků a provedení analýz pomocí microarray a qPCR byly použity komerční soupravy, jejichž seznam je uveden v tab. 6.

Tabulka 6 Seznam použitých komerčních souprav pro izolaci a analýzu pomocí microarray a qPCR. V tabulce je uvedeno, k čemu byla souprava použita, její název a výrobce.

Použití	Název	Výrobce
Izolace RNA	miRNeasy Mini Kit	QIAGEN
Microarray – značení	FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit	Affymetrix
Microarray – čipy	Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Array	Affymetrix
Reverzní transkripce	TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Single-tube assays).	Thermo Fisher Scientific
qPCR – sondy a primery	TaqMan Advanced miRNA Assay	Thermo Fisher Scientific
qPCR mix	TaqMan Fast Advanced Master Mix 2×5 ml	Thermo Fisher Scientific

Pro detekci signálu při qPCR byly použity sondy TaqMan Advanced miRNA Assay dodané firmou Thermo Fisher Scientific. Jejich seznam a cílové miRNA jsou uvedeny v tab. 7 na následující straně.

Tabulka 7 Seznam sond použitých pro RT-qPCR. Sonden byly dodány firmou Thermo Fisher Scientific. V tabulce je uvedeno Assay ID sondy, které slouží pro identifikaci konkrétní sondy v rámci Thermo Fisher Scientific, a údaje o cílové miRNA.

Assay ID	Cílová miRNA	Sekvence cílové miRNA
478254_mir	hsa-miR-107	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCA
477860_mir	hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
478853_mir	hsa-miR-371b-5p	ACUCAAAAGAUGGCGGCACUUU
477858_mir	hsa-miR-15a-5p	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG
478162_mir	hsa-miR-572	GUCCGCUCGGCGGUGGCCCA
478107_mir	hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUACUGAGUU
478264_mir	hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA
478947_mir	hsa-miR-498	UUUCAAGCCAGGGGGCGUUUUUC
478551_mir	hsa-miR-18a-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG
477840_mir	hsa-miR-130b-3p	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU
478399_mir	hsa-miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
478674_mir	hsa-miR-1271-5p	CUUGGCACCUAGCAAGCACUCA
478323_mir	hsa-miR-331-3p	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA
479235_mir	hsa-miR-30e-5p	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG
477909_mir	hsa-miR-140-5p	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG
478576_mir	hsa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
478577_mir	hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
478583_mir	hsa-miR-181b-5p	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU
478543_mir	hsa-miR-1281	UCGCCUCCUCCUCUCCC
478024_mir	hsa-miR-324-5p	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU
miR-320c.1.1767	hsa-miR-320c	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Seznam přístrojů a zařízení, které byly použity během izolace a analýzy miRNA, je uveden v tab. 8 na následující straně.

Tabulka 8 Přehled použitých přístrojů a zařízení. V tabulce je uveden přístroj (popř. jeho využití), jeho model a výrobce.

Přístroj	Model	Výrobce
Flowbox – izolace	AURA 2000 MAC	BIOAIR INSTRUMENTS
Flowbox – příprava PCR	Scanlaf Mars 900	LaboGene
Flowbox – post-PCR	Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific
Chlaz. centrifuga – izolace	Hermle Z 323 K, chlazená	Labnet
Centrifuga – izolace	Smart 15 Micro Centrifuge	Hanil Science
Centrifuga – post-PCR	Centrifuge 5430	Eppendorf
Termoblok – izolace	Digital Dry Bath 2 Blocks	Thermo Fisher Scientific
Nanodrop	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific
RT-qPCR termocykler	LightCycler 480	Roche
Termocykler – postPCR	Mastercycler Nexus	Eppendorf
Promývací stanice	GeneChip Fluidics Station 450	Applied Biosystems
Pícka	Affymetrix GeneChip Hybridization Oven 645	Applied Biosystems
Sken na microarray čipy	Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G	Applied Biosystems
Automatický pipetor	Freedom EVO 150	Tecan
Automatický ultrazvukový pipetor	Echo 555	Labcyte

4.4 Použité experimentální postupy

Primární data byla získána experimentálními laboratorními metodami. Byla izolována celková RNA ze vzorků meningiomů a změřena její koncentrace a čistota. Data o expresi miRNA v jednotlivých vzorcích byla získána metodou microarray a ověřena qPCR (po reverzní transkripci do cDNA).

4.4.1 Izolace RNA z parafinových řezů meningiomů

Pro izolaci celkové RNA ze vzorků meningiomů byl použit miRNeasy Mini Kit (QIAGEN), výrobcem je udávána vysoká výtěžnost zvláště krátkých RNA.

1. Příprava 20 ml lyzačního roztoku smícháním chemikálií uvedených v tab. 9.

Tabulka 9 Složení lyzačního roztoku použitého pro izolaci RNA ze vzorků.

Složka	Koncentrace	Objem [ml]
Sterilizovaná voda	-	13,95
SDS	10 %	2
Tris pH 7,4	1 mol/l	2
Proteináza K	10 mg/ml	1
EDTA	0,5 mol/l	0,8
RNAsin	10 000 U	0,25

2. Přidání 44 ml absolutního ethanolu (99%) do pufru RPE a 30 ml do RWT.

3. Přidání 500 µl lyzačního roztoku do mikrozkuavek s parafinovými řezy meningiomů.
4. Seškrábnutí vyčnívajících řezů do lyzačního roztoku pomocí špičky pipety.
5. Inkubace 12 hodin při 60 °C na termobloku.
6. Přidání 700 µl QIAzol Lysis Reagent do každé mikrozkuavky a důkladné zvortexování.
7. Inkubace 5 minut při pokojové teplotě.
8. Přidání 140 µl chloroformu do každé mikrozkuavky. Důkladné zvortexování.
9. Inkubace 5 minut při pokojové teplotě.
10. Centrifugace po dobu 15 minut, při 12 000 g a 4 °C.
11. Přenesení supernatantu do nové mikrozkuavky. Přidání 1000 µl absolutního ethanolu a promíchání natahováním a vypouštěním roztoku z pipety.
12. Přenesení 700 µl roztoku z kroku 11 na kolonku RNeasy Mini Spin Column. Centrifugace po dobu 15 sekund při 8 000 g a pokojové teplotě.
13. Opakování kroku 12 do přenesení veškerého roztoku z kroku 11.
14. Přenesení 700 µl RWT pufru na kolonku. Centrifugace po dobu 15 sekund při 8 000 g a pokojové teplotě. Odstranění filtrátu.
15. Přenesení 500 µl RPE pufru na kolonku. Centrifugace po dobu 15 sekund při 8 000 g a pokojové teplotě. Odstranění filtrátu.
16. Přenesení 500 µl RPE pufru na kolonku. Centrifugace po dobu 2 minut při 8 000 g a pokojové teplotě. Odstranění filtrátu.
17. Centrifugace po dobu 1 minuty při 15 000 g a pokojové teplotě pro vysušení kolonky.
18. Přemístění kolonky do nové 1,7ml mikrozkuavky. Odstranění filtrátu i s předchozí mikrozkuavkou.
19. Přenesení 30 µl RNase-free vody na membránu kolonky tak, aby membrána nebyla porušena. Centrifugace po dobu 1 minuty při 8 000 g a pokojové teplotě.
20. Odstranění kolonky, uzavření mikrozkuavky a uchování vzorku při -80 °C.

4.4.2 Spektrofotometrické měření koncentrace RNA

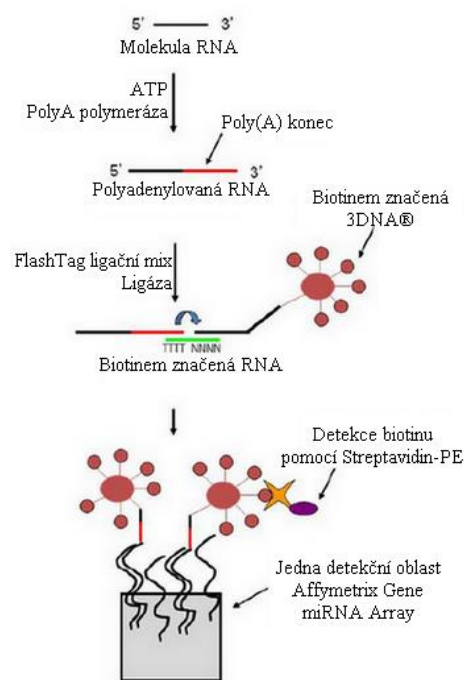
Pro změření koncentrace a čistoty RNA získaných při izolaci byl použit NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

1. Přenesení 1,5 µl RNase-free vody (stejně, která byla použita při izolaci) na čidlo Nanodropu.
2. Změření spektra RNase-free vody jako slepý vzorek. Setření vody z čidla buničinou.
3. Přenesení 1,5 µl vzorku RNA na čidlo Nanodropu.
4. Změření spektra vzorku. Vyčištění čidla buničinou. Opakování pro další vzorky.
5. Opětovné změření spektra vody a export dat.

4.4.3 Microarray na čipu

Microarray analýza vzorků byla provedena na čípech Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Array (Applied Biosystems). Pro značení RNA ve vzorcích před aplikací na čipy byl použit FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit (Applied Biosystems). Kroky, které se nelišily od postupu doporučeného výrobcem, byly zkráceny. Schéma reakce je na obr. 10.

1. Předehřátí pícky na 48 °C. Rozpuštění izolovaných vzorků na ledu.
2. Úprava koncentrace izolovaných vzorků RNA pomocí Nuclease-free vody na 130 ng/8 µl v 0,2ml mikrozkuvkách.
3. Přidání 2 µl RNA Spike Control Oligos.
4. Naředění ATP mixu pomocí roztoku Tris o 1 mmol/l v poměru ATP mix:Tris 1:38,5.
5. Příprava polyadenylační reakce podle pokynů výrobce. Inkubace směsi 15 minut při 37 °C.
6. Příprava ligační reakce podle pokynů výrobce. Inkubace 30 minut při pokojové teplotě.
7. Příprava hybridizační reakce na čipy Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Array podle pokynů výrobce.
8. Inkubace čipů v pícce po dobu 16–18 hodin při 48 °C a 60 rpm.
9. Vyjmutí čipů z pícky a odstranění hybridizační směsi z čipu pomocí pipety do nových mikrozkuvek. Uchování hybridizační směsi.
10. Příprava promývací stanice. Naskenování ID čipů do software Affymetrix GeneChip Command Console.
11. Promytí čipů na promývací stanici podle pokynů výrobce.
12. Vyjmutí čipů z promývací stanice a vložení do skeneru. Naskenování čipů.
13. Úprava skenů čipů pomocí Affymetrix GeneChip CommandConsole software. Export souborů CEL.



Obrázek 10 Schéma označení miRNA a následné microarray analýzy. Molekula RNA je nejprve polyadenylována na 3' konci, a na polyadenylovaný konec je následně ligázou navázána rozvětvená nukleová kyselina nesoucí biotin. Po hybridizaci RNA na microarray čip je biotin detekován značeným streptavidinem. Převzato z brožury pro FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit (Applied Biosystems).

4.4.4 Reverzní transkripce

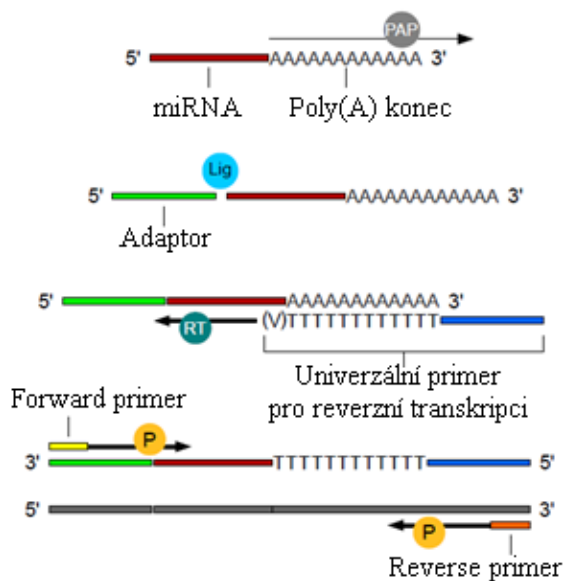
Pro validační část experimentu byl použit jiný set vzorků. Z nich izolovaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit. Kroky, které se nelišily od postupu doporučeného výrobcem, byly v textu zkráceny. Schéma reakcí je uvedeno na obr. 11 na str. 31.

1. Úprava koncentrace vzorků RNA pomocí DEPC vody tak, aby byla ≤ 5 ng/ μ l.
2. Příprava směsi pro polyadenylaci podle tab. 10 pro požadovaný počet reakcí.

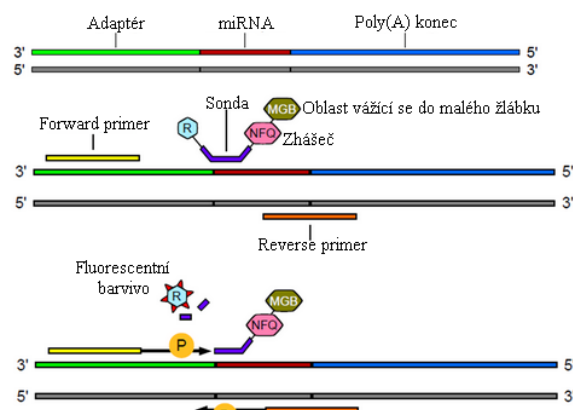
Tabulka 10 Složení směsi pro polyadenylaci před reverzní transkripcí vzorku. Oproti složení uvedenému výrobcem se liší přidávkem RNasinu pro snížení kontaminace RNázami.

Složka	Množství (1 reakce) [μ l]
10X Poly(A) pufr	0,5
ATP	0,5
Poly(A) enzym	0,3
RNase-free voda	1,4
RNasin	0,3
Celkový objem	3,0

3. Přenesení 2 μ l zředěných vzorků do 0,2ml mikrozkušavek. Přidání 3 μ l polyadenylační směsi ke každému vzorku.
4. Vložení zkumavek do termocyklu a provedení polyadenylační reakce při teplotním profilu dle pokynů výrobce.
5. Příprava směsi pro ligaci adaptorů na RNA dle pokynů výrobce. Přidání 10 μ l ligační směsi ke vzorkům z předchozího kroku.
6. Provedení ligační reakce v termocyklu při teplotním profilu dle pokynů výrobce.
7. Příprava směsi pro reverzní transkripci dle pokynů výrobce. Přidání 15 μ l směsi ke vzorkům z předchozího kroku.
8. Provedení reverzní transkripce v termocyklu při teplotním profilu dle pokynů výrobce.
9. Příprava směsi pro amplifikační reakci dle pokynů výrobce. Přenesení 45 μ l amplifikační směsi do nové 0,2 μ l mikrozkušavky.
10. Přenesení 5 μ l produktu reverzní transkripce do mikrozkušavek k amplifikační směsi. Uchování zbylé cDNA při -20 °C.
11. Provedení amplifikační reakce v termocyklu dle pokynů výrobce.
12. Uchování amplifikovaných vzorků při -20 °C.



Obrázek 12 Schéma reakcí vedoucích k reverzní transkripci miRNA. Nejprve byla miRNA ve vzorku polyadenylována pomocí poly(A) polymerázy (PAP). Následně k ní byl navázán adaptor pomocí ligázy (Lig). Poly(A) konec umožnil reverzní transkripci miRNA do cDNA pomocí reverzní transkriptázy (RT). cDNA byla následně amplifikována pomocí primerů specifickým k oblastem navázaného adaptoru a primeru pro reverzní transkripci. Převzato a upraveno z TaqMan Advanced miRNA cDNA



Obrázek 11 Schéma RT-qPCR reakce. Z miRNA odvozená cDNA je amplifikována pomocí univerzálního primeru pro navázaný adaptor o známé sekvenci a specifického primeru vážícího se do oblasti 3' konce původní miRNA a části poly(T) konce cDNA. Amplifikace byla detekována pomocí specifické fluorescentní sondy, která byla degradována polymerázou při prodlužování primeru. Degradaci došlo k oddělení zhášče a emisi záření fluorescentního barviva.

4.4.5 qPCR

Kvantitativní PCR byla provedena pomocí sond TaqMan Advanced miRNA Assay a PCR směsi TaqMan Fast Advanced Master Mix. Výrobce neručil za správnost teplotního profilu qPCR pro LightCycler 480 (Roche), proto bylo nutné jej pro tento přístroj optimalizovat. Schéma mechanismu qPCR reakce je uvedeno na obr. 12. Schéma procesu je uvedeno na obr. 13 na str. 33.

1. Naředění cDNA vzorku do 0,1X TE pufru v poměru 1:9 v 384jamkové destičce (Echo Qualified, LABCYTE). Přenesení 4,5 µl vzorku a 40,5 µl 0,1X TE pufru do prvních 4 sloupců.
2. Vytvoření 4 replikátních 384jamkových destiček (LightCycler 480 Multiwell) podle templatové (z kroku 1) pomocí přístroje Echo 555 (Labcyte). Množství vzorku v každé jamce cílové destičky je 2,5 µl.
3. Příprava směsi pro RT-PCR podle tab. 11.

Tabulka 11 Složení směsi pro přípravu qPCR pomocí TaqMan Fast Advanced Master Mix a sond TaqMan Advanced miRNA Assay.

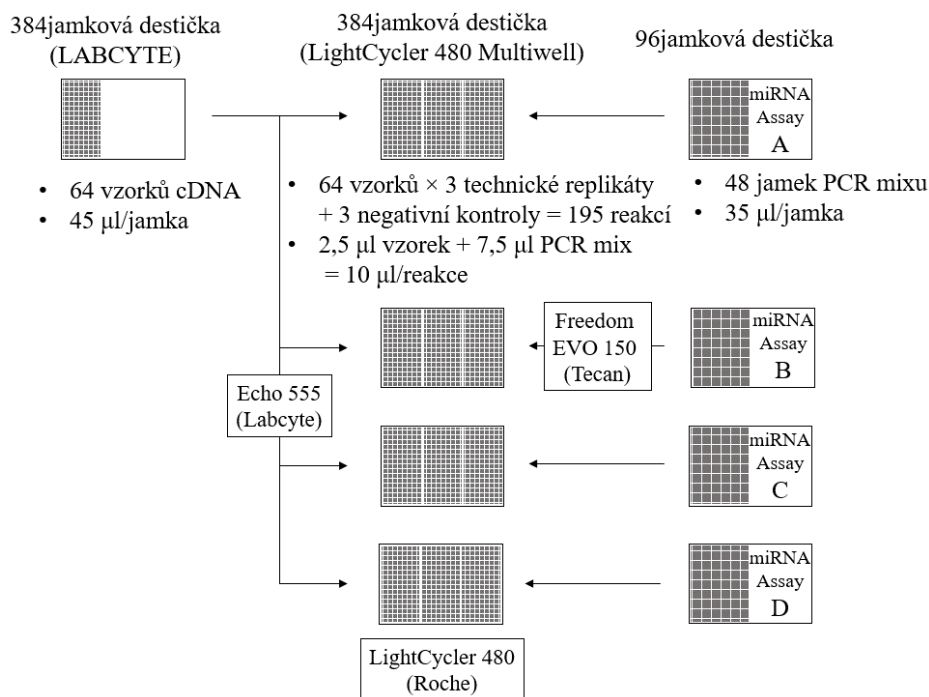
Složka	Množství (195 reakcí) [μl]
TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X)	1200
TaqMan Advanced miRNA Assay (20X)	120
DEPC treated voda	480
Celkem	1800

4. Přenesení 35 μl RT-PCR směsi do 48 jamek nové 96jamkové destičky.
5. Vložení 384jamkové destičky vzorkem do přístroje Freedom EVO 150 (Tecan), který přenesl 7,5 μl PCR směsi z 96jamkové destičky do každé jamky se vzorkem na 384jamkové destičce. Celkový objem qPCR reakce byl 10 μl.
6. Provedení qPCR reakce v přístroji LightCycler 480 (Roche). Nastavení teplotního profilu je uvedeno v tab. 12. Signál fluorescence byl snímán na konci elongační fáze při vlnových délkách 498-580 nm.

Tabulka 12 Teplotní profil qPCR reakce pomocí TaqMan Fast Advanced Master Mix a sond TaqMan Advanced miRNA Assay. Hybridizace primerů a elongace produktu probíhá v jednom kroku.

Název programu	Teplota [°C]	Čas [s]	Ramp Rate [°C/s]	Počet cyklů
Aktivace polymerázy	95	20	1,90	1
Denaturace	95	10	1,90	40
Hybridizace primerů, elongace	60	40	1,60	
Ukončení	37	1	2,20	1

7. Opakování kroků 3 až 6 pro další připravené 384 jamkové desky, pouze s použitím jiné miRNA Assay pro detekci jiné miRNA.



Obrázek 13 Schéma pipetování qPCR reakcí. Nejprve bylo do 64 jamek 384jambkové destičky přeneseno 45 µl vzorku. 384jambková destička firmy LABCYTE je speciálně upravena pro ultrazvukový transfer roztoků přístrojem Echo 555. Vzorky byly rozděleny do čtyř 384jambkových destiček (LightCycler 480 Multiwell). Zároveň byly na každé destičce vytvořeny 3 technické replikáty každého vzorku. Do 48 jamek 96jambkové destičky bylo přidáno po 35 µl připravené směsi pro PCR. Pomocí přístroje Freedom EVO 150 (Tecan) byla PCR směs přenesena do jamek se vzorkem na 384jambkové destičce. V jedné reakci (jamce) bylo 2,5 µl vzorku a 7,5 µl PCR směsi, celkový reakční objem byl tedy 10 µl. PCR reakce byla provedena v přístroji LightCycler 480 (Roche).

4.5 Použité výpočetní metody

Výpočetní metody byly použity ke statistickému zpracování primárních dat, vytvoření modelu miRNA schopného predikce recidivy meningiomu a zjištění jeho vlastností. Byly počítány změny exprese miRNA získané microarray i qPCR analýzou.

4.5.1 Použité statistické metody pro microarray analýzu

Cílem microarray analýzy bylo identifikovat diferenciálně exprimované miRNA vhodné pro zařazení do validační fáze experimentu.

1) Kontrola kvality microarray dat

Byla ověřena kvalita čipů na základě normalizovaných hodnot exprese pomocí funkce arrayQualityMetrics() knihovny arrayQualityMetrics (Bioconductor). Kontrola kvality slouží pro

zjištění microarray čipů, u nichž došlo při zpracování k systematické chybě a není možné je pro další analýzu použít.

2) Normalizace intenzity fluorescence microarray

Soubory CEL všech vzorků byly nahrány do R software pomocí příkazu `read.celfiles()` knihovny `oligo` (Bioconductor). V software R byla provedena RMA (Robust Multi-array Average) normalizace, pro kterou byla použita funkce `rma()` knihovny `affy` (Bioconductor). RMA normalizace je algoritmus, který hrubé údaje o intenzitě upraví proti signálu pozadí a nespecifické hybridizaci, následně hodnoty intenzity fluorescence transformuje pomocí logaritmu o základu 2, a nakonec provede normalizaci mezi čipy prostřednictvím kvantilové normalizace. Kvantilová normalizace spočívá v postupném nahrazování nejvyšších (druhých, třetích nejvyšších...) hodnot průměry všech čipů.

Výsledkem RMA normalizace je R objekt `affy` knihovny `ExpressionSet`, který obsahuje normalizované \log_2 hodnoty exprese jednotlivých genů každého vzorku.

3) Wilcoxonův dvouvýběrový test

Pro analýzu významnosti změny exprese miRNA mezi skupinami pacientů byl použit Wilcoxonův exaktní dvouvýběrový test. Jedná se o neparametrický test, pro jehož použití data nemusí splňovat podmínku Gaussova normálního rozdělení. Byla porovnávána neznámá rozdělení hodnot \log_2 exprese miRNA u recidivujících a nerecidivujících pacientů.

Změna exprese genů byla testována na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Dvouvýběrový Wilcoxonův test byl proveden pomocí příkazu `wilcox.exact()` v knihovně `exactRankTestsR` R software. Byly získány p hodnoty významnosti změny exprese miRNA mezi skupinami pacientů. Nulová hypotéza předpokládá, že distribuční funkce exprese miRNA je shodná ve skupině recidivujících i nerecidivujících pacientů (exprese miRNA se nemění).

Vzhledem k tomu, že hladina významnosti je zároveň pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku a vzhledem k velkému počtu opakování testu (testováno 6094 prob, 5 % z toho je přibližně 305 falešně pozitivních výsledků) bylo nutno p hodnotu upravit (adjustovat). Pomocí R software, knihovny `qvalue` a funkce `qvalue()` byly získány adjustované p hodnoty (q hodnoty). Pokud byla q hodnota miRNA menší než hladina významnosti 0,05, byla změna exprese miRNA vyhodnocena jako statisticky významná.

Hodnoty p a q byly z R software exportovány do programu Microsoft Excel, kde byly aplikovány datové filtry pro identifikaci signifikantních rozdílů v expresi miRNA.

4) Výpočet mediánu absolutní odchylky

Jako charakteristika variability dat byl použit medián absolutní odchylky od mediánu (MAD). MAD je vhodnější pro data s nenormálním rozdělením oproti standardní odchylce, protože se jedná o výpočet

robustnější vzhledem k odlehlým hodnotám. Protože byl malý počet testovaných vzorků, lze očekávat jejich nenormální rozdělení.

MAD byl vypočítán podle následujícího vzorce, kde e označuje \log_2 hodnotu exprese, i každou miRNA, j každého pacienta a k skupinu pacientů. Skupiny pacientů jsou dvě, r značí skupinu pacientů s recidivou meningiomů, n skupinu pacientů s nerecidivujícími meningiomy.

$$MAD_{ik} = \text{median}(|e_{ijk} - \text{median}(e_{ik})|)$$

Rozdíl exprese miRNA mezi skupinami byl posuzován podle rozdílu mediánu její exprese.

$$\Delta m_i = |\text{median}(e_{ir}) - \text{median}(e_{in})|$$

Podmínkou pro zahrnutí miRNA do validační fáze experimentu bylo, že se její rozdíl mediánů musí lišit minimálně o větší ze dvou MAD.

$$\frac{\Delta m_i}{\max(MAD_{ir}, MAD_{in})} \geq 1$$

4.5.2 Použité statistické metody pro validační fázi experimentu

Cílem validační fáze experimentu bylo sestavit model miRNA pro predikci recidivy meningiomů a ověřit jeho vlastnosti. Výchozími hodnotami pro zpracování byly průměry tripletů Ct zjištěné pomocí qPCR.

1) Vytvoření modelu miRNA prediktorů („best subset selection“)

Pomocí metody funkce `bess()` knihovny `BeSS` pro R software byla porovnávána schopnost různých počtů miRNA prediktorů identifikovat recidivující vzorek. Funkce `bess()` vypočítá odhad testovací chyby jednotlivých modelů pomocí algoritmu `Primal Dual Active Set (PDAS)` (Wen *et al.*, 2017). Model nejlepšího počtu prediktorů byl vybrán podle nejnižšího odhadu testovací chyby (největší pravděpodobnosti, že model pacienta správně zařadí do skupiny recidivujících/nerecidivujících). Z analýzy byly vynechány všechny vzorky, kde chyběla qPCR data pro některou testovanou miRNA (data musí být pro selekční metodu kompletní).

2) LOOCV („Leave One Out Cross-Validation“)

Dále byla ověřována testovací chyba vybraného modelu metodou LOOCV („Leave One Out Cross-Validation“), která spočívá v odstranění jednoho měření (vzorku) ze souboru a fitování multivariátního logistického regresního modelu na zbylých datech. Úspěšnost predikce recidivy získaného modelu se hodnotí na vynechaném vzorku. Testovací chyba je proporce modelem špatně identifikovaných vzorků ze všech testovaných.

Algoritmus `glm()` (v R software) nejprve vypočítá odhady koeficientů. Odhady koeficientů slouží k výpočtu poměru šancí, „odds ratio“ (OR). Odds ratio každé miRNA je číslo, které říká, kolikrát se

zvýší pravděpodobnost recidivy meningiomu, když se ΔCt miRNA zvýší o 1. Je to poměr šance, že dojde k recidivě meningiomu při určité hodnotě ΔCt ku šanci, že k recidivě meningiomu dojde při hodnotě $\Delta Ct + 1$. Šance („odds“) je poměr pravděpodobností. Vztah odds, odhadu koeficientů β (označený „0“ pro průsečík, a i pro miRNA) a ΔCt v modelu o velikosti n je následující:

$$\log(odds) = \beta_0 + \sum_{i=1}^n (\beta_i * \Delta Ct_i)$$

Pravděpodobnost, že vzorek bude recidivující, byla určena pomocí následujícího vztahu.

$$P_{rec} = \frac{odds}{1 + odds}$$

Odds ratio bylo počítáno pro každou miRNA v modelu zvlášť:

$$OR_i = e^{\beta_i}$$

3) Waldův test

Waldův test ověřuje, zda je vztah mezi vysvětlující (miRNA exprese) a vysvětlovanou hodnotou (recidiva meningiomu) signifikantní. Waldův test byl použit při sestavování predikčního modelu miRNA, do modelu byly zařazovány miRNA s p hodnotou vyšší než 0,05.

4) Výpočet senzitivity, specifity, pozitivní a negativní prediktivní hodnoty modelu

Senzitivita (SE) vyjadřuje schopnost modelu zjistit pozitivní výsledek. Počítá se jako poměr všech výsledků, které test správně vyhodnotil jako pozitivní (skutečně pozitivní, SP) a součtu všech pozitivních vzorků v testovaném souboru (včetně falešně negativních, FN). Model určil vzorek jako pozitivní při pravděpodobnosti recidivy nad 0,5 (50%).

$$SE = \frac{SP}{SP + FN}$$

Specifita (SP) je schopnost modelu vyhodnotit negativní vzorek. Vypočítá se poměrem všech výsledků, které model správně vyhodnotil jako negativní (skutečně negativních, SN) a všech negativních vzorků v testovaném souboru (včetně falešně pozitivních, FP).

$$SP = \frac{SN}{SN + FP}$$

Pozitivní prediktivní hodnota (PPH) vyjadřuje proporcii skutečně pozitivních výsledků ze všech výsledků, které model vyhodnotí jako pozitivní.

$$PPH = \frac{SP}{SP + FP}$$

Negativní prediktivní hodnota (NPH) naopak vyjadřuje proporcí modelem správně určených negativních výsledků ze všech negativně vyhodnocených výsledků.

$$NPH = \frac{SN}{SN + FN}$$

- 5) Výpočet ideální cut-off hodnoty modelu a AUC („area under the curve“, plochy pod křivkou) v ROC („receiver operating characteristic“) grafu

Ideální cut-off hodnota pravděpodobnosti, za kterou je vzorek vyhodnocen jako recidivující, byla určována pomocí ROC grafu. ROC graf testu na y-ose zobrazuje senzitivitu testu a na x-ose doplněk do specifity testu (1-specifita). Při různých hodnotách cut-off má test rozdílnou schopnost identifikovat (skutečně) pozitivní a negativní výsledky.

Do ROC grafu jsou postupně vynášeny hodnoty senzitivity a specifity pro test při zvyšující se cut-off hodnotě. Při zvýšení senzitivity testu dochází ke snížení specifity a naopak. Ideální cut-off hodnota je zjištěna jako bod nejbližší hornímu levému rohu grafu, kdy má test nejvyšší kombinaci (součet) senzitivity a specifity.

Plocha pod křivkou je měřítkem přesnosti testu. Čím více se blíží hodnotě 1 (perfektnímu testu, při 100% senzitivě 100% specifita), tím je test přesnější.

4.5.3 Výpočet změny exprese miRNA

Cílem výpočtů změny exprese bylo zjistit, kolikrát se exprese miRNA změnila mezi vzorky recidivujících a nerecidivujících meningiomů.

- 1) Výpočet změny exprese miRNA pro microarray data

Z mediánů \log_2 hodnot exprese byla vypočítán násobek změny exprese miRNA mezi skupinami pacientů („fold change“, FC). Expresse miRNA je značena e , každá miRNA i , skupina recidivujících pacientů r , skupina nerecidivujících pacientů n .

$$\log_2 FC = \log_2 \left| \frac{(e_{ir})}{(e_{in})} \right| \quad FC = \left| \frac{(e_{ir})}{(e_{in})} \right|$$

- 2) Výpočet změny exprese miRNA pro qPCR data

Pro každou analyzovanou miRNA (i) byl zjišťován násobek změny exprese (FC) mezi skupinou (k) recidivujících pacientů (r) a nerecidivujících pacientů (n) vzhledem k normalizační miRNA ($norm$).

$$\begin{aligned} \Delta CT_{ik} &= CT_i - CT_{norm} \\ \Delta \Delta CT_i &= \Delta CT_{ir} - \Delta CT_{in} \\ FC &= 2^{\Delta \Delta CT} \end{aligned}$$

5 VÝSLEDKY

5.1 Výběr vzorků pro analýzu

Byla izolována RNA z 312 FFPE vzorků meningiomů a 5 vzorků nenádorové arachinoidální tkáně. Vzorky pro analýzy byly vybírány tak, aby byla koncentrace RNA i čistota vzorku co nejvyšší. Čistota vzorku byla posuzována podle poměru absorbancí při 260 a 280 nm tak, aby byla co nejblíže hodnotě 1,8. 60 vzorků bylo použito pro microarray analýzu (tab. 13).

Tabulka 13 Výsledky měření na přístroji NanoDrop ND-1000 pro 60 vzorků určených pro microarray analýzu. První a čtvrtý sloupec obsahuje ID přiřazená vzorkům, konstantní pro všechny analýzy. A (260/280) – poměr absorbancí při 260 a 280 nm, c - koncentrace

ID	c [ng/ul]	A (260/280)	ID	c [ng/ul]	A (260/280)
1m	141	1,64	31m	45	1,68
2m	828	1,94	32m	57	1,79
3m	457	1,88	33m	121	1,72
4m	275	1,88	34m	237	1,76
5m	318	1,90	35m	2234	1,92
6m	938	1,92	36m	79	1,75
7m	59	1,83	37m	698	1,82
8m	165	1,83	38m	222	1,87
9m	137	1,84	39m	305	1,82
10m	323	1,86	40m	417	1,81
11m	576	1,87	41m	221	1,78
12m	242	1,85	42m	256	1,81
13m	1065	1,95	43m	112	1,83
14m	246	1,88	44m	930	1,89
15m	345	1,88	45m	371	1,85
16m	244	1,95	46m	193	1,80
17m	1772	1,95	47m	1299	1,87
18m	319	1,89	48m	595	1,91
19m	42	1,83	49m	346	1,91
20m	127	1,87	50m	957	1,88
21m	325	1,83	51m	371	1,80
22m	89	1,84	52m	43	1,73
23m	358	1,78	53m	374	1,93
24m	202	1,73	54m	415	1,80
25m	114	1,88	55m	1379	1,96
26m	464	1,79	56m	731	1,95
27m	79	1,89	57m	1435	1,90
28m	584	1,88	58m	118	1,83
29m	391	1,79	59m	446	1,81
30m	10	1,43	60m	82	1,70

Pro validační fázi experimentu bylo vybráno odlišných 64 vzorků meningiomů než pro microarray analýzu. Údaje o koncentraci RNA a čistotě těchto vzorků jsou v tab. 14. Vzorky pro validaci byly párovány na základě grade meningiomů a věku, pohlaví, váze a výšce pacienta (tab. 15, str. 40).

Tabulka 14 Výsledky měření na přístroji NanoDrop ND-1000 pro 64 vzorků určených pro validační fázi experimentu. První a čtvrtý sloupec obsahuje ID přiřazená vzorkům, konstantní pro všechny analýzy. A (260/280) – poměr absorbancí při 260 a 280 nm, c - koncentrace

ID	c [ng/ul]	A (260/280)	ID	c [ng/ul]	A (260/280)
173m3	106	1,87	15m3	6016	1,93
164m3	279	1,89	51m3	1411	1,90
115m3	126	1,80	174m3	193	1,82
168m3	127	1,80	136m3	843	1,97
127m3	459	1,76	57m3	152	1,87
69m3	1773	1,90	25m3	40	1,67
17m2	994	1,86	2m2	389	1,81
185m3	204	1,80	8m2	113	1,76
76m3	187	1,85	56m3	347	1,91
72m3	237	1,86	9m3	1871	1,96
80m3	444	1,88	201m3	370	1,78
18m3	622	1,95	108m3	91	1,80
77m3	237	1,92	30m3	57	1,82
16m3	262	1,94	87m3	265	1,80
32m3	150	1,89	166m3	451	1,81
135m3	242	1,86	7m2	119	1,48
34m3	293	1,91	103m3	681	1,91
123m3	1100	1,89	193m3	697	1,90
55m3	2048	1,95	137m3	686	1,98
116m3	400	1,86	1m2	184	1,76
12m3	342	1,87	10m3	180	1,83
90m3	411	1,77	68m3	1441	1,96
46m3	848	1,94	3m2	32	1,56
63m3	1215	1,92	191m3	331	1,85
98m3	272	1,84	16m2	958	1,88
132m3	690	1,87	141m3	3471	1,75
91m3	599	1,91	5m2	637	1,81
88m3	625	1,99	9m2	691	1,96
82m3	612	1,94	10m2	179	1,81
198m3	160	1,81	60m3	213	1,85
3m3	90	1,79	35m3	164	1,88
59m3	119	1,90	114m3	561	1,89

Tabulka 15 Párování vzorků pro validační fázi experimentu na základě údajů o pacientech. Byl hodnocen grade meningiomu a pohlaví, výška, váha a věk pacienta při první diagnóze. R – skupina pacientů s recidivujícími meningiomy, N – skupina pacientů s nerecidivujícími meningiomy, pomlčka – chybějící data.

ID (R)	ID (N)	WHO grade (R)	WHO grade (N)	Pohlaví (R)	Pohlaví (N)	Věk při diagnóze (R)	Věk při diagnóze (N)	Váha (R) [kg]	Váha (N) [kg]	Výška (R) [cm]	Výška (N) [cm]
15m3	173m3	1	1	žena	žena	35	35	82	66	158	153
51m3	164m3	1	1	žena	žena	37	37	54	92	-	159
174m3	115m3	1	1	žena	žena	42	42	-	68	-	162
136m3	168m3	1	1	žena	žena	45	45	82	-	165	-
57m3	127m3	1	1	muž	muž	45	45	90	82	175	176
25m3	69m3	1	1	žena	žena	47	47	72	63	164	170
2m2	17m2	1	1	muž	muž	47	47	98	120	182	178
8m2	185m3	1	1	žena	žena	48	48	53	94	162	167
56m3	76m3	1	1	žena	žena	50	50	71	65	170	161
9m3	72m3	1	1	žena	žena	51	51	63	95	164	168
201m3	80m3	1	1	muž	muž	54	54	176	105	109	174
108m3	18m3	1	1	žena	žena	58	58	70	78	160	160
30m3	77m3	1	1	žena	žena	59	59	77	80	159	164
87m3	16m3	1	1	žena	žena	61	61	85	75	174	165
166m3	32m3	1	1	žena	žena	63	63	91	85	173	172
7m2	135m3	1	1	žena	žena	68	68	84	78	165	158
103m3	34m3	1	1	žena	žena	21	25	89	56	170	156
193m3	123m3	2	2	žena	žena	33	30	53	51	173	167
137m3	55m3	1	1	žena	žena	38	37	84	58	164	165
1m2	116m3	1	1	muž	muž	38	36	100	125	180	194
10m3	12m3	1	1	žena	žena	40	43	53	70	162	170
68m3	90m3	1	1	žena	žena	40	43	72	81	160	165
3m2	46m3	1	1	žena	žena	41	43	65	84	150	177
191m3	63m3	1	1	muž	žena	41	43	82	54	176	160
16m2	98m3	1	1	muž	muž	49	53	90	73	172	180
141m3	132m3	2	2	muž	muž	57	58	67	136	172	186
5m2	91m3	1	1	muž	muž	59	58	112	85	183	175
9m2	88m3	1	1	žena	žena	67	65	86	93	162	170
10m2	82m3	2	2	žena	žena	68	70	70	62	165	-
60m3	198m3	1	1	žena	žena	69	70	85	-	163	-
35m3	3m3	1	1	muž	muž	73	72	80	110	165	173
114m3	59m3	2	2	muž	muž	73	74	-	83	-	176

Koncentrace a čistota vzorků RNA z arachinoidální tkáně použitých jako negativní kontroly je uvedena v tab. 16. Oproti nádorovým vzorkům vykazovaly nižší koncentraci RNA, způsobené menším množstvím buněk v nenádorové tkáni arachinoidey.

Tabulka 16 Koncentrace a poměr absorbancí při 260 a 280 nm pro vzorky RNA izolované z arachinoidální tkáně.

ID	c [ng/ul]	A (260/280)
1NK	95	1,57
2NK	62	1,58
3NK	35	1,58
4NK	22	1,58
5NK	30	1,76

5.2 Microarray analýza

Byla provedena microarray hybridizace izolované RNA na čipy Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Array. Každý z 60 vzorků meningiomů a 5 negativních kontrol byl hybridizován na jeden čip.

Byla zjištěna rozdílná exprese miRNA již při porovnání primárních nádorů v obou skupinách. Pro analýzu exprese bylo proto vyřazeno 15 vzorků meningiomů odebraných při první recidivě pacienta (tj. při druhé nebo pozdější operaci). Ze dvou vzorků v páru tak byl hodnocen pouze jeden.

Před zařazením čipů do další analýzy byla zkontrolována jejich kvalita. Na základě výsledku kontroly kvality byl z analýzy odstraněn čip se vzorkem 34m.

Do validační fáze byly miRNA vybírány na základě následujících kritérií:

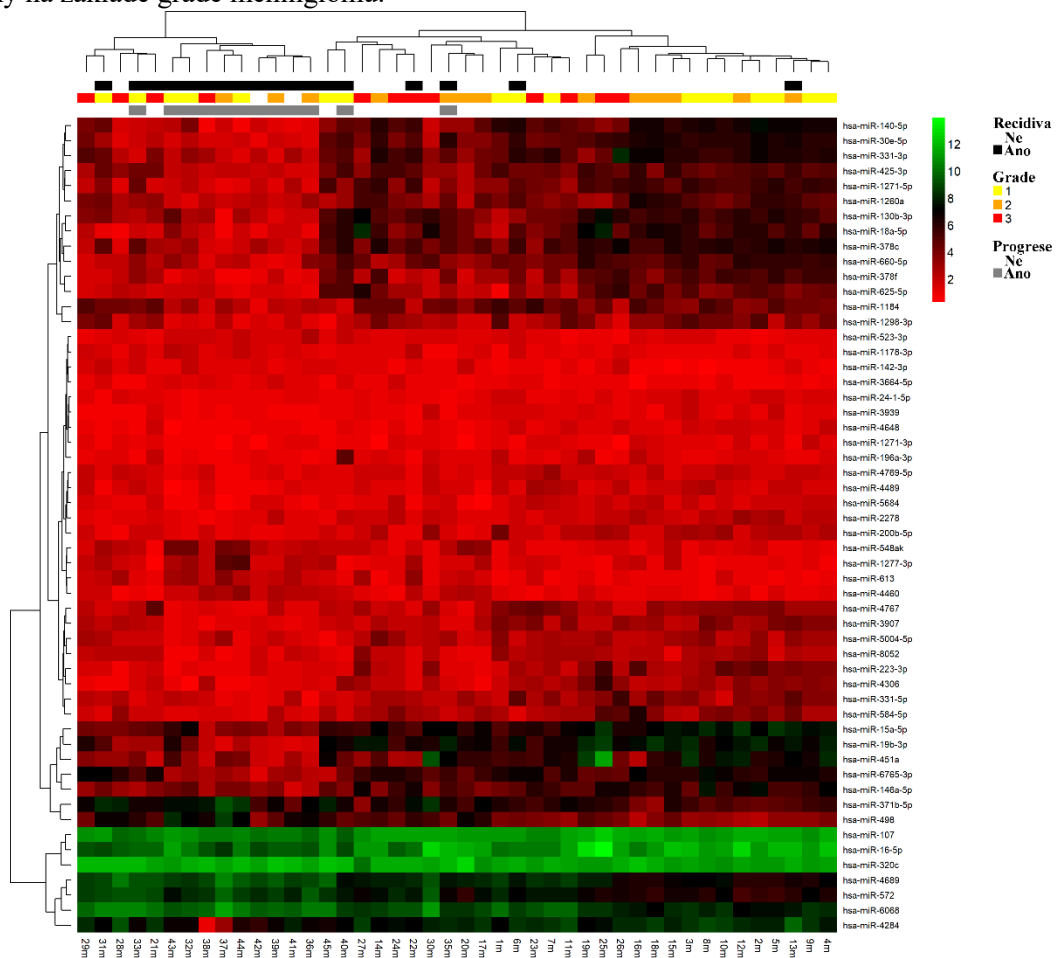
- 1) Významně odlišná exprese miRNA mezi skupinami pacientů na základě Wilcoxonova exaktního dvouvýběrového testu (adjustovaná p hodnota q , hladina významnosti $\alpha = 0,05$).
- 2) Mediány exprese miRNA se musí lišit mezi skupinami recidivujících a nerecidivujících pacientů minimálně o maximální medián absolutní odchylky (MAD) exprese.
- 3) MiRNA musí být exprimována, tj. \log_2 hodnota intenzity microarray signálu musí být minimálně 1.
- 4) Biologický význam miRNA, hodnocený na základě záznamů v databázi miRBase.

Hodnocení splnění kritérií:

- 1) Byla porovnávána distribuce exprese každé miRNA mezi skupinami pacientů. Signifikantní změna exprese byla zjištěna u 105 miRNA z 6094 testovaných sekvencí.
- 2) Ze všech miRNA zařazených do experimentu tuto podmínku splňovalo 124 miRNA. Hodnoty Δm_i u 3 miRNA dosáhly dokonce více než dvojnásobek MAD_{ik} .

- 3) Minimální \log_2 hodnotu signálu intenzity fluorescence 1 mělo 2488 z posuzovaných miRNA. Vzhledem k příliš velkému počtu miRNA bylo kritérium zpřísněno na minimální hodnotu 5. Na této hladině intenzity bylo identifikováno 347 miRNA.
- 4) Biologický význam byl zjišťován u 21 miRNA, které splnily zpřísněnou podmínku minimální intenzity fluorescence a všechny ostatní podmínky. Byla ověřována onkologická literatura týkající se dané miRNA v miRBase.

Celkem 54 miRNA splňovalo všechny podmínky stanovené při hodnocení experimentu. Byla vytvořena heat mapa \log_2 hodnot exprese těchto miRNA v jednotlivých vzorcích (obr. 14). Pomocí agregační metody „complete“ jsou vzorky hierarchicky klastrovány podle podobnosti jejich profilů miRNA exprese. Vzorky jsou zřetelně sdružovány podle recidivy a progresu meningiomů. Naopak nejsou sdružovány na základě grade meningiomu.



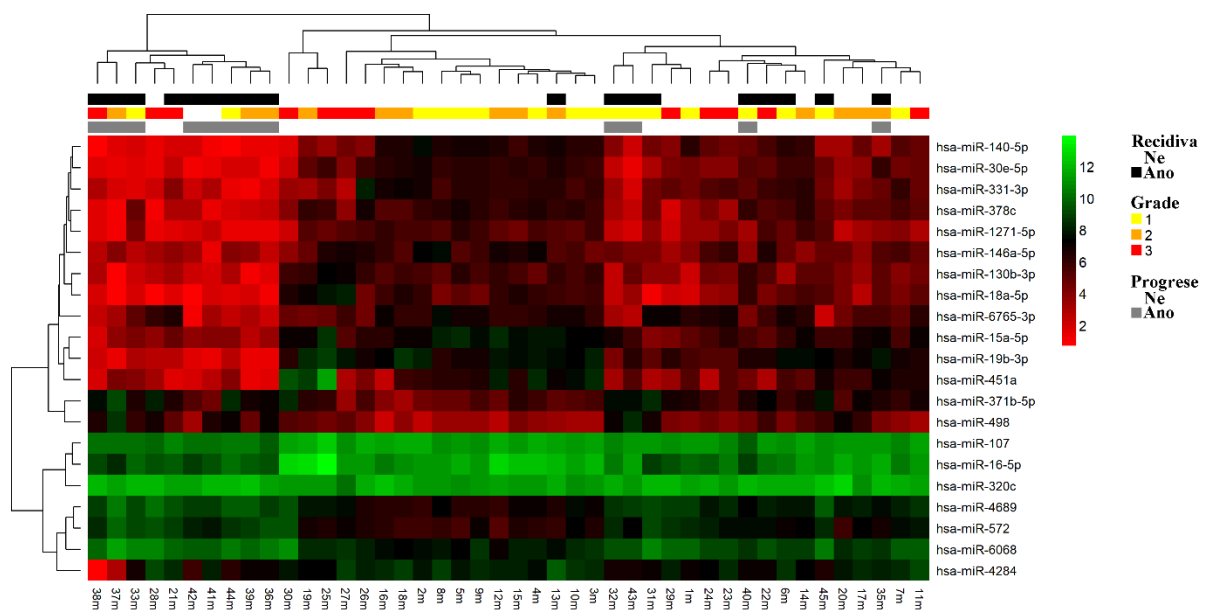
Obrázek 14 Heat mapa exprese 54 miRNA, které splnily podmínky pro zařazení do validační fáze experimentu. Klastrování bylo provedeno agregační metodou „complete“. Každý řádek heat mapy odpovídá jedné miRNA, každý sloupec jednomu vzorku meningiomu. Grade vzorku je vyznačen barevně na horním okraji heat mapy. Šedý obdélník pod určením grade značí progresi meningiomu do vyššího grade, černý obdélník nad určením grade meningiomu označuje meningiomy, u nichž došlo k recidivě. Červená, černá a zelená barva každého pole heat mapy je \log_2 intenzita fluorescence dané miRNA ve vzorku.

Podobně jsou sdružovány i analyzované miRNA, které se podle intenzity rozdělily do několika skupin. Hierarchicky nejvýše jsou dvě skupiny – obecně více exprimované miRNA proti méně exprimovaným. Skupina více exprimovaných miRNA je dále rozdělena na dvě, kdy v jedné se nacházejí miRNA spíše exprimované v recidivujících meningiomech a v druhé naopak miRNA více exprimované v nerecidivujících meningiomech.

Skupina méně exprimovaných miRNA je rozdělena tak, že jsou zřetelně vidět dvě skupiny miRNA se sníženou expresí v recidivujících meningiomech. U třetí větve miRNA není rozdíl jejich exprese mezi skupinami pacientů výrazný, podle Wilcoxonova testu je však stále signifikantní.

Pouze 21 miRNA splnilo zpřísněná kritéria pro zařazení do validační fáze experimentu. Opět byla sestavena heat mapa profilů exprese těchto miRNA ve všech vzorcích meningiomů (obr. 15). Vzorky jsou sdružovány do skupin podle recidivy výrazně méně, než tomu bylo při 54 posuzovaných miRNA. Přesto je v heat mapě jedna skupina vzorků téměř výhradně recidivujících meningiomů s progresí.

Na základě profilů exprese lze opět rozdělit miRNA do dvou skupin podle intenzity exprese. U většiny miRNA je vidět spíše snížená exprese v recidivujících meningiomech proti nerecidivujícím.



Obrázek 15 Heat mapa exprese 21 miRNA, které splnily zpřísněné podmínky pro validační fázi experimentu. Klastrování bylo provedeno agregační metodou „complete“ a popsáno stejným způsobem jako na obrázku 14.

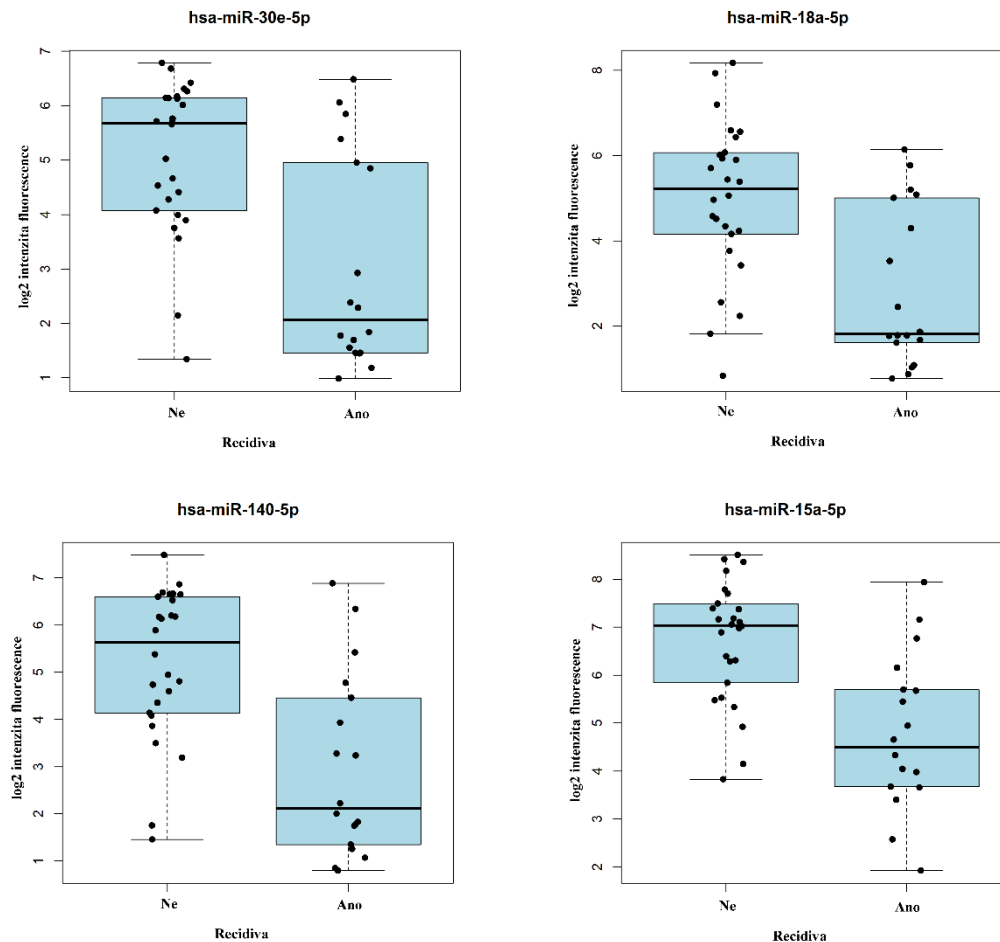
Z 21 kandidátních miRNA bylo podle biologické významnosti pro validační fázi vybráno 16. Shrnutí jejich vlastností relevantních pro posouzení při výběru do validační fáze experimentu je v tab. 17 na následující straně.

Tabulka 17 Soubor 16 miRNA, které byly na základě svých vlastností vybrány pro testování do validační fáze experimentu. Q hodnota – adjustovaná p hodnota Wilcoxonova testu pro velký počet opakování, Δm_i – rozdíl mediánů \log_2 intenzity fluorescence miRNA mezi skupinami recidivujících a nerecidivujících pacientů, $\Delta m_i/MAD_i$ – kolikrát je rozdíl mediánů vyšší než medián absolutní odchylky.

miRNA	q hodnota	Δm_i	$\frac{\Delta m_i}{MAD_i}$	Medián \log_2 intenzity fluorescence	
				recidivující	nerecidivující
miR-107	0,0436	0,743	1,10	10,55	11,29
miR-16-5p	0,0436	1,441	1,30	9,81	11,25
miR-320c	0,0444	0,472	1,29	11,78	11,31
miR-371b-5p	0,0479	1,343	1,10	7,01	5,67
miR-15a-5p	0,0435	2,544	1,68	4,49	7,04
miR-572	0,0438	1,475	1,36	8,34	6,87
miR-451a	0,0465	2,576	1,05	3,51	6,08
miR-19b-3p	0,0436	3,431	1,10	3,52	6,95
miR-498	0,0436	1,950	1,17	5,92	3,97
miR-18a-5p	0,0438	3,403	2,24	1,82	5,22
miR-130b-3p	0,0438	2,313	1,22	3,02	5,33
miR-146a-5p	0,0444	1,548	1,02	3,91	5,46
miR-1271-5p	0,0438	2,604	1,54	2,43	5,04
miR-331-3p	0,0436	2,309	1,15	3,18	5,48
miR-30e-5p	0,0449	3,612	2,80	2,06	5,68
miR-140-5p	0,0436	3,522	2,07	2,11	5,63

Největší rozdíl exprese mezi skupinami pacientů vyjádřený poměrem $\Delta m_i/MAD_i$ byl zjištěn u miR-30e-5p, miR-18a-5p, miR-140-5p a miR-15a-5p (obr. 16, str. 45). Z jejich grafů je patrné nenormální rozdělení exprese miRNA. Distribuce je zvláště u recidivujících pacientů výrazně zešíkmená směrem k nižším hodnotám, opačná tendence je u nerecidivujících pacientů.

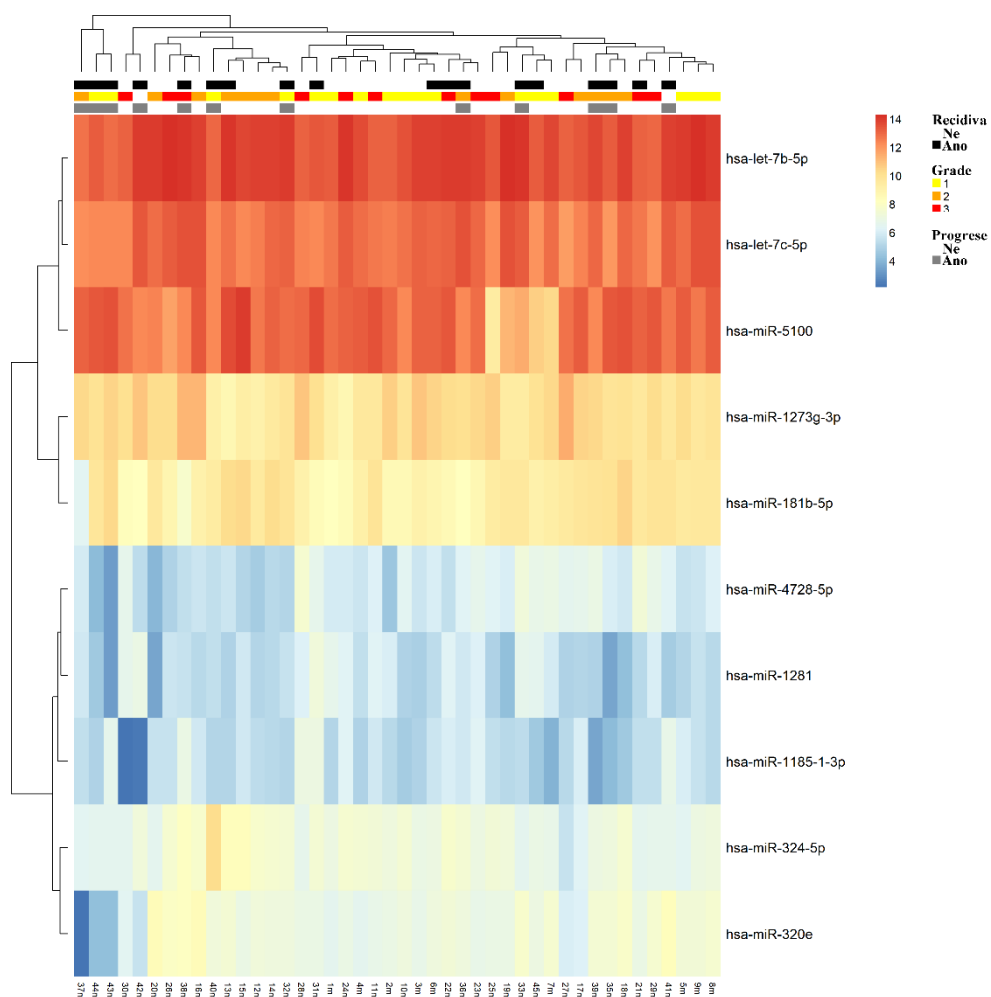
U miR-30e-5p je z grafu patrné bimodální rozdělení dat jak u recidivujících (přibližně kolem \log_2 hodnot exprese 2 a 5), tak nerecidivujících (kolem \log_2 hodnot 4 a 6) pacientů. 2. a 3. kvartil exprese této miRNA je velmi široký, u recidivujících pacientů zahrnuje 3 body \log_2 škály exprese.



Obrázek 16 Krabicové diagramy \log_2 intenzity fluorescence pro 4 miRNA, které měly mezi skupinami recidivujících a nerecidivujících pacientů nejvyšší rozlišení (tj. nejvyšší poměr $\Delta m_i / MAD_i$). Každý bod odpovídá intenzitě signálu fluorescence jednoho vzorku pro danou miRNA. Krabice diagramu zobrazuje 2. a 3. kvartil, dělicí čára odpovídá mediánu exprese. Vousy vyznačují maximálně 1,5násobek mezikvartilového rozpětí od 1., resp. 3. kvartilu.

Pro validační fázi experimentu bylo nutné vybrat kontrolní miRNA, ke kterým budou normalizovány hodnoty exprese testovaných miRNA. Proto musely mít co nejmenší změnu exprese mezi oběma skupinami pacientů. Adjustovaná p hodnota Wilxonova testu pro normalizační miRNA musí být co nejvyšší (nelze u nich zamítnout nulovou hypotézu shodnosti distribuce). Poměr $\Delta m_i / MAD_i$, který hodnotí, jak moc jsou od sebe vzdáleny mediány exprese, musí být u normalizačních miRNA co nejnižší.

Na základě těchto podmínek bylo identifikováno 10 miRNA vhodných pro normalizaci. Heat mapa jejich exprese je na obr. 17 na následující straně. Klastrování vzorků na základě jejich miRNA profilů (opět agregační metodou „complete“) nevytváří skupiny podle recidivy. Rozdělení recidivujících/nerecidivujících vzorků v hierarchickém shlukování je náhodné. Podobně jsou shlukovány miRNA do skupin podle výše intenzity jejich fluorescence a není patrný vzor korespondující s recidivou meningiomů.



Obrázek 17 Heat mapa \log_2 hodnoty exprese pro miRNA, které byly vyhodnoceny jako vhodné pro normalizaci ve validační fázi experimentu. Každý řádek heat mapy odpovídá jedné miRNA, každý sloupec jednomu vzorku meningiomu. Grade vzorku je vyznačen barevně na horním okraji heat mapy, stejně jako údaje o recidivě a progresi.

Z těchto 10 miRNA byl vybrán soubor čtyř, jejichž exprese byla ověřena ve validační fázi experimentu. Tyto byly opět vybrány na základě biologické relevance, tedy informací o jejich použitelnosti pro dané účely z databáze miRBase. Jejich vlastností jsou uvedeny v tab. 18.

Tabulka 18 Soubor 4 miRNA, které byly vybrány jako normalizační (kontrolní) do validační fáze experimentu. Tabulka shrnuje stejná kritéria jako tabulka 17.

miRNA	q hodnota	Δm_i	$\frac{\Delta m_i}{MAD_i}$	Medián \log_2 intenzity fluorescence	
				recidivující	nerecidivující
miR-let7b-5p	0,4609	0,022	0,05	13,80	13,78
miR-181b-5p	0,4865	0,027	0,03	9,49	9,46
miR-1281	0,4505	0,163	0,18	5,50	5,34
miR-324-5p	0,4818	0,023	0,03	7,08	7,10

5.3 Validace pomocí qPCR

Validační fáze experimentu sloužila k ověření úrovně exprese miRNA vybraných na základě dat získaných pomocí metody microarray. Zatímco microarray analýza je schopná identifikovat změny exprese velkého počtu miRNA, její citlivost je ve srovnání s qPCR menší.

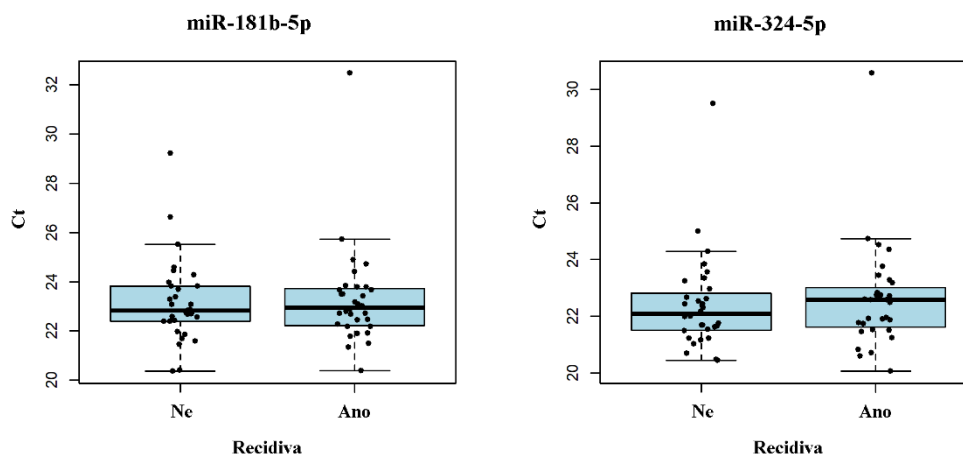
Byl použit jiný set vzorků meningiomů. Na rozdíl od souboru použitého pro microarray analýzu byly vzorky párovány na základě informací o pacientech pro snížení vlivu skrytých proměnných ve variabilitě mezi skupinami.

Metoda qPCR musela být optimalizována pro přístroj LightCycler 480 (Roche), který nebyl doporučen výrobcem pro TaqMan Advanced miRNA Assay (Applied Biosystems). Z 16 kandidátních miRNA byly po optimalizaci vyřazeny 3 (miR-371b-5p, miR-572 a miR-498), které se amplifikovaly pouze málo nebo vůbec.

Každá kombinace vzorku a miRNA byla měřena ve třech technických replikátech, jako výsledná hodnota byl počítán aritmetický průměr Ct tripletu.

5.3.1 Výběr normalizační miRNA

Ze čtyř měřených kandidátních normalizačních miRNA (výběr dvou na obr. 18) byla na základě nejmenšího rozdílu průměrných Ct hodnot mezi skupinami pacientů vybrána jedna (miR-181b-5p). K ní byly normalizovány data všech ostatních miRNA rozdílem Ct.

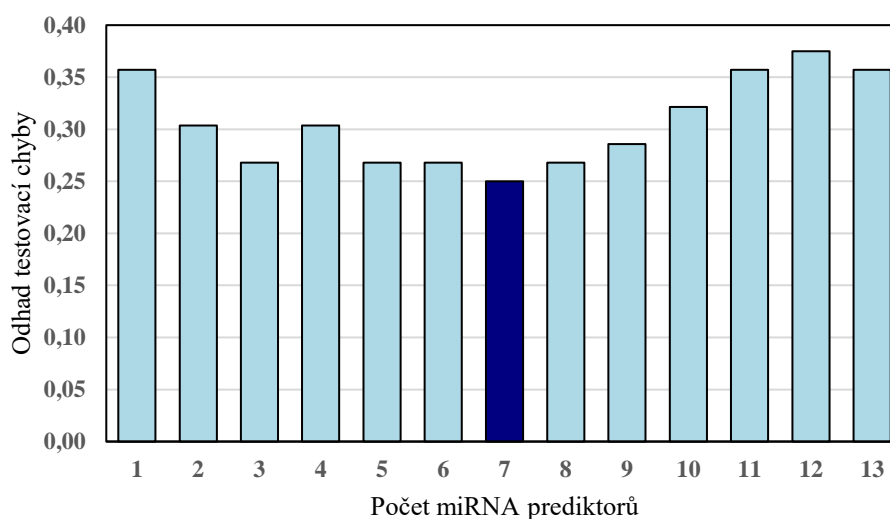


Obrázek 18 Grafy Ct hodnot qPCR pro 2 kandidátní normalizační miRNA. Každý bod odpovídá průměru ze tří měření fluorescence jednoho vzorku pro danou miRNA. Krabicové diagramy zobrazují charakteristiky shodně jako na obrázku 16.

5.3.2 Výběr nejlepšího modelu

Normalizovaná hodnota Ct byla získána odečtením Ct miR-181b-5p od Ct dané miRNA ve vzorku. Ze získaných tzv. Δ Ct hodnot byl vytvářen model predikující recidivu multivariátní logistickou regresí.

Pro počet miRNA 1 až 13 byl sestavován kandidátní model (obr. 19) pomocí balíčku `bess()` programu R. Jako nejlepší byl vybrán model se 7 prediktory s testovací chybou 0,25 (tj. vyhodnotil vzorek chybně jako recidivující/nerecidivující v 25 % případů) (obr. 19).



Obrázek 19 Graf závislosti odhadu testovací chyby na počtu miRNA prediktorů při Best Subset Selection analýze. Výběr s nejnižším odhadem testovací chyby je vyznačen tmavomodře.

Trénovací chyba získaného modelu 7 prediktorových miRNA (tab. 19) je 0,2143, tj. je schopný správně předpovědět recidivu meningiomů v $100 - 21,43 = 78,57$ % případů.

Tabulka 19 Konečný model recidivy meningiomů se 7 miRNA prediktory. Odds ratio (poměr šancí) vyjadřuje, kolikrát se zvýší šance meningiomu na recidivu při zvýšení ΔCt miRNA o 1. Signifikantní p hodnota pro Waldův test při $\alpha = 0,05$. MiRNA signifikantní pro model jsou vyznačeny oranžově. 95% CI – 95% konfidenční interval odds ratio.

Prediktorová miRNA	Odds ratio	95% CI	p hodnota
miR-15a-5p	3,0042	(1,4587; 8,1370)	0,0107
miR-331-3p	9,4515	(2,0128; 66,0200)	0,0103
miR-16-5p	0,2435	(0,0518; 0,8103)	0,0377
miR-146a-5p	2,3758	(1,1513; 5,7480)	0,0306
miR-18a-5p	0,5185	(0,2069; 1,2538)	0,1400
miR-130b-3p	0,4524	(0,1423; 1,1672)	0,1389
miR-1271-5p	1,4109	(0,8487; 2,4978)	0,2037

Při LOOCV model 7 miRNA vyhodnocoval set 56 patientských vzorků (u 8 vzorků ze 64 scházelo měření exprese jednoho nebo více prediktorů). Ve chvíli, kdy model vypočítal pravděpodobnost recidivy vzorku jako 50 % a vyšší, určil vzorek jako pozitivní pro recidivu (tj. model počítal s cut-off hodnotou 0,5).

Ve 23 případech z 29 správně vyhodnotil vzorek jako pozitivní (recidivující), v 6 případech vyhodnotil jako pozitivní nerecidivující vzorek. Z 27 nerecidivujících vzorků meningiomů test správně identifikoval 21, zatímco 6 vzorků bylo falešně pozitivních (tab. 20).

Tabulka 20 Tabulka situací, které vznikly při LOOCV validaci modelu 7 prediktorových miRNA na souboru 56 vzorků. Recidiva +/- - počet recidivujících/nerecidivujících vzorků meningiomů zařazených do validačního modelu, test +/- - počet vzorků, které model vyhodnotil jako recidivující/nerecidivující.

	recidiva +	recidiva -	celkem
test +	23	6	29
test -	6	21	27
celkem	29	27	56

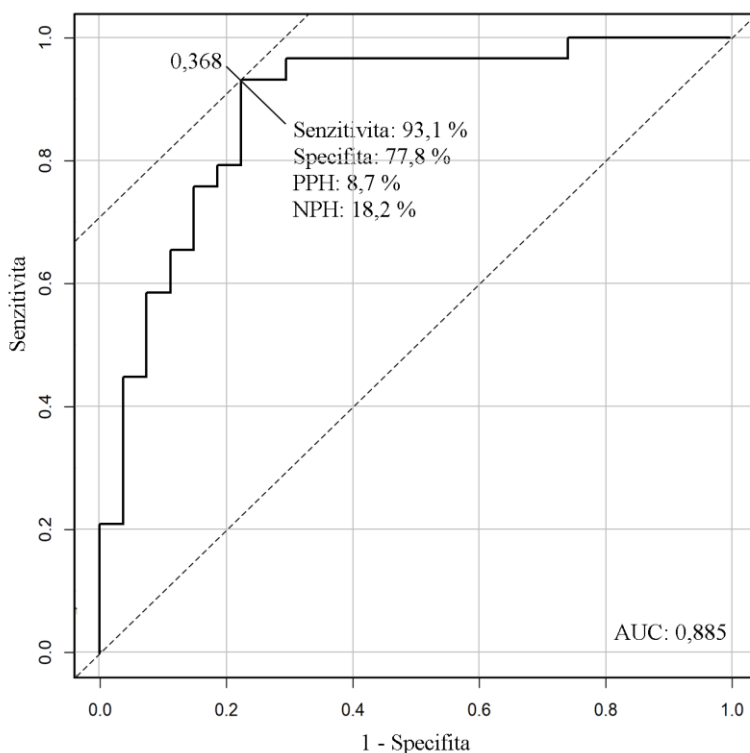
Vlastnosti tohoto modelu prediktorů jsou uvedeny v tab. 21. Test správně identifikuje recidivujícího pacienta s pravděpodobností 79 % (senzitivita testu). Naopak nerecidivující pacient je testem identifikován správně s pravděpodobností 78 % (specifita testu).

Pravděpodobnost, že pacient recidivuje, když ho test označí jako recidivujícího, je 79 % (vyjádřena jako pozitivní prediktivní hodnota). Pacient je testem správně vyhodnocen jako nerecidivující s pravděpodobností 78 % (negativní prediktivní hodnota).

Tabulka 21 Vlastnosti prediktivního modelu 7 miRNA při cut-off hodnotě modelu 0,5. 95% CI – 95% konfidenční interval.

Vlastnost modelu	Hodnota	95% CI
Senzitivita	0,79	(0,60; 0,92)
Specifita	0,78	(0,58; 0,91)
Pozitivní prediktivní hodnota	0,79	(0,60; 0,92)
Negativní prediktivní hodnota	0,78	(0,58; 0,91)

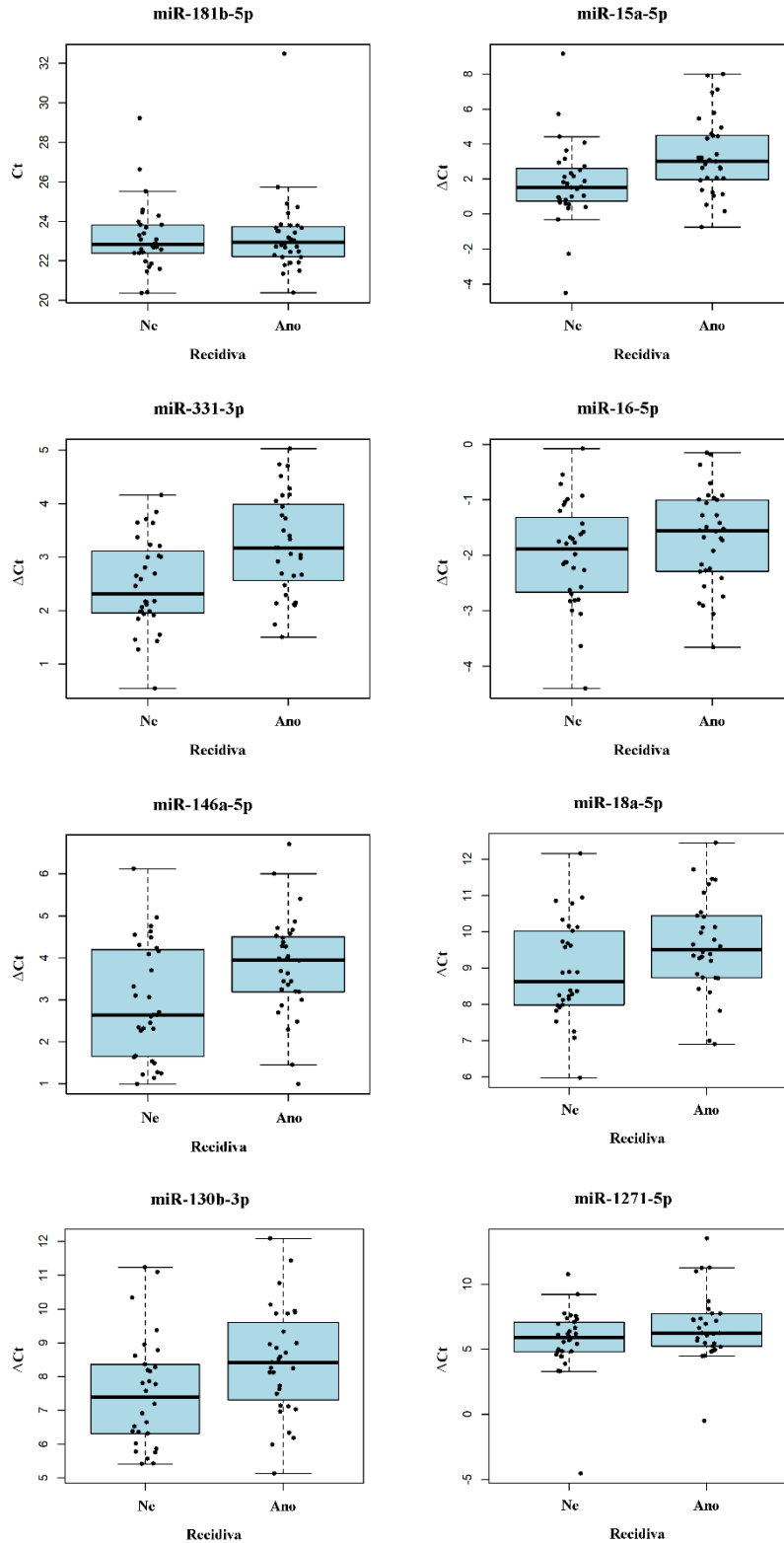
Na základě hodnot selektivity a specifity modelu byl zjišťován ideální cut-off modelu pro určení vzorku jako recidivujícího. Pro nejvyšší senzitivitu a specifitu testu by vzorek měl být vyhodnocen jako pozitivní při pravděpodobnosti recidivy nad 36,8 %. Při jiné cut-off hodnotě má model odlišné vyhodnocovací vlastnosti (senzitivitu, specifitu a prediktivní hodnoty), které jsou vyznačeny na obr. 20 na následující straně. Přesnost modelu, vyjádřená jako plocha pod křivkou ROC, je 0,885.



Obrázek 20 ROC („Receiver Operating Characteristic“) křivka pro zjištění ideální cut-off hodnoty pozitivního výsledku testu na základě modelu 7 miRNA. PPH – pozitivní predikční hodnota, NPH – negativní predikční hodnota, AUC – area under the curve, plocha pod křivkou.

Grafy ΔC_t hodnot všech miRNA, které byly zahrnuty do predikčního modelu a miRNA miR-181b-5p, k níž byly normalizovány, jsou na obr. 21 na následující straně. Expresе všech miRNA vykazuje přibližně normální rozdělení, ale s rozdílným rozptylem hodnot.

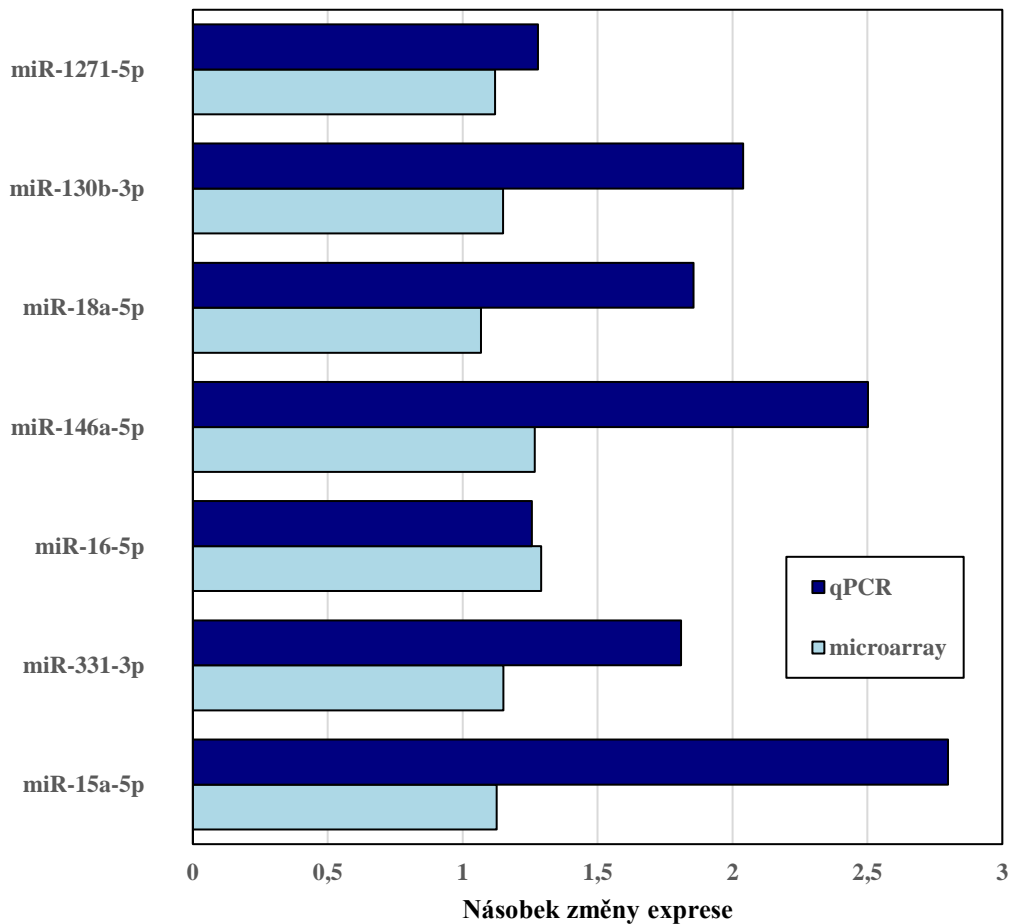
Všechny miRNA mají normalizované hodnoty ΔC_t vyšší než 0 (tj. exprimují se méně než normalizační miRNA), s výjimkou miR-16-5p, která se exprimuje více, než normalizační miRNA. Ke snížení exprese vzhledem k nerecidivujícím meningiomům došlo u všech miRNA, vč. miR-16-5p.



Obrázek 21 Krabicové diagramy Ct hodnot normalizační miRNA miR-181b-5p a Δ Ct hodnot 7 prediktorových miRNA diagnostického modelu. Každý bod odpovídá průměru ze tří měření fluorescence jednoho vzorku pro danou miRNA. Krabicové diagramy zobrazují charakteristiky shodně jako na obrázku 16.

5.4 Porovnání výsledků microarray a qPCR

Pro porovnání exprese miRNA byl zvolen násobek změny exprese („fold change“), jelikož se jedná o bezrozměrný údaj (hodnoty exprese miRNA zjištěné pomocí microarray a pomocí qPCR jsou udávány v jiných jednotkách). Bylo porovnáváno 7 miRNA výsledného diagnostického modelu (obr. 22).



Obrázek 22 Graf změny exprese miRNA zařazených do diagnostického modelu. Porovnání měření získaných metodami microarray a qPCR a vyjádření jako fold change nerecidivující skupiny pacientů oproti recidivující.

S výjimkou miR-16-5p byl fold change všech 7 miRNA vyšší při analýze pomocí qPCR, než microarray. U všech miRNA se jednalo o snížení exprese v recidivujících meningiomech oproti nerecidivujícím.

Nejvýraznější fold change nastal u miR-15a-5p a miR-146a-5p. Exprese obou miRNA se na základě dat z qPCR analýzy lišily mezi recidivujícími a nerecidivujícími meningiomy víc, než dvakrát. Naopak v microarray analýze nebyla zjištěna ani jedna miRNA, která by se expresí lišila více než 1,5×. Nejvýraznější fold change zjištěný microarray analýzou měla miR-16-5p.

6 DISKUZE

Během analýzy microarray dat bylo zjištěno, že signifikantní změna exprese miRNA nastává již u primárních nádorů získaných při první operaci pacienta. Z další analýzy byly proto vyřazeny vzorky sekundárních nádorů. Zahrnutí dat pouze z primárních nádorů odstraňuje ze souboru dat možné rušivé proměnné. Navíc model získaný pomocí těchto dat umožní predikovat recidivu pacienta již bezprostředně po první operaci.

Přesnost predikčního modelu na základě plochy pod křivkou grafu ROC je 0,5. Náhodný prediktor bez vztahu k určovaným datům by odpovídal hodnotě 0,5, zatímco u perfektního modelu se plocha pod křivkou rovná 1. Lze tedy usuzovat, že model je při určování recidivy meningiomů poměrně přesný.

Signifikanci změny exprese miRNA jako prediktoru pro sestavovaný diagnostický panel určoval její „odds ratio“. Pokud 95 % konfidenční interval neprocházal bodem 1 (tj. pokud změněná exprese miRNA buď snižovala, nebo zvyšovala pravděpodobnost recidivy, a ne obojí najednou), byl vliv miRNA považován za signifikantní. V panelu jsou ovšem zahrnuty i miRNA, jejichž „odds ratio“ predikce recidivy signifikantní nebyly. Tyto miRNA slouží jako stabilizátory modelu, přestože nemají predikční význam samy o sobě.

Expresní profily miRNA nebyly porovnávány s negativními kontrolami zdravých tkání, protože výsledky analýz zjistily dostatečnou změnu exprese již při porovnání recidivujících a nerecidivujících meningiomů. Srovnání exprese miRNA mezi zdravou arachinoidální tkání a meningiomy nebylo cílem této práce.

Při porovnávání násobků změny exprese mezi microarray a qPCR byly výraznější změny exprese v případě detekce pomocí qPCR metody. To mohlo být způsobeno jak nižší citlivostí analýzy, tak zejména vyšší homogenitou patientských vzorků v případě qPCR validace a tím pádem omezení vlivu skrytých rušivých proměnných.

Mimo záběr této bakalářské práce je druhá validační fáze experimentu, kdy bude robustnost získaného modelu ověřována na větším souboru vzorků a případně budou některé méně vhodné prediktory vyřazeny.

Ve studii Zhi *et al.* (2013) srovnávali expresi miRNA mezi zdravou arachinoidální tkání a meningiomy. Expresi zjišťovali na 110 patientských vzorcích pro 200 miRNA pomocí qPCR, zatímco pro identifikaci možných cílů v této studii byla rovněž použita microarray (pro více než 6000 cílů) na 45 patientských vzorcích.

Zhi *et al* identifikovali 3 miRNA signifikantně spojené s recidivou meningiomů – miR-190a, miR-29c a miR-219-5p. Ani u jedné z nich nebyla zjištěna rozdílná exprese mezi recidivujícími a nerecidivujícími meningiomy v naší studii ve screeningu pomocí microarray.

Zajímavé je srovnání, že ve studii Zhi *et al.* byla exprese miR-16 shledána jako velice stabilní napříč meningiomy (recidivujícími i nerecidivujícími) i zdravou tkání a byla tak použita jako normalizační miRNA. V našich experimentech byla ovšem miR-16-5p zařazena do panelu predikujícího recidivu meningiomů.

Další miRNA, která se vyskytovala v obou studiích, je miR-146a-5p. Zhi *et al.* udávají, že byla zjištěna signifikantně zvýšená exprese této miRNA v meningiomech oproti zdravé arachinoidální tkáni, ale bez vztahu k recidivě meningiomů. Diagnostický model sestavený v této práci tuto miRNA naopak zahrnuje.

V rámci pozdější studie od Zhi *et al.* (2016) byl sestaven diagnostický panel sérových miRNA pro detekci meningiomu. S recidivou meningiomu byla asociována změna v expresi miR-409-3p a miR-224, u kterých v této bakalářské práci signifikantně odlišná změna exprese zjištěná nebyla. Jedná se nicméně o sérové miRNA, které nemusí mít původ v meningiomech pacienta, ale odrážet jinou změnu fyziologického stavu.

Přesnost panelu sestaveného Zhi *et al.*, měřená stejně jako v této práci pomocí plochy pod ROC křivkou, byla 0,778. To je o přibližně o 0,1 (10 %) méně, než byla AUC modelu získaného v této bakalářské práci. Panel studie Zhi *et al.* byl testován na více pacientech, zatímco tento panel ještě čeká ověření na větším množství pacientů v druhé validační fázi.

V současné době není k dispozici žádný *in vitro* diagnostický nástroj schopný predikce recidivy meningiomů s přijatelnou přesností. Tento panel miRNA (po dalším zpřesnění ve druhé validační fázi) umožní snadno vytvořit přesnou prognózu pro pacienta již po první operaci.

7 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo profilovat expresi miRNA v recidivujících a nerecidivujících meningiomech a na základě toho vytvořit diagnostický panel schopný předpovědět, zda meningiom bude recidivovat.

Byla izolována celková RNA ze vzorků recidivujících a nerecidivujících meningiomů. Microarray analýzou byly identifikovány miRNA se signifikantně změněným profilem exprese u recidivujících meningiomů. Celkem 21 splňovalo podmínky pro zařazení do validační fáze experimentu.

Expresní profily vybraných 13 miRNA byly ověřeny na druhém, párovaném setu vzorků pomocí qPCR. Získaná data byla použita pro výběr nejlepších miRNA prediktorů recidivy. Testovací chyba panelu 7 miRNA byla zjišťována pomocí „Leave One Out Cross-Validation“ přístupu a byl vypočítán finální model predikce pomocí multivariátní logistické regrese.

Získaný diagnostický panel miRNA byl schopný správně určit meningiom jako recidivující v 78,57 % případů při cut-off hodnotě 0,5. Ideální cut-off hodnota modelu pro vyhodnocení vzorku jako recidivujícího je 0,368. Přesnost modelu odpovídající ploše pod křivkou ROC analýzy byla 0,885.

Získaný model bude dále validován, případně upravován, na větším počtu pacientů za účelem jeho zavedení do rutinního procesu diferenciální in vitro diagnostiky.

8 LITERATURA

1. van Alkemade, H., de Leau, M., Dieleman, E. M. T., Kardaun, J. W. P. F., van Os, R., Vandertop, W. P., *et al.* (2012). Impaired survival and long-term neurological problems in benign meningioma [Online]. *Neuro-Oncology*, 14(5), 658-666. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos013>.
2. Almeida, M. I., Reis, R. M., & Calin, G. A. (2011). MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers [Online]. *Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, 717(1-2), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009>.
3. Aavikko, M., Li, S. -P., Saarinen, S., Alhopuro, P., Kaasinen, E., Morgunova, E., *et al.* (2012). Loss of SUFU Function in Familial Multiple Meningioma [Online]. *The American Journal Of Human Genetics*, 91(3), 520-526. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.07.015>.
4. Ambros, V. A uniform system for microRNA annotation [Online]. *Rna*, 9(3), 277-279. <https://doi.org/10.1261/rna.2183803>.
5. Berezikov, E. (2011). Evolution of microRNA diversity and regulation in animals [Online]. *Nature Reviews Genetics*, 12(12), 846-860. <https://doi.org/10.1038/nrg3079>.
6. Bi, W. L., Abedalthagafi, M., Horowitz, P., Agarwalla, P. K., Mei, Y., Aizer, A. A., *et al.* (2016). Genomic landscape of intracranial meningiomas [Online]. *Journal Of Neurosurgery*, 125(3), 525-535. <https://doi.org/10.3171/2015.6.JNS15591>.
7. Bi, W. L., Greenwald, N. F., Abedalthagafi, M., Wala, J., Gibson, W. J., Agarwalla, P. K., *et al.* (2017). Genomic landscape of high-grade meningiomas. *Npj Genomic Medicine*, 2(15). <https://doi.org/10.1038/s41525-017-0014-7>.
8. Borchert, G. M., Lanier, W., & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs [Online]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(12), 1097-1101. <https://doi.org/10.1038/nsmb1167>.
9. Brastianos, P. K., Horowitz, P. M., Santagata, S., Jones, R. T., McKenna, A., Getz, G., *et al.* (2013). Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations [Online]. *Nature Genetics*, 45(3), 285-289. <https://doi.org/10.1038/ng.2526>
10. Budak, H., Bulut, R., Kantar, M., & Alptekin, B. MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription [Online]. *Briefings In Functional Genomics*, elv026-. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elv026>.
11. Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., *et al.* (2002). Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 99(24), 15524-15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>.

12. Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs [Online]. *Cell*, 136(4), 642-655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>.
13. Clark, V. E., Harmanci, A. S., Bai, H., Youngblood, M. W., Lee, T. I., Baranoski, J. F., *et al.* (2016). Recurrent somatic mutations in POLR2A define a distinct subset of meningiomas [Online]. *Nature Genetics*, 48(10), 1253-1259. <https://doi.org/10.1038/ng.3651>.
14. Desnoyers, G., Bouchard, M. -P., & Massé, E. (2013). New insights into small RNA-dependent translational regulation in prokaryotes [Online]. *Trends In Genetics*, 29(2), 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.004>.
15. Desvignes, T., Batzel, P., Berezikov, E., Eilbeck, K., Eppig, J. T., McAndrews, M. S., *et al.* (2015). MiRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants [Online]. *Trends In Genetics*, 31(11), 613-626. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.09.002>.
16. Dong, H., Lei, J., Ding, L., Wen, Y., Ju, H., & Zhang, X. (2013). MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis [Online]. *Chemical Reviews*, 113(8), 6207-6233. <https://doi.org/10.1021/cr300362f>.
17. El-Badawy, N. M., Farid, R. M., Nagib, L. N., & Ibrahim, R. A. (2014). Role of progesterone receptor expression and proliferative activity in predicting the recurrence of meningioma [Online]. *Pathology*, 46, S120-S121. <https://doi.org/10.1097/01.PAT.0000454509.26298.5c>.
18. Galani, V., Lampri, E., Varouktsi, A., Alexiou, G., Mitselou, A., & Kyritsis, A. P. (2017). Genetic and epigenetic alterations in meningiomas [Online]. *Clinical Neurology And Neurosurgery*, 158, 119-125. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2017.05.002>.
19. Gutmann, D. H. Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas [Online]. *Human Molecular Genetics*, 9(10), 1495-1500. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.10.1495>.
20. Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis [Online]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509-524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
21. Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs [Online]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001>.
22. Han, J., Pedersen, J. S., Kwon, S. C., Belair, C. D., Kim, Y. -K., Yeom, K. -H., *et al.* (2009). Posttranscriptional Crossregulation between Drosha and DGCR8 [Online]. *Cell*, 136(1), 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.053>.
23. He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., *et al.* (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene [Online]. *Nature*, 435(7043), 828-833. <https://doi.org/10.1038/nature03552>.
24. Histology Guide: What is H&E? The Histology Guide [online]. [cit. 2017-10-13]. Dostupné z: http://histology.leeds.ac.uk/what-is-histology/H_and_E.php.

25. Hortobágyi, T., Bencze, J., Murnyák, B., Kouhsari, M. C., Bognár, L., & Marko-Varga, G. (2017). Pathophysiology of meningioma growth in pregnancy [Online]. *Open Medicine*, 12(1), -. <https://doi.org/10.1515/med-2017-0029>.
26. Horvitz, H. R., & Sulston, J. E. (1980). Isolation and Genetic Characterization of Cell-Lineage Mutants of the Nematode *CAENORHABDITIS ELEGANS*. *Genetics*, 96(2), 435–454.
27. Chamberlain, M.,C. (2015). Treatment of Meningioma, Including in Cases With No Further Surgical or Radiotherapy Options. *Oncology* 29(5), 369-71.
28. Choudhary, A., Pradhan, S., Huda, M. F., Mohanty, S., & Kumar, M. (2006). Radiation induced meningioma with a short latent period following high dose cranial irradiation – Case report and literature review [Online]. *Journal Of Neuro-Oncology*, 77(1), 73-77. <https://doi.org/10.1007/s11060-005-9009-9>.
29. Iwakawa, H. -oki, & Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression [Online]. *Trends In Cell Biology*, 25(11), 651-665. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.011>.
30. Kempthues, K. J. (2016). Horvitz and Sulston on Caenorhabditis elegans Cell Lineage Mutants [Online]. *Genetics*, 203(4), 1485-1487. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.193003>.
31. Kim, Y. -K., Kim, B., & Kim, V. N. (2016). Re-evaluation of the roles of DROSHA , Exportin 5 , and DICER in microRNA biogenesis [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 113(13), E1881-E1889. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602532113>.
32. Kobayashi, H., & Tomari, Y. (2016). RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins [Online]. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(1), 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.08.007>.
33. Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2010). MiRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data [Online]. *Nucleic Acids Research*, 39(Database), D152-D157. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1027>.
34. Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2013). MiRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data [Online]. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D68-D73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1181>.
35. Kwon, S. C., Nguyen, T. A., Choi, Y. -G., Jo, M. H., Hohng, S., Kim, V. N., & Woo, J. -S. (2016). Structure of Human DROSHA [Online]. *Cell*, 164(1-2), 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.019>.
36. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. -H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [Online]. *The Embo Journal*, 23(20), 4051-4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>.
37. Li, S., & Patel, D. J. (2016). Drosha and Dicer: Slicers cut from the same cloth [Online]. *Cell Research*, 26(5), 511-512. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.19>.

38. Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer [Online]. *Nature Reviews Cancer*, 15(6), 321-333. <https://doi.org/10.1038/nrc3932>.
39. Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., *et al.* (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary [Online]. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803-820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
40. Marosi, C., Hassler, M., Roessler, K., Reni, M., Sant, M., Mazza, E., & Vecht, C. (2008). Meningioma [Online]. *Critical Reviews In Oncology/hematology*, 67(2), 153-171. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.01.010>.
41. Mawrin, C., & Perry, A. (2010). Pathological classification and molecular genetics of meningiomas [Online]. *Journal Of Neuro-Oncology*, 99(3), 379-391. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0342-2>.
42. Mechtler, P., Johnson, S., Slabodkin, H., Cohanin, A. B., Brodsky, L., & Kandel, E. S. (2017). The evidence for a microRNA product of human DROSHA gene [Online]. *Rna Biology*, 14(11), 1508-1513. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1342934>.
43. Meister, P., Konrad, E., & Hahne, N. (1981). Incidence and histological structure of the storiform pattern in benign and malignant fibrous histiocytomas [Online]. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy And Histology*, 393(1), 93-101. <https://doi.org/10.1007/BF00430873>.
44. Motameny, S., Wolters, S., Nürnberg, P., & Schumacher, B. (2010). Next Generation Sequencing of miRNAs – Strategies, Resources and Methods [Online]. *Genes*, 1(1), 70-84. <https://doi.org/10.3390/genes1010070>.
45. Pèrez-Magán, E., Campos-Martín, Y., Mur, P., Fiaño, C., Ribalta, T., García, J. F., *et al.* (2012). Genetic Alterations Associated With Progression and Recurrence in Meningiomas [Online]. *Journal Of Neuropathology & Experimental Neurology*, 71(10), 882-893. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31826bf704>.
46. Perry, A., Gutmann, D. H., & Reifenberger, G. (2004). Molecular pathogenesis of meningiomas [Online]. *Journal Of Neuro-Oncology*, 70(2), 183-202. <https://doi.org/10.1007/s11060-004-2749-0>.
47. PN 702569 Affymetrix GeneChip User Guide.
48. Prada, F., Del Bene, M., Moiraghi, A., Casali, C., Legnani, F. G., Saladino, A., *et al.* (2015). From Grey Scale B-Mode to Elastasonography: Multimodal Ultrasound Imaging in Meningioma Surgery—Pictorial Essay and Literature Review [Online]. *Biomed Research International*, 2015, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2015/925729>.
49. Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications [Online]. *Biochimie*, 117, 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>.

50. Reddy, K. B. (2015). MicroRNA (miRNA) in cancer [Online]. *Cancer Cell International*, 15(1), -. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0185-1>.
51. Regionální zpravodajství Národního zdravotnického informačního systému [online] (2016). Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. [cit. 2017-10-09].
52. Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., *et al.* (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [Online]. *Nature*, 403(6772), 901-906. <https://doi.org/10.1038/35002607>.
53. Riemenschneider, M. J., Perry, A., & Reifenberger, G. (2006). Histological classification and molecular genetics of meningiomas [Online]. *The Lancet Neurology*, 5(12), 1045-1054. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70625-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70625-1).
54. Rogers, L., Barani, I., Chamberlain, M., Kaley, T. J., McDermott, M., Raizer, J., *et al.* (2015). Meningiomas: knowledge base, treatment outcomes, and uncertainties. A RANO review [Online]. *Journal Of Neurosurgery*, 122(1), 4-23. <https://doi.org/10.3171/2014.7.JNS131644>.
55. Rogers, L., Gilbert, M., & Vogelbaum, M. A. (2010). Intracranial meningiomas of atypical (WHO grade II) histology [Online]. *Journal Of Neuro-Oncology*, 99(3), 393-405. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0343-1>.
56. Rutledge, M. H., Sarrazin, J., Rangaratnam, S., Phelan, C. M., Twist, E., Merel, P., *et al.* (1994). Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas [Online]. *Nature Genetics*, 6(2), 180-184. <https://doi.org/10.1038/ng0294-180>.
57. Saloner, D., Uzelac, A., Hetts, S., Martin, A., & Dillon, W. (2010). Modern meningioma imaging techniques [Online]. *Journal Of Neuro-Oncology*, 99(3), 333-340. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0367-6>.
58. Saydam, O., Shen, Y., Wurdinger, T., Senol, O., Boke, E., James, M. F., *et al.* (2009). Downregulated MicroRNA-200a in Meningiomas Promotes Tumor Growth by Reducing E-Cadherin and Activating the Wnt/ -Catenin Signaling Pathway [Online]. *Molecular And Cellular Biology*, 29(21), 5923-5940. <https://doi.org/10.1128/MCB.00332-09>.
59. Schirle, N. T., & MacRae, I. J. (2012). The Crystal Structure of Human Argonaute2 [Online]. *Science*, 336(6084), 1037-1040. <https://doi.org/10.1126/science.1221551>.
60. Simpson, D. (1957). THE RECURRENCE OF INTRACRANIAL MENINGIOMAS AFTER SURGICAL TREATMENT. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20(1), 22–39.
61. Slabý, O. (2012). *MikroRNA v onkologii*. ISBN 978-80-7262-587-1.
62. Slezak-Prochazka, I., Kluiver, J., de Jong, D., Kortman, G., Halsema, N., Poppema, S., *et al.* (2013). Cellular Localization and Processing of Primary Transcripts of Exonic MicroRNAs [Online]. *Plos One*, 8(9), e76647-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076647>.
63. Smith, M. J. (2015). Germline and somatic mutations in meningiomas [Online]. *Cancer Genetics*, 208(4), 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2015.02.003>.

64. Smith, M. J., Ahn, S., Lee, J. -I., Bulman, M., Plessis, D. du, & Suh, Y. -L. (2017). SMARCE1 mutation screening in classification of clear cell meningiomas [Online]. *Histopathology*, 70(5), 814-820. <https://doi.org/10.1111/his.13135>.
65. Standring, S.(2016). Gray's Anatomy, the Anatomical Basis of Clinical Practice, Forty-First Edition, by Susan Standring, Editor-in-Chief, Elsevier Limited, 2016, 1,562 Pages, Hardcover, ISBN: 978-0-7020-5230-9. [Online]. *Clinical Anatomy*, 29(2), 264-265. <https://doi.org/10.1002/ca.22677>.
66. Suh, N., & Blelloch, R. (2011). Small RNAs in early mammalian development: from gametes to gastrulation [Online]. *Development*, 138(9), 1653-1661. <https://doi.org/10.1242/dev.056234>.
67. Suzuki, H. I., Katsura, A., Yasuda, T., Ueno, T., Mano, H., Sugimoto, K., & Miyazono, K. (2015). Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes [Online]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(7), 512-521. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3050>.
68. Torres-Martín, M., Kusak, M. E., Isla, A., Burbano, R. R., Pinto, G. R., Melendez, B., *et al.* (2015). Whole exome sequencing in a case of sporadic multiple meningioma reveals shared NF2, FAM109B, and TPRXL mutations, together with unique SMARCB1 alterations in a subset of tumor nodules [Online]. *Cancer Genetics*, 208(6), 327-332. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2015.03.012>.
69. Wang, Y. -C., Chuang, C. -C., Wei, K. -C., Chang, C. -N., Lee, S. -T., Wu, C. -T., *et al.* (2016). Long Term Surgical Outcome and Prognostic Factors of Atypical and Malignant Meningiomas [Online]. *Scientific Reports*, 6(1), -. <https://doi.org/10.1038/srep35743>.
70. Wang, X., Xu, X., Ma, Z., Huo, Y., Xiao, Z., Li, Y., & Wang, Y. (2011). Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by Exportin-5 [Online]. *Rna*, 17(8), 1511-1528. <https://doi.org/10.1261/rna.2732611>.
71. Wen, C., Zhang, A., Quan, S., & Wang, X. (2017). BeSS: an R package for best subset selection in linear, logistic and CoxPH models. [arXiv:1709.06254](https://arxiv.org/abs/1709.06254). <https://doi.org/10.18637/jss.v000.i00>.
72. Zhi, F., Shao, N., Li, B., Xue, L., Deng, D., Xu, Y., *et al.* (2016). A serum 6-miRNA panel as a novel non-invasive biomarker for meningioma [Online]. *Scientific Reports*, 6(1), -. <https://doi.org/10.1038/srep32067>.
73. Zhi, F., Zhou, G., Wang, S., Shi, Y., Peng, Y., Shao, N., *et al.* (2013). A microRNA expression signature predicts meningioma recurrence [Online]. *International Journal Of Cancer*, 132(1), 128-136. <https://doi.org/10.1002/ijc.27658>.
74. Zhang, M., Hanna, M., Li, J., Butcher, S., Dai, H., & Xiao, W. (2010). Creation of a Hyperpermeable Yeast Strain to Genotoxic Agents through Combined Inactivation of PDR and CWP Genes [Online]. *Toxicological Sciences*, 113(2), 401-411. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp267>.