

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Biologie
Genetika, molekulární biologie, virologie



Bc. Romana Vajnerová

Sledovanie expresie génov zapojených do patogenézy rhabdomyosarkómov
Monitoring the expression of genes involved in pathogenesis of
rhabdomyosarcomas

Diplomová práca

Školiteľ: RNDr. Lenka Krsková, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.08.2015

.....
Podpis

Pod'akovanie:

Na tomto mieste by som sa veľmi rada poďakovala svojej školiteľke RNDr. Lenke Krskovej, Ph.D. za odborné vedenie mojej práce, všetok čas a pomoc, ktorú mi venovala.

Vďaka patrí aj všetkým členom Laboratória molekulárnej patológie FN Motol za cenné rady pri prevedení experimentálnej časti mojej diplomovej práce a vždy pozitívnu kolektívnu náladu.

V neposlednom rade moje poďakovanie patrí Prof. MUDr. Romanovi Kodetovi, Csc. za vždy veľmi ochotný a odborný prístup.

Abstrakt

Rabdomyosarkómy (RMS) sú heterogénnou skupinou sarkómov mezenchymálneho pôvodu, ktoré si do určitej miery uchovávajú bunkovú diferenciáciu v priečne pruhované svalstvo, no svoj diferenciačný cyklus nie sú schopné dokončiť. V súčasnosti sú najčastejšie sa vyskytujúcimi malígnymi nádormi mäkkých tkanív u pediatrických pacientov.

V posledných rokoch sa pozornosť z viacerých uhlov upiera na výskum malých jednovláknových molekúl, takzvaných mikroRNA (miRNA). Ako vysoko konzervatívne, 18 až 24 nukleotidov dlhé nekódujúce molekuly RNA zohrávajú úlohu dôležitých regulátorov génovej expresie. Kontrolujú ako fyziologické, tak patologické procesy v organizme, pričom na viacerých úrovniach bola popísaná aj ich významná úloha v patogenéze rôznych nádorových ochorení. Abnormálne hladiny miRNA vedú k variabilným, pritom významným dôsledkom, čím sa expresia miRNA ukázala byť tiež nádorovo špecifická. Takéto mikroRNA niekedy zastávajú úlohu onkogénov, no väčšina sa pri nádorových ochoreniach vyskytuje v podobe nádorových supresorov.

V svojej práci sa sústredím na rodinu takzvaných myomiRNA, teda svalovo-špecifických mikroRNA (miR-133a, miR-133b a miR-206), riadiacich bunkový osud myogénnych prekursorov, pričom sa zameriavam na potenciálne zmenenú hladinu ich expresie vo vzorkách rabdomyosarkómov alveolárnej, embryonálnej či vzácne aj pleomorfnej formy, v porovnaní so vzorkami rôznych typov mezenchymálnych nádorov či nenádorovým svalovým tkanivom.

Analýza výsledkov poukázala na štatisticky významné rozdiely v hladinách expresie jednotlivých myomiRs (hlavne v prípade miR-206 a miR-133b) u RMS v porovnaní s kontrolnými vzorkami, či rôzne hladiny expresie vrámci rôznych podtypov RMS. Výsledky práce by mohli mať vplyv na kandidatúru týchto svalovo-špecifických mikroRNA ako prípadných diagnostických či prognostických markerov v patogenéze rabdomyosarkómov.

Kľúčové slová: rabdomyosarkómy, mikroRNA, myomiRs, RQ-RT-PCR, génová expresia

Abstract

Rhabdomyosarcomas (RMS) are heterogeneous group of sarcomas with mesenchymal origin. These rhabdomyosarcomas in some detail keep their cell differentiation in structure, but they are not able to finish their differentiation cycle. At the moment RMS are the most frequently occurring malignant soft tissue tumors in paediatric patients.

In recent years, the attention is focused on the research of small single strand molecules, so called microRNA (miRNA). As highly conserved, 18 to 24 nucleotides long, uncoding molecules of RNA, they play important role as regulators of gene expression. They are controlling both, physiological and pathological processes in organism. Their important role in pathogenesis of different tumor diseases was described at multiple levels. Abnormal levels of miRNA leads to variable, although significant consequences, what indicates miRNA expression also as tumor specific. These miRNA sometimes represents the role of oncogenes, but mostly they occur in the form of tumor suppressors.

In my diploma thesis I am focusing on the family of so called myomiRNAs, muscle-specific microRNAs (miR-133a, miR-133b and miR-206), which regulates cell determination of myogenic precursors, whereas I focus on potentially changed level of their expression in the samples of alveolar, embryonal, or very rare form of pleomorphic rhabdomyosarcoma in the comparison with samples of different types of mesenchymal tumors or muscle tissue without presence of a tumor.

Analysis of the results pointed out statistically significant differences in the levels of expression in individual myomiRs (most significant are miR-206 and miR-133b) by RMS, in comparison with control samples, or different levels of expression in terms of different subtypes of RMS. The results of my work could have an impact on candidature of these muscle-specific microRNAs as a potential diagnostic or prognostic markers in pathogenesis of rhabdomyosarcoma.

Key words: rhabdomyosarcoma, microRNA, myomiRs, RQ-RT-PCR, gene expression

Obsah

Zoznam skratiek.....	8
1. Literárny prehľad.....	9
1.1 Rabdomyosarkómy.....	9
1.1.1 Všeobecná charakteristika RMS.....	9
1.1.2 Epidemiológia.....	10
1.1.3 Etiológia.....	11
1.1.4 Histológia RMS.....	11
1.1.5 Fúzne gény PAX3-FKHR a PAX7-FKHR.....	17
1.1.6 Základ súčasného stavu prognózy a liečby RMS.....	18
1.2 MikroRNA.....	21
1.2.1 Všeobecná charakteristika miRNA.....	21
1.2.2 Distribúcia miRNA génov v ľudskom genóme.....	24
1.2.3 Biogenéza miRNA.....	26
1.2.4 Svalovo-špecifické miRNA.....	28
1.3 Kvantitatívna reverzná PCR v reálnom čase (RQ-RT-PCR).....	32
1.3.1 Základná charakteristika.....	32
1.3.2 TaqMan assay pre RQ-RT-PCR.....	33
1.3.3 Metodika RQ-RT-PCR.....	35
2. Ciele.....	37
3. Materiály.....	38
3.1 Pacienti.....	38
3.2 Roztoky a chemikálie.....	41
3.2.1 Roztoky a chemikálie, použité v postupoch izolácie nukleových kyselín.....	41
3.2.2 Roztoky a chemikálie, použité v postupe reverznej transkripcie.....	43
3.2.3 Roztoky a chemikálie, použité v postupe kvantitatívnej PCR v reálnom čase.....	43
3.2.4 Primery.....	44
3.3 Laboratórna technika.....	44
4. Metodika.....	45

4.1 Izolácia miRNA.....	45
4.2 Reverzná transkripcia.....	50
4.3 MikroRNA kvantifikácia.....	53
4.4 Analýza reakcie.....	54
4.4.1 Analýza pomocou sotvéru.....	54
4.4.2 Koncept Ct hodnoty.....	55
5. Výsledky.....	56
5.1 Ambion kit versus Norgen kit.....	56
5.2 FFPE /zmrazené vzorky tkanív.....	57
5.3 Štatistické vyhodnotenie hladín expresie špecifických myomiRs.....	57
5.3.1 Všeobecné zhrnutie expresie myomiRs.....	59
5.3.2 Porovnanie expresie myomiRs pri RMS, mezenchymálnych nádoroch a svalovom tkanive.....	61
5.3.3 Porovnanie expresie myomiRs pri RMS oproti svalovému tkanivu.....	63
5.3.4 Porovnanie expresie myomiRs pri aRMS oproti svalovému tkanivu.....	65
5.3.5 Porovnanie expresie myomiRs pri eRMS oproti svalovému tkanivu.....	67
5.3.6 Porovnanie expresie myomiRs pri aRMS a eRMS	69
5.3.7 Porovnanie expresie myomiRs v RMS oproti svalovému tkanivu.....	71
5.3.8 Porovnanie expresie myomiRs pri aRMS PAX+ a aRMS PAX-.....	73
5.3.9 Porovnanie expresie myomiRs pri RMS, mezenchymálnych nádoroch a svalovom tkanive.....	75
5.3.10 Porovnanie expresie myomiRs v prípadoch prežívších a zomrelých pacientov	78
6. Diskusia.....	81
6.1 Ambion kit versus Norgen kit	81
6.2 FFPE / zmrazené vzorky tkanív.....	82
6.3 Vyhodnotenie hladín expresie špecifických myomiRs v rôznych typoch vzoriek.....	84
7. Súhrn.....	87
8. Zoznam použitej literatúry.....	88

Zoznam skratiek

AGO	proteín rodiny Argonaut
aRMS	alveolárny typ rabdomyosarkómu
cDNA	komplementárna DNA
C _t	prahový cyklus (<i>threshold cycle</i>)
eRMS	embryonálny typ rabdomyosarkómu
FFPE	tkanivo zaliate v parafíne, fixované formalínom (<i>formalin-fixed paraffine-embedded</i>)
<i>FKHR</i> gén	<i>forkhead homolog rhabdomyosarcoma gene</i>
<i>HOX</i> gény	homeotické gény
MRFs	myogénne regulačné faktory (<i>Myogenic Regulatory Factors</i>)
mRNA	mediátorová RNA
miRISC	<i>miRNA-induced-silencing complex</i>
miRNA (miR)	mikroRNA
myomiRs	svalovo-špecifické mikroRNA (<i>muscle+microRNA</i>)
NK	nukleová kyselina
<i>PAX3</i> gén	<i>paired box gene 3</i>
<i>PAX7</i> gén	<i>paired box gene 7</i>
PCR	polymerázová reťazová reakcia
pre-miRNA	prekurzorová mikroRNA
pRMS	pleomorfný typ rabdomyosarkómu
RMS	rabdomyosarkómy
RQ-RT-PCR	kvantitatívna reverzná PCR v reálnom čase
RT	reverzná transkripcia
SRF	faktor sérovej odpovede (<i>Serum Response Factor</i>)
ssRMS	vretenobunkový-sklerozujúci typ rabdomyosarkómu
UTR	neprekladaný región (<i>untranslated region</i>)

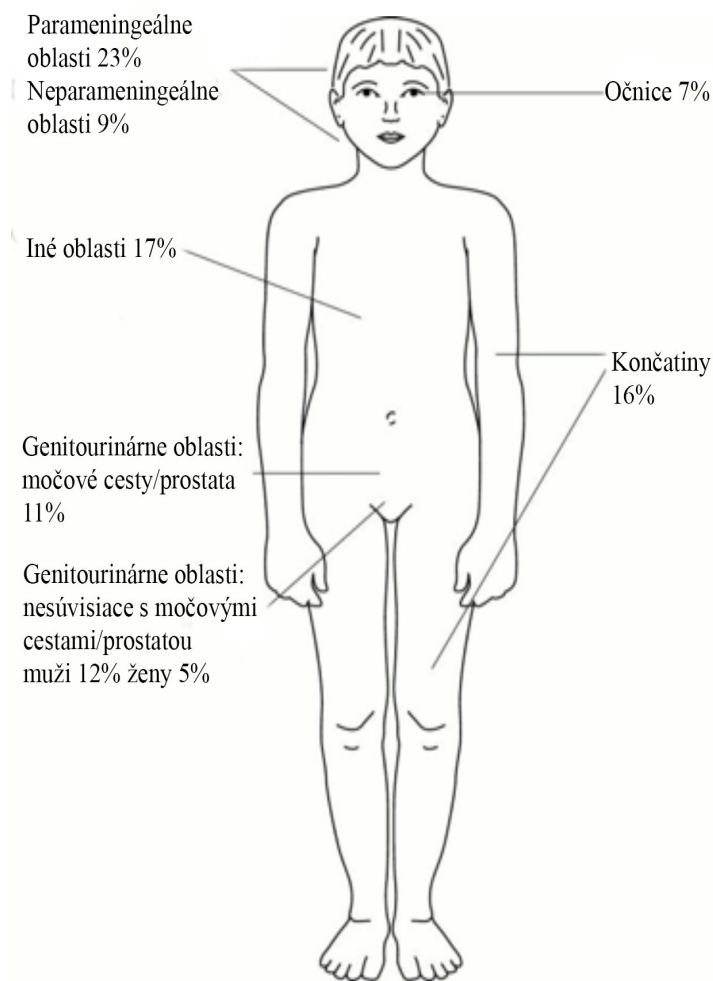
1. Literárny prehľad

1.1 Rabdomyosarkómy

1.1.1 Všeobecná charakteristika RMS

Rabdomyosarkómy (RMS) sú definované ako malígne nádory mezenchymálneho pôvodu. Spôsobujú približne 5 % rakovinových ochorení u pediatrických pacientov a sú príčinou asi polovice výskytu sarkómov hladkých tkanív všeobecne. U detí aj dospelých je to tretia najčastejšia príčina vzniku extrakraniálneho malígneho tumoru. Štatisticky vo výskyte rabdomyosarkómov bola pozorovaná mierna prevaha u chlapcov (oproti dievčatám približne 1,4:1) (Merlino a Helman, 1999). Približne dve tretiny prípadov sú diagnostikované detským pacientom mladším ako 6 rokov (Egas-Bejar a Huh, 2014), pričom incidencia je pri RMS najvyššia u detí vo veku 1-4 roky, mierne klesá pri 10-14 ročných a zostáva ustálená pri 15-19 ročných adolescentoch. Najbežnejšie miesta vzniku tumoru pri rabdomyosarkómoch zahŕňajú oblasti hlavy a krku, genitourinálne oblasti či končatiny (Obr. 1) (McDowell, 2003).

U dospelých sa rabdomyosarkómy vyskytujú s veľmi nízkou frekvenciou. Všeobecne sarkómy mäkkých tkanív tvoria približne len 1 % všetkých pevných malignít u dospelých, pričom rabdomyosarkómy z toho predstavujú iba 3 % z týchto sarkómov. Tieto štatistiky vychádzajú okrem iného aj zo štúdie od Weiss a Goldblum, či skupiny Ferrari a kol., v ktorej sa pracuje so vzorkami 190 pacientov s rôznymi diagnostikovanými podtypmi rabdomyosarkómov, starších 18 rokov (Weiss a Goldblum, 2001; Ferrari a kol, 2003; Egas-Bejar a Huh, 2014).



Obr. 1 Najbežnejšie miesta vzniku primárneho tumoru u RMS (upravené podľa McDowell, 2001).

1.1.2 Epidemiológia

Epidemiológia primárneho nádoru je prirodzene závislá od histologického podtypu a veku pacienta, čo je napríklad typické pri adolescentoch s výrazne vyšším výskytom alveolárneho podtypu RMS oproti mladším pacientom. Viac ako polovica prípadov je diagnostikovaná pred 5. rokom života (Egas-Bejar a Huh, 2014). Symptómy a typické

znaky ochorenia sú závislé od primárneho výskytu nádoru, rozsahu zasiahnutia orgánov či prítomnosti metastáz. Vo všeobecnosti sa však RMS často vyskytuje bez špecifických príznakov a s minimom rozpoznateľných symptómov (McDowell, 2003).

Najčastejšie sa vyskytujúce histologické podtypy u detí a dospelých sú embryonálne rabdomyosarkómy (eRMS) a alveolárne rabdomyosarkómy (aRMS). ERMS vznikajú prevažne v oblasti hlavy, krku či v genitourinálnej oblasti a vyskytujú sa výrazne častejšie (75 %) ako alveolárne rabdomyosarkómy s incidenciou najvyššou u detí vo veku do štyroch rokov. Alveolárny typ RMS sa zvykne vyskytovať v rozsiahlejšom vekovom období a nádory sa objavujú na rôznych častiach tela, najčastejšie však postihujú končatiny (McDowell, 2003).

1.1.3 Etiológia

Rabdomyosarkómy majú vo výraznej väčšine prípadov primárne sporadický výskyt, no spájajú sa aj s viacerými genetickými syndrómami. Jedna štúdia napríklad dokladá, že až 30 % detských pacientov s rabdomyosarkómom má kongenitálnu anomáliu s najčastejším postihnutím gastrointestinálneho systému. Čo sa týka genetických syndrémov s familiárnou dedičnosťou, RMS sa viaže hlavne s Li-Fraumeniho syndrómom, pre ktorý je typická zárodočná mutácia génu *TP53* a častejší výskyt rôznych typov nádorov, vrátane rabdomyosarkómu. Ďalej sa RMS občas tiež spája s genetickými syndrómami ako neurofibromatózou typu I, Rubinstein-Taybiho syndrómom, či Beckwith-Wiedemannovým syndrómom (Egas-Bejar a Huh, 2014).

1.1.4 Histológia RMS

Na molekulárnej úrovni rabdomyosarkómy tvoria heterogénnu skupinu nádorov mäkkých tkanív, ktorá sa na základe klinickopatologických vlastností delí do viacerých podskupín, založených na rôznom genetickom základe či na diferentných morfológických

znakoch buniek, ktoré v polovici 20. storočia popísali pomocou pozorovaní svetelným mikroskopom Horn a Enterline a rozdelili rabdomyosarkómy na embryonálny, alveolárny, botryoidný a pleomorfný podtyp. Súčasnejšie štúdie rozlišujú diferenciaciu podtypov na základe ešte trochu komplexnejších znakov ako sú vretenovité bunky, či prognosticky neprajný anaplastický typ rabdomyosarkómu (Parham, 2001).

Pôvodná bunka, ktorá dáva za vznik rabdomyosarkómu nie je jednoznačne uzavretou otázkou. Za kandidátov sa považujú svalové kmeňové bunky či multipotentné mezenchymálne kmeňové bunky (Egas-Bejar a Huh, 2014). Vo viacerých prípadoch však histológia rabdomyosarkómov analogicky pripomína myogézu vo vyvíjajúcom sa embryu, čo nahráva možnosti odvodu RMS práve od primitívnych mezenchymálnych buniek (Parham, 2001).

Všeobecne sa bunky rabdomyosarkómov histologicky definujú ako malé, okrúhle, modré bunky, ktoré však nájdeme aj xpri identifikácii iných malignít, ako lymfómy, neuroblastóm, Ewingov sarkóm či primitívne neuroektodermálne tumory (Egas-Bejar a Huh, 2014).

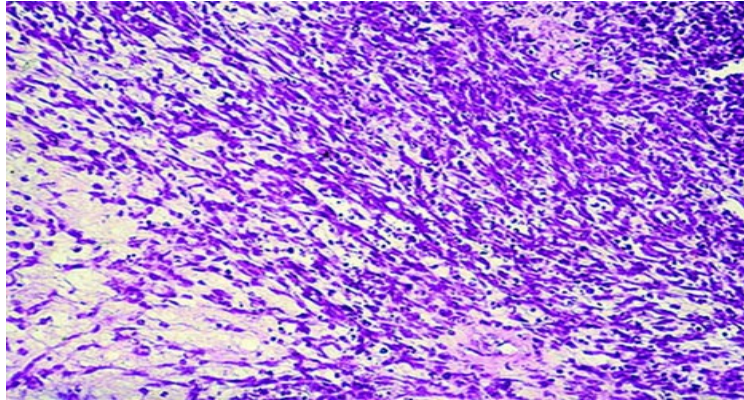
Základné histologické delenie rabdomyosarkómov je ustálené do štyroch hlavných skupín:

- embryonálny typ rabdomyosarkómov
- pleomorfný typ rabdomyosarkómov
- alveolárny typ rabdomyosarkómov
- vretenobunkový-sklerozujúci typ rabdomyosarkómov

Embryonálny typ RMS

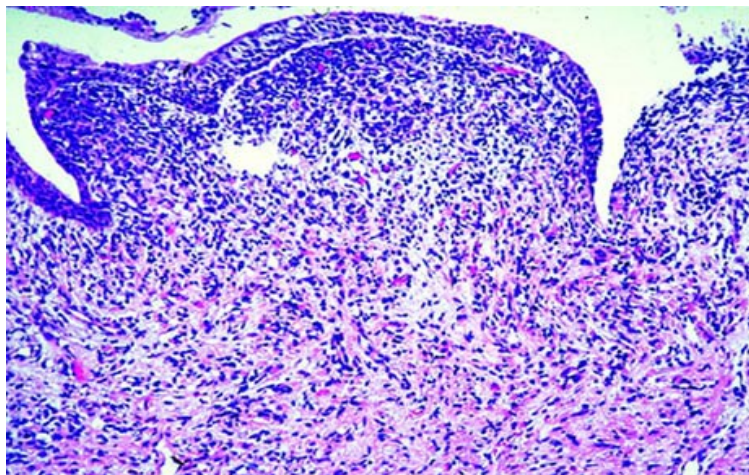
Embryonálny typ rabdomyosarkómu (eRMS) je najčastejšie sa vyskytujúcim podtypom RMS, predstavuje asi 70 % výskytu rabdomyosarkómov u detí (Egas-Bejar a Huh, 2014). Typicky sa objavuje vo veku 0-4 rokov. Medzi základné histologické znaky patrí strata bunkovej celistvosti a nápadne akoby rekapituluje normálnu embryonálnu

myogézu, keď somity začínajú formovať nascentný sval. ERMS sa klasicky objavuje hlavne v genitourinárnom trakte, oblastiach hlavy a krku či trupu (Merlino a Helman, 1999).



Obr. 2 Základný embryonálny podtyp RMS (Parham, 2001).

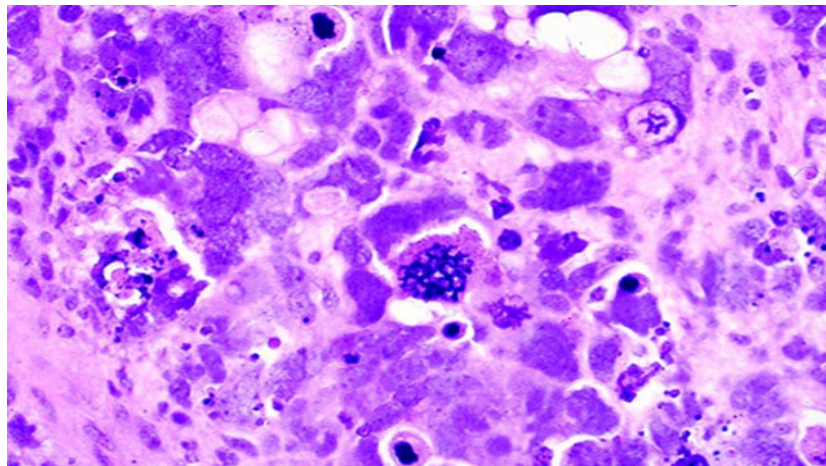
Pod eRMS spadá aj prvý pozorovaný typ rabdomyosarkómov, a to botryoidný podtyp. Často polyploidné lézie pripomínajú strapce hrozna odkiaľ pochádza názov (z gréčtiny *botryos*). Tieto lézie často hraničia s epiteliálnym povrchom močového mechúra, žlčovodu či vagíny (Parham, 2001). Tumory postihujú takmer výhradne močový mechúr či vagínu pediatrických pacientov (Merlino a Helman, 1999).



Obr. 3 Botryoidný typ eRMS. Neoplázia malých buniek, dotýkajúcich sa epiteliálneho povrchu. (Parham, 2001).

Pleomorfný typ RMS

Pleomorfný typ rabdomyosarkómu (pRMS) sa vyskytuje takmer výhradne v mäkkých tkanivách dospelých vo veku 30 až 50 rokov. Postihuje hlavne končatiny a má značne agresívnu formu, bohužiaľ k podrobnejším štúdiám chýbajú dáta nakoľko táto forma RMS je skôr výnimočná (Egas-Bejar a Huh, 2014). PRMS tvoria zhluky anaplastických viacjadrových buniek s veľkými, hyperchromatickými jadrami (Merlino a Helman, 1999).

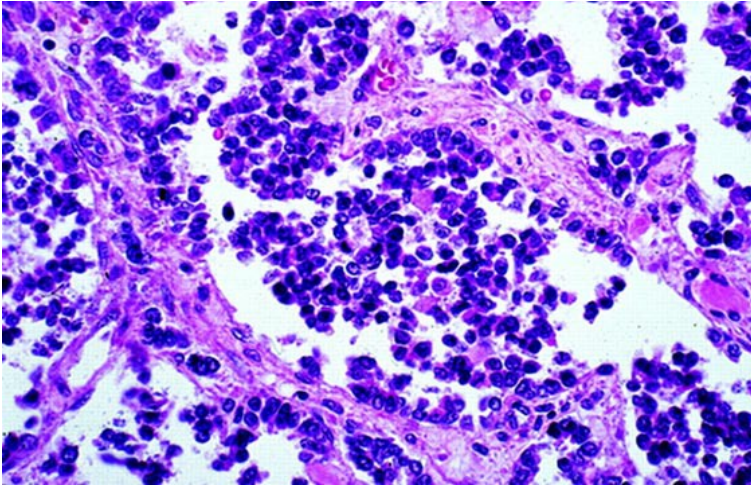


Obr. 4 Pleomorfný typ RMS (Parham, 2001).

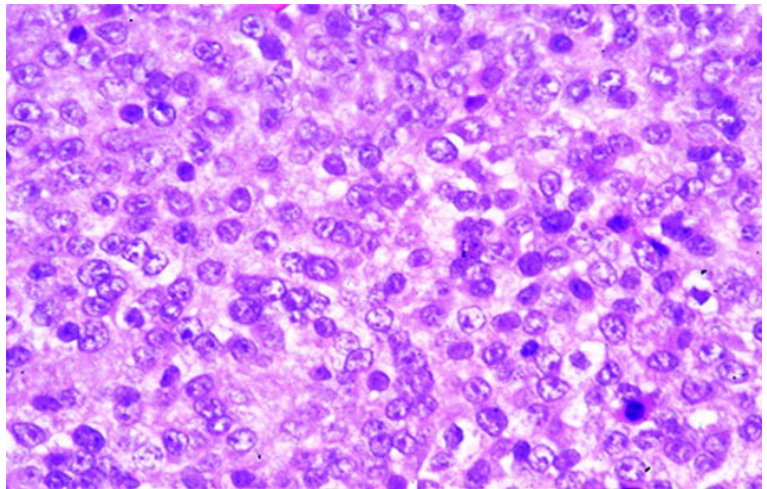
Alveolárny typ RMS

Alveolárne rabdomyosarkómy (aRMS) tvoria asi 20 % výskytu rabdomyosarkómov. Prognosticky sú menej priaznivé, typickejšie pre dospievajúce deti až adolescentov. Primárne miesta vzniku tumoru zahrňujú končatiny, trup či perianálnu oblasť. Vyznačujú sa husto naskladanými, malými, guľatými bunkami. Diagnosticky typickou je mikroskopicky viditeľná alveolárna štruktúra, kedy sa bunky zoskupujú okolo určitých útvarov z kolagénneho fibrovaskulárneho tkaniva, pripomínajúcich pľúcne alveoly. Taktiež boli opísané miesta solídnych oblastí, pripomínajúce lymfómy, čo dalo za vznik solídneho podtypu aRMS (Parham, 2001).

A)



B)



Obr. 5 Alveolárny typ rabdomyosarkómu: A) klasický, diagnosticky typický aRMS; B) solidný typ aRMS (Parham, 2001).

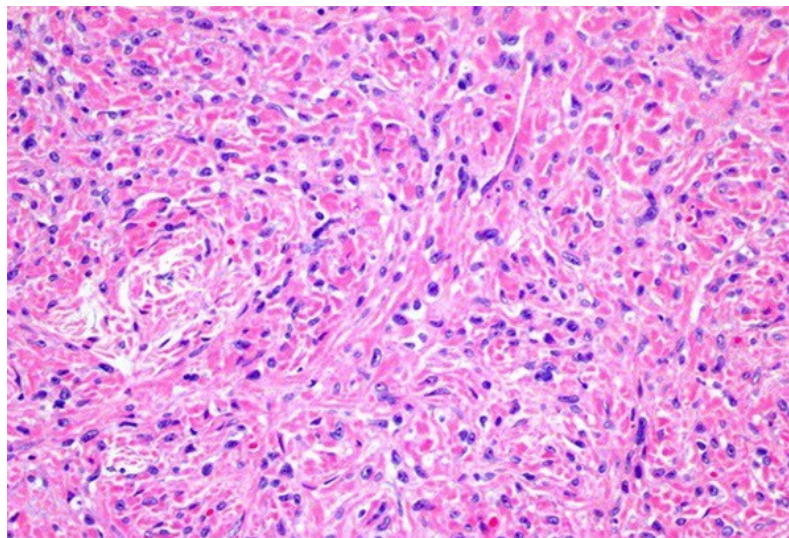
Vretenobunkový-sklerozujúci typ RMS

Vretenobunkový-sklerozujúci typ rabdomyosarkómov (ssRMS) je pomerne vysoko vzácnou variantou nádorov mäkkých tkanív. Prvýkrát bol v literatúre samostatne vymedzený až v roku 2002, v štúdiu od Folpe a kol., ako sklovitý typ sarkómu s nadmerným obsahom matrix, pripomínajúci osteosarkóm či chondrosarkóm (Folpe a kol, 2002). Štatisticky tvorí 5-10 % všetkých diagnostikovaných prípadov RMS, pričom u

mužov sa vyskytuje výrazne častejšie (oproti ženám približne v pomere 6:1). Objavuje sa ako u detských pacientov tak u dospelých, líši sa však v mieste vzniku primárneho nádoru. U detí je to prednostne v paratestikulárnej oblasti, u dospelých prioritne v oblasti hlavy a krku (Nascimento a Barr, 2013).

Histopatologicky je ssRMS diagnostikovaný na základe vretenovitých buniek, často zoskupených do zväzkov, s elipsoidnými alebo natiahnutými jadrami a maličkými jadierkami (Nascimento a Barr, 2013). Bunky bývajú často usporiadané pomedzi husto naskladané kolagénové vlákna (Carroll a Nodit, 2013).

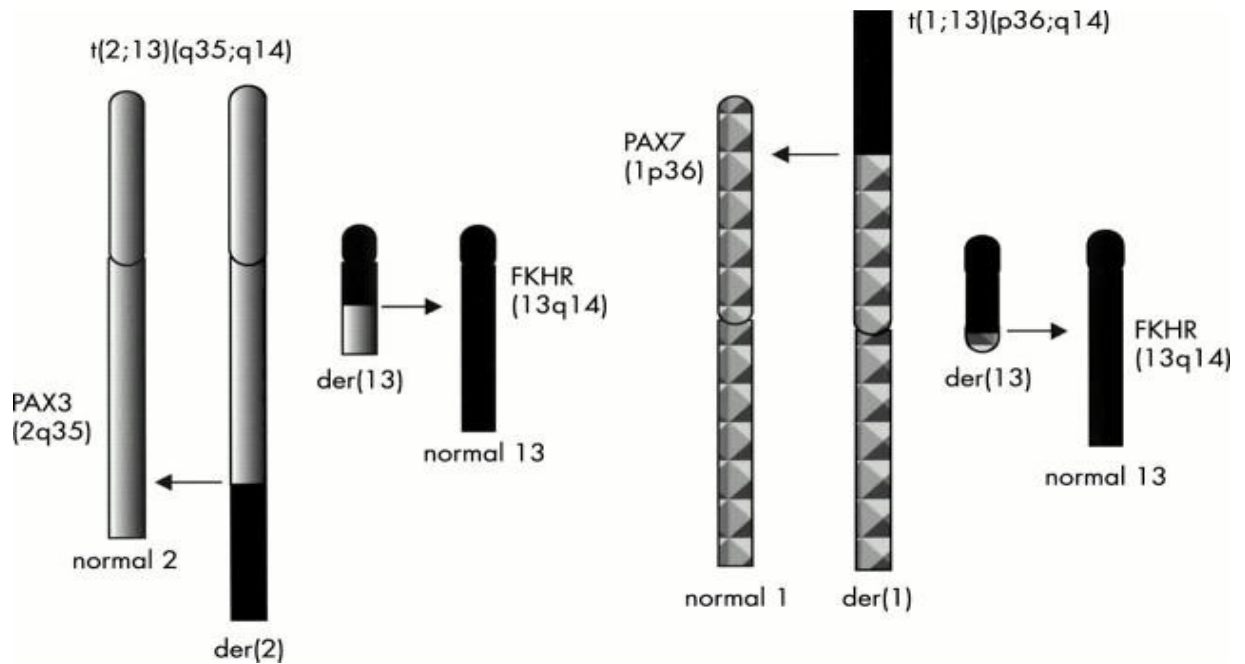
Čo sa týka prognózy, u dospelých pacientov je podstatne horšia s pomerne častým výskytom metastáz (40-50 %) oproti pacientom detského veku, u ktorých je miera prežitia viac ako 5 rokov štatisticky až 95 % (Nascimento a Barr, 2013). Podobne ako u eRMS, ani u ssRMS nebol zatiaľ pozorovaný žiaden typický genetický "podpis" či vhodný diagnostický marker (Carroll a Nodit, 2013).



Obr. 6 Vretenobunkový-sklerozujúci typ RMS (Chen a kol, 2015).

1.1.5 Fúzne gény *PAX3-FKHR* a *PAX7-FKHR*

Alveolárny podtyp rabdomyosarkómov býva často typický výskytom dvoch špecifických chromozomálnych prestavieb, čo však taktiež pri správnej diagnostike nie je pravidlom. Sú to translokácie dvoch *PAX* génov, *PAX3* – lokalizovaný na chromozóme 2 a *PAX7* – lokalizovaný na chromozóme 1. Translokácia génu *PAX3*, t(2;13)(q35;q14), sa vyskytuje pri asi 55 % prípadov aRMS, zatiaľ čo translokácia *PAX7*, t(1;13)(p36;q14) pri asi 22 % (Obr. 7) (Sorensen a kol, 2002). Gény *PAX3* a *PAX7* zohrávajú dôležitú úlohu vo vývoji svalstva počas embryogenézy, kedy z kondenzovanej mezodermy vznikajú somity, z ktorých sa následne vyvíja kostrové svalstvo. Narušenie prirodzenej funkcie týchto génov teda môže vyústiť do abnormálneho vývoja svalstva (McDowell, 2003). Väzbou medzi DNA viažucou doménou narušených génov *PAX3* a *PAX7* a transaktivačnou doménou génu *FKHR*, lokalizovanom na chromozóme 13, vznikajú fúzne gény *PAX3-FKHR* a *PAX7-FKHR*, ktoré sú exprimované ako chimérické transkripty, kódujúce chimérické proteíny, ktoré aktivujú transkripciu z viažucich domén *PAX* génov s vyššou potenciou oproti prirodzenému stavu a v konečnom dôsledku podporujú nádorovú aktivitu s výrazným vplyvom na rast nádorových buniek, apoptózu, diferenciáciu či pohyb buniek (Barr, 2001). Prognostické analýzy preukázali, že fúzny gén *PAX3-FKHR* je asociovaný s horšou prognózou oproti *PAX7-FKHR*. Oba fúzne gény slúžia ako špecifické a senzitivne prostriedky pre sledovanie minimálnej diseminovanej choroby, či pozorovanie infiltrácie nádorovými bunkami RMS. Približne pri 75-80 % prípadov aRMS fungujú ako unikátne diagnostické markery, no je akútne nájst' spoľahlivý marker aj pri fúzne negatívnych prípadoch aRMS. Čo sa týka embryonálneho podtypu RMS, žiaden špecifický marker zatiaľ identifikovaný nebol (McDowell, 2003).



Obr. 7 Vyobrazenie balansovaných chromozomálnych translokácií, z ktorých vznikajú fúzne gény *PAX3-FKHR* a *PAX7-FKHR* (McDowell, 2003).

1.1.6 Základ súčasného stavu prognózy a liečby RMS

Pri RMS je zavedený systém TNM (*Tumor-Nodes-Metastasis*), ktorý posudzuje celkové štádium a prognózu ochorenia na základe primárneho miesta výskytu a veľkosti nádoru, zasiahnutia príahľých orgánov a lymfatických uzlín, či prítomnosti vzdialených metastáz (Merlino a Helman, 1999). Tento systém je však spoľahlivejší hlavne čo sa týka dospelých, u pediatrických pacientov je často potreba komplexnejší systém stratifikácie (Egas-Bejar a Huh, 2014). Čo sa týka liečby RMS, za posledné dekády sa neustále zlepšujú, rozširujú a vyvíjajú nové postupy a metódy a prebiehajú klinické štúdie na rôznych princípoch za účelom zvyšovať celkový priemer prežitia pacientov. Hlavnými aktérmi štúdií, testov a zostavovania liečebných protokolov sú medzinárodné skupiny ako

americká IRS (*Intergroup Rhabdomyosarcoma*), či európska SIOP (*International Society of Paediatric Oncology*), ku ktorej sa koncom osemdesiatych rokov pripojila *The Soft Tissue Sarcoma Group*. SIOP aj IRS pracujú samostatne na dvoch rozdielnych liečebných protokoloch. Zatiaľ čo IRS navrhuje okamžité agresívne operatívne odstránenie nádoru a následnú rádioterapiu, SIOP určuje chemoterapiu a čo najlepšie zmiernenie stavu pacienta pred operáciou a rádioterapiou. Protokoly sú vytvárané na základe stupňa troch hlavných kritérií stavu nádoru: (1) miesto primárneho tumoru, (2) štádium ochorenia, rozsah postihnutia/napadnutia orgánov, prípadný výskyt metastáz, (3) histologický podtyp RMS (McDowell, 2003). Rýchla a správna diagnostika, prioritne na základe morfológických vlastností a klasifikácií, je samozrejme kľúčová pri stratifikácii pacientov, prognóze, či liečbe z hľadiska progostického či terapeutického.

Čo sa týka Českej republiky, pacienti s diagnostikovaným typom rhabdomyosarkómu sa liečia podľa oficiálneho medzinárodného protokolu EpSSG RMS 2005 (*European Paediatric Soft tissue sarcoma Study Group*) s najnovšou verziou 1.2, vydanou v júly 2008.

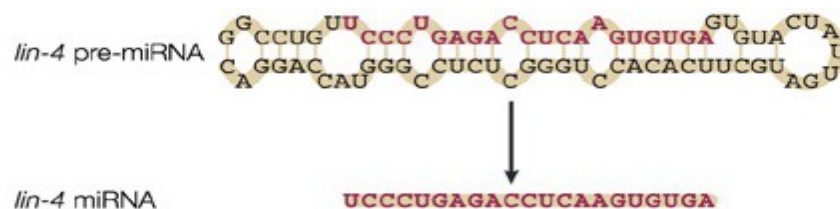
1.2 MikroRNA

1.2.1 Všeobecná charakteristika miRNA

MikroRNA (miRNA) sú malé, jednovláknové, spravidla 18 až 24 nukleotidov dlhé, evolučne vysoko konzervované nekódujúce regulačné molekuly RNA, endogénneho pôvodu. Nájdené boli ako u živočíchov, tak rastlín, s podstatnou funkciou v podobe regulátora génovej expresie na post-transkripčnej úrovni, ústiac až v represiu translácie cieľových mRNA molekúl či v ich degradáciu (Bartel, 2004). Prítomnosť génov pre miRNA bola tiež preukázaná aj v niektorých väčších DNA vírusoch, ako Vírus Epstein-

Barrovej, Herpesvírus HHV-8, či ľudský cytomegalovírus (Kim a Nam, 2006). Mierou expresie sa preukazujú tiež ako tkanivovo-špecifické či viazané na štádium vývoja ako dôležité regulátori viacerých fyziologických procesov, od základných ciest bunkovej diferenciácie, vývoja, proliferácie po kontrolu bunkovej smrti (Mendell, 2005). Podieľajú sa tiež na regulácii unikátnych vlastností kmeňových buniek, imunitného systému či patologických procesov v podobe nádorovej transformácie (Slabý, 2012). Negatívne regulujú cieľové molekuly, závisiac od stupňa ich komplementarity s touto molekulou (Esquela-Kerscher & Slack, 2006).

Týmom Victora Ambrosa bola v roku 1993 objavená a popísaná prvá mikroRNA, tzv. *lin-4*, pričom mutácia v tejto 21 nukleotidov dlhej RNA molekule zapríčinila defekty vo vývoji modelového organizmu *Caenorhabditis elegans* (Obr. 8). Bolo totiž objavené, že gén, kontrolujúci správny larválny vývoj namiesto kódovania proteínu produkuje pár určitých malých molekúl RNA, pričom tá dlhšia sa ukázala byť prekuzom kratšej a disponovali antisense komplementaritou k viacerým miestam na 3'UTR konci mRNA určitého génu, čím tlmila jeho transláciu (Lee a kol., 1993; Wightman a kol., 1993).



Obr. 8 Prekuzorová (pre-miRNA) a maturovaná (miRNA) štruktúra *lin-4* u *Caenorhabditis elegans*.

Historicky prvá objavená a popísaná mikroRNA (He a Hannon, 2004).

Po zistení, že tieto krátke molekuly RNA sú evolučne konzervované, bolo v priebehu niekoľkých rokov objavených mnoho ďalších mikroRNA, vrátane rastlinných a rôznych živočíšnych organizmov, pomocou techník klonovania a zásahov bioinformatiky. Tieto štúdie úspešne preukázali, že niektoré miRNA sú exprimované výhradne len v špecifických tkanivách organizmu (Lagos-Quintana a kol., 2001). V roku 2004 bola táto štúdia ešte viac rozvinutá, kedy Sempere a kol. pomocou techniky Northern blott analyzovali 119 rôznych miRNA z ľudských a myších orgánov ako pľúca, mozok, pečeň či kostrové svalstvo, pričom vyzdvihli konzervatívnosť a tkanivovú-špecificitu expresie mikroRNA (Sempere a kol., 2004). Len u ľudí už dnes bolo identifikovaných viac ako 1 500 maturovaných, vysoko konzervovaných miRNA, veľká väčšina pritom stále s neznámou funkciou. Celkový prehľad ponúka databáza miRBASE (<http://www.mirbase.org/>), s informáciami o nukleotidovej sekvencii, zaradení do rodiny, základnej anotácie, či referencií.

MikroRNA sa zúčastňujú viacerých významných procesov, vrátane posttranskripčnej regulácie génovej expresie na základe mRNA degradácie, inhibície translácie či génového utišovania (*silencing*) na chromatinovej úrovni, ústiac do biologických procesov ako apoptóza, bunková proliferácia či diferenciácia. Vo viacerých štúdiách pri rôznych typoch nádorov bola pozorovaná ich úloha v podobe onkogénu či nádorového supresoru, kedy tieto molekuly vykazujú potenciálnu úlohu vo forme diagnostického či prognostického markera, čo predstavuje možnú významnú úlohu v podobe cieľov antikancerogénnej liečby. Ako dôležité regulátory génovej expresie kontrolujú fyziologické aj patologické procesy v bunke ako jej vývoj či vznik nádorového ochorenia.

V posledných rokoch sa hlavná otázka sústreďí na funkciu týchto malých nekódujúcich RNA molekúl v procesoch patogenézy rôznych druhov nádorov. Je známe, že bunky majú svojich takzvaných „ochrancov“ v procesoch delenia, diferenciácie či správnej ceste bunkovej smrti, ktorými sú nádorové-supresorové gény, či podstatné funkcie protoonkogénov. Chyba v týchto génoch prevažne vedie k vzniku rakoviny, pričom mnoho z týchto génov je prepisovaných najprv z DNA do RNA, následne na proteín, až potom uskutočňujú svoj účinok. Otázka ohľadom miRNA v rakovinových procesoch sa často sústreďí na ich formu v podobe nádorových supresorov či onkogénov, dúfajúc v ich možné

využitie v diagnostike či liečbe rakovinových ochorení (Esquela-Kerscher and Slack, 2006).

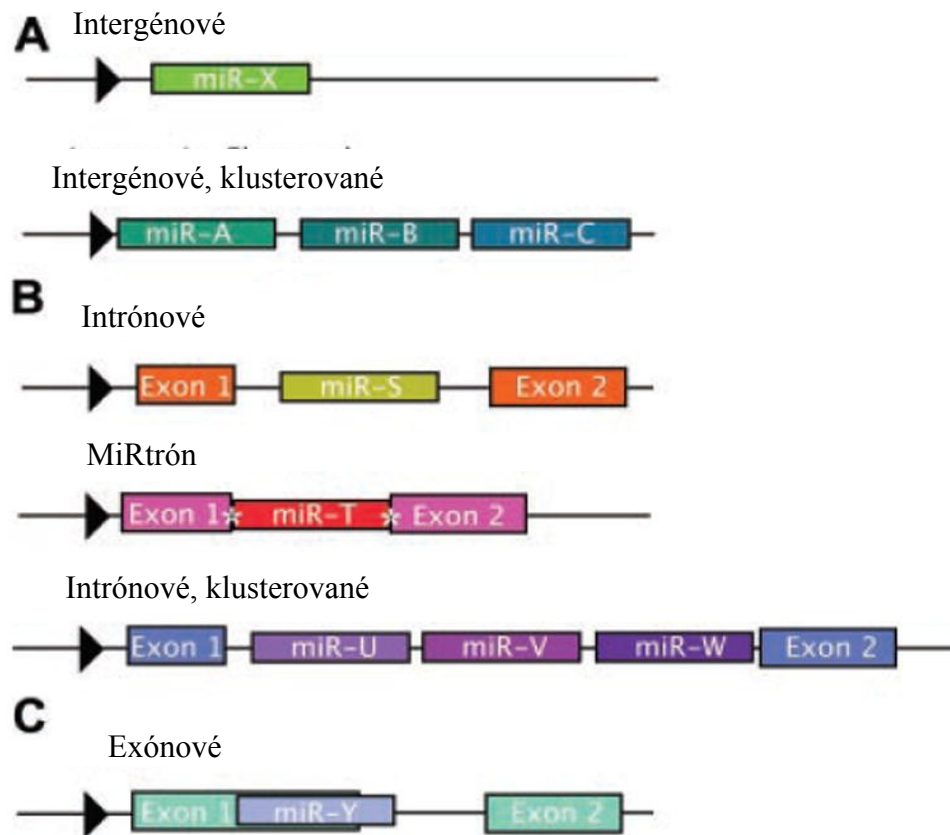
MikroRNA prirodzene regulujú mnoho rôznych biologických procesov, vrátane bunkovej proliferácie, diferenciácie, apoptózy. Vďaka bioinformatickým dátam sa ukazuje, že pravdepodobne každá miRNA kontroluje stovky génových cieľov, čím sa prejavuje veľký vplyv miRNA v takmer každej genetickej dráhe. Kvôli tejto vlastnosti však bolo preukázané, že mutácie či mis-exprimované miRNA súvisia s viacerými rôznymi typmi rakovinových ochorení u človeka, pričom, ako bolo spomenuté, miRNA fungujú v podobe nádorových-supresorových génov, no tiež onkogénov. Takéto miRNA, asociované so vznikom rakoviny, zvyknú byť nazývané ako „oncomirs“. Viac ako polovica už známych miRNA bola lokalizovaná vo fragilných miestach chromózomov, čo sú tiež miesta, často asociovaná so vznikom rôznych rakovinových ochorení človeka. Profilovanie expisie miRNA a zaznamenanie rozdielnych expisí v nádoroch sa preto momentálne ukazuje ako perspektívnejšie pre klasifikáciu subtypov rakoviny v porovnaní s expresnými profilmi génov, kódujúcich proteíny a možná cesta pomoci pri diagnóze alebo liečbe týchto ochorení (Esquela-Kerscher a Slack, 2006).

Ako bolo spomenuté, mikroRNA sú negatívnymi regulátormi viacerých procesov v bunkách, pričom tento vplyv závisí na stupni komplementarity medzi určitou molekulou miRNA a jej cieľom. V prvom prípade sa miRNA viaže na základe komplementarity na sekvenciu proteín-kódujúcej molekuly mRNA, čo indukuje RNA-sprostredkovanú dráhu interferencie (RNAi), na základe čoho sú mRNA transkripty štiepené ribonukleázami v multiproteínovom komplexe miRISC (*miRNA-induced-silencing complex*) s naviazanou miRNA, čo má za následok degradáciu cieľovej mRNA. Tento mechanizmus génového utišovania (*silencing*) sa vyskytuje prevažne u rastlín (Tang a kol., 2003; Esquela-Kerscher a Slack, 2006). Pozorovaný bol aj u niekoľkých prípadoch živočíchov, napríklad čo sa týka práce Yekta a kol. a niektorých HOX génov cicavcov, no nie je u nich prevažujúcim mechanizmom génovej regulácie pomocou miRNA (Yekta a kol., 2004). U živočíchov sa miRNA viaže na 3'UTR neprekladaný región (*untranslated region*), špecifické miesto na cieľovej mRNA. Táto väzba u živočíchov prebieha aj s neúplnou komplementaritou. Výsledkom je posttranskripčná represia expisie, pričom proces prebieha pomocou komplexu RISC, veľmi podobnému komplexu, fungujúcemu pri

utišovaní génov (Lee a kol., 1993; Esquela-Kerscher a Slack, 2006). Cieľom tohto mechanizmu sú redukované hladiny proteínov vybraných génov, no množstvo mRNA sa v zásade nemení. Aj keď niektoré štúdie na základe experimentov s miRNA popísali indukovanú degradáciu cieľových mRNA, doteraz nebol dokázaný presný priebeh (Bagga a kol., 2005; Esquela-Kerscher a Slack, 2006).

1.2.2 Distribúcia miRNA génov v ľudskom genóme

Génom pre miRNA je akási unikátna génová jednotka, nachádzajúca sa v medzigénovej oblasti. Na základe širokého spektra analýz bolo vyhodnotené, že podstatná väčšina medzigénových miRNA má primárne transkripty s dĺžkou približne 3 až 4 kb, má presne definované štartovacie nukleotidy, poly(A) signál a jasne vymedzené 5' a 3' konce transkriptu (Olena a Patton, 2010). Gény pre miRNA sú v ľudskom genóme rozmiestnené na všetkých chromozómoch, okrem chromozómu Y. Medzigénové miRNA sa môžu vyskytovať v genóme ako monocistronické s vlastným promótorom, či polycistronické. Približne 50 % miRNA je v genóme umiestnených v podobe klastrov. U človeka je dnes známych 55 takýchto klastrov. Prepisované sú ako polycistronické primárne transkripty. MiRNA v jednom klastre bývajú často spriaznené, čo vysvetľuje vznik klastrov pravdepodobne pomocou génovej duplikácie. (Kim a Nam, 2006). Ďalšou možnosťou výskytu génov pre miRNA v genóme sú tzv. intrónové miRNA. Nachádzajú sa v intrónových oblastiach kódujúcich génov, či génov pre dlhé nekódujúce RNA, samostatne alebo v klastroch. Špecifickým prípadom výskytu miRNA génov sú takzvané miRtróny, kedy príslušný intrón priamo zodpovedá sekvencii pre-miRNA, má zostrihové miesta na oboch koncoch a nepotrebuje k maturácii *Drosha-Pasha* procesorový komplex, popísaný neskôr, pri biogenéze mikroRNA. Výnimočne sa vyskytujú aj exónové miRNA, prevažne na prechode exónu a intrónu v géne pre nekódujúcu RNA (Obr. 9). Špeciálne organizované v genóme stavovcov sú aj miRNA asociované s klastrami HOX génov. Známa genomická lokalizácia a štruktúra miRNA môže byť naozaj nápomocná pri podrobnejšom skúmaní biogenézy či funkcií špecifických druhov miRNA (Olena a Patton, 2010).



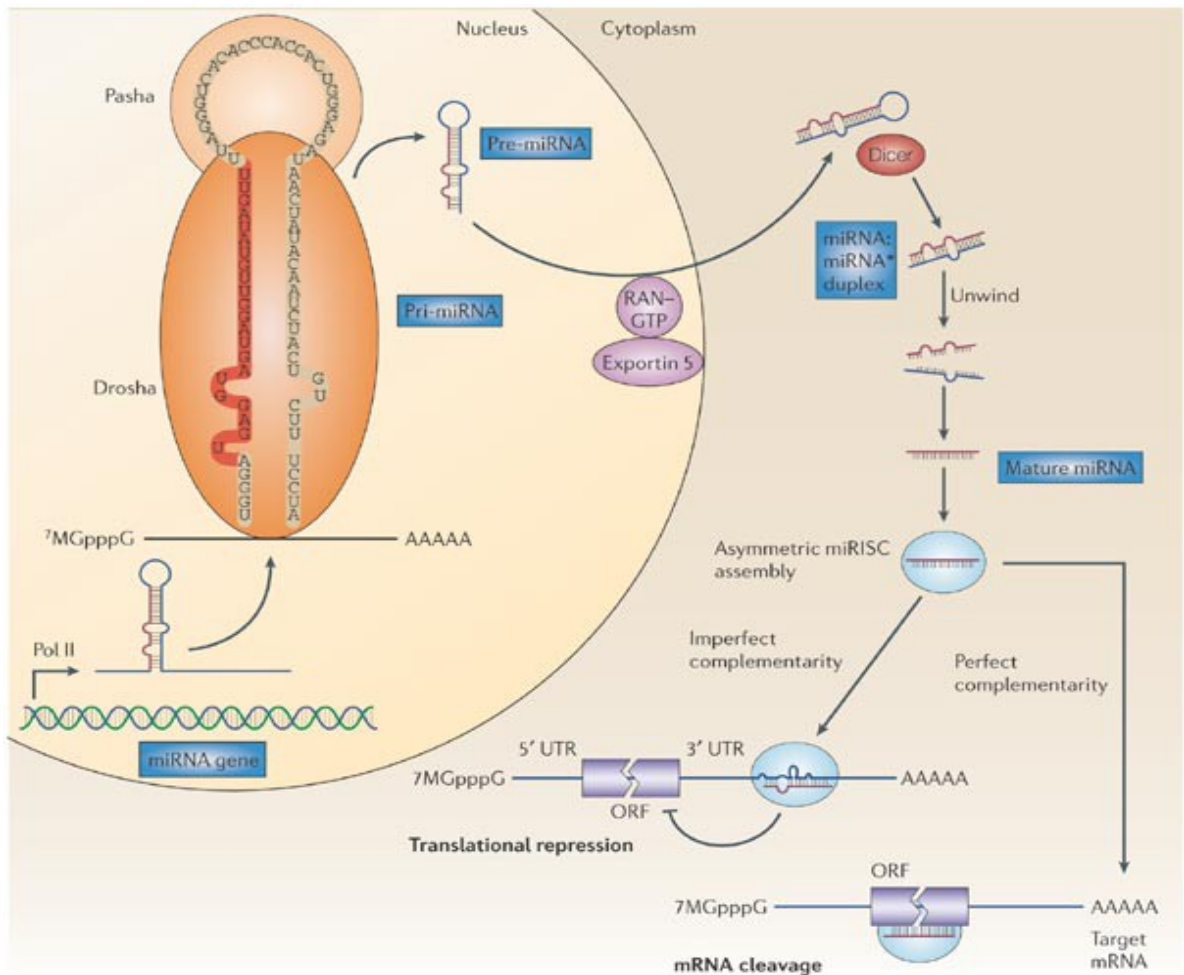
Obr. 9 Rôzne prípady genómovej lokalizácie miRNA (upravené podľa Olena a Patton, 2010).

1.2.3 Biogenéza miRNA

MikroRNA sa vyznačujú ako špecifickou biogenézou (Obr. 10), tak mechanizmom regulácie. Vo všeobecnosti majú miRNA gény vlastné promótoary a do primárnych transkriptov sú prepisované pomocou RNA polymerázy II, čím vznikajú veľké RNA prekurzory, nazývané *pri-miRNA*. Promótorové oblasti génov pre miRNA sú značne

podobné promótorom kódujúcich génov. Disponujú TATA box sekvenciami, iniciačnými elementmi, CpG ostrovčekmi a histónovými modifikáciami, čo indukuje reguláciu týchto oblastí pomocou transkripčných faktorov, enhancerov, tlmiacich elementov, metyláciou či histónovou modifikáciou (Ozsolak a kol, 2008), pričom epigenetická regulácia miRNA génov, hlavne vo forme metylácie, je pomerne častá pri malígnej transformácii buniek (Han a kol, 2007). Primárne transkripty pri-miRNA sú editované pomocou adenosín deamináz účinkujúcich na RNA (ADAR) a v jadre sú zostrihované enzýmom rodiny RNáz III, ktorý sa nazýva u rastlín *Dcl1*, u živočíchov *Drosha* a proteínom viažucim dvojláknovú RNA - *Pasha* (tiež nazývaným DGCR8) do stavu približne 70 nukleotidov dlhých *pre-miRNA*, ktoré sa skladajú do nie dokonale komplementárnych vlásenkových štruktúr dĺžky priemerne 33 nukleotidov. *Drosha* a *Pasha* spolu vytvárajú multiproteínový komplex, nazývaný mikroprocesor. V rastlinných bunkách prebieha procesia *pre-miRNA* do stavu maturovaného miRNA duplexu stále v jadre pomocou *Dcl1* (Kim, 2005). Čo sa týka živočíšnych buniek, *pre-miRNA* sú následne exportované do cytoplazmy pomocou GTP-dependentného transportného proteínu *Exportín 5* (XPO5), ktorý rozpoznáva dvojnukleotidový presah na 3'konci vlásenkovej štruktúry, ktorý tu vytvára ribonukleáza *Drosha*. Tento transport je aktívny a energeticky závislý na väzbe GTP na malý proteín *Ran*, disponujúci GTPázovou aktivitou. V cytoplazme ďalej *pre-miRNA* v podobe dvojláknového, asi 22 nukleotidov dlhého, miRNA: miRNA* duplexu podlieha maturácii pomocou endonukleázy *Dicer*, ktorá je súčasťou komplexu s dsRNA väzobným proteínom TRBP. Dvojláknová miRNA je rozvinutá, pričom jeden reťazec je označovaný ako vedúci („*guide*“), ktorý je ďalej spracovávaný a druhý ako vedľajší („*passenger*“ alebo miRNA*) je uvoľnený a degradovaný. Vedúcim reťazcom sa na základe stability párovania na 5'konci stane ten, ktorý je v duplexe miRNA: miRNA* na tomto konci stabilný menej. Vedúci reťazec maturovanej miRNA je inkorporovaný do multiproteínového komplexu miRISC (*miRNA-induced silencing complex*), ktorého centrálna časť je tvorená proteínmi Argonautovej rodiny (AGO1-4) a proteínmi GEMIN3 a GEMIN4. MiRNA v komplexe s miRISC vo výsledku realizuje svoju funkciu negatívnej regulácie väzbou do oblasti 3'UTR cieľovej mRNA (Esquela-Kerscher a Slack, 2006). MiRISC komplex je svojim vlastným efektorom regulačnej dráhy miRNA, pričom proteíny Argonautovej rodiny sú pre jeho funkciu zásadné. Sú zodpovedné za vlastné posttranskripčné utlmenie a obsahujú dve

vysoko konzervované väzobné domény pre RNA, a to doménu *PAZ*, ktorá sprostredkováva interakciu AGO s miRNA na 3' konci maturovanej ss-miRNA a doménu *PIWI*, ktorá sa viaže s 5' koncom vedúceho reťazca a je katalytickou podjednotkou ribonukleázy s účinkom na cieľovú mRNA (Hutvagner a Simard, 2008).



Obr. 10 Mechanizmus biogenézy mikroRNA (Esquela-Kerscher a Slack, 2006).

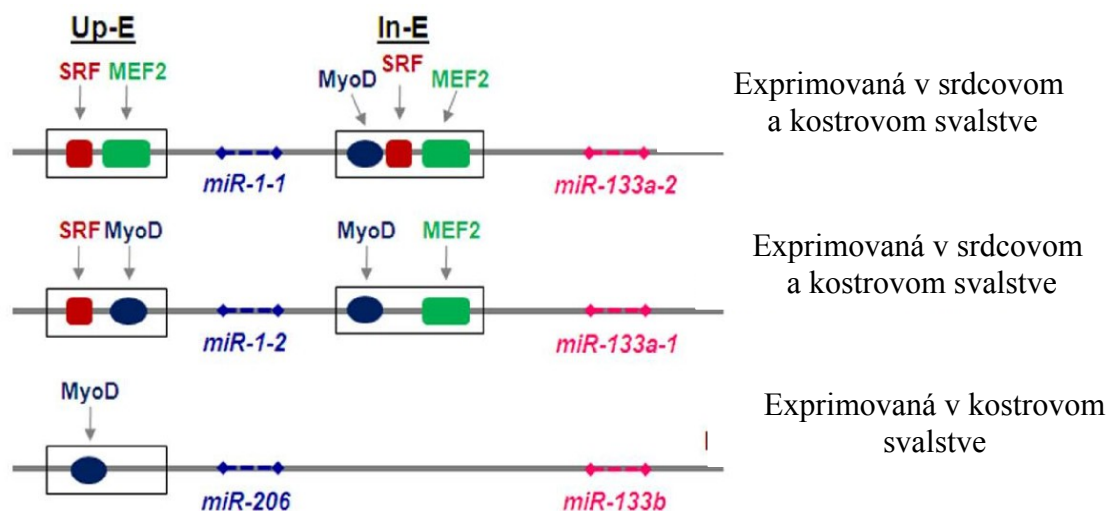
Za kľúčový determinant pri tomto regulačnom mechanizme je považovaný stupeň komplementarity medzi príslušnými miRNA a mRNA, pričom úplná komplementarita

spôsobuje degradáciu cieľovej mRNA, katalyzovanú proteínom AGO2, ktorý je súčasťou miRISC komplexu. Neúplná komplementarita má za následok inhibíciu translácie, pričom takýmto nepresným párovaním vznikajú sekundárne štruktúry v podobe tzv. bublín. Tento spôsob regulácie výrazne prevláda naopak v bunkách živočíchov. MiRNA môžu tiež v určitých prípadoch indukovať deadenyláciu mRNA a tým znemožniť cirkularizáciu mRNA. Rozhodujúcou väzobnou vlastnosťou medzi miRNA a cieľovou mRNA je presné Watson-Crickovo párovanie u nukleotidov 2-8, ktoré pri každej miRNA predstavujú takzvaný „seed“ región (Carthew a Sontheimer, 2009).

Čo sa týka metabolizmu miRNA, dostačujúco a uspokojujúco zatiaľ žiadny mechanizmus popísaný nebol, avšak obecné sú mikroRNA vysoko stabilné molekuly a počas rozpadu dosahuje často mnoho hodín, prípadne až dní. Voľné miRNA sú oproti tomu stabilné menej (Slabý, Svoboda a kol, 2012).

1.2.4 Svalovo-špecifické miRNA

„*MyomiRs*“ (myo = muscle + miR = miRNA) je skupina svalovo-špecifických mikroRNA, s podstatnou úlohou v myogenéze, svalovom raste počas embryogenézy, svalovej funkcii, homeostáze či hypertrofii (McCarthy, 2008). Prvýkrát spomenuté mikroRNA z tejto skupiny boli v už vyššie spomenutej štúdií od Sempere a kol., kedy popísali kanonické myomiRs miRNA-1, miRNA-133a a miRNA-206, pričom preukázali, že ich expresia je prísne viazaná na kostrové svalstvo a svaly srdca (Sempere a kol., 2004) v takej miere, že na základe real-time PCR sú mikroRNA kostrového svalstva a svalstva srdca, tiež popri miRNA exprimovaných v mozgu či v pankrease tkanivovo najšpecifickejšie miRNA (Lee a kol., 2008). Svalovo-špecifické miRNA tvoria rodinu miR-1/miR-206, ktorá v súčasnosti pozostáva zo šiestich členov, porozdeľovaných do troch bicistronických génových klastrov na troch samostatných chromozómoch (chromozómy 6, 18 a 20): miR-1-1/miR-133a-2, miR-1-2/133a-1 a miR-206/miR133b (Obr. 11) (Rota a kol, 2011).



Obr. 11 Zobrazenie troch bicistronických myomiRs klastrov (upravené podľa Rota a kol., 2011).
miR=mikroRNA; SRF=Serum Response Factor; MEF2=Myocyte Enhancer Factor 2, MyoD=Myogenic Differentiation.

Ďalej môžu byť rozdelené na základe konzervatívnosti „seed“ regiónu do dvoch hlavných skupín, a to miR-1/206 a miR-133a/b. Výsledkom evolučnej duplikácie, každý tento bicistronický klaster pozostáva z člena jednej alebo druhej spomenutej skupiny (McCarthy, 2008). Na základe výskumu myomiRs, výsledky poukazujú na jedinečnosť miR-206, ktorá je špecificky exprimovaná len v kostrových svaloch a súčasne je jedinou myomiR, ktorá je exprimovaná len v tkanivách stavovcov, čo odráža možnú dôležitosť a úlohu vo vyššej svalovej komplexite stavovcov, vo forme účasti v špecifikácii satelitových buniek počas vývoja a prechodov typu vlákna v dospelom svale (McCarthy, 2008). Satelitové bunky sú pravdepodobne kmeňové bunky dospelého kostrového svalu, zodpovedné za postnatálny rast svalu či regeneráciu svalu po zranení (Zammit a kol., 2006; McCarthy, 2008). MiR-1-1 a miR-1-2 sú obe zahrnuté vo vývoji ako kostrového tak srdcového svalového tkaniva a majú identické nukleotidové sekvencie. Oproti tomu už spomenutá miR-206 sa líši v štyroch nukleotidoch mimo „seed“ región. MiR-133a-1 a miR-133a-2 sú vo svojich sekvenciách taktiež identické a oproti miR-133b sa líšia len jediným nukleotidom (Tab. 1).

Tab. 1 Svalovo-špecifické miRNA, ich špecifická sekvencia a umiestnenie v genóme (Rota a kol., 2011).

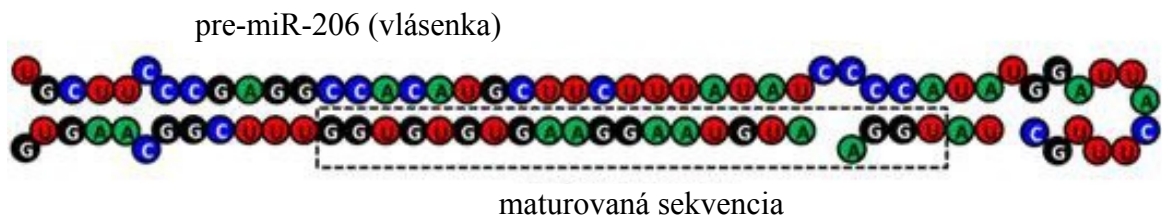
myomiRs	Sekvencia*	Ľudský chromozóm	Región
miR-1-1	5'-UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA-3'	20	Intergénovo
miR-1-2	5'-UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA-3'	18	Intrón
miR-206	5'-UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG-3'	6	Intergénovo
miR-133a-2	5'-UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG-3'	20	Intrón
miR-133a-1	5'-UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG-3'	18	Intrón
miR-133b	5'-UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA-3'	6	Intrón

* hrubo je vyznačená „seed“ sekvencia, podčiarknuté sú nukleotidové rozdiely medzi rodinami myomiRs

MiRNA z celej rodiny miR-1/miR-206 môžu fungovať synergicky, či každá rôzne špecificky na základe ich „seed“ sekvencií, ktorými sa viažu na cieľové mRNA, a to aj za rovnakých podmienok či v rovnakom tkanive. Expresiu myomiRs počas vývoja a diferenciácie svalového tkaniva reguluje faktor sérovej odpovede SRF (*Serum Response Factor*) a myogénne regulačné faktory MRFs (*Myogenic Regulatory Factors*) ako napríklad MyoD, myogénín či MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*). Regulácia je sprostredkovaná väzbou na špecifické oblasti promótoru alebo enhancerov génov cieľových miRNA.

Myogénna rola myomiRs je kontrolovaná priamo aj nepriamo, a to reciprokom reguláciou expresie MRFs. Faktory SRF a MRFs kooperujú pri diferenciácii srdcového a priečne pruhovaného tkaniva, pričom zahŕňajú expresiu myomiRs klastrov miR-1-1/miR-133a-2 a miR-1-2/miR-133a-1. Klaster miR-206/miR-133b je zahrnutý v skorých fázach diferenciácie kostrového svalstva, indukovaný expresiou transkripčných faktorov MyoD (*Myogenic Differentiation*) a myogénín. MiR-1 aj miR-206 zamedzujú expresiu génov *PAX7* a *PAX3* (*Paired box*), kódujúcich tkanivovo špecifické transkripčné faktory, indukujúce proliferáciu satelitových buniek v okolí svalového vlákna či myogénnych prekurzorov. MiR-1 samostatne môže inhibovať rast srdcových myocytov cez transkripčný faktor Hand2 cieľovej mRNA. MiR-206 (Obr. 12) zase down-reguluje DNA polymerázu *a*, čo vedie až k zastaveniu bunkového cyklu a proteín folistatín, spôsobujúc amplifikáciu

pro-myogénneho signálu. MiR-1 a MiR-206 kooperujú na diferenciácii svalových buniek. Naopak umelo vyvolaná expresia miR-133 v myoblastoch znižuje expresiu myogenínu, neskorého svalového markera MHC (*Myosin-Heavy Chain*) a podporuje proliferáciu. Down-regulácia SRF, sprostredkovaná cez miR-133 reguluje rovnováhu proliferácie a diferenciácie svalovo-špecifických génov (Rota a kol, 2011).



Obr. 12 Štruktúra vlásenkovej prekurzorovej pre-miR-206, s vyznačenou sekvenciou konečnej maturovanej miR-206 (Novák a kol, 2014).

Čo sa týka prepojenia miRNA a patogenézy rabdomyosarkómov, štúdie sa sústreďujú práve na rodinu svalovo-špecifických myomiRs, miR-1/miR-206, pričom viacero štúdií dokladá výsledky o výrazne zníženej expresii miR-1 a miR-133a v bunkových líniiach alveolárnych a embryonálnych rabdomyosarkómov v porovnaní s diferencovanými myoblastmi a kostrovým svalovým vláknom, ako prezentuje napríklad aj štúdia od Rao a kol. z roku 2010, kde sa venujú aj potenciálnej úlohe miRNA v podobe sľubného terapeutického cieľa v oblasti rabdomyosarkómov (Rao a kol, 2010; Rota a kol, 2011).

1.3 Kvantitatívna reverzná PCR v reálnom čase (RQ-RT-PCR)

Či vo vedeckej sfére, tak v klinickej praxi, si v oblasti onkológie, ako diagnostiky, prognostiky či terapeutických možností našla svoje miesto technika kvantitatívnej PCR, meranej v reálnom čase. Vďaka svojej relatívnej jednoduchosti, rýchlosti a multiplikovateľnosti je výhodnou voľbou pre analýzy rôznych nádorových markerov, je citlivá na detekciu génových duplikácií, delécií, mutácií malého rozsahu až po zámenu jedinej bázy, či sledovanie génovej expresie (Bernard a Wittwer, 2002).

1.3.1 Základná charakteristika

Kvantitatívna reverzná PCR v reálnom čase (RQ-RT-PCR) (*Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*) je dnes podstatným členom rodiny PCR technológií. Umožňuje spoľahlivú a preukáznu detekciu a meranie počtu produktov, generovaných počas každého jedného cyklu celého PCR procesu. Výhoda tohto postupu spočíva hlavne v priebehu metódy v uzavretom systéme bez potreby post-PCR manipulácie, čím sa predchádza otváraniu vzoriek a tým možnej kontaminácii (Heid a kol, 1996).

Principiálnym krokom je konverzia RNA na cDNA, ďalej sa deteguje prítomnosť PCR produktov, potrebný je kvalitný prístroj na monitorovanie amplifikácie v reálnom čase a vhodný softvér na kvantitatívnu analýzu (Bustin a Mueller, 2005).

Technika závisí od špeciálnej oligonukleotidovej próby, ktorá hybridizuje s cieľovou sekvenciou nukleovej kyseliny. Počas PCR cyklu dochádza k štiepeniu próby, pričom 5' endonukleázová aktivita polymerázy môže byť použitá na detekciu amplifikovaného cieľového produktu (Heid a kol, 1996).

Rôzne techniky monitorovania degradácie próby:

- interkalácia dvojlákových DNA-viažúcich farbív
- ^{32}P značenie próby
- značenie próby fluorescenčnými farbivami

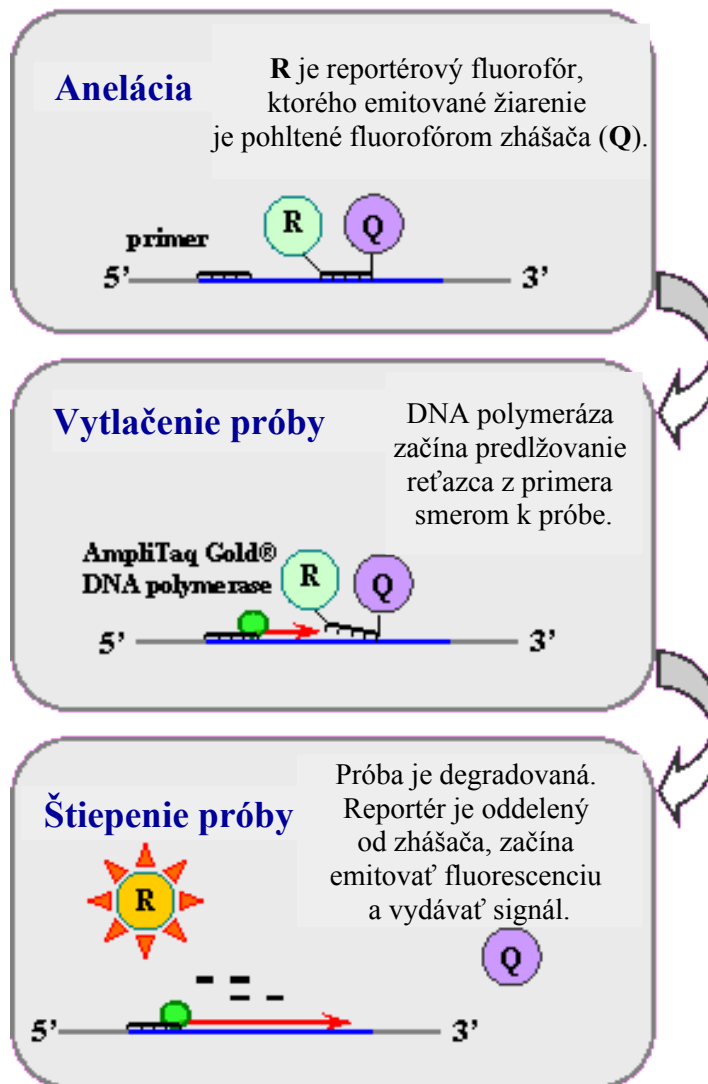
1.3.2 TaqMan assay pre RQ-RT-PCR

TaqMan assay (podľa *Taq* DNA polimerázy) bola jedna z prvých metód zostavená pre monitorovanie PCR reakcie v reálnom čase pri aplikácii ako na kvantifikáciu mRNA, tak špecifický spôsob detekcie. V roku 1996 ju ako novú metódu kvantitatívnej PCR v reálnom čase rozvinul tím Heid a kol., s princípom merania akumulácie PCR produktu pomocou fluorescenčne dvojznačenej próby (Heid a kol, 1996).

Po denaturačnom kroku primery a próby hybridizujú na svoje cieľové miesta cDNA molekúl, pričom próba má na svojom 5' konci fluorescenčne značený fluorofór ("reportér") a na svojom 3' konci tzv. "zhášač", ktorý tlmí fluorescenčné vlastnosti reportéra. Detekcia produktu závisí na 5' endonukleázovej aktivite *Taq* DNA polymerázy, ktorá počas polymerizačného kroku v PCR cykle štípe takto značenú oligonukleotidovú próbu, čo oddelí reportéra od zhášača, vďaka čomu je reportér schopný emitovať svoju fluorescenciu a tým vzniká detegovateľný signál. Vďaka akumulácii tohto signálu je produkt možné detegovať a monitorovať (Obr. 13). Próby sa tiež vďaka chemickej modifikácii na svojich 3' koncoch nepredlžujú (Bustin a Mueller, 2005).

Všeobecne špecificita RQ-RT-PCR reakcie závisí od troch hlavných komponentov, a to od dvoch špecifických PCR primerov a próby.

TaqMan® Applied Biosystems



Obr. 13 Prehľad priebehu kvantitatívnej PCR v reálnom čase, založenej na princípe špeciálne navrhnutých TaqMan prôb (upravené podľa [1]). R=reportérový fluorofór; Q=fluorofór zhášača.

Praktická aplikácia RQ-RT-PCR:

- relatívna a absolútna kvantifikácia génovej expresie
- overenie preukázateľnosti výsledkov z DNA microarrays
- rôzne analýzy, zahŕňajúce objav či analýzu SNP (*Single-Nucleotide Polymorphism*)
- počítanie baktérií, vírusov, húb atď.

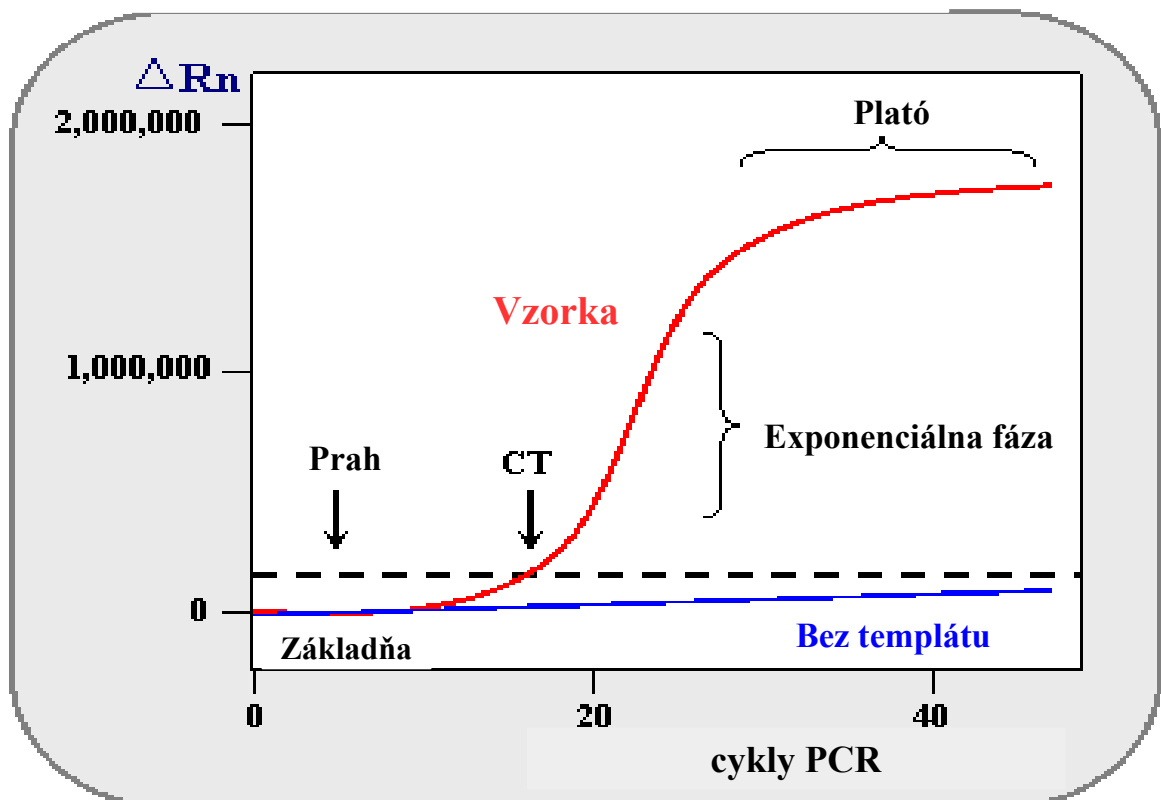
1.3.3 Metodika RQ-RT-PCR

Nomenklatúra RQ-RT-PCR v hlavných bodoch (Obr. 14):

Základňa (*základná čiara*) je presne v PCR cykle, v ktorom sa začína akumulovať reportérový fluorescenčný signál, no stále je pod hranicou detekcie prístroja.

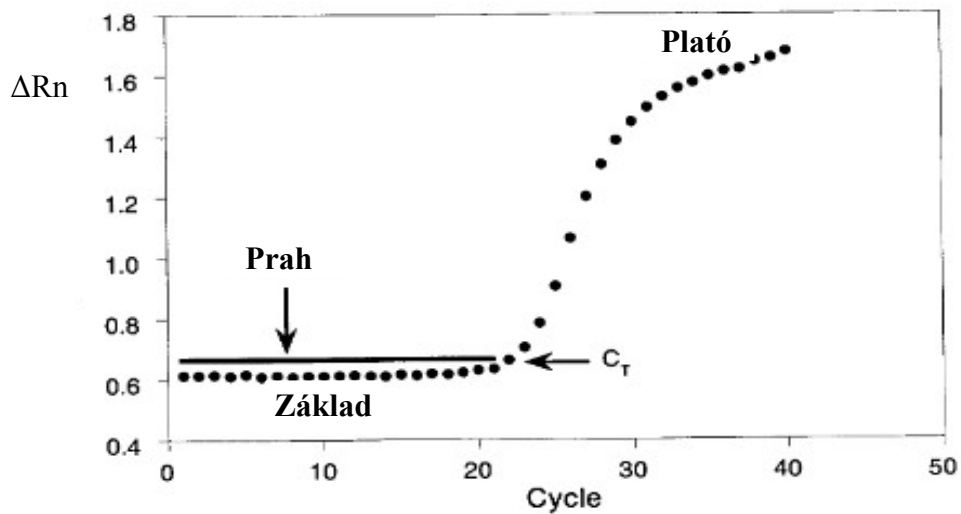
ΔRn značí prídavok fluorescenčného signálu v každom časovom bode merania. Táto hodnota je viazaná s počtom cyklov počas priebehu PCR.

Prah (*threshold*) je ľubovoľný stupeň fluorescencie, určený na základe variability hodnôt vzoriek od základne. Signál, detegovaný nad udanou prahovou hodnotou je považovaný za preukázny a hlavný bod stupňa fluorescencie, ktorý determinuje tzv. C_t bod (*threshold cycle*) pre každú jednotlivú vzorku.



Obr. 14 Model priebehu kvantitatívnej PCR v reálnom čase (upravené podľa [1]).

Ct bod je definovaný ako zlomový moment, respektíve je to prvý určitý cyklus PCR, v ktorom je produkt už dostatočne naakumulovaný a jeho signál prostredníctvom fluorescencie vydanéj fluorofórom na špecifickej próbe (označovaným ako reportér) je výraznejší ako daný prahový stupeň fluorescencie. Ide o časový bod, v ktorom je amplifikovaný PCR produkt prvýkrát detegovaný. Ide v zásade o základný princíp PCR reakcie v reálnom čase a podstatnou jednotkou pri zbieraní a zostavovaní presných a opakovateľných výsledkov a spracovateľných dát (Obr. 15) (Bernard a Wittwer, 2002).



Obr. 15 Zvýraznenie Ct bodu počas priebehu kvantitatívnej PCR (Heid a kol, 1996).

2. Ciele

V prvom rade sme sa zamerali na úlohu svalovo-špecifických mikroRNA (myomiRs) miR-206, miR-133b a miR-133b a ich potenciálne zmenenú hladinu expresie vo vzorkách pacientov s diagnostikovaným ochorením rabdomyosarkómu.

Výšku expresie jednotlivých myomiRs chceme potom porovnať s kontrolnými vzorkami v podobe rôznych typov mezenchymálnych nádorov a vzorkami nenádorového svalového tkaniva. Hladinu expresie tiež budeme analyzovať vrámci jednotlivých podtypov RMS (aRMS, eRMS, pRMS).

Ideálne budú analyzované dáta štatisticky významné, čím sa otvorí ďalšia otázka ich možnej kandidatúry v podobe prípadných diagnostických či prognostických markerov RMS.

Vedľa hlavnej témy sme sa rozhodli vzájomne porovnať dva komerčné izolačné kity z hľadiska celkovej kvality konečnej vyizolovanej vzorky a taktiež rozdiel na konečnú hladinu expresie vyizolovanej vzorky, pochádzajúcej buď z parafinových bločkov alebo zmrazeného tkaniva.

3. Materiály

3.1 Pacienti

V tejto práci je zahrnutých dohromady 82 vzoriek (61 vzoriek RMS / 21 vzoriek kontrolnej skupiny), pochádzajúcich celkovo od 66 pacientov. Vzorky boli vyšetrené, porovnávané a analyzované postupmi, popísanými v metodickej časti.

61 vzoriek tvoria pacienti s diagnózou rôzneho podtypu rabdomyosarkómu (Tab. 2):

- 22 pacientov s eRMS
- 37 pacientov s aRMS
- 2 pacienti s pRMS

Tab. 2 Prehľad pacientov podľa čísla vzorky s diagnózou a podtypom rabdomyosarkómu.

Vzorka	Diagnóza
1	eRMS
2	eRMS
3	eRMS PAX3+
4	eRMS
5	aRMS
6	eRMS
7	eRMS
8	eRMS
9	eRMS
10	aRMS PAX3+
11	eRMS
12	aRMS PAX-
13	aRMS PAX-
14	eRMS
15	eRMS

16	aRMS PAX-
17	eRMS
18	aRMS PAX7+
19	eRMS
20	eRMS
21	eRMS
22	eRMS
23	aRMS PAX-
24	aRMS PAX-
25	aRMS PAX-
26	eRMS PAX3+
27	aRMS PAX3+
28	pRMS
29	eRMS PAX3+
30	pRMS
31	aRMS PAX3+
32	eRMS
33	aRMS PAX3+
34	aRMS PAX3+
35	aRMS PAX-
36	aRMS PAX-
37	aRMS PAX3+
38	eRMS
39	aRMS PAX3+
40	aRMS PAX7+
41	aRMS PAX3+
42	aRMS PAX7+
43	eRMS
44	aRMS PAX3+
45	aRMS PAX3+
46	aRMS PAX-
47	aRMS PAX-
48	aRMS PAX-

49	aRMS PAX3+
50	aRMS PAX3+
51	eRMS
52	aRMS PAX3+
53	aRMS PAX3+
54	aRMS PAX-
55	aRMS PAX-
56	aRMS PAX-
57	aRMS PAX-
58	aRMS PAX-
59	aRMS PAX-
60	aRMS PAX-
61	aRMS PAX3+

aRMS-alveolárny typ rabdomyosarkómu, eRMS-embryonálny typ rabdomyosarkómu, pRMS-pleomorfný typ rabdomyosarkómu

Zvyšných 21 vzoriek tvorí kontrolnú skupinu:

- 14 pacientov s diferentnými diagnózami viacerých typov mezenchymálnych nádorov (Tab. 3)
- 5 vzoriek nenádorového svalového tkaniva
- 2 vzorky tkaniva mozgu

Tab. 3 Prehľad pacientov kontrolnej skupiny s inými diagnózami ako RMS.

Pacient	Diagnóza
1	Nediferencovaný sarkóm mäkkých tkanív
2	Ewingov sarkóm
3	Ewingov sarkóm
4	Ewingov sarkóm
5	Ewingov sarkóm
6	Ewingov sarkóm

7	Synoviálny sarkóm
8	Solitárny fibrózny tumor pleury
9	Epiteloidný sarkóm
10	Dermatofibrosarcoma protuberans
11	Dermatofibrosarcoma protuberans
12	Fibroblastóm
13	Nediferencovaný sarkóm mäkkých tkanív
14	Ewingov sarkóm

Celkovo teda práca disponuje 82 jednotlivými vzorkami zo 66 rôznych pacientov. Od viacerých pacientov je teda k dispozícii viac ako len 1 vzorka, a to s hlavným účelom porovnania expresie jednotlivých miRNA na základe izolácie z FFPE (parafínové bločky) (74 vzoriek) oproti izolácii zo zmrazeného tkaniva (10 vzoriek), či záujmu porovnať kvalitu dvoch izolačných kitov rôznych značiek (70 ku 12 vzorkám).

Ako rabdomyosarkómy tak vzorky s inými diagnózami boli čerpané zo zásob Ústavu patológie a molekulárnej medicíny 2.LF a FN Motol. Časovo sa záber odobratých vzoriek skladá od roku 1998 až po 2015. Kontrolnú skupinu tiež tvorí 5 vzoriek nenádorového svalového tkaniva či 2 vzorky mozgového tkaniva, ktoré sme pre porovnanie hladiny expresie mikroRNA pribrali z inej štúdie.

3.2 Roztoky a chemikálie

3.2.1 Roztoky a chemikálie, použité v postupoch izolácie nukleových kyselín

Chemikálie a roztoky použité pri postupe izolácie nukleových kyselín pomocou *FFPE RNA Purification Kit* od *NORGEN* Biotek Corp.:

- xylén (Sigma)
- 100% etanol (Merck)
- destilovaná voda
- reagenty, obsiahnuté v balení kitu
 - Štiepiaci pufo (*Digestion buffer*)
 - Väzobný pufo (*Binding solution*)
 - Enzým-inkubačný pufo (*Enzyme incubation buffer*)
 - Premývací roztok (*Wash solution*)
 - Elučný roztok (*Elution solution*)
 - Proteínáza K
 - DNáza I

Chemikálie a roztoky použité pri postupe izolácie nukleových kyselín pomocou *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit*, značky *Ambion®* od Life Technologies:

- xylén (Sigma)
- 100% etanol (Merck)
- destilovaná voda
- reagenty, obsiahnuté v balení kitu
 - Štiepiaci pufo (*Digestion buffer*)
 - Premývací roztok 1 (*Wash 1*)
 - Premývací roztok 2/3 (*Wash 2/3*)
 - Izolačné aditívum (*Isolation additive*)
 - Elučný roztok (*Elution solution*)
 - Proteáza
 - 10x DNázový pufo
 - Dnáza

Chemikálie a roztoky použité pri postupe Trizolovej izolácie nukleových kyselín zo zmrazeného tkaniva:

- trizol (Invitrogen)
- chloroform (Sigma)
- izopropanol (2-propanol) (Sigma)
- 75% etanol (Merck)
- destilovaná voda

3.2.2 Roztoky a chemikálie, použité v postupe reverznej transkripcie

Chemikálie a roztoky použité pri postupe reverznej transkripcie pomocou *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* od Applied Biosystems:

- destilovaná voda
- reagenty, obsiahnuté v balení kitu
 - 10x RT pufor
 - dNTP mix (100mM)
 - RNázový inhibítor (20U/μl)
 - Multiscribe™ reverzná transkriptáza (50U/μl)

3.2.3 Roztoky a chemikálie, použité v postupe kvantitatívnej PCR v reálnom čase

Chemikálie a roztoky použité pri postupe mikroRNA kvantifikácie pomocou *TaqMan® MicroRNA Assays*

- destilovaná voda
- 10g/l bovinný sérový albumín (BSE) (*Sigma*)
- TaqMan® Universal Master Mix II
- reagenty, obsiahnuté v balení kitu

- miRNA-špecifický RT primer
- miRNA-špecifický forward PCR primer
- špecifický reverse PCR primer
- miRNA-špecifickú TaqMan® MGB próbu

3.2.4 Primery

Špecifické RT-primery jednotlivých miRNA, dodané kitom *TaqMan® MicroRNA Assays*:

- hsa-miR-206
sekvencia: 5' UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG 3'
- hsa-miR-133a
sekvencia: 5' UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG 3'
- hsa-miR-133b
sekvencia: 5' UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA 3'
- hsa-miR-92
sekvencia: 5' UAUUGCACUUGUCCCGGCCUG 3'

3.3 Laboratórna technika

Bloky ("heat blocks")

AccuBlock™Labnet

Unitek™HB-130

Centrifúgy

Hettich EBA12

Jouan BR4

Prístroj kvantitatívnej PCR

Light Cyclor 2.0 Roche

Light Cyclor Software, verzia 4.1

4. Metodika

4.1 Izolácia miRNA

MiRNA bola izolovaná ako zo vzoriek, zaliatých v parafíne (FFPE), tak zmrazených tkanív. Izolácia miRNA z FFPE prebiehala na základe postupov kitov dvoch rôznych značiek na porovnanie kvality vzoriek a aj samostatných protokolov izolácie.

Izolácia miRNA pomocou kitu od *NORGEN Biotek Corp.*:

1. Deparafinizácia

- a) Mikrotómom nakrájané parafínové bloky podľa štandardu na 10 x 5 μm tenké rezy sa uložia do špeciálnej eppendorfky bez prítomnosti RNáz.
- b) K vzorke sa pridá 1 ml xylénu a zvortexuje sa.
- c) Deparafinizácia pri teplote 50 °C po dobu 5 minút.
- d) Centrifugácia 2 minúty na 14,000 otáčkach (14000 x g).
- e) Bez narušenia peletky sa odstráni xylén.
- f) Pridá sa 1 ml 95-100% etanolu a vzorka sa zvortexuje.
- g) Centrifugácia 2 minúty na 14,000 RPM (14000 x g).
- h) Opatrne sa odstráni etanol bez poškodenia peletky.
- i) Opakujú sa kroky f) až h). Pozor aby sa etanol odstránil kompletne.
- j) Peletka sa vysuší po dobu aspoň 10 minút pri izbovej teplote.

2. Príprava lyzátu

- a) K vysušenej peletke sa pridá 300 μl štiepiaceho pufru (*Digestion Buffer*) a 10 μl Proteinázy K a vortexuje sa.
- b) Inkubácia na 55 °C po dobu 15 minút, vzorka sa občas zvortexuje.
- c) Inkubácia na 80 °C po dobu 15 minút, vzorka sa občas zvortexuje.
- d) Pridá sa 300 μl viažuceho roztoku (*Binding Solution*) a vzorka sa zvortexuje.

e) Pridá sa 600 μ l 95-100% etanolu, vzorka sa zvertexuje.

3. Naviazanie RNA na kolónku

- a) Zostaví sa kolónkový systém pomocou špeciálnej kolónky s filtrom a zbieracej skúmavky, dodaných kitom.
- b) 600 μ l pripraveného lyzátu s etanolom sa prepipetuje do kolónky.
- c) Centrifugácia 1 minútu na 14,000 RPM (14000 x g).
- d) Pretečený zvyšok zo spodnej časti kolónkového systému sa zleje a kolónka sa nasadí späť.
- e) Kroky b) až d) sa opakujú kým kolónkou neprejde celý lyzát.

Nasleduje nepovinný krok v postupe pre maximálne odstránenie zvyšnej genomickej DNA zo vzorky.

- a) Do kolónky sa napipetuje 400 μ l premývacieho roztoku, dodaného kitom.
- b) Centrifugácia 2 minúty na 14,000 RPM (14000 x g), pretečený zvyšok sa zleje.
- c) Pridá sa 100 μ l enzýmového inkubačného pufru (*Enzyme Incubation Buffer*) s DNázu I bez prítomnosti RNáz.
- d) Centrifugácia 1 minútu na 14,000 RPM (14000 x g).
- e) Pretečený zvyšok zo spodnej časti kolónkového systému sa prepituje späť na filter kolónky.
- f) Inkubácia 15 minút pri izbovej teplote.

4. Premývanie kolónky

- a) Do kolónky sa pripipetuje 400 μ l premývacieho roztoku.
- b) Centrifugácia 1 minútu pri 14,000 RPM (14000 x g).
- c) Pretečený zvyšok zo spodnej časti sa zleje.
- d) Znova sa pridá 400 μ l premývacieho roztoku.
- e) Centrifugácia 1 minútu pri 14,000 RPM (14000 x g).
- f) Zleje sa zvyšok zo spodnej časti.
- g) Kolónka so zachytenou RNA na filtri sa nechá sušiť pri izbovej teplote po 2 minúty, zbieracia skúmavka sa odstráni.

5. Elúcia RNA

- a) Kolónka sa umiestni do novej eppendorfky, elučnej skúmavky, dodanej kitom.
- b) Do kolónky sa napipetuje 50 μ l elučného roztoku.
- c) Centrifugácia 2 minúty pri 2,000 RPM (200 x g).
- d) Následuje centrifugácia 1 minútu pri 14,000 RPM (14000 x g).
- e) Pokiaľ nie je celý obsah eluovaný, centrifugácia sa opakuje.
- f) Takto vypurifikovaná RNA sa môže dlhodobo skladovať v mrazáku s teplotou pod -70 °C.

Izolácia miRNA pomocou kitu od Life Technologies:

1. Deparafinizácia

- a) Mikrotómom sa z parafínových bločkov so zaliatým tkanivom narežú 10 x 5 μ m tenké rezy podľa štandardu.
- b) Do eppendorfky s narezanými rezmi sa pridá 1 ml 100% xylénu a zvertexuje sa.
- c) Inkubácia 3 minúty pri teplote 50 °C.
- d) Centrifugácia 2 minúty pri 14,000 otáčkach.
- e) Xylén sa zleje.
- f) Peletka sa dvakrát premyje 100% etanolom a zvertexuje sa.
- g) Centrifugácia 2 minúty pri 14,000 otáčkach.
- h) Peletka sa pri pokojovej teplote suší 15 - 45 minút na odstránenie zvyšného etanolu.

2. Rozklad pomocou proteázy

- a) Do eppendorfky sa napipetuje 100 μ l štiepiaceho pufru (*Digestion Buffer*) a 4 μ l Proteázy.
- b) Inkubácia 15 minút pri teplote 50 °C.

c) Inkubácia 15 minút pri teplote 80 °C.

3. Izolácia nukleovej kyseliny

- a) Pripraví sa mix etanol/izolačné aditívum*¹
- b) Pripravený mix sa napipetuje k vzorke a pipetovaním premieša.
- c) Vzorka s etanolovým mixom sa prepipetuje na filter do vrchnej časti kolónkového systému.
- d) Centrifugácia 30 sekúnd pri 10,000 otáčkach.
- e) Pretečený zvyšok zo spodnej časti systému sa zleje.
- f) Do kolónky sa napipetuje 700 µl premývacieho roztoku (*Wash1*).
- g) Centrifugácia 30 sekúnd pri 10,000 otáčkach, spodná časť sa zleje.
- h) Premytie 500 µl premývacieho roztoku (*Wash2/3*).
- i) Centrifugácia 30 sekúnd pri 10,000 otáčkach, spodná časť sa zleje.
- j) Opakovať centrifugáciu 30 sekúnd pri 10,000 otáčkach kvôli odstráneniu zvyšov roztoku.

4. Trávenie nukleáz a finálna purifikácia

- a) Pridať 60 µl vopred pripraveného mixu, obsahujúceho DNázu*²
- b) Inkubácia pri izbovej teplote po dobu 30 minút.
- c) Pridať 700 µl premývacieho roztoku (*Wash1*).
- d) Centrifugácia 30 sekúnd pri 10,000 otáčkach, spodná časť sa zleje.
- e) Dvakrát premyť 500 µl premývacieho roztoku (*Wash2/3*).
- f) Centrifugácia 30 sekúnd pri 10,000 otáčkach, spodná časť sa zleje.
- g) Centrifugácia 1 minútu pri 10,000 otáčkach, zbieracia skúmavka sa odstráni.
- h) Kolónka sa nasadí do novej eppendorfkky.
- i) Na filter sa pri pokojovej teplote nanesie 60 µl elučného roztoku.
- j) Centrifugácia 1 minútu pri 14,000 otáčkach.
- k) Kolónka sa odstráni, eppendorfka so vzorkou sa môže dlhodobo uchovávať v mrazáku pri teplote -80 °C.

*¹ Isolation Additive ... 120 μ l

100% etanol ... 275 μ l

395 μ l pufru na 1 vzorku

*² 10x riedený DNázový pufr ... 6 μ l

DNáza ... 4 μ l

destilovaná voda ... 50 μ l

50 μ l mixu na 1 vzorku

Zo zmrazeného tkaniva bola RNA izolovaná postupom Trizolovej izolácie, bežne zavedenom v laboratóriu Ústavu patológie a molekulárnej medicíny 2.LF a FN Motol.

Trizolová izolácia RNA zo zmrazeného tkaniva (TIRNA)

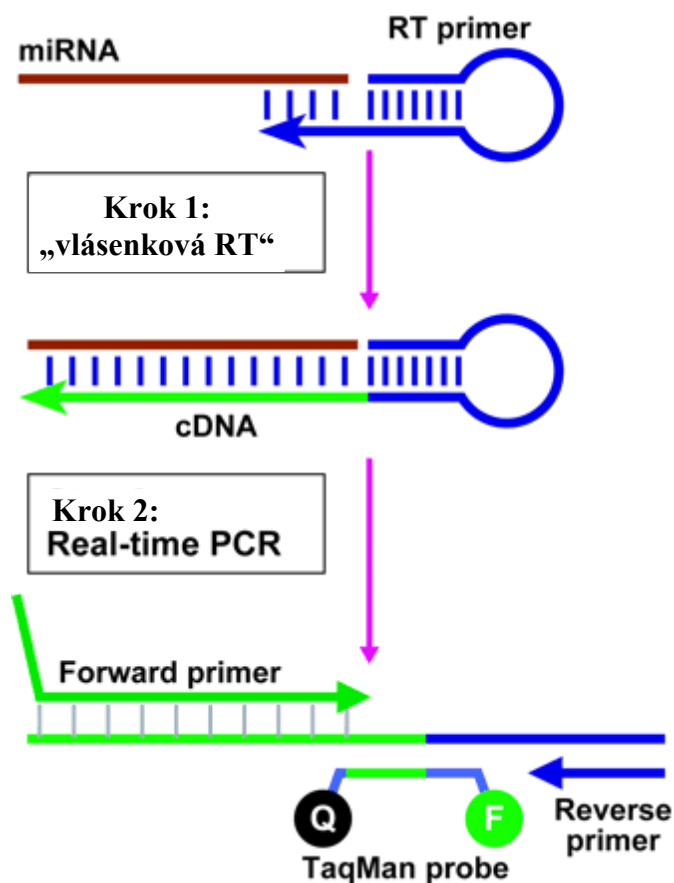
- a) K vzorke zmrazeného tkaniva, pripravenej podľa štandardu na 10 x 5 μ m tenké rezy, sa pridá 1ml Trizolu, vzorka sa rozsuspenderuje a dostatočne zvortexuje.
- b) Inkubácia 5 minút pri pokojovej teplote.
- c) Pridať 200 μ l chloroformu, pretrepať a aspoň 10 sekúnd vortexovať.
- d) Inkubácia 2 až 3 minúty pri pokojovej teplote.
- e) Centrifugácia 15 minút pri 11,600 otáčkach (12000 x g) a teplote 4 °C.
- f) Odoberie sa vrchná vodná fáza, ideálne 400 μ l.
- g) Pridať 500 μ l chladeného izopropanolu, pretáčaním pomaly premiešať.
- h) Precipitácia 10 minút pri pokojovej teplote.
- i) Centrifugácia 10 minút pri 11,600 RPM (12000 x g) a teplote 4 °C.
- j) Supernatant sa opatrne zleje, eppendorfka s peletkou sa osuší na vyklávanom štvorčeku z buničiny.
- k) K peletke pridať 1 ml 75% etanolu, prevracaním eppendorfky oddeliť peletku odo dna.
- l) Centrifugácia 5 minút pri 9,200 RPM (7500 x g) a teplote 4 °C.

- m) Supernatant sa zleje, eppendorfka osuší na buničitom štvorčeku.
- n) Otvorená eppendorfka s peletkou sa nechá 15 minút sušiť na buničine hore dnom.
- o) Pridať 40 µl sterilnej vody.
- p) Rozpustiť peletku 10 minút pri teplote 55-60 °C.
- q) Eppendorfka so vzorkou sa môže dlhodobo uchovávať v mrazáku pri teplote -80 °C.

4.2 Reverzná transkripcia

Špeciálne navrhnutá reverzná transkripcia pre miRNA bola vykonávaná podľa doporučeného postupu od Applied Biosystems na základe kitu *TaqMan®MicroRNA Reverse Transcription Kit*, na ktorý prirodzene nasleduje postup kitu *TaqMan®MicroRNA Assays*. Základ postupu spočíva v konverzii RNA príslušnej vzorky do jednovláknovej cDNA za použitia špecifických microRNA primerov, dodávaných práve s kitom *TaqMan®MicroRNA Assays*. Každá jedna miRNA totiž v jednotlivej reakcii potrebuje svoj vlastný špecifický primer.

TaqMan PCR analýzy využívajú metódu kvantifikácie miRNA na základe použitia vlásenkových RT primerov. Sú kvalitnejšie z hľadiska špecificity a efektivity, čo je dôležitou vlastnosťou pri mnohých príbuzných miRNA, ktoré sa môžu od seba líšiť len na základe jedného nukleotidu. Lepšia je tepelná stabilita RT primer/RNA duplexu a taktiež na nich stráca vplyv kontaminácia dvojvláknovou genomickou DNA, keďže štruktúra takejto vlásenky potláča jej väzbu na molekulu miRNA. Spočíva v tom, že vlásenkový primer je hybridizovaný na 3' koniec miRNA a pomocou Multiscribe reverznej transkriptázy je molekula prepísaná do cDNA. RT produkt je následne štandardne kvantifikovaný pomocou TaqMan PCR postupov so špecifickými miRNA-PCR primermi a značenými TaqMan próbami (Chen a kol, 2005) (Obr. 16).



Obr. 16 Schematické znázornenie špeciálnej dvojkrokovej *TaqMan® miRNA Assays*. Vlásokový RT primer sa viaže na molekulu miRNA, ktorá je následne Multiscribe reverznou transkriptázou prepísaná do cDNA a takýto produkt je kvantifikovaný pomocou real-time PCR na základe špecifických primerov a fluorescenčných TaqMan prôb (Chen a kol, 2005).

1. Príprava RT Master mixu

a) Všetky reagenty, dodané kitom, sa po vybratí z mrazáku pomaly nechajú rozmraziť na ľade.

b) V eppendorfke sa pripraví podľa odporúčaného množstva RT master mix, pričom každá samostatná vzorka (reakcia) obsahuje: 7 μ l master mixu

3 μ l špecifického primeru

5 μ l vyizolovanej RNA vzorky

Tab. 4 Množstvo jednotlivých reagentov použité pri príprave Master mixu na 1 reakciu.

Komponent	Objem v Master mixe pre 1 reakciu
dNTP mix	0,15 μ l
Multiscribe™ RT enzým (50U/ μ l)	1,00 μ l
10x RT pufor	1,5 μ l
RNázový inhibítor (20U/ μ l)	0,19 μ l
Destilovaná voda	4,16 μ l
Celkový objem	7,00 μl

- c) Jemne popretáčať v ruke a hotový Master mix ponechať na ľade, pokým reakcie nie sú pripravené.

2. Príprava RT reakcie

- a) Podľa počtu vzoriek do každej eppendorfky rozpipetovať po 7 μ l Master mixu.
- b) Do jednotlivých eppendorfiiek k Master mixu napipetovať po 5 μ l RNA z vyizolovaných vzoriek.
- c) Pipetovaním premiešať, jemne a krátko scentrifugovať.
- d) RT primery pred použitím nechať rozmraziť na ľade, následne jemne scentrifugovať.
- e) K pripraveným vzorkám v eppendorfkách napipetovať po 3 μ l špecifického RT primeru do konečného objemu jednej reakcie 15 μ l.
- f) Pipetovaním premiešať, krátko a jemne scentrifugovať.
- g) Inkubácia na ľade po dobu 5 minút.
- h) Inkubácia 30 minút pri 16 °C.
- i) Inkubácia 30 minút pri 42 °C.
- j) Denaturácia 5 minút pri 85 °C.
- k) Vzorky cDNA sú pripravené k ďalšiemu postupu, či uloženiu a uchovaniu v mrazáku pri teplote 4 °C.

4.3 MikroRNA kvantifikácia

Od Applied Biosystems sú navrhnuté postupy na základe kitu *TaqMan®MicroRNA Assays* za účelom detegovať a kvantifikovať maturované mikroRNA pomocou real-time PCR prístrojov. Kit obsahuje hlavne vysoko špecifické vlásenkové miRNA primery, ako pre RT reakciu, tak špecifické forward a reverse PCR primery, či špecifickú próbu. Kvantifikácia miRNA sa robí na real-time PCR systémoch, keďže klasické cykly nedokážu detegovať fluorescenčné signály, vytvárané štiepením TaqMan® prôb. Každá samostatná reakcia má objem 20 μl , pričom jednotlivé vzorky boli pripravené vždy v duplikátoch.

1. Príprava PCR reakcie

- a) Z príslušných reagentov sa namieša špecifický PCR mix pre každý jeden typ miRNA - PCR primeru zvlášť, v objeme 19 μl .

Tab. 5 Reakčná zmes na prípravu PCR mixu do objemu jednej reakcie.

Komponenty	Objem v PCR mixe pre 1 reakciu
TaqMan®Universal Master Mix II	10 μl
Špecifický miRNA-PCR primer	1 μl
BSA 10g/l	0,5 μl
Destilovaná voda	7,5 μl
Celkový objem	19 μl

- b) Do každej reakcie sa napipetuje 1 μl vzorky, pripravenej reverznou transkripciou, do plného objemu 20 μl , pričom každá vzorka sa pipetuje v duplikáte.
- c) Vzorky sa jemne scentrifugujú po dobu 30 sekúnd.

d) Jednotlivé reakcie sú pripravené na kvantifikáciu a detekciu metódou PCR v reálnom čase (RQ-RT-PCR).

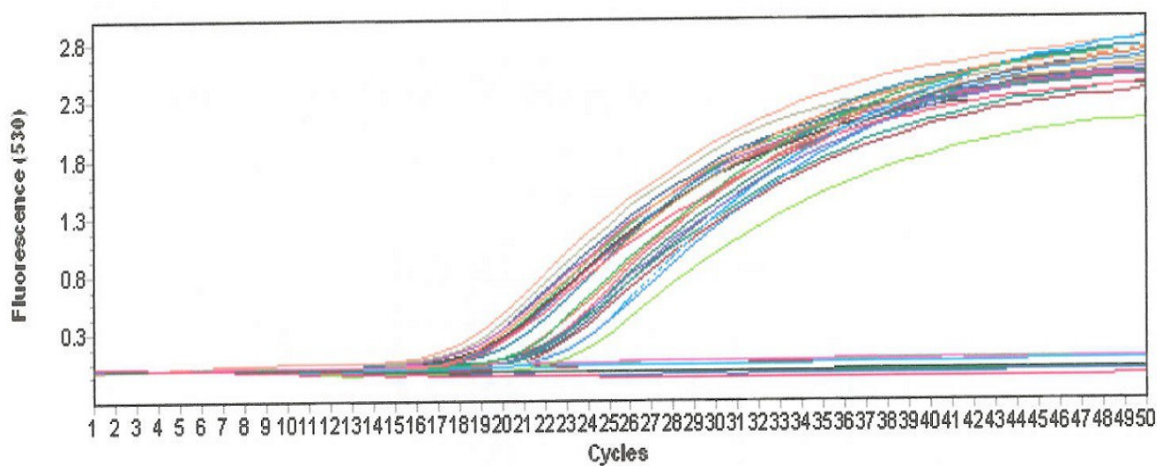
Tab. 6 Parametre teplotného cyklu kvantitatívnej real-time PCR a meranie fluorescence.

	Teplota (°C)	Čas (hh:mm:ss)	Meranie fluorescence
Predenaturácia	50	00:02:00	none
Denaturácia	95	00:10:00	none
PCR cyklus (kvantifikácia) (50x)	95	00:00:15	none
	60	00:00:35	single
Chladienie	40	00:00:20	none

4.4 Analýza reakcie

4.4.1 Analýza pomocou softvéru

Analýza výsledkov a zaznamenaný priebeh reakcie RQ-RT-PCR bol vyhodnotený pomocou LightCycler®Software, verzia 4.1.



Obr. 17 Grafické zobrazenie výsledku RQ-RT-PCR reakcie z prístroja Light Cycler 2.0 Roche, analyzované softvérom LightCycler®Software, verzia 4.1. Na základe emitovanej fluorescence vzorky upravené do grafu v podobe farebne od seba odlišiteľných amplifikačných kriviek.

4.4.2 Koncept C_t hodnoty

C_t hodnota (prahový cyklus), ako bolo spomenuté vyššie, odráža cyklus, v ktorom presne dochádza k nárastu fluorescencie nad prahovú hodnotu. Tento cyklus je zachytený, zaznamenaný a ďalej využívaný práve ako C_t hodnota (čím je C_t hodnota nižšia, tým viac bolo do reakcie dodaného templátu). Posúdenie rozdielu C_t hodnôt zrovnávaných vzoriek sa vyhodnocuje pomocou výpočtu ΔC_t . Pri kvantifikácii sa obvykle na zrovnanie množstva materiálu testovaných vzoriek vyhodnocuje aj „interná“ kontrola. Počet kópií či celkový stav takejto kontroly by mal byť u všetkých testovaných vzoriek rovnaký, aby zistený výsledný rozdiel testovaného cieľového materiálu reálne odpovedal rozdielu v testovanom materiáli, nie v chybnnej koncentrácii vzoriek.

Výpočet ΔC_t pomocou internej kontroly má takúto podobu:

$$\Delta C_t = C_t (\text{testovaná vzorka}) - C_t (\text{interná kontrola})$$

V našej štúdii ako interná kontrola slúži špecifická mikroRNA hsa-miR-92, ku ktorej sa vzťahuje výpočet hodnoty ΔC_t pre všetky testované vzorky a jednotlivo pre každú príslušnú špecifickú myomiRs, analyzovanú v našej práci.

MiR-92 sa v genóme vyskytuje v klastrovanej podobe, exprimovaná je okrem iného i v embryonálnych bunkách a dôležitú úlohu zohráva aj pri normálnom vývoji buniek (Houbaviy a kol, 2003).

5. Výsledky

5.1 Ambion kit versus Norgen kit

Izolácia RNA z parafínových bločkov bola realizovaná pomocou kitov *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit*, značky *Ambion®* od Life Technologies a *RNA Purification Kit* od *NORGEN* Biotek Corp. Keďže sme teda k dispozícii mali dva rôzne typy kitov na izoláciu nukleových kyselín z FFPE, niekoľko rovnakých vzoriek sme vyizolovali na základe oboch týchto protokolov a zmerali u nich expresiu miRNA pomocou RQ-RT-PCR na základe rovnakého postupu, popísaného vyššie v „Metódach“. K dispozícii bolo dohromady 82 vzoriek tkanív, vyizolovaných pomocou kitu Norgen alebo *Ambion®* v pomere 70:12. Analýzu expresných profilov sme zamerali na dva typy svalovo-špecifických miRNA, a to miR-206 a miR-133b. Z nameraných hladín sme vyrátali hodnoty priemeru a mediánu na celkové porovnanie kvality vyizolovanej vzorky pomocou oboch kitov (Tab.7 a 8).

Tab. 7 Zrovnanie kvality vyizolovanej miRNA-206 pri izolácii pomocou kitov *Ambion®* a *Norgen*.
Porovnanie vyobrazené na základe priemeru a mediánu.

miR-206	<i>Ambion®</i>	<i>Norgen</i>
priemer	- 0,91857	- 0,97429
medián	- 0,75	- 1,14

Tab. 8 Zrovnanie kvality vyizolovanej miRNA-133b pri izolácia pomocou kitov *Ambion®* a *Norgen*.
Porovnanie vyobrazené na základe priemeru a mediánu.

miR-133b	<i>Ambion®</i>	<i>Norgen</i>
priemer	- 1,075	- 1,71
medián	- 1,075	- 1,71

Naše výsledky na veľký rozdiel v kvalite izolovaných miRNA nepoukázali, práve naopak, oba izolačné protokoly boli na základe vypočítaných hodnôt priemeru aj mediánu značne porovnateľné.

5.2 FFPE /zmrazené vzorky tkanív

Testovaná RNA v tejto práci bola izolovaná pomocou viacerých postupov, ktorých výber závisí aj od spôsobu dlhodobého uchovania vzoriek tkaniva. K dispozícii nám boli ako vzorky tkaniva, zaliateho v parafíne, tak vzorky tkaniva zmrazeného. Z plného počtu 84 vzoriek bolo 74 fixovaných v podobe parafínových bločkov (FFPE = *formalin-fixed paraffine-embedded*) a zvyšných 10 v podobe zmrazených tkanív.

Izolácia celkovej RNA z FFPE pomocou jedného z kitov či Trizolová izolácia zo zmrazeného tkaniva nám poskytli vyizolované vzorky, pripravené na ďalší spoločný postup. Po špecifickej reverznej transkripcii sa kvalita vyizolovaných nukleových kyselín hodnotila na základe merania hladiny expzie pomocou kvantitatívnej PCR v reálnom čase. Výsledné hodnoty ΔC_t pre vzorky FFPE a zvlášť porovnávané vzorky zmrazeného tkaniva boli výrazne podobné. Táto časť štúdie vychádza zo zatiaľ nepublikovaných výsledkov štúdie Krsková a kol., vzorky a hodnoty ďalej zhromažďujeme a štatistická významnosť sa ešte len bude stanovovať a porovnávať vo väčšej vzorke.

5.3 Štatistické vyhodnotenie hladín expzie špecifických myomiRs

Spracovanie dát prebehlo pomocou štatistického programu StatView a softvéru JMP IN 5.1 software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Signifikantný význam rozdielov expzie jednotlivých miRNA bol vyhodnotený Kruskal-Wallisovým alebo Mann-Whitneyho testom.

Kruskal-Wallisov test (mediánový test) je prirodzeným rozšírením tzv. Mann-Whitneyho testu. Je to neparametrická metóda, vytvorená pre tri a viac vzoriek. Cieľom testu je odhalenie, či sú rozdiely mediánov jednotlivých skupín v skúmanej vzorke štatisticky významné a predstavujú určitý stupeň vzťahu premenných, alebo sú tieto rozdiely čisto náhodné a bez akéhokoľvek vzťahu medzi premennými. Princípom je testovanie nulovej štatistickej hypotézy o rovnosti všetkých mediánov. Najdôležitejším komponentom, ktorý dostaneme je *P-hodnota* s hranicou významnosti tradične 5 % ($P = 0,05$), pod ktorú keď hodnota klesne ($P < 0,05$), nulová hypotéza sa zamietne, teda rozdiel mediánov je príliš veľký aby bol náhodný, čo ho robí štatisticky významným, teda medzi premennými existuje vzťah. *P-hodnota* rovná či vyššia hladine významnosti ($P \geq 0,05$) znamená, že rozdiel medzi mediánmi je dôsledkom náhodného výberu a štatisticky významný nie je, čiže medzi premennými teda nie je žiaden vzťah (i2).

Mann-Whitneyho test sa naproti tomu používa pri porovnávaní mediánov dvoch nezávislých vzoriek, pričom hodnotí či je rozdiel mediánov týchto dvoch skupín štatisticky významný alebo len čisto náhodný. Podobne, *P* hodnota nižšia 0,05 ($P < 0,05$) znamená štatistickú významnosť a existujúci vzťah týchto dvoch vzoriek (i3).

Dohromady bolo v rámci tejto práce vyšetrených 82 vzoriek, z čoho 61 vzoriek s diagnózou RMS a 21 vzoriek kontrolnej skupiny (Tab. 9).

Tab. 9 Základný prehľad typov a jednotlivých počtov vzoriek, ktoré boli vyšetrené v rámci tejto štúdie.

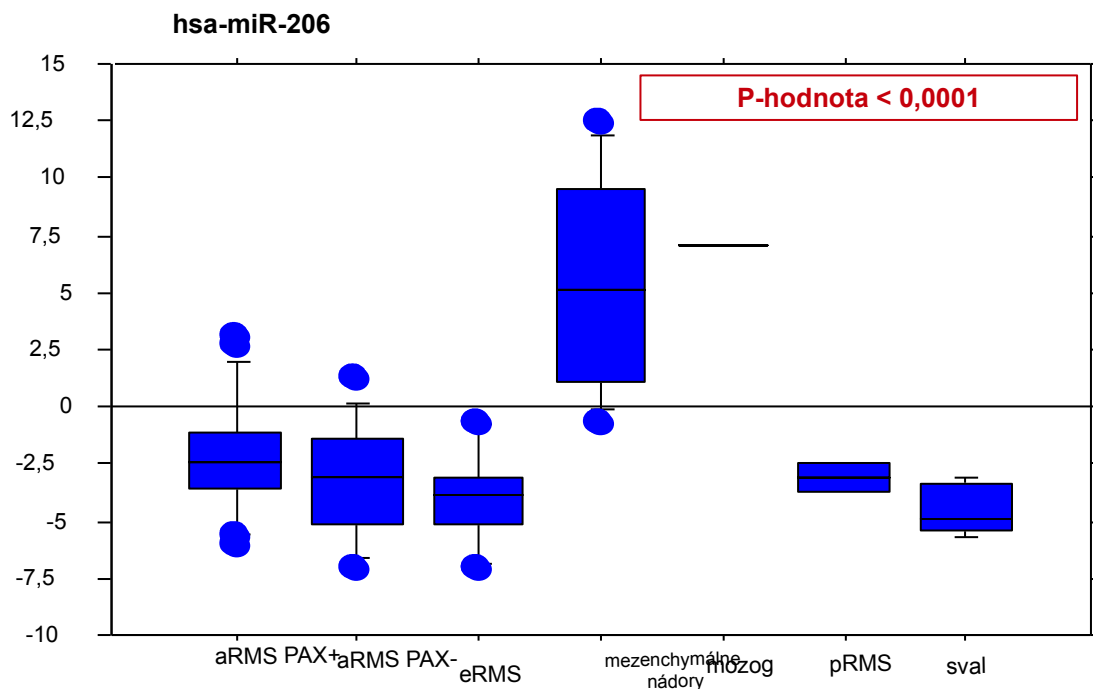
Typ vzoriek		Počet vzoriek	
RMS	aRMS	PAX+	18
		PAX-	19
	eRMS		22
	pRMS		2
Kontrolná skupina	mezenchymálne nádory		14
	nenádorové svalové tkanivo		5
	mozog		2

Pri jednotlivých vzorkách bola po kvantifikácii pomocou RQ-RT-PCR analyzovaná a štatisticky spracovaná hladina expresie svalovo-špecifických mikroRNA, a to miR-206, miR-133b, miR-133a a kontrolnej mikroRNA, od ktorej sa rozdiely testovaných vzoriek odvíjajú na základe výpočtov hodnoty ΔC_t . Z týchto dát bol vykonaný štatistický rozbor pomocou špeciálneho analytického programu s výsledným grafickým zhodnotením v podobe tzv. *box plotu*. Každý graf disponuje osou *x* s príslušnými testovanými vzorkami, osou *y* s výškou hladiny expresie a vpísanou P-hodnotou, určujúcou štatistickú významnosť spracovaných dát.

5.3.1 Všeobecné zhrnutie expresie myomiRs

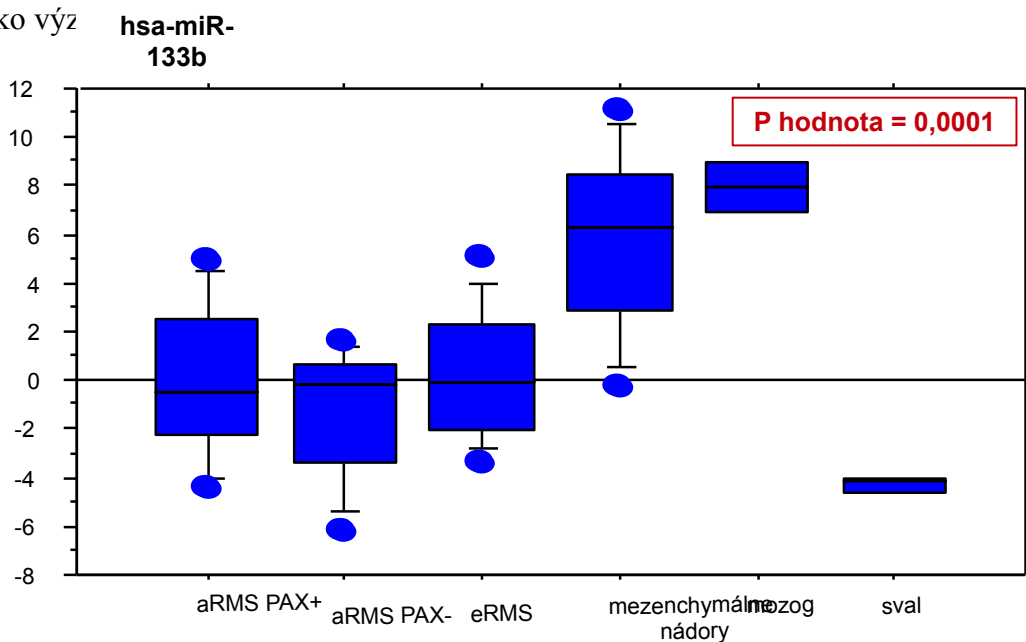
V nižšie uvedených grafoch 1-3 je uvedené základné porovnanie hladín expresie študovaných myomiRs vo všetkých príslušných vzorkách. Výška expresie jednotlivých svalovo-špecifických mikroRNA je zobrazená v samostatných grafoch, pričom v každom je porovnané rozdelenie do podtypov RMS (aRMS PAX+ / aRMS PAX- / eRMS / pRMS), vzoriek iných mezenchymálnych nádorov a vzoriek mozgového či nenádorového svalového tkaniva. Spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou mediánového Kruskal-Wallisovho testu.

Graf 1 zobrazuje porovnanie hladín expresie špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách rôznych podtypov RMS, vzorky kontrolnej skupiny mezenchymálnych nádorov, mozgového tkaniva a nenádorovej vzorky svalu. P hodnota tejto štatistickej analýzy je nižšia ako 0,0001 (tým pádom tiež nižšia ako hranica významovosti $P = 0,05$), čo ju robí štatisticky vysoko významnou.



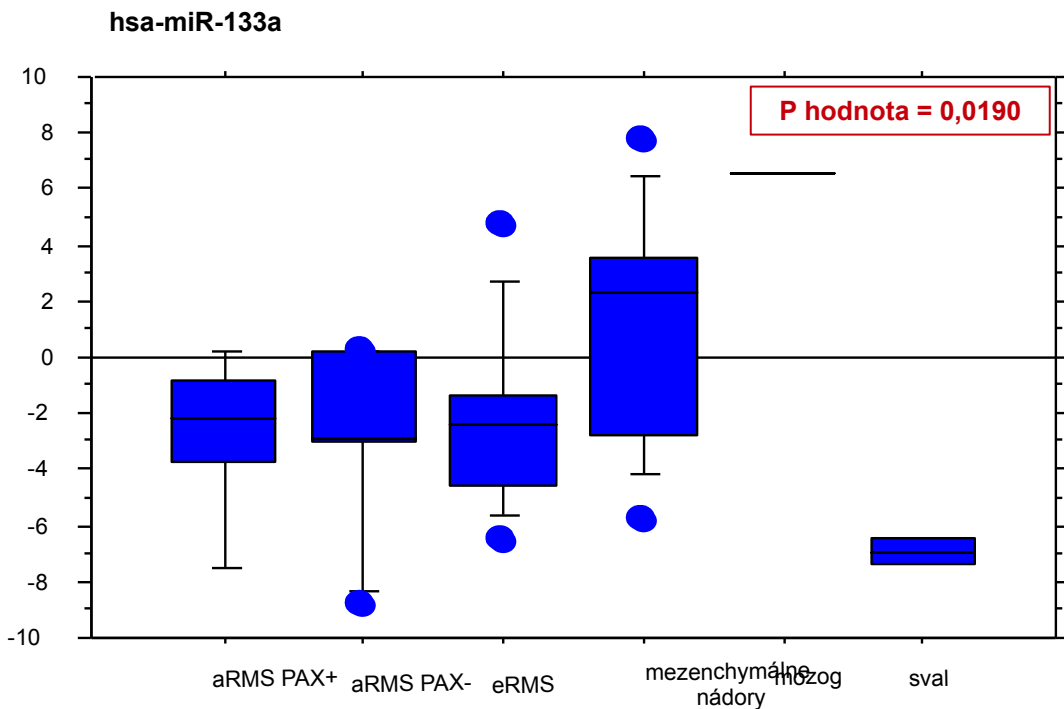
Graf. 1 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expície miR-206. Všeobecné porovnanie podtypov RMS navzájom a so skupinami kontrolných vzoriek. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty < 0,0001.

Graf 2 predstavuje zrovnanie hladín exprimovanej hsa-miR-133b vo vzorke podobných skupín ako pri grafe 1. U jednotlivých podskupín RMS je však hladina expície miR-133b o niečo nižšia ako pri miR-206. P-hodnota je rovná 0,0001, čo ju robí tiež štatisticky vysoko výz



Graf. 2 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133b. Porovnanie podtypov RMS navzájom a so skupinami kontrolných vzoriek. V pravom rohu je vpísaná stanovená P-hodnota = 0,0001.

Graf 3 ukazuje zrovnanie hladín expresie hsa-miR-133a v podskupinách rabdomyosarkómov a vzorkách kontrolnej skupiny. Hladiny sú viditeľne vyrovnannejšie, no P hodnota je stále štatisticky významná, nakoľko je rovná 0,0190.



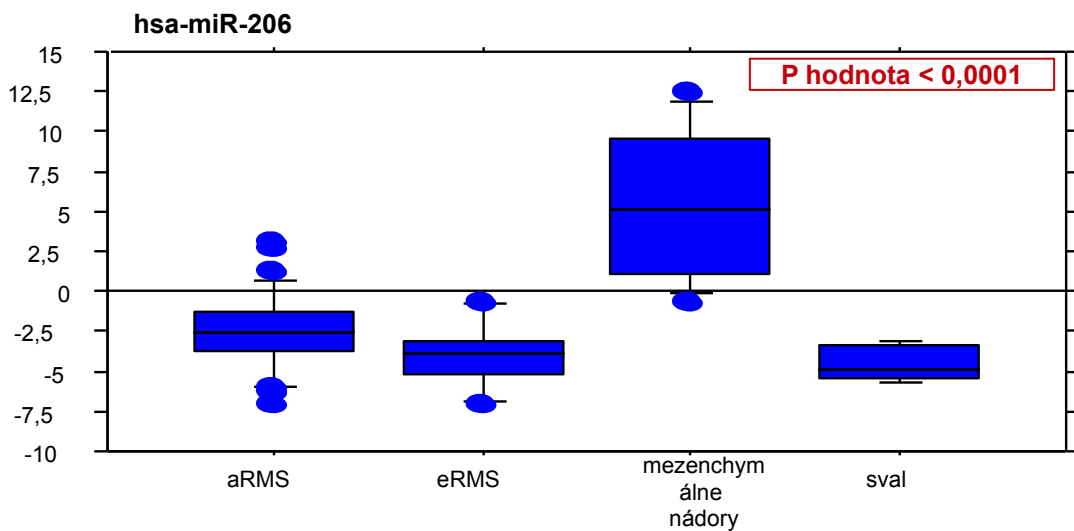
Graf. 3 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133a. Všeobecné porovnanie podtypov RMS navzájom a so skupinami kontrolných vzoriek. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0190.

5.3.2 Porovnanie expresie myomiRs pri RMS, mezenchymálnych nádoroch a svalovom tkanive

V ďalšej trojici grafov (4-6) sú bližšie porovnávané hladiny expresie jednotlivých študovaných myomiRs pri dvoch najčastejšie sa vyskytujúcich podtypoch RMS (alveolárnom a embryonálnom RMS), kontrolných vzorkách mezenchymálnych nádorov a

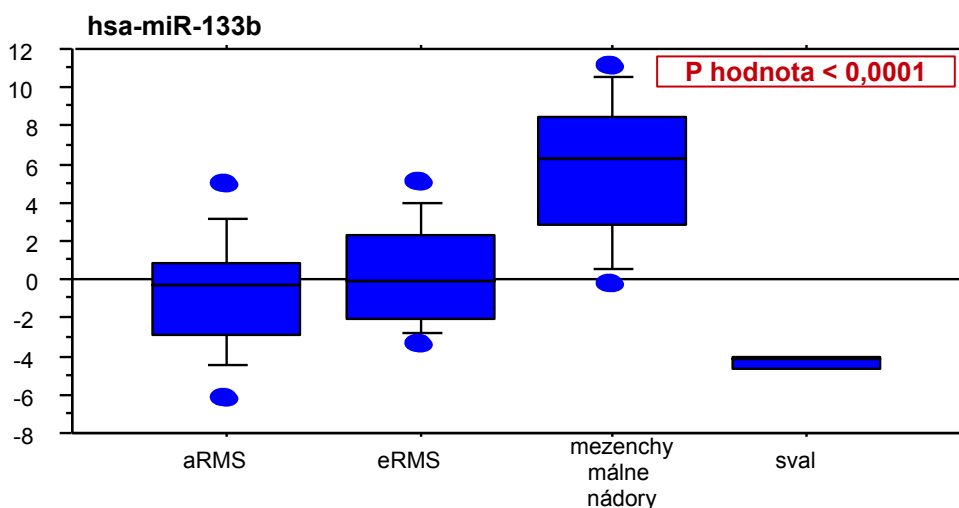
nenádorovom svalovom tkanive. Spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou Kruskal-Wallisovho testu.

Graf 4 zobrazuje porovnanie hladín expresie špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách dvoch podtypov RMS, a to aRMS a eRMS, vzorkách kontrolnej skupiny mezenchymálnych nádorov a nenádorovej vzorky svalového tkaniva. P hodnota tohto súboru dát je nižšia ako 0,0001, čím sa preukazuje ako štatisticky vysoko významná. Rozdiel vo výške expresie svalovo-špecifickej miR-206 vo svalovom tkanive je viditeľne vyšší oproti tkanivu mezenchymálnemu.

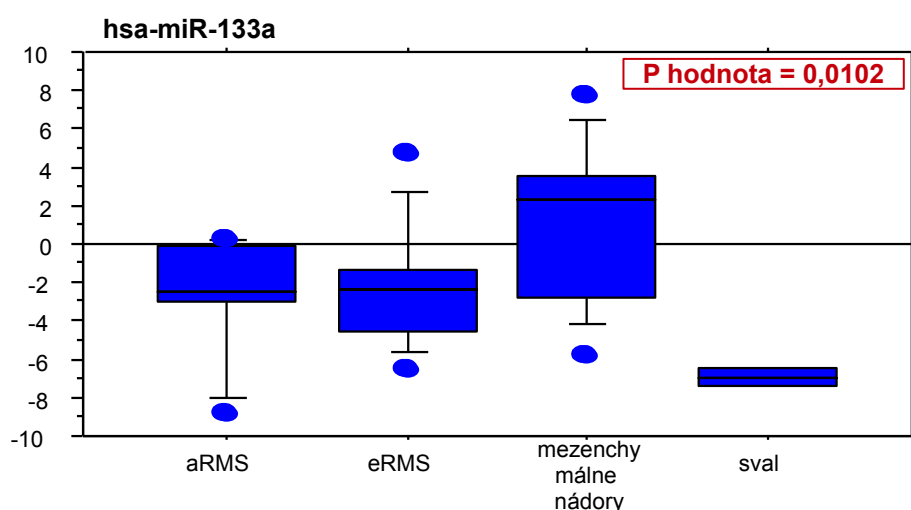


Graf. 4 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-206. Porovnanie expresie u aRMS, eRMS a u kontrolných skupín. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty < 0,0001.

V grafe 5 už rozdiel v hladinách expresie svalovo-špecifickej miR-133b v tkanivách svalov oproti mezenchymálnym nie je tak výrazný, avšak stále značný. Hladina významnosti je vďaka P-hodnote nižšej ako 0,0001 stále štatisticky vysoká.



Graf. 5 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133b. Porovnanie expresie u aRMS, eRMS a u kontrolných skupín. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty $< 0,0001$. Graf 6 podobne zobrazuje rozdiely v hladinách expresie špecifickej hsa-miR-133a pri vzorkách aRMS, eRMS, kontrolných vzorkách mezenchymálnych nádorov a nenádorovom svalovom tkanive. P hodnota sa rovná 0,0102, čo aj v tomto prípade potvrdzuje štatistickú významnosť nameraných hladín.



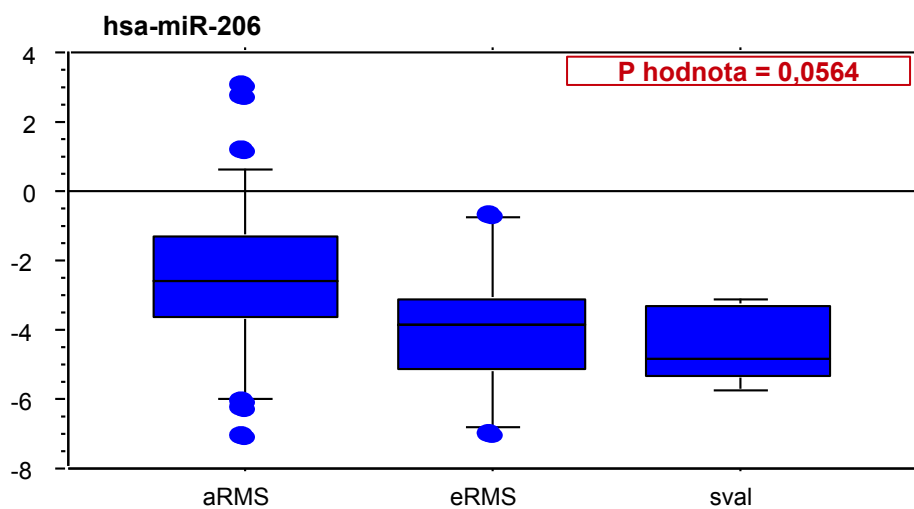
Graf. 6 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133a. Porovnanie expresie u aRMS, eRMS a u kontrolných skupín. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0102.

5.3.3 Porovnanie expresie myomiRs pri RMS oproti svalovému tkanivu

V grafoch 7-9 sú porovnávané hladiny expresie jednotlivých špecifických myomiRs zamerané na vzorky svalového tkaniva. Výška expresie je vyobrazená pri

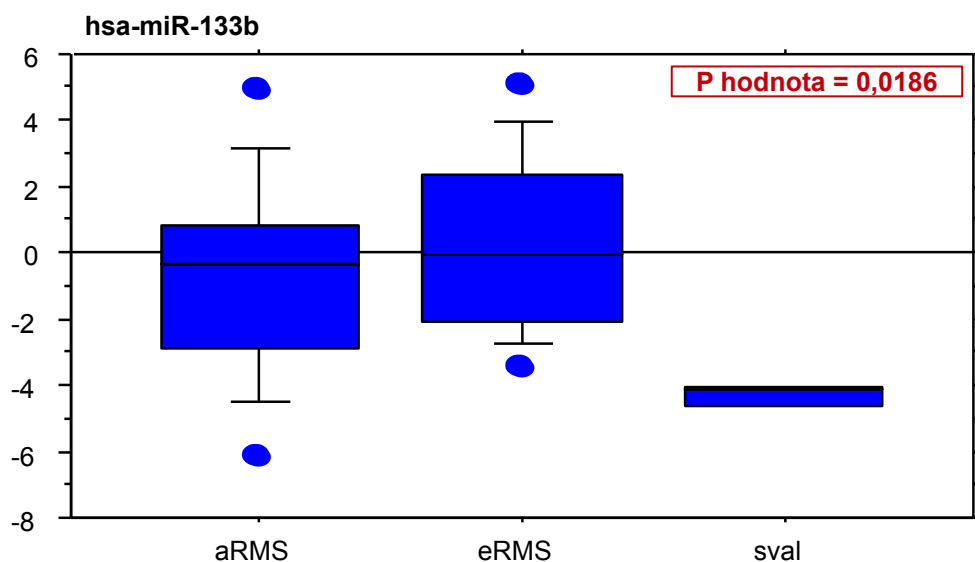
alveolárnom type RMS, embryonálnom type RMS a vzorke nenádorového svalového tkaniva. Spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou Kruskal-Wallisovho testu.

V grafe 7 sú vyjadrené hladiny expzie špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách dvoch podtypov RMS, a to aRMS a eRMS, oproti vzorke nenádorového svalového tkaniva. P hodnota štatistického súboru je rovná 0,0564, čo ju robí vyššou ako je hranica významnosti, čo znamená, že rozdiel medzi mediánmi v tomto prípade nie je štatisticky významný.



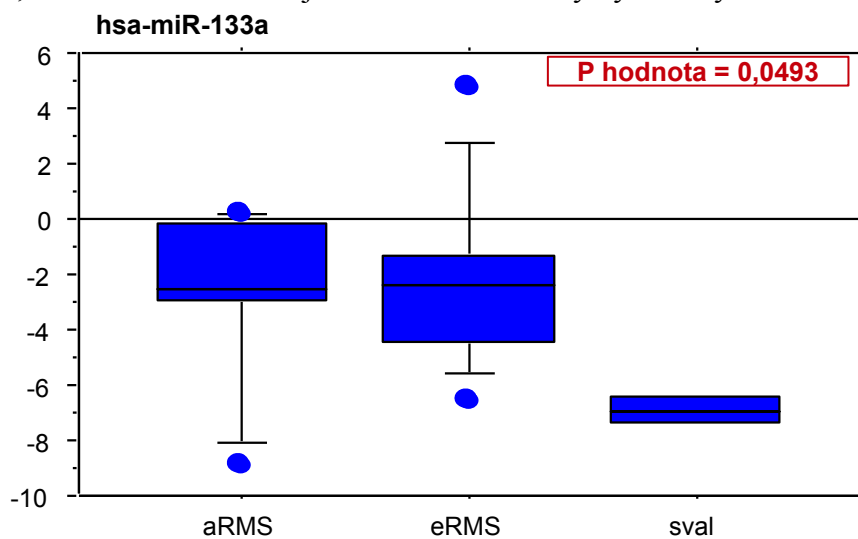
Graf. 7 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expzie miR-206. Porovnanie expzie tejto špecifickej mikroRNA u aRMS, eRMS a nenádorového svalového tkaniva. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0564.

Graf 8 podobne zobrazuje hladiny expzie špecifickej hsa-miR-133b vo vzorkách aRMS, eRMS a nenádorovom svalovom tkanive. P hodnota sa rovná hodnote 0,0186, čo ju robí na rozdiel od miR-206 štatisticky významnou.



Graf. 8 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133b. Porovnanie expresie u aRMS, eRMS a nenádorového svalového tkaniva. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0186.

V grafe 9 je zobrazený rozdiel exprimovanej hsa-miR-133a vo vzorkách aRMS, eRMS a nenádorovom svalovom tkanive. P hodnota = 0,0493, čím je takmer na hranici významnosti, no rozdiel mediánov je stále ešte štatisticky významný a nenáhodný.

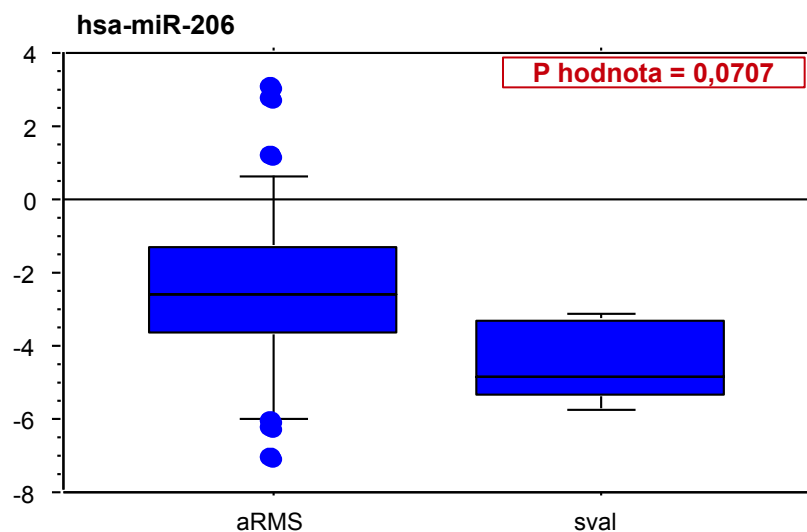


Graf. 9 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133a. Porovnanie expresie u aRMS, eRMS a nenádorového svalového tkaniva. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0493.

5.3.4 Porovnanie expresie myomiRs pri aRMS oproti svalovému tkanivu

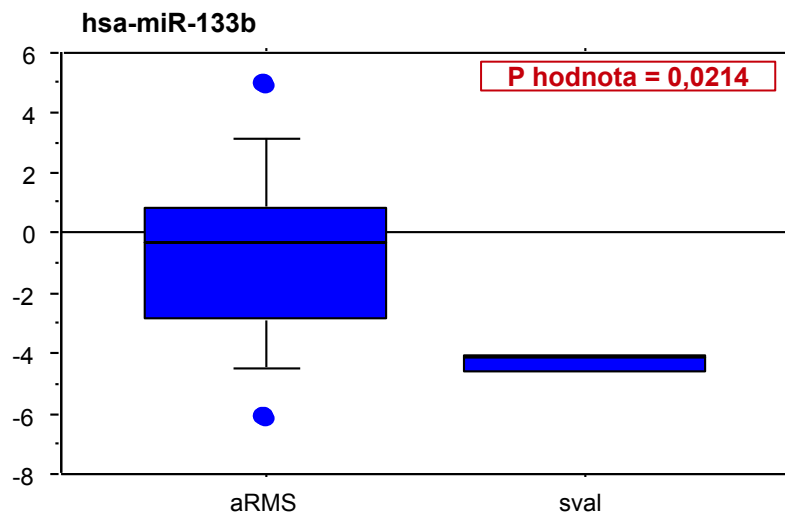
Grafy 10-12 zobrazujú hladiny expresie jednotlivých svalovo-špecifických mikroRNA, porovnávané medzi skupinou vzoriek alveolárneho rabdomyosarkómu a vzorkou nenádorového svalového tkaniva. Štatistické spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou Mann-Whitneyho testu, nakoľko boli zrovnávané rozdiely mediánov len dvoch nezávislých skupín vzoriek.

V grafe 10 sú zobrazené hladiny expresie špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách alveolárneho typu rabdomyosarkómov v porovnaní s nenádorovou vzorkou svalového tkaniva. P hodnota súboru je rovná 0,0707, čo robí rozdiel mediánov čisto náhodný, bez bližšieho vzťahu medzi premennými a bez štatistickej významnosti.



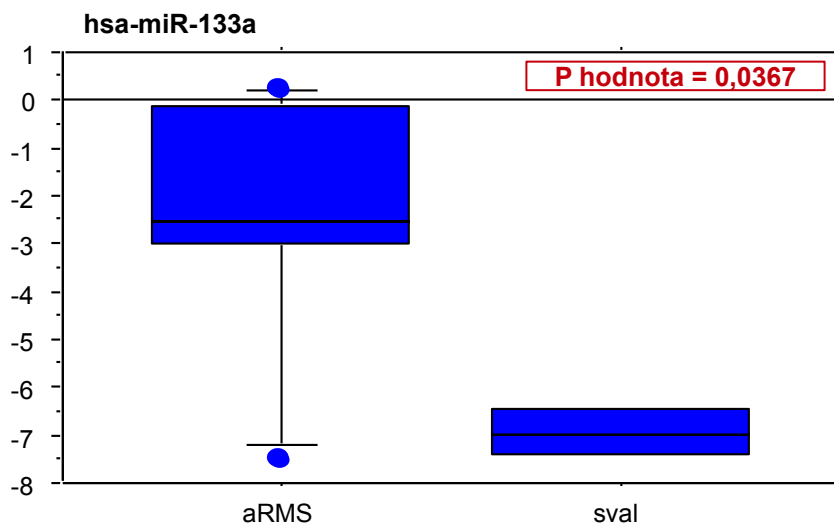
Graf. 10 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-206. Porovnanie expresie špecifickej myomiR u aRMS oproti nenádorovému svalovému tkanivu. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0707.

Naproti tomu rozdiel hladiny expresie špecifickej hsa-miR-133b vo vzorke aRMS oproti vzorke svalového tkaniva je viditeľne väčší ako pri miR-206 (Graf. 11). P hodnota = 0,0214, čo ju robí štatisticky významnou s preukázaným vzťahom premenných.



Graf. 11 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133b. Porovnanie expresie špecifickej myomiR u aRMS oproti nenádorovému svalovému tkanivu. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0214.

V grafe 12 je porovnávaná hladina expresie hsa-miR-133a v skupine vzoriek s diagnózou alveolárneho rabdomyosarkómu so skupinou vzoriek nenádorového svalového tkaniva. P hodnota je rovná hodnote 0,0367, čo ju robí taktiež štatisticky významnou.

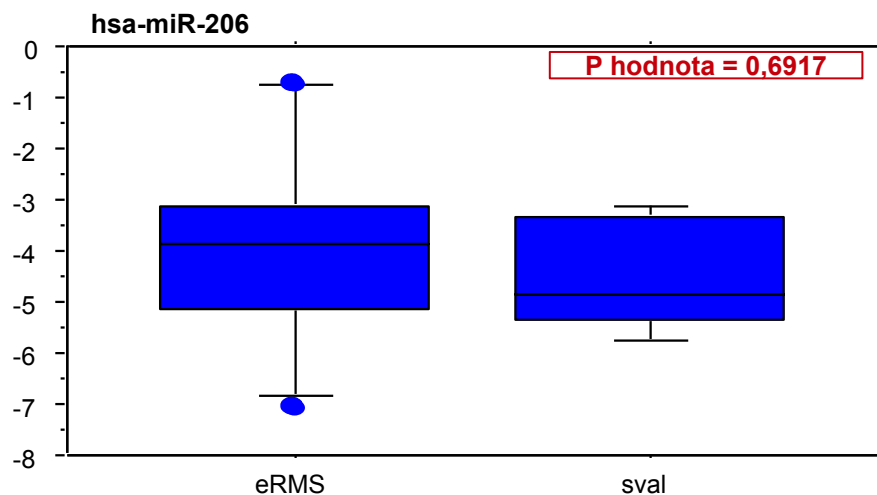


Graf. 12 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133a. Porovnanie expresie špecifickej myomiR u aRMS oproti nenádorovému svalovému tkanivu. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0367.

5.3.5 Porovnanie expresie myomiRs pri eRMS oproti svalovému tkanivu

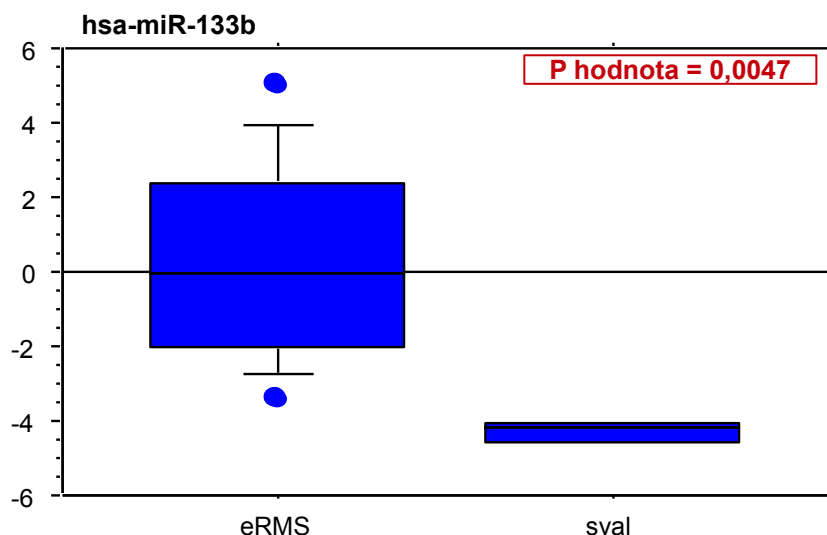
V grafoch 13-15 sú zobrazené hladiny expresie jednotlivých svalovo-špecifických mikroRNA, porovnávané na podobnom princípe ako v predchádzajúcej podkapitole, no v tomto prípade je výška expresie myomiRs posudzovaná medzi skupinou vzoriek najčastejšie sa vyskytujúceho typu rabdomyosarkómov (eRMS) a vzorkou nenádorového svalového tkaniva. Štatistické spracovanie dát bolo taktiež vyhodnotené pomocou Mann-Whitneyho testu pre dve nezávislé skupiny vzoriek.

V grafe 13 sú zobrazené hladiny expresie špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách embryonálneho typu rabdomyosarkómov, porovnávané s nenádorovou vzorkou svalového tkaniva. P hodnota súboru dát je rovná hodnote 0,6917, vysoko nad hranicou významnosti, čo odporuje možnému vzťahu medzi príslušnými premennými na základe rozdielu mediánov. Oba súbory vzoriek však vykazujú značne vysokú hladinu expresie.



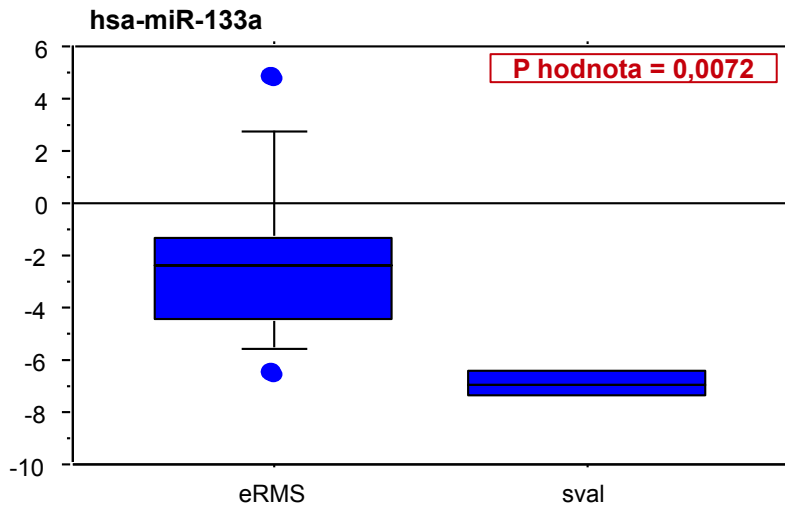
Graf. 13 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-206. Porovnanie expresie príslušnej špecifickej myomiR u eRMS oproti nenádorovému svalovému tkanivu. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,6917.

Graf 14 zobrazuje výšku exprimovaných hladín špecifickej hsa-miR133b vo vzorkách eRMS a kontrolných vzorkách svalového tkaniva. P hodnota tohto súboru sa rovná 0,0047, čo ju robí, štatisticky významnou s preukázaným existujúcim vzťahom medzi premennými.



Graf. 14 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133b. Porovnanie expresie špecifickej myomiR u eRMS oproti nenádorovému svalovému tkanivu. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0047.

V grafe 15 je zobrazený rozdiel expresie hsa-miR-133a medzi skupinou vzoriek eRMS a vzorkami nenádorového svalového tkaniva. P hodnota je v tomto teste taktiež štatisticky významná a vzťah premenných preukázaný (P hodnota = 0,0072).

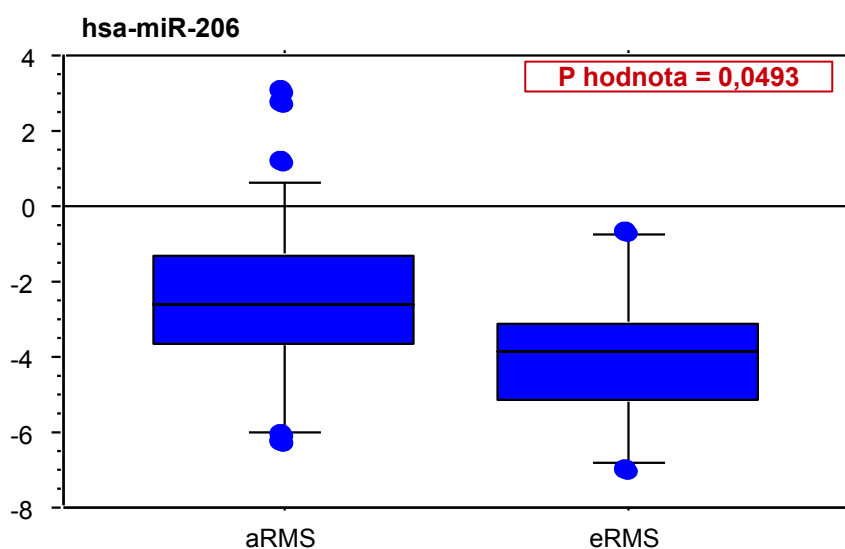


Graf. 15 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133a. Porovnanie expresie špecifickej myomiR u eRMS oproti nenádorovému svalovému tkanivu. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0072.

5.3.6 Porovnanie expresie myomiRs pri aRMS a eRMS

Grafy 16-18 zobrazujú hladiny expresie jednotlivých svalovo-špecifických mikroRNA vo vzorkách pacientov s diagnózou RMS, presnejšie so zamerním na rozdiel v expresii myomiRs medzi alveolárnym a embryonálnym typom rhabdomyosarkómov. Štatistické spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou Mann-Whitneyho testu.

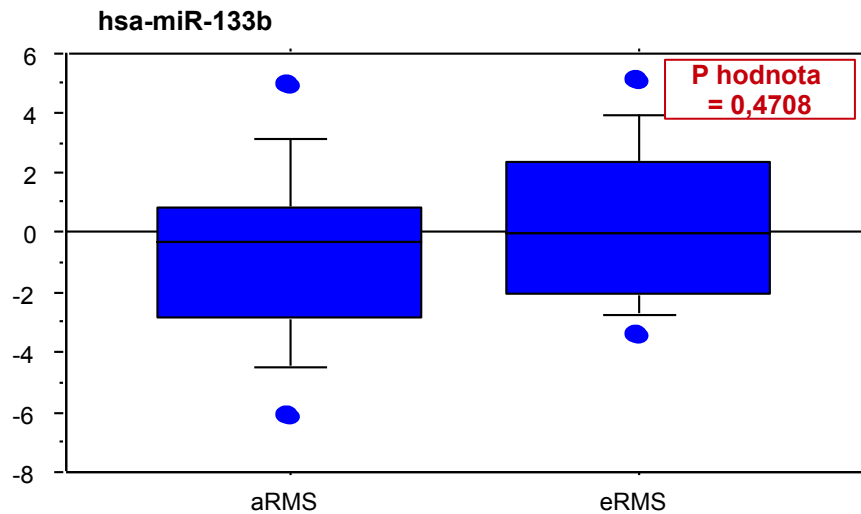
Graf 16 ukazuje a porovnáva hladiny expresie svalovo-špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách pacientov s alveolárnym a embryonálnym typom RMS. P hodnota štatistického súboru je rovná hodnote 0,0493, čo ju robí štatisticky významnou aj napriek blízkosti s hranicou významovosti 0,05.



Graf. 16 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-206. Táto špecifická myomiR je porovnávaná svojou výškou expresie medzi aRMS a eRMS podtypom. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0493.

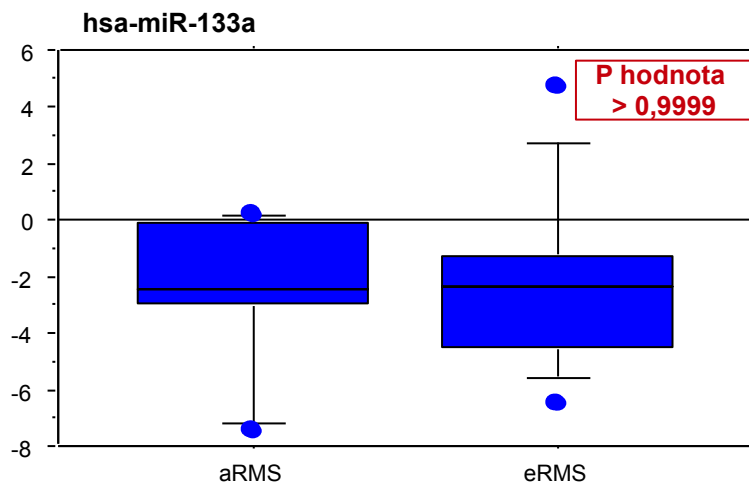
V grafe 17 je zobrazená hladina expresie špecifickej hsa-miR-133b osobitne pri vzorke pacientov s aRMS a vzorke pacientov s eRMS. P hodnota = 0,4708, čo je značne nad

hranicou významosti, čo znamená, že premenné nie sú v žiadnom bližšom vzťahu a test nie je štatisticky významný.



Graf. 17 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133b. Táto špecifická myomiR je porovnávaná svojou výškou expresie medzi aRMS a eRMS podtypom. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,4708.

Graf 18 zobrazuje vyhodnotenie hladín expresie špecifickej hsa-miR-133a vo vzorkách s diagnózou aRMS a eRMS. P hodnota > 0,9999 čo znamená súbor bez akéhokoľvek preukázneho štatistického významu alebo vzťahu medzi premennými.

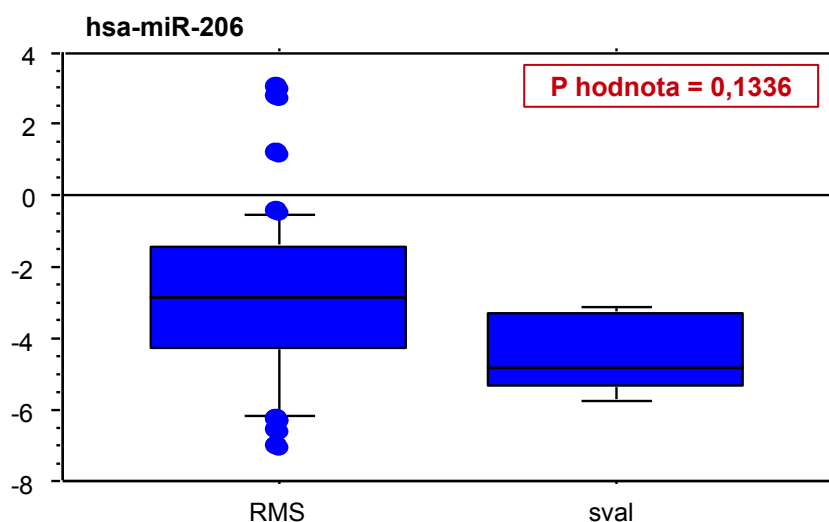


Graf. 18 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133a. Táto špecifická myomiR je porovnávaná svojou výškou expresie medzi aRMS a eRMS podtypom. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty > 0,9999.

5.3.7 Porovnanie expresie myomiRs v RMS oproti svalovému tkanivu

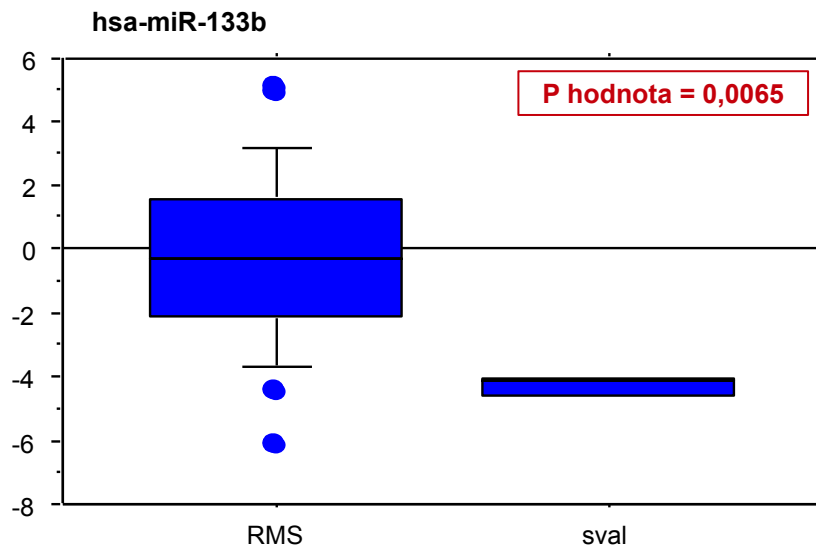
V grafoch 19-21 sú zobrazené hladiny expresie jednotlivých študovaných myomiRs, analyzované na základe rozdielnej expresie vo vzorkách pacientov s diagnostikovaným typom RMS oproti kontrolnej vzorke nenádorového svalového tkaniva. Štatistické spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou Mann-Whitneyho testu, zostaveného pre dve nezávislé skupiny vzoriek.

V grafe 19 sú zobrazené hladiny expresie špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách pacientov s RMS, porovnané s výškou expresie tejto mikroRNA v nenádorovom svalovom tkanive. P hodnota súboru je rovná hodnote 0,1336, čo nepodporuje možnosť existencie vzťahu medzi príslušnými premennými. Rozdiel medzi mediánmi nie je štatisticky významný.



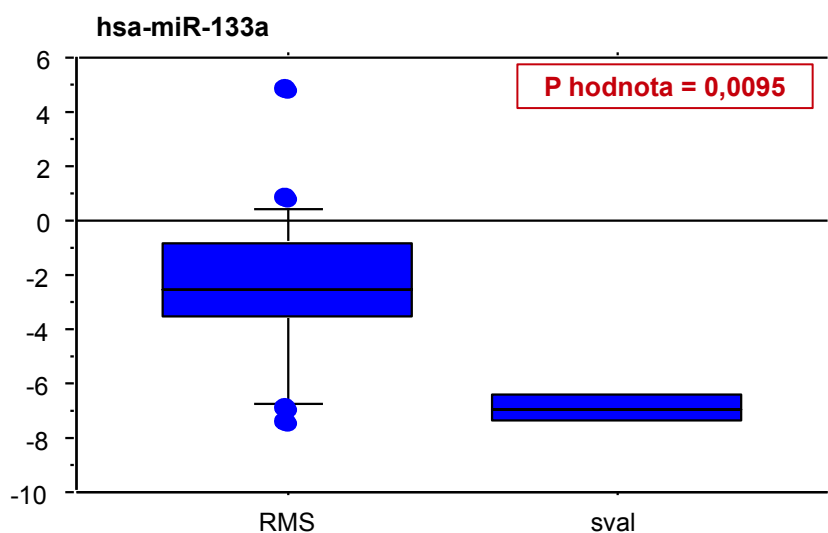
Graf. 19 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-206. Špecifická myomiR je porovnávaná na základe výšky expresie medzi vzorkami RMS a svalovým tkanivom. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,1336.

V grafe 20 je zobrazená hladina expresie špecifickej myomiR-133b s porovnaním medzi vzorkami rôznych typov RMS a vzorkami nenádorového svalového tkaniva. P hodnota sa rovná 0,0065, čo robí výsledok tohto testu štatisticky významným.



Graf. 20 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133b. Špecifická myomiR je porovnávaná na základe výšky expresie medzi vzorkami RMS a svalovým tkanivom. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0065.

Graf 21 zobrazuje porovnanie rozdielnych hladín expresie špecifickej hsa-miR-133a vo vzorkách s diagnózou RMS oproti nenádorovým vzorkám svalu. P hodnota je rovná 0,0095, čo taktiež štatisticky znamená významnosť a preukázný vzťah medzi premennými.

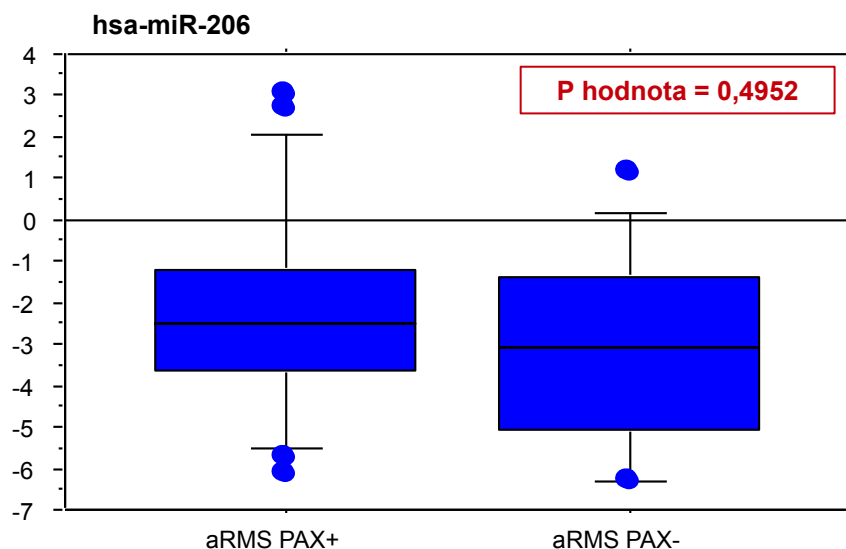


Graf. 21 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133a. Špecifická myomiR je porovnávaná na základe výšky expresie medzi vzorkami RMS a svalovým tkanivom. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0095.

5.3.8 Porovnanie expresie myomiRs pri aRMS PAX+ a aRMS PAX-

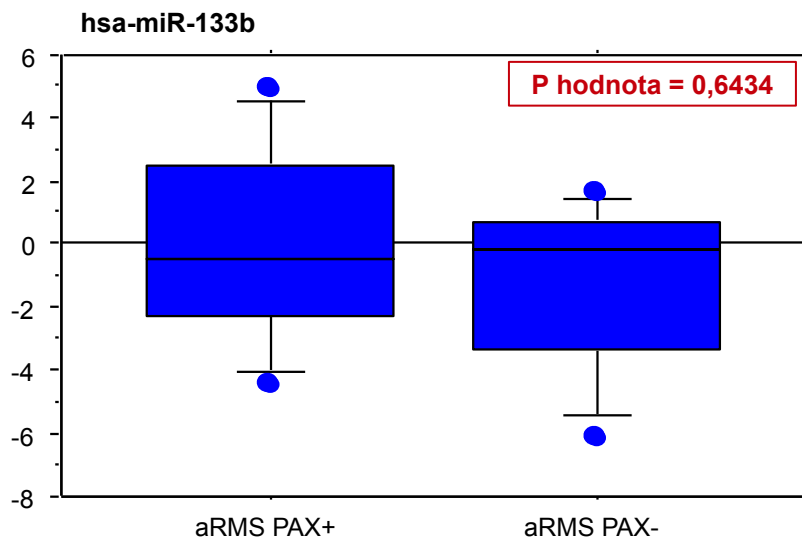
Grafy 22-24 zobrazujú merané hladiny expresie jednotlivých príslušných svalovo-špecifických mikroRNA vo vzorkách pacientov s diagnózou alveolárneho typu RMS, s rozdelením na prognosticky rozdielne fúzne pozitívne a fúzne negatívne formy aRMS. Štatistické spracovanie dát bolo vyhodnotené pomocou Mann-Whitneyho testu.

Graf 22 porovnáva hladiny expresie svalovo-špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách pacientov s diagnostikovanými aRMS PAX+ alebo aRMS PAX-. P hodnota štatistického súboru je rovná hodnote 0,4952, čo znamená, že výsledky a vzťah premenných nie sú štatisticky významné.



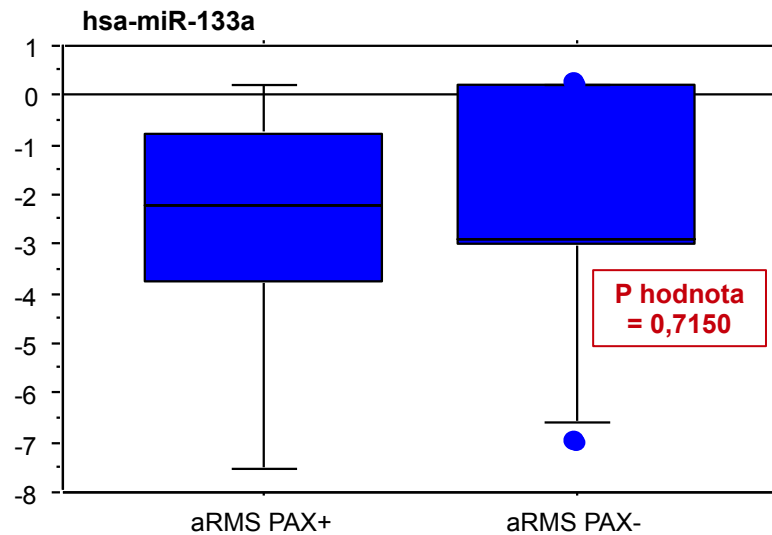
Graf. 22 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-206. Svalovo-špecifická mikroRNA je analyzovaná na základe výšky svojej expresie medzi vzorkami aRMS PAX+ a aRMS PAX-. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,4952.

Graf 23 zobrazuje porovnanie exprimovaných hladín špecifickej hsa-miR-133b vo vzorkách fúzne pozitívnych a fúzne negatívnych aRMS. P hodnota = 0,6434, čo taktiež značí štatiticky nevýznamný výsledok testu.



Graf. 23 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133b. Svalovo-špecifická mikroRNA je analyzovaná na základe výšky svojej expresie medzi vzorkami aRMS PAX+ a aRMS PAX-. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,6434.

V grafe 24 je zobrazený rozdiel exprimovanej hladiny špecifickej myomiR-133a vo vzorkách s fúzne pozitívnym a fúzne negatívnym aRMS. P hodnota súboru sa rovná hodnote 0,7150, čo je tiež vysoko nad hranicou štatistickej významnosti bez dokázanej existencie vzťahu medzi premennými.

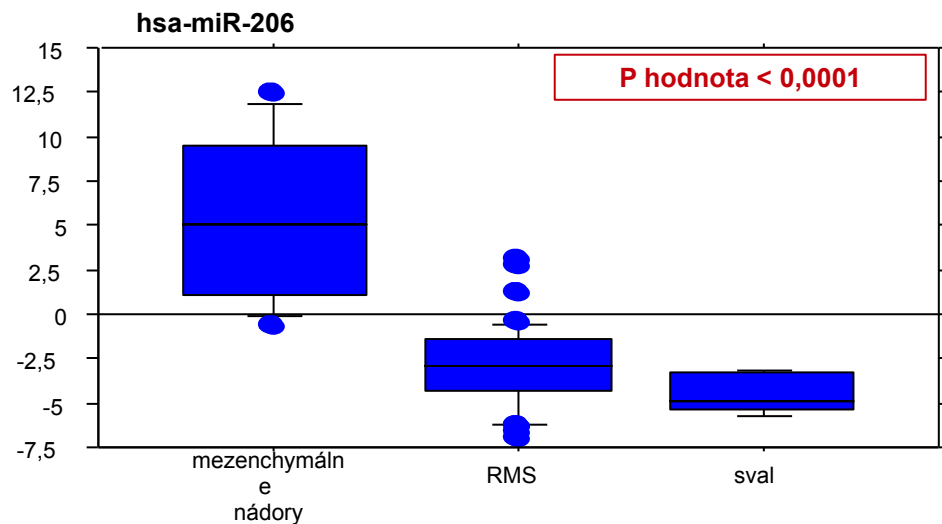


Graf. 24 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133a. Svalovo-špecifická mikroRNA je analyzovaná na základe výšky svojej expresie medzi vzorkami aRMS PAX+ a aRMS PAX-. Vpravo je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,7150.

5.3.9 Porovnanie expresie myomiRs pri RMS, mezenchymálnych nádoroch a svalovom tkanive

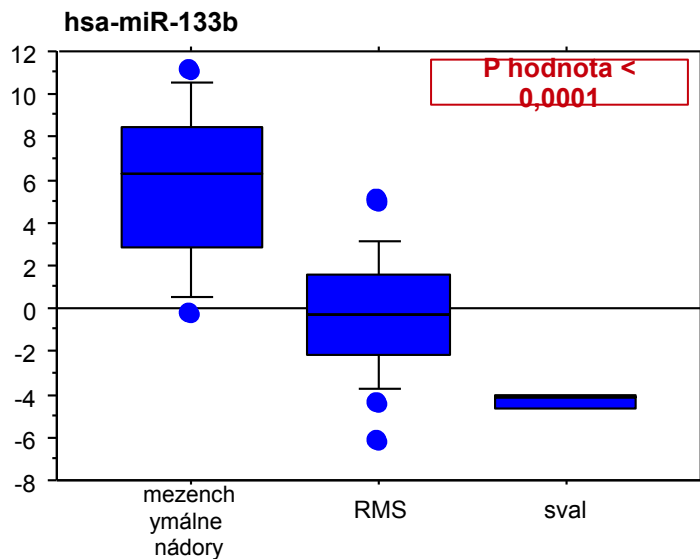
V nižšie uvedených grafoch 25-27 sú zobrazené hladiny expresie jednotlivých študovaných svalovo-špecifických mikroRNA, analyzované na základe rozdielnej expresie vo vzorkách pacientov s diagnózou RMS, vzorkách rôznych typov mezenchymálnych nádorov a vzorkách nenádorového svalového tkaniva. Štatistické spracovanie súboru dát bolo vyhodnotené pomocou Kruskal-Wallisovho testu.

Graf 25 poukazuje na rozdielne hladiny expresie špecifickej hsa-miR-206 vo vzorkách pacientov s RMS a vzorkách kontrolných skupín mezenchymálnych nádorov či nenádorového tkaniva svalu. P hodnota súboru je $< 0,0001$, čo znamená existujúci vzťah medzi premennými a naozaj vysokú štatistickú významnosť.



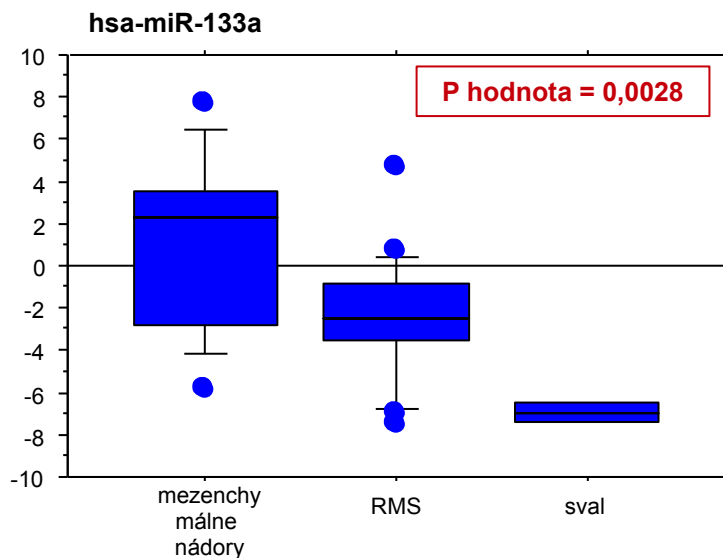
Graf. 25 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-206. Svalovo-špecifická mikroRNA je porovnávaná na základe výšky expresie v kontrolných vzorkách mezenchymálnych nádorov, vzorkách RMS a vzorkách nenádorového svalového tkaniva. V pravom rohu je vpísaná stanovená P-hodnota $< 0,0001$.

Graf 26 rovnako zobrazuje rozdielne hladiny expresie študovanej svalovo-špecifickej miR-133b vo vzorkách rôznych typov RMS, vzorkách rôznych typov mezenchymálnych nádorov či vzorkách svalového nenádorového tkaniva. P hodnota $< 0,0001$ taktiež znamená vysokú štatistickú významnosť bez náhodného rozdielu medzi mediánmi.



Graf. 26 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133b. Svalovo-špecifická mikroRNA je porovnávaná na základe výšky svojej expresie medzi kontrolnými vzorkami mezenchymálnych nádorov, vzorkami RMS a vzorkami nenádorového svalového tkaniva. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty < 0,0001.

V grafe 27 sú hladiny exprimovanej špecifickej hsa-miR-133a vo vzorkách RMS, mezenchymálnych nádorov a svalového tkaniva menej výrazne rozdielne ako v predošlých myomiRs, no taktiež dobre viditeľné, čo potvrdzuje aj P hodnota = 0,0028, čím potvrdzuje štatistickú významnosť.



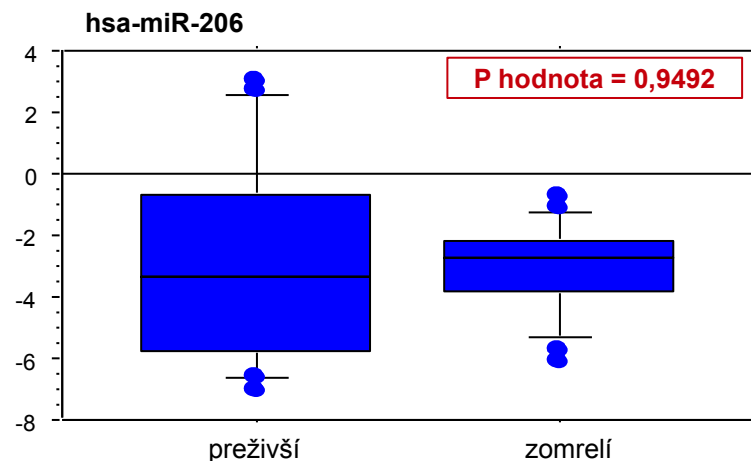
Graf. 27 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133a. Svalovo-špecifická mikroRNA je porovnávaná na základe výšky svojej expresie medzi kontrolnými vzorkami mezenchymálnych nádorov,

vzorkami RMS a vzorkami nenádorového svalového tkaniva. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,0028.

5.3.10 Porovnanie expresie myomiRs v prípadoch preživších a zomrelých pacientov

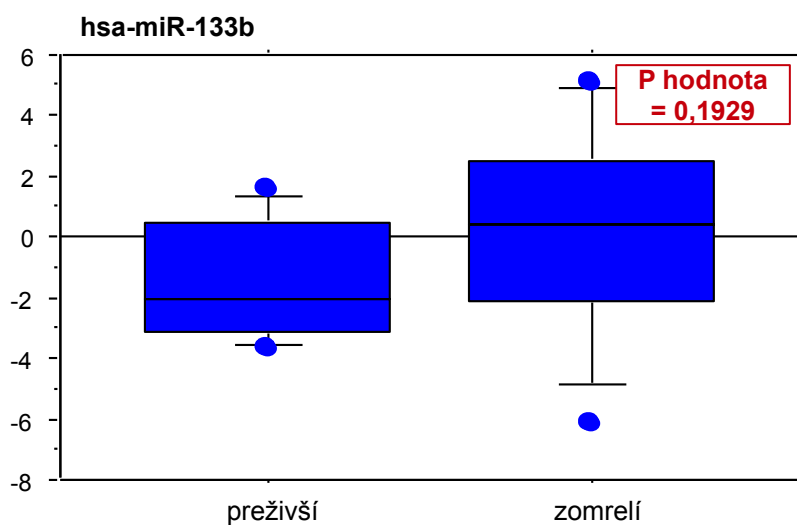
Posledná trojica grafov (28-30) sa sústreďujú na porovnanie hladín expresie jednotlivých svalovo-špecifických mikroRNA vo vzorkách pacientov s diagnózou RMS, no so zameraním na možný prognostický význam myomiRs, kedy by mali odzrkadľovať rôznu hladinu expresie v prognosticky pozitívnejších, alebo naopak negatívnejších prípadoch RMS, často končiacich úmrtím pacienta. Štatistické spracovanie dát bolo vyhodnotených pomocou analytického Mann-Whitneyho testu pre dve nezávislé skupiny vzoriek.

Graf 28 zobrazuje porovnanie hladín expresie špecifickej hsa-miR-206 pri vzorkách pacientov preživších / zomrelých po diagnostikovaní RMS. P hodnota sa rovná hodnote 0,9492, čo je vysoko nad hranicou významnosti, analýza a rozdielne hodnoty mediánov teda nie sú štatisticky významné.



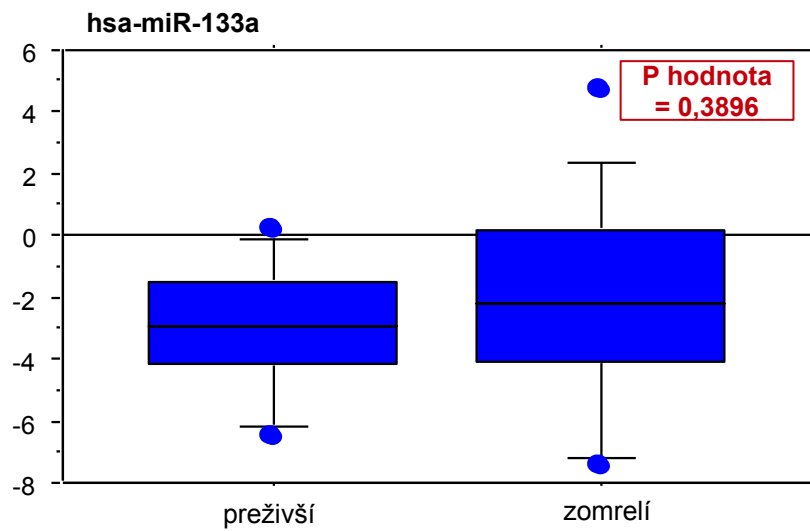
Graf. 28 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-206. Rozdiel výšky expresie príslušnej svalovo-špecifickej mikroRNA je porovnávaný na vzorke pacientov na základe ich prežitia či úmrtnosti po diagnostikovaní RMS. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,9492.

V grafe 29 je taktiež zobrazená rozdielna výška expresie svalovo-špecifickej miR-133b vo vzorkách prognosticky rozdielnych prípadov RMS. P hodnota = 0,1929 však znova znamená štatistickú nevýznamnosť výsledkov testu.



Graf. 29 Štatistické vyhodnotenie (box plot) hladín expresie miR-133b. Rozdiel výšky expresie príslušnej svalovo-špecifickej mikroRNA je porovnávaný na vzorke pacientov na základe ich prežitia či úmrtnosti po diagnostikovaní RMS. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,1929.

Na poslednom grafe (Graf. 30) vidíme porovnanie dvoch skupín vzoriek pacientov s diagnózou RMS na základe výšky expresie svalovo-špecifickej miR-133a v oboch skupinách. P hodnota = 0,3896. Rozdiel medzi mediánmi je dôsledkom náhody a nie je štatisticky významný. Medzi premennými nie je žiaden vzťah.



Graf. 30 Štatistické vyhodnotenie (*box plot*) hladín expresie miR-133a. Rozdiel výšky expresie príslušnej svalovo-špecifickej mikroRNA je porovnávaný na vzorke pacientov na základe ich prežitia či úmrtnosti po diagnostikovaní RMS. V pravom hornom rohu je vpísaná stanovená hladina P-hodnoty = 0,3896.

6. Diskusia

6.1 Ambion kit versus Norgen kit

Pri postupe izolácie nukleových kyselín sme mali možnosť pracovať s dvoma rozdielnymi kitmi dvoch rôznych značiek, čím sme sa dostali k otázke vzájomného porovnania týchto kitov a výslednej kvalite žiadanej vyizolovanej vzorky. Prvý kit *FFPE RNA Purification Kit* pochádzal od kanadskej firmy Norgen Biotek Corp., druhý *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit* značky Ambion® od Life Technologies. Pomocou oboch kitov sme izolovali vzorky, zaliate v parafrínových bločkoch (FFPE). Základným postupom sa protokoly výrazne nelíšia, princíp u oboch spočíva v kolónkovej izolácii. Po úvodnej deparafrinizácii a premytia peletky nasleduje rozklad proteázou a priame naviazanie RNA na kolónku. Kit od Norgen-u tu okrem bežného disponuje aj dobrovoľným krokom na maximálne odstránenie prítomnej DNA, zatiaľ čo Ambion® používa DNázový mix vrátane prirodzeného postupu. Následným premývaním vzorky sa dostávame k finálnej purifikácii. Komponenty k oboj jednotlivým postupom sú okrem destilovanej vody, xylénu a etanolu dodávané v balení kitu.

Podľa možností sme vzorky vyizolovali pomocou oboch kitov v pomere 70 : 12 (Norgen : Ambion®). Následný postup bol pre všetky vzorky rovnaký, po špecifickej reverznej transkripcii mikroRNA do podoby cDNA sa vzorka kvantifikovala pomocou PCR v reálnom čase na princípe protokolu *TaqMan® MicroRNA Assays*. Nakoniec boli dosiahnuté výsledky analyzované na základe výpočtu pomocou C_t hodnoty u dvoch svalovo-špecifických mikroRNA, a to miR-206 a miR-133b.

Porovnaním hladín expresie oboch miRNA samostatne sme dostali hodnoty priemeru a mediánu naozaj výrazne podobné u oboch porovnávaných kitov.

Na podobné zrovnanie komerčných izolačných kitov sa zamerala aj štúdia od Li a Kowdley, v ktorej boli zahrnuté aj nami porovnávané kity od Ambion® a Norgen. Vo svojej práci zrovnávali kvalitu a množstvo výtazku RNA za účelom zdokonalenia izolačných protokolov pre miRNA z hľadiska ich potenciálneho využitia ako

diagnostických či prognostických biomarkerov nádorových ochorení. Izolácie nukleových kyselín a následné merania hladín expresie však prevádzali na vzorkách krvi, oproti našim vzorkám FFPE. Testované boli navyše vzorky pacientov s rôznymi diagnózami mimo rabdomyosarkómov, či viacerými typmi miRNA, avšak mimo svalovo-špecifické myomiRs. Vo svojich výsledkoch, narozdiel od našich, publikujú, že kit od Ambion® mal vyšší percentuálny výťažok ako aj kvalitu vyizolovanej miRNA oproti kitu Norgen (Li a Kowdley, 2012).

Podobná štúdia bola realizovaná kanadskou skupinou Lam a kol., v ktorej analyzovali hladiny génovej expresie na základe rôznych parametrov vo vzorkách dlhých aj krátkych RNA molekúl, vrátane miRNA. Vzorky boli izolované na základe štyroch rôznych postupov, medzi ktorými boli aj protokoly Ambion® a Norgen kitov. Už meraním kvality a kvantity vyizolovanej RNA sa hodnoty pohybovali celkom blízko. Vyhodnotením dát z RQ-RT-PCR sa preukazuje kvalitatívne značná podobnosť oboch kitov, pre príklad pri miR-let7a bola hodnota ΔC_t po izolácii kitom Norgen rovná $10,1 \pm 0,3$, po izolácii kitom Ambion® bola hodnota ΔC_t rovná $10,6 \pm 0,9$. Výsledky tejto práce teda podporujú našim, keď poukazujú na kvalitné, hodnotné a hlavne značne porovnateľné výsledky oboch izolačných kitov rôznych značiek (i4).

Odvíjajúc sa od našich výsledkov a tým zhodnotenia značne vysokej podobnosti výslednej kvality izolácie na základe oboch protokolov, žiaden z nich teda výraznejšie oproti druhému neuprednostňujeme. Dáta sú však zatiaľ súčasné a priebežne budú ďalej doľňané pre optimálnejšiu štatistiku a analýzu čo sa týka porovnania oboch izolačných kitov navzájom.

6.2 FFPE / zmrazené vzorky tkanív

Formalínom fixované tkanivá v podobe vzoriek nukleových kyselín, archivovaných v parafínových bločkoch (FFPE) majú z hľadiska klinického aj praktického veľký význam z pohľadu informatívnosti, či uchovania tkaniva ako zdroja nukleovej kyseliny. Aj napriek často značnej fragmentácii či chemickej modifikácii uchovávanej NK je FFPE obzvlášť

vyho vujúcim spôsobom skladovania vzoriek, vhodných k ďalšiemu štúdiu . Okrem toho bolo preukázané, že fragmentácia RNA v parafínových bločkoch podlieha degradácii len do určitého veľkostného bodu a to približne do dĺžky 80 nukleotidov. Nakoľko sú mikroRNA podstatne malými molekulami (18 až 24 nukleotidov), v takejto chvíli majú pri fragmentácii dĺžkovú výhodu a procesom fixácie nie sú významne zasiahnuté (Liu a Xu, 2011).

Liu a Xu vo svojej štúdií porovnávali FFPE oproti vzorkám zmrazeného tkaniva, pochádzajúcich z rovnakej vzorky tkaniva. Expresné profily miRNA merali pomocou komerčne dostupných miRNA microarrays či kvantitatívnej PCR v reálnom čase. Podrobnejšími výsledkami zastávajú názor, že expresia miRNA zo vzorky FFPE je meranou hladinou veľmi blízko podobná meraným vzorkám zmrazených tkanív (Liu a Xu, 2011).

Xi a kol. vo svojej práci zdôrazňuje štatistickú neexistenciu signifikantného rozdielu medzi analýzou expresného profilu miRNA , izolovanej z FFPE alebo vzorky zmrazeného tkaniva, pričom stabilitu miRNA nezmenili ani rôzne "staré" vzorky FFPE. Štatistickú významnosť dokladá dosiahnutými P-hodnotami $< 0,05$ (Xi a kol, 2007).

Výsledky práce Li a kol. zobrazujú hladiny expresie miRNA, vyizolovanej z FFPE, dokonca vyššie ako pri vyizolovaných vzorkách zo zmrazených tkanív. Vysvetľujú si to hlavne zvýšenou kvantitou miRNA vo vzorkách FFPE, ktorých dĺžka je v tomto prípade výhodou (Li a kol., 2007).

S podporou viacerých štúdií teda namerané výsledky inklinujú k skutočnosti, že tkanivo, uchovávané vo forme FFPE, je viac ako vhodným zdrojom pre analýzy hladín expresie molekúl mikroRNA. Tieto malé molekuly majú výhodu svojej krátkej dĺžky, vďaka čomu materiál zostáva celkovo v hodnotnom stave pre rôzne typy analýz. Zhromažďujúce sa dáta tejto práce vychádzajú zo zatiaľ nepublikovaných dát (Krsková a kol., nepublikované údaje), na ktorých sa stále ďalej pracuje.

6.3 Vyhodnotenie hladín expresie špecifických myomiRs v rôznych typoch vzoriek

Rabdomyosarkómy dnes predstavujú najčastejšie sa vyskytujúci nádor mäkkých tkanív u pediatrických pacientov s pomerne agresívnym klinickým fenotypom a zúfalým nedostatkom sérových diagnostických či prognostických markerov.

MikroRNA sa v posledných rokoch stáva stále viac prítlačlivou témou v oblasti nádorových ochorení a tak sa otázky a požiadavky vzťahujú v súčasnosti hlavne k týmto malým nekódujúcim molekulám. Svalovo-špecifické mikroRNA sa nazývajú myomiRs a my sme sa v tejto práci zamerali na sledovanie hladiny expresie práve týchto molekúl so vzťahom k myogénnej regulácii a pri ich abnormálnych hladinách expresie voči ochoreniu RMS (Slabý, 2012).

Všetky príslušné vzorky, zahrnuté v tejto práci boli vyizolované špeciálnymi postupmi pre izoláciu, špecifickou RT boli prepísané do cDNA, následne boli kvantifikované pomocou PCR reakcie, meranej v reálnom čase a príslušné dáta boli štatisticky spracované do podoby vyhodnotenia celkovej štatistickej významnosti.

Celkovo 82 vzoriek bolo rozdelených do podskupín vo forme variant RMS a kontrolných vzoriek v podobe mezenchymálnych nádorov a svalového nenádorového tkaniva.

Do hlavnej úlohy študovaných mikroRNA z rodiny svalovo-špecifických myomiRs boli do tejto práce vybraté: miR-206, miR-133b, miR-133a. Svalovo-špecifické miRNA sa v ochoreniach rabdomyosarkómov prirodzene javia ako pod-exprimované v porovnaní s nenádorovým svalovým tkanivom.

Vzorky mozgového tkaniva sa dostali do tejto štúdie so záujmom porovnania jeho výšky expresie oproti svalovo-špecifickým mikroRNA a ako doplňujúce kontrolné vzorky iného pôvodu. Podľa očakávania boli hladiny expresie vzorky mozgu oproti svalovým

vzorkám veľmi nízke, nevykazovali žiaden vzdialený kontaktný vzťah, tobôž nie inak štatisticky významný voči testovaným vzorkám ako doplnujúca kontrola.

Štatisticky najvýznamnejšie je celkové porovnanie špecifických myomiRs vrámci hlavných typov RMS, svalového tkaniva a vzoriek mezenchymálnych nádorov. Hladiny expresie myomiRs sú viditeľne významne vyššie oproti kontrolným vzorkám nádorov mezenchymálnych tkanív. Všetky tri študované svalovo-špecifické mikroRNA sú v týchto výsledkoch štatisticky vysoko signifikantné (Graf. 1, 2, 3), na čom dnes pracuje mnoho štúdií s perspektívnym využitím v klinickej praxi.

Špecifickejšie porovnanie s ohľadom na rozdielnú expresiu voči kontrolným vzorkám mezenchymálnych nádorov môžeme vidieť v grafoch 4 až 6. Hladiny expresie svalového tkaniva korelujú s výškou expresie dvoch najčastejšie sa vyskytujúcich variant RMS, aRMS a eRMS. Čo sa týka miR-133a, viditeľne je už expresia medzi RMS a mezenchymálnymi nádormi viac vyrovnaná, no všetky tri myomiRs sú stále v hladinách vysoko štatisticky signifikantné.

Čo sa týka špecifického porovnania výšky expresie aRMS a eRMS oproti nenádorovému svalovému tkanivu, miR-206 ustupuje z popredia štatistickej významnosti a pozornosť sa zameria viac na svalovo-špecifické miR-133a a miR-133b, ktoré zostávajú štatisticky signifikantné a jasne vidno rozdiel oproti nenádorovému svalovému tkanivu s vyššou hladinou expresie myomiRs. MiR-133a je oproti miR-133b v tomto prípade exprimovanejšia (graf. 8, 9).

Pri porovnávaní hladín expresie myomiRs jednotlivo, najprv u aRMS, v druhom prípade u eRMS voči vzorke nenádorového svalového tkaniva, miR-206 skončila znova bez štatistického významu (Graf. 10, 13). MiR-133b a miR-133a majú v oboch prípadoch signifikantné hladiny expresie, pričom miR-133a (Graf. 12, 15) je znova exprimovaná o niečo silnejšie oproti miR-133b (Graf. 11, 14).

Zaujímavým a podstatným je porovnanie hladín expresie myomiRs u dvoch najčastejšie sa vyskytujúcich variant RMS, a to aRMS a eRMS. Štatisticky preukáznou je miR-206, pričom u eRMS mala vyššiu hladinu expresie. Na základe down-regulácie myomiRs v nádorovom ochorení, tým pádom sa miR-206 ukazuje byť významnejšie prognostickým markerom pre typ alveolárnej formy RMS (Graf. 16). Hladiny expresie myomiRs 133a a 133b sú v tomto prípade vysoko nepreukázne, u miR-133a je P hodnota dokonca vyššia ako 0,9999 (Graf.18). Tomuto výsledku nahráva aj štúdia od Missiaglia a kol, v ktorej sa venuje expresii miR-206 a podobne jako v tejto práci, expresná hladina miR-206 bola vo vzorkách RMS down-regulovaná oproti kontrolnému nenádorovému svalovému tkanivu a pritom signifikantne vyššia oproti kontrolným vzorkám mezenchymálnych typov nádorov. Znížená expresia miR-206, hlavne pri aRMS koreluje s horšou prognózou prežívania (Missiaglia a kol., 2010).

Zrovnanie exprimovaných hladín myomiRs všeobecne pri skupine RMS oproti kontrolnému nenádorovému svalovému tkanivu je štatisticky signifikantné v prípade myomiRs 133a a 133b, pričom expresia miR-133a je približne dvakrát vyššia ako u miR-133b (Graf. 20, 21). Vyššia hladina expresie miR-206 priamo vplyva na gény, ovplyvňujúce diferenciaciu svalových tkanív (Missiaglia a kol, 2010).

Jedným z najdôležitejších hodnotení výšky expresie je určite porovnanie exprimovaných hladín jednotlivých myomiRs pri alveolárnom type RMS. aRMS je druhý najčastejšie sa vyskytujúci typ RMS, avšak prognosticky výrazne menej priaznivý. Typický je výskytom fúzne pozitívnych génov *PAX3-FKHR* alebo *PAX7-FKHR*, čo často pomáha pri správnej a rýchlejšej diagnostike tejto formy RMS, no bežne sa tieto fúzne gény vyskytujú len v asi 75 % prípadov aRMS, čo robí stále nepostrádateľným lov na spoľahlivejší marker tohto typu ochorenia (McDowell, 2003).

Hladina expresie jednotlivých myomiRs bola porovnávaná medzi vzorkami fúzne pozitívnej a fúzne negatívnej formy aRMS. Ani jedna svalovo-špecifická mikroRNA však v tomto prípade k štatistickej významnosti blízko nemala (Graf. 22, 23, 24).

Podľa Missiaglia a kol. je však znížená expresia spojená tiež s kratším prežívaním pri metastatickej forme eRMS a aRMS fúzne negatívnej varianty (Missiaglia a kol, 2010).

Na zhodnotenie hladín expresie jednotlivých myomiRs sa s širším merítkom pozerá porovnanie celej skupiny RMS so svalovým nenádorovým tkanivom a vzorkami mezenchymálnych nádorov. Všetky tri študované svalovo-špecifické mikroRNA sú v tomto prípade štatisticky preukázne. RMS má najnižšiu hladinu expresie u miR-133b (Graf. 26).

Poslednou otázkou a cieľom práce bola potenciálna úloha svalovo-špecifického markeru v oblasti prognózy. Zostavili sme preto dve rôzne skupiny so vzorkami prognosticky priaznivejšími v podobe "preživších" pacientov oproti vzorke prognosticky nepriaznivej v podobe "zomrelých" pacientov. Dosiaľ dokončená vzorka pacientov bola v každom študovanom type svalovo-špecifických mikroRNA štatisticky absolútne nepreukázna (Graf. 28, 29, 30), no stále pokračuje zbieranie väčšej a širšej vzorky dát, dúfajme k štatistickej významnosti.

7. Súhrn

Na základe expresných analýz a štatistických výsledkov je významná úloha svalovo-špecifických mikroRNA vo vzorkách pacientov s rabdomyosarkómami nepopierateľná. Prirodzene majú tieto tzv. myomiRs vo vzorkách s RMS značne nižšiu hladinu expresie oproti normálnemu nenádorovému svalovému tkanivu. Výraznejšie pod-exprimovaná je hlavne mikroRNA-206 s jednoznačne preukázaným vplyvom na klinické správanie RMS.

Hladiny expresie jednotlivých myomiRs boli porovnávané a štatisticky analyzované voči kontrolným skupinám mezenchymálnych nádorov (oproti ktorým boli myomiRs výrazne nad-exprimované), nenádorového svalového tkaniva (oproti ktorému boli vždy pod-exprimované) a vrámci jednotlivých podskupín RMS navzájom, kde zohráva hlavnú úlohu zase miR-206 s nízkou expresiou hlavne pri aRMS, čím sa spája s horšou prognózou tohoto ochorenia.

Vzájomným porovnaním (ako na základe postupu, tak na základe štatistiky) dvoch komerčných kitov použitých v tejto štúdií sme dostali až prekvapivo podobné hodnoty mediánov vyzolovaných vzoriek so študovanými svalovo-špecifickými miR-206 a miR-133b. Taktiež porovnanie dlhodobého skladovania vzoriek tkanív vo forme FFPE alebo zmrazených vzoriek tkanív preukazuje hodnoty veľmi podobné, čím s FFPE robí materiál úrovne rovnakej kvality ako je zmrazené tkanivo. Vďaka tomu hlavne krátka dĺžka mikroRNA, ktorou sa tieto nekódujúce molekuly často vyhnú fragmentácii pri postupe fixácie vzorky do parafínu.

Každopádne budeme v štúdií pokračovať a postupne ju rozširovať a ideálne jej výsledky raz budú mať potenciálny vplyv na kandidatúru týchto myomiRs ako prípadných diagnostických či prognostických markerov v patogenéze rabdomyosarkómov!

8. Zoznam použitej literatúry

Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*. 2005; 122(4):553-63.

Barr FG. Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene*. 2001; 20(40):5736-46.

Bartel PD. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004; 116:281–297.

Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem*. 2002; 48(8):1178-85.

Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109(4):365-79.

Carroll SJ, Nodit L. Spindle cell rhabdomyosarcoma: a brief diagnostic review and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2013; 137(8):1155-8.

Egas-Bejar D, Huh WW. Rhabdomyosarcoma in adolescent and young adult patients: current perspectives. *Adolescent Health, Medicine and Therapeutics*. 2014; 5:115–125.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(4):259-69.

Ferrari A, Dileo P, Casanova M, Bertulli R, Meazza C, Gandola L, Navarria P, Collini P, Gronchi A, Olmi P, Fossati-Bellani F, Casali PG. Rhabdomyosarcoma in adults. A retrospective analysis of 171 patients treated at a single institution. *Cancer*. 2003; 98(3):571-80.

Folpe AL, McKenney JK, Bridge JA, Weiss SW. Sclerosing rhabdomyosarcoma in adults: report of four cases of a hyalinizing, matrix-rich variant of rhabdomyosarcoma that may be confused with osteosarcoma, chondrosarcoma, or angiosarcoma. *Am J Surg Pathol*. 2002; 26(9):1175-83.

Han L, Witmer PD, Casey E, Valle D, Sukumar S. DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol Ther.* 2007; 6(8):1284-8.

He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004; 5(7):522-31.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996; 6(10):986-94.

Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell.* 2003; 5(2):351-8.

Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(1):22-32.

Chen Q, Lu W, Li B. Primary sclerosing rhabdomyosarcoma of the scalp and skull: report of a case and review of literature. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(2):2205–2207.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(20):e179.

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6(5):376-85.

Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet.* 2006; 22(3):165-73.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001; 294:853–858.

Lee EJ, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, Schmittgen TD. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA.* 2008; 14(1):35-42.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes smallRNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75(5):843-54.

Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnology*. 2007; 7:36.

Li Y, Kowdley KV. Method for microRNA isolation from clinical serum samples. *Anal Biochem*. 2012; 431(1): 69–75.

Liu A, Xu X. MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods Mol Biol*. 2011; 724:259-67.

McCarthy JJ. MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1779(11):682–691.

McDowell H. Update on childhood rhabdomyosarcoma. *Arch Dis Child*. 2003; 88(4):354–357.

Mendell JT. MicroRNAs: Critical Regulators of Development, Cellular Physiology and Malignancy. *Cell Cycle*. 2005; 4(9):1179-1184.

Merlino G, Helman LJ. Rhabdomyosarcoma – working out the pathways. *Oncogene*. 1999; 18(38):5340-8.

Missiaglia E, Shepherd CJ, Patel S, Thway K, Pierron G, Pritchard-Jones K, Renard M, Sciot R, Rao P, Oberlin O, Delattre O, Shipley J. MicroRNA-206 expression levels correlate with clinical behaviour of rhabdomyosarcomas. *Br J Cancer*. 2010; 102(12):1769-77.

Nascimento AF, Barr FG. Spindle cell/sclerosing rhabdomyosarcoma. In: Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F, editors. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 4th edn. Lyon: IARC Press; 2013. pp. 134–135.

Novák J, Kružliak P, Bienertová-Vašků J, Slabý O, Novák M. MicroRNA-206: a Promising Theranostic Marker. *Theranostics*. 2014; 4(2):119-133.

- Olena AF, Patton JG. Genomic Organization of microRNAs. *J Cell Physiol.* 2010; 222(3): 540–545.
- Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, Zhang X, Song JS, Fisher DE. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* 2008; 22(22):3172-83.
- Parham DM. Pathologic classification of rhabdomyosarcomas and correlations with molecular studies. *Mod Pathol.* 2001; 14(5):506-14.
- Rao PK, Missiaglia E, Shields L, Hyde G, Yuan B, Shepherd CJ, Shipley J, Lodish HF. Distinct roles for miR-1 and miR-133a in the proliferation and differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *The FASEB Journal.* 2010; 24(9):3427-3437.
- Rota R, Ciarapica R, Giordano A, Miele L, Locatelli F. MicroRNAs in rhabdomyosarcoma: pathogenetic implications and translational potentiality. *Molecular Cancer.* 2011; 10:120.
- Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biology.* 2004; 5(3):R13.
- Slabý O. MikroRNA: historie, definice, biogeneze a funkce. Houdek L. (ed.): MikroRNA v onkologii. Galén, Praha, 2012, 1-29.
- Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, Bridge JA, Crist WM, Triche TJ, Barr FG. *PAX3-FKHR* and *PAX7-FKHR* gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol.* 2002; 20(11):2672-9.
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* 2003; 17(1):49-63.
- Weiss SW, Goldblum JR: Rhabdomyosarcoma. In Weiss SW, Goldblum JR (eds). *Enzinger and Weiss's soft tissue tumors.* 4th ed., St. Louis, CV Mosby, 2001, 785-835.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. Elegans*. *Cell.* 1993; 75(5):855-62.

Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*. 2007; 13(10):1668-74.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of *HOXB8* mRNA. *Science*. 2004; 304(5670):594-6.

Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: The stem cell that came in from the cold. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2006; 54(11):1177-1191.

Internetové zdroje:

i1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/> (11.8.2015)

i2: <http://rimarcik.com/navigator/kw.html> (11.8.2015)

i3: <http://rimarcik.com/navigator/n-ordinal.html> (11.8.2015)

i4: https://norgenbiotek.com/sites/default/files/resources/total_rna_purification_kit_rna_quality_assessment_and_the_effect_on_gene_expression_studies_presented_at_ascb_2008_posters_68.pdf (11.8.2015)