

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2022**

**Zuzana Nováčková**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**Zuzana Nováčková**

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**STANOVENÍ CIRKULUJÍCÍCH mikroRNA U PACIENTŮ  
S MELANOMEM**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

PLZEŇ 2022

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadaní bakalářské práce.

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadaní bakalářské práce.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 21. 3. 2022

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Nováčková Zuzana

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Stanovení cirkulujících mikroRNA u pacientů s melanomem

Vedoucí práce: doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Počet stran – číslované: 56

Počet stran – nečíslované: 34

Počet příloh: 4

Počet titulů použité literatury: 55

Klíčová slova: mikroRNA, melanom, RT real-time PCR, hladiny exprese, izolace RNA

Souhrn:

V posledních letech celosvětově narůstá počet pacientů s nádorovým onemocněním pigmentových buněk kůže, maligním melanomem. Ačkoliv mezi nejčastěji používané metody diagnostiky maligního melanomu patří chirurgická biopsie, mnohé výzkumy poukazují na výhody tekuté biopsie a využití cirkulujících molekul mikroRNA z periferní krve jako nových biomarkerů. Cílem této bakalářské práce byla izolace molekul RNA ze vzorků plazmy pacientů s melanomem a následné stanovení hladin exprese vybraných mikroRNA, které se dle literární rešerše jeví jako významné v souvislosti s maligním melanomem. Výsledkem je statistické vyhodnocení výtěžnosti metody izolace RNA kolonkovou metodou a čistoty získané RNA. Dále bylo stanovením na pilotním souboru pacientů získáno 5 mikroRNA, které vykazují souvislost s délkou bezpříznakového období (disease-free interval, DFI) a 6 mikroRNA, které vykazují souvislost s celkovým přežitím (overall survival, OS). Získané výsledky budou využity v širším výzkumu Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, s cílem uplatnění významných mikroRNA jako prognostických markerů při rozhodování o adjuvantní léčbě pacientů léčených pro melanom.

## **Abstract**

Surname and name: Nováčková Zuzana

Department: The Department of Paramedical science, Medical diagnostics studies and Public health

Title of thesis: Determination of the circulating microRNA in patients with melanoma

Consultant: doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Number of pages – numbered: 56

Number of pages – unnumbered: 34

Number of appendices: 4

Number of literature items used: 55

Keywords: microRNA, melanoma, RT real-time PCR, expression levels, RNA isolation

### Summary:

In recent years, the number of patients with malignant melanoma, a cancer of the pigment cells of the skin, has been increasing worldwide. Although surgical biopsy is one of the most commonly used methods for the diagnosis of malignant melanoma, many studies point to the benefits of liquid biopsy and the use of circulating microRNA molecules from peripheral blood as potential new biomarkers. The aim of this bachelor's thesis was to isolate RNA molecules from plasma samples of melanoma patients and subsequently determine the expression levels of selected microRNAs that, according to a literature search, appeared to be significant in relation to malignant melanoma. The result is a statistical evaluation of the yield of the RNA isolation method by column method and the purity of the obtained RNA. In addition, 5 microRNAs showing an association with disease-free interval (DFI) and 6 microRNAs showing an association with overall survival (OS) were obtained by determination in a pilot cohort of patients. The obtained results will be used in a broader research of the Institute of Biology, Faculty of Medicine, Charles University in Pilsen, with the aim of using significant microRNAs as prognostic markers in decision-making about adjuvant treatment of patients treated for melanoma.

## **Předmluva**

Bakalářská práce se zaměřuje na v posledních letech stále aktuálnější téma, čímž je nádorové onemocnění maligní melanom. Do problematiky včasné detekce tohoto onemocnění, volby vhodné léčby a detekce případné recidivy vnáší příznivé vyhlídky molekuly mikroRNA, které by mohly nalézt uplatnění jako nové biomarkery. Cílem této bakalářské práce je izolace molekul mikroRNA z plazmy periferní krve pacientů, kteří se léčí s melanomem, zjištění výtěžnosti metody a čistoty izolované RNA. Součástí je také stanovení hladin exprese izolované miRNA metodou RT real-time PCR a zhodnocení, zda některé z vybraných mikroRNA vykazují specifický vztah k době celkového přežití a bezpříznakového období u pacientů s melanomem. Tato bakalářská práce je součástí širšího projektu, který probíhá na Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni.

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala doc. RNDr. Martinu Peštovi, Ph.D., vedoucímu mé bakalářské práce, za pomoc s výběrem tématu, poskytnutí odborných podkladů a za množství cenných rad, podnětů a doporučení. V neposlední řadě také děkuji za věnovaný čas, vstřícnost a velikou podporu po celou dobu psaní bakalářské práce.

Mé poděkování patří také RNDr. Kateřině Houfkové, Ph.D. za nesmírnou ochotu, vstřícnost a odbornou pomoc s praktickou částí práce, za věnovaný čas a cenné připomínky. Ráda bych poděkovala také své rodině, bez které by nebylo možné práci dokončit.



# OBSAH

SEZNAM GRAFŮ .....	12
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	13
SEZNAM TABULEK .....	14
SEZNAM ZKRATEK .....	15
ÚVOD.....	19
TEORETICKÁ ČÁST .....	21
1 PODSTATA KARCINOGENEZE.....	21
1.1 Obecné příčiny vzniku nádorových onemocnění.....	21
1.2 Klíčové geny poškozené v procesu karcinogeneze.....	22
1.2.1 Protoonkogeny .....	22
1.2.2 Tumor-supresorové geny .....	23
1.3 Karcinogeneze je mnohastupňový proces.....	24
1.4 Průběh karcinogeneze .....	24
1.5 Charakteristické vlastnosti maligního nádoru.....	24
1.5.1 Soběstačnost v tvorbě proliferativních signálů.....	25
1.5.2 Poruchy inhibitorů buněčného dělení .....	26
1.5.3 Rezistence k aktivaci apoptózy.....	27
1.5.4 Získání neomezeného replikačního potenciálu.....	28
1.5.5 Indukce angiogeneze .....	29
1.5.6 Aktivace invazivity a získání metastatického potenciálu .....	29
1.5.7 Poruchy energetického metabolismu.....	30
1.5.8 Oslabení vlivu imunitního systému .....	31
2 MELANOM.....	32
2.1 Etiologie a rizikové faktory vzniku melanomu.....	32
2.2 Klinický obraz a diagnostika .....	33
2.2.1 Klinické varianty maligního melanomu .....	34
2.3 Mortalita a predikce přežití pacientů s maligním melanomem.....	35
2.3.1 Klasifikace melanomu dle AJCC staging systému.....	35
2.4 Léčba pacientů s maligním melanomem.....	36
3 MIKRORNA.....	38
3.1 Kanonický model biogeneze mikroRNA.....	38
3.2 Funkce mikroRNA a podíl na karcinogenezi .....	38
3.2.1 Role mikroRNA při vzniku a léčbě maligního melanomu .....	39
3.3 Extracelulární transport a degradace mikroRNA.....	40
3.4 Nomenklatura molekul mikroRNA .....	41

4	TEKUTÁ BIOPSIE (LIQUID BIOPSY).....	42
4.1	Biologická podstata tekuté biopsie .....	42
4.1.1	Cirkulující nádorové buňky .....	43
4.1.2	Cirkulující nádorová DNA .....	43
4.2	Sestavení diagnostického panelu mikroRNA pro maligní melanom.....	44
5	METODY KVANTITATIVNÍHO STANOVENÍ MIKRORNA .....	46
5.1	Příprava vzorku před samotným stanovením.....	46
5.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	46
5.2.1	RT real-time PCR .....	47
5.3	Sekvenování nové generace (NGS) .....	48
	PRAKTICKÁ ČÁST .....	51
6	CÍL A ÚKOLY PRÁCE .....	51
6.1	Hlavní cíl.....	51
6.2	Dílčí cíle.....	51
7	VÝZKUMNÉ OTÁZKY .....	52
8	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU .....	53
9	METODIKA PRÁCE .....	54
9.1	Izolace molekul RNA z plazmy .....	54
9.1.1	Přístrojové vybavení .....	54
9.1.2	Postup izolace RNA z plazmy .....	56
9.1.3	Postup měření koncentrace miRNA spektrofotometrem NanoDrop 1000 a výpočet čistoty RNA ve vzorku.....	58
9.2	Stanovení molekul miRNA metodou RT real-time PCR.....	59
9.2.1	Přístrojové vybavení .....	59
9.2.2	Postup reverzní transkripce s využitím soupravy Taq man MicroRNA Reverse Transcription Kit.....	61
9.2.3	Postup Real-time PCR.....	63
10	ANALÝZA NAMĚŘENÝCH HODNOT A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	65
10.1	Koncentrace a čistota izolovaných vzorků.....	65
10.1.1	Hodnocení výtěžku izolované RNA z plazmy .....	65
10.1.2	Hodnocení čistoty izolované RNA z plazmy .....	66
10.2	Stanovení hladin exprese vybraných molekul miRNA.....	67
10.2.1	Vyhodnocení vztahu vybraných miRNA k bezpříznakovému období (DFI) a celkovému přežití (OS).....	68
10.3	Shrnující zodpovězení výzkumných otázek.....	70
	DISKUZE .....	71
	ZÁVĚR.....	74
	SEZNAM LITERATURY.....	75

SEZNAM PŘÍLOH .....	82
PŘÍLOHY .....	83
Příloha A – Tabulka izolovaných vzorků včetně naměřených koncentrací, hodnot čistoty a doby odběru vzorku.....	83
Příloha B – Tabulka hodnot expresí významných miRNA majících vztah k DFI anebo k OS. ....	85
Příloha C – Grafy vztahu hladin expresí vybraných miRNA s bezpříznakovým obdobím (DFI). ....	87
Příloha D – Grafy vztahu hladin expresí vybraných miRNA s celkovým přežitím (OS). ....	89

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Výtěžnost izolace RNA všech vzorků.....	66
Graf 2: Parametry čistoty izolované RNA 280/260. ....	67
Graf 3: Záznam Real-time PCR vybraných miRNA. ....	68
Graf 4: Vztah předoperačních hladin exprese miR-320 s bezpříznakovým obdobím (DFI). .....	87
Graf 5: Vztah předoperačních hladin exprese miR-1980 s bezpříznakovým obdobím (DFI). .....	87
Graf 6: Vztah předoperačních hladin exprese miR-4487 s bezpříznakovým obdobím (DFI). .....	88
Graf 7: Vztah předoperačních hladin exprese miR-494 s celkovým přežitím (OS).....	89
Graf 8: Vztah předoperačních hladin exprese miR-1260 s celkovým přežitím (OS).....	89
Graf 9: Vztah předoperačních hladin exprese miR-99a s celkovým přežitím (OS).....	90

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vortex TX4 Digital IR vortex mixer (Velp Scientifica).....	54
Obrázek 2: Centrifuga Fresco 21 (Thermo Fisher Scientific).....	55
Obrázek 3: Centrifuga Micro Star 17 (VWR International).....	55
Obrázek 4: Centrifuga MiniSpin® (Eppendorf).....	56
Obrázek 5: Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies).....	56
Obrázek 6: Měření koncentrace RNA pomocí software NanoDrop 1000 3.7.....	58
Obrázek 7: Vortex MS3 B S000 (IKA® Werke GmbH & Co. KG).....	59
Obrázek 8: Centrifuga PCR Plate Spinner (VWR International).....	60
Obrázek 9: Termocycler Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies).....	60
Obrázek 10: Termocycler T100 Thermal Cycler (Bio-Rad).....	61
Obrázek 11: Laminární box ZEPHYRUS® PCR Box Harmony (Elisabeth Pharmacon) ..	61
Obrázek 12: Teplotní profil reverzní transkripce v termocycleru T100 Thermal Cycler (Bio-Rad).....	63
Obrázek 13: Teplotní profil RT real-time PCR v termocycleru Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies).....	64

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Významné miRNA a jejich hladiny exprese v souvislosti s délkou bezpříznakového období (DFI).....	69
Tabulka 2: Významné miRNA a jejich hladiny exprese v souvislosti s délkou celkového přežití (OS).....	69
Tabulka 3: Seznam izolovaných vzorků včetně koncentrací RNA, časového určení odběru a čistot získané RNA .....	83
Tabulka 4: Hodnoty expresí významných mikroRNA mající vztah k DFI anebo k OS .....	85

## SEZNAM ZKRATEK

5'	.....	The 5' untranslated region
3'	.....	The 3' untranslated region
ABCDE	.....	Assymetry – Border irregularity – Color variegation – Diameter – Evolving
AJCC	.....	American Joint Committee on Cancer
ALM	.....	Acral lentiginous melanoma
BAP1	.....	BRCA1 associated protein 1
Bcl-2	.....	B-cell lymphoma 2
BRAF	.....	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA1	.....	Breast cancer gene 1
CD4+	.....	Cluster of differentiation 4
CD8+	.....	Cluster of differentiation 8
CD45	.....	Cluster of differentiation 45
Cdk4;6	.....	Cyclin-dependent kinase 4;6
CDH1	.....	Cadherin-1
CDKN2A	.....	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	.....	Complementary DNA
cfDNA	.....	Circulating free DNA
cf-miRNA	.....	Circulating free microRNA
c-MYC	.....	Cellular myelocytomatosis oncogene
CpG	.....	Cytosin-phosphate-Guanin
CTCs	.....	Circulating tumor cells

ctDNA..... Circulating tumor DNA

DFI..... Disease-free interval

DGCR8..... DiGeorge syndrome critical region 8

DNA ..... Kyselina deoxyribonukleová

dNTPs ..... Deoxynucleotide triphosphates

E2F ..... E2 transcription factor

EDTA ..... Ethylenediaminetetraacetic acid

EGF-R..... Epidermal growth factor receptor

ErbB..... Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog

Fas..... Fas cell surface death receptor

FFPE..... Formalin-fixed, paraffin-embedded

FGF1/2..... Fibroblast growth factor 1/2

FRET ..... Fluorescence resonance energy transfer

GDP ..... Guanosine diphosphate

GLUT1 ..... Glucose transporter 1

GTP..... Guanosine triphosphate

HDL..... High-density lipoprotein

HeLa ..... Henrietta Lacks cells

HER2/neu ..... Humánní epidermální receptor

HGP ..... Human Genome Project

HUGO..... Human Genome Organisation

LDH..... Lactate dehydrogenase

LF UK..... Lékařská fakulta Univerzity Karlovy



LMM..... Lentigo maligna melanoma

lncRNA..... Long non-coding RNA

MC1R ..... Melanocortin-1 receptor

MEK ..... Mitogen-activated protein kinase kinase

MELmiR- ..... The miRNA panel

MITF..... Melanocyte inducing transcription factor

miRISC ..... MiRNA-induced silencing complex

miRNA ..... MicroRNA

MMP..... Matrix metalloproteinase

mRNA..... Messenger RNA

NGS ..... Next-generation sequencing

NK ..... Natural killers

NM..... Nodular melanoma

OS..... Overall survival

p14 ..... Protein p14

p16 ..... Protein p16

p53 ..... Tumor protein p53

PCR..... Polymerase chain reaction

pRb ..... Retinoblastomový protein

pre-miRNA ..... Precursor-microRNA

pri-miRNA..... Primary transcripts of microRNA

qPCR..... Quantitative polymerase chain reaction

RAN..... Ras-related nuclear protein

Ras ..... Rodina genů Ras

Rb ..... Retinoblastomový gen

RB1 ..... RB transcriptional corepressor 1

RISC ..... RNA induced silencing complex

RNA ..... Kyselina ribonukleová

RT-PCR ..... Reverse transcription–polymerase chain reaction

S-100b ..... S100 calcium binding protein B

SSM ..... Superficial spreading melanoma

TERT ..... Telomerase reverse transcriptase

TGFb ..... Transforming growth factor beta

Th1 ..... T helper type 1 cells

TP53 ..... Gen of tumor protein p53

TRBP ..... Transactivation response element RNA-binding protein

TSP-1 ..... Thrombospondin 1

UV ..... Ultraviolet

VEGF-A ..... Vascular endothelial growth factor A

XPO5 ..... Exportin-5

XRN2 ..... 5'-3' exoribonuclease 2

## ÚVOD

Melanom, nádorové onemocnění pigmentových buněk kůže, patří k nejčastějším onkologickým onemocněním a jeho incidence v posledních letech celosvětově narůstá. Na druhou stranu pokroky v onkologické léčbě, zvláště uplatnění biologické léčby, prodlužují především přežití pacientů a současně zlepšují kvalitu jejich života (Fikrle et Pizinger, 2010). Zároveň nová onkologická léčba (imunoterapie, nízkomolekulární inhibitory) se začíná uplatňovat i v podobě zajišťovací léčby. S výběrem vhodné onkologické léčby je úzce spojeno stanovení prognózy onemocnění. V současné době se pro tyto účely používají kromě zobrazovacích metod také biomarkery, jejichž vlastnosti pomohou rozlišit normální biologické procesy v lidském těle od procesů patogenních a nádorových. Proto mohou být biomarkery využity také k detekci případné recidivy onemocnění. Kromě proteinových markerů, například S-100B, získávají v současnosti stále větší význam biomarkery nukleových kyselin, ať jsou to molekuly ctDNA (detekce konkrétní mutace), tak ve výzkumu využívané různé typy nekódujících RNA, například miRNA nebo lncRNA.

Cílem této bakalářské práce je změřit hladiny exprese vybraných molekul miRNA v plazmě pomocí metody RT real-time PCR, včetně izolace molekul RNA z plazmy, změření koncentrace a stanovení parametrů čistoty. Bakalářská práce je součástí širšího projektu probíhajícího na Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, jehož cílem je stanovit molekuly mikroRNA v plazmě pacientů chirurgicky léčených pro melanom a určit, zda hladiny mikroRNA předoperačních, pooperačních odběrů a hladiny v období follow-up mohou mít prognostický význam.

Bakalářská práce je členěna na teoretickou a praktickou část. Teoretická část se zabývá problematikou procesu karcinogeneze a vzniku nádorového onemocnění s vymezením osmi charakteristických vlastností maligního nádoru. Následuje popis onkologického onemocnění kůže – maligního melanomu, včetně incidence, rizikových faktorů, klinického obrazu, léčby i čtyř základních variant onemocnění. Další část je zaměřena na molekuly mikroRNA, jejich biogenezi, funkci a vlastnosti, kterými se řadí na pozici potenciálních kandidátů na biomarkery nádorových onemocnění. Souvisejícím tématem je problematika přístupu tekuté biopsie (liquid biopsy), jakožto metody citlivějšího získání vzorku pro stanovení diagnózy, prognózy a případné léčby nádorových onemocnění.

Poslední kapitolou teoretické části jsou metody kvantitativního stanovení molekul miRNA, z nichž nejhojněji využívaná je metoda RT qPCR, zvláště RT real-time PCR, případně NGS.

Obsahem praktické části je izolace molekul mikroRNA z 50 vzorků plazmy pacientů léčených pro melanom a následné stanovení hladin získaných molekul metodou RT real-time PCR u 44 vzorků. Stanovení probíhalo v laboratořích Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Součástí praktické části je popis kroků jednotlivých metod, hodnoty stanovení koncentrací a čistoty izolované miRNA, včetně statistického vyhodnocení. V neposlední řadě jsou uvedeny také statisticky vyhodnocené výsledky stanovení molekul miRNA v plazmě metodou RT real-time PCR a jejich vztah k parametrům přežití. Součástí práce je také obrazová příloha včetně tabulek a grafů.

# TEORETICKÁ ČÁST

V teoretické části je popsán proces karcinogeneze a její obecné rysy. Následuje část věnovaná malignímu melanomu a molekulám mikroRNA. V další části práce je rozebrán aktuální pohled na metodiku tekuté biopsie, jejíž součástí je i stanovení molekul RNA v plazmě u onkologických pacientů. V závěrečné kapitole teoretické části jsou popsány metody kvantitativního stanovení molekul RNA.

## 1 PODSTATA KARCINOGENEZE

Pojmem karcinogeneze nebo také kancerogeneze je označován mnohastupňový proces, při kterém se z fyziologicky fungující buňky stává buňka nádorová (Adam et al., 2009).

### 1.1 Obecné příčiny vzniku nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění jsou geneticky podmíněné choroby, které v současné době patří mezi nejčastější genetická onemocnění. Příčin vzniku a rozvoje nádorového onemocnění je celá řada. Hlavní příčinou je vznik mutací klíčových genů regulace buněčného cyklu, apoptózy a oprav DNA. Tyto geny jsou dle výsledného efektu z hlediska karcinogeneze označovány jako protoonkogeny, resp. tumor-supresorové geny (Brdička, 2015) a je jim věnována samostatná kapitola.

Důležitou roli hraje v procesu karcinogeneze „vhodné prostředí“, které je nutným předpokladem transformace normální buňky na nádorovou buňku. Zde je zásadní genomová nestabilita buňky, kterou Douglas Hanahan a Robert A. Weinberg v roce 2011 zařadili do skupiny tzv. povolovacích mechanismů. Nestabilitou genomu se rozumí poruchy klíčových mechanismů, které zajišťují kontrolu a opravy genomu, čímž zabraňují karcinogenezi. Mohou se rozlišovat do dvou úrovní – porucha reparačních mechanismů genomové DNA a porucha kontrolních bodů v buněčném cyklu. Reparační mechanismy DNA slouží k vyhledávání a opravě chyb na úrovni pořadí bází, které vznikly během replikace, rekombinace či důsledkem dalších vlivů. Nejčastěji poškozenými mechanismy v nádorových buňkách bývá nukleotidová excizní oprava a oprava špatného párování. Druhou úrovní genomové nestability je porucha kontrolních bodů v buněčném cyklu, což vede ke změnám na úrovni chromozomů. Reciproká translokace a aneuploidie jsou nejvíce frekventované strukturní a numerické aberace spojené se vznikem nádorového onemocnění (Adam et al., 2009; Hanahan et Weinberg, 2011; Snustad et Simmons, 2017).

Kromě změn sekvence DNA může v buňce dojít k negenetickým (epigenetickým) změnám, které sice nevedou ke změně pořadí nukleotidů, přesto však mohou mít podobné důsledky. Epigenetické změny jsou specifické tím, že ovlivňují genom pomocí chemické remodelace struktury chromatinu. Jak bylo řečeno, nezahrnují změnu sekvence DNA a lze tedy jednoduše říct, že epigenetické mechanismy ovlivňují fenotyp, aniž by ovlivnily genotyp. Příkladem je metylace DNA v oblasti CpG ostrůvků, acetylace histonů, inaktivace chromozomu X či genový imprinting. Nejvýraznějším mechanismem, který bývá poškozen u nádorových buněk, je právě metylace CpG. V takovém případě dochází k aberantní hypermetylaci CpG ostrůvků, což zapříčiňuje inaktivaci tumor-supresorových genů (Adam et al., 2009; Snustad et Simmons, 2017).

Podíl na změnách v buněčném genomu mají i další faktory, které mohou tyto změny buď přímo iniciovat (tzv. mutageny) anebo podporovat v další progresi, čímž dochází k rychlejšímu a intenzivnějšímu rozvoji nádorového onemocnění. Jedná se o vlivy exogenní a endogenní. Exogenní vlivy působí na organismus zvenčí. Příkladem jsou účinky karcinogenních látek, expozice ionizujícímu záření nebo následky infekce karcinogenních virů (virus Epstein-Baarové, Papillomaviry, aj.). Endogenní vlivy vznikají uvnitř organismu. Příkladem je reaktivita volných kyslíkových radikálů, které vznikají jako nežádoucí produkty buněčného metabolismu. (Brdička, 2015).

## **1.2 Klíčové geny poškozené v procesu karcinogeneze**

Jak již bylo řečeno v předchozí kapitole, nejčastěji zasaženými geny, které stojí za rozvojem nádorové transformace buňky, jsou protoonkogeny a tumor-supresorové geny.

### **1.2.1 Protoonkogeny**

Geny nazývané onkogeny byly poprvé objeveny v genomu retrovirů. Mohou změnit procesy intracelulární signalizace hostitelské buňky a transformovat jí na nádorovou. Homologními geny k virovým onkogenům jsou lidské protoonkogeny. Protoonkogeny jsou specifické geny, které se běžně vyskytují v organismu. Kódují proteinové produkty zodpovědné za regulaci proliferace a vývoje buněk, především růstové faktory, jejich receptory, transkripční faktory a další. Pokud dojde k mutaci protoonkogenů, vzniká aktivovaný onkogen, který indukuje vznik nádoru (Kontomanolis et al., 2020; Snustad et Simmons, 2017).

K rozvinutí plně aktivního onkogenu postačí mutace pouze v jedné dominantní alele daného protoonkogenu. Díky tomu lze onkogeny nazývat dominantními aktivátory

nádorového bujení. Mutace protoonkogenů vznikají nejčastěji spontánními defekty v průběhu buněčného dělení, málokdy dochází k přenosu v zárodečné linii na potomstvo. Příkladem mutačních procesů, které vedou ke vzniku onkogenů jsou chromozomální translokace, bodové mutace nebo genové amplifikace (Kontomanolis et al., 2020; Snustad et Simmons, 2017).

Jedním z nejčastěji mutovaných protoonkogenů je rodina Ras, která kóduje signální proteiny vázající a zároveň štěpící guanosintrifosfát (GTP). Po navázání proteinu Ras dojde k aktivaci a zároveň ke štěpení GTP na guanosindifosfát (GDP). V případě mutace genu V-ras dojde k vazbě a aktivaci, ale štěpení již nenastává, díky čemuž vzniká stále aktivovaný signální protein, který indukuje buněčné dělení. Mutovaný gen Ras lze najít u pacientů s kolorektálním karcinomem, karcinomem slinivky břišní, nebo u akutní myeloidní leukémie (Masopust et Průša, 2003; Tomášek, 2013).

### **1.2.2 Tumor-supresorové geny**

Antionkogeny neboli tumor-supresorové geny je skupina genů, jejichž produkty hrají klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu, včetně inhibice proliferace a dělení buněk, indukce apoptózy a oprav DNA. Tím přispívají k normálnímu buněčnému vývoji a brání rozvinutí nádorového bujení. Pro inaktivaci tumor-supresorových genů je nutná mutace v obou daných recesivních alelách, čímž se patrně liší od vzniku mutací v protoonkogenech. Dalším rozdílem je původ mutace, který může u tumor-supresorových genů být ze 40 % dědičným přenosem, ale zároveň i somatickou mutací, která vzniká sporadicky u 60 % případů. Málokdy však v organismu dojde k mutacím obou recesivních alel souběžně. Inaktivaci tumor-supresoru a výsledné rozvinutí nádorového fenotypu vysvětluje tzv. „Knudsova hypotéza dvou zásahů“ z roku 1971. Dle teorie dochází nejprve k tzv. prvnímu zásahu, jímž může být dědičná nebo sporadická mutace první alely. Druhým zásahem je posléze sporadická mutace druhé alely v průběhu života. Výsledkem je inaktivovaný tumor-supresorový gen a volná cesta ke vzniku nádoru (Kontomanolis et al., 2020; Snustad et Simmons, 2017).

Velmi důležitým tumor-supresorovým genem je gen Rb. Jeho funkcí je tvorba proteinu pRB, který blokuje transkripční faktory, čímž inhibuje transkripci specifické mRNA pro růstové faktory. Mutací Rb vzniká nádor oka zvaný retinoblastom. Dalším zástupcem rodiny tumor-supresorů je gen TP53, kódující protein p53, jenž má na starost monitoraci poškození buněčné DNA. Mutace genu TP53 stojí například za vznikem

syndromu Li-Fraumeni (Masopust et Průša, 2003; Snustad et Simmons, 2017). Funkce pRb a p53 bude podrobněji rozebrána v podkapitole Poruchy inhibitorů buněčného dělení.

### **1.3 Karcinogeneze je mnohastupňový proces**

Za rozvojem nádorového onemocnění obvykle nestojí pouze jedna genetická změna v jediném genu. Bylo zjištěno, že vznik rakoviny je proces mnohastupňový, při kterém dochází k nahromadění genetických změn, které poskytují nádorovým buňkám selekční výhodu. Díky tomu začnou nádorové buňky postupně dominovat nad zdravými buňkami v dané tkáni. Odhaduje se, že pro rozvoj maligního fenotypu je zapotřebí nahromadění alespoň 4 genetických změn. Skutečnost, že se jedná o kumulace různorodých změn v genomu buňky, stojí za rozmanitostí a komplikovaností nádorových onemocnění. Tato heterogenita způsobuje komplikace například při výběru účinné léčby (Adam et al., 2009; Snustad, et Simmons, 2017).

### **1.4 Průběh karcinogeneze**

Vývoj nádorového onemocnění bývá zpravidla dlouholetou záležitostí. Průměrná doba rozvoje nádorového onemocnění je 5–10 let. Tuto přeměnu lze rozdělit do 3 fází (Masopust et Průša, 2003).

První fází je fáze iniciační, ve které dochází k mutaci určitého genu. Tato fáze je časově krátká, avšak nevratná. Buňka získává potenciál transformovat se do maligní podoby. Následuje fáze promoční, kdy jsou mutací zasažené buňky stimulovány promočními faktory k častější a masivnější proliferaci. Pokud se účinky promočních faktorů kumulují, buňky se transformují v maligní. Naopak, v případě, že jsou promoční faktory utlumeny, dochází ke zpomalení, v některých případech až k zastavení maligní transformace. Z tohoto důvodu může promoční fáze trvat až několik desítek let. Poslední fází je fáze progresu, v níž se nahromadí genetické změny charakteristické pro maligní nádor (Masopust et Průša, 2003). Tyto vlastnosti jsou podrobněji rozebrány v následující kapitole.

### **1.5 Charakteristické vlastnosti maligního nádoru**

Každá buňka má ve svém genomu zabudovaný systém obranných protinádorových mechanismů, který využívá k udržení stability a fyziologických buněčných funkcí. Charakteristické vlastnosti maligní transformace definovali Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg v roce 2000 a doplnili v roce 2011. Jsou to: soběstačnost v tvorbě proliferativních signálů, poruchy inhibitorů buněčného dělení, rezistence k aktivaci apoptózy, získání



neomezeného replikačního potenciálu, indukce angiogeneze, aktivace invazivity a získání metastatického potenciálu, poruchy energetického metabolismu a oslabení vlivu imunitního systému. Těchto osm zásadních změn v buněčné fyziologii reprezentuje zdařilý průnik do obraných mechanismů buňky, což umožní přežití nádorových buněk a jejich následnou proliferaci a šíření. Je nutné podotknout, že k možnosti rozvinutí těchto vlastností jsou zapotřebí již zmíněné povolovací mechanismy, jimiž jsou kromě nestability genomu (viz výše) také poruchy v protinádorové zánětlivé reakci (Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

### **1.5.1 Soběstačnost v tvorbě proliferativních signálů**

Skutečnost, že nádorové buňky získávají autonomii k růstovým signálům, byla definována jako jedna z prvních charakteristických vlastností nádorových buněk. Fyziologicky normální buňky potřebují ke své proliferaci růstové signály, jejichž sekrece je pečlivě kontrolována. Tyto signály iniciují vstup do cyklu buněčného růstu a dělení buňky. K mechanismu účinku růstových signálů dochází pomocí specifických transmembránových buněčných receptorů. Molekula proliferativního signálu (nejčastěji určitý ligand) se naváže na receptor, čímž spustí signální dráhy uvnitř buňky. Tyto dráhy následně donesou informaci do jádra buňky, která na podnět zareaguje proliferací. V současné době však stále nejsou zcela známy přesné mechanismy a podmínky vzniku růstových signálů, neboť jsou časově a prostorově regulovány z dané buňky na buňky sousední (Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

Nádorové buňky vyvinuly velké množství strategií, díky kterým se stávají v růstových faktorech soběstačné, což vede k mitotické hyperstimulaci. Zřejmé jsou molekulové změny na třech základních úrovních: na úrovni extracelulárních růstových faktorů, na úrovni transcelulárních receptorů a na úrovni intracelulárních signálních drah. Příkladem změn na úrovni extracelulárních růstových faktorů jsou případy, kdy nádorové buňky vysílají signály, kterými stimulují okolní normální buňky. Stimulované buňky následně odpovídají tvorbou nadbytku růstových faktorů. V jiném případě bylo zaznamenáno, že nádorové buňky si samy dokáží produkovat ligandy růstového faktoru, čímž se stávají zcela nezávislých na okolních buňkách. Známou změnou na úrovni transcelulárních receptorů je například zvýšení počtu receptorů. V tomto případě nádorové buňky hyperreagují na jinak limitující množství ligandu. Příkladem je overexprese receptoru EGF-R/erbB u karcinomů žaludku, mozku a prsu nebo receptoru HER2/neu v karcinomech žaludku a mléčné žlázy. Často dochází také ke strukturálním změnám v molekulách

receptorů, čímž nastane signalizace nezávislá na ligandu (Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

### **1.5.2 Poruchy inhibitorů buněčného dělení**

Buněčný cyklus je ve všech normálních buňkách velmi přísně regulován prostřednictvím antiproliferativních signálů. Jedná se o molekuly s inhibiční funkcí, které mohou být jak navázané na povrchu okolních buněk, tak rozpuštěné v extracelulárním prostoru (například TGFb). Do buňky se tyto molekuly dostávají stejným způsobem jako molekuly růstových signálů, tedy prostřednictvím transmembránových receptorů. Klíčovou funkcí inhibičních signálů je blokáce proliferace dvěma odlišnými mechanismy. Prvním je indukce buňky ke stažení se do G0 fáze, tzv. klidové. V této fázi se buňka nedělí, pouze plní své základní funkce a po odstranění potíží se může vrátit zpět do buněčného cyklu. Druhým mechanismem je donucení buňky k přechodu do G1 fáze, tzv. postmitotické. Buňka tak vynechá fázi mitózy, ve které by mohla v případě poškození přenést genetickou chybu do dceřiných buněk. Tím se trvale vzdá replikačního potenciálu a dochází k její diferenciaci (Hanahan et Weinberg, 2000).

Všechny antiproliferativní mechanismy jsou závislé na působení tumor-supresorových genů, konkrétně na jejich produktech – proteinech pRB a p53. Tyto proteiny fungují jako řídicí uzly v kontrolních fázích buněčného cyklu. Protein pRB přijímá signály z různých, především extracelulárních zdrojů a na jejich podkladě rozhoduje, zdali bude buňka v buněčném cyklu pokračovat. Jedním z hlavních regulačních mechanismů pRb je systém cyklinů a cyklin-dependentních kináz. Kinázy jsou enzymy, které katalyzují přeměnu substrátů, díky čemuž buňce umožní přechod do následující fáze. Regulytory kináz jsou proteiny cykliny, které v příslušný čas a za příslušných podmínek kinázu aktivují. Příkladem je systém cyklinu D s Cdk4 a Cdk6, který fosforiluje pRB, čímž dojde k uvolnění transkripčního faktoru E2F. Tento faktor poté aktivuje expresi genů nutných k realizaci S fáze buněčného cyklu (Adam et al., 2009; Hanahan et Weinberg, 2000; 2011). Naopak protein p53 funguje jako transkripční faktor, díky své funkci nazývaný „strážce genomu“. Monitoruje signály z intracelulárních zdrojů, zejména poškození DNA, a ze senzorů buněčného stresu. V případě, že shledá buňku nějakým způsobem nevhodnou k další proliferaci, spustí genovou expresi genů, které svými produkty zastaví její buněčný cyklus. V kritických případech p53 indukuje zahájení apoptózy (Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

Pro své přežití a rozvoj je zapotřebí, aby se nádorové buňky vyhnuly takto silným regulačním programům. Způsoby jsou principiálně velmi podobné těm, které nádorové buňky uplatňují v souvislosti se soběstačností v proliferativních signálech. Příkladem je snížená citlivost receptorů na signální molekuly TGF $\beta$  nebo jejich celková dysfunkčnost. Výsledkem je neregulovaný vznik komplexu Cyklin D s Cdk4, který inaktivuje pRB. Buňka tak prochází nekontrolovaně do S fáze buněčného cyklu i v případě, že je poškozená (Hanahan et Weinberg, 2000).

### **1.5.3 Rezistence k aktivaci apoptózy**

Programovaná buněčná smrt neboli apoptóza je velmi přísně regulovaný mechanismus, který slouží k odstranění již nefunkčních či ireverzibilně poškozených buněk z organismu. Fyziologicky nastává například při embryogenezi, eliminaci autoreaktivních T-lymfocytů nebo v určité fázi menstruačního cyklu. O patologickém procesu lze hovořit ve chvíli, kdy je spuštěna na základě poškození buňky následkem vystavení buněčnému stresu (Masopust et Průša, 2003).

Mechanismus apoptózy může probíhat několika způsoby, zásadní jsou však dvě hlavní signální dráhy – intracelulární (vnitřní) a extracelulární (vnější). Vnější dráha bývá aktivována například při napadení buňky intracelulárním parazitem. Poškozené buňky vystavují na svém povrchu Fas-receptory, tzv. „receptory smrti“. Ty jsou následně rozpoznány Fas-ligandy, které se na receptor napojí a vznikne komplex. Vnitřní dráha se uplatňuje například, pokud hrozí poškození buněčné DNA. Klíčová je zvýšená exprese p53, což způsobí navázání proapoptických proteinů na membránu mitochondrie. Následně dojde k vylití cytochromu C do cytosolu a degradaci mitochondrií. Obě tyto dráhy směřují ke společné části, kterou je aktivace kaspázové kaskády. Kaspázy patří do skupiny proteolytických enzymů, jejichž funkcí je štěpení proteinů jádra a cytoskeletu (Hanahan et Weinberg, 2000; 2011; Masopust et Průša, 2003).

Výsledkem je postupné zmenšování buňky, kondenzace jaderného chromatinu, lýza organel. Cytoplazma se odštěpuje a obklopena zbytky cytoplazmatické membrány tvoří tzv. apoptotická tělíska. Díky těmto váčkům nedochází k vylití cytoplazmy s buněčným obsahem do extracelulárního prostoru, a tedy ani k zánětlivé reakci, která vzniká při nekróze. Na závěr jsou apoptotická tělíska fagocytována okolními a profesionálními imunitními buňkami (Masopust et Průša, 2003).

Existuje hned několik způsobů, jak se nádorové buňky stanou rezistentními k jedné z hlavních bariér proti rakovině. Prvním a nejčastějším způsobem je ztráta funkce tumor-supresorového genu TP53, což vede k narušení vnitřní signální dráhy aktivace. Apoptóza je velmi přísně regulována systémem pro a protiapoptotických proteinů skupiny Bcl-2, a proto je logické, že dalším mechanismem vzniku rezistence k její aktivaci je zvýšení exprese antiapoptotických regulátorů. Posledním způsobem je defekt ve Fas-receptoru, který znemožní realizaci vnější signální dráhy aktivace (Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

#### **1.5.4 Získání neomezeného replikačního potenciálu**

Mohlo by se zdát, že pokud v buňce dojde k deregulaci proliferace mechanismy popsanými výše (tedy k poruše citlivosti k proliferativním signálům a indukci apoptózy), musí se zcela jistě buňka transformovat na buňku nádorovou. Data z mnohých výzkumů však ukázala, že zřejmě veškeré savčí buňky mají zabudovaný další obranný mechanismus, také nazývaný jako „mitotické hodiny“. Cílem tohoto programu je omezení počtu replikací buňky, především s využitím molekulárního mechanismu telomer. Telomery jsou koncové části ramen lineárních chromozómů, skládající se z repetitivních hexanukleotidů TTAGGG. Z podstaty mechanismu replikace je pouze jedno z nově vznikajících vláken syntetizováno kontinuálně. Druhé je syntetizováno po částech pomocí tzv. Okazakiho fragmentů. Výsledkem úprav těchto fragmentů do kompletního nově syntetizovaného vlákna je částečné zkrácení konců DNA chromozómů právě v oblasti telomer. To znamená, že se při každé replikaci zkracuje telomerická DNA na 5' - konci v dceřiných buňkách zhruba o 50–200 párů bází. V případě, že dojde ke kritickému zkrácení telomer, což odpovídá asi 60–80 buněčným cyklům, buňka přechází do nevratné fáze senescence neboli tzv. replikativního stárnutí. V této fázi je buňka stále schopna života, avšak neproliferuje. Ve výjimečných případech může nastat situace, kdy se buňka fázi senescence vyhne. Dochází tak k další replikaci, při které začne buňka přicházet o kódující DNA na koncích ramen chromozómů, neboť již nejsou chráněna telomery. Výsledkem je vznik strukturních chromozomových aberací (například dicentrických chromozómů) a nastává fáze krize. V této fázi většina buněčné populace umírá (Adam et al., 2003; Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

Pro rozvoj nádoru makroskopických rozměrů je nutné, aby došlo k defektu i v tomto obranném mechanismu, neboť se jedná o program nezávislý na mezibuněčné signalizaci. Specializovaný DNA enzym telomeráza dokáže dosyntetizovávat telomerní konce DNA. Je tvořena dvěma segmenty: RNA segmentem TR a segmentem TART, který má katalytickou funkci. Pokud není exprimován gen pro TART segment, nedochází k aktivaci

telomerázy, jak tomu je v normálních buňkách. U 85–90 % nádorových buněk však k exprimaci dochází a telomeráza se stává aktivní. Díky tomu nádorová buňka nepodléhá fázi senescence ani fázi krize a stává se „nesmrtelnou“. Typickým příkladem jsou HeLa buňky, nádorové buňky odebrané v roce 1951 z maligního karcinomu děložního čípku. Tyto buňky se mimo jiné také díky aktivní telomeráze replikují v kultivačních kulturách dodnes (Adam et al., 2009; Hanahan et Weinberg, 2000; 2011; Ivanković et al., 2006).

### **1.5.5 Indukce angiogeneze**

Novotvorba krevních kapilár neboli angiogeneze je pečlivě regulovaný proces, aktivní ve fázi embryogeneze. V dospělosti bývá tento proces také spouštěn, ale pouze přechodně ve fyziologických případech jako je hojení ran či reprodukční cyklus u žen. Pro všechny buňky včetně nádorových je přístup k cévám nutností. Díky nim mohou získávat přísun živin a kyslíku a zároveň odstraňovat metabolity a oxid uhličitý (Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

Angiogeneze, jak již bylo řečeno, je velmi přísně regulovaný mechanismus. K tomuto účelu slouží systém pozitivních signálů (aktivátorů), které angiogenezi stimulují, a negativních (inhibitorů), které ji naopak potlačují. Hlavním zástupcem aktivátorů je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), kódovaný genem VEGF-A. Signalizace ligandu VEGF může být regulována na úrovni jeho tří tyrosinkinázových receptorů či prostřednictvím exprese samotného genu VEGF-A (např. hypoxie, onkogenní stimulace aj.). Dalším známým aktivátorem je acidický a bazický růstový faktor fibroblastu (FGF1/2). Naopak významným inhibítoem je trombospondin-1 (TSP-1), jehož exprese je regulována proteinem p53. Interferon  $\alpha$ ,  $\beta$  a angiostatin jsou dalšími zástupci z řad inhibitorů angiogeneze (Adam et al., 2009; Hanahan et Weinberg, 2000).

Proliferující buňky nádorové tkáně získávají schopnost indukce angiogeneze překvapivě až v pozdější fázi bujení, procesem zvaným „angiogenic switch“. Při tomto procesu dojde k dysbalanci mezi aktivátory a inhibitory. Příkladem je inaktivace tumor-supresoru p53, díky které dojde ke snížení koncentrace TSP-1. Naopak aktivace onkogenního proteinu RAS je úzce spojena se zvýšením koncentrace VEGF, což vede ke stimulaci angiogeneze (Adam et al., 2009).

### **1.5.6 Aktivace invazivity a získání metastatického potenciálu**

Metastázy jsou nádorová ložiska vzdálená od hlavní nádorové masy. Tvoří příčinu úmrtí u 90 % pacientů s rakovinným onemocněním. Jedná se o několikastupňový proces

biologických a biochemických změn, který lze označovat jako tzv. „invazivně-metastatickou kaskádu“. V prvním kroku nádorové buňky pronikají z lokálně napadené tkáně do přilehlých cév krevního a lymfatického systému. Těmito cestami se šíří do vzdálených tkání. Po přechodu z lumen cév do parenchymu nové tkáně dochází ke vzniku menších shluků nádorových buněk (Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

Klíčové pro schopnost invazivity jsou procesy remodelace extracelulárního prostoru a změny v adhezivitě buněk. Mezi hlavní molekuly buněčné adheze patří kadheriny, konkrétně kadherin E. Jedná se o transmembránové nebo s membránou asociované glykoproteiny, jejichž funkcí je vytvoření a udržení rovnováhy mezi epiteliálními buňkami, řízení jejich přežívání a proliferace. E-kadherin je kódován tumor-supresorovým genem CDH1, jehož mutace vede ke snížení exprese E-kadherinu, a tudíž podnícení invazivity (Adam et al., 2009; Roy et Berx, 2008).

Metaloproteinázy (MMP) jsou důležité proteolytické enzymy, které se účastní remodelace extracelulární matrix. Z tohoto důvodu jsou cílem nádorových buněk při snaze o získání schopnosti invazivity a tvorby metastáz. Vzhledem k tomu, že jsou MMP regulovány na více úrovních, existuje mnoho míst vzniku možného defektu. Například zvýšení exprese MMP růstovými faktory, inaktivace inhibitorů MMP apod. (Adam et al., 2009).

### **1.5.7 Poruchy energetického metabolismu**

Nádorové buňky upravují kormě proliferace i svůj energetický metabolismus, s cílem podpořit především buněčný růst a dělení. Příkladem je přeprogramování metabolismu glukózy převážně na glykolýzu. Za tímto účelem dochází k regulaci glukózových receptorů GLUT1 a vyššímu příjmu glukózy do buňky. Vzniklé meziproducty glykolýzy jsou distribuovány do různých biosyntetických drah, což usnadňuje, a především zrychluje tvorbu makromolekul potřebných pro vznik nových buněk (Hanahan et Weinberg, 2011).

S přeprogramováním glukózového metabolismu souvisí i fakt, že u některých nádorů byly objeveny subpopulace nádorových buněk, z nichž každá využívala jinou cestu pro tvorbu energie. Metabolismus první subpopulace fungoval na principu anaerobní glykolýzy, jejímž konečným produktem byl laktát. Druhá subpopulace symbioticky využívala laktát pro získání energie pomocí Krebsova citrátového cyklu (Hanahan et Weinberg, 2011).

### **1.5.8 Oslabení vlivu imunitního systému**

Ve fyziologicky fungující tkáni jsou veškeré buněčné a molekulární procesy bedlivě monitorovány buňkami imunitního systému, který by měl ve většině případů rozpoznat počínající nádorové bujení a eliminovat ho. Přesto však dokáží buňky solidních nádorů této monitoraci uniknout. Mnohé výzkumy potvrdily, že k rozvoji nádorového onemocnění je nutným předpokladem oslabený imunitní systém. Experimentální výzkum na myších prokázal, že defekty ve vývoji nebo funkci imunitních buněk vedly k evidentně vyššímu výskytu nádorů. Konkrétně se jednalo o cytotoxické T-lymfocyty (CD8+), pomocné Th1-lymfocyty (CD4+) a NK buňky. Přesto jsou však komponenty specifického i přirozeného imunitního systému velkou překážkou pro rozvoj nádorového bujení. (Hanahan et Weinberg, 2011).

## 2 MELANOM

Melanom je nádorové onemocnění pigmentových buněk kůže (melanocytů), jehož výskyt v posledních letech narůstá v celosvětovém měřítku. V Evropě bylo za rok 2010 nově diagnostikováno 15 případů na 100 tisíc obyvatel (Fikrle et Pizinger, 2010), zatímco za rok 2014 se pouze v České republice nově diagnostikovalo 22,9 případů na 100 tisíc obyvatel (Kodet et Krajsová, 2017). Nejvíce ohroženou skupinou jsou pacienti s bílou barvou pleti, nejčastěji ve středním a starším věku. Postižení pacientů s tmavší barvou pleti bývá vzácnější, stejně tak vývoj maligního melanomu u dětí v předpubertálním věku. U mužů je maligní melanom pátým nejčastějším rakovinným onemocněním, u žen šestým (Ahmed et al., 2020; Fikrle et Pizinger, 2010).

### 2.1 Etiologie a rizikové faktory vzniku melanomu

Rizikové faktory ovlivňující vznik melanomu lze klasifikovat na genetickou a fenotypovou výbavu jedince a na vlivy vnějšího prostředí. Příčina vzniku melanomu na genetickém podkladu bývá z 10 % způsobena autozomálně dominantním zděděním mutace od jednoho z rodičů. Familiární melanom bývá nejčastěji způsoben germinální delecí na krátkém raménku chromozomu 9, v oblasti 9p21. Zde se nachází důležité geny CDKN2A a Cdk4, jejichž produkty p14 a p16 mají důležitou regulační funkci buněčného cyklu. Mezi další mutované geny nalézané u maligního melanomu, se řadí poškození tumor-supresorového genu BAP1, který kóduje BRCA1-associated protein 1 (Fikrle et Pizinger, 2010; Kodet et Krajsová, 2017). Funkcí jeho proteinového produktu BAP1 je regulace diference, opravy DNA a dalších částí buněčného cyklu (Foretová et al., 2019). V neposlední řadě je nasnadě zmínit geny MITF, MC1R nebo RB1, jejichž mutace se taktéž může projevit vznikem maligního melanomu. Melanom vznikající de novo je způsoben somatickou mutací, z níž nejčastější bývá v genu BRAF (Fikrle et Pizinger, 2010; Kodet et Krajsová, 2017). Konkrétním příkladem je záměna v exonu 15, kde je na pozici 600 místo valinu zařazena kyselina glutamová. Tato mutace se označuje BRAF-V600E a nachází se přibližně u 50 % všech pacientů s melanomem (Varrone et Caputo, 2020).

Z rizikových faktorů vnějšího prostředí je nejlépe zdokumentovaný vliv UV záření. Riziko tvorby melanomu vzniká po opakovaném spálení kůže při pobytu na slunci, při pobytu v soláriích s neodborně instalovanými zdroji UV záření, a další. Nejrizikovějšími skupinami jsou děti a osoby s kožním fototypem I a II (velmi světlá kůže, světlé vlasy, modré oči) (Kodet et Krajsová, 2017). Existuje také několik geneticky podmíněných syndromů,



kdy jsou pacienti na UV složku slunečního záření extrémně citliví. Jako příklad lze uvést onemocnění Xeroderma pigmentosum, které se vyznačuje okamžitým popálením kůže, zvýšeným vznikem puchýřů a melanomů po vystavení UV záření (Lehmann et al., 2011).

## 2.2 Klinický obraz a diagnostika

Zhruba 10–20 % melanomů vzniká ze získaných dysplastických melanocytárních névů. Klasické melanocytární névy vznikají již v prvních měsících života a jejich tvorba probíhá přibližně do 30. roku. Pokud počet normálních névů přesáhne 100, riziko transformace na melanom se zvyšuje. Nikoliv však tolikrát, jako u pacientů, kteří zaznamenají vznik většího množství přímo dysplastických névů do 30. roku života (Kodet et Krajsová, 2017).

Rozeznání dysplastického névu od počínající maligní melanocytární transformace bývá mnohdy obtížné. Proto byl již v roce 1985 zaveden systém ABCDE, jehož jednoduchost umožňuje usnadnění diagnostiky počínajícího melanomu i pro neodbornou veřejnost. Každé jednotlivé písmeno ve zkratce ABCDE má svůj význam. A (Assymetry) udává nepravidelnost tvaru pigmentového névu. B (Border irregularity) znamená, že okraje névu nejsou plně ohraničené, ale spíše nejasné a nepřesné. C (Color variegation) je označení pro různobarevnost névu, zahrnující hnědou a černou barvu. U nálezu šedavé, modré nebo červené barvy je nutné dbát zvýšené pozornosti. D (Diameter) definuje průměr daného névu. V případě, že průměr přesahuje 6 mm, může se jednat o tvořící se melanom. Posledním parametrem je E (Evolving), tedy rozvoj névu v čase. Tento parametr byl sice přidán později, přesto má však pro diagnostiku zásadní význam (Třešková et al., 2014; Kodet et Krajsová, 2017).

Ačkoliv je diagnostické pravidlo ABCDE přesné a jednoduché, v některých případech nepostačí k definitivnímu určení diagnózy. Neinvazivním vyšetřením, které se používá pro zpřesnění výsledku je dermatoskopické vyšetření. Funguje na principu fotografie névu, následného několikanásobného zvětšení a zanalyzování výše zmíněných kritérií. (Třešková et al., 2014). Výhodou je bezesporu větší diagnostická přesnost než při pozorování pouhým okem, a také snížení počtu chirurgických excizí, které by mohly být vykonány zbytečně. Nejspecifičtější a nejpřesnější vyšetřovací metodou však stále zůstává chirurgická excize, následovaná histologickým vyšetřením odebrané tkáně (Fikrle et Pizinger, 2010; Třešková et al., 2014).

Zdálo by se, že díky jasným a přesně daným diagnostickým postupům jsou melanocytové transformace včasně zachyceny. Tak tomu však bývá v menším množství případů. Příčinou může být nedostatečná znalost pacienta, strach z návštěvy lékaře, nebo i pochybení ze strany lékaře (Fikrle et Pizinger, 2010). Velké naděje se proto vkládají do nádorových biomarkerů, jejichž koncentrace se mění v závislosti na probíhající maligní přeměně melanocytů. Ačkoliv se na základě mnoha výzkumů předpokládá diagnostické využití biomarkerů, v rutinní klinické praxi se zatím nepoužívají. Hlavním důvodem je nedostatečná citlivost a specifita (Stark et al., 2015).

### **2.2.1 Klinické varianty maligního melanomu**

Povrchově se šířící melanom (SSM) patří k nejčastějším typům maligního melanomu, tvořící přibližně 70 % případů. Postihuje pacienty všech věkových skupin, častěji však ženy (Longo et al., 2011). Ve většině případů vzniká na kůži de novo, může se ale také rozvinout z prekursorového dysplastického névu (Třešková et al., 2014). SSM roste ve dvou fázích. Nejprve podélně, paprskovitým směrem od středového ložiska, přičemž vykazuje obvykle kombinaci hnědé, černé, šedomodré či bílé barvy. Tato fáze může trvat po dobu několika měsíců až let. Následuje fáze vertikálního růstu, při kterém se ložisko zpevňuje a vyvstává nad povrch okolní kůže. S touto fází se výrazně zhoršuje prognóza (Fikrle et Pizinger, 2010; Longo et al., 2011).

Nodulární melanom (NM) představuje 15–30 % maligních melanomů, což ho řadí na druhé místo po SSM. Avšak prvenství zaujímá v agresivitě, neboť se jedná o nejvíce agresivní variantu maligních melanomů s velmi špatnou prognózou. Příčinou je zcela jistě typ růstu, který je částečně odlišný od růstu ostatních typů melanomu. NM roste již od počátku vertikálně, zatímco horizontální růst je minimální (Brlek et al., 2016). Výsledkem je vyvýšený symetrický nodulus s pravidelnými okraji, jehož barva může být růžovočervená, v případě pigmentace i hnědá či černá. Do několika měsíců od fáze růstu dochází k ulceraci NM, k jeho krvácení a vzniku krust (Kelly et al., 2003). Incidence NM roste s věkem, přičemž postižení bývají zpravidla muži starší 50 let. Nejčastěji zasažené oblasti jsou hlava, krk a dolní končetiny (Brlek et al., 2016).

Lentigo maligna melanoma (LMM) tvoří 4–15 % maligních melanocytárních onemocnění, vyskytující se u pacientů staršího věku, nejčastěji nad 70 let. Postihuje především části těla, které jsou dlouhodobě vystaveny kumulativním účinkům UV složky slunečního záření, tedy oblasti hlavy a krku. LMM se v 5–29 % tvoří transformací

z prekursorového melanomu Lentigo melanoma (LM), vznikajícího in situ. LM se projevuje jako pozvolna rostoucí skvrna na vodorovné hranici epidermální a dermální části kůže (Rastoder et Glud, 2019). Zbarvení bývá většinou od tmavšího opálení, přes různé odstíny hnědé až černé. K rozvoji LMM z LM dochází po zhruba 10 až 15 letech. Hlavním znakem je vznik vyvýšeného útvaru (papuly) tmavší barvy a síťová pigmentace černé barvy (Šitum et al., 2010).

Akrolentiginózní melanom (ALM) je diagnostikován u 5–10 % melanomů. Jde o nejméně častou variantu melanomu v europoidní populaci, naopak u populace mongoloidní a negroidní se vyskytuje nejvíce. ALM má nejhorší prognózu ze všech typů maligních melanomů, s čímž souvisí skutečnost, že stanovení diagnózy bývá většinou až v pozdních stádiích onemocnění. Důvodem mohou být mimo jiné také nespecifické klinické projevy, kterými se ALM vyznačuje. Mezi obvykle postižené oblasti patří chodidla, dlaně a lůžka pod nehty. Avšak přibližně 28–34 % ALM nejsou pigmentované a lze je tak lehce zaměnit za jiné abnormality vyskytující se na výše zmíněných místech, například bradavice, plíseň nohou, vředy apod. (Teramoto et al., 2020; Wouters et Thissen, 2012).

## **2.3 Mortalita a predikce přežití pacientů s maligním melanomem**

Mortalita maligního melanomu tvoří 80 % všech úmrtí na nádorové kožní onemocnění. Ačkoli incidence melanomu stoupá, křivka mortality se více dramaticky nemění. To odráží úsilí lékařů a odborníků, kteří pracují na zvýšení včasné diagnostiky, která bývá spojená s lepší prognózou, a zároveň efektivitě terapie (Třešková et al., 2014).

### **2.3.1 Klasifikace melanomu dle AJCC staging systému**

Délku přežití a prognózu lze nejlépe definovat na základě tzv. AJCC (American Joint Committee on Cancer) staging system, který byl formulován v roce 2009, od té doby však mnohokrát aktualizován a doplňován. Dle AJCC lze rozdělit maligní melanom do čtyř stádií podle tloušťky, míry ulcerace, mitotického indexu a dalších kritérií (Balch et al., 2009).

Stádium I a II je spojeno s příznivou prognózou. Doba přežití prvních 10 let od diagnózy se nejčastěji pohybuje v rozmezí 85–99 %, záleží však na dalším rozdělení do podkategorií T1–T4, dle výše zmíněných kritérií. Klíčovou roli hraje postižení regionálních lymfatických uzlin. V případě, že nádorové buňky regionální uzliny infiltrují, jedná se o stádium III. V tomto stádiu je hlavním prediktivním faktorem počet infiltrovaných regionálních uzlin, přičemž samotná infiltrace může být mikroskopická i makroskopická. Desetiletá míra přežití činí kolem 33–52 %. Posledním stádiem je stádium IV, pro které jsou

typické metastázy ve vzdálených tkáních, kvůli čemuž je stádium spojeno s velmi špatnou prognózou. Důležitou prediktivní roli zde hraje sérová hladina enzymu laktátdehydrogenázy (LDH), podle které se pacienti rozdělují do dalších podskupin. V případě zvýšené koncentrace LDH je pacient automaticky zařazen do podskupiny, kde míra ročního přežití činí 18–33 %, pětiletého však už jen 10 % (Balch et al., 2009; Třešková et al., 2014).

## 2.4 Léčba pacientů s maligním melanomem

Zlatým standardem pro diagnostiku a zároveň i pro léčbu je chirurgická excize nádorového ložiska. Společně s ložiskem je odebírán lem zdravě vypadajících okrajů o šířce od 5 mm do 2 cm. Šířka bezpečnostních okrajů je stanovena na základě Breslowova indexu. Excize bývá zároveň namířena na první spádovou uzlinu po mizním toku (tzv. sentinelovou), kde by se v případě invazivního nádoru mohly nacházet metastázy. Názory odborníků se však rozcházejí, neboť dle některých výzkumů nemá excize sentinelové uzliny vliv na dobu přežití pacienta. Diagnostický význam je však stále platný (Longvert et Saiag, 2019). U pacientů v pokročilých stádiích melanomu se využívá chemoterapie takovými léčivy, jejichž účinkem je zpomalení růstu nádorových buněk a inhibice syntézy jejich DNA, např. dakarbazin nebo temozolomid. Míra odpovědi na chemoterapeutika je však pouze 5–15 %. V posledních letech byly proto vyvinuty nové metody terapie, a tak je chemoterapie využívána především v případě, pokud účinnější léčiva selhávají (Longvert et Saiag, 2019; Varrone et Caputo, 2020).

Novějšími možnostmi léčby jsou imunoterapie a cílená léčba. Imunoterapie funguje na principu inhibice kontrolních bodů buněčného cyklu imunitních buněk. Výsledkem je stimulace imunitních buněk, což vede ke zvýšení protinádorové imunitní odpovědi. Míra léčebné odpovědi se pohybuje kolem 30–58 %. Příkladem imunoterapeutických léčiv je ipilimumab, nivolumab a pembrolizumab, včetně jejich kombinací. Nevýhodou imunoterapie je riziko vzniku imunopatologických onemocnění, především kožní, jaterní, endokrinní či trávicí povahy. Zřejmě proto se další výzkumy ubírají směrem stimulace protinádorové imunity pomocí geneticky modifikovaných organismů, například virus herpes simplex-1, který produkuje faktor stimulující makrofágy a granulocyty (Longvert et Saiag, 2019).

Cílená terapie se zaměřuje na konkrétní signální dráhy a s nimi souvisejícími proteiny. U zhruba poloviny všech diagnostikovaných melanomů se nachází mutace genu BRAF. Z tohoto důvodu jsou vyvíjena léčiva, která slouží jako inhibitory BRAF kinázy,

konkrétně mutace BRAF-V600E. Mezi příklady léčiv patří vemurafenib a dabrafenib, na jejichž léčebný účinek odpovídá přibližně 50 % pacientů. Mutace BRAF kinázy souvisí s mutací signální dráhy genu MEK. Studie prokázaly až 76 % míru odpovědi při použití kombinace inhibitoru BRAF a inhibitoru MEK (např. vemurafenib s kobimetinibem). Vzhledem k tomu, že inhibitory jsou specificky toxické, může dojít k výskytu nežádoucích účinků, od zvýšené citlivosti a horečky až po dlaždicobuněčný karcinom (Longvert et Saiag, 2019).

### 3 MikroRNA

Nukleová kyselina mikroRNA (miRNA) byla poprvé objevena roku 1993 výzkumným týmem profesora Ambrose u hlístice *Caenorhabditis elegans*. Jde o skupinu nekódujících jednovláknových RNA, o délce pouze 19–25 nukleotidů. Jejich vznik probíhá v jádře a v cytoplazmě buňky. MiRNA mají důležitou regulační funkci v mnoha biologických procesech, například proliferaci a diferenciaci buněk, apoptóze. Jejich uplatnění lze nalézt i v regulaci vlastností kmenových buněk, buněk imunitního systému a samozřejmě nádorových buněk. V neposlední řadě miRNA slouží jako důležitý posel v mezibuněčné komunikaci (Gajos-Michniewicz et Czyz, 2019; Slabý et Svoboda, 2012).

#### 3.1 Kanonický model biogeneze mikroRNA

Geny pro expresi miRNA se nachází na všech lidských chromozomech kromě chromozomu Y. Biogeneze je velmi specifická a přísně regulovaná. Prvním krokem je přepis DNA do primárního transkriptu (pri-miRNA) enzymem RNA polymerázou II. Vzniklý dlouhý transkript se dále štěpí v buněčném jádře komplexem proteinů, tzv. „Microprocessor complex“. Ten se skládá z ribonukleázy Drosha a proteinu DGCR8 (nebo také Pasha u *Drosophily Melanogaster*). Výsledkem je vznik prekurzorové struktury miRNA (pre-miRNA), která má v sekundární konformaci tvar připomínající vlásenku. Její délka je v průměru okolo 70 nukleotidů s dvounukleotidovým přesahem, který hraje roli při exportu do cytoplazmy. Přesah je rozpoznáván komplexem transportního proteinu Exportinu-5 (XPO5) s proteinem Ran, který je závislý na energii ve formě GTP (RAN-GTP). V cytoplazmě na pre-miRNA nasedá RNA polymeráza III, známá spíše jako endonukleáza Dicer, která v komplexu s vazebným proteinem TRBP syntetizuje zralou dvoušroubovici pre-miRNA. V poslední fázi je dvoušroubovice rozvolněna, jedno vlákno se poté pomocí proteinu Agronaut začlení do komplexu RISC (RNA induced silencing complex). Druhé vlákno pre-miRNA je degradováno. Výsledná maturovaná miRNA se v podobě miRISC váže na 3' nepřekládanou oblast specifické mRNA (Desvignes et al., 2015; Slabý et Svoboda, 2012). Kromě kanonické cesty biogeneze existují i cesty nekanonické, které nejsou závislé na nukleázách Drosha a Dicer (Ha et Kim, 2014).

#### 3.2 Funkce mikroRNA a podíl na karcinogenezi

Jak již bylo řečeno v úvodu, v současné době nemůže být pochyb o regulační funkci miRNA. Odborníci se domnívají, že miRNA stojí za regulací více než poloviny kódujících genů lidského genomu. Mechanismus regulace se odvíjí od interakce miRNA s mRNA,

přesněji, miRNA nasedá na 3' nepřekládající konec mRNA pomocí principu komplementarity. Funkcí 3' nepřekládaného konce je dohled nad metabolismem své mRNA, včetně kvality translace, stability, transportu apod. V případě, že se miRNA naváže na tento konec zcela nebo alespoň téměř dokonale dle principu komplementarity, dojde k úplné degradaci mRNA. Pokud však vazba dokonalá není, translace je „pouze“ utlumena (Gajos-Michniewicz et Czyz, 2019; Slabý et Svoboda, 2012).

Messengerová RNA přenáší informaci transkribovanou z určitého genu k translaci do struktury proteinů. Vzhledem k tomu, že miRNA funguje jako utlumovací mechanismus mRNA, lze ji rozdělit podobně jako regulační proteiny na onko-miRNA a tumor-supresorové miRNA. Záleží na informaci, kterou mRNA v danou chvíli přenáší. Jestliže miRNA degraduje mRNA kódující onkoproteiny, jedná se o tumor-supresorovou miRNA. Pokud však degraduje mRNA, které kódují tumor-supresory, pak lze hovořit o onko-miRNA (onkomiRs). Příkladem je miR-638, jenž jako onkomiR degraduje mRNA kódující několikrát zmíněný protein p53. Obecně tedy lze říci, že deregulovaná miRNA může pozitivně přispět k transformaci buněk na nádorové (Varrone et Caputo, 2020).

### **3.2.1 Role mikroRNA při vzniku a léčbě maligního melanomu**

Z funkce deregulované miRNA je zřejmé, že podíl na transformaci v maligní nádorové buňky kůže (melanomogeneze) je možný. Od objevení miRNA byla popsána řada konkrétních vlivů miRNA na cílové geny. Jedním z významných příkladů je úloha miRNA v souvislosti s regulací genu MITF, který kóduje transkripční faktory. Tyto transkripční faktory regulují buněčný cyklus melanocytů, přičemž vysoké koncentrace transkripčních faktorů způsobují vysokou diferenciaci a proliferaci. Naopak nízké koncentrace MITF jsou spojené se vzrůstajícím metastatickým potenciálem a invazivitou melanomu. Expresí genu MITF reguluje více zástupců ze skupiny molekul miRNA, jedním z nich je také miR-182. V případě její nadměrné exprese dochází ke stimulaci MITF a tím k posílení proliferačního potenciálu melanocytů. Dále miR-137, jejíž účinek vede k potlačení exprese MITF. Výsledkem je zakládání vzdálených metastáz, což poukazuje na špatnou prognózu pacientů ve IV. stádiu melanomu. Dalšími miRNA, které se podílejí na regulaci MITF jsou například miR-26a, miR-101, miR-148, miR-211, miR218, miR-340 nebo miR-542-3p (Varrone et Caputo et al., 2020).

Jiným příkladem je korelace miR-145 s genem TP53. Zde p53 stimuluje zvýšení koncentrace miR-145, které vede k supresi genu c-MYC. Tím dochází k zastavení progresu

nádoru. Dalo by se tedy říct, že vyšší koncentrace miR-145 vypovídá o zachované aktivitě p53, společně s jeho klíčovými protinádorovými vlastnostmi (Segura et al., 2010).

Při dlouhodobé cílené léčbě melanomu se může u pacienta rozvinout rezistence na léčiva, která způsobí další progresi onemocnění. Jako příklad lze použít maligní melanom s mutací v genu BRAF, a to BRAFV600 či BRAF/MEK. Jako terapie se používají inhibitory signálních drah, které geny exprimují (př. lék vemurafenib). MiRNA má velký význam v predikci odpovědi na terapii, neboť některé miRNA dokáží rezistenci přímo vyvolat (miR-34a, miR-100 či miR-211) a některé mají naopak schopnost citlivost na léčbu zvýšit, či dokonce obnovit (miR-7, miR-32 nebo miR-524 5p) (Varrone et Caputo, 2020).

### **3.3 Extracelulární transport a degradace mikroRNA**

Molekuly miRNA jsou po svém vzniku náchylné ke štěpení ribonukleázami. Proto využívají několik typů transportních struktur, které je před RNázami ochrání. Jednou z variant extracelulárního transportu je navázání na bílkovinný přenašeč, například již zmíněný protein Agronaut, nebo lipoproteinové částice HDL. Druhou variantou je sbalení miRNA do extracelulárních váček (vezikulů). Tyto váčky mohou být několikadruhé podle způsobu vzniku. Exozómy jsou nejmenší typ extracelulárních vezikulů, vznikající splnutím buněčných endozómů s cytoplazmatickou membránou. Ektozómy dosahují větších velikostí a vznikají vypučením cytoplazmatické membrány do extracelulárního prostoru (Gajos-Michniewicz et Czyz, 2019).

Nádorové buňky vylučují části svých cytoplazmatických membrán ve formě mikrovezikulů, které se nazývají onkozómy. V závislosti na množství vyloučených onkozómů lze odvodit progresi a agresivitu nádorů (Gajos-Michniewicz et Czyz, 2019).

Molekuly miRNA jsou vysoce stabilní. Bylo zjištěno, že životnost některých orgánových miRNA je řádově několik desítek hodin i dnů. Častěji však bývá metabolismus miRNA více zrychlený, neboť pro regulaci buněčného cyklu je nutná velká flexibilita a aktivita. Jako příklad lze uvést miR-26b, která se u dělících se buněk degraduje rychleji, než u buněk, jejichž buněčný cyklus byl zastaven. Degradace molekul mikroRNA na modelovém organismu *Caenorhabditis elegans* probíhá enzymem z rodiny exoribonukleáz XRN2, a to ve směru od 5' konce k 3' konci (Slabý et Svoboda, 2012).



### 3.4 Nomenklatura molekul mikroRNA

Molekuly mikroRNA mají stejně jako jiné nukleové kyseliny přesně daný systém klasifikace a pojmenování. Již od roku 2002 existuje online databáze „miRBase“ (<http://mirbase.org/>; dříve „microRNA Registry“), která obsahuje specifické údaje všech doposud známých miRNA, včetně biogenetických prekurzorů, přesném pořadí nukleotidů, informací o pozici v genomu, a dalších. Zároveň databáze „miRBase“ přiřazuje unikátní označení nově objeveným miRNA dle přesně stanovených pravidel (Kozomara et al., 2019).

První částí názvu mikroRNA je zkratka označující živočišný druh, v jehož genomu byla daná miRNA popsána, například „mmu-“ je označení pro myš, „hsa-“ označuje lidský genom apod. Dále následuje zkratka názvu „mikroRNA“, která by měla, dle pokynů k nomenklatuře miRNA popsané v publikaci „miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants“ vypovědět, zda se jedná o genomový lokus, kde se daná mikroRNA nachází (v tom případě se označuje „mir“), nebo o meziprodukt biogeneze miRNA („*miR*“), či o konečný produkt, tedy zralou mikroRNA („miR“) (Desvignes et al., 2015). Následuje specifické číslo mikroRNA, které je vybráno sériově jako následující po nejnověji přiřazeném (například pokud byla jako poslední pojmenována miR-220, nově popsaná miRNA získá identifikační číslo 221). Písmena uvedená za číselným označením představují různé prekurzory jinak velmi blízkých sekvencí dané miRNA. Pro příklad miR-221a a miR-221b. Na závěr se pro přesnější lokalizaci uvádí přípona „-5p“ nebo „-3p“ podle konce vlákna DNA. Konečný název tak může být například: „hsa-miR-221a-3p“, přičemž by se jednalo o zralou mikroRNA v lidském genomu, číslo 221 a vlákno 3p, která vznikla z prekurzoru a (miRBase, 2002).

Ovšem existují i výjimky, které se dle výše popsané nomenklatury nepopisují. Kromě odchylek při identifikaci mikroRNA u rostlin nebo u virů, jsou typickým příkladem mikroRNA označované z historických důvodů jako „let-7“ a „lin-4“ (miRBase, 2002).

## 4 TEKUTÁ BIOPSIE (LIQUID BIOPSY)

Nejběžněji používanou metodou pro diagnostiku rakovinného onemocnění, určení prognózy a případné odpovědi na terapii, je chirurgická resekce solidního nádoru či tkáňová biopsie. Existují však určité limity, které využití metod značně komplikují. Hlavním z nich je heterogenita nádorů, která může být intratumorální a intermetastatická. Intratumorální heterogenita se vyznačuje nesourodostí genetického profilu různých částí nádorové tkáně. Heterogenita intermetastatická představuje stejný jev, který se však vyskytuje mezi jednotlivými metastatickými ložisky (Diaz et Bardelli, 2014). Tkáňová biopsie je limitována částí odebraného vzorku a dobou odběru. V případě analýzy takového vzorku je tedy možné, že získané informace o genetickém profilu nádoru nebudou úplné, což může komplikovat následné léčebné výkony (Crowley et al., 2013). Další nevýhodou při použití tkáňové biopsie je invazivita a s ní spojené nepohodlí pro pacienta. Zároveň mohou vlivem bioptického zákroku nastat nežádoucí komplikace. Kromě toho, části získaných tkání jsou fixovány formaldehydem a poté konzervovány v tzv. FFPE (formalin-fixed, paraffin-embedded) parafinových blocích. FFPE bloky dokáží zkoumanou DNA zesítovat, čímž se vzorky mohou stát nepoužitelnými (Diaz et Bardelli, 2014).

Liquid biopsy neboli tekutá biopsie představuje metodu, při které se jako vzorek k analýze odebírá periferní krev, přesněji řečeno plazma. Tím odpadájí potíže s vyšší invazivitou biopsie a diskomfortu pro pacienta. Zároveň lze tekutou biopsii provádět kdykoliv během terapie, což umožní přesnější sledování léčby. Největší výhodou je překonání nádorové heterogenity díky cirkulujícím nádorovým buňkám a nukleovým kyselinám, které jsou do krve exprimovány všemi nádorovými buňkami (Diaz et Bardelli, 2014). Tato klíčová vlastnost tekuté biopsie vede k jejímu potenciálnímu využití při nádorovém screeningu a určení diagnózy ještě před vznikem solidního nádoru (Chen et Zhao, 2019). Jako všechny metody i tekutá biopsie má své limity. Hlavní z nich je nutnost vysoké citlivosti a specifity detekčních souprav, neboť koncentrace cirkulujících nádorových buněk i nádorové DNA je nízká a poločas rozpadu krátký (Ye et al., 2019).

### 4.1 Biologická podstata tekuté biopsie

V periferní krvi se nachází velké množství struktur a molekul různé povahy. Pro analýzu vzorku získaného metodou tekuté biopsie jsou nejvíce důležité cirkulující nádorové buňky (CTCs) a cirkulující nádorová DNA (ctDNA), jejichž vlastnosti budou podrobněji popsány v následujících kapitolách (Chen et Zhao, 2019).

#### **4.1.1 Cirkulující nádorové buňky**

Nádorové buňky přechází do krevního řečiště po vyloučení z primárního nádoru nebo z metastáz, především na základě přirozených fyzikálních sil (např. invazivita nádorové masy do cév či její růst) (Jain et al., 2021). Dochází tak ke vzniku cirkulujících nádorových buněk (CTCs), jejichž pohybem krevním řečištěm může dojít k zavedení do vzdálených tkání a vzniku metastáz. CTCs jsou dle systému „CellSearch“ definované jako jaderné buňky, větší než 4  $\mu\text{m}$ , které obíhají v krevním systému, přičemž produkují specifické epiteliální proteiny a cytokeratiny. Zároveň ale neobsahují znak CD45, kterým se vyznačují všechny leukocytární buňky. Stanovení CTCs lze využít jako ukazatel recidivy nebo metastáz nádorového onemocnění, například u pacientů po chirurgickém odstranění primárního nádoru. Aplikace do klinické praxe se však v současnosti jeví jako velmi obtížná. Důvodem je jednak spíše nízká koncentrace CTCs v periferní krvi (řádově jednotky až desítky CTCs/ml), dále vysoká cena za stanovení a nejednoznačný názor onkologické komunity na začlenění stanovení CTCs do léčebných protokolů (Ye et al., 2019).

#### **4.1.2 Cirkulující nádorová DNA**

Buňky podléhající buněčné degradaci, ať v procesu apoptózy, či v procesu nekrózy, uvolňují fragmenty své DNA do krevního oběhu a vzniká tzv. cirkulující volná DNA (cfDNA). Stejně tomu je i v případě buněk nádorových, jejichž DNA, tzv. cirkulující nádorová DNA (ctDNA), obsahuje veškeré informace o genetických defektech mateřských nádorových buněk, nejčastěji bodové mutace, chromozomové přestavby, amplifikace či aneuploidie. Vylučování ctDNA do okolního prostoru nádoru je závislé na vlastnostech nádorové masy (např. velikost, lokalizace nebo cévní zásobení) (Diaz et Bardelli, 2014). Vzhledem k tomu, že lidský organismus ve většině případů čítá větší množství zdravých buněk než nádorových, je ctDNA pouze malou částí z celkové cfDNA. Na přítomnost ctDNA tak poukazují pouze zjištěné specifické genetické abnormality (Ye et al., 2019). Délka fragmentů cfDNA se pohybuje v násobcích 180 párů bazí (Diaz et Bardelli, 2014). Molekuly ctDNA bývají kratší, kolem 90–150 párů bazí. Biologický poločas rozpadu cfDNA je krátký, přibližně 16 minut až 2,5 hodin. Všechny tyto vlastnosti znesnadňují detekci ctDNA, stejně jako různé biologické a technické faktory, na nichž je citlivost ctDNA závislá, například celková nádorová zátěž organismu nebo koncentrace ctDNA ve vzorku. Proto není divu, že ačkoliv se citlivost ctDNA u pacientů s nádorovým onemocněním ve stádiu IV blíží téměř ke 100 %, využití v klinické praxi zatím není rutinního rázu (Diaz et Bardelli, 2014; Ye et al., 2019).

## 4.2 Sestavení diagnostického panelu mikroRNA pro maligní melanom

Molekuly mikroRNA jsou během procesu apoptózy, nekrózy nebo vlivem aktivního uvolňování, secernovány buňkami do extracelulárního prostoru. MiRNA se tak stávají cirkulujícími bezbuněčnými miRNA (cf-miRNA), které lze nalézt ve všech biologických tekutinách (kromě plazmy a séra také v moči, slinách a mateřském mléce). Vlastnosti miRNA byly již zmíněné v předchozích kapitolách. Přesto je však důležité zdůraznit tři z nich, které jsou klíčové při uvažování o miRNA jako o vhodných kandidátech na nové biomarkery nádorových onemocnění. Jsou to: vysoká stabilita cf-miRNA v tělních tekutinách a s ní spojený odběr formou tekuté biopsie; výpovědní hodnota cf-miRNA o nádorovém onemocnění, neboť je specifická pro danou tkáň a mění se s progresí onemocnění; dostupnost metod, jimiž lze cf-miRNA analyzovat, protože se jedná o metody běžně využívané v laboratořích lékařské genetiky a molekulární biologie (Polini, Carpi et al., 2019).

Pro sestavení diagnostického panelu je zásadní, aby vybrané miRNA byly exprimovány ve větší míře u maligního melanomu oproti ostatním maligním onemocněním, a zároveň, aby nebyly exprimovány zdravými kožními buňkami (Stark et al., 2015). Příkladem diagnostického panelu je MELmiR-18, navržený v roce 2015 doktorem Starkem et al. V panelu MELmiR-18 bylo zkoumáno 18 miRNA, přičemž 7 z nich (tzv. panel MELmiR-7) je schopen identifikovat melanom bez ohledu na stádium a výši nádorové zátěže. U 100 % hodnocených pacientů byl panel MELmiR-7 využit také ke sledování progresu onemocnění. MiRNA zařazené do panelu MELmiR-7 jsou: miR-16, miR-211-5p, miR-4487, miR-4706, miR-4731, miR-509-3p a miR-509-5p (Stark et al., 2015).

Ústav biologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni se v současné době zabývá studií, jejímž cílem je stanovit předoperační a pooperační hladiny molekul mikroRNA u pacientů chirurgicky léčených pro melanom, a zjistit, zda mohou mít tyto miRNA prognostický význam pro parametry přežití anebo pro adjuvantní léčbu pacientů. Mezi sledované parametry přežití patří celková doba přežití pacienta, tzv. OS (overall survival) a bezpříznakové období, tzv. DFI (disease-free interval) (doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D. et RNDr. Kateřina Houfková, Ph.D., *in verb*, 2022). Toto období je definováno jako interval mezi resekci primárního nádorového ložiska a diagnostiky vzniku metastáz ve vzdálených orgánech, tedy období bez známek onemocnění (Höppener et al., 2019). V rámci studie byl na základě literární rešerše sestaven panel 25 miRNA, které by mohly vykazovat souvislost s onemocněním maligním melanomem. Jedná se o následující:

miR-16, miR-19a, miR-21, miR-30b, miR-39, miR-99a, miR-125b, miR-145, miR-146a, miR-149, miR-149/miR-39, miR-149\*, miR-150, miR-182, miR-191, miR-204, miR-214, miR-221, miR-320, miR-494, miR-1246, miR-1260, miR-1980, miR-4487 a miRNA let-7g (doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D. et RNDr. Kateřina Houfková, Ph.D., *in verb*, 2022).

Ačkoliv nejnovější studie prezentují slibné výsledky, zůstává překážkou pro uvedení vyšetření molekul miRNA u onkologických pacientů do klinické praxe nestejnorodost detekčních a normalizačních metod, jež brání vyčlenění konkrétního diagnostického panelu miRNA pro stanovení maligního melanomu (Carpi et al., 2020).

## **5 METODY KVANTITATIVNÍHO STANOVENÍ mikroRNA**

Molekuly miRNA se nachází v buňkách, tkáních a biologických tekutinách (Lu et Rothenberg, 2018). Nejčastěji se vyšetřují z odebraných tkání zalitých do parafinových bloků a z plazmy. Pro stanovení miRNA z plazmy se pacientovi odebírá nesrážlivá žilní krev. Antikoagulačními činidly bývají EDTA nebo citrát. Heparin není pro molekulárně genetická vyšetření vhodný, neboť inhibuje enzym DNA polymerázu. V případě FFPE bločků je potřeba tkáň odparafinovat použitím několika po sobě jdoucích lázní xylynu a ethanolu v různém poměru. (Beránek, 2016). V současné době se pro kvantitativní stanovení nejvíce používá metoda PCR a NGS, které budou jednotlivě rozebrány v následujících kapitolách.

### **5.1 Příprava vzorku před samotným stanovením**

Získanou krev (plazmu) nebo tkáň je před stanovením nutné zpracovat. Prvním krokem je izolace příslušné nukleové kyseliny, která probíhá v několika krocích. Existuje několik metod izolace, přičemž princip zůstává obdobný. Nejprve je nutné narušit buněčnou membránu buněk ve vyšetřovaném vzorku, čehož lze dosáhnout prostřednictvím lyzačních roztoků. Následně pomocí proteáz a dalších enzymů dojde k degradaci bílkovin a jiných kontaminujících příměsí. Po extrakci a přečištění se získá výsledný roztok miRNA, připravený k dalšímu stanovení (LabGuide, 2014). Dříve se k izolaci miRNA využívala klasická fenol-chloroformová extrakce s následným vysrážením RNA. Problémem však byla nižší výtěžnost metody a zároveň vysoké riziko kontaminace. Z tohoto důvodu se začaly používat kolonkové metody s komerčně vyráběnými soupravami. Nejběžněji užívané jsou soupravy „mirVana“ od společnosti Thermo Fisher Scientific sídlící v USA, nebo „miRNEasy“ od firmy Qiagen se sídlem v Německu. Výhoda kolonkové metody je jednoznačně v návrhu souprav k maximální výtěžnosti, čehož je využíváno především při izolaci miRNA z tělních tekutin. Zde je výtěžek mnohem nižší než při izolaci z tkání, přesto však nejsou koncentrace získané miRNA natolik nízké, aby se nedaly využít k dalšímu stanovení (Lu et Rothenberg, 2018). Hlavním problémem při práci s RNA však nadále zůstává riziko kontaminace stabilními enzymy ribonukleázami, které velmi ochotně štěpí všechny molekuly RNA ve vzorku (Beránek, 2016).

### **5.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je přelomová metoda, která byla vyvinuta Kary Bank Mullisem v roce 1983. PCR umožňuje velmi citlivou mnohonásobnou amplifikaci

konkrétní části DNA, čímž se velmi usnadní následná manipulace s DNA při dalších vyšetřovacích metodách (Seifi et al., 2012). Aby reakce PCR správně proběhla, je zapotřebí několik komponentů. Předně templátová nukleová kyselina, která se bude amplifikovat. Postačí i malé množství (100pg – 1µg). Klíčovým komponentem je také termostabilní DNA polymeráza, neboť reakce probíhá při vysokých teplotách. Nejčastěji využívanou je Taq polymeráza, izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Dále jsou pro PCR reakci nutné deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTPs), specifické primery navržené komplementárně k templátové nukleové kyselině, správná koncentrace MgCl<sub>2</sub>, reakční pufr a další aditiva. Takto připravený mix se vloží do termocycleru a projde přesně danými tepelnými cykly:

- 1) Denaturace – rozvolnění dvouřetězcové DNA, při 95° C.
- 2) Annealing – navázání primerů k templátové jednořetězcové DNA, 45–60° C.
- 3) Elongace – nasednutí DNA polymerázy a syntéza nového vlákna, 70–72° C.

V tomto pořadí se cykly opakují obvykle 40krát. Výsledkem je vznik několika milionů kopií templátové DNA (Life technologies, 2012).

Od objevení PCR vznikly desítky modifikací, které vyhovují požadavkům současné pokrokové doby a využívají se spíše než klasická varianta PCR. Příkladem je quantitative PCR neboli kvantitativní PCR (qPCR), při které je koncentrace jednotlivých amplikonů sledována po každém cyklu, obvykle pomocí fluorescenčního barviva (Bio-Rad, 2006). Dalšími příklady jsou Allele-specific PCR, Hot-start PCR, Multiplex PCR, Nested PCR a v poslední řadě také RT real-time PCR, které bylo využito pro praktickou část této práce (Sapkota, 2021).

### **5.2.1 RT real-time PCR**

Reverse Transcriptase Real-Time PCR je modifikovaná metoda qPCR, jež se v poslední době stále častěji využívá v klinické diagnostice. Příkladem využití je sledování virové nálože u onemocnění způsobených RNA virem, dále stanovení míry genové exprese v odebraném vzorku a v poslední řadě také při sekvenaci velkých genů. Hlavní výhodou metody je sledování amplikonů v reálném čase a zároveň využití metody ke kvantifikaci informace obsažené v RNA díky reverzní transkriptáze. (Beránek, 2016; Cavé et al., 2003).

První fází RT real-time PCR je reverzní transkripce RNA do komplementární DNA (cDNA), pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Jedná se o RNA-dependentní DNA polymerázu, která byla poprvé popsána v roce 1970 v replikačním cyklu retrovirů (Tzertzinis et al., 2008; Wöhrl, 2019). V další fázi lze metodu RT real-time PCR rozdělit na jedнокrokovou nebo dvoukrokovou, v závislosti na využití testovacích zkumavek. U dvoukrokové metody proběhne v jedné zkumavce nejprve reverzní transkripce. Alikvot je následně přenesen do jiné zkumavky a je spuštěno Real-time PCR. Při jedнокrokové metodě se provádí v jedné zkumavce reverzní transkripce a zároveň RT real-time PCR, přičemž použité primery musí být genově specifické. Obě metody se však shodují při využití získané cDNA jako templátu (Bio-Rad, 2006).

Jak vypovídá již sám název metody, nárůst počtu amplikonů je sledován v reálném čase. Do reakce jsou přidána fluorescenční barviva, která se během jednotlivých teplotních fází váží na dvouřetězcovou DNA. Případně mohou být fluorescenčně značeny primery či sondy, které hybridizují s templátovou DNA. Příkladem využívaných fluorescenčních technologií jsou SYBR green, TaqMan sondy, Molecular Beacon sondy, FRET hybridizující sondy nebo Scorpion sondy. Každá z těchto technologií pracuje na odlišném principu, výsledkem je však vždy změna fluorescence, která je změřena po každém proběhlém cyklu. Následně jsou získané hodnoty vyneseny do grafu v závislosti na počtu cyklů a z výsledné amplifikační křivky se odečte množství vzniklých produktů (Life technologies, 2012; Seifi et al., 2012).

### **5.3 Sekvenování nové generace (NGS)**

Pojmem sekvenování se rozumí získání informací o přesném pořadí nukleotidů v řetězci DNA. První průlomovou metodou bylo sekvenování první generace – tzv. sekvenace dle Sangera, kterou navrhl v roce 1977 pozdější držitel Nobelovy ceny Frederick Sanger. Tato metoda dala o 20 let později možnost vzniku Projektu mapování lidského genomu (HGP) pod záštitou organizace HUGO a následně konkurenční společností Celera. Projekt byl dokončen po 12 letech s úspěšnou sekvenací 99 % lidského genomu (Beránek, 2016; Snustad et Simmons, 2017). Zároveň se však prokázalo, že ačkoliv byla metoda sekvenování dle Sangera nejvyspělejší metodou sekvenování, její nákladnost a časová náročnost bránily celosvětovému rozšíření do klinické praxe. V posledních dvaceti letech tak začaly vznikat nové metody sekvenace, které se sice principiálně odvíjí od metody sekvenování dle Sangera, využívají však nejmodernější dostupné digitální technologie. Tyto



metody se souhrnně označují pojmem „sekvenování nové generace“ (NGS) (Muzzey et al., 2015).

Principem NGS je v základu stále sekvenování dle Sanger, tedy použití čtyř různých fluorescenčních barev k modifikaci bází pro adenin, thymin, guanin a cytosin. Rozdílem oproti Sangerově sekvenování je počet barevně modifikovaných bází. Zatímco při Sangerově sekvenování je modifikována pouze malá část bází, u NGS jsou barevně modifikovány všechny dostupné báze (Muzzey et al., 2015). Základem pro stanovení metodou NGS je vzorek nukleové kyseliny, jejíž délka by neměla přesáhnout 1 kb. Pokud se sekvenuje DNA delší než 1 kb, je nutná její fragmentace. Té lze docílit několika způsoby, například biochemickým štěpením pomocí nukleáz, hydrodynamicky nebo fyzikálními metodami za použití ultrazvuku (Beránek, 2016). Další fází je samotné sekvenování, které bývá zcela odlišné v závislosti na použitých NGS metodách. Nejčastěji využívanými metodami jsou sekvenování syntézou nebo také sekvenování ve stylu Illumina (název dle použitého analyzátoru), dále sekvenování ligací, iontově polovodičové sekvenování a pyrosekvenování. V této práci bude povrchově popsán princip sekvenování syntézou, vzhledem k jejímu nejčastějšímu využití. Templátová DNA je pevně navázána na konkrétní pozici na sklíčku. Následně nasedne na každý templát DNA polymeráza, která podle principu komplementarity dosyntetizuje na konec templátu modifikovanou bázi. Sekvenátor poté zachytí fluorescenční barvu a intenzitu templátu, společně s jeho přesnou pozicí na sklíčku. Tento proces se posléze opakuje v několika cyklech, mezi nimiž dochází k převedení fluoreskujících modifikovaných bází zpět na nefluoreskující běžné báze. V dalším kole čtení se opět připojí jedna modifikovaná báze a takto proces pokračuje, dokud není zastaven. Výsledkem je informace o přesném pořadí nukleotidů analyzované DNA (Muzzey et al., 2015).

NGS disponuje velkým množstvím výhod, díky kterým rychle prostupuje do klinické praxe. Kromě nízké finanční nákladnosti a časové náročnosti (sekvenace jednoho lidského genomu trvá v průměru jediný den a cena se pohybuje kolem 1000 USD) je hlavní výhodou spolehlivá přesnost v rozpoznání rozdílů v genomu pacienta od referenčního genomu. Tyto rozdíly se nazývají varianty a lze je rozdělit do dvou skupin. První skupina obsahuje změny v sekvenci DNA, jako jsou jednonukleotidové polymorfismy nebo krátké delece. Druhou skupinu tvoří velké delece nebo duplikace či celogenové delece. Díky přesnosti NGS je možné metodu využít například ve screeningu nosičství heterozygotních variant genu,

zjišťování vzácných nebo rakovinných onemocnění a aneuploidií u plodu (Muzzey et al., 2015).

## **PRAKTICKÁ ČÁST**

Praktická část bakalářské práce byla zpracovávána v období leden–březen 2022 na pracovišti Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni.

## **6 CÍL A ÚKOLY PRÁCE**

### **6.1 Hlavní cíl**

Cílem bakalářské práce je zvládnutí metodiky, která zahrnuje izolaci RNA z plazmy u 50 pacientů (část z celého souboru stovek pacientů), a dále stanovení exprese vybraných molekul mikroRNA ve vzorcích izolované RNA. Práce rovněž zahrnuje vyhodnocení části exprese molekul miRNA u pilotního souboru pacientů a stanovení vztahu exprese těchto mikroRNA k bezpříznakovému období a celkovému přežití.

### **6.2 Dílčí cíle**

1. Izolace RNA z vzorků plazmy pacientů léčených pro melanom při odběrech předoperačních, pooperačních a v průběhu sledování léčby.
2. Stanovení exprese molekul mikroRNA ve vzorcích RNA izolované z plazmy.
3. Statistické zhodnocení naměřených hodnot, včetně vztahů k bezpříznakovému období a celkovému přežití.

## 7 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

Po prostudování metodiky izolace molekul mikroRNA z plazmy soupravou QIAGEN miRNeasy Serum/Plazma Kit a následného stanovení pomocí metody RT real-time PCR, byly s přihlédnutím k cílům projektu Ústavu biologie LF UK v Plzni stanoveny následující výzkumné otázky:

1. Umožňuje plazma získaná ze vzorků periferní krve pacientů s melanomem izolaci dostatečného množství RNA pro analýzu exprese mikroRNA?
2. Dosahuje RNA izolovaná z plazmy pacientů léčených pro melanom dostatečné čistoty pro stanovení exprese metodou RT real-time PCR?
3. Které molekuly z rodiny mikroRNA (stanovené v rámci panelu LF UK v Plzni) prokazují specifický vztah k době celkového přežití a bezpříznakovému období?

## **8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU**

Pro projekt Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni byl vybrán široký soubor čítající stovky pacientů. Jedná se o muže i ženy, u nichž se vyskytlo onemocnění melanomem, a kteří v důsledku tohoto onemocnění podstoupili operativní excizi ložiska a následnou léčbu. Veškeré výše zmíněné zákroky probíhaly v letech 2018–2021 na oddělení plastické chirurgie Fakultní nemocnice v Plzni. Pacienti s informovaným souhlasem poskytli předoperační, pooperační náběry a náběry plné krve při kontrolách.

Pro praktickou část bakalářské práce bylo vybráno 50 vzorků plazmy připravené z plné krve těchto pacientů, přičemž data o pacientech byla pro účely práce anonymizována.

## 9 METODIKA PRÁCE

### 9.1 Izolace molekul RNA z plazmy

Pro izolaci RNA z plazmy byla použita kolonková metoda s pomocí soupravy QIAGEN miRNeasy Serum/Plazma Kit.

#### 9.1.1 Přístrojové vybavení

Pro izolaci molekul RNA z plazmy a pro měření koncentrace byly použity následující přístroje:

- *Eppendorf Research*, automatické jednonábové pipety s nastavitelným objemem 20  $\mu$ l - 1000  $\mu$ l, firma *Eppendorf*, Německo
- *TX4 Digital IR Vortex Mixer*, vortex, firma *Velp Scientifica*, Itálie
- *Fresco 21*, centrifuga, firma *Thermo Fisher Scientific*, USA
- *Micro Star 17*, centrifuga, firma *VWR International*, USA
- *MiniSpin<sup>®</sup>*, centrifuga, firma *Eppendorf*, Německo
- *NanoDrop ND-1000*, spektrofotometr, firma *NanoDrop Technologies*, USA

Pro měření koncentrace na spektrofotometru *NanoDrop* byl zároveň využit software *NanoDrop 1000 3.7* od firmy *NanoDrop Technologies*.

*Obrázek 1: Vortex TX4 Digital IR vortex mixer (Velp Scientifica).*



*Zdroj: Autor, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.*

*Obrázek 2: Centrifuga Fresco 21 (Thermo Fisher Scientific).*



*Zdroj: Autor, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.*

*Obrázek 3: Centrifuga Micro Star 17 (VWR International).*



*Zdroj: Autor, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.*

Obrázek 4: Centrifuga MiniSpin® (Eppendorf).



Zdroj: Autor, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.

Obrázek 5: Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies).



Zdroj: Autor, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.

### 9.1.2 Postup izolace RNA z plazmy

1. Zapnout centrifugu *Fresco 21* a nechat nachladit na 4° Celsia.
2. Plazmu vyjmutou z mrazícího boxu nechat volně rozmrazit při pokojové teplotě.



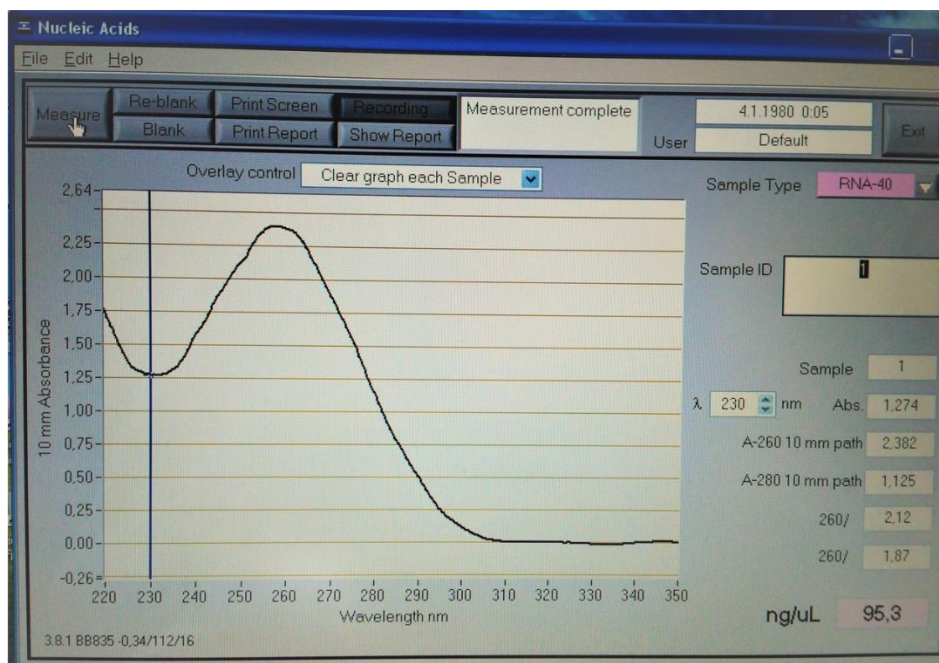
3. Po rozmrznutí plazmu krátce zvortexovat a stočit 10 sekund programem „SHORT“ (centrifuga *MiniSpin*<sup>®</sup>).
4. Odebrat 200 µl plazmy do 1,5 ml mikrozkuřavky *Eppendorf*<sup>®</sup>
5. Doplnit pětinasobným objemem QIAzol Lysis Reagent (tedy 1 ml, pokud bylo dostatečné množství plazmy) a zvortexovat.
6. Inkubovat 5 minut při pokojové teplotě.
7. Vyjmout miRNeasy Plasma Spike-In Control z chladničky, krátce zvortexovat a stočit 10 sekund programem „SHORT“ (centrifuga *MiniSpin*<sup>®</sup>).
8. Doplnit 3,5 µl miRNeasy Plasma Spike-In Control.
9. Přidat 200 µl chloroformu.
10. Mikrozkuřavku prudce a důkladně protřepat v ruce, následně 20 sekund vortexovat.
11. Inkubovat 3 minuty při pokojové teplotě.
12. Centrifugovat 15 minut při 14 000 RPM/12 000 g při 4° Celsia (centrifuga *Fresco 21*).
13. Přepipetovat 650 µl horní fáze do 2 ml mikrozkuřavky *Eppendorf*<sup>®</sup>.
14. Doplnit 975 µl 100 % ethanolu a promíchat svislým překlápěním mikrozkuřavky.
15. Odebrat 550 µl a přenést na kolonku *RNeasy MinElute Spin Column*.
16. Centrifugovat 30 sekund při 10 000 RPM/8 000 g (centrifuga *MiniSpin*<sup>®</sup>).
17. Vylít objem, který byl přefiltrován kolonkou, mikrozkuřavku osušit o buničinu.
18. Krok 14.–16. opakovat 2x tak, aby byl celý obsah vzorku přefiltrován přes kolonku.
19. Na kolonku doplnit 700 µl roztoku RWT.
20. Centrifugovat 30 sekund při 10 000 RPM/8 000 g (centrifuga *MiniSpin*<sup>®</sup>).
21. Vylít objem, který byl přefiltrován kolonkou, mikrozkuřavku osušit o buničinu.
22. Na kolonku přidat 500 µl roztoku RPE.
23. Centrifugovat 30 sekund při 10 000 RPM/8 000 g (centrifuga *MiniSpin*<sup>®</sup>).
24. Vylít objem, který byl přefiltrován kolonkou, mikrozkuřavku osušit o buničinu.
25. Na kolonku doplnit 500 µl 80 % ethanolu.
26. Centrifugovat 2 minuty při 10 000 RPM/8 000 g (centrifuga *MiniSpin*<sup>®</sup>).
27. Kolonku vložit do 2 ml sběrací mikrozkuřavky *Eppendorf*<sup>®</sup>.
28. Vysušit membránu kolonky centrifugací 5 minut při maximálním RPM/g na prázdno (centrifuga *MiniSpin*<sup>®</sup>).
29. Kolonku vložit do 1,5 ml mikrozkuřavky *Eppendorf*<sup>®</sup> a doplnit přímo na střed membrány 25 µl RNase-free water.
30. Inkubovat 1–5 minut při pokojové teplotě.

31. Centrifugovat 75 sekund při maximálním RPM/g, přičemž víčka mikrozkušavky jsou seřazena po směru letu (centrifuga *Micro Star 17*).
32. Objem, který byl přefiltrován přes kolonku znovu napipetovat přímo na střed kolonky.
33. Centrifugovat 75 sekund při maximálním RPM/g, přičemž víčka mikrozkušavky jsou seřazena po směru letu (centrifuga *Micro Star 17*).

### 9.1.3 Postup měření koncentrace miRNA spektrofotometrem NanoDrop 1000 a výpočet čistoty RNA ve vzorku

1. Zapnout notebook, spustit program ikonou „*Nanodrop*“.
2. Promýt analyzátor nanesením 1  $\mu$ l RNase free water na čidlo, kliknout na ikonu „*Nucleic Acid*“, ve výběru zvolit „*RNA-40*“.
3. Změřit blank nanesením 1  $\mu$ l RNase free water na čidlo, kliknout na ikonu „*Measure*“ a ve výběru „*Simple ID*“ zvolit „*Blank*“.
4. Postupně změřit každý izolovaný vzorek nanesením 1  $\mu$ l vzorku na čidlo, kliknout na ikonu „*Measure*“ a do „*Simple ID*“ zapsat číslo vzorku.
5. Mezi každým měřením utřít čidlo buničinou.
6. Výpočet čistoty získané miRNA jako poměr absorbancí při 260 a 280 nm.

Obrázek 6: Měření koncentrace RNA pomocí software NanoDrop 1000 3.7.



Zdroj: Autor, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.

## 9.2 Stanovení molekul miRNA metodou RT real-time PCR

### 9.2.1 Přístrojové vybavení

Pro RT real-time PCR byly použity následující přístroje:

- *Eppendorf Research*, automatické jednakanálové a multikanálové pipety s nastavitelným objemem 20  $\mu$ l - 1000  $\mu$ l, firma *Eppendorf*, Německo
- *MS3 B S000*, vortex, firma *IKA<sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG*, Německo.
- *PCR Plate Spinner*, centrifuga, firma *VWR International*, USA.
- *Stratagene Mx3005P*, termocycler, firma *Agilent Technologies*, USA.
- *T100 Thermal Cycler*, termocycler, firma *Bio-Rad*, USA.
- *ZEPHYRUS<sup>®</sup> PCR Box Harmony*, laminární box, firma *Elisabeth Pharmacon*, Česká republika.

Správný průběh RT real-time PCR byl v termocyleru *Stratagene Mx3005P* řízen softwarem *MxPro qPCR Software* od firmy *Agilent Technologies*.

Obrázek 7: Vortex *MS3 B S000* (*IKA<sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG*).



Zdroj: Autor, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.

*Obrázek 8: Centrifuga PCR Plate Spinner (VWR International).*



*Zdroj: Autor, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.*

*Obrázek 9: Termocykler Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies).*



*Zdroj: Autor, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.*

Obrázek 10: Termocykler T100 Thermal Cycler (Bio-Rad).



Zdroj: Autor, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.

Obrázek 11: Laminární box ZEPHYRUS<sup>®</sup> PCR Box Harmony (Elisabeth Pharmacon).



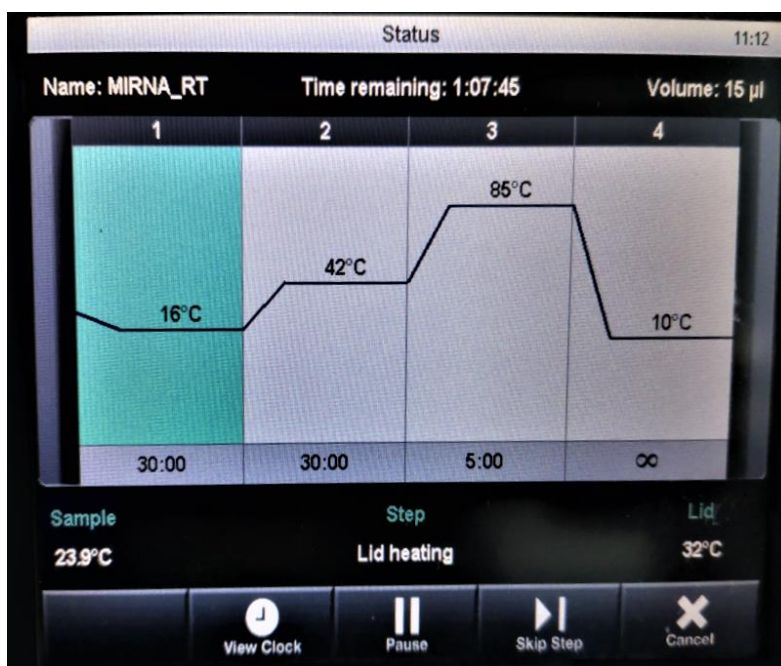
Zdroj: Autor, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.

### 9.2.2 Postup reverzní transkripce s využitím soupravy Taq man MicroRNA Reverse Transcription Kit

1. Před použitím všechny používané reagentie krátce zvertexovat a stočit.

2. Do 2 ml mikrozkušavky *Eppendorf*<sup>®</sup> připravit Master MIX, který se na 1 vzorek skládá z:
  - a. 8,66  $\mu$ l PCR water
  - b. 0,19  $\mu$ l RNase inhibitoru
  - c. 0,15  $\mu$ l dNTP Mixu
  - d. 1,5  $\mu$ l RT pufu
  - e. 1  $\mu$ l MultiScribe reverzní transkriptázy
3. Rozpipetovat získaný objem rovnoměrně do 8 jamkového stripu, umístěném v chladícím bločku.
4. Umístit 96 jamkovou mikrotitrační destičku do chladícího bloku.
5. Multikanálovou pipetou rozpipetovat Master MIX po 11,5  $\mu$ l na jamku do 96 jamkové mikrotitrační destičky (dle počtu vzorků)
6. Rozpipetovat potřebný objem primeru do nového 8 jamkového stripu.
7. Multikanálovou pipetou rozpipetovat primer po 2,5  $\mu$ l na jamku do 96 jamkové mikrotitrační destičky (dle počtu vzorků).
8. Multikanálovou pipetou přidat RNA vzorku po 1  $\mu$ l na jamku do 96 jamkové mikrotitrační destičky (dle počtu vzorků).
9. Pevně destičku uzavřít, zvortexovat a zkontrolovat, zda se na dnech jamek nenachází vzduchové bubliny.
10. Umístit do termocycleru BioRad na program „MiRNA“, jehož teplotní profil je následující:

Obrázek 12: Teplotní profil reverzní transkripce v termocykleru T100 Thermal Cycler (Bio-Rad).



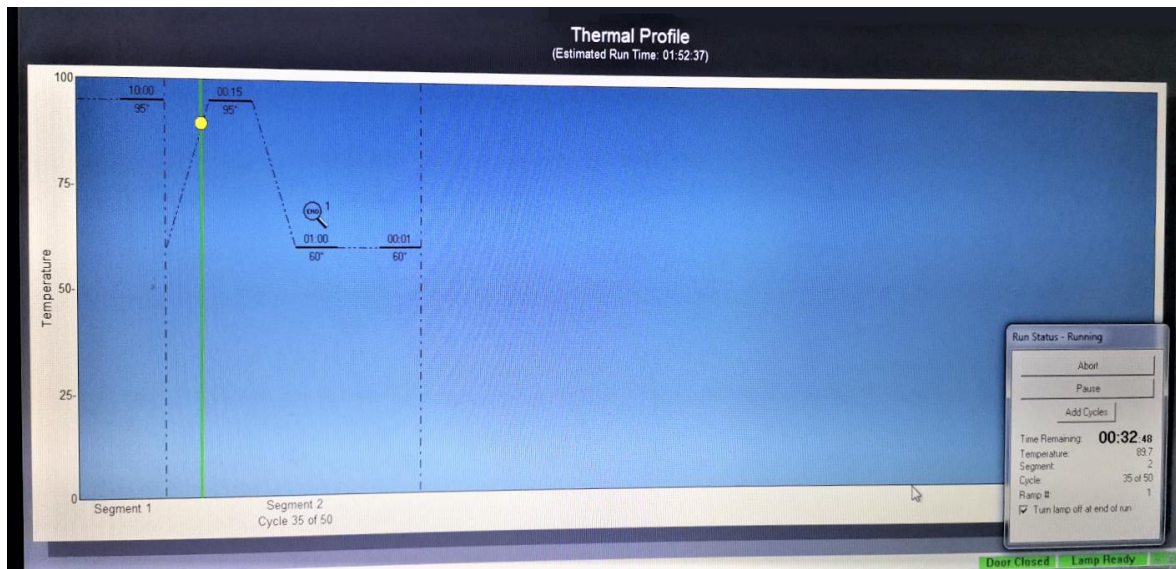
Zdroj: RNDr. Kateřina Houfková, Ph.D., Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.

### 9.2.3 Postup Real-time PCR

1. Před použitím všechny používané reagenty krátce zvortexovat a stočit.
2. Do 2 ml mikrozkušavky *Eppendorf*<sup>®</sup> připravit Master MIX, který se na 1 vzorek skládá z:
  - a. 6,5 µl PCR water
  - b. 10 µl pufru Taq Man Universal Master Mix II
  - c. 1 µl sondy + primeru Taq Man MicroRNA Assay
3. Rozpipetovat získaný objem rovnoměrně do 8 jamkového stripu, umístěném v chladícím bločku.
4. Umístit 96 jamkovou mikrotitrační destičku do chladícího bloku.
5. Multikanálovou pipetou rozpipetovat Master MIX po 17,5 µl na jamku do 96 jamkové mikrotitrační destičky (dle počtu vzorků, kalibrátoru a negativní kontrole, vše v doubletu).
6. Multikanálovou pipetou několikrát propipetovat RT-cDNA.
7. Multikanálovou pipetou rozpipetovat RT-cDNA po 2,5 µl na jamku do 96 jamkové mikrotitrační destičky (dle počtu vzorků v doubletu), několikrát propipetovat RT-cDNA s Master MIXEM v každé jamce.
8. Dodat kalibrátor v doubletu do 96 jamkové mikrotitrační destičky.

9. Do jamek s negativní kontrolou nepřidávat žádnou další reagenii.
10. Pevně destičku uzavřít, zvortexovat a zkontrolovat, zda se na dnech jamek nenachází vzduchové bubliny.
11. Umístit do termocycleru Stratagene a spustit Real-time PCR, jejíž teplotní profil je následující:

Obrázek 13: Teplotní profil RT real-time PCR v termocycleru Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies).



Zdroj: RNDr. Kateřina Houfková, Ph.D., Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.



# 10 ANALÝZA NAMĚŘENÝCH HODNOT A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

## 10.1 Koncentrace a čistota izolovaných vzorků

Naměřené hodnoty koncentrace a hodnoty čistoty izolované RNA ze vzorků plazmy jsou uvedeny v Tabulce 3 v Příloze A.

### 10.1.1 Hodnocení výtěžku izolované RNA z plazmy

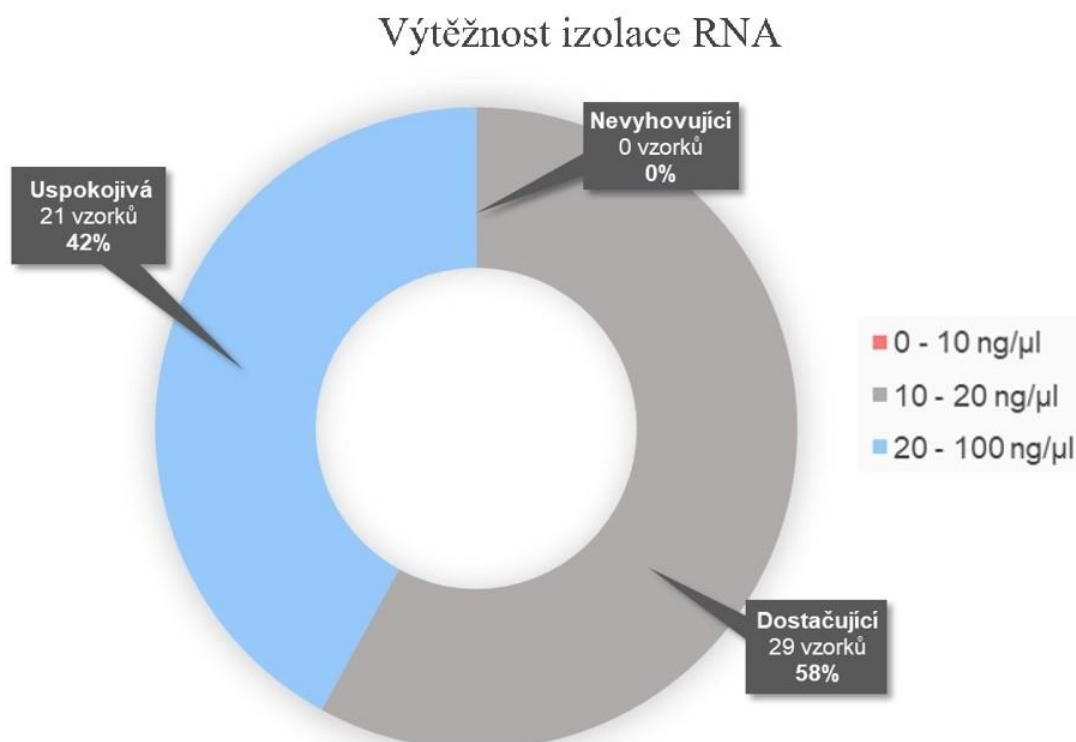
Pro určení výtěžnosti izolace RNA všech zpracovaných vzorků byly hodnoty koncentrace rozděleny do 3 skupin. Do první skupiny spadají hodnoty koncentrace 0–10 ng/μl, do druhé skupiny hodnoty 10–20 ng/μl a do třetí skupiny hodnoty 20–100 ng/μl. První skupina reprezentuje takové vzorky, jejichž koncentrace je pro vlastní stanovení nevyhovující. Žádný ze všech izolovaných vzorků však koncentraci pod hranici 10 ng/μl neměl. Vzorky spadající do druhé skupiny jsou svou koncentrací k analýze dostačující. Z Grafu 1 je patrné, že dostačujících vzorků je 29, tedy 58 %. Naopak koncentrace zbývajících 21 vzorků – 42 % ve třetí skupině je pro účely analýzy více než uspokojivá.

Vlastní analýzu metodou RT real-time PCR je vhodné provést u vzorků, jejichž koncentrace je větší než 10 ng/μl (tedy vzorky náležící do skupin č. 2 a 3). Na základě hodnot z Grafu 1 bylo zjištěno, že pro následné stanovení je vhodné všech 50 izolovaných vzorků. Vzorky s koncentrací pod 10 ng/μl lze analyzovat pouze v případě, že je u nich provedena kontrola  $C_T$ <sup>1</sup>, přičemž horní hranice odpovídá hodnotě 40. Pokud by se daný vzorek pohyboval nad touto hodnotou, nebyl by vhodný k dalšímu stanovení a hodnocení. Ve skutečnosti byla analýza metodou RT real-time PCR provedena jen u 44 vzorků, které byly vybrány na základě klinických parametrů pacientů.

---

<sup>1</sup> **Threshold cycle ( $C_T$ )** je definován jako počet PCR cyklů nutných k překročení prahu fluorescenčního signálu, který odlišuje nespecifickou fluorescenci pozadí od specifické fluorescence vyšetřované nukleové kyseliny. Hodnota  $C_T$  je tak nepřímo úměrná množství amplifikátů nukleové kyseliny ve vzorku, přičemž hodnoty  $C_T < 29$  představují velmi silné pozitivní reakce se značným množstvím nukleové kyseliny,  $C_T 30–37$  jsou pozitivní reakce se středním množstvím nukleové kyseliny a  $C_T 38–40$  představují slabě pozitivní reakce s minimálním množstvím nukleové kyseliny. Hodnoty  $C_T > 40$  mohou být negativní reakce zatížené kontaminací prostředím (Applied Biosystems, 2016; doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D. et RNDr. Kateřina Houfková, Ph.D., *in verb*, 2022).

Graf 1: Výtěžnost izolace RNA všech vzorků.



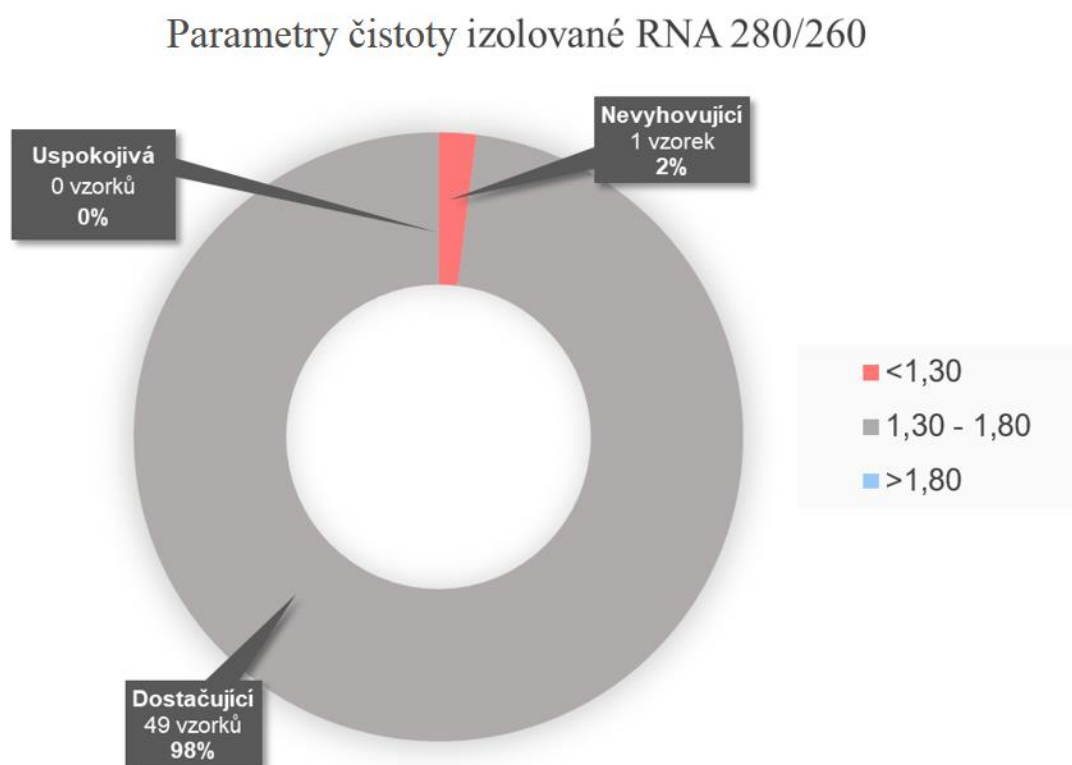
Zdroj: Autor podle dat Ústavu biologie LF UK v Plzni, 2022.

### 10.1.2 Hodnocení čistoty izolované RNA z plazmy

K vyjádření vhodnosti čistoty izolované RNA pro analýzu metodou RT real-time PCR bylo zapotřebí nejprve spočítat čistotu pro každý vzorek pomocí poměru absorbancí při 260 a 280 nm, tedy  $A_{260}/A_{280}$ . (Výsledné hodnoty viz Tabulka 3 v Příloze A). Následně byly získané hodnoty rozděleny opět do 3 skupin. Do první skupiny náleží takové vzorky, jejichž čistota je nižší než 1,30 a tudíž nevyhovující pro vlastní stanovení RT real-time PCR metodou. Vzorky ve druhé skupině mají hodnoty čistoty v rozmezí 1,30 – 1,80 a jsou tak k následné analýze dostačující. Poslední skupinou jsou vzorky s čistotou nad 1,80, které můžeme hodnotit pro následnou analýzu jako více než uspokojivé.

Z Grafu 2 je zřejmé, že 1 vzorek má hodnotu čistoty nižší než 1,30 a je tak k analýze nevyhovující. Z celkového počtu 50 vzorků tak tvoří 2 %. Naopak hodnoty zbývajících 49 vzorků, tedy 98 % spadají do druhé skupiny s čistotou dostačující pro analýzu RT real-time PCR. Žádný izolovaný vzorek nedosahuje více než uspokojivé čistoty, tedy hodnot vyšších než 1,80.

Graf 2: Parametry čistoty izolované RNA 280/260.

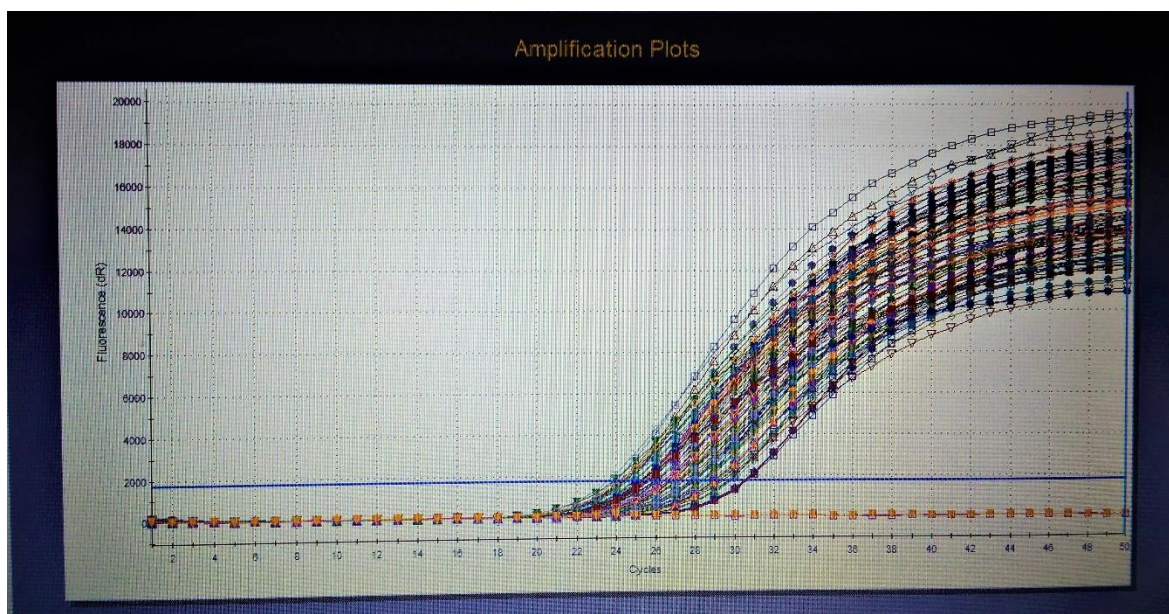


Zdroj: Autor podle dat Ústavu biologie LF UK v Plzni, 2022.

## 10.2 Stanovení hladin exprese vybraných molekul miRNA

Dle získaných statistických údajů o výtěžku a čistotě izolované miRNA bylo všech 50 zpracovaných vzorků vhodných k následujícímu stanovení. Analýza metodou RT real-time PCR byla provedena u 44 vzorků, které byly vybrány na základě klinických parametrů pacientů. Hladiny exprese sledovaných mikroRNA se pohybovaly průměrně mezi hodnotami 30–33, neboť právě mezi 30–33. cyklem byl zaznamenán výrazný nárůst amplifikací sledovaných miRNA (viz Graf 3). Z těchto údajů vyplývá, že reakce byly ve většině případů pozitivní, avšak množství amplifikované miRNA se pohybovalo ve středních hodnotách. (Hodnoty exprese všech významných miRNA, které mají vztah s DFI nebo OS jsou uvedeny v Tabulce 4, Příloze B).

Graf 3: Záznam Real-time PCR vybraných miRNA.



Zdroj: Autor, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.

### 10.2.1 Vyhodnocení vztahu vybraných miRNA k bezpříznakovému období (DFI) a celkovému přežití (OS)

Hodnoty exprese byly stanoveny na panelu mikroRNA, do něhož byly vybrány takové miRNA, které by dle odborné literatury mohly vykazovat souvislost s délkou bezpříznakového období (disease-free interval, DFI) nebo s celkovým přežitím (overall survival, OS) (viz kap. 4.2 Teoretické části).

Z celého panelu 25 mikroRNA byly získány významné hodnoty u 5 miRNA (v případě souvislosti s DFI) a 6 miRNA (v případě souvislosti s OS). Grafy vztahů hladin exprese některých z vybraných signifikantních mikroRNA s OS a DFI jsou uvedeny v Příloze C a D.

Signifikantní vztah s délkou bezpříznakového období vykazují miR-320, miR-494, miR-1980, miR-4487 a miR-99a. Ze získaných hodnot exprese těchto miRNA vyplývá, že v případě nízkých předoperačních hladin každé z výše zmíněných mikroRNA, má pacient po operačním zákroku delší trvání bezpříznakového období, jak je patrné z Tabulky 1:

Tabulka 1: Významné miRNA a jejich hladiny exprese v souvislosti s délkou bezpříznakového období (DFI).

Významné miRNA	Hladiny jejich exprese	Odhad DFI [měsíce]	P hodnota
miR-320	Nízká	40,1	0,009
	Vysoká	17,2	
miR-494	Nízká	43	0,018
	Vysoká	17,3	
miR-1980	Nízká	40,6	0,001
	Vysoká	15	
miR-4487	Nízká	36,2	0,048
	Vysoká	23,7	
miR-99a	Nízká	41,6	0,008
	Vysoká	15,4	

Zdroj: Autor podle dat Ústavu biologie LF UK v Plzni, 2022.

Zároveň předoperační hladiny molekul miR-221, miR-320, miR-494, miR-1260, miR-1980 a miR-99a se vyznačují obdobným vztahem s délkou celkového přežití pacienta. Z uvedené Tabulky 2 je patrné, že pokud jsou hladiny těchto miRNA před operací nízké, doba celkového přežití pacienta po operačním zákroku roste a naopak:

Tabulka 2: Významné miRNA a jejich hladiny exprese v souvislosti s délkou celkového přežití (OS).

Významné miRNA	Hladiny jejich exprese	Odhad OS [měsíce]	P hodnota
miR-221	Nízká	40,8	0,026
	Vysoká	27,9	
miR-320	Nízká	44,4	0,016
	Vysoká	21,9	
miR-494	Nízká	Nehodnotitelné	0,009
	Vysoká	15	
miR-1260	Nízká	40,8	0,026
	Vysoká	28	
miR-1980	Nízká	40,9	0,024
	Vysoká	22	
miR-99a	Nízká	42,2	0,017
	Vysoká	20,7	

Zdroj: Autor podle dat Ústavu biologie LF UK v Plzni, 2022.

### 10.3 Shrnující zodpovězení výzkumných otázek

1. Umožňuje plazma získaná ze vzorků periferní krve pacientů s melanomem izolaci dostatečného množství RNA pro analýzu exprese mikroRNA?

Ano, umožňuje. Důkazem je vlastní proběhnutí RT real-time PCR a naměření exprese u řady vzorků s hodnotami  $C_T$  nižšími než 35. Po statistickém zhodnocení bylo zjištěno, že i u vzorků s nižší koncentrací 10–20 ng/ $\mu$ l, kterých bylo 29 (58 %) z celkového počtu vzorků, bylo možné provést metodu RT real-time PCR.

2. Dosahuje RNA izolovaná z plazmy pacientů léčených pro melanom dostatečné čistoty pro stanovení exprese metodou RT real-time PCR?

Po předchozích zkušenostech s čistotou izolované RNA z různých zdrojů pro účely stanovení exprese metodou RT real-time PCR byly nároky na čistotu RNA sníženy oproti standardním parametrům, neboť i u těchto vzorků bylo možné stanovit expresi zkoumaných molekul. Z toho důvodu lze konstatovat, že 98 % vzorků má dostačující parametry čistoty pro provedení RT real-time PCR.

3. Které molekuly z rodiny mikroRNA (stanovené v rámci panelu LF UK v Plzni) prokazují specifický vztah k době celkového přežití a bezpříznakovému období?

Jak již bylo řečeno, cílem výzkumu je nalezení prognostických markerů ze skupiny molekul mikroRNA, které by usnadnily rozhodnutí o adjuvantní léčbě pacientů léčených pro melanom. Pilotní studie, jejíž provedení bylo součástí této bakalářské práce, umožnila identifikovat miR-320, miR-494, miR-1980, miR-4487 a miR-99a statisticky signifikantní ve vztahu k bezpříznakovému období a miR-221, miR-320, miR-494, miR-1260, miR-1980 a miR-99a statisticky signifikantní ve vztahu k celkovému přežití.

## DISKUZE

Bakalářská práce byla součástí širšího výzkumu probíhajícího na Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Pro část tohoto výzkumu bylo v rámci praktické části bakalářské práce zpracováno 50 vzorků plazmy z periferní krve pacientů léčených s onemocněním maligním melanomem, přičemž odběry byly předoperační, pooperační (1., 3. a 4. den) a v období follow-up, tedy při 1. – 5. ambulantní kontrole. První částí zpracování byla izolace molekul RNA ze vzorku s využitím soupravy QIAGEN miRNeasy Serum/Plazma Kit. Bylo zjištěno, že je pro tuto kolonkovou metodu ideální izolovat vzorky v sadách po 10–15, neboť doba mezi zpracováním jednotlivých vzorků v sadě není na tolik dlouhá, aby mohlo docházet k nežádoucím reakcím u déle stojících vzorků. Celková doba izolace všech 50 vzorků činila více než 11,5 h, přičemž průměrná doba izolace jedné sady se pohybovala od 120 do 150 minut.

Po statistickém zhodnocení bylo zjištěno, že 29 vzorků (tj. 58 %) spadá hodnotami koncentrace do rozmezí 10–20 ng/μl, což je dostatečná koncentrace pro následnou analýzu exprese metodou RT real-time PCR. Hodnoty koncentrací zbylých 21 vzorků (tj. 42 %) jsou pro následné stanovení více než uspokojivé, neboť se pohybují v rozmezí 20–100 ng/μl. Žádný vzorek neměl koncentraci nižší než 10 ng/μl, díky čemuž byly do následného stanovení RT real-time PCR metodou zařazeny všechny izolované vzorky. Kromě vyšší časové náročnosti protokolu a důrazu na zručnost a pečlivost pracovníka je nevýhodou této izolační metody vstupní materiál, tedy plazma periferní krve. Ačkoliv koncentrace molekul RNA ve všech vzorcích dosahovala hodnot vhodných pro následné stanovení, nejvyšší naměřená hodnota byla 32,8 ng/μl. Z toho vyplývá, že vzorky plazmy z periferní krve nedosahují tak vysokých hodnot, jako například izolace RNA z tkání zpracovaných formou FFPE bloků.

Čistota izolované RNA vyjádřená poměrem absorbancí 260/280 nm byla spočítána u všech 50 izolovaných vzorků. Po dílčím rozdělení vzorků dle hodnot čistoty do tří skupin bylo zjištěno, že pouze 1 vzorek má hodnotu čistoty nižší než 1,30. K následnému stanovení exprese metodou RT real-time PCR byl však uznán, vzhledem ke skutečnosti, že se jeho hodnota 1,29 pohybovala velmi těsně pod danou hranicí 1,30 s přihlédnutím k možné odchylce měřících přístrojů. Zbylých 49 vzorků se pohybovalo hodnotami čistoty v rozmezí 1,30 – 1,80, což je dle našich zkušeností čistota dostačující pro následné stanovení. Na otázku, zda „dosahuje RNA izolovaná z plazmy pacientů léčených pro melanom

dostatečné čistoty pro stanovení exprese metodou RT real-time PCR?“ lze tak odpovědět z 98 % kladně.

Druhou komponentou praktické části bakalářské práce bylo stanovení exprese molekul mikroRNA ze vzorků RNA plazmy metodou RT real-time PCR. Z původně izolovaných 50 vzorků bylo stanovení provedeno u 44 vzorků, které byly vybrány na základě klinických parametrů pacientů. Metodika postupu byla rozdělena do dvou fází. V první fázi byla pomocí diagnostické soupravy Applied Biosystems – Taq Man Micro RNA Reverse Transcription Kit provedena reverzní transkripce. Ve druhé fázi byla získaná cDNA z předchozí fáze přidána do reakční směsi metody Real-time PCR. Poté se sledoval průběh PCR reakce v reálném čase, přičemž bylo zjištěno, že výrazný nárůst amplifikací miRNA byl průměrně zaznamenán mezi 30–33. cyklem. RT real-time PCR je časově náročná metoda, neboť první fáze – reverzní transkripce trvá kolem 1 h, 10 min. Samotné PCR trvá přibližně 1 h, 55 min, přičemž k oběma fázím je nutné připočítat zhruba 30 minut manuální práce laboranta při přípravě reakce. Celkově tedy metoda trvá více než 4 hodiny.

Součástí cílů bakalářské práce bylo rovněž zjistit, zda některé miRNA z celkových 25 vybraných v panelu LF UK v Plzni vykazují specifický vztah k bezpříznakovému období a celkovému přežití u pacientů léčených pro melanom. Na základě získaných dat expresí vyšetřovaných mikroRNA a vytvořených grafů bylo možné určit 5 konkrétních miRNA, které mají souvislost s DFI. Jedná se o miR-99a, miR-320, miR-494, miR-1980 a miR-4487. U každé s těchto miRNA bylo zjištěno, že doba bezpříznakového období bude tím delší, čím nižší hodnoty exprese dané miRNA byly zachyceny před operačním zákrokem. Odhad trvání DFI v měsících byl nejnižší v případě vysokých předoperačních koncentrací miR-1980 – 15 měsíců. Naopak nejdelší DFI bylo odhadnuto v případě nízkých předoperačních koncentrací miR-494 – 43 měsíců.

Dále bylo identifikováno 6 konkrétních miRNA, které vykazují souvislost s OS. Jsou to opět miR-99a, miR-320, miR-494 a miR-1980, dále doplněné o miR-221, a miR-1260. Zjištěný vztah byl principiálně obdobný vztahu s DFI, tedy čím nižší předoperační hladiny dané miRNA, tím delší doba celkového přežití. MiR-494 vykazuje největší diverzitu mezi nízkými a vysokými hodnotami předoperačních hladin exprese. Vysoká hladina této miRNA předpovídá přežití přibližně 15 měsíců, zatímco nízké koncentrace ukazují na výrazně lepší prognózu (pacientům s nízkými předoperačními hodnotami miR-494 zkoumaného souboru se daří příznivě).



Získané výsledky u signifikantních miRNA z hlediska vztahu k parametrům přežití u maligního melanomu jsou v souladu a dále rozvíjejí informace v již publikovaných studiích. Varrone et Caputo et al., 2020 uvádí jako významné mikroRNA taktéž miR-211 a miR-340. Stejně tak je dle výzkumu Starka et al., 2015 signifikantní pro maligní melanom miR-4487. Tyto výsledky ukazují narůstající znalosti o úlohách konkrétních mikroRNA ve vzniku a průběhu nádorového onemocnění maligní melanom. Díky tomu by se jejich uplatnění z hlediska biomarkerů mohlo v budoucnu posunout do klinické praxe.

## ZÁVĚR

Tématem bakalářské práce bylo „Stanovení cirkulujících mikroRNA u pacientů s melanomem“, neboť v současné době se v celosvětovém měřítku zvyšuje incidence onemocnění maligním melanomem v populaci. V teoretické části bakalářské práce byly charakterizovány konkrétní procesy vedoucí ke karcinogenezi. Dále bylo popsáno onemocnění maligní melanom, včetně nejčastěji využívaných metod pro jeho diagnostiku a léčbu. Zároveň byly objasněny výhody a nevýhody tekuté biopsie, jakožto eventuální náhrady klasických chirurgických metod diagnostiky melanomu. V souvislosti s tím byly popsány molekuly mikroRNA a jejich potenciální využití jako prognostických biomarkerů. Na závěr teoretické části byla rozebrána problematika kvantitativního stanovení molekul mikroRNA pomocí molekulárně biologických metod, jako je PCR nebo NGS.

Praktická část bakalářské práce se věnovala izolaci molekul mikroRNA z plazmy periferní krve pacientů léčených pro melanom, stanovení hladin exprese těchto molekul a statistické zhodnocení získaných hodnot. Bylo zjištěno, že plazma izolovaná kolonkovou metodou s využitím soupravy QIAGEN miRNeasy Serum/Plazma Kit je dostatečně výtěžná pro získání vhodného množství RNA pro následné stanovení. Zároveň molekuly RNA vykazují pro následné stanovení převážně vhodnou čistotu. Stanovení hladin exprese jednotlivých molekul mikroRNA bylo provedeno metodou RT real-time PCR. Pro reverzní transkripci byl použita souprava Taq man MicroRNA Reverse Transcription Kit, pro Real-time PCR souprava Taq Man Universal Master Mix II a Taq Man MicroRNA Assay. Na pilotním souboru pacientů bylo na základě získaných hodnot expresí identifikováno 6 miRNA, které vykazují vztah s OS, a 5 miRNA, které vykazují vztah s DFI.

Výsledky získané v praktické části bakalářské práce představují přínosné informace pro výzkum Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Pokud by se po provedení analýzy všech stovek vzorků zařazených do výzkumu potvrdily výsledky prezentované v bakalářské práci, mohly by výše jmenované molekuly mikroRNA nalézt v budoucnu uplatnění jako prognostické markery při rozhodování o adjuvantní léčbě pacientů léčených pro melanom.

## SEZNAM LITERATURY

ADAM, Zdeněk, KOPTÍKOVÁ, Jana, VORLÍČEK, Jiří et al. *Molekulární biologie a genetika nádorů*. Vybrané kapitoly z knihy *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. 48 s. ISBN 978-80-247-3324-1

AHMED, Bilal et al. Malignant Melanoma: Skin Cancer-Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* [online]. 2020, 30(4):291-297. [cit. 30.11.2021]. Dostupné z: doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2020028454

Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific. *Real-time PCR: understanding Ct* [online]. 2016. [cit. 25.2.2022]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PJ1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf>

BALCH, Charles M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 20 December 2009, 27(36): 6199-206. [cit. 30.11.2021]. Dostupné z: doi: 10.1200/JCO.2009.23.4799

BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2016. 196 s. ISBN 978-80-246-3224-7

Bio-Rad Laboratories, Inc. *Real-Time PCR Applications Guide* [online]. 2006. [cit. 3.1.2022]. Dostupné z: [https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5279.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf)

BRDIČKA, Radim a DIDDEN, William. *Genetika v klinické praxi III*. 1. vyd. Praha: Galén, 2015. 189 s. ISBN 978-80-7492-226-8

BRLEK, Zorica Đorđević et al. Dermoscopy of Nodular Melanoma: Review of the Literature and Report of 3 Cases. *Acta Dermatovenerologica Croatica* [online]. August 2016, 24(3): 203-8. [cit. 5.12.2021]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27663921/>

CARPI, Sara et al. Circulating microRNAs as biomarkers for early diagnosis of cutaneous melanoma. *Expert Review of Molecular Diagnostics* [online]. January 2020, 20(1): 19-30. [cit. 14.12.2021]. Dostupné z: doi: 10.1080/14737159.2020.1696194

CAVÉ, H. et al. La RT-PCR en diagnostic Clinique. *Annales de Biologie Clinique* [online]. 2003 November, 61(6): 635-44. [cit. 5.1.2022]. Dostupné z: [https://www.jle.com/fr/revues/abc/e-docs/la\\_rtper\\_en\\_diagnostic\\_clinique\\_\\_261442/article.phtml](https://www.jle.com/fr/revues/abc/e-docs/la_rtper_en_diagnostic_clinique__261442/article.phtml)

CHEN, Ming a ZHAO, Hongyu. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Human Genomics* [online]. 1 August 2019, 13(1): 34. [cit. 7.12.2021]. Dostupné z: doi: 10.1186/s40246-019-0220-8

CROWLEY, Emily et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology* [online]. August 2013, 10(8): 472-84. [cit. 8.12.2021]. Dostupné z: doi: 10.1038/nrclinonc.2013.110.

DESVIGNES, Thomas et al. miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends in Genetics* [online]. 2015, 31(11): 613-626. [cit. 25.11.2021]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.tig.2015.09.002

DIAZ, Louis A. a BARDELLI, Alberto. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 20 February 2014, 32(6): 579-86. [cit. 12.12.2021]. Dostupné z: doi: 10.1200/JCO.2012.45.2011

FIKRLE, Tomáš a PIZINGER, Karel. Maligní melanom. *Onkologie* [online]. 2010, 4(4): 225–228 2010. [cit. 28.11.2021]. ISSN - 1803-5345. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2010/04/03.pdf>

FORETOVÁ, Lenka et al. Syndrom BAP1 – predispozice k malignímu mezoteliomu, kožnímu a uveálnímu melanomu, renálnímu karcinomu a dalším nádorům. *Klinická Onkologie* [online]. 2019, 32(2):2S118-2S122. [cit. 28.11.2021]. Dostupné z: doi: 10.14735/amko2019S118

GAJOS-MICHNIEWICZ, Anna a CZYZ, Malgorzata. Role of miRNAs in Melanoma Metastasis. *Cancers* [online]. 7 March 2019, 11(3): 326. [cit. 24.11.2021]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers11030326

HA, Minju a KIM, V. Narry. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. August 2014, 15(8): 509-524. [cit. 24.11.2021]. Dostupné z: doi: 10.1038/nrm3838

HANAHAN, Douglas a WEINBERG, Robert A. The hallmarks of Cancer. *Cell* [online]. 7 January 2000, 100(1): 57-70. [cit. 2.11.2021]. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9

HANAHAN, Douglas a WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. 4 March 2011, 144(5): 646-674. [cit. 26.10.2021]. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013

HÖPPENER, Diedrik J. et al. The Disease-Free Interval Between Resection of Primary Colorectal Malignancy and the Detection of Hepatic Metastases Predicts Disease Recurrence but Not Overall Survival. *Annals of Surgical Oncology* [online]. September 2019, 26(9): 2812-2820. [cit. 12.12.2021]. Dostupné z: doi: 10.1245/s10434-019-07481-x

IVANKOVIĆ, Milena, CUKUSIĆ, Andrea et al. Telomerase activity in HeLa cervical carcinoma cell line proliferation. *Biogerontology* [online]. April 2007, 8(2): 163-72. [cit. 26.10.2021]. Dostupné z: doi: 10.1007/s10522-006-9043-9

JAIN, Amit Kumar et al. Liquid Biopsy. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology* [online]. 20 May 2021, 42(01): 077-079. [cit. 8.12.2021]. ISSN 0971-5851. Dostupné z: doi: 10.1055/s-0041-1729434

KELLY, John W. Nodular melanoma. No longer as simple as ABC. *Australian Family Physician* [online]. September 2003, 32(9): 706-9. [cit. 5.12.2021]. ISSN 0300-8495. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14524207/>

KODET, Ondřej a KRAJSOVÁ, Ivana. Maligní melanom, incidence, rizikové faktory a jeho časná diagnostika. *Onkologie* [online]. 2017, 11(3): 138–143. [cit. 28.11.2021]. ISSN 1803-5345. Dostupné z: 10.36290/xon.2017.027

KONTOMANOLIS, Emmanuel, KOUTRAS, Antonios et al. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research* [online]. November 2020, 40(11): 6009-6015. [cit. 26.10.2021]. Dostupné z: doi: 10.21873/anticancer.14622

KOZOMARA, Ana et al. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research* [online]. 8 January 2019, 47(D1): D155– D162. [cit. 7.3.2022]. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gky1141

LAB Guide, průvodce laboratoří. *Izolace a purifikace nukleových kyselin* [online]. 2014. [cit. 3.1.2022]. Dostupné z: <https://labguide.cz/wp-content/uploads/2014/10/Ke-stažení-Izolace-a-purifikace-nukleových-kyselin.pdf>

LEHMANN, Alan R. et al. Xeroderma pigmentosum. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. 1 November 2011, 70(6). [cit. 28.11.2021]. Dostupné z: doi: 10.1186/1750-1172-6-70

Life technologies, Thermo Fisher Scientific *Real-time PCR handbook* [online]. 2012. [cit. 4.1.2022]. Dostupné z: <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>

LONGO, Caterina et al. Superficial Spreading Melanoma. In: HOFMANN-WELLENHOF, Rainer et al. *Reflectance Confocal Microscopy for Skin Diseases*. Heidelberg: Springer-Verlag, January 2012. s 151-178. [cit. 5.12.2021]. ISBN 978-3-642-21997-9. Dostupné z: doi: 10.1007/978-3-642-21997-9\_13

LONGVERT, C. a SAIAG, P. Actualités dans le mélanome cutané – Melanoma update. *La Revue de médecine interne* [online]. March 2019, 40 (3): 178–183. [cit. 6.12.2021]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.revmed.2018.11.005

LU, Thomas X. et ROTHENBERG, Marc E. MicroRNA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. April 2018, 141(4): 1202-1207. [cit. 4.1.2022]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jaci.2017.08.034

MASOPUST, Jaroslav a PRŮŠA, Richard. *Patobiochemie buňky*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2. Lékařská fakulta, 2003. 323 s. ISBN: 80-239-1011-0

*The miRBase Sequence Database* [online]. 2002. [cit. 7.3.2022]. Dostupné z: <https://www.mirbase.org>

MUZZEY, Dale et al. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Current Genetic Medicine Reports* [online]. 2015, 3(4): 158-165. [cit. 5.1.2022]. Dostupné z: doi: 10.1007/s40142-015-0076-8

PEŠTA, Martin a HOUFKOVÁ, Kateřina, Ústav biologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni [ústní sdělení]. Plzeň, 28. 1. 2022

POLINI, Beatrice, CARPI, Sara et al. Circulating cell-free microRNAs in cutaneous melanoma staging and recurrence or survival prognosis. *Pigment Cell & Melanoma Research* [online]. 2019, 32: 486–499. [cit. 14.12.2021]. Dostupné z: doi: 10.1111/pcmr.12755

RASTODER, Ema a GLUD, Martin. Diagnostik og behandling af lentigo maligna melanoma. *Ugeskrift for Læger* [online]. 2019, 181: V08180544. [cit. 4.12.2021]. ISSN 0041-5782. Dostupné z: [https://ugeskriftet.dk/files/scientific\\_article\\_files/2019-10/v08180544\\_0.pdf](https://ugeskriftet.dk/files/scientific_article_files/2019-10/v08180544_0.pdf)

ROY, Frans van a BERX, Geert. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 23 August 2008, 65(2008): 3756–3788. [cit. 2.11.2021]. Dostupné z: doi: 10.1007/s00018-008-8281-1.

SAPKOTA, Anupama. Types of PCR (Polymerase chain reaction) – definition and uses. In: *Microbe Notes* [online]. 20 April 2021. [cit. 4.1.2022]. Dostupné z: <https://microbenotes.com/types-of-pcr/>

SEGURA, Miguel F. et al. Melanoma MicroRNA signature predicts post-recurrence survival. *Clinical Cancer Research* [online]. 1 March 2010, 16(5): 1577-1586. [cit. 29.11.2021]. Dostupné z: doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2721

SEIFI, Morteza et al. Overview of Real-Time PCR Principles. In: HERNANDEZ-RODRIGUEZ, Patricia a GOMEZ, Arlen Patricia Ramirez. *Polymerase Chain Reaction* [online]. Londýn: IntechOpen, May 2012, s 405-442. [cit. 4.1.2022]. ISBN 978-953-51-5300-9. Dostupné z: doi: 10.5772/39220

SLABÝ, Ondřej a SVOBODA, Marek. *MikroRNA v onkologii*. 1. vyd. Praha: Galén, 2012. 324 s. ISBN 978-80-7262-587-1

SNUSTAD, Peter a SIMMONS, Michael. *Genetika*. 2. vyd. Překlad Jiřina Relichová a kol. Brno: Masarykova univerzita, 2017. 844 s. ISBN 978-80-210-8613-5

STARK, Mitchell S. et al. The Prognostic and Predictive Value of Melanoma-related MicroRNAs Using Tissue and Serum: A MicroRNA Expression Analysis. 2015

*eBioMedicine* [online]. 12 May 2015, 2(7): 671-680. [cit. 29.11.2021]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ebiom.2015.05.011

ŠITUM, Mirna et al. Lentigo Maligna Melanoma – the Review. *Collegium antropologicum* [online]. 2010, 34(2): 299-301. [cit. 4.12.2021]. Dostupné z: <https://hrcak.srce.hr/en/file/79086>

TERAMOTO, Yukiko et al. Acral Lentiginous Melanoma. In: BALCH, Charles M. et al. *Cutaneous Melanoma* [online]. Cham: Springer, 29 January 2020. s 897-924. [cit. 5.12.2021]. ISBN 978-3-030-05070-2. Dostupné z: doi: 10.1007/978-3-030-05070-2\_67

TOMÁŠEK, Jiří a BERKOVCOVÁ, Jitka. Onkogeny RAS – prediktivní molekulární marker u kolorektálního karcinomu. *Klinická Onkologie* [online]. 2013, 26(5): 366–367 [cit. 2.11.2021]. ISSN 0862–495X. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/180/4311.pdf>

TŘEŠKOVÁ, Inka et al. *Biomarkery u maligního melanomu* [online]. Plzeň: Tribun, 2014 [cit. 5.12.2021]. ISBN 978-80-263-0815-7. Dostupné z: [https://oid.fnplzen.cz/sites//Biomarkery\\_u\\_maligniho\\_melanomu\\_0.pdf](https://oid.fnplzen.cz/sites//Biomarkery_u_maligniho_melanomu_0.pdf)

TZERTZINIS, George et al. RNA-dependent DNA polymerases. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. October 2008, 3(1): 3.7. [cit. 5.1.2022]. Dostupné z: doi: 10.1002/0471142727.mb0307s84

VARRONE, Francesca. The miRNAs Role in Melanoma and in Its Resistance to Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 29 January 2020, 21(3): 878. [cit. 24.11.2021]. Dostupné z: doi: 10.3390/ijms21030878

WÖHRL, Birgitta M. Structural and Functional Aspects of Foamy Virus Protease-Reverse Transcriptase. *Viruses* [online]. 2 July 2019, 11(7): 598. [cit. 5.1.2022]. Dostupné z: doi: 10.3390/v11070598

WOUTERS, Loes T. C. M. a THISSEN, Monique R. T. M. Klinische les het acrolentigineus melanoom – Hoe te herkennen en wanneer te verwijzen? *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* [online]. 19 June 2012, 156: A4927. [cit. 5.12.2021]. Dostupné z: <https://www.ntvg.nl/system/files/publications/a4927.pdf>



YE, Qianwei et al. Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Molecular Cancer* [online]. 3 July 2019, 18(1): 114. [cit. 12.12.2021]. Dostupné z: doi: 10.1186/s12943-019-1043-x

## SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Tabulka izolovaných vzorků včetně naměřených koncentrací a hodnot čistoty.
- Příloha B – Tabulka hodnot expresí významných miRNA majících vztah k DFI anebo k OS.
- Příloha C – Grafy vztahu hladin expresí vybraných miRNA s bezpříznakovým obdobím (DFI).
- Příloha D – Grafy vztahu hladin expresí vybraných miRNA s celkovým přežitím (OS).

# PŘÍLOHY

## Příloha A – Tabulka izolovaných vzorků včetně naměřených koncentrací, hodnot čistoty a doby odběru vzorku.

Tabulka 3: Seznam izolovaných vzorků včetně koncentrací RNA, časového určení odběru a čistot získané RNA (1. část).

Číslo vzorku	ID číslo pacienta	Doba odběru	C <sub>RNA</sub> [ng/μl]	Čistota 260/280
1	706120	Před operací	24,3	1,51
4		Po operaci	23,7	1,48
16		1. den po operaci	17,4	1,67
19		3. den po operaci	23,0	1,40
34	595503	Před operací	14,5	1,67
38		Po operaci	16,8	1,43
48		1. den po operaci	21,8	1,56
50	530925	Před operací	15,3	1,48
67		Po operaci	23,6	1,55
73		1. den po operaci	20,5	1,49
79	430804	Před operací	17,0	1,42
85		Po operaci	23,7	1,42
80		1. den po operaci	21,4	1,56
86		4. den po operaci	25,3	1,58
146		1. ambulantní kontrola	19,4	1,51
152		2. ambulantní kontrola	14,4	1,39
150	455411	Před operací	19,1	1,46
156		Po operaci	18,1	1,63
163		1. den po operaci	11,3	1,40
168		1. ambulantní kontrola	17,1	1,69
196		2. ambulantní kontrola	25,7	1,33
199		3. ambulantní kontrola	24,4	1,53
226	410728	Před operací	16,7	1,35
234		Po operaci	20,5	1,63
248		1. den po operaci	16,8	1,48
251		3. den po operaci	17,9	1,40
278	720326	Před operací	23,0	1,60
281		Po operaci	19,3	1,70
293		1. den po operaci	15,0	1,64
299		3. den po operaci	21,1	1,57
332		1. ambulantní kontrola	20,3	1,45
338		2. ambulantní kontrola	24,1	1,42
371	545929	Před operací	14,8	1,41
374		Po operaci	18,5	1,51

Zdroj: Autor podle dat Ústavu biologie LF UK v Plzni, 2022.

Tabulka 3: Seznam izolovaných vzorků včetně koncentrací RNA, časového určení odběru a čistot získané RNA (2. část).

Číslo vzorku	ID číslo pacienta	Doba odběru	C <sub>RNA</sub> [ng/μl]	Čistota 260/280
375	545929	1. den po operaci	19,3	1,53
379		1. ambulantní kontrola	19,1	1,34
415		2. ambulantní kontrola	20,8	1,48
418		3. ambulantní kontrola	16,5	1,33
431	570919	Před operací	30,3	1,52
434		Po operaci	15,5	1,35
452		1. den po operaci	12,2	1,37
456		3. den po operaci	15,1	1,31
514		1. ambulantní kontrola	19,3	1,53
517		2. ambulantní kontrola	26,5	1,39
855		3. ambulantní kontrola	19,9	1,29
803	570209	4. ambulantní kontrola	32,8	1,76
804	456201	5. ambulantní kontrola	18,6	1,66
808	790407	4. ambulantní kontrola	18,7	1,57
809	545508	4. ambulantní kontrola	18,6	1,66
856	520316	1. ambulantní kontrola	30,7	1,48

Zdroj: Autor podle dat Ústavu biologie LF UK v Plzni, 2022.

**Příloha B – Tabulka hodnot expresí významných miRNA majících vztah k DFI anebo k OS.**

*Tabulka 4: Hodnoty expresí významných mikroRNA mající vztah k DFI anebo k OS (1. část).*

Vysvětlivky: Nedet. C<sub>T</sub>... Nedetekované C<sub>T</sub>

Číslo vzorku	Hodnoty exprese [C <sub>T</sub> ]						
	miR-99a	miR-221	miR-320	miR-494	miR-1260	miR-1980	miR-4478
1	36,725	33,510	29,625	Nedet. C <sub>T</sub>	32,590	36,300	30,830
4	36,145	33,020	30,480	37,560	32,310	36,880	30,960
16	38,200	36,085	31,355	43,930	32,400	Nedet. C <sub>T</sub>	32,055
19	38,220	34,520	31,365	37,850	33,185	35,230	32,450
34	36,965	34,685	30,770	38,000	32,560	36,520	33,305
38	33,710	33,400	31,025	41,910	31,960	47,340	33,130
48	33,705	33,755	29,850	37,090	32,550	37,940	32,950
50	35,360	33,835	29,630	Nedet. C <sub>T</sub>	32,275	36,690	32,580
67	44,710	37,600	36,900	Nedet. C <sub>T</sub>	35,150	47,960	36,120
73	31,540	34,445	29,765	Nedet. C <sub>T</sub>	32,535	Nedet. C <sub>T</sub>	32,740
79	37,425	34,085	28,830	Nedet. C <sub>T</sub>	32,670	38,420	32,870
85	35,030	33,160	27,860	Nedet. C <sub>T</sub>	31,585	33,620	32,665
80	35,900	34,830	28,735	Nedet. C <sub>T</sub>	31,695	35,180	33,170
86	35,530	34,100	29,520	Nedet. C <sub>T</sub>	31,160	49,660	33,110
146	35,720	34,140	28,800	Nedet. C <sub>T</sub>	33,130	Nedet. C <sub>T</sub>	34,965
152	37,260	34,980	30,485	Nedet. C <sub>T</sub>	33,595	36,180	34,945
150	38,930	35,510	30,675	Nedet. C <sub>T</sub>	33,495	38,040	34,465
156	35,080	33,780	29,060	37,850	32,520	46,430	34,185
163	38,630	35,380	30,310	40,750	34,880	36,600	34,840
168	Nedet. C <sub>T</sub>	35,460	31,430	37,190	34,475	37,610	Nedet. C <sub>T</sub>
196	37,430	34,345	29,480	Nedet. C <sub>T</sub>	33,0300	38,360	34,015
199	38,480	34,965	29,445	37,600	33,035	35,660	33,820
226	37,060	34,235	29,330	Nedet. C <sub>T</sub>	33,375	36,050	32,500
234	37,240	35,010	29,550	Nedet. C <sub>T</sub>	33,810	36,810	32,980
248	35,500	35,810	30,680	38,460	32,860	46,160	33,500
251	39,340	36,055	31,445	Nedet. C <sub>T</sub>	32,680	35,640	33,340
278	36,490	35,480	31,840	Nedet. C <sub>T</sub>	34,565	36,030	35,840
281	38,600	37,760	33,770	37,620	34,615	38,870	35,960
293	Nedet. C <sub>T</sub>	35,475	30,600	43,720	34,005	37,785	34,150
299	35,595	34,450	30,675	38,920	32,690	36,310	34,430
332	39,220	34,995	29,440	40,640	32,065	35,300	33,310
338	38,990	33,920	29,265	37,590	32,500	36,930	33,595
371	36,030	31,900	25,075	36,835	31,800	Nedet. C <sub>T</sub>	32,815
374	35,880	33,995	28,640	Nedet. C <sub>T</sub>	31,645	Nedet. C <sub>T</sub>	32,110
375	35,490	34,600	28,600	39,940	31,880	Nedet. C <sub>T</sub>	32,700

Zdroj: Autor podle dat Ústavu biologie LF UK v Plzni, 2022.

Tabulka 4: Hodnoty expresí významných mikroRNA mající vztah k DFI anebo k OS (2. část).

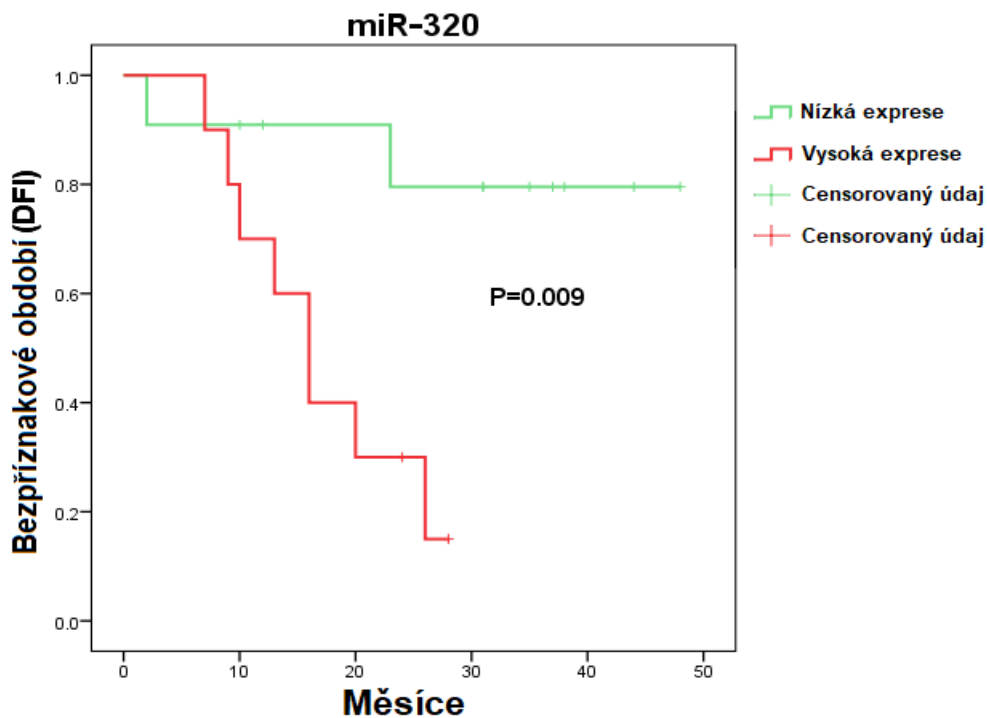
Vysvětlivky: Nedet. C<sub>T</sub>... Nedetekované C<sub>T</sub>

Číslo vzorku	Hodnoty exprese [C <sub>T</sub> ]						
	miR-99a	miR-221	miR-320	miR-494	miR-1260	miR-1980	miR-4478
379	35,935	35,425	30,100	36,590	31,810	Nedet. C <sub>T</sub>	33,660
415	36,630	34,375	29,230	39,285	33,345	Nedet. C <sub>T</sub>	33,410
418	37,850	35,185	29,740	41,720	32,915	Nedet. C <sub>T</sub>	33,255
431	37,910	33,290	29,925	37,250	32,655	Nedet. C <sub>T</sub>	32,620
434	36,390	34,225	30,050	Nedet. C <sub>T</sub>	32,890	Nedet. C <sub>T</sub>	32,540
452	Nedet. C <sub>T</sub>	34,325	28,845	Nedet. C <sub>T</sub>	34,060	34,570	33,305
456	Nedet. C <sub>T</sub>	33,160	29,645	Nedet. C <sub>T</sub>	32,940	38,460	32,090
514	39,750	34,270	29,770	38,110	32,620	34,320	33,450
517	Nedet. C <sub>T</sub>	34,925	29,420	Nedet. C <sub>T</sub>	32,570	37,545	33,120

Zdroj: Autor podle dat Ústavu biologie LF UK v Plzni, 2022.

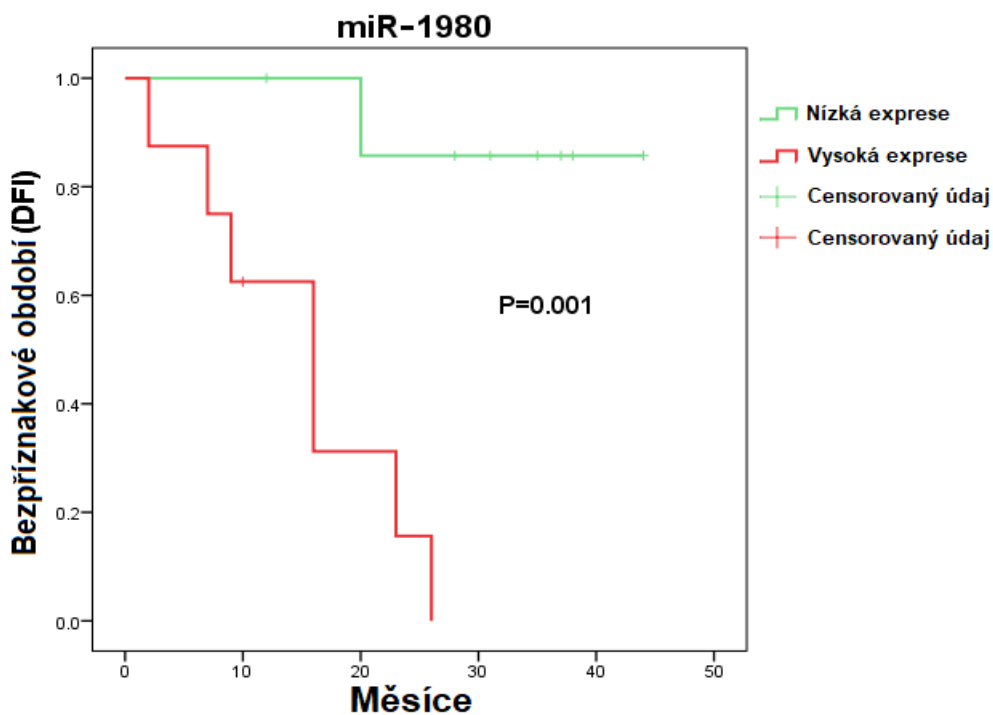
**Příloha C – Grafy vztahu hladin expresí vybraných miRNA s bezpříznakovým obdobím (DFI).**

*Graf 4: Vztah předoperačních hladin exprese miR-320 s bezpříznakovým obdobím (DFI).*



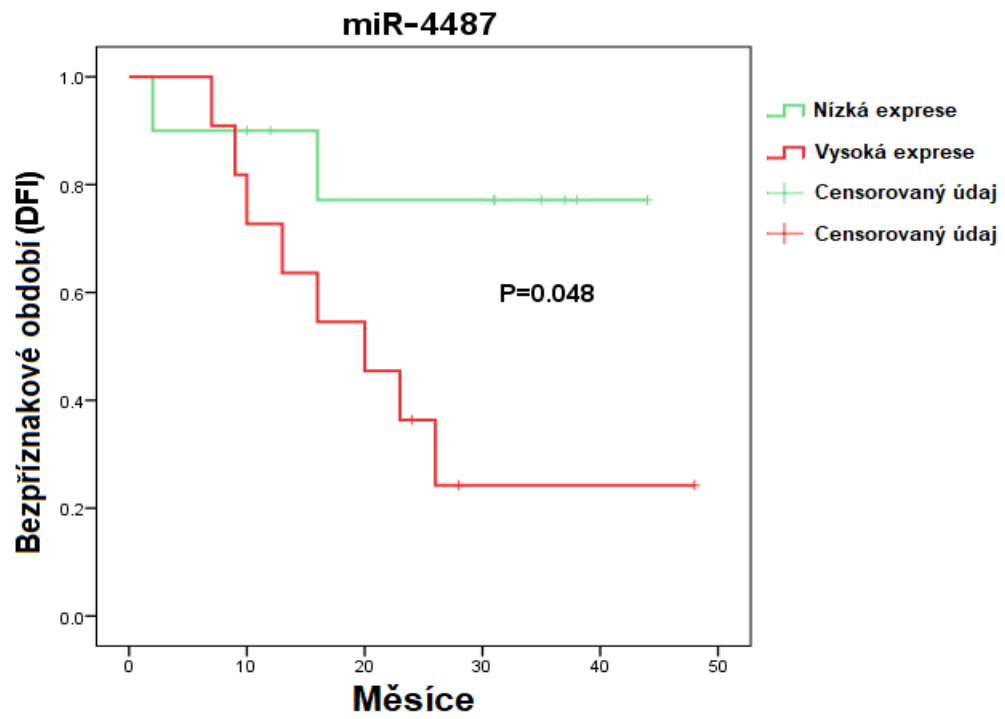
Zdroj: Upraveno dle Dattatrya Shetti, Ph.D., Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.

*Graf 5: Vztah předoperačních hladin exprese miR-1980 s bezpříznakovým obdobím (DFI).*



Zdroj: Upraveno dle Dattatrya Shetti, Ph.D., Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.

Graf 6: Vztah předoperačních hladin exprese miR-4487 s bezpříznakovým obdobím (DFI).

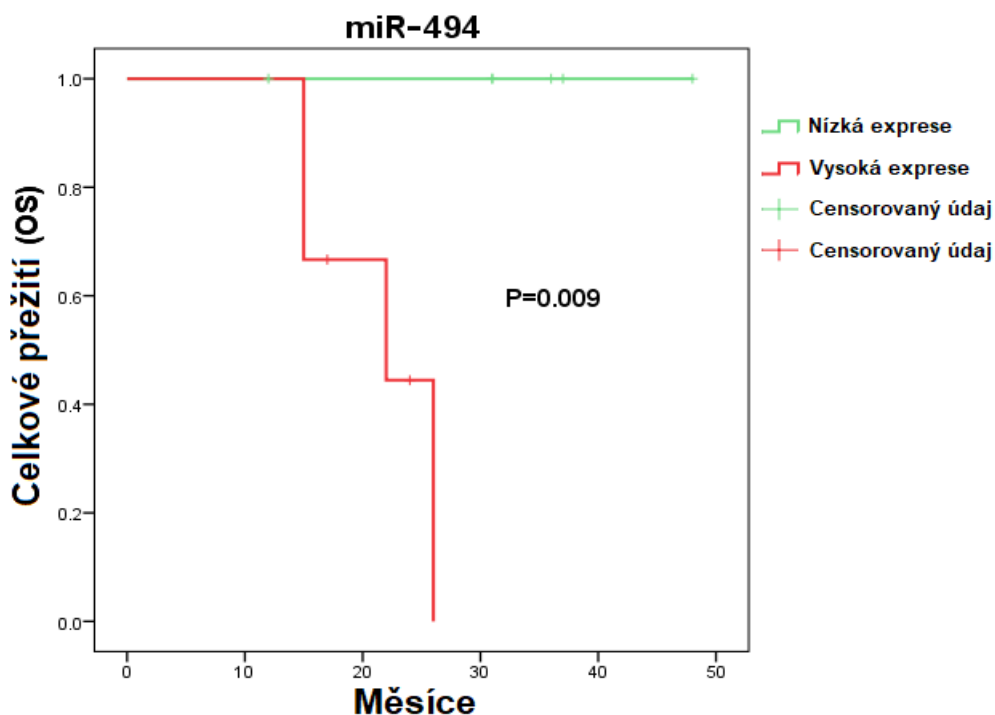


Zdroj: Upraveno dle Dattatrya Shetti, Ph.D., Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.



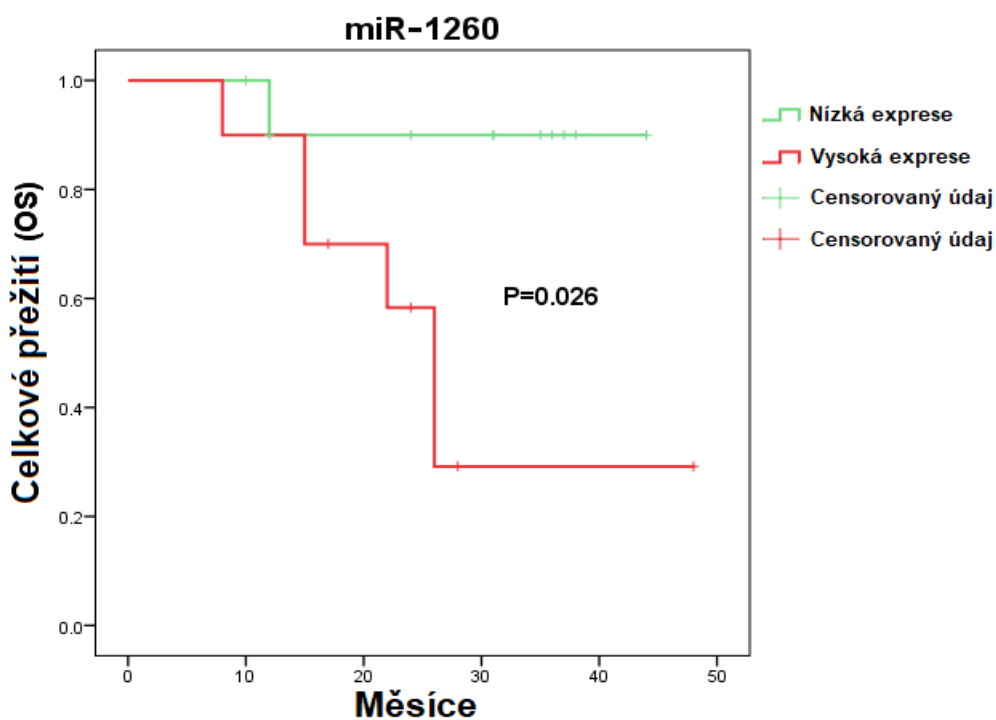
**Příloha D – Grafy vztahu hladin expresí vybraných miRNA s celkovým přežitím (OS).**

*Graf 7: Vztah předoperačních hladin exprese miR-494 s celkovým přežitím (OS).*



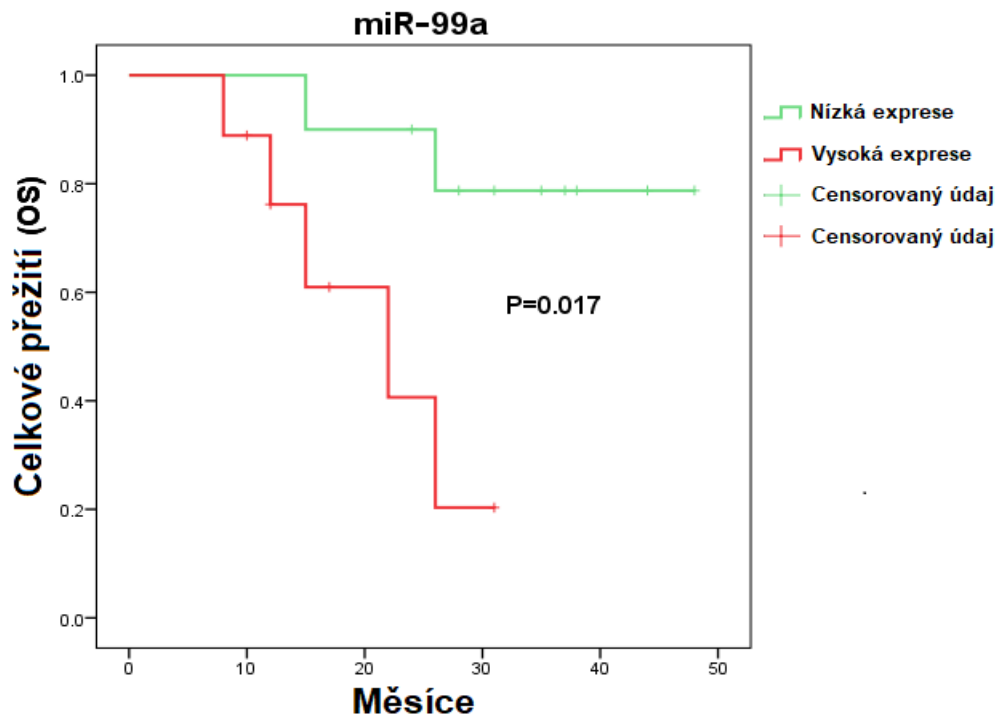
*Zdroj: Upraveno dle Dattatrya Shetti, Ph.D., Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.*

*Graf 8: Vztah předoperačních hladin exprese miR-1260 s celkovým přežitím (OS).*



*Zdroj: Upraveno dle Dattatrya Shetti, Ph.D., Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.*

Graf 9: Vztah předoperačních hladin exprese miR-99a s celkovým přežitím (OS).



Zdroj: Upraveno dle Dattatrya Shetti, Ph.D., Ústav biologie LF UK v Plzni, 2022.