

**Univerzita Karlova**

**3. lékařská fakulta**

Studijní obor: Biologie a patologie buňky



**MUDr. Arpád Szabó**

Expres miRNA v adenokarcinomu pankreatu – vztah k morfológickým  
charakteristikám a prognóze onemocnění.

Expression of miRNAs in pancreatic adenocarcinoma – relationship to morphological  
characteristics and disease prognosis.

**Disertační práce**

Školitel: prof. MUDr. Václav Mandys, CSc.

Praha, 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podrobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 1. 6. 2020

Arpád Szabó

## **Identifikační záznam**

SZABÓ, Arpád. *Expresie miRNA v adenokarcinomu pankreatu - vztah k morfológickým charakteristikám a prognóze onemocnění [Expression of miRNAs in pancreatic adenocarcinoma – relationship to morphological characteristics and disease prognosis]*.

Praha, 2020. 93 stran a 2 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta.

Vedoucí práce: prof. MUDr. Václav Mandys, CSc.

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl velmi poděkovat svému vedoucímu disertační práce prof. MUDr. Václavovi Mandysovi, CSc. za jeho dlouhodobou profesionální motivaci a podporu při sepisování této disertační práce.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Alexejovi Popovovi, Ph.D., prof. MUDr. Zdence Vernerové, CSc. a všem dalším členům našeho týmu pro kolegiální podporu při vykonání pokusů a sdělení vědecké motivace. Chtěl bych poděkovat doc. RNDr. Ladislavovi Pečeňovi, CSc. a MUDr. Peterovi Wohlfahrtovi, Ph.D. za provedení statistické analýzy dat. V neposlední řadě bych poděkoval přednostovi Ústavu patologie 3LF UK prof. MUDr. Radoslavovi Matějovi, Ph.D. a primáři MUDr. Václavovi Eisovi, Ph.D. za vytvoření klidného a přátelského pracovního prostředí.

Zároveň bych chtěl poděkovat mé manželce a svým rodičům za nekonečnou podporu a trpělivosti.

*Experimentální práce vedoucí k výsledkům této práce byla podpořena Karlovou Univerzitou a Třetí lékařskou fakultou grantem PRVOUK-P27/LF a PROGRESS Q28/LF3.*

## OBSAH

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
2	ÚVOD	9
2.1	Duktální adenokarcinom pankreatu	9
2.1.1	Epidemiologie	9
2.1.2	Histologická klasifikace	9
2.1.3	Diagnostika a terapie	9
2.1.4	Prognostické faktory	10
2.1.5	Biomarkery pro PDAC v klinické praxi	11
2.2	Základní charakteristiky miRNA	12
2.2.1	Biogeneze miRNA	12
2.2.2	Mechanismus účinku miRNA	14
2.2.3	Regulace působení miRNA	15
2.2.4	MiRNA v exosomech	16
2.3	Detekce miRNA	17
2.3.1	Metody detekce miRNA	17
2.3.2	Standardizace detekce miRNA	18
2.4	Expresí miRNA v normálních tkáních	20
2.4.1	Expresí miRNA v normální tkáni pankreatu	20
2.5	Úloha miRNA ve vzniku zhoubných nádorů	21
2.5.1	Úloha miRNA v onkogenezi PDAC	22
2.5.2	Změny v expresi miRNA u PDAC	22
2.5.3	Úloha miRNA v tkáňovém mikroprostředí PDAC	23
2.5.4	Úloha exosomů v onkogenezi PDAC	24
2.5.5	Role studovaných oncomiRNA v onkogenezi PDAC	24
2.5.6	Role studovaných tumor-supresorových miRNA v onkogenezi PDAC	26
2.6	MiRNA v prekursorových lézích PDAC	27
2.6.1	Expresí miRNA v PanIN	27
2.6.2	Expresí miRNA v IPMN	28
2.6.3	Expresí miRNA v MCN	29
2.7	Uplatnění miRNA v diagnostice PDAC	30
2.7.1	MiRNA v bioptické diagnostice tumorů pankreatu	30
2.7.2	MiRNA v diagnostice cystických lézí pankreatu	30

2.7.3	Cirkulující miRNA	31
2.7.4	MiRNA v pankreatické šťávě	32
2.7.5	MiRNA ve stolici	33
2.8	Vztah miRNA k diferenciaci a progresi PDAC	34
2.8.1	Hodnocení v chirurgických resekátech	34
2.8.2	Hodnocení v krvi a v sekretech	34
2.9	MiRNA v určení prognózy pacientů s PDAC	36
3	HYPOTÉZY A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	37
3.1	Podklady pro vyslovení hypotéz	37
3.2	Hypotézy a cíle práce	38
4	PACIENTI A METODY	39
4.1	Soubory pacientů	39
4.1.1	Základní charakteristiky pacientů v 1. studii	39
4.1.2	Základní charakteristiky pacientů v 2. studii	39
4.1.3	Základní charakteristiky pacientů z databázy TCGA	40
4.2	Morfologická charakteristika nádorů	40
4.3	Výběr vzorků pro analýzu exprese miRNA	41
4.4	Izolace miRNA a reverzní transkripce	42
4.5	Hodnocení exprese miRNA pomocí qPCR	43
4.6	Statistická analýza	44
4.6.1	První studie	44
4.6.2	Druhá studie	44
5	VÝSLEDKY	45
5.1	Vztah sledovaných exprese miRNA v PDAC k endogenním kontrolám	45
5.2	Stanovení optimálního postupu normalizace pro měření exprese miRNA	47
5.3	Expresse sledovaných miRNA v karcinomech pankreatu	50
5.4	Expresse miRNA a kliniko-patologické charakteristiky pacientů	51
5.5	Expresse sledovaných miRNA a histologická struktura nádoru	52
5.6	Vztah parametrů nádoru a exprese miRNA s přežitím pacientů	53
6	DISKUZE	56
6.1	Hodnocení stability exprese genů pro normalizaci algoritmem Normfinder	56
6.2	Normalizace RT-qPCR pro hodnocení exprese miRNA v PDAC	58
6.3	Vztah histologické stavby PDAC k expresi sledovaných miRNA	61
6.4	Vztah exprese miRNA k progresi nádoru a délce přežití nemocných	62

7 ZÁVĚR	66
8 ABSTRAKT	67
9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71
10 SEZNAM PUBLIKACÍ	93
11 PŘÍLOHY	

## 1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3' UTR	3'nepřepisovaný konec (z angl. UnTranslated Region)
5-FU	5-fluorouracil
AGO	Argonaute
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CA19-9	karbohydrátový antigen 19-9
CAF	nádorem asociovaný fibroblast (z angl. Cancer Associated Fibroblast)
CEA	karcinoembryonální antigen
CT	prahový cyklus (z angl. Cycle Treshold)
EMT	epitelově-mesenchymální přechod
ERCP	endoskopická retrográdní cholangiopankreatografie
FNAB	tenkojehlová aspirační biopsie (z angl. Fine Needle Aspiration Biopsy)
FNKV	Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
FFPE	materiál zpracovaný parafrínovou technikou (z angl. Formalin Fixed Paraffin Embedded)
GC	gemcitabin
HPF	zorní pole s velkým zvětšením 40x (z angl. High Power Field)
IPMN	intraduktální papilární mucinózní neoplázie
isomiR	miRNA s post-transkripční modifikací v nukleotidech
ISH	in situ hybridizace
Let-7	Lethal-7
oncomiR	onkogenní miRNA
MCN	mucinózní cystická neoplázie
miR	microRNA
MiRNA	microRNA
MRE	z angl. miRNA Response Element
nm	nanometr
PanIN	pankreatická intraepiteliální neoplázie
pre-miRNA	perkurzorová miRNA
pri-miRNA	primární miRNA
PSC	pankreatická hvězdicová buňka (z angl. Pancreatic Stellate Cell)
RNA	ribonukleová kyselina
RNA seq	RNA sekvenace



OS	celková délka přežití (z angl. Overall Survival)
PDAC	pankreatický duktální adenokarcinom
PFS	délka přežití do progrese nemoci (z angl. Progress-Free Survival)
RISC	z angl. RNA-induced silencing complex
RT-qPCR	z angl. Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction
snoRNA	z angl. small nucleolar RNA
snRNA	z angl. small nuclear RNA
TCGA	z angl. The Cancer Genome Atlas
TNM	z angl. Tumor, Node, Metastasis
UICC	z angl. Union for International Cancer Control

## 2 ÚVOD

### 2.1 Duktální adenokarcinom pankreatu

#### 2.1.1 Epidemiologie

Duktální adenokarcinom (PDAC) představuje 90 % nově diagnostikovaných primárních malignit pankreatu (Cascinu et al. 2010) a patří mezi klinicky nejzávažnější nádorová onemocnění. Dle údajů Národního Onkologického Registru ČR bylo v roce 2016 zjištěno 1165 nových případů u mužů a 1078 případů u žen. Tato diagnóza tvoří jak u mužů, tak u žen čtvrtou nejčastější příčinu úmrtí na zhoubný nádor, v roce 2016 bylo zaznamenáno 1058 úmrtí mužů a 1020 úmrtí žen (Novotvary 2016, ÚZIS). Incidence nemoci se postupně zvyšuje od 45-50 let a má vrchol ve věku 70-75 let (svod.cz). Pod 50 let je výskyt PDAC neobvyklý; v těchto případech je často asociován s dědičnými nádorovými syndromy (James et al. 2004).

#### 2.1.2 Histologická klasifikace

Nejčastějším histologickým typem PDAC je adenokarcinom vývodového typu. Nádorové elementy připomínající hlenotvorný epitel biliárního typu tvoří infiltrativně rostoucí nepravidelné tubulární a kribriformní struktury. V hůře diferencovaných nádorech jsou výraznější jaderné atypie, zvýšená mitotická aktivita, omezení hlenotvorby, solidně trabekulární a disociativní uspořádání. Častá je perineurální propagace a lymfovaskulární invaze. V některých nádorech je velká část objemu tvořena desmoplastickým stromatem. Vzácnější histologické varianty PADAC jsou adenoskvamózní, medulární, hepatoidní, koloidní a nediferencovaná (Vincent et al. 2011).

Hodnocení PDAC podle anatomického rozsahu progresse nemoci je uvedeno v TNM klasifikaci, 8. vydání (Brierley et al. 2017). Pokročilost nádoru je určována podle lokálního nálezu, tj. největšího rozměru nádorového ložiska, šíření do peripankreatického tuku, prorůstání do velkých splachnických cév, a dále přítomnosti metastáz do lymfatických uzlin a metastáz vzdálených.

#### 2.1.3 Diagnostika a terapie

Víc než dvě třetiny pacientů s PDAC jsou diagnostikovány s lokálně pokročilým nádorem nebo se vzdálenými metastázemi, tedy v inoperabilním stadiu (Vincent et al.

2011). Příčinou pozdní diagnózy je skutečnost, že specifické symptomy se manifestují až v pokročilém stadiu nemoci. Navíc nádor jeví lokální známky agresivního chování již v iniciálních fázích vývoje; invaze a perineurální šíření byly prokázány i u malých karcinomů náhodně nalezených při pitvě (Kimura et al. 2000). U pacientů s operabilním nádorem patří k hlavním příznakům nemoci bolest břicha, ikterus a nevolnost (Keane et al. 2014). Dalšími méně obvyklými příznaky jsou glukózová intolerance, epizody pankreatitidy, migrující tromboflebitida (Trousseauův příznak) a splenomegalie (Li 2012; Li et al. 2017; Thayalasekaran et al. 2009; Chen et al. 2012). Část případů je diagnostikována incidentálně při vyšetření zobrazovacími metodami (Santo et al. 2017).

V dnešní době doporučený léčebný postup u pacientů s časným operabilním tumorem je pankreatoduodenektomie, distální pankreatektomie nebo totální pankreatektomie (Acher et al. 2018; Jing et al. 2013; Andrén-Sandberg et al. 2016) s možností neoadjuvantní chemoterapie gemcitabinem (Scheufferlein et al. 2019). Po resekci je zaváděna adjuvantní terapie gemcitabinem, případně s přidáním 5-fluorouracilu nebo dalších chemoterapeutik (Gbolahan et al. 2019).

#### **2.1.4 Prognostické faktory**

Prognóza PDAC je navzdory současným pokrokům v protinádorové terapii extrémně nepříznivá. Dlouhodobě se prognóza pacientů diagnostikovaných ve stadiu I a IV výrazně neliší. Pětileté přežití je navzdory intenzivní léčbě pouhých 2-9 % (McGuigan et al. 2018). Podle očekávání bude PDAC představovat v roce 2030 druhou nejčastější příčinu úmrtí na nádorová onemocnění (Rahib et al. 2014). Během posledních dekád došlo k významnému zlepšení přežití nemocných po chirurgickém výkonu, mortalita v pooperačním období klesla z 25 % v sedmdesátých letech na 2 % v současné době (Shirai et al. 2016). Dlouhodobá prognóza po resekci PDAC ale zůstává nepříznivá (Huang et al. 2018), časem se u většiny operovaných pacientů objeví lokoregionální recidiva nebo metastatický rozsev (Jones et al. 2019).

Adjuvantní chemoterapie prodlužuje medián přežití operovaných pacientů o 6 měsíců (Gbolahan et al. 2019). K faktorům negativně ovlivňujícím přežití u PDAC patří pozitivní resekční okraj, přítomnost uzlinových metastáz, perineurální a vaskulární nádorová invaze (Winter et al. 2006; Bilici 2014). Dlouhodobější prognóza jednotlivých nemocných je nepředvídatelná, v souboru 95 pacientů přežívajících víc než 5 let po resekci PDAC byly ve 41 % případů v resekatu pozitivní lymfatické uzliny a ve 24 % případů byl pozitivní resekční okraj; relaps byl pozorován i více než 10 let po

chirurgickém zákroku (Ferrone et al. 2012).

### **2.1.5 Biomarkery pro PDAC v klinické praxi**

Z důvodu obtíží v časně diagnóze PDAC a často nepříznivého pooperačního průběhu onemocnění jsou cestou intenzivního výzkumu hledány nové diagnostické a prognostické biomarkery. Nejpřínosnějším v současné době klinicky používaným biomarkerem je CA19-9, který je ale pro nízkou specifitu nevhodný ke screeningu asymptomatických pacientů. CA19-9 může být falešně pozitivní při obstrukční cholestáze nebo při zánětech pankreatu (Poruk et al. 2013). Karcinoembryonální antigen (CEA) se uplatňuje v klinické diagnostice PDAC v menší míře; je pozitivní i u karcinomu kolorektálního (Meng et al. 2017). CA19-9 a CEA jsou vhodné pro monitoraci pacientů s již diagnostikovaným PDAC, jejich hladina má též prognostický význam (Poruk et al. 2013; Meng et al. 2017). Další experimentálně navržené diagnostické, prediktivní a prognostické biomarkery PDAC jsou např. Glypican-1, Osteopontin, hENT1 a SMAD-4 (Hasan et al. 2019). Navzdory slibným výsledkům dosud provedených studií žádná z uvedených molekul zatím nenašla širší uplatnění v klinické praxi. V posledních letech se jako potenciální biomarkery dostaly do popředí pozornosti nekódující RNA molekuly, včetně microRNA (miRNA).

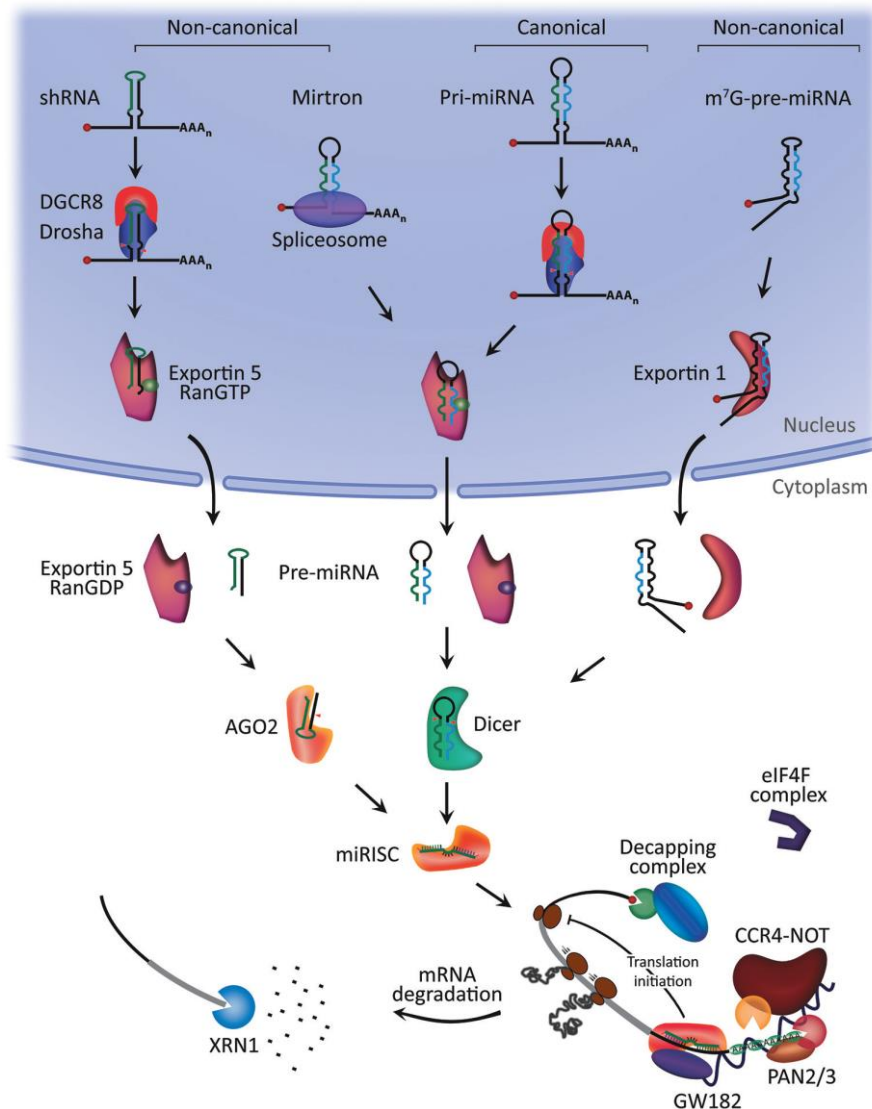
## 2.2 Základní charakteristiky miRNA

MiRNA patří mezi krátké nekódující vlákna RNA s průměrnou délkou 22 nukleotidů. Jedná se o evolučně konzervované molekuly, jejichž exprese byla prokázána v říši rostlin i živočichů (Wang et al. 2019; Gebert et al. 2019). Prvním představitelem dnes již početné rodiny miRNA je lin-4, která byla objevena v roce 1993 u *Caenorhabditis elegans* (Lee et al. 1993). V současnosti je u člověka popsáno víc než 3000 miRNA (www.mirbase.org). Tyto molekuly představují jednu z klíčových komponent regulace genové exprese, uskutečňující se na epigenetické úrovni mechanismem tzv. RNA interference. Jedná se o posttranskripční „silencing“ mRNA molekul v cytoplasmě, probíhající navázáním komplementárních miRNA vláken na jejich 3'UTR konec, vedoucí k degradaci mRNA nebo k zastavení translace (Lam et al. 2015). Proces RNA interference má značný biologický význam. Hraje roli v embryogenezi a v regulacích komplexních intracelulárních pochodů, včetně apoptózy, buněčného cyklu a diferenciaci (Vidigal et al. 2015). Prostřednictvím RNA interference je intracelulárně regulována exprese tisíců genů (Lewis et al. 2005). Nedávno byla objevena aktivní sekrece miRNA prostřednictvím exosomů, představující důležitou formu intercelulární komunikace (Zhang et al. 2015). Abnormality ve spektru exprimovaných miRNA byly prokázány u většiny nádorových a nenádorových nemocí. Předpokládá se, že miRNA hrají roli v patogenezi, proto je intenzivně studováno jejich možné využití jako diagnostických nebo prognostických biomarkerů (Ardekani et al. 2010).

### 2.2.1 Biogeneze miRNA

První kroky syntézy miRNA probíhají v buněčném jádře; transkripce se uskutečňuje činností RNA-polymerázy II nebo RNA-polymerázy III (Ha et al. 2014). Kanonická dráha syntézy se uplatňuje v tvorbě většiny miRNA zapojených do „silencingu“ prostřednictvím RISC-komplexu. Nezpracovaný transkript je délky až 1000 nukleotidů, označený jako primární miRNA (pri-miRNA). Zvláštností je parciální komplementarita nukleotidů uvnitř vlákna, vedoucí ke vzniku ohybu zvaného „hairpin loop“. Posttranskripční modifikace pri-miRNA probíhá v „mikroprocesorovém komplexu“, agregátu proteinů obsahujícím DGCR8 a ribonukleázu III Drosha; dojde ke splicingu a k enzymatickým modifikacím ribonukleotidů (O'Brien et al. 2018). Výsledkem je pre-miRNA, která je transportována do cytoplasmy prostřednictvím

Exportinu-5. Tento proces je energeticky náročný, vázaný na Ran-GTPázu (Yi e al, 2003). Vlákno pre-miRNA je zpracováno v cytoplasmě RNázou III Dicer, která odstraní terminální ohyb. Z duplexu miRNA je na základě termodynamické stability sekvence jedno z vláken (vedoucí vlákno) vybráno pro vykonání regulačních funkcí v RISC komplexu (O'Brien et al. 2018). Ve většině případů dochází současně k degradaci druhého, komplementárního vlákna miRNA (miRstar nebo miRNA\*). Pro regulaci může být vybrán transkript od 3'-konce nebo od 5'-konce pre-miRNA, selektované vlákno je označováno sufixem -3p a -5p (Bhayani et al. 2012).



**Obrázek číslo 1:** Dráhy syntézy miRNA a mechanismus akce (zdroj: O'Brien et al. 2018)

Non-kanonická dráha biogeneze miRNA se uplatňuje během syntézy non kanonických miRNA (Babiarz et al. 2008). Tato dráha syntézy má několik variant, některé kroky mohou být prováděny pomocí jiných enzymových komplexů než v kanonické dráze. Zpracování transkribované pri-miRNA v jádře se může uskutečnit prostřednictvím Drosha/DGCR8 nebo v tzv. „mirtronech“. Následně dojde k transportu pre-miRNA do cytoplasmy pomocí Exportinu-1 nebo Exportinu-5. Syntéza funkční miRNA dokončena pomocí komplexu proteinů Dicer nebo Dicer-independentní cestou (Abdelfattah 2014).

Po dokončení syntézy je vlákno miRNA začleněno do komplexu proteinů, jehož hlavní funkční jednotkou je Argonaut (AGO). Výsledná RISC je schopna regulovat translaci cílových mRNA (Jonas et al. 2015). Vlákno miRNA\*, které se neinkorporovalo do RISC, nebývá vždy degradováno, může mít důležité funkce regulační (Bhayani et al. 2011).

Sekvence kódující miRNA se často nacházejí v intronech vlastních regulovaných genů, jejich syntéza však probíhá nezávisle na transkripci cílové mRNA (Steiman-Shimony et al. 2018). Přibližně polovina miRNA je lokalizována v jiných genech nebo v intergenních oblastech, kde mají vlastní promotor (Rodriguez et al. 2004). Transkripce více miRNA kódovaných ve stejné oblasti genu může probíhat synchronně; v tomto případě se jedná o tzv. „miRNA cluster“ (Altuvia et al. 2005).

### **2.2.2 Mechanismus účinku miRNA**

MiRNA jsou součástí posttranskripční regulace a působí v miRNA Induced Silencing Complex (RISC). V případě vysoké komplementarity se RISC váže na 5'-konec mRNA, na tzv. seed region miRNA Response Element (MRE) sekvencí, délky 6-8 nukleotidů. Endonukleáza AGO2 rozštěpí mRNA, přičemž dojde i k rozpadu RISC a k degradaci miRNA (Jo et al. 2015).

Ve většině případů není komplementarita mezi miRNA a cílovou MRE sekvencí dokonalá (Cai et al. 2009). Pokud vlákno mRNA určené k degradaci není rozštěpeno endonukleázovou aktivitou AGO2, dochází k destabilizaci deadenylací na 3'-konci a odstraněním 5'-čepičky (O'Brien et al. 2018). Tímto způsobem lze přesněji regulovat inhibující účinek miRNA. Dalším mechanismem regulace zprostředkovaným miRNA je modulace protein-syntetizujícího komplexu (Vasudevan et al. 2007).

Buněčné jádro je rovněž místem miRNA-zprostředkované degradace mRNA. Některé miRNA, např. miR-21, se akumulují i v buněčném jádře (Leung 2015).

Význam nukleární RNA-interference nebyl dosud objasněn (Roberts 2014). Recentně byla objevena úloha nukleárních miRNA v epigenetickém řízení genové exprese dalším mechanismem, kovalentní modifikací histonů a iniciací metylace CpG ostrůvků, podporující vznik heterochromatinu (Tao et al. 2017).

### **2.2.3 Regulace působení miRNA**

RNA interference prostřednictvím miRNA představuje dynamický a vysoce regulovaný proces. Jeden druh miRNA může mít vliv na expresi více genů. Naopak jeden gen může být regulován prostřednictvím většího počtu miRNA, které jsou dostupné v cytoplasmě v různých koncentracích a mají odlišnou afinitu k MRE oblasti vlákna mRNA (Cai et al. 2009). Při alternativním splicingu se mRNA téhož genu mohou lišit v počtu a v sekvenci MRE oblastí; to přináší pro miRNA možnost mít v různých typech buněk odlišné, ale přitom přísně koordinované účinky (O'Brien et al. 2018). Variabilita miRNA je dodatečně zvýšena post-transkripční editací nukleotidů, což vede ke vzniku isomiRů vyznačujících se různou dynamikou (Cloonan et al. 2011).

Exprese miRNA je úzce vázána na syntézu cílové mRNA. Jedním z hlavních mechanismů regulace je metylace promotorů, řada miRNA genů má CpG ostrůvky v této oblasti. (Wang et al. 2013). Syntéza miRNA může být indukována celou řadou exogenních a endogenních stimulů, jako jsou hypoxie, vliv hormonů, xenobiotik a toxinů (Gulyaeva et al. 2016).

V experimentálně analyzovaných vzorcích vykazují miRNA mimořádnou stabilitu (Glinge et al. 2017; Hall et al. 2012), v intracelulárním prostředí je jejich obrat ovšem rychlý. Stabilita miRNA závisí na daném typu, může se měnit v souvislosti se změnami diferenciací buňky (Bail et al. 2010). Cílená RNA-řízená miRNA degradace je nejvýznamnějším mechanismem regulujícím životnost miRNA, fungujícím cíleně na základě komplementarity s 5' nebo 3' koncem miRNA (Kato 2018). Stabilita RISC je rovněž ovlivnitelná post-translační modifikací AGO (Johnston et al. 2011). Omezení dostupnosti miRNA sekvestrací může regulovat jejich funkci, detailní mechanismus tohoto procesu ale nebyl dosud objasněn (Tang et al. 2015).



### **2.2.3 MiRNA v exosomech**

Exosomy jsou membránou ohraničené měchýřky průměru 40-150 nm, představující jeden z nejdůležitějších způsobů horizontální intercelulární komunikace. Sekrece exosomu probíhá aktivně a je pod úzkou regulací pomocí signální dráhy Rab GTPázy (Ostrowski et al. 2010). Vyloučené exosomy jsou selektivně navázány na membránové receptory cílových buněk (Andreu et al. 2014), internalizace pak probíhá prostřednictvím mikropinocytózy nebo endocytózy (Zhang et al. 2015). Obsahem exosomů jsou biologicky aktivní proteiny, lipidy a nukleové kyseliny (Zhang et al. 2019). V exosomální frakci se ve velkém množství akumulují nekódující RNA molekuly, z nichž nejvýznamnější jsou miRNA. Mechanismus transportu miRNA do exosomů je selektivní a dosud málo objasněn (Zhang et al. 2015). Tímto způsobem přenášené miRNA mohou pravděpodobně uplatnit signální funkci, která je předmětem intenzivního výzkumu (Sun et al. 2018).

## 2.3 Detekce miRNA

MiRNA jsou v porovnání s dalšími typy RNA vysoce rezistentní vůči degradaci: odolávají vysokým teplotám, výkyvům pH i degradaci RNázou (Glinge et al. 2017). Jejich integrita je dobře zachována v biologickém materiálu, lze je izolovat z tělesných tekutin, ze zmražených tkání i z archivovaných parafinových bloků (Li et al. 2015; Brown 2018; Liu a Xu 2011).

### 2.3.1 Metody detekce miRNA

Pro detekci miRNA je používána řada analytických metod, s odlišnou senzitivitou, specificitou, kapacitou a technickou náročností.

In situ hybridizace (ISH) umožňuje v histologických řezech přímou vizualizaci analyzované miRNA v jednotlivých buňkách a jejich subcelulárních kompartmentech, ve kterých dochází k její akumulaci (Zhang et al. 2015; Babapoor et al. 2016). Zavedení tzv. locked nucleic acid (LNA) sond, ve kterých se nachází syntetický nukleotid obsahující bicyklický furanosový prsten v konformaci napodobující RNA, přineslo zvýšení přesnosti ISH (Vester a Wengel 2004). Vazba sondy je omezena na zralou miRNA, bez nespecifické detekce prekurzorových vláken pre-miRNA a pri-miRNA. Nevýhodou ISH je nemožnost objektivní kvantifikace exprese miRNA (Lei et al. 2018).

Hybridizační mikroarraye jsou první velkokapacitní metodou pro analýzu globální exprese vysokého počtu miRNA. Hybridizace probíhá na kartě, obsahující komplementární sondy značené fluorescentní molekulou (Li a Ruan 2009). Komerční produkty umožňují hodnocení exprese až 1500 miRNA (Liu et al. 2008). Normalizace probíhá algoritmem interpretujícím získaná data dle kvantilů exprese, lokální regrese nebo dle globálního průměrování (Meyer et al. 2010). Adaptace systémů „next-generation sequencing“ umožňuje zobrazení kompletního transkriptomu, v posledních letech je proto na vzestupu uplatnění RNA seq ve výzkumu exprese miRNA (Chu a Corey 2012). Proces je založen na tvorbě cDNA-knihoven a na masivně paralelní sekvenaci tisíce cDNA vláken. Metoda nevyžaduje primery, vazba na reakční komůrku probíhá RNA ligací nebo poly-A tailingem (Giraldez 2018). RNA seq umožňuje identifikovat dříve nevidaný počet malých nekódujících RNA, včetně prekurzorů miRNA, -5p a -3p transkriptů. Metoda je též schopna objevit nové druhy miRNA a spolehlivě diferencovat vlákna s malými rozdíly v sekvenci nukleotidů. Nevýhodou

RNA seq je vysoká cena, technická náročnost a obtížnost datové analýzy (Conesa et al. 2016; Baker 2010).

RT-qPCR představuje nejčastěji používanou metodu pro zjišťování exprese miRNA. Prvním krokem je reverzní transkripce izolovaných miRNA do cDNA vláken. Následně je analyt amplifikován metodou PCR (Forero et al. 2019), kvantifikace exprese se provádí porovnáním CT hodnot vzorku nádoru a kontroly normální tkáně (Schmittgen a Livak 2008). Komerčně přístupné karty umožňují zvýšení kapacity metody, s paralelní kvantifikací exprese až stovek miRNA (Forero et al. 2019). RT-qPCR má z metod vyšetřujících expresi miRNA nejvyšší senzitivitu a specificitu, uplatňuje se při validaci výsledků mikroarraye a RNAseq (Chang et al. 2010; Fang a Cui 2011). Další výhodou metody je rychlost, příznivá cena a nízká technická náročnost. Nevýhodou RT-qPCR je nespécifická vazba klasických primerů na miRNA s podobnou nukleotidovou sekvencí. Zavedení speciálně konstruovaných primerů, včetně stem-loop primerů (Taqman miRNA assay, thermofisher.com) a universal trailing primerů (miRCury LNA Universal RT PCR assay, quiagen.com) umožnilo zvýšit specificitu amplifikace (Chen et al. 2005; Jung et al. 2013).

Droplet digital PCR (ddPCR) představuje novou metodu analyzující expresi miRNA, umožňující přesnější kvantifikaci drobných změn v tekutých vzorcích (Zhao et al. 2018). Výhodou je možnost absolutní kvantifikace na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti zkoumané miRNA v kapkách PCR reakce, umožňující zlepšení podmínek normalizace. Uvedená metoda byla například použita při stanovení exprese miRNA v krevním séru pacientů s karcinomem plic, kde vykazovala dobrou konkordanci s RT-qPCR (Campomenosi et al. 2016).

### **2.3.2 Standardizace detekce miRNA**

Stanovení úrovně exprese miRNA je citlivé na technickou manipulaci během pre-analytické a analytické fáze pokusu. Pro praktické použití miRNA ke klinickým studiím je nutné zavést standardizovanou a spolehlivě reprodukovatelnou metodu detekce. Velkým problémem v interpretaci nálezů z dosud provedených studií je nízká reprodukovatelnost výsledků. Jednou z nejdůležitějších příčin nesrovnalostí je nejednotná volba analytické metody pro detekci miRNA. Porovnání dvanácti komerčních postupů zaměřených na stanovení exprese miRNA, založených na RT-qPCR, hybridizaci a RNAseq, odhalilo nízkou reprodukovatelnost výsledků (Mestdagh et al. 2014).

K dalším významným zdrojům variability v hodnotách detegovaných miRNA patří rozdíly v manipulaci a skladování odebraných vzorků (Boisen et al. 2015; Vojtechova et al. 2017), výtěžnost izolačního postupu (Kroh et al. 2010; Carlsson et al. 2018), odlišné normalizační postupy (Popov et al. 2015) a způsob statistického hodnocení dat (de Ronde et al. 2018).

## **2.4 Exprese miRNA v normálních tkáních**

Některé miRNA jsou ve tkáních konstitutivně exprimovány, další jsou přítomny jen v nízkých koncentracích (Ludwig et al. 2016); panel všech přítomných miRNA se označuje jako „miRnom“. Při porovnání miRnomu různých typů nenádorových lidských buněk byla zjištěna rozdílná exprese miRNA, některé z exprimovaných miRNA byly orgánově specifické. Na základě extenzivní analýzy celkem 1997 miRNA v 61 typech tkání od dvou zemřelých byl sestaven atlas miRnomu pro lidské orgány (Ludwig et al. 2016). Každá miRNA má odlišný index tkáňové specificity, většina miRNA je exprimována současně ve více orgánech (Landgraf et al. 2007). Množství konstitutivně exprimovaných miRNA, včetně miR-21, je vysoce variabilní v různých tkáních; největší stabilitu exprese vykazovala miR-16 (Landgraf et al. 2007). Fyziologické hodnoty exprese miRNA v jednotlivých tkáních nebyly dosud stanoveny. Popsána byla značná interindividuální variabilita (Ludwig et al. 2016), rozdíly v expresi mohou vyvolat například i změny stravování nebo běžná fyzická činnost (Witwer 2012; Aoi et al. 2014).

### **2.4.1 Exprese miRNA v normální tkáni pankreatu**

Exprese miRNA a jejich úloha v homeostáze normální tkáně pankreatu byly studovány v menší míře, v porovnání s rolí miRNA v PDAC. Profil miRNA v tkáni pankreatu vykazoval dobrou interindividuální korelaci (Ludwig et al. 2016). V pankreatických acinech byla prokázána vysoká exprese miR-216 a miR-217; hladina těchto miRNA byla v ostatních tkáních těla a v PDAC nízká (Szafranska et al. 2007). Další pankreas-specifickou miRNA je miR-150-3p (Ludwig et al. 2016). Exprese miR-375 je specifická pro Langerhansovy ostrůvky, kde se podílí na modulaci sekrečního mechanismu inzulinu (Poy et al. 2004).

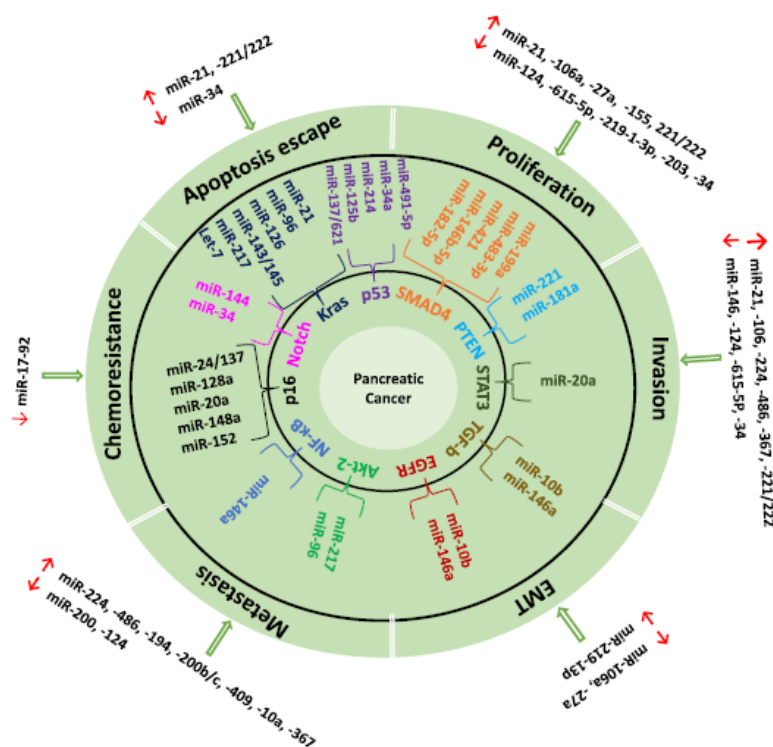
## 2.5 Úloha miRNA ve vzniku zhoubných nádorů

Buňky za fyziologických okolností syntetizují stovky různých molekul miRNA ve variabilních koncentracích (de Rie et al. 2017). Jedná se o komplikovanou a přísně regulovanou síť hrající důležitou úlohu v modulaci exprese velké části genů. Pro identifikaci cílových genů jsou přístupné veřejné databáze, např. miRTarBase (mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw). Ztráta dohledu nad syntézou miRNA se jeví jako významný mechanismus uplatňující se v nádorovém bujení. První malignitou s prokázanou deregulací miRNA byla chronická lymfatická leukemie, u které bylo zjištěno, že delece chromosomu 13q14 vede ke snížení hladin miR-15 a miR-16 v nádorových buňkách (Calin et al. 2002). Následně byla abnormální exprese miRNA potvrzena u velkého počtu nejen nádorových, ale i nenádorových onemocnění (Yang et al. 2020; Calatayud et al. 2017). Jedním z důvodů, proč dochází k deregulaci syntézy miRNA, je lokalizace jejich genů v místech náchylnějších k mutacím v tzv. tumor-fragilních oblastech chromosomů, kde je kódováno až 50% miRNA (Calin et al. 2004). Ve zhoubných novotvarech mohou mít klíčové miRNA úlohu onkogenů nebo tumor supresorů (Zhou et al. 2017), přičemž svojí činností modulují důležité procesy související s maligním chováním, jako jsou deregulace apoptózy a buněčné proliferace, invazivní růst a metastazování.

Postupně bylo identifikováno více klíčových miRNA, které mají abnormální expresi u velkého počtu malignit a zřejmě i podstatnou funkci v udržování nádorového fenotypu. K nejvýznamnějším z nich patří miR-10b (Sheedy a Medarova 2018), miR-21 (Feng a Tsao 2016), miR-34a (Zhang et al. 2019), miR-155 (Higgs a Slack 2013), miR-210 (Dang a Myers 2015) a miR-221/222 (Garofalo et al. 2012), Mechanismus účinku jednotlivých onkogenních a tumor-supresorových miRNA stále zůstává z větší části neobjasněn. Důležitou otázkou je, zda miRNA patří k základním součástem kancerogeneze, nebo zda jejich abnormální exprese představuje pouze vedlejší fenomén doprovázející onkologicky podstatnější procesy (Witwer 2015). Vzhledem ke komplikované a heterogenní povaze malignit je další otázkou, do jaké míry lze poznatky o roli miRNA v nádorovém procesu získaných při studiu různých malignit zobecnovat. Pro aplikaci výsledků preklinických studií do klinicky efektivních diagnostických a terapeutických postupů je proto zásadní získat nové znalosti mechanismů účinku miRNA.

## 2.5.1 Úloha miRNA v onkogenezi PDAC

Ve tkáni PDAC byla popsána abnormální exprese četných miRNA. Byl prokázán jejich podíl na ovlivňování řady procesů v nádorových buňkách, včetně podpory proliferace a invazivního růstu, inhibice apoptózy, modulace epitelově-mesenchymálního přechodu a chemorezistence (Huang et al. 2016). Abnormálně syntetizované onkogenní a tumor-supresorové miRNA mají jako cílové geny důležité součásti klíčových signálních drah, včetně RAS/MAPK, JAK/STAT a TGFβ/SMAD (Zhang et al. 2016; Ottaviani et al. 2018). V nádorových kmenových buňkách PDAC hrají miRNA roli v jejich homeostáze, a to v udržování „kmenových“ vlastností a chemorezistenci (Bimonte et al. 2016).



**Obrázek číslo 2:** funkce a signální dráhy v PDAC pod vlivem činností deregulovaných miRNA (zdroj: Zhang et al. 2016)

## 2.5.2 Změny v expresi miRNA u PDAC

První údaje o expresním profilu miRNA ve tkáních PDAC byly získány z analýzy vzorků z resektů pankreatu, archivovaných po zmražení v tkáňových bankách nebo uchovaných ve formě parafinových bloků. Tento materiál obsahuje velký objem nádorové tkáně, umožňující izolaci značného množství vysoce kvalitní miRNA. Dlouhodobá archivace vzorků byla základem pro provedení retrospektivních studií s vysokým počtem pacientů (Rounge et al. 2015; Szafranska et al. 2008). Analýza

pomocí mikroarraye a RNAseq přinesla řadu informací o komplexních změnách exprese miRNA v PDAC (Szafranska et al. 2007; Müller et al. 2015).

V resekátech PDAC byla prokázána deregulace celé řady miRNA. První práce identifikovala abnormality v expresi víc než 100 miRNA, včetně miR-21, miR-155, miR-221, miR-222a, miR-301 a miR-376a (Lee et al. 2007). Změny v profilu miRNA v tkáních PDAC byly následně potvrzeny v dalších studiích (Szafranska et al. 2007; Zhang et al. 2009; Jamieson et al. 2012; Bauer et al. 2012; Jiao et al. 2012; Schultz et al. 2012; Calatayud et al. 2017). Panely miRNA se změněnou expresí dokázaly odlišit vzorky PDAC od normálního pankreatu nebo od chronické pankreatitidy (CP) (Bloomston et al. 2007; Bauer et al. 2012; Vychytilova-Faltejskova et al. 2015; Calatayud et al. 2017). V jednotlivých studiích byly rozdíly ve spektru diagnostických panelů navržených pro identifikaci nádorových tkání

Laserová mikrodisekce umožnila cílenou analýzu profilu miRNA v nádorových buňkách. Stroma může tvořit velkou část objemu nádoru a tím je signifikantním zdrojem „šumu“ při analýze exprese miRNA. První práce zkoumající vzorky PDAC po mikrodisekci identifikovala v nádorových buňkách zvýšenou hladinu celkem 21 miRNA a sníženou hladinu 4 miRNA (Bloomston et al. 2007).

Sekvenace transkriptomu buněk PDAC může přinést velké pokroky v analýze exprese miRNA. První pilotní studie analyzující profil miRNA pomocí RNA seq identifikovala up-regulaci 74 miRNA a down-regulaci 30 miRNA u PDAC (Müller et al. 2015). V další studii bylo v PDAC popsáno celkem 607 abnormálně exprimovaných miRNA. Celkem 31 miRNA vykazovalo po validaci pomocí RT-qPCR signifikantně odlišnou expresi mezi PDAC a nenádorovou kontrolou (Vila-Navarro et al. 2017). Databáze TCGA obsahuje údaje o transkriptomu velkého počtu PDAC a je významným zdrojem pro budoucí výzkum (Liao et al. 2018)

### **2.5.3 Úloha miRNA v tkáňovém mikroprostředí PDAC**

Tkáňové mikroprostředí v PDAC je klíčové pro přežití nádorových buněk. Je tvořeno z nádorem asociovaných fibroblastů (CAF), kolagenního vaziva, cévních prostorů a z buněk imunitního systému (Murakami et al. 2019). Při aktivaci pankreatických hvězdicových buněk dochází ke změnám v „miRnomu“, s odlišnou expresí popsanou u 84 miRNA (Masamune et al. 2014). Do řízení funkcí CAF je zapojeno více miRNA, včetně miR-21, miR-29a, miR-155, miR-199a, miR-200, miR-210 a miR-214 (Kwon et al. 2015; Kadera et al. 2013; Pang et al. 2015; Karamitopoulou



et al. 2017; Kuninty et al. 2016). Exprese miR-21 byla výraznější v peritumorálních fibroblastech a byla signifikantním faktorem pro zvýšení invazivity buněk MiaPaCa linie. Inhibice miR-21 v CAF a v nádorových buňkách vedla k výraznému poklesu invazivity (Kadera et al. 2013). Zvýšená exprese miR-21 a miR-210 byla popsána ve stromatu v blízkosti „tumor budding“, svědčící pro komunikaci nádoru a stromatu prostřednictvím miRNA při indukci epitelově-mesenchymálního přechodu (Karamitopoulou et al. 2017).

#### **2.5.4 Úloha exosomů v onkogenezi PDAC**

Nádorové buňky včetně PDAC uvolňují exosomy do cirkulace ve zvětšeném množství (Melo et al. 2015). Funkce těchto částek není zcela objasněná, mají pravděpodobně značný podíl na intercelulární komunikaci regulaci interakcí s mikroprostředím (Pang et al. 2015, Costa Silva et al. 2015). Exosomy jsou zapojeny do více pochodů včetně lokální imunosuprese, modulace mikroprostředí, podpory proliferace a invazivního růstu (Yan et al. 2017). Nádorové buňky selektivně akumulují miRNA v exosomech, včetně miR-10a, miR-10b, miR-21, miR-27a, miR-155 a miR-373 (Melo et al. 2014). Exosomální miR-21 a miR-451a derivována z CAF podporovala v *in vitro* podmínkách růst a migraci nádorových buněk PDAC (Takikawa et al. 2017).

#### **2.5.5 Role studovaných oncomiRNA v onkogenezi PDAC.**

Ze skupiny miRNA s proto-onkogenní funkcí (oncomiRNA) je nejvíce prozkoumána miR-21. Je zapojena do modulace důležitých procesů v nádorových buňkách, včetně proliferace, apoptózy, migrace, invazivity, metastazování a chemorezistence (Moriyama et al. 2009; Giovanetti et al. 2010; Zhang et al. 2018). Deplece miR-21 *in vitro* vyvolala zánik PDAC buněk down-regulací *Bcl-2* a up-regulací exprese *Bax* (Sicard et al. 2013). Transfekce pre-miR-21 *in vitro* podporovala přežití nádorových buněk, současně indukovala rezistenci proti chemoterapii gemcitabinem. Zvýšená byla exprese matrix metaloproteináz a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (Giovanetti et al. 2010). Bylo zjištěno, že miR-21 se podílí i na regulaci exprese *PTEN* a fosforylace kinázy Akt, které jsou klíčovými komponentami signální dráhy PI3K/Akt/mTOR (Giovanetti et al. 2010). *In vitro* expozice nádorových buněk epitelálnímu růstovému faktoru podporovala syntézu miR-21; to vedlo k inhibici apoptózy a k progresi buněčného cyklu prostřednictvím signální dráhy MAPK/ERK (Zhao et al. 2018). Prokázána byla rovněž nepřímá vazba na komponenty dráhy K-ras

(Yu et al. 2016). Další geny ovlivněné prostřednictvím miR-21 jsou *TMI*, *PTEN* a *PDCD4* (Qi et al. 2009; Wei et al. 2016). MiR-21 je jednou z nejdůležitějších miRNA modulující rezistenci na terapii gemcitabinem v PDAC (Hwang et al. 2010; Kadera et al. 2013; Giovanetti et al. 2010)

MiR-155 je charakterizována nadměrnou expresí v maligních nádorech, včetně karcinomu mléčné žlázy a tlustého střeva (Mattiske et al. 2012; Cao et al. 2018). Tato oncomiRNA se uplatňuje down-regulací genu *TP53INP*, který je součástí regulační dráhy p53. Poruchy v této dráze vedou k inhibici apoptózy a k podpoře nádorové proliferace (Gironella et al. 2007). V podmínkách *in vitro* miR-155 podporovala migraci a invazivitu nádorových buněk. Dále byla prokázána role v regulaci signální dráhy STAT3 a represi syntézy *SOCS1* (Huang et al. 2013). MiR-155 se uplatňuje i v modulaci chemorezistence buněk PDAC. Po expozici nádorových buněk gemcitabinu (GC) v *in vitro* podmínkách došlo k uvolnění exosomů obsahujících miR-155. Vstřebání těchto exosomů dalšími buňkami PDAC zvýšilo jejich odolnost vůči GC (Mikamori et al. 2017).

MiR-196a je oncomiRNA deregulovaná u vysokého počtu nádorů (Lu et al. 2016). Dalším členem této rodiny je miR-196b, která je oncomiRNA s mírně odlišnou rolí, rovněž abnormálně exprimovaná u PDAC (Wang et al. 2017). Experimentální transfekce miR-196a způsobila v buňkách PDAC pokles hladiny *ING5*, což vedlo k redukcí apoptózy, zvýšení nádorové proliferace a k vyšší invazivitě (Liu et al. 2013). Bylo též prokázáno, že miR-196a podporuje onkogenezi modulací NFkB inhibitoru  $\alpha$ , *in vitro* dochází po introdukci miR-196a ke zvýšení proliferace a migrace nádorových buněk (Huang et al. 2014). Další geny pod kontrolou miR-196a jsou *FOXO1*, *NME4* *Annexin A1* a členové rodiny *Hox* (Lu et al. 2016).

MiR-210 je oncomiRNA abnormálně exprimovaná u PDAC, pravděpodobně v souvislosti s hypoxií v tumoru (Ho et al. 2010; Dang a Myers 2015). Nejdůležitějším cílem miR-210 je *HIF-1a*, který představuje klíčovou komponentu dráhy regulující hypoxickou odpověď. Deregulace této dráhy je výrazně zúčastněna v karcinogenezi i jiných nádorů. (Huang et al. 2014). Tato miRNA hraje též důležitou úlohu v modulaci interakcí pankreatických hvězdicových buněk (PSC) a PDAC buněk. V ko-kultuře s PSC došlo k up-regulaci miR-210 v nádorových buňkách linií Panc-1, MIAPaCa-2, a SUI-2. V nádorových buňkách PDAC byla prokázána indukce EMT prostřednictvím miR-210 ovlivněných PSC (Takikawa et al. 2017). Horizontální přenos exosomální

miR-210 mezi nádorovými buňkami v *in vitro* podmínkách podporoval rezistenci na GC (Yang et al. 2020).

### 2.5.6 Role studovaných tumor-supresorových miRNA v onkogenezi PDAC.

MiR-96 se podílí na regulaci onkogenu *KRAS*. V podmínkách *in vitro* byla zvýšená exprese *KRAS* v buněčných liniích MIAPaCa-2, PANC-1 a BxPC-3 asociována s poklesem hladin miR-96; následná expozice těchto buněčných linií miR-96 vyvolala apoptózu blokováním dráhy Akt/*KRAS* (Yu et al. 2010). Další geny, jejichž aktivita podléhá regulaci prostřednictvím miR-96, jsou *HERG1* a *NUAK1* (Feng et al. 2014; Huang et al. 2014).

MiR-148a je další miRNA s tumor-supresorovým účinkem. Její deregulace byla prokázána kromě PDAC i u karcinomu žaludku, tlustého střeva a mléčné žlázy (Xia et al. 2014; Takahashi et al. 2012; Xu et al. 2016). Buňky PDAC vykazují v porovnání s nenádorovým duktálním epitelem výraznou depleci miR-148a. Prvním identifikovaným genem regulovaným prostřednictvím miR-148a byl *CDC25*. *In vitro* transfekce analogu miR-148a vedla k omezení exprese *CDC25B* a tím k inhibici proliferace nádorových buněk (Liffers et al. 2011). Schopnost miR-148a omezit nádorový růst však nebyla prokázána při indukci její over-exprese pomocí lentivirového vektoru, a to jak v buněčných kulturách *in vitro*, tak *in vivo* v xenograftech u myši (Delpu et al. 2013). Down-regulace miR-148a se může inhibicí WNT/ $\beta$ -kateninové signální dráhy podílet i na indukci epitelově-mezenchymálního přechodu (EMT) nádorových buněk (Peng et al. 2017). Další cílové geny regulace pomocí miR-148a jsou *AMPK $\alpha$ 1*, *CCKBR*, *Bcl-2* a *GLUT1* (Zhao et al. 2013; Zhang et al. 2014; Wu et al. 2018).

MiR-217 je v nenádorové tkáni pankreatu exprimována v acinech s vysokou specificitou (Szafranska et al. 2007). V buňkách PDAC byla pomocí ISH a RT-qPCR prokázána výrazně snížená exprese miR-217 (Zhao et al. 2010). Její *in vitro* up-regulace prostřednictvím virového vektoru vedla k inhibici nádorového růstu, poklesu exprese *KRAS* a snížení fosforylace Akt. Inhibice miR-217 v buněčných liniích vyvolala opačný efekt; hladina exprese miR-217 korelovala negativně s hladinou proteinu *KRAS* (Zhao et al. 2010).

## 2.6 miRNA v prekurzorových lézích PDAC

Kancerogeneze je u velké části epitelových nádorů vícestupňovým procesem, v jehož počátečních fázích se vyskytují prekurzorové léze - intraepiteliální neoplázie (dysplázie). S postupnou akumulací genových mutací dochází k deregulaci klíčových signalizačních drah ovlivňujících buněčný cyklus a umožňujících přežití neoplastického klonu (Ren et al. 2019). Nekódující RNA molekuly, včetně miRNA, hrají pravděpodobně významnou roli v modulaci funkce onkogenů zapojených do iniciace a progresu dysplázie. Abnormality v profilu exprimovaných miRNA byly prokázány v prekancerózních lézích u více orgánů, včetně jícnu, tlustého střeva a mléčné žlázy (Fassan et al. 2011; Hannafon et al. 2018).

PDAC je u většiny pacientů diagnostikován v pozdním inoperabilním stadiu. Ve velké části případů lze při histologickém vyšetření resekátu identifikovat prekurzorovou lézi, ve které jsou s rostoucím stupněm dysplázie popisovány mutace v klíčových protoonkogenech a tumor-supresorových genech, včetně *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* a *SMAD4* (Ren et al. 2019). U PDAC se popisují tři typy prekurzorových lézí: pankreatická intraepiteliální neoplázie (PanIN), intraduktální papilární mucinózní neoplázie (IPMN) a mucinózní cystická neoplázie (MCN) (Vincent et al. 2011). Deregulace miRNA zapojených do procesu kancerogeneze byla v těchto prekurzorech prokázána už v časném stadiu transformace, tedy i v lézích s nízkým stupněm dysplázie.

### 2.6.1 Exprese miRNA v PanIN.

Pankreatická intraepiteliální neoplázie vzniká v epitelu vývodů. Jedná se o multifokální proces, pankreatické vývody mohou být postiženy i difúzně. Průměrná velikost těchto lézí je < 5 milimetrů (Hruban et al. 2008; Yamao et al. 2017); možnost radiologické diagnózy PanIN je proto značně limitována (Lee et al. 2018).

Stupeň dysplázie se v histologických řezech hodnotí na základě míře jaderné atypie a morfologického obrazu epitelu. Intraepiteliální neoplázie mohou postupně progredovat od nízkého stupně (PanIN-1) přes střední stupeň (PanIN-2) a vysoký stupeň (PanIN-3) až k invazivnímu adenokarcinomu (Hruban et al. 2008). PanIN-1 byla histologicky prokázána v 36 % pankreatů resekovaných pro jiné důvody než PDAC a má velmi nízký maligní potenciál (Andrea et al. 2003). Naproti tomu PanIN-3 se v pankreatech operovaných pro nenádorová onemocnění se vyskytuje vzácně; častěji je v asociaci s maligním tumorem nebo v souvislosti s hereditárními nádorovými syndromy vedoucími ke vzniku PDAC (Andrea et al. 2003; Slater et al. 2014).

Nové poznatky o expresi miRNA u PanIN umožňují získat hlubší vzhled do mechanismů zapojených do patogeneze PDAC. Změna profilu miRNA byla ve vzorcích PanIN při použití mikrodisekce prokázána v souvislosti s progresí dysplázie. byla charakterizována zvýšením exprese miR-21, miR-221, miR-222 and let-7a. Pomocí ISH byla navíc potvrzena akumulace miR-21 v cytoplasmě epitelii s PanIN-2/3 (duRieu et al. 2010). Analýza exprese miRNA v souboru 31 případů PanIN prokázala zvýšenou expresi miR-155 až v PanIN-2 (Ryu et al. 2010). U 34 případů PanIN s různým stupněm dysplázie byla pomocí mikroarraye po laserové mikrodisekci identifikována abnormální exprese celkem 65 miRNA, včetně miR-21 (Yu et al. 2011). Profil deregulovaných miRNA umožňoval kategorizovat léze dle stupně dysplázie; snížení miR-148a a miR-217, spolu se zvýšením miR-196a bylo prokázáno v PanIN2/3 (Xue et al. 2013). Snížení hladin miR-148a může být zapříčiněno hypermetylací promotoru (Hanoun et al. 2010). Exprese miR-96 a miR-217 klesala v souvislosti se zvyšujícím stupněm dysplázie (Chang et al. 2017).

Změny cirkulujících miRNA souvisejících s přítomností PanIN nebyly dosud podrobněji prozkoumány. V pilotní studii byla prokázána up-regulace miR-196a a miR-196b v PanIN-2/3; hladina těchto miRNA v periferní krvi byla signifikantně zvýšená u PDAC a u pacientů s multifokální PanIN2/3 sledovaných pro výskyt PDAC v rodině (Slater et al. 2014).

### **2.6.2 Exprese miRNA v IPMN**

Intraduktální papilární mucinózní neoplázie je cystická léze vycházející z epitelu hlavního pankreatického vývodu (main duct type) nebo vedlejších interlobulárních vývodů (branch duct type). Histologicky se popisuje varianta biliární, intestinální, gastrická a onkocytární (Levink et al. 2018). Biliární a „main duct type“ IPMN mají nejvyšší riziko maligní transformace do PDAC, která se popisuje až v 42 % případů „main duct type“ IPMN (Salvia et al. 2004).

Charakterizace změn profilu miRNA v tkáních IPMN může pomoci při stratifikaci rizikových lézí, s možností odhalení high grade dysplázie nebo maligní transformace. První práce zaměřená na analýzu IPMN pomocí RT-qPCR a LNA-ISH popsala zvýšenou expresi deseti miRNA, včetně miR-21 a miR-155 v nádorových buňkách. V pankreatické šťávě byla též zvýšená hladina miR-21 a miR-155. Tento nález byl ale vzhledem k malému počtu pacientů statisticky pouze hraničně relevantní (Habbe et al. 2009). Lubezky et al. (2013) po manuální mikrodisekci 55 tumorů a

vyšetření pomocí mikroarraye identifikovali zvýšení exprese miR-10a, miR-106a a miR-155 v IPMN, v porovnání s normální tkání a s malignitou. Mezi IPMN s nízkým a vysokým stupněm dysplázie byl popsán rozdíl v expresi celkem patnácti miRNA. IPMN s maligní transformací se lišila od ostatních lézí profilem deregulovaných miRNA (Lubezky et al. 2013). Caponi et al. (2013) prokázali zvýšenou expresi miR-21 a miR-155 u IPMN s invazí, miR-21 navíc vykazovala podstatný prediktivní význam pro OS a PFS u pacientů s IPMN s invazí. Hladina miR-101 byla vyšší u IPMN bez invaze. Nižší exprese miR-99a, miR-99b, miR-100, miR-126, miR-130 a miR-342-3p byla prokázána u high risk IPMN (Permeth-Wey et al. 2015). Léze s rostoucím stupněm dysplázie vykazovaly snížení hladin miR-96 a miR-217 (Chang et al. 2017).

U pacientů s IPMN jsou prokazatelné změny v hladině cirkulujících miRNA v periferní krvi; miR-21 byla zvýšena u IPMN, nebylo však možné odlišit IPMN od PDAC (Abue et al. 2015). Exosomální frakce v séru nemocných s IPMN obsahovala signifikantně zvýšené množství miR-191, miR-21 a miR-451, v hladině miRNA nevázaných na exosomy nebyly zjištěny rozdíly mezi pacienty s IPMN a kontrolou. (Goto et al. 2018).

### **2.6.3 Exprese miRNA v MCN.**

Mucinózní cystická neoplázie je nejméně častým prekurzorem PDAC. MCN je makroskopicky dobře ohraničená a opouzdřená mono- nebo oligolokulární cysta. Histologicky je výstelka cystického tumoru tvořena neoplastickým mucinózním epitelem, s celulárním stromatem ovariálního typu v okolí (Hruban a Fukushima 2008). Vnitřní povrch léze je hladký; přítomnost solidních murálních nodulů budí podezření z dysplázie nebo přechodu do malignity (Farrell 2015). MCN se obvykle nachází v těle nebo v kaudě pankreatu; na rozdíl od IPMN zpravidla nekomunikuje s vývodním systémem (Yamao et al. 2011).

Abnormality v expresi miRNA jsou v MCN prostudovány v menším rozsahu než u IPMN. V souboru 69 mikrodisekovaných pankreatických neoplázií umožnila analýza panelu miR-10b-5p, miR-202-3p, miR-210, a miR-375 odlišit MCN od jiných cystických tumorů pankreatu (Lee et al. 2014). Panel miR-130-3p, miR-192-5p, miR-202-3p a miR-337-5p vykazoval senzitivitu 100% při odlišení MCN od „branch duct type“ IPMN. Aspirát tekutiny z MCN vykazoval významné zvýšení hladin miR-21, panel tvořený z miR-17-3p, miR-21, miR-155, miR-191 a miR-221 ale neumožnil spolehlivě odlišit MCN od IPMN (Ryu et al. 2011)

## **2.7 Uplatnění miRNA v diagnostice PDAC**

### **2.7.1 miRNA v bioptické diagnostice tumorů pankreatu**

Tenkojehlová aspirační biopsie (FNAB) má pro diagnózu PDAC senzitivitu 81.6 %, specificitu 87.5 %, pozitivní prediktivní hodnotu 98.1 % a negativní prediktivní hodnotu 36.8 % (Voss et al. 2000). Dosud provedené studie popisují zvýšení senzitivity a specificity FNAB vyšetření při kombinaci s analýzou hladin miRNA v aspirátu. V jednotlivých pracích jsou značné rozdíly v navržených diagnostických panelech. První analýza exprese miRNA vzorků získaných při FNAB od šestnácti pacientů navrhla pro diagnózu PDAC kombinaci miR-196 a miR-217 (Szafranska et al. 2008). Při následném vyšetření aspirovaných vzorků z pankreatu pomocí mikroarraye byla u PDAC zjištěna deregulace celkem 158 miRNA. Elevace miR-21, miR-27a, miR-146a, miR-196a a miR-200a, spolu s depresí hladin miR-20a, miR-96 a miR-217 umožnila odlišit případy PDAC od benigních kontrol (Hong et al. 2014). Multicentrická studie 228 aspirátů pankreatu zpracovaných parafínovou technikou navrhla diagnostický panel miR-24, miR-130b, miR-135b, miR-148a, a miR-196 (Brand et al. 2014). Prospektivní studie s cílem validovat nálezy předchozích prací (Frampron et al. 2016) v nefixovaných FNAB vzorcích 55 pacientů s ložiskovým procesem pankreatu identifikovala zvýšenou expresi miR-21, miR-155, miR-210, miR-196a a miR-10b v maligních lézích.

### **2.7.2 miRNA v diagnostice cystických lézí pankreatu**

Rozšíření radiologických zobrazovacích metod přineslo zvýšení počtu odhalených pankreatických cyst (de Jong et al. 2010). Nejčastěji se jedná o mucinózní prekurzorové léze PDAC, serózní cystadenomy nebo pozánětlivé pseudocysty. Vzácněji se může se jednat o cysticky změněné invazivní adenokarcinomy (Pitman et al. 2010). Většina cystických lézí pankreatu je benigní s různým rizikem maligní transformace, určení jejich biologické povahy je bez odběru cytologického nebo histologického vzorku prakticky nemožné (Cho et al. 2013). V klinické praxi se používá aspirační cytologie při endoskopické ultrasonografii nebo endoskopické retrográdní cholangiopankreatografii (ERCP), charakterizována vysokou senzitivitou a nízkou specificitou pro diagnózu maligních lézí (Frampton et al. 2016). Zvýšení hladin CA19-9 a CEA v tekutém obsahu cysty je pomocným znakem při záchytu mucinózních neoplastických lézí (Brugge 2004). Vzhledem k nedostatkům v současné době klinicky

zavedených diagnostických postupů je studována možnost využití analýzy miRNA pro zjištění charakteru pankreatických cyst a určení jejich biologické povahy.

První pilotní studie analyzující hladiny miRNA v tekutém obsahu pankreatických cyst prokázala zvýšení miR-21, miR-221 a miR-17-3p v mucinózních lézích (Ryu et al. 2011). Elevace miR-21 a miR-221 v obsahu cysty byla asociována s maligní transformací v MCN a IPMN (Farrell et al. 2013). Zvýšení hladiny miR-21 bylo popsáno v tekutině u cysticky změněného PDAC a u serózního cystadenomu, bez možnosti jejich rozlišení na základě hodnot miR-21 (Jiao 2012). Analýza pomocí RNA seq zjistila změněnou hladinu patnácti miRNA, s odlišnými hodnotami v tekutině získané z prekursorových lézí a z cystického PDAC (Wang et al. 2015).

### **2.7.3 Cirkulující miRNA**

Odběr periferní krve je minimálně invazivním zákrokem, umožňujícím získat materiál použitelný pro nádorovou diagnostiku. Cirkulující miRNA se vyskytují v proteinových komplexech v asociaci s Ago2, HDL, Nucleofosmin-1 nebo uvnitř exosomů, což přispívá k jejich stabilitě (Arroyo et al. 2011; Cheng 2015; Kalra et al. 2013). Do oběhu jsou uvolňovány prostřednictvím ne zcela objasněných mechanismů (Sohel 2016). Analýza cirkulujících miRNA byla v různých studiích provedena ze vzorků plné krve, séra nebo z plazmy (Schultz et al. 2014; Wang et al. 2013; Franklin et al. 2018). Použití různých materiálů může způsobit nesrovnalosti v detegovaných hladinách miRNA (Wang et al. 2012). Krevní elementy, včetně trombocytů, obsahují vysoké množství miRNA (Lindsay a Edelstein 2016); hemolýza může zásadně změnit hladinu některých miRNA (Pritchard et al. 2012).

Dosud bylo publikováno víc než 30 prací zabývajících se diagnostickým potenciálem cirkulujících miRNA pro odhalení časného PDAC. Rozbor krve pomocí mikroarraye umožnil podrobně studovat změny hladin cirkulující miRNA u PDAC (Bauer et al. 2012; Schultz et al. 2014; Xu et al. 2016; Franklin et al. 2018), v jedné studii bylo detegováno u pacientů s nádorem až 91 miRNA se změněnou hladinou v krevní plazmě (Ali et al. 2011). Bylo identifikováno několik významně deregulovaných cirkulujících miRNA, zejména miR-18a (Morimura et al. 2011), miR-21 (Qu et al. 2017), miR-196a (Kong et al. 2011), miR-200a/b, miR-210 (Ho et al. 2010) a miR-221 (Kawaguchi et al. 2013); stanovení jejich hladin dokázalo odlišit PDAC od zdravých jedinců nebo pacientů s CP. Ke zvýšení senzitivity a specificity detekce PDAC pomocí cirkulujících miRNA může přispět sestavení diagnostických



panelů. Mezi jednotlivými dosud provedenými studiemi byly rozdíly ve složení těchto panelů (Wei et al. 2018); snahy o validaci výsledků byly neúspěšné (Xu et al. 2016). Doplnění diagnostických panelů miRNA údajem o hladině CA19-9 vedlo ke zvýšení jejich diagnostické hodnoty (Schultz et al. 2014; Liu et al. 2012; Ganepola et al. 2014). Nejvyšší senzitivita a specificita byla dosažena při kombinaci CA19-9 s cirkulující miR-16 a miR-196a (Liu et al. 2012).

Selektivní analýza cirkulující exosomální miRNA umožňuje získat další významnou informaci o profilu nádorem syntetizovaných miRNA a zvýšit přesnost měření odstraněním kontaminujících miRNA z krevních elementů. V cirkulujících exosomech u PDAC se prokázalo zvýšení hladiny více miRNA, včetně miR-10b, miR-21 a miR-744 (Joshi et al. 2015; Que et al. 2013; Miyamae et al. 2015). Na podkladě změn v exosomálních miRNA v krvi bylo sestaveno několik diagnostických panelů (Goto et al. 2018; Que et al. 2013, Madhavan et al. 2015). Pilotní studie kombinující panel exosomální miR-1246, miR-3976, miR-4306, a miR-4644 s cirkulujícími markery kmenových buněk CD104, MET, EpCAM, Tspan8 and CD44v6 uvedla senzitivitu 100 % a specificitu 80 % pro diagnózu PDAC (Madhavan et al. 2015).

#### **2.7.4 miRNA v pankreatické šťávě**

Pankreatická šťáva je sekremem acinárních buněk, obsahujícím především trávicí enzymy a ionty. MiRNA se z nádoru do pankreatické šťávy mohou uvolňovat buď volně nebo v exosomech (Sadakari et al. 2010; Nakamura et al. 2019). Předpokládá se, že analýza hladin miRNA může mít potenciál při hodnocení biologické povahy tumorózních lézí pankreatu. Určitou nevýhodou je technická náročnost odběru pankreatické šťávy během ERCP, někdy i se závažnými komplikacemi (Szary et al. 2013). Vzhledem k uvedeným obtížím byla analýza hladin miRNA v sekretech pankreatu studována zatím jen v rámci pilotních studií. První studie analyzující hodnoty miRNA v pankreatické šťávě identifikovala významnou elevaci hladin miR-21 a miR-155 u pacientů s PDAC, v porovnání s chronickou pankreatitidou (Sadakari et al. 2010). Zvýšená hladina miR-21 a miR-155 byla prokázána v pankreatické šťávě i v exosomech (Nakamura et al. 2019). Kombinace analýzy exprese miRNA s vyšetřením sérové hladiny CA19-9 nebo s cytologií pankreatické šťávy přinesla zvýšení senzitivity a specificity diagnózy PDAC (Wang et al. 2014; Nakamura et al. 2019).

### **2.7.5 miRNA ve stolici**

Stolice představuje dobře přístupný materiál obsahující izolovatelnou miRNA. Dosud největší pozornost dostaly fekální miRNA u adenokarcinomu tlustého střeva. Současná meta-analýza sedmnácti publikací identifikovala miR-21 a miR-92a jako nejspolehlivější markery pro diagnózu této malignity (Yau et al. 2019).

Použití fekálních miRNA v diagnostice PDAC představuje bezpečnější přístup, než jakým je odběr pankreatické šťávy při ERCP. Možnosti zavedení fekálních miRNA pro diagnózu PDAC ve stolici byly dosud zkoumány pouze v rámci pilotních studií, s nejednotnými závěry, a to jak ohledně změn v hladinách fekálních miRNA, tak i ve složení diagnostických panelů (Link et al. 2012; Ren et al. 2012; Yang et al. 2014).

## **2.8 Vztah miRNA k diferenciaci a progresi PDAC**

### **2.8.1 Hodnocení v chirurgických resekátech**

Vztah exprese miRNA k pokročilosti nádoru byl hodnocen v chirurgických resekátech v několika studiích, s protichůdným výsledkem. Dosud neexistuje shoda ve vytvoření panelu miRNA pomocí kterého by bylo možné určit pokročilost PDAC. Jamieson et al. (2012) demonstrovali pozitivní korelaci exprese miR-21, miR-146a a miR-628 ke stupni diferenciaci, pokročilosti nádoru a přítomnosti uzlinových metastáz. Pozitivní korelace hladin miR-21 s přítomností metastáz do lymfatických uzlin byla potvrzena ve dvou dalších pracích (Nagao et al. 2012; Kadera et al. 2013); naproti tomu Hwang et al. (2010) nepopsali statisticky významnou korelaci exprese miR-21 a přítomností uzlinových metastáz. S velikostí a pokročilostí tumoru souvisela kromě onkogenní miR-21 i zvýšená hladina miR-139b (Zhou et al. 2016). Giovanetti et al. (2010) prokázali statisticky významnou asociaci zvýšení hladiny miR-21 pouze s nízkou diferenciací karcinomu a ne s dalšími kliniko-patologickými parametry. Prediktivní úloha miR-21 nebyla všeobecně potvrzena, Dillhoff et al. (2008) neobjevili žádnou korelaci exprese miR-21 s diferenciací nádoru, jeho velikostí a přítomností vzdálených metastáz. Popsána byla pozitivní korelace snížené exprese miR-148a s pokročilostí tumoru a přítomností metastáz do lymfatických uzlin (Peng et al. 2017). Lemberger et al. (2019) stanovili panel šesti miRNA uplatňujících se v progresi PDAC (miR-130b, miR-141, miR-155, miR-196a, miR-216a, a miR-720), jejichž zvýšení pozitivně předpovídalo přítomnost nádorových metastáz v lymfatických uzlinách.

### **2.8.2 Hodnocení v krvi a v sekretech**

Cirkulující miRNA v krvi by mohly být vhodným markerem pro určení pokročilosti tumoru. Vzhledem k tomu, že k uvolňování miRNA do krevního oběhu dochází více mechanizmy včetně rozpadu buněk nebo aktivní sekrecí v exosomech (Sohel 2016), je korelace s výsledky získanými z chirurgických resekátů obtížná. Větší studie porovnávající změny v expresi miRNA v plazmě a v resekátech u téhož pacienta nebyla u PDAC dosud provedena.

Vztah hladin miRNA v periferní krvi ke klinicko-patologickým parametrům PDAC byl dosud málo studován. Byla prokázána korelace hladiny miR-21 s pokročilostí tumoru, se statisticky významným rozdílem mezi stadiem III a IV (Liu R et

al. 2012; Wang et al. 2013). Význam plazmatické hladiny miR-21 ale nebyl ve všech studiích srovnatelný. Liu et al. (2012) nedokázali v souboru 140 PDAC při použití panelu miR-16, miR-21, miR-155, miR-181a, miR-181b, miR-196a a miR-210 rozlišit u sledovaných pacientů jednotlivá stadia nádoru. Kawaguchi et al. (2013) zjistili zvýšenou plazmatickou hladinu miR-221 u pacientů se vzdálenými metastázami a s neresekabilním tumorem. V jiné studii korelovala inoperabilita tumoru se zvýšenou hladinou miR-196a (Kong et al. 2011). V další práci byla vyšší hladina exosomální frakce miR-196a zaznamenána u pacientů s časným PDAC, ve stadiu I a IIa (Xu et al. 2017).

Zvýšená hladina miR-205 a miR-210 v pankreatické šťávě predikovala přítomnost hematogenních metastáz (Wang et al. 2014).

## 2.9 MiRNA v určení prognózy pacientů s PDAC

Prognostický význam miRNA u pacientů s PDAC byl hodnocen především v rámci retrospektivních a pilotních studií. Ve většině dosud publikovaných prací byly miRNA izolovány z FFPE nebo ze zmraženého archivovaného materiálu z resekátů nádorů pankreatu (Bloomston et al. 2007; Szafranska et al. 2007; Zhang et al. 2009; Greither et al. 2010; Schultz et al., 2012; Frampton et al., 2014; Ali et al. 2015; Calatayud et al. 2017). Analýza vzorků PDAC pomocí mikroarraye odhalila vztah většího počtu miRNA k prognóze nemocných (Bloomston et al. 2007); tento nálezn umožnil rozdělení PDAC na molekulární podtypy (Namkung et al. 2016) a vytvoření panelu miRNA s prognostickým potenciálem.

Nejvíce prozkoumaným prognostickým markerem u PDAC je miR-21 (Wald et al. 2017), která hraje významnou roli v kancerogenezi. Její zvýšená exprese negativně ovlivňuje délku přežití u více maligních nádorů, včetně PDAC (Zhu et al. 2014). Další miRNA byly u PDAC předmětem jednotlivých studií analyzujících jejich expresi v malých souborech pacientů (Wald et al. 2017). S kratší délkou přežití souvisela zvýšená exprese více oncomiRNA, např. miR-10 (Preis et al. 2011), miR-155 (Papaconstantinou et al. 2013), miR-196a (Bloomston et al. 2007), miR-198 (Vychytilova-Faltejskova et al. 2015), miR-203 (Greither et al. 2010) a miR-222 (Frampton et al. 2015). Prognosticky nepříznivá byla snížená exprese tumor-supresorových miRNA, např. miR-34a (Jamieson et al. 2012), miR-96 (Li et al. 2014), miR-141 (Zhu et al. 2014), miR-148a\* (Calatayud et al. 2017) a miR-494 (Ma et al. 2013). Přestože výsledky pilotních studií se ukazují jako nadějně, prediktivní potenciál většiny miRNA zůstává neověřen. Navíc panely vybraných miRNA používané pro určení prognózy se u jednotlivých studií liší (Wald et al. 2017).

Změny hladiny cirkulujících miRNA v periferní krvi mohou mít význam pro predikci délky přežití pacientů s PDAC, byly však studovány v menším rozsahu než v tkáňových vzorcích z resekátů PDAC. Mezi cirkulující miRNA, jejichž zvýšená hladina souvisí s negativní prognózou pacientů, patří miR-21, miR-196a, miR-744 a miR-1290 (Khan et al. 2016; Kong et al. 2011; Miyamae et al. 2015; Li A 2013). Pro určení možnosti použití miRNA izolovaných z pankreatické šťávy nebo ze stolice pro predikci prognózy bylo dosud provedeno jen málo studií.

### 3 HYPOTÉZY A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

#### 3.1 Podklady pro vyslovení hypotéz

Hodnocení exprese miRNA představuje komplexní proces citlivý ke změnám v metodických postupech v pre-analytickém stadiu i v analytickém stadiu měření. Normalizační strategie je jedním z faktorů, který může mít významný dopad na zjištěné hodnoty exprese miRNA. Důležitou roli hraje variabilita související s technickým zpracováním a s biologickou heterogenitou ve vzorcích. Pro normalizaci RT-qPCR jsou u miRNA zpravidla voleny krátké nekódující RNA-molekuly. Může se jednat o produkty tzv. „housekeeping genů“, které ale mnohdy nebývají stabilně exprimovány v tumorech. Další možností je přidání umělých RNA-produktů (tzv. „alien spike“) do analytu ve známých koncentracích, což umožňuje normalizaci kroků analýzy následujících po izolaci miRNA z tkáňových vzorků.

U většiny maligních nádorů, včetně PDAC, byl popsán vysoký počet deregulovaných miRNA, a to jak ve tkáni resektovaných nádorů, tak i v tělesných tekutinách. Některé miRNA působí jako onkogeny a tumor-supresory, jejich abnormální exprese byla popsána i v prekurzorových lézích PDAC. Vzhledem k vysoké stabilitě miRNA by mohly změny jejich spektra v tělesných tekutinách sloužit pro diagnózu pacientů s PDAC v časném stadiu nemoci. Výsledky z výzkumu exprese miRNA v tkáňových vzorcích PDAC i prekurzorových lézí mohou být použity pro sestavení panelů miRNA pro tento diagnostický postup. Abnormality v expresi miRNA mohou souviset s pokročilostí tumoru nebo s přítomností metastáz, některé druhy miRNA mohou tedy sloužit k zařazení pacientů do prognostických skupin nebo pro predikci efektu protinádorové terapie. Přesný význam miRNA ve vzniku a progresi PDAC ale zůstává stále neobjasněn. Výsledky prací hodnotících expresi miRNA jsou navíc inkonzistentní; dosud nebyl stanoven univerzálně uznaný postup pro jejich začlenění do diagnostického a terapeutického postupu PDAC.

### 3.2 Hypotézy a cíle práce

Hlavním cílem bylo přispět ke zlepšení metod hodnocení exprese miRNA u PDAC a k objasnění roli vybraných miRNA ve vlastnostech PDAC.

Konkrétně se jednalo o:

-Hodnocení vlivu různých strategií normalizace na změny exprese vyšetřených miRNA v tkáních PDAC při měření prostřednictvím RT-qPCR.

*Hypotéza: volba kontroly pro normalizaci pokusu RT-qPCR ovlivňuje detegovanou hodnotu exprese vyšetřených miRNA.*

-Porovnání exprese normalizačních kontrol U6, U91, miR-16 a cel-miR-39 v parafínových blocích PDAC a nenádorových tkání pankreatu pro určení nejstabilnější kontroly k normalizaci pro RT-qPCR.

*Hypotéza: vybrané endogenní kontroly U6, U9, miR-16 a přidaná arteficiální „spike“ cel-miR-39 má stabilní expresi v PDAC a v nenádorových tkáních pankreatu.*

-Stanovení exprese miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155, miR-196a, miR-210 a miR-217 v parafínových blocích PDAC a v nenádorovém parenchymu pankreatu.

*Hypotéza: exprese vybraných miRNA je v nenádorové tkáni pankreatu a v PDAC odlišná.*

-Určení vztahu mikroskopických vlastností nádorů - histologického uspořádání, nukleárních atypií a mitotické aktivity k expresi miRNA.

*Hypotéza: histologické charakteristiky nádorů mají vztah k expresi vyšetřených miRNA.*

-Určení vztahu klinicko-patologických vlastností nádoru, včetně stadia nemoci a přítomnosti metastáz k expresi miRNA.

*Hypotéza: klinicko-patologické charakteristiky nádorů mají vztah ke změnám v expresi vyšetřených miRNA.*

-Určení vlivu exprese vybraných miRNA na délku přežití bez progresu (PFS) a celkovou délku přežití (OS) pacientů s PDAC.

*Hypotéza: délka intervalu mezi chirurgickou resekci nádoru a progresí a délka celkového přežití pacientů nemoci souvisejí s hladinami exprese vyšetřených miRNA.*

## **4 PACIENTI A METODY**

### **4.1 Soubory pacientů**

Obsahem disertační práce jsou 2 studie s mírně odlišným souborem pacientů operovaných na chirurgické klinice 3LF UK a FNKV v Praze. Parafinové bloky byly získány z bioptického archivu Ústavu patologie FNKV. Studie byly provedeny podle pravidel Helsinské deklarace a schváleny Etickou komisí 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Vyhláška 1006/2012 byla podepsána MUDr. Markem Váchou, Ph.D., vedoucím Etické komise.

#### **4.1.1 Základní charakteristiky pacientů v 1. studii**

Do studie bylo zahrnuto 24 pacientů, 11 žen a 13 mužů operovaných pro karcinom pankreatu v letech 2007-2012. Věk pacientů byl 36-83 let, s mediánem 65.5 let. U žádného z nemocných nebyly popsány hereditární genetické syndromy. V hlavě pankreatu bylo lokalizováno 18 nádorů, 1 nádor byl v těle a 5 bylo v kaudě. Typizace nádorů byla provedena podle WHO klasifikace tumorů trávicího ústrojí, 4. vydání (Bosman et al. 2010). Všechny nádory odpovídaly histologicky konvenčnímu adenokarcinomu vývodového typu. Jeden nádor byl dobře diferencovaný, 14 nádorů bylo středně diferencovaných a 9 nádorů bylo špatně diferencovaných. Ve třech případech byla nemoc ve stadiu pT1, u pěti případů pT2, u patnácti případů pT3 a u jednoho případu pT4. Celkem u osmnácti nemocných byly popsány metastázy do lymfatických uzlin.

#### **4.1.2 Základní charakteristiky pacientů v 2. studii**

Jednalo se o 54 nemocných s karcinomem pankreatu, operovaných v letech 2007-2015 (Tabulka číslo 1). V souboru bylo celkem 27 mužů a 27 žen. Věk pacientů byl 34-83 let, s mediánem 63 let. U žádného z nemocných nebyly popsány hereditární genetické syndromy. V hlavě pankreatu bylo lokalizováno 40 nádorů, 8 bylo v těle a 6 bylo v kaudě. Čtyři nádory byly dobře diferencované, 27 nádorů bylo středně diferencovaných a 23 nádorů bylo špatně diferencovaných. U jednoho z pacientů vznikl karcinom v terénu MCN. U čtyř pacientů byl tumor ve stadiu pT1, u sedmi pacientů pT2, u 41 pacientů pT3 a u dvou pacientů pT4. Celkem u 37 nemocných byly přítomny metastázy do lymfatických uzlin. Perineurální propagace byla přítomna u 47 případů a



lymfovaskulární invaze u 29 případů. Resekční okraj byl negativní (R0) ve čtyřiceti a pozitivní (R1) ve čtrnácti případech.

Věk (Medián)	63
Pohlaví (muž/žena)	27/27
Stupeň diferenciacie tumoru (dobře/středně/hůře)	4/27/23
Stadium tumoru (pT1/T2/T3/T4)	4/7/41/2
Šíření do lymfatických uzlin (N1/N0)	37/16
Perineurální šíření (ano/ne)	47/7
Lymfovaskulární invaze (ano/ne)	29/25
Resekční okraj (R1/R0)	14/40
Délka PFS (v měsících)	0-81
Medián	13
Délka OS (v měsících)	5-81
Medián	19

**Tabulka číslo 1:** Klinicko-patologické charakteristiky 54 pacientů s PDAC, vyšetřených v 2. studii. PFS – délka přežití bez progresu nemoci. OS – celková délka přežití.

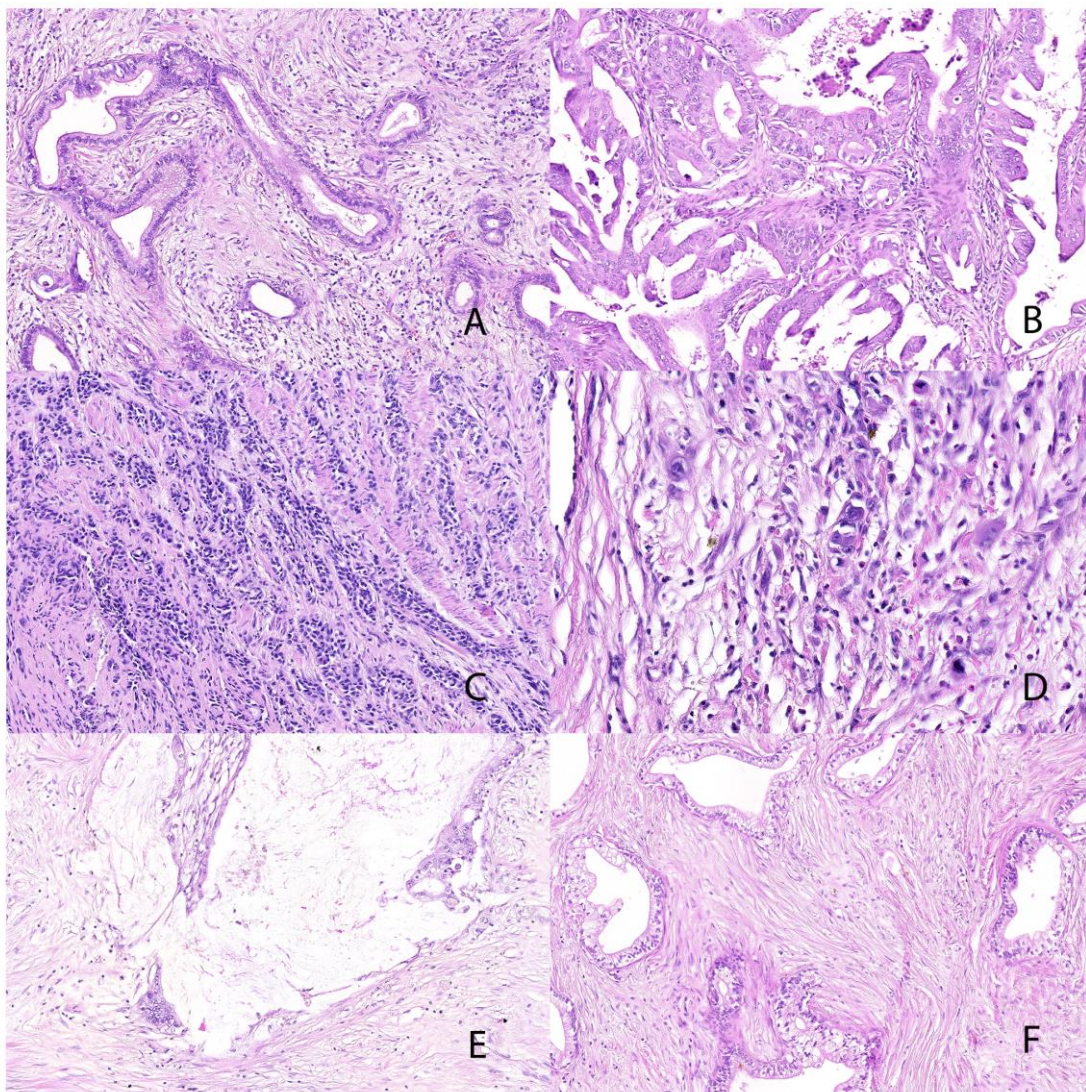
#### 4.1.3 Základní charakteristiky pacientů z databáze TCGA

Databáze „the Cancer Genome Atlas“ (TCGA) obsahuje miRnom 178 resekovaných karcinomů pankreatu. Stanovení exprese miRNA bylo provedeno na přístroji „next generation sequencing“ Illumina-seq. Údaje o expresi miRNA v nádorech byly získány z portálu oncolnc.org (Anaya 2016), klinické údaje pacientů byly staženy z portálu TCGA (gdc.cancer.gov). Po kontrole dostupných klinických údajů jsme z analýzy vyloučili případy neuroendokrinních nádorů a speciálních podtypů adenokarcinomu pankreatu. Vyšetřený soubor obsahoval 160 pacientů s konvenčním PDAC.

#### 4.2 Morfologická charakteristika nádorů

Nádory byly histopatologicky hodnoceny podle 4. vydání WHO klasifikace tumorů trávicího ústrojí (Bosman et al. 2010). Všechny vyšetřované nádory odpovídaly konvenčnímu duktálnímu adenokarcinomu. Mikroskopická architektura nádorů byla klasifikována jako tubulární, kribriformní, solidně-trabekulární, mucinózní, světlobuněčná a disociativní (obrázek číslo 3). U jednotlivých případů bylo v archivu nalezeno 4-8 histologických preparátů obsahujících nádor. Detailnější hodnocení probíhalo na každém histologickém řezu obsahujícím strukturu PDAC. Zastoupení

histologických struktur v nádoru bylo hodnoceno v celém jeho objemu, podíl jednotlivých typů byl spočítán po pěti procentech celkového objemu nádoru. Nukleární pleomorfismus byl hodnocen dle třístupňové klasifikace jako mírný, střední nebo výrazný. Mitózy byly počítány na 10 zorných polí s velkým zvětšením (HPF) (mikroskop Olympus BX43 a objektiv Olympus Plan 40x/0.65).



**Obrázek číslo 3:** Histologická struktura pankreatického duktálního adenokarcinomu.

**A** – tubulární (20x zvětšení). **B** – kribriformní (20x). **C** – solidně trabekulární (20x). **D** – disociativní (40x). **E** – hlenotvorný (20x). **F** – světlobuněčný (20x).

#### 4.3 Výběr vzorků pro analýzu exprese miRNA

Z archivovaných parafinových bloků byl vybrán vždy jeden blok, kde nádorová tkáň tvořila minimálně dvě třetiny rozsahu. Vzorky nenádorové tkáně pankreatu představující negativní kontrolu byly získány ze separátních parafinových bloků ze vzdálenosti minimálně 15 mm od nádoru.

#### 4.4 Izolace miRNA a reverzní transkripce

Pro izolaci miRNA byly použity tři parafinové řezy tloušťky 6  $\mu\text{m}$ , získané z každého vybraného bloku. Izolace byla provedena pomocí kitu miRNeasy FFPE kit (Qiagen), dle pokynů výrobce. Pro ověření kvality a čistoty izolátu bylo použito 2 mikrolitrů RNA. Poměr absorbance byl měřen multidetekčním přístrojem Synergy HT (BioTek) při vlnové délce 260 a 280 nm, použitím Take3 micro-volume ploténky. Integrita izolované RNA byla hodnocena agarózovou gelovou elektroforézou a pomocí softwaru GeneTools 3.08 (SynGene).

Pro reverzní transkripci byl použit mix stem-loop primerů. Pro analýzu byly zvoleny stem-loop primery, jejichž struktura snižuje vazbu primeru na pre- a pri-miRNA a tím se zvyšuje specifita vyšetření. Primery byly navrženy pomocí miRNA primer design softwaru (Dr. Fuliang Xie, East Carolina University). Sekvence stem-loop primerů pro vnitřní kontroly, včetně “alien spike” (miR-39 od *C. elegans*) a kvantifikovaných pankreatických miRNA jsou v Tabulkách číslo 2 a číslo 3.

Jméno kontroly	Sekvence stem-loop primerů
miR-39 <i>C. elegans</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTATTAC
U6	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAAATATGG
U91 snoRNA	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGGCCT
miR-16	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGCCAA

**Tabulka číslo 2:** Stem-loop primery pro reverzní transkripci vnitřních kontrol.

miRNA	Sekvence stem-loop primerů
miR-21	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACA
miR-96	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGCAAAAATGTG
miR-148a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGTCGGAG
miR-155	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACCCCTATCAGG
miR-196a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCAACAACATG
miR-210	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAGCCGCTGTC
miR-217	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCCAATCAGTTC

**Tabulka číslo 3:** Stem-loop primery pro reverzní transkripci miRNA.

	Sekvence primerů
Univerzální primer	ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
mir-39 <i>C. elegans</i>	GCGGCGGAGCTGATTTTCGTCTTG
U6	GCGGCGGGCGCAAGGATGACACG
U91 snoRNA	GCGGCGGTGGCCGATGATGACG
miR-16	GCGGCGGTAGCAGCACGTAAAT
miR-21	GCGGCGGTAGCTTATCAGACTG
miR-96	GCGGCGGTTTGGCACTAGCAC
miR-148a	GCGGCGGAAAGTTCTGAGACACTCC
miR-155	GCGGCGGTAAATGCTAATCGTG
miR-196a	GCGGCGGTAGGTAGTTTCATGTTG
miR-210	GCGGCGGCTGTGCGTGTGACAG
miR-217	GCGGCGGTACTGCATCAGGAAC

**Tabulka číslo 4:** Primery pro RT-qPCR.

Reverzní transkripce byla provedena použitím přístroje C1000 Thermal Cycler (BIO-RAD). Reakční směs objemu 50  $\mu$ l obsahovala: 1  $\mu$ g DNA-free RNA, reakční pufr [50 mM Tris – HCl (pH 8.3 při 25 °C), 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub> a 50 mM DTT]; 1 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP; 20 IU rRNasin ribonukleázového inhibitoru; 100 IU Moloney murine leukemia virus reverzní transkriptázy (M-MuLV RT, Thermo scientific) a primer mix, obsahující 20 pmol z každého stem-loop primeru. Spike RNA (miR-39 od *C. elegans*, 5  $\times$  10<sup>8</sup> kopií) byla přidána do směsi před transkripcí, jako normalizační kontrola. Po denaturaci (5 minut při 70°C, následně chlazení na ledu), reakční směs byla inkubována 10 minut při 25°C, následně 60 minut při 42°C. Pro ukončení reakce byla směs zahřáta 10 minut na 70°C.

#### 4.5 Hodnocení exprese miRNA pomocí qPCR

Vzorky cDNA byly amplifikovány v duplikátech bezprostředně po reverzní transkripci, použitím přístroje 7500 Fast real-time PCR system (Applied Biosystems) a kitu Hot FirePol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne). Do reakční směsi byl přidán 10 pmol každého primeru (miRNA specifických a univerzální, Tabulka číslo 4) a 2  $\mu$ l cDNA. Amplifikace vzorků cDNA probíhala při následujících podmínkách: denaturace při 94 °C délky 15 minut, následně 40 cyklů tvořených denaturací při 94 °C

trvající 15 s, annealingem při 62 °C trvajícím 60 s a DNA syntézou při 72 °C trvajícím 40 s. Specificita reakčních produktů byla sledována pomocí křivek tání.

Metoda  $\Delta\Delta CT$  byla použita pro stanovení hladin relativní exprese analyzovaných miRNA v nádorech (Pfaffl 2001). CT (cycle threshold) je hodnota amplifikačního cyklu, při které PCR vstoupí do fáze exponenciálního růstu a intenzita fluorescenčního signálu produktu překročí sílu pozadí. Hodnota CT byla stanovena individuálně pro každou miRNA v nádorech a v příslušných nenádorových tkáních pankreatu. Výpočet relativních hodnot exprese probíhal dle formule:

$$\Delta\Delta CT = \left( (CT_{miRNA})_{tumor} - ((CT_{control})_{normal} \pm n) \right) - \left( (CT_{miRNA})_{normal} - (CT_{control})_{normal} \right).$$

## 4.6 Statistická analýza

### 4.6.1 První studie

Expres miRNA v nádorové a normální tkáni byla porovnána prostřednictvím párovaného dvouvýběrového Studentova t-testu a analýzou rozptylu (ANOVA). Hodnoty  $p < 0.05$  byly považovány za statisticky významné. Údaje z měření RT-qPCR (CT-threshold cykly) byly linearizovány, algoritmus NormFinder byl použit pro výběr nejstabilnějšího genu z vnitřních kontrol.

### 4.6.2 Druhá studie

Statistická analýza byla provedena pomocí programů GenEx 6 (MultiD analyses), S.A.S. verze 9.4 (SAS Inc, Cary, NC, USA) a SPSS 25 (IBM). Expres miRNA v nádorové a normální tkáni byla porovnána pomocí párovaného Wilcoxonova testu. Vztah hladiny exprese individuálních miRNA byl hodnocen pomocí Spearmanova koeficientu pořadové korelace. Vztah exprese miRNA a klinicko-patologických charakteristik nádoru k délce přežití pacientů s PDAC byl hodnocen univariální analýzou a multivariální analýzou pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik. Vztah exprese miRNA a délky přežití pacientů v databáze TCGA byl hodnocen univariální analýzou pomocí Coxova modelu regrese. Každá testovaná hypotéza byla dvoustranná. Vybraná hladina významu byla  $\alpha = 0.05$ , hodnoty  $p < 0.05$  byly považovány za statisticky signifikantní.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Vztah exprese miRNA v PDAC k endogenním kontrolám

V první studii byla hodnocena exprese vybraných miRNA (miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155, miR-196a a miR-217), izolovaných z parafinových bloků resekátů PDAC a příslušných nenádorových tkání. Porovnání exprese miRNA mezi PDAC a nenádorovou kontrolou prokázala signifikantní variaci pro hodnotu exprese každé z vyšetřených miRNA (Obrázek číslo 4, Tabulka číslo 5).

Onkogenní miR-21 byla významně over-exprimovaná v nádorech, až 17.71 násobně při normalizaci k U91 ( $p < 0.01$ ). Zjištěné hodnoty exprese miR-21 se změnily na 5.44násobek při normalizaci k U6 ( $p < 0.01$ ), 7.03násobek v případě miR-16 ( $p < 0.01$ ) a na 14.56násobek při “spike” ( $p < 0.01$ )

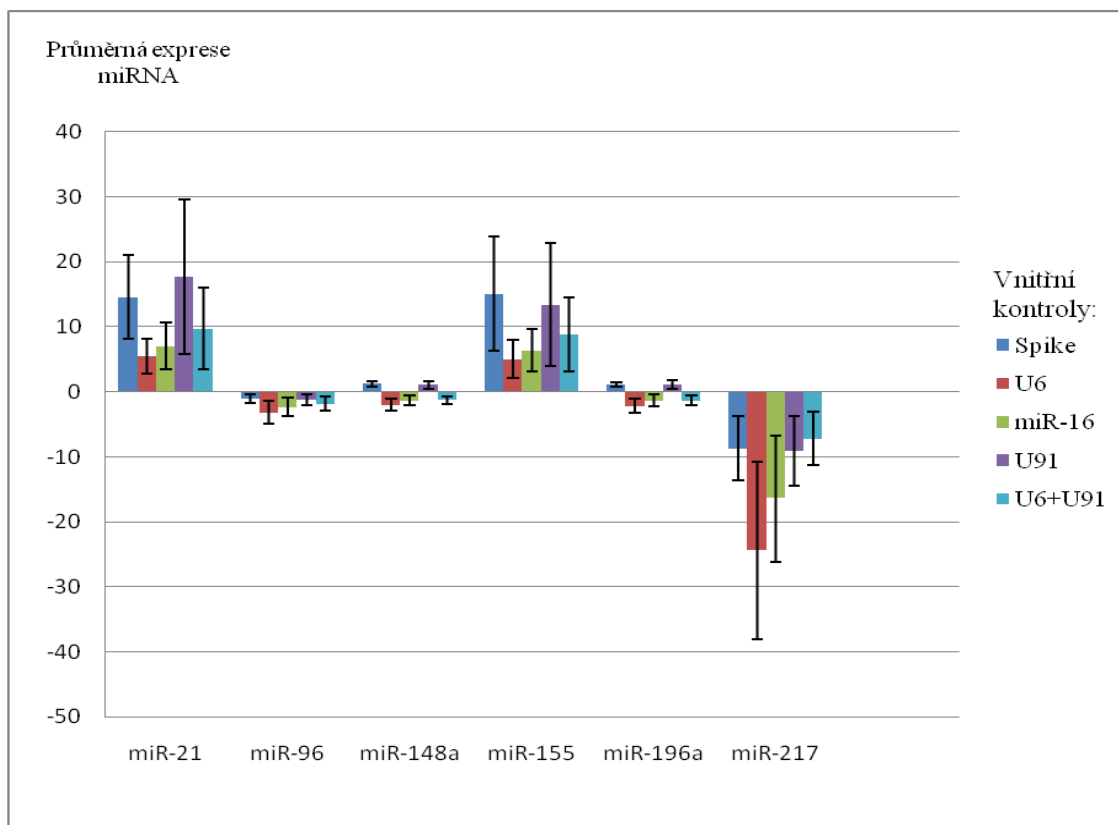
Hodnota exprese miR-96 v PDAC nevykazovala signifikantní změny při normalizaci pomocí “spike” ( $p > 0.05$ ) a U91 ( $p > 0.05$ ). Exprese miR-96 byla ovšem významně down-regulovaná, když byla měřena relativně k U6 (3.22krát,  $p < 0.01$ ) nebo miR-16 (2.32krát,  $p < 0.01$ ).

Nebyl prokázán signifikantní rozdíl v expresi miR-148a při normalizaci k “spike” ( $p > 0.05$ ), nebo k U91 ( $p > 0.05$ ). Na druhou stranu, exprese miR-148a byla signifikantně snižena při použití U6 (1.33krát,  $p < 0.01$ ) a miR-16 (2.04krát,  $p < 0.01$ ) pro normalizaci.

V nádorech byla zjištěna zvýšená exprese miR-155, s významnou variací při použití různých vnitřních kontrol pro normalizaci: amplifikace miR-155 byla 15.1 násobná relativně k “spike” ( $p < 0.01$ ); 5.05 násobná k U6 ( $p < 0.01$ ); 6.39 násobná k miR-16 ( $p < 0.01$ ) a 13.36 násobná k U91 ( $p < 0.01$ ).

Exprese miR-196a byla mírně zvýšena relativně při normalizaci k “spike” (1.09krát) a U91 (1.13krát), aniž by byl výsledek statisticky signifikantní ( $p > 0.05$ ). Hladina miR-196a byla statisticky významně snížena relativně k U6 (2.22krát,  $p < 0.01$ ) a nevýznamně snížena k miR-16 (1.35krát,  $p > 0.05$ ).

Hladina miR-217 byla významně nižší ve všech případech PDAC v porovnání s normální tkání pankreatu, při normalizaci ke všem vnitřním kontrolám ( $p < 0.01$ ). Nejnižší hodnota exprese byla stanovena při normalizaci k U6 (24.39 násobné snížení,  $p < 0.01$ ).



**Obrázek číslo 4:** Expresse miRNA při použití různých vnitřních kontrol

Průměrná expresse vybraných miRNA ve vzorcích PDAC, měřeno pomocí RT-qPCR při normalizaci k odlišným interním kontrolám a ke kombinaci U6 + U91. Hodnoty jsou prezentovány jako průměr ± standardní odchylka. Hodnoty expresse miRNA jsou signifikantně variabilní, v závislosti od volby normalizace.

miRNA	Vnitřní kontroly				
	Spike	U6	miR-16	U91	U6+U91
miR-21	14,56 ± 6,468 <b>p &lt; 0.01</b>	5,44 ± 2,73 <b>p &lt; 0.01</b>	7,03 ± 3,614 <b>p &lt; 0.01</b>	17,71 ± 11,922 <b>p &lt; 0.01</b>	9,67 ± 6,287 <b>p &lt; 0.01</b>
miR-96	-1,04 ± 0,668 <b>p &gt; 0.05</b>	-3,22 ± 1,766 <b>p &lt; 0.01</b>	-2,32 ± 1,376 <b>p &lt; 0.01</b>	-1,17 ± 0,831 <b>p &gt; 0.05</b>	-1,85 ± 1,134 <b>p &lt; 0.01</b>
miR-148a	1,25 ± 0,429 <b>p &gt; 0.05</b>	-2,04 ± 0,92 <b>p &lt; 0.01</b>	-1,33 ± 0,782 <b>P &lt; 0.05</b>	1,06 ± 0,549 <b>p &gt; 0.05</b>	-1,27 ± 0,594 <b>p &gt; 0.05</b>
miR-155	15,1 ± 8,786 <b>p &lt; 0.01</b>	5,05 ± 2,992 <b>p &lt; 0.01</b>	6,39 ± 3,312 <b>p &lt; 0.01</b>	13,36 ± 9,477 <b>p &lt; 0.01</b>	8,79 ± 5,675 <b>p &lt; 0.01</b>
miR-196a	1,09 ± 0,306 <b>p &gt; 0.05</b>	-2,22 ± 1,09 <b>p &lt; 0.01</b>	-1,35 ± 0,905 <b>p &gt; 0.05</b>	1,13 ± 0,676 <b>p &gt; 0.05</b>	-1,34 ± 0,726 <b>p &lt; 0.05</b>
miR-217	-8,69 ± 4,99 <b>p &lt; 0.01</b>	-24,39 ± 13,616 <b>p &lt; 0.01</b>	-16,39 ± 9,71 <b>p &lt; 0.01</b>	-9,09 ± 5,323 <b>p &lt; 0.01</b>	-7,19 ± 4,161 <b>p &lt; 0.01</b>

**Tabulka číslo 5:** Průměrná změna hladin expresse ve vzorcích PDAC, měřena relativně k 4 různým vnitřním kontrolám a ke kombinaci U6 + U91, při porovnání s normální tkání pankreatu. Negativní hodnoty označují down-regulaci miRNA v nádoru. Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± standardní odchylka. Hodnota p < 0.05 je považována za statisticky signifikantní. P-hodnoty pro bezvýznamné rozdíly jsou vyznačeny červeným písmem.

Kombinace U6 a U91 byla identifikována jako nejspolehlivější pro hodnocení exprese miRNA (hodnota stability = 0.036; Tabulka číslo 6). Při normalizaci s nejstabilnějším párem (Tabulka číslo 5), miR-21 a miR-155 vykazovaly signifikantní up-regulaci (9.67 násobně a 8.79 násobně,  $p < 0.01$ ). Aktivita miR-96, miR-196a a miR-217 byla významně inhibována (1.85 násobně, 1.34 násobně a 7.19 násobně,  $p < 0.01$ ). Exprese miR-148a byla též nižší, změna ale nebyla statisticky signifikantní ( $p > 0.05$ ).

Gen	Hodnota stability		<b>Nejlepší gen</b> U91		
Spike	0.085		<b>Hodnota stability</b> 0.056		
U6	0.056		<b>Nejlepší kombinace dvou genů:</b> U6 a U91		
miR-16	0.078		<b>Hodnota stability pro nejlepší kombinaci:</b> 0.036		
U91	0.056				
Nitroskupinová variace			Meziskupinová variace		
Skupina	1	2	Skupina	1	2
Spike	0.061	0.065	Spike	0.054	-0.054
U6	0.013	0.026	U6	-0.026	0.026
miR-16	0.023	0.086	miR-16	-0.043	0.043
U91	0.017	0.053	U91	0.016	-0.016

**Tabulka číslo 6:** Stabilita vnitřních kontrol zjištěna analýzou algoritmem NormFinder. Skupina 1) Normální tkáň; skupina 2) vzorky PDAC.

## 5.2 Stanovení optimálního postupu normalizace pro měření exprese miRNA

Pro určení optimální kontroly pro normalizaci byly pomocí one-way ANOVA analýzy porovnány hodnoty exprese vyšetřených miRNA, normalizované k „spike“ i k dalším endogenním kontrolám, včetně kombinaci U6 + U91. V případě stability všech normalizačních kontrol by byly hodnoty exprese vyšetřených miRNA shodné pro každou kontrolu. Provedená analýza naopak prokázala signifikantní rozdíly v expresi pro miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155 a miR-196a ( $p < 0.01$ ). Rozdíl v expresi byl pro miR-217 nevýznamný ( $p > 0.05$ ).

Následně byly prostřednictvím párového Studentova *t*-testu porovnány hodnoty exprese vybraných miRNA získané po normalizaci k „spike“ nebo k endogenním kontrolám (Tabulka číslo 7). Rozdíly v expresi všech vybraných miRNA, kromě miR-217, byly odlišné při normalizaci k „spike“, U6 a při kombinaci U6 a U91. V případě



miR-16 byly rozdíly nevýznamné pouze pro miR-217 ( $p > 0.05$ ). Rozdíly v expresi mezi “spike” a U91 byly statisticky insignifikantní pro každou z miRNA ( $p > 0.05$ ), mimo miR-217 ( $p < 0.05$ ). Jediná endogenní kontrola, která demonstrovala podobné chování jako “spike”, byla U91.

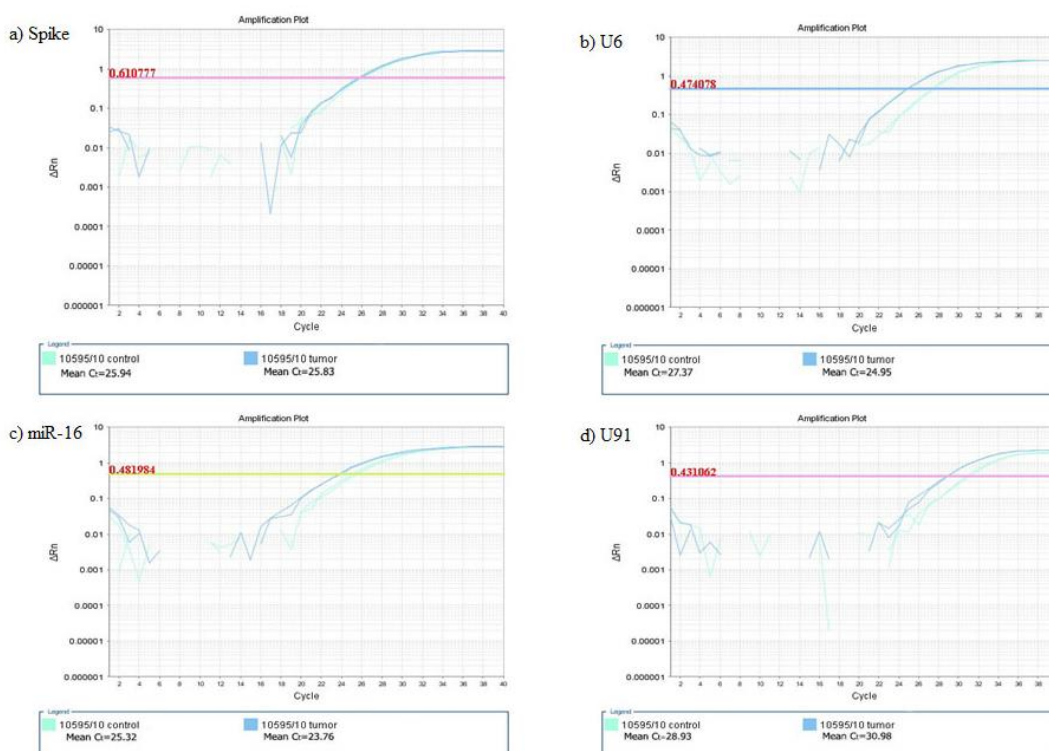
Prahové cykly (CT) pro každou z endogenních kontrol se lišily v nádorech a v normálních tkáních pankreatu (Obrázek číslo 5). Během analýzy amplifikačních křivek pro různé interní kontroly téměř v každém vzorku tumoru byla změna prahového cyklu o  $n = 5-6$  cyklů v porovnání s normální tkání. CT hodnoty pro “spike” byly podobné u PDAC a u normálních tkání, s rozdílem menším než  $n = 0.8$  cyklů. V případě dalších kontrol změny CT-hodnot činily od  $n = -6.20$  do  $n = 5.8$  cyklů. Hladina exprese zvolených endogenních kontrol byla změřena použitím normalizace k “spike” (Tabulka číslo 8). Variace v expresi U6 v tumorech vykazovala hodnoty  $-1.03$  až  $8.12$ násobek normálních tkání, miR-16  $-2.94$  až  $7.38$ násobek a U91  $-3.05$  až  $4.36$ násobek. V expresi rozdíl byl statisticky signifikantní pro každou vnitřní kontrolu ( $p < 0.01$ ). U6 byla nadměrně exprimována v 22 nádorech (z 24), miR-16 v 18 nádorech a U91 v 14 nádorech. MiR-16 byla down-regulována v 6 nádorech a U91 v 5 nádorech.

Ve vzorcích nádoru jsme prokázali instabilitu exprese pro každou endogenní kontrolu. Algoritmus NormFinder byl použit pro identifikaci nejstabilnější interní kontroly. Údaje ohledně exprese vnitřních kontrol získané RT-qPCR byly linearizovány a porovnány ve dvou skupinách: tumory a normální pankreatické tkáně (Tabulka číslo 6). Nejstabilnější kontrolou byla U91 (hodnota stability = 0.056), hodnoty stability pro další vnitřní kontroly byly podobné (hodnota stability = 0.085; 0.056 a 0.078 pro “spike”, U6 a miR-16). U6 vykazovala stejnou hodnotu stability jako U91 (hodnota stability = 0.056), demonstrovala ale vyšší hodnoty vnitroskupinové variability. Překvapivě, nejméně stabilní kontrolou byl “spike” (hodnota stability = 0.085). Důvodem pro “nestabilitu” spike může být, že Normfinder dokáže vypočítat variace dvou skupin, obsahující každý případ nádoru a normálních tkání. Není ale schopen posoudit rozdíly mezi normální tkání a nádorem u jednotlivých pacientů. Nejstabilnějším párem vnitřních kontrol byla kombinace U6 + U91 (hodnota stability = 0.036).

miRNA	Vnitřní kontroly			
	U6	miR-16	U91	U6+U91
miR-21	2,97E-06 p < 0.001	0.003404 p < 0.01	0,7979 <b>p &gt; 0.05</b>	0.000789 p < 0.01
miR-96	0.003078 p < 0.01	0.02723 p < 0.05	0,639203 <b>p &gt; 0.05</b>	0.038631 p < 0.05
miR-148a	4,66E-06 p < 0.001	0.007849 p < 0.01	0,3078 <b>p &gt; 0.05</b>	0.000586 p < 0.01
miR-155	6,13E-05 p < 0.01	0.000873 p < 0.01	0,534202 <b>p &gt; 0.05</b>	0.001831 p < 0.01
miR-196a	7,93E-07 p < 0.001	0.042034 p < 0.05	0,862491 <b>p &gt; 0.05</b>	0.000117 p < 0.01
miR-217	0.003951 p < 0.01	0.065696 <b>p &gt; 0.05</b>	0.024668 p < 0.05	0.008373 p < 0.05

**Tabulka číslo 7:** Rozdíly hodnot exprese miRNA při normalizaci.

Hladiny exprese miRNA byly normalizovány relativně k „spike“, v porovnání s normalizací relativně k dalším vnitřním kontrolám. Hodnoty  $p < 0.05$  párovaného t-testu byly považovány za statisticky signifikantní. Hodnoty  $p$  statisticky nevýznamných rozdílů jsou vyznačeny tučným červeným písmem.



**Obrázek číslo 5:** Endogenní kontroly mají odlišné prahové cykly (CT) v nádorech a v normálních tkáních.

a). Spike, rozdíl v CT mezi tumorem a kontrolou je  $n = 0,11$  cyklů. b). Hodnota rozdílu pro U6 je  $n = -2,42$  cyklů. c). Pro miR-16 je  $n = -1,56$  cyklů. d). Pro U91 je  $n = 2,05$  cyklů. Tento nálezní potvrzuje, že exprese zvolených endogenních kontrol v tumorech je variabilní.

	Geny		
	U6	miR-16	U91
Min	-1,03	-2,94	-3,05
Max	8,12	7,38	4,36
Průměr ± SD	3,13 ± 1,331 p < 0.01	2,69 ± 1,540 p < 0.01	1,61 ± 0,730 p < 0.01

**Tabulka číslo 8:** Hladiny exprese endogenních kontrol v PDAC, relativně při normalizaci k “spike”. Hodnoty exprese endogenních kontrol jsou signifikantně variabilní v PDAC, v porovnání s normální tkání Hodnoty  $p < 0.05$  byly považovány za statisticky signifikantní.

### 5.3 Exprese miRNA v karcinomech pankreatu

Analýza tkání PDAC prokázala v souborech pacientů v 1. a v 2. studii signifikantní změny exprese vybraných miRNA (Tabulka číslo 5 a 9). Ve skupině pacientů ve 2. studii (Tabulka číslo 9) bylo zjištěno zvýšení exprese miR-21, miR-155 a miR-210 (až 72.62-krát, 232.36-krát a 181.38-krát;  $p < 0.01$ ), v porovnání s nenádorovou tkání pankreatu. Na druhou stranu, miR-96 byla významně down-regulována v PDAC (-1.42-krát,  $p < 0.01$ ). Exprese miR-217 byla často inhibována, v patnácti vzorcích PDAC nebyla tato miRNA vůbec detegována. Signifikantní rozdíly mezi nádorem a normální tkání nebyly zjištěny pro expresi miR-148a a miR-196a ( $p > 0.05$ )

Byla zjištěna signifikantní pozitivní korelace mezi úrovní exprese různých miRNA (Tabulka číslo 10 A a B). Vysoké hladiny miR-21 souvisely s elevací miR-155 ( $\rho = 0.48$ ,  $p < 0.01$ ) a miR-210 ( $\rho = 0.36$ ,  $p < 0.01$ ). Down-regulace miR-96 korelovala s miR-196a ( $\rho = 0.42$ ,  $p < 0.01$ ). Vztah mezi miR-155 a miR-210 ( $\rho = 0.30$ ,  $p = 0.029$ ), dále mezi miR-148a a miR-217 ( $\rho = 0.27$ ,  $p = 0.048$ ) byl signifikantní pro interval spolehlivost 95 % a nesignifikantní pro 99 %.

miRNAs	Změny hladiny exprese miRNA		
	Min	Max	Průměr ± SD
miR-21	-16.12	72.62	12.01 ± 14.242 <b>p &lt; 0.05</b>
miR-96	-18.52	6.22	-1.42 ± 3.981 <b>p &lt; 0.05</b>
miR-148a	-55.56	42.3	-1.63 ± 10.762 p = 0.08
miR-155	-13.16	232.36	22.91 ± 38.526 <b>p &lt; 0.05</b>
miR-196a	-15.38	25.9	0.913 ± 5.574 p = 0.91
miR-210	-4.0	181.38	15.68 ± 28.869 <b>p &lt; 0.05</b>
miR-217	-100 (0*)	15.87	-7.45 ± 16.537 <b>p &lt; 0.05</b>

**Tabulka číslo 9:** Průměrné změny hladin exprese miRNA v PDAC, při porovnání s normální tkání. Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± standardní odchylka. Negativní hodnoty označují down-regulaci miRNA v nádoru. Hodnoty  $p < 0.05$  byly považovány za statisticky signifikantní. Hodnoty  $p$  Wilcoxonova testu pro signifikantní rozdíly jsou vyznačeny tučným červeným písmem.

\*Expresse miR-217 nebyla detegována v patnácti případech PDAC.

A	miR-21	miR-96	miR-148a	miR-155	miR-196a	miR-210	miR-217
miR-21	1	0.1197	0.1167	<b>0.4827</b>	0.1786	<b>0.3601</b>	-0.0415
miR-96	0.1197	1	0.1142	0.1193	<b>0.4281</b>	-0.0047	0.0150
miR-148a	0.1167	0.1142	1	0.0871	-0.1575	0.0843	<b>0.2747</b>
miR-155	<b>0.4827</b>	0.1193	0.0871	1	-0.0630	<b>0.3023</b>	-0.1114
miR-196a	0.1786	<b>0.4281</b>	-0.1575	-0.0630	1	0.0478	0.0409
miR-210	<b>0.3601</b>	-0.0047	0.08435	<b>0.3023</b>	0.0478	1	-0.0557
miR-217	-0.0415	0.0150	<b>0.27475</b>	-0.1114	0.0409	-0.0557	1

B	miR-21	miR-96	miR-148a	miR-155	miR-196a	miR-210	miR-217
miR-21	0	0.39775	0.40961	<b>0.00028</b>	0.20512	<b>0.00871</b>	0.7699
miR-96	0.39775	0	0.42014	0.39928	<b>0.00154</b>	0.97316	0.9153
miR-148a	0.40961	0.42014	0	0.53890	0.26478	0.55215	<b>0.0486</b>
miR-155	<b>0.0002</b>	0.39928	0.53890	0	0.65716	<b>0.02933</b>	0.4316
miR-196a	0.20512	<b>0.00154</b>	0.26478	0.65716	0	0.73616	0.7732
miR-210	<b>0.00871</b>	0.97316	0.55215	<b>0.02933</b>	0.73616	0	0.6947
miR-217	0.76992	0.91539	<b>0.04869</b>	0.43166	0.77322	0.69476	0

**Tabulka číslo 10 A a B:** Korelace exprese hladin exprese mezi různými miRNA

Hodnoty Spearmanova koeficientu pořadové korelace ( $\rho$ ) byly použity pro hodnocení vztahu exprese různých druhů miRNA (A). P-hodnoty nižší než  $p < 0.05$  jsou považovány za statisticky signifikantní a jsou vyznačeny tučným červeným písmem (B).

#### 5.4 Expresse miRNA a kliniko-patologické charakteristiky pacientů

Porovnání hladin miRNA s klinicko-patologickými charakteristikami pacientů pomocí Spearmanova koeficientu ukázalo pozitivní korelaci exprese miR-210 s věkem pacientů ( $\rho = 0.35$ ,  $p = 0.0094$ ; Tabulka číslo 11). Expresse analyzovaných miRNA nekorelovala s dalšími parametry, včetně stadia nádoru, stupně diferenciaci, přítomnosti uzlinových metastáz, perineurální propagace a lymfovaskulární invaze.

miRNA	Parametry pacientů						
	Věk	Stupeň diferenciacie	Hodnota pT	Metastáza do LU*	Perineur. šíření	Lymf. invaze	Resekční okraj
<b>miR-21</b>	0.21643 p=0.1159	0.13555 p=0.32841	0.08242 p=0.5534	-0.06524 p=0.6393	0.02653 p=0.84897	0.01311 p=0.9250	-0.03796 p=0.7852
<b>miR-96</b>	0.03486 p=0.8023	0.00322 p=0.98155	0.14026 p=0.3117	0.22004 p=0.1098	0.06899 p=0.62012	-0.05362 p=0.7001	0.05152 p=0.7113
<b>miR-148a</b>	-0.09795 p=0.4810	-0.14682 p=0.28941	-0.00647 p=0.9629	0.12408 p=0.3713	0.05483 p=0.69375	-0.08936 p=0.5205	0.15726 p=0.2561
<b>miR-155</b>	0.18552 p=0.1792	0.02586 p=0.85272	0.13994 p=0.3128	0.0243 p=0.8615	0.16095 p=0.24497	-0.00596 p=0.9659	-0.0949 p=0.4948
<b>miR-196a</b>	0.1392 p=0.3154	0.04928 p=0.72342	0.14689 p=0.2891	0.15736 p=0.2557	-0.08668 p=0.53313	0.01907 p=0.8911	0.19932 p=0.1484
<b>miR-210</b>	0.35047 <b>p=0.0093</b>	0.03133 p=0.82208	0.03515 p=0.8007	0.03198 p=0.8184	0.08666 p=0.53321	-0.01787 p=0.8979	0.02982 p=0.8304
<b>miR-217</b>	-0.24358 p=0.0759	-0.06054 p=0.66365	0.15461 p=0.2642	0.01408 p=0.9195	0.046 p=0.74117	-0.20857 p=0.1301	0.09764 p=0.4824

**Tabulka číslo 11:** Korelace klinicko-patologických vlastností pacientů s hladinou exprese miRNA. Hodnoty Spearmanovy korelace ( $\rho$ ) byly použity pro hodnocení vztahu klinicko-patologických parametrů tumoru a exprese miRNA. P-hodnoty nižší než  $p < 0.05$  jsou považovány za statisticky signifikantní a jsou vyznačeny tučným červeným písmem. \*LU – lymfatická uzlina.

### 5.5 Exprese miRNA a histologická struktura nádoru

Hodnocení vztahu exprese miRNA k mikroskopickému obrazu PDAC pomocí Spearmanovy korelace ukázalo statisticky signifikantní asociaci exprese vybraných miRNA s histologickou strukturou nádorů (Tabulka číslo 12). Zvýšená exprese miR-148a a miR-217 souvisela s tubulárním uspořádáním, které je charakteristické pro více diferencované nádory ( $\rho = 0.39$ ,  $p = 0.0030$ ;  $\rho = 0.28$ ,  $p = 0.0396$ ). Hodnoty miR-148a vykazovaly negativní korelaci se stupněm nukleární atypie ( $\rho = -0.30$ ,  $p = 0.0274$ ) a s disociativním uspořádáním ( $\rho = -0.28$ ,  $p = 0.0338$ ). Exprese miR-155 měla pozitivní korelaci s vysokou mitotickou aktivitou nádorových buněk ( $\rho = 0.27$ ,  $p = 0.0468$ ).

Parametry nádoru	miRNA						
	miR-21	miR-96	miR-148a	miR-155	miR-196a	miR-210	miR-217
Struktura Tubulární	-0.06396 p=0.6459	0.20166 p=0.1437	0.39621 <b>p=0.0030</b>	-0.18439 p=0.1820	0.07923 p=0.5690	-0.17178 p=0.2142	0.28100 p=0.0396
Kribriformní	-0.00316 p=0.9819	0.04965 p=0.7215	0.01063 p=0.9392	0.06643 p=0.6332	-0.07216 p=0.6041	0.16552 p=0.2317	-0.07146 p=0.6076
Solidně Trabekulární	0.02782 p=0.8417	-0.09591 p=0.4903	-0.21358 p=0.1210	0.15416 p=0.2657	-0.06176 p=0.6573	-0.01352 p=0.9227	-0.10583 p=0.4463
Disociativní	-0.04564 p=0.7431	-0.08164 p=0.5573	-0.28938 <b>p=0.0338</b>	0.03988 p=0.7747	-0.05832 p=0.6753	0.01061 p=0.9393	-0.11410 p=0.4113
Světlobuněčná	0.15876 p=0.2515	0.05180 p=0.7099	-0.00503 p=0.9712	0.17032 p=0.2182	0.09870 p=0.4777	0.19978 p=0.1475	-0.15013 p=0.2786
Nukleární atypie	0.09231 p=0.5068	-0.03809 p=0.7845	-0.30015 <b>p=0.0274</b>	0.11659 p=0.4011	-0.05003 p=0.7194	0.04269 p=0.7592	-0.01895 p=0.8918
Mitotická aktivita	0.18985 p=0.1691	-0.16938 p=0.2208	-0.10428 p=0.4530	0.27182 <b>p=0.0468</b>	-0.01885 p=0.8924	0.08383 p=0.5467	-0.24747 p=0.0712

**Tabulka číslo 12:** Korelace histologické struktury nádoru, nukleárních atypií a mitotické aktivity s hladinou exprese vybraných miRNA.

Hodnoty Spearmanovy korelace ( $p$ ) byly použity pro hodnocení vztahu morfologických parametrů tumoru a exprese miRNA. P-hodnoty nižší než  $p < 0.05$  jsou považovány za statisticky signifikantní a jsou vyznačeny tučným červeným písmem.

## 5.6 Vztah parametrů nádoru a exprese miRNA s přežitím pacientů

Údaje o intervalu mezi chirurgickou resekcí nádoru a progresí nemoci (PFS) byly dostupné u 42 pacientů, s mediánem třinácti měsíců. Celkové přežití (OS) nemocných bylo od 1 do 81 měsíců, s mediánem 19 měsíců. Sedm pacientů bylo bez relapsu po 20-81 měsíců, všichni tito nemocní přežívali až do konce sledování.

Hodnocení prognostického významu stadia nádoru bylo omezeno počtem pacientů. Nebyly patrné rozdíly v prognóze mezi středně a špatně diferencovanými karcinomy ( $p > 0.05$ ). Pozitivní resekcí okraj byl asociován s kratším PFS ( $p = 0.005$ ). Vaskulární invaze signifikantně korelovala s kratším OS pacientů ( $p = 0.036$ ). Nebyl prokázán vztah délky přežití k perineurálnímu šíření ani k metastatickému postižení lymfatických uzlin.

Mitotická aktivita nádorových buněk byla z morfologických parametrů nádoru nejvýznamnější při korelaci s OS a PFS ( $p = 0.0093$  a  $p = 0.0063$ ). Hranice 3 mitóz na

10 HPF 40x umožnila určit pacienty s dobrou a se špatnou prognózou. Mikroskopické uspořádání nádoru, včetně tubulárního, kribriformního, solidně trabekulárního a disociativního, nebylo asociováno s prognózou pacientů. Solidně trabekulární uspořádání bylo při univariantské analýze na hranici významnosti s OS ( $p = 0.058$ ).

Hodnocení vztahu exprese zkoumaných miRNA s prognózou nemocných s PDAC neodhalilo signifikantní korelaci. Nebyl prokázán statisticky významný vztah mezi PFS, OS a expresí zkoumaných miRNA ( $p > 0.05$ , Tabulka číslo 13 a číslo 14).

<i>miRNA</i>	Parameter Estimate	Standard Error	Chi-Square	P-hodnota	Hazard Ratio	95% HR Confidence Limits	
miR-21	0.00419	0.01060	0.1562	0.692; <b>p &gt; 0.05</b>	1.004	0.984	1.025
miR-96	0.02320	0.14363	0.0261	0.871; <b>p &gt; 0.05</b>	1.023	0.772	1.356
miR-148a	0.00340	0.02204	0.0238	0.877; <b>p &gt; 0.05</b>	1.003	0.961	1.048
miR-155	0.00299	0.00401	0.5562	0.455; <b>p &gt; 0.05</b>	1.003	0.995	1.011
miR-196a	-0.01748	0.04550	0.1475	0.700; <b>p &gt; 0.05</b>	0.983	0.899	1.074
miR-210	0.00427	0.00510	0.6998	0.402; <b>p &gt; 0.05</b>	1.004	0.994	1.014
miR-217	0.07048	0.08000	0.7761	0.378; <b>p &gt; 0.05</b>	1.073	0.917	1.255

**Tabulka číslo 13:** Vztah celkového přežití a exprese miRNA u pacientů s PDAC.

Coxův model proporcionálních rizik byl použitý pro analýzu prognostických funkcí miRNA. P-hodnoty vyšší než  $p > 0.05$  jsou považovány za statisticky insignifikantní a jsou vyznačeny tučným červeným písmem.

<i>miRNA</i>	Parameter Estimate	Standard Error	Chi-Square	P-hodnota	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
miR-21	0.00704	0.00993	0.5029	0.478; <b>p &gt; 0.05</b>	1.007	0.988	1.027
miR-96	0.01405	0.13169	0.0114	0.915; <b>p &gt; 0.05</b>	1.014	0.783	1.313
miR-148a	0.04633	0.02440	3.6051	0.057; <b>p &gt; 0.05</b>	1.047	0.999	1.099
miR-155	0.00357	0.00358	0.9915	0.319; <b>p &gt; 0.05</b>	1.004	0.997	1.011
miR-196a	-0.02901	0.04370	0.4407	0.506; <b>p &gt; 0.05</b>	0.971	0.892	1.058
miR-210	0.00565	0.00457	1.5276	0.216; <b>p &gt; 0.05</b>	1.006	0.997	1.015
miR-217	0.04751	0.07628	0.3879	0.533; <b>p &gt; 0.05</b>	1.049	0.903	1.218

**Tabulka číslo 14:** Vztah přežití bez progresu a hladiny exprese miRNA u pacientů s PDAC.

Coxův model proporcionálních rizik byl použitý pro analýzu prognostických funkcí miRNA. P-hodnoty vyšší než  $p > 0.05$  jsou považovány za statisticky insignifikantní a jsou vyznačeny tučným červeným písmem.

V souboru TCGA byla celková délka přežití pacientů 0-73 měsíců, s mediánem přežití 15 měsíců. Do konce doby sledování přežívalo 71 pacientů. Při univariantské analýze exprese žádná ze zkoumaných miRNA nevykazovala statisticky významný vztah s OS ( $p > 0.05$ , Tabulka číslo 15). Databáze neobsahovala údaje o PFS pacientů.

miRNA	B	Standard error	Wald	P-hodnota	Hazard ratio	95,0% CI for hazard ratio	
						Lower	Upper
miR-21-5p	0,175	0,34	0,267	<b>0,606</b>	1,192	0,613	2,318
miR-96-5p	-0.066	0,146	0,207	<b>0,649</b>	0,936	0,704	1,245
miR-148a-5p	-0.098	0,159	0,377	<b>0,539</b>	0,907	0,664	1,239
miR-155-5p	0,241	0,203	1,406	<b>0,236</b>	1,272	0,854	1,895
miR-196a-5p	0,138	0.076	3,302	<b>0.069</b>	1,148	0,989	1,331
miR-217	0.026	0.051	0,258	<b>0,611</b>	1,026	0,928	1,135

**Tabulka číslo 15:** vztah mezi expresí zkoumaných miRNA a délkou OS pacientů.

Univariální analýza Cox regrese byla provedena po logaritické transformaci údajů o expresi miRNA. P-hodnoty vyšší než  $p > 0.05$  jsou považovány za statisticky insignifikantní a jsou vyznačeny tučným červeným písmem.



## 6. DISKUZE

### 6.1 Výběr optimální endogenní kontroly pro normalizaci algoritmem Normfinder

Hodnocení exprese miRNA pomocí RT-qPCR se může stát důležitou součástí diagnostiky PDAC. Cílem normalizace metody je odstranit non-biologické variability v analytech, které vznikají při odběru, skladování, extrakci RNA, reverzní transkripci a kvantifikaci a dále i biologické variability podmíněné heterogenitou ve vzorcích (Peltier et al. 2008). Pro normalizaci jsou často používány endogenní krátké nekódující RNA molekuly, např. U6 snRNA (Schwarzenbach et al. 2015), 18S a 5S ribozomální RNA (Lee et al. 2007), RNU48, RNU43, RNU44 snoRNA (Gee et al. 2011) nebo jiná miRNA (Szafranska et al. 2007; Wang et al. 2009). Jedná se o produkty tzv. „referenčních genů“, jejichž exprese je konstitutivní a má být ve tkáních konstantní, nezávisle od probíhajících patologických změn. Pro identifikaci genových produktů nejvhodnějších pro normalizaci jsou k dispozici algoritmy geNorm ([genorm.cmgg.be](http://genorm.cmgg.be)), NormFinder ([moma.dk/normfinder-software](http://moma.dk/normfinder-software)) a BestKeeper ([gene-quantification.de](http://gene-quantification.de)). Jedním z cílů první studie bylo určení optimálního postupu pro normalizaci metody RT-qPCR hodnocením stability vybraných endogenních kontrol v PDAC a v nenádorové tkáni pankreatu pomocí algoritmu NormFinder.

Ve většině studií zaměřených na určení exprese miRNA v resekcích PDAC byla jako endogenní kontrola pro normalizaci použita snRNA U6 (Zhang et al. 2009; Greither et al. 2010; Ma et al. 2013; Hong et al. 2014). Jedná se o nekódující nukleární RNA, která je součástí „spliceosomu“, komplexu proteinů provádějících post-transkripční modifikaci nově syntetizované pre-mRNA odstraněním intronů (Didychuk et al. 2018). Nevýhodou U6 je nekonstantní exprese v maligních nádorech, zjištěná například u karcinomu močového měchýře a mléčné žlázy (Peltier et al. 2008; Hansen et al. 2007; Appaiah et al. 2011). Cholangiocelulární karcinom, nádor s podobnou morfologií jako PDAC, vykazoval výraznější expresi U6 v nádorových buňkách v porovnání s mezenchymálním stromatem nebo v benigním vývodovém epitelem (Lou et al. 2015). Normalizace v archivovaném FFPE materiálu prostřednictvím U6 může být problematická, množství U6 lineárně klesá se stářím vzorku (Pescoe et al. 2017). Hladina U6 je v tělesných tekutinách nekonstantní, což znemožňuje její použití pro normalizaci cirkulujících miRNA (Qi et al. 2012). Na základě našich výsledků vykazuje exprese U6 až osminásobné zvýšení v PDAC v porovnání s nenádorovou tkání

pankreatu. U6 byla druhou nejstabilnější kontrolou pro normalizaci dle NormFinder algoritmu.

Kromě U6 se mohou pro normalizaci metody RT-qPCR uplatnit další typy nekódujících RNA vláken. Small Cajal body-specific RNA 18 neboli U91, patřící do skupiny C/D box snoRNA, je lokalizována především v Cajalově tělísku. Její funkce není přesně známa, pravděpodobně se podílí na řízení U4 snRNA ve spliceosomu (Darzacq et al. 2002). Naše práce jako první studovala expresi U91 v nenádorové tkáni pankreatu a v PDAC. Dle algoritmu Normfinder byla U91 nejstabilnější endogenní kontrolou, lze jí tedy doporučit jako endogenní normalizační kontrolu pro stanovení exprese miRNA v resekátech PDAC metodou RT-qPCR. Nejstabilnějším párem pro normalizaci byla kombinace U6+U91.

Další rozšířenou normalizační metodou je použití endogenních miRNA. Tato normalizace se uplatňuje především při stanovení cirkulující miRNA, protože jiná krátká nekódující RNA vlákna jsou v extracelulárním prostředí nestabilní (Freedman et al. 2016). Pro normalizaci lze uplatnit jednu miRNA nebo zvolit panel. Nejvíce používanou miRNA pro normalizaci byla miR-16 (Schwarzenbach et al. 2015). Nejedná se zcela o ideální možnost, její exprese se může v nádorech měnit. V jedné studii byla hladina cirkulující miR-16 signifikantně zvýšena u pacientů s PDAC a tato miRNA byla navržena jako plasmatický diagnostický marker (Liu et al. 2012). Exprese miR-16 byla v naší práci v souboru PDAC značně variabilní. Podle algoritmu NormFinder byla miR-16 nejméně stabilní ze sledovaných endogenních kontrol. Zjištěná nestabilita exprese U6 a miR-16 v PDAC a v nenádorové tkáni pankreatu může mít vliv na výsledky získané metodou RT-qPCR při použití těchto molekul pro normalizaci.

Přidání exogenních nukleotidů do vzorku izolované RNA, např. cel-miR-39, cel-miR-54 nebo cel-miR-238, ve známých koncentracích (tzv. „spike-in“ kontroly) umožňuje normalizovat analytické stadium měření (Schwarzenbach et al. 2015). Tento postup však nelze pro variabilitu vzorků spojenou s odběrem, zpracováním a skladováním materiálu pro normalizaci pre-analytické fáze uplatnit (Schwarzenbach et al. 2015). Přidání „spike“ před izolací nukleových kyselin může způsobit nesrovnalosti; poměr koncentrace izolované miRNA a cizorodé miRNA může být v různých vzorcích variabilní. V naší studii byly amplifikační křivky a CT hodnoty pro „spike“ v nádorech a v nenádorových vzorcích z vyšetřených normalizačních kontrol značně blízké. Podle algoritmu NormFinder se jako nejméně stabilní kontrola ukázal překvapivě „spike“. Důvodem pro „nestabilitu“ této kontroly může být, že NormFinder dokáže určit variaci

pro celé skupiny zahrnující každý případ nádoru a normální tkáň. Určení rozdílů mezi normální tkání a nádorem u jednotlivých pacientů není pomocí tohoto algoritmu možné.

## 6.2 Normalizace RT-qPCR pro hodnocení změn exprese miRNA v PDAC

V pracích zaměřených na hodnocení profilu miRNA v PDAC použitím mikroarraye a RT-qPCR byla zjištěna významná intertumorální heterogenita exprese, a to v případě některých miRNA až s 10000 násobným rozdílem (Zhang et al. 2009). V jednotlivých dosud uveřejněných publikacích vykazovaly průměrné zjištěné hodnoty exprese miRNA značnou variabilitu. Zjištěné rozdíly mohou zčásti souviset i s použitím normalizační strategie. Další část první práce byla zaměřena na určení optimální kontroly pro normalizaci stanovení exprese vybraných miRNA v PDAC. Studovány byly miRNA, které jsou zapojeny do procesu kancerogeneze PDAC: miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155, miR-196a a miR-217. Jako kontroly byly pro normalizaci metody RT-qPCR zvoleny: “spike” (umělá miR-39 od *C. elegans*) a tři endogenní nekódující RNA - U6 snRNA, miR-16 a snoRNA U91. V druhé studii byla hodnocena exprese stejných miRNA v tkáňových vzorcích PDAC v souboru 54 pacientů pomocí RT-qPCR při použití “spike” pro normalizaci metody. Panel vyšetřených miRNA (miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155, miR-196a a miR-217) byl doplněn o miR-210.

MiR-21 se v PDAC uplatňuje jako onkogen, podporující proliferaci, metastazování a chemorezistenci nádorových buněk. Exprese miR-21 v PDAC byla hodnocena ve více studiích. Při použití U6 pro normalizaci byl medián exprese miR-21 v nádoru zvýšen 2.2krát (Bloomston et al. 2007). Podobně i Zhang et al. (2009) a Hong et al. (2014) popsali při použití stejné interní kontroly signifikantní zvýšení exprese miR-21 v PDAC, v některých nádorech byla její hladina zvýšena až 6888krát (Zhang et al. 2009). V jiné studii duRieu et al. (2010) pozorovali při použití kombinace U6 a 5S jako endogenní kontroly 20.1 násobné zvýšení miR-21. Ve vzorcích krevní plazmy pacientů s PDAC byla při použití miR-16 detegována 2.42krát zvýšená hladina miR-21 v porovnání se zdravými kontrolami (Wang et al. 2009). V souladu s literárními údaji byla i v naší studii v nádorech prokázána zvýšená exprese miR-21. Naměřené výsledky exprese miR-21 byly signifikantně ovlivněny použitou normalizační kontrolou. Nejnižší průměrná hodnota byla relativně k U6 (5.5 násobné zvýšení), nejvyšší průměrná hodnota miR-21 byla zjištěna při normalizaci k U91 (17.71 násobné zvýšení). Hladina miR-21 byla ve vzorcích PDAC zahrnutých do druhé studie též signifikantně zvýšená

(průměrně 12.01krát, nejvyšší elevace v nádoru byla 72 násobná).

Onkogenní miR-155 je klíčovou součástí regulace signalizační dráhy p53 a je zvýšeně exprimována v PDAC. Zhang et al. (2009) při normalizaci k U6 popsali až 52krát zvýšenou expresi v jednotlivých nádorech; Ma et al. (2013) změřili 2.11 násobné zvýšení v jejich souboru pacientů s toutéž endogenní kontrolou. V séru pacientů s PDAC bylo detegováno při normalizaci s miR-16 3.74 násobné zvýšení hladiny miR-155 (Wang et al. 2009). V naší studii byla též prokázána zvýšená exprese miR-155 v resekátech PDAC. Při normalizaci k U6 byla hladina miR-155 v nádoru 5.05 násobně zvýšena, nejvyšší exprese byla při normalizaci k “spike” (15.1 násobné zvýšení). V našem souboru pacientů s PDAC v druhé studii byla též prokázána zvýšená exprese miR-155 (průměrně 22.9krát, nejvyšší hodnota exprese byla 232 násobná).

MiR-196a hraje v PDAC roli onkogenu, modulací NFkB inhibitoru  $\alpha$  má přispívat k proliferaci a invazivitě nádorových buněk. Exprese miR-196a je v PDAC deregulována; Zhang et al. (2009) popsali v jednotlivých nádorech při normalizaci k U6 signifikantní intertumorální variabilitu její hladiny. Wang et al. (2009) demonstrovali při použití miR-16 jako endogenní kontrolu 16.0 násobné zvýšení ve vzorcích krevní plazmy pacientů s PDAC. V našich případech PDAC jsme zvýšení exprese miR-196a neprokázali. Při normalizaci k U6 bylo zjištěno průměrné 2.2 násobné snížení exprese miR-196a. Naopak při normalizaci relativně k miR-16, U91, nebo k “spike” jsme signifikantní rozdíly exprese mezi tkáněmi PDAC a nenádorovou tkání pankreatu nezaznamenali. V naší skupině 54 nemocných s PDAC v druhé studii byla prokázána vysoká intertumorální variabilita v hladinách miR-196a, exprese byla v jednotlivých případech 15krát snižena až 25.9krát zvýšená. Rozdíly v expresi miR-196a mezi vzorky PDAC a nenádorové kontroly ale nebyly statisticky významné ( $p > 0.05$ ).

Mir-210 hraje v PDAC roli onkogenu, uplatňující se při hypoxické odpovědi nádorových buněk. Exprese miR-210 byla v PDAC studována v menší míře, její elevace byla prokázána v resekátech pankreatu (Szafranska et al. 2007; Greither et al. 2010) a v pankreatické šťávě (Wang et al. 2014). V naší studii jsme prokázali signifikantní zvýšení exprese miR-210 (průměrně 15.68krát, nejvyšší hodnota 181krát) v PDAC.

MiR-96 má v PDAC funkci tumor-supresoru, podílí se na regulaci exprese *KRAS*. Literární údaje týkající se exprese miR-96 ve vzorcích PDAC jsou značně protichůdné. Analýza pomocí mikroarraye prokázala v nádorové tkáni 1.77 násobné zvýšení miR-96 v porovnání s chronickou pankreatitidou (Bloomston et al. 2007). Při použití RT-qPCR bylo naopak zjištěno 4.35 násobné snížení v nádoru při normalizaci

exprese k miR-24 (Szafranska et al. 2007). Hong et al. (2014) a Feng et al. (2014) popsali v PDAC až osminásobné snížení miR-96 při normalizaci k U6. V naší studii jsme pozorovali významný rozdíl ve výsledcích exprese miR-96 získaných při použití různých kontrol pro normalizaci metody. Při použití U6, miR-16 a kombinace U6+U91 byla v nádorové tkáni zjištěna snížená hladina miR-96 3.22krát, 2.32krát a 1.58krát. Při použití “spike” a U91 nebyla v nádorech v porovnání s normální tkání pankreatu prokázána statisticky signifikantní změna exprese miR-96. V druhé studii jsme prokázali významný pokles hladiny miR-96 ve vzorcích PDAC, v porovnání s nenádorovou tkání pankreatu (průměrně 1.42krát, nejnižší hodnota exprese 18 násobné snížení).

MiR-148a je v PDAC tumor-supresorem, inhibujícím proliferaci nádorových buněk a zamezujícím jejich epiteliálně-mezenchymálnímu přechodu. Exprese miR-148a je v PDAC snížena, příčinou je hypermetylace promotorové oblasti kódujícího genu (Hanoun et al. 2010). Bloomston et al. (2007) a Jamieson et al. (2012) popsali při použití mikroarraye průměrné, 5.5 násobné a 7.14 násobné snížení exprese. Szafranska et al. (2007) stanovili pomocí RT-qPCR, při normalizaci k miR-24, 6.15 násobné snížení miR-148a. Normalizace relativně k U6 prokázala 2.5 násobnou a 2.86 násobnou down-regulaci v PDAC (Zhang et al. 2009; Ma et al. 2013). V naší studii byla hladina miR-148a v PDAC při normalizaci k U6 a miR-162.04krát, resp. 1.33krát snížena. Exprese miR-148a hodnocená relativně k “spike”, k U91, nebo ke kombinaci U6+U91 nevykázala statisticky signifikantní rozdíly mezi nádorem a normální tkání pankreatu. Naše druhá studie neprokázala významné snížení v expresi miR-148a ve vyšetřených případech PDAC, v porovnání s nenádorovou tkání pankreatu ( $p > 0.05$ ). Hladina miR-148a ale byla snížena ve více případech PDAC, až 55 násobně relativně s kontrolou.

MiR-217 je další tumor-supresor modulující funkci signalizační dráhy KRAS/Akt. Snížená exprese miR-217 byla zjištěna ve více studiích PDAC. Szafranska et al. (2007) popsali až desetinásobné relativní snížení v nádorech, při normalizaci k miR-24. Hladina miR-217 byla v nádorech 2krát snížena při normalizaci k 18S (Greither et al. 2010) a 3.91krát snížena při normalizaci k U6 (Ma et al. 2013). Hong et al. (2014) popsali při použití U6 až 62.5 násobné snížení exprese miR-217 v PDAC. V jedné práci nebyla v nádorových buňkách PDAC izolovaných po mikrodisekci detegována exprese miR-217, jejím zdrojem v dalších publikacích byly pravděpodobně složky nádorového mikroprostředí (Munding et al. 2011). V souladu s literaturou byla exprese miR-217 v našem souboru PDAC signifikantně snížena při normalizaci s

každou studovanou kontrolou. Největší snížení (24.39krát) bylo relativně k U6 a nejmenší (7.19krát) bylo při použití kombinace U6+U91. V našich vzorcích PDAC v druhé studii byla hladina miR-217 signifikantně snížena. V patnácti vzorcích s nádorem nebyla exprese miR-217 detegována.

Kromě změn exprese jednotlivých miRNA jsme v druhé studii zjistili ve vzorcích PDAC i významnou pozitivní korelaci exprese tři oncomiRNA - miR-21, miR-155 a miR-210. Tento náález svědčí pro jejich možnou kooperaci ve vzniku a v progresi PDAC (Moriyama et al. 2009; Gironella et al. 2007; Ho et al. 2010). Pozitivní korelace byla patrná také mezi tumor-supresorovými miR-148a a miR-217, kde u obou bylo v nádorech zjištěno snížení hladin. Tyto miRNA jsou zapojeny do regulace buněčné proliferace (Feng et al. 2016; Zhao et al. 2010), jejich souběžná deaktivace může hrát důležitou roli v procesu kancerogeneze. Negativní korelace byla prokázána mezi sníženou expresí miR-96 a zvýšením miR-196a v nádorech. MiR-96 je inhibitorem *KRAS*, snižujícím proliferaci nádorových buněk (Yu et al. 2010; Feng et al. 2014); miR-196a naopak podporuje proliferaci a migraci nádorových buněk a omezuje apoptózu (Liu et al. 2013; Huang et al. 2013). Down-regulace miR-96 spolu s up-regulací miR-196a může být významným krokem v postupující kancerogenezi.

### **6.3 Vztah histologické stavby PDAC k expresi sledovaných miRNA**

Naše druhá studie byla zaměřena i na určení vztahu exprese vybraných miRNA k histologickým charakteristikám PDAC; tomuto tématu byla podle literárních údajů dosud věnována jen malá pozornost. Prokázali jsme významnou korelaci zvýšené hladiny miR-148a a miR-217 s tubulárním uspořádáním nádoru. Hodnoty miR-148a navíc vykazovaly negativní korelaci s disociativním růstem. Zjištěná asociace zvýšené hladiny miR-155 s vyšší mitotickou aktivitou buněk PDAC může souviset s předpokládanou rolí této miRNA v modulaci buněčného cyklu, v *in vitro* podmínkách byla zvýšená hladina miR-155 spojena s vyšší proliferací buněk a s inhibicí apoptózy (Gironella et al. 2007). V jedné studii bylo zjištěno zvýšení hladiny miR-21 u nízké diferencovaných případů PDAC (Giovanetti et al. 2010), porovnání exprese miR-21 s histologickou stavbou nádorů však nebylo v této práci provedeno. V naší práci vztah exprese studovaných miRNA ke stupni diferenciace nádorů nebyl prokázán.

## 6.4 Vztah exprese sledovaných miRNA k progresi nádoru a délce přežití nemocných s PDAC

K nejdůležitějším prognostickým ukazatelům PDAC patří rozsah lokální progresie nádoru v době diagnózy a přítomnost uzlinových, popřípadě vzdálených metastáz. Kurabilní resekce nádoru v době diagnózy je možná pouze u 10-15 % nemocných (Vincent et al. 2011). Ve stagingu pacientů s PDAC se uplatňuje především počítačová tomografie. Hlavním kritériem resektability nádoru jsou nepřítomnost prorůstání do velkých cév splanchniku nebo metastáz do lymfatických uzlin. Vztah exprese miRNA v chirurgických resekátech nebo v tělesných tekutinách od nemocných s PDAC k progresi nádoru byl dosud málo studován. Bylo zjištěno, že s lokální nádorovou progresí a s přítomností uzlinových metastáz je spojena elevace miR-21, miR-130b, miR-139b, miR-141, miR-146a, miR-155, miR-196a, miR-216a, miR-628 a miR-720 (Jamieson et al. 2012; Zhou et al. 2016; Lemberger et al. 2019) a snížení miR-148a (Peng et al. 2017). Určení významu hladiny miRNA v progresi PDAC ale není v literatuře jednoznačné, například Schultz et al. (2012) v souboru 170 případů PDAC vztah změn exprese miRNA k pokročilosti nádorů neprokázali. Ani naše hodnocení neodhalilo statisticky signifikantní vztah exprese vybraných miRNA k velikosti nádorů, k přítomnosti perineurální propagace, vaskulární invaze nebo metastáz do lymfatických uzlin.

Navzdory významným pokrokům v protinádorové terapii nedošlo ke zlepšení přežití pacientů s PDAC. V písemnictví se stále zvyšuje počet prací zaměřených na možnosti použití nových biomarkerů, včetně miRNA, pro predikci délky přežití pacientů s adenokarcinomem pankreatu. Dosud byl identifikován větší počet miRNA, u kterých byl zjištěn vztah jejich hladiny k prognóze pacientů (Wald et al. 2017). Většina prací hodnotících vliv změn exprese miRNA na délku přežití byla provedena retrospektivně, s malým počtem pacientů. Součástí naší práce bylo zjistit, zda existuje vztah exprese vybraných miRNA k délce přežití nemocných s PDAC.

Nejvíce prozkoumaným prognostickým markerem u maligních nádorů ze skupiny miRNA je onkogenní miR-21. Byla prokázána korelace zvýšené hladiny této miRNA s kratším přežitím nemocných s maligním melanomem, gliomem, karcinomem mléčné žlázy, tlustého střeva, plic, žaludku, jater a ledvin (Zhu et al. 2014). Prognostický význam exprese miR-21 v resekátech PDAC byl předmětem více studií (Dillhoff et al. 2008; Giovannetti et al. 2010; Hwang et al. 2010; Jamieson et al. 2012;

Nagao et al. 2012; Kadera et al. 2013; Papaconstantinou et al. 2013, Dhayat et al. 2015) a meta-analýz (Zhu et al. 2014; Frampton et al. 2015; Negoj et al. 2017); v souboru 2000 nemocných s PDAC byl zjištěn signifikantní vztah zvýšené exprese miR-21 ke zkrácení OS a PFS. V literatuře však není úplná shoda ohledně prognostického významu miR-21. Schultz et al. (2012), Ali et al. (2015) a Calatayud et al. (2017) neprokázali statisticky významnou vazbu exprese miR-21 na délku přežití v souboru 225, 37 a 165 pacientů. Hladina miR-21 korelovala s kratším PFS u pacientů s inoperabilním nádorem léčeným chemoterapií gemcitabinem a kapecitabinem, přičemž nebyla prokazatelná asociace hladin miR-21 s délkou OS (Khan et al. 2016). V různých studiích jsou i rozdílná pozorování týkající se typu buněk, ve kterých má exprese miR-21 prognostický význam. Kadera et al. (2013) lokalizovali zvýšenou expresi miR-21 v nádorem asociovaných fibroblastech, tento nálezkoreloval s přítomností metastáz v lymfatických uzlinách a se zkrácením OS, přitom úroveň exprese miR-21 v nádorových buňkách byla v této studii prognosticky nevýznamná. Naopak signifikantně zvýšená exprese miR-21, detegovaná v nádorových buňkách izolovaných mikrodisekcí, korelovala v jiné práci s významným zkrácením OS (Giovanetti et al. 2010). Prognostický význam hladin miR-21 v periferní krvi byl zkoumán v menším rozsahu. Analýza krevní plazmy při použití mikroarraye identifikovala deregulaci celkem 91 miRNA, přičemž elevace hladin miR-21 korelovala s kratším OS (Ali et al. 2010). Vztah zvýšené hladiny cirkulující miR-21 se zkrácením přežití pacientů s PDAC byl potvrzen v dalších studiích, v souborech obsahujících 17, 25, 77 a 177 pacientů (Khan et al. 2016; Karasek et al. 2018; Liu et al. 2012; Wang et al. 2013).

Zvýšená exprese miR-155 je prognosticky významná u několika maligních nádorů, například karcinomu plic, mléčné žlázy a karcinomu hepatocelulárního (Xu et al. 2013; Mattiske et al. 2012; Ning et al. 2019). V jedné studii představovala onkogenní miR-155, spolu s miR-21 nezávislý prediktivní faktor pro délku OS pacientů s PDAC (Papaconstantinou et al. 2013). Souvislost zvýšené exprese této miRNA s kratší délkou přežití u PDAC byla potvrzena i v další studii (Greither et al. 2010). Ma et al. (2013) a Calatayud et al. (2017) popsali zvýšenou expresi miR-155 v PDAC, ovšem bez statisticky významného ovlivnění OS pacientů.

Zvýšená exprese onkogenní miR-196a má prognostický význam u více malignit, např. u karcinomu žaludku, tlustého střeva a mléčné žlázy (Yang et al. 2017; Lu et al. 2016; Milevskij et al. 2019). MiR-196a představuje u PDAC jednou z prvních miRNA, kde byl zjištěn vztah k délce přežití pacientů. Zvýšená exprese miR-196a spolu s elevací



miR-219 v resekovaných PDAC byla spojena se zkrácením OS pacientů (Bloomston et al. 2007). Zvýšená hladina miR-196a v krevní plazmě pacientů korelovala s kratší délkou přežití (Kong et al. 2010; Yu et al. 2017).

Onkogenní miR-210 je v maligních nádorech široce prozkoumaná, její zvýšená exprese korelovala s horší prognózou nemocných s karcinomem ledvin, tlustého střeva a plic (Samaan et al. 2014; Qu et al. 2014; Osugi et al. 2015). Zvýšená exprese miR-210 v resekátech PDAC byla asociována s kratší délkou přežití operovaných nemocných (Greither et al. 2010). Naproti tomu studie zaměřená na vztah hladiny miR-210 ve vzorcích plazmy k přežití pacientů s PDAC ukázala, že její snížená hladina souvisí s horší prognózou nemocných (Yu et al. 2017).

MiR-96 se u PDAC uplatňuje jako tumor-supresor. Byla prokázána souvislost její snížené exprese se zkrácením OS (Li et al. 2014). V jiných maligních nádorech může miR-96 působit jako onkogen, přičemž její zvýšená hladina ve tkáních a v plazmě byla u hepatocelulárního a kolorektálního karcinomu asociována s horší prognózou (Ning et al. 2019; Gao et al. 2018).

Snížení exprese miR-148a má prognostický význam u více nádorů, včetně karcinomu močového měchýře, tlustého střeva a karcinomu ovariálního (Ma et al. 2016; Takahashi et al. 2012; Gong et al. 2016). Vztah snížené hladiny miR-148a k délce přežití pacientů s PDAC byl dosud málo studován; korelace její -3p formy (miR-148\*) s přežitím byla dosud identifikována jen v jedné práci. Vyšetřením resekátů PDAC od celkem 225 pacientů byl pro predikci délky OS navržen panel miR-212, miR-675, miR-148a\*, miR-187 a let-7g\*; přičemž snížení miR-148a\* bylo nezávislým prognostickým ukazatelem pro kratší délku přežití (Schultz et al. 2012).

Snížená exprese miR-217 se ukázala jako prediktor kratšího OS u více maligních nádorů, včetně karcinomu jater, plic, žaludku a ledviny (Tian et al. 2017; Satipathi et al. 2017; Chen et al. 2015; Li et al. 2013). U PDAC však nebyl neprokázán vztah exprese miR-217 k délce OS a PFS nemocných (Ma et al. 2013; Vychytilova-Faltejskova et al. 2015).

Katalogizace „raw data“ získaných sekvenací genomu velkého počtu nádorů, včetně PDAC, umožnila vznik databáze The Cancer Genome Atlas (TCGA) (Tomczak et al. 2015). Více studií se zabývalo analýzou dat z miRNA sekvenace pankreatických nádorů obsažených v databázi TCGA, s cílem identifikovat miRNA predikujících délku OS pacientů (Zhou et al. 2016; Liang et al. 2018; Shi et al. 2018; You et al. 2019). Složení panelů se značně lišilo mezi jednotlivými publikacemi. MiR-21 byla uvedena

jako prognosticky významná pouze v jedné z publikací (Zhou et al. 2016). Expres miR-196a byla v další studii signifikantní pro predikci délky OS v univariantsní analýze regrese, tato miRNA nebyla významná pro predikci délky OS v multivariantsní analýze při kombinaci s dalšími miRNA (Shi et al. 2018). Zjištěné rozdíly v prognosticky významných miRNA mohou souviset s odlišnou strukturou studií a rozdílnou analýzou dat. V našem vyšetření skupiny 160 resekovaných PDAC z databáze TCGA nesouvisela expres žádné ze studovaných miRNA se zkrácenou délkou OS pacientů. Vypovídající hodnota kohorty TCGA pro predikci prognózy pacientů s PDAC je limitována krátkou dobou sledování po resekci a inkluzí jiných nádorů než konvenční PDAC (Nicolle et al. 2019).

V naší práci jsme vztah změn exprese námi sledovaných miRNA (miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155, miR-196, miR-210 a miR-217) k délce OS a PFS pacientů s PDAC neprokázali.

## 7 ZÁVĚR

Možnosti praktického využití detekce miRNA v nádorové tkáni a v tělesných tekutinách pro časnou diagnózu PDAC a pro stanovení prognózy nemocných jsou v současné době intenzivně diskutovány. MiRNA, krátké nekódující RNA molekuly uplatňující se v post-transkripční regulaci genové exprese, hrají významnou roli v kancerogenezi a progresi nádorů.

Předložená disertační práce byla zaměřena na určení optimální endogenní kontroly pro normalizaci exprese ve tkáních PDAC a na uplatnění prognostického významu vybraných miRNA u nemocných s PDAC. K hlavním výsledkům práce patří:

- 1) Byla prokázána odlišná hladina U6, U91 miR-16 a cel-miR-39 ve vzorcích resekátů PDAC a v nenádorové tkáni pankreatu. Endogenní vnitřní kontroly U6, U91 a miR-16 vykazovaly významnou intertumorální variabilitu. Jako nejstabilnější endogenní kontrola pro normalizaci při stanovení exprese miRNA ve tkáni PDAC pomocí RT-qPCR se podle algoritmu NormFinder ukázala U91.
- 2) Naměřené hodnoty exprese miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155, miR-196a a miR-217 v nádorové tkáni se signifikantně liší v závislosti na zvolené kontrole. Tato okolnost může značně limitovat porovnatelnost výsledků mezi studii používajícími odlišné strategie normalizace pro kvantifikaci exprese miRNA v PDAC.
- 3) V souboru 54 nemocných s PDAC byly prokázány rozdíly v expresi miR-21, miR-96, miR-155, miR-210 a miR-217 ve vzorcích z resekátů nádoru, v porovnání s nenádorovou tkáni pankreatu.
- 4) Byl prokázán vztah zvýšené exprese miR-148a a miR-217 k tubulárnímu uspořádání nádoru. Snížená exprese miR-148a souvisela s disociativním růstem v PDAC. Elevovaná exprese miR-155 korelovala se zvýšenou mitotickou aktivitou nádorových buněk.
- 5) Nebyla prokázána souvislost změněné exprese vybraných miRNA s pokročilostí nádoru, stupněm diferenciací, přítomností uzlinových metastáz, perineurální propagace a lymfovaskulární invaze. Exprese vybraných miRNA nesouvisela s celkovou délkou přežití pacientů s PDAC, ani s délkou přežití do progresu nádoru.

## 8 ABSTRAKT

Duktální adenokarcinom (PDAC) je nejčastějším primárním nádorem pankreatu. Jeho nepříznivá prognóza je dána mimo jiné i tím, že je často diagnostikován až v inoperabilním pozdním stadiu a navíc vykazuje vysokou chemorezistenci. Pro možnost časnější diagnózy PDAC a tím zlepšení prognózy nemocných jsou hledány nové biomarkery, mezi které patří mimo jiné i microRNA (miRNA), krátké nekódující RNA molekuly, zapojené do post-transkripční regulace genové exprese.

Na rozdíl od jiných RNA jsou molekuly miRNA v biologických vzorcích stabilní. Jejich expresi je možné stanovit prostřednictvím více analytických metod, například kvantitativní real-time PCR (RT-qPCR). Pro normalizaci metod používaných pro zjištění hladiny miRNA je nutné použít vhodné endogenní kontroly. Variabilní exprese endogenních kontrol však může znamenat určitou nejistotu při kvantifikaci exprese miRNA. Cílem první práce byly analýza exprese šesti miRNA, izolovaných z parafinových bloků (FFPE) biopticky vyšetřených PDAC a určení optimální vnitřní kontroly. Při normalizaci výsledků RT-qPCR byly hodnoceny čtyři interní kontroly: arteficiální spike miR-39 od *C. elegans*, U6 snRNA, miR-16 a snoRNA U91. Hodnoty exprese všech sledovaných miRNA byly v nádorech signifikantně odlišné v závislosti na zvolené vnitřní kontrole. Mimo to vykazovala stabilita použitých vnitřních kontrol u jednotlivých nádorů signifikantní rozdíly. Jako nejstabilnější endogenní kontrola, kterou lze doporučit pro endogenní normalizaci exprese miRNA v tkáních PDAC pro normalizaci, se pomocí algoritmu NormFinder ukázala U91.

Možnost použití miRNA jako diagnostického nebo prognostického markeru maligních nádorů byla předmětem více publikací. Cílem druhé práce bylo stanovení exprese sedmi vybraných miRNA, izolovaných z formalinem fixovaných parafinových bloků (FFPE) od 54 pacientů s PDAC. Následně byl hodnocen vztah exprese těchto miRNA k histologickému uspořádání a pokročilosti nádoru, celkové délce přežití nemocných (OS) a délce přežití do progresu nemoci (PFS). Ve vyšetřených nádorech byla zjištěna zvýšená exprese miR-21, miR-155 a miR-210, v porovnání s nenádorovou tkání pankreatu. Naopak hladiny miR-96 a miR-217 byly u PDAC signifikantně sniženy. Patrná byla pozitivní korelace hladin miR-210 s věkem pacientů ( $\rho=0.35$ ). Exprese všech sledovaných miRNA nevykazovala korelaci se sledovanými parametry nádoru – stupněm diferenciací, rozsahu lokální progresu, ani s metastatickým postižením lymfatických uzlin, perineurální invazí, vaskulární invazí a délkou přežití

pacientů. Zvýšené hladiny miR-148a a miR-217 vykazovaly signifikantní korelaci s tubulárním uspořádáním nádoru; snížená exprese miR-148a souvisela s disociativním uspořádáním nádoru. Zvýšená exprese miR-155 měla vztah k vyšší mitotické aktivitě nádorových buněk.

V předložené práci je demonstrován význam správné volby vnitřní kontroly pro normalizaci výsledků RT-qPCR při stanovení exprese miRNA. Byla potvrzena odlišná exprese miRNA v PDAC v porovnání s nenádorovou tkání pankreatu. Byla prokázána signifikantní asociace histologického uspořádání nádoru a mitotické aktivity s expresí některých miRNA. Korelace mezi úrovní exprese sledovaných miRNA, progresí nádoru a délkou přežití nemocných nebyla prokázána.

## ABSTRACT

Ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common primary pancreatic neoplasm. It's frequently diagnosed in late inoperable stage and has high resistance to chemotherapy; this situation contributes to its unfavourable prognosis. Therefore, there is a need for biomarkers enabling early detection of PDACs and by this way to improve patient prognosis. MicroRNAs (miRNA), short non-coding RNA molecules involved in post-transcriptional regulation of gene expression, belong to such markers.

Contrary to other RNA molecules, miRNAs are stable in biological samples. Their expression is measured by several analytical methods, including real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Normalization of methods determining miRNA levels requires adequate endogenous controls. However, variable expression of endogenous controls in tumors may cause bias in determining miRNA levels. The aim of the first study was to investigate the expression of six miRNAs isolated from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) samples of PDACs. Four controls were chosen for RT-qPCR result normalization: artificial spike miR-39 from *C. elegans*, U6 snRNA, miR-16 and snoRNA U91. Expression values of all studied miRNAs in tumors were significantly different depending on selected endogenous controls. Additionally, stability of the controls varied significantly in individual tumors, U91 was determined to be the most stable according to the NormFinder algorithm. Thus, U91 can be recommended as endogenous control for miRNA expression in PDAC tissues.

The possibility to utilize miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers in malignancies has been the subject of multiple publications. The aim of the second study was to investigate the expression of seven selected miRNAs isolated from FFPE samples of 54 PDAC patients. The relationship of miRNA expression levels with tumor histology, clinico-pathological characteristics, patient overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) was subsequently evaluated. Overexpression of miR-21, miR-155 and miR-210 was observed in PDACs, in comparison with non-neoplastic pancreatic tissue. On the contrary, miR-96 and miR-217 were significantly downregulated in PDACs. Positive correlation of miR-210 levels was observed with patient age ( $\rho=0.35$ ). Expression levels of all selected miRNAs failed to demonstrate significant correlation with tumor parameters – grade, degree of local progression, lymph node involvement, perineural invasion, vascular invasion and length of patient survival. Additionally, elevated levels of miR-148a and miR-217 have shown positive

correlation with tubular arrangement of tumors; decreased miR-148a expression was associated with dissociative tumor growth. Elevated miR-155 levels were linked to high mitotic activity in cancer cells.

This work demonstrated significance of the choice of endogenous controls for normalization of RT-qPCR results during miRNA expression analysis. The results have confirmed abnormal miRNAs expression in PDACs in comparison with adjacent non-neoplastic tissue. Significant association was detected between histological structure, mitotic activity and miRNA expression in tumors. Finally, no correlation of miRNA levels with tumor progression and length of patient survival could be demonstrated.

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abdelfattah AM, Park C, Choi MY. 2014. Update on non-canonical microRNAs. *Biomol Concept* 5 (4): 275–87.
- Abue M, Yokoyama M, Shibuya R, Tamai K, Yamaguchi K, Sato I, Tanaka N, Hamada S, Shimosegawa T, Sugamura K and Satoh K. 2015. Circulating miR-483-3p and miR-21 is highly expressed in plasma of pancreatic cancer. *International Journal of Oncology* 46 (2), 539–47.
- Acher AW, Bleicher J, Cannon A, Scaife C. 2008. Advances in surgery for pancreatic cancer. *J Gastrointest Oncol* 9 (6): 1037–43.
- Ali S, Almhanna K, Chen W, Philip PA, Sarkar FH. 2010. Differentially expressed miRNAs in the plasma may provide a molecular signature for aggressive pancreatic cancer. *American Journal of Translational Research* 3 (1), 28–47.
- Ali S, Dubaybo H, Brand RE, Sarkar FH. 2015. Differential Expression of MicroRNAs in Tissues and Plasma Co-exists as a Biomarker for Pancreatic Cancer. *J Cancer Sci Ther* 7 (11): 336–46.
- Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, Brownstein MJ, Tuschl T, Margalit H. 2005. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Research* 33 (8), 2697–706.
- Anaya J. 2016. OncoLnc: linking TCGA survival data to mRNAs, miRNAs, and lncRNAs. *PeerJ Comput. Sci* 2: e67.
- Andrea A, Sarkar F., Adsay V. 2003. Clinicopathological Correlates of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: A Comparative Analysis of 82 Cases With and 152 Cases Without Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mod Pathol* 16, 996–1006.
- Andrén-Sandberg Å, Ansorge C, Yadav T. 2016. Are There Indications for Total Pancreatectomy in 2016? *Dig Surg* 33: 329-34.
- Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. 2014. *Front Immunol* 5: 442.
- Aoi W, Sakuma K. 2014. Does regulation of skeletal muscle function involve circulating microRNAs? *Front Physiol* 5: 39.
- Appaiah HN, Goswami CP, Mina LA, Badve S, Sledge GW Jr, Liu Y, Nakshatri H. 2011. Persistent upregulation of U6:SNORD44 small RNA ratio in the serum of breast cancer patients. *Breast Cancer Research* 13 (5), R86.
- Ardekani AM, Naeini MM. 2010. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna J Med Biotechnol* 2 (4): 161–79.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogossova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (12), 5003–8.



- Babapoor S, Horwich M, Wu R, Levinson S, Gandhi M, Makkar H, Kristjansson A, Chang M, Dadras SS. 2016. microRNA in situ hybridization for miR-211 detection as an ancillary test in melanoma diagnosis. *Mod Pathol* 29, 461–75.
- Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R. 2008. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev* 22 (20): 2773–85.
- Bail S, Swerdel M, Liu H, Jiao X, Goff LA, Hart RP, Kiledjian M. 2010. Differential regulation of microRNA stability. *RNA* 16 (5), 1032–39.
- Baker M. 2010. MicroRNA profiling: separating signal from noise. *Nat Methods* 7 (9): 687-92.
- Bauer AS, Keller A, Costello E, Greenhalf W, Bier M, Borries A, Beier M, Neoptolemos J, Büchler M, Werner J, Giese N, Hoheisel JD. (2012). Diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis by measurement of microRNA abundance in blood and tissue. *PLoS one* 7 (4), e34151.
- Bhayani MK, Calin GA, Lai SY. 2012. Functional relevance of miRNA\* sequences in human disease. *Mutat Res* 731 (1-2): 14-9.
- Bilici A. Prognostic factors related with survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. 2014. *World J Gastroenterol* 20 (31): 10802–812.
- Bimonte S, Barbieri A, Leongito M, Palma G, Del Vecchio V, Falco M, Palaia R, Albino V, Piccirillo M, Amore A, Petrilla A, Granata V, Izzo F. 2016. The Role of miRNAs in the Regulation of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Stem cells international* 8352684.
- Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. 2007. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 297: 1901– 8.
- Boisen MK, Dehlendorff C, Linnemann D, Schultz NA, Jensen BV, Høgdall EV and Johansen JS. 2015. MicroRNA Expression in Formalin-fixed Paraffin-embedded Cancer Tissue: Identifying Reference MicroRNAs and Variability. *BMC Cancer* 15, 1024.
- Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. 2010. WHO Classification of Tumours of the Digestive System vol. 3., 4th ed. Lyon: *International Agency for Research on Cancer*. ISBN-13: 978-92-832-2432-7
- Brand RE, Adai AT, Centeno BA, Lee LS, Rateb G, Vignesh S, Menard C, Wiechowska-Kozłowska A, Boldys H, Hartleb M, Sanders MK, Munding JB, Tannapfel A, Hahn SA, Stefańczyk L, Tsongalis GJ, Whitcomb DC, Conwell DL, Morisset JA, Gardner TB, Gordon SR, Suriawinata AA, Lloyd MB, Wylie D, Labourier E, Andruss BF, Szafranska-Schwarzbach AE. 2014. A microRNA-based test improves endoscopic ultrasound-guided cytologic diagnosis of pancreatic cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12: 1717–23.
- Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. 2017. TMN 8. vydání. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Praha. ISBN: 978-80-7472-173-1
- Brown R, Epis MR, Horsham JL, Kabir TD, Richardson KL, Leedman PJ. 2018. Total RNA extraction from tissues for microRNA and target gene expression analysis: not all kits are created equal. *BMC Biotechnology* 18 (1), 16.

- Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. 2009. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* 7 (4), 147-154.
- Calatayud D, Dehlendorff C, Boisen MK, Hasselby JP, Schultz NA, Werner J, Immervoll H, Molven A, Hansen CP, Johansen JS. 2017. Tissue MicroRNA profiles as diagnostic and prognostic biomarkers in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma and periampullary cancers. *Biomark Res* 21 (5): 8.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24), 15524–29.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (9), 2999–3004.
- Campomenosi P, Gini E, Noonan DM, Poli A, D'Antona P, Rotolo N, Dominiononi L, Imperatori A. 2016. A comparison between quantitative PCR and droplet digital PCR technologies for circulating microRNA quantification in human lung cancer. *BMC Biotechnology* 16 (1), 60.
- Cascinu S, Falconi M, Valentini V, Jelic S. 2010. Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21 Suppl 5: v55-8.
- Cao H, Huang S, Liu A, Chen Z. 2018. Up-regulated expression of miR-155 in human colonic cancer. *J Cancer Res Ther* 14 (3): 604-7.
- Caponi S, Funel N, Frampton AE, Mosca F, Santarpia L, Van der Velde AG, Jiao LR, De Lio N, Falcone A, Kazemier G, Meijer GA, Verheul HM, Vasile E, Peters GJ, Boggi U, Giovannetti E. 2011. The good, the bad and the ugly: a tale of miR-101, miR-21 and miR-155 in pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms. *Ann Oncol* 24 (3): 734–41.
- Carlsson J, Davidsson S, Fridfeldt J, Giunchi F, Fiano V, Grasso C, Zelic R, Richiardi L, Andrén O, Pettersson A, Fiorentino M, Akre O. 2018. Quantity and quality of nucleic acids extracted from archival formalin fixed paraffin embedded prostate biopsies. *BMC Medical Research Methodology* 18 (1), 161.
- Cloonan N, Wani S, Xu Q, Gu J, Lea K, Heater S, Barbacioru C, Steptoe A. L, Martin HC, Nourbakhsh E, Krishnan K, Gardiner B, Wang X, Nones K, Steen JA, Matigian NA, Wood DL, Kassahn KS, Waddell N, Shepherd J, Grimmond SM. 2011. MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. *Genome Biology* 12 (12), R126.
- Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, Szczeniak MW, Gaffney DJ, Elo LL, Zhang X, Mortazavi A. 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology* 17, 13.
- Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, Becker A, Hoshino A, Mark MT, Molina H, Xiang J, Zhang T, Theilen T M, García-Santos G, Williams C, Ararso Y, Huang Y, Rodrigues G, Shen TL, Lyden D. 2015. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology* 17 (6), 816–826.
- Dang K, Myers KA. 2015. The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression. *Int J Mol Sci* 16 (3): 6353–72.

- Darzacq X, Jády BE, Verheggen C, Kiss AM, Bertrand E, Kiss T. 2002. Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *EMBO J* 21 (11): 2746–56.
- de Jong K, Nio CY, Hermans JJ, Dijkgraaf MG, Gouma DJ, van Eijck CH, van Heel E, Klass G, Fockens P, Bruno MJ. 2010. High prevalence of pancreatic cysts detected by screening magnetic resonance imaging examinations. *Clin Gastroenterol Hepatol* 8: 806–11.
- de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, Arner E, Arner P, Ashoor H, Åström G, Babina M, Bertin N, Burroughs AM, Carlisle AJ, Daub CO, Detmar M, Deviatiiarov R, Fort A, Gebhard C, Goldowitz D, Guhl S, Ha TJ, de Hoon M. 2017. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology* 35 (9), 872–878.
- de Ronde MWJ, Ruijter JM, Moerland PD, Creemers EE, Pinto-Sietsma SJ. 2018. Study Design and qPCR Data Analysis Guidelines for Reliable Circulating miRNA Biomarker Experiments: A Review. *Clin Chem* 64 (9): 1308-18.
- Delpu Y, Lulka H, Sicard F, Saint-Laurent, N, Lopez F, Hanoun N, Buscail L, Cordelier P, Torrisani J. 2013. The rescue of miR-148a expression in pancreatic cancer: an inappropriate therapeutic tool. *PloS one* 8(1), e55513.
- Dhayat SA, Abdeen B, Köhler G, Senninger N, Haier J, Mardin WA. 2015. MicroRNA-100 and microRNA-21 as markers of survival and chemotherapy response in pancreatic ductal adenocarcinoma UICC stage II. *Clin Epigenetics* 7:132. Published 2015 Dec 23.
- Didychuk AL, Butcher SE, Brow DA. 2018. The life of U6 small nuclear RNA, from cradle to grave. *RNA* 24 (4): 437–60.
- Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C, Bloomston M. 2008. MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *J Gastrointest Surg* 12 (12): 2171–6.
- du Rieu MC, Torrisani J, Selves J, Al Saati T, Souque A, Dufresne M, Tsongalis GJ, Suriawinata AA, Carrère N, Buscail L, Cordelier P. 2011. MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin Chem* 56 (4): 603–12.
- Fang Z, Cui X. 2011. Design and validation issues in RNA-seq experiments, *Briefings in Bioinformatics* 12 (3) 280–7.
- Farrell JJ, Toste P, Wu N, Li L, Wong J, Malkhassian D, Tran LM, Wu X, Li X, Dawson D, Wu H, Donahue TR. 2013. Endoscopically Acquired Pancreatic Cyst Fluid MicroRNA 21 and 221 Are Associated With Invasive Cancer. *The Am J Gastroenterol* 108: 1352–9.
- Farrell JJ. 2015. Prevalence, Diagnosis and Management of Pancreatic Cystic Neoplasms: Current Status and Future Directions. *Gut and Liver* 9 (5), 571–89.
- Fassan M, Volinia S, Palatini J, Pizzi M, Baffa R, De Bernard M, Battaglia G, Parente P, Croce CM, Zaninotto G, Ancona E, Rugge M. 2011. MicroRNA expression profiling in human Barrett's carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 129: 1661-70.
- Feng H, Wang Y, Su J, Liang H, Zhang CY, Chen X, Yao W. 2016. MicroRNA-148a Suppresses the Proliferation and Migration of Pancreatic Cancer Cells by Down-regulating ErbB3. *Pancreas* 45: 1263–71.

- Feng J, Yu J, Pan X, Li Z, Chen Z, Zhang W, Wang B, Yang L, Xu H, Zhang G, Xu Z. 2014. HERG1 Functions as an Oncogene in Pancreatic Cancer and is Downregulated by miR-96. *Oncotarget* 14 (5): 5832-44.
- Feng, Y. H., & Tsao, C. J. 2016. Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomedical Reports* 5 (4): 395–402.
- Ferrone CR, Pieretti-Vanmarcke R, Bloom JP, Zheng H, Szymonifka J, Wargo JA, Thayer SP, Lauwers GY, Deshpande V, Mino-Kenudson M, Fernández-del Castillo C, Lillemoe KD, Warshaw AL. 2012. Pancreatic ductal adenocarcinoma: long-term survival does not equal cure. *Surgery* 152 (3 Suppl 1), 43–9.
- Forero DA, González-Giraldo Y, Castro-Vega LJ, Barreto GE. 2019. qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *Biotechniques* 67 (4): 192-9.
- Frampton AE, Krell J, Jamieson NB, Gall TM, Giovannetti E, Funel N, Mato Prado M, Krell D, Habib NA, Castellano L, Jiao LR, Stebbing J. 2015. microRNAs with prognostic significance in pancreatic ductal adenocarcinoma: A meta-analysis. *Eur J Cancer* 51: 1389–404.
- Frampton AE, Krell J, Jamieson NB, Gall TM, Giovannetti E, Funel N, Mato Prado M, Krell D, Habib NA, Castellano L, Jiao LR, Stebbing J. 2015. microRNAs with prognostic significance in pancreatic ductal adenocarcinoma: A meta-analysis. *Eur J Cancer* 51: 1389–404.
- Frampton AE, Krell J, Prado MM, Gall TM, Abbassi-Ghadi N, Del Vecchio Blanco G, Funel N, Giovannetti E, Castellano L, Basyouny M, Habib NA, Kaltsidis H, Vlavianos P, Stebbing J, Jiao LR. 2016. Prospective validation of microRNA signatures for detecting pancreatic malignant transformation in endoscopic-ultrasound guided fine-needle aspiration biopsies. *Oncotarget* 7 (19), 28556–69.
- Franklin O, Jonsson P, Billing O, Lundberg E, Öhlund D, Nyström H, Lundin C, Antti H, Sund M. 2018. Plasma Micro-RNA Alterations Appear Late in Pancreatic Cancer. *Annals of Surgery* 267 (4), 775–81.
- Freedman JE, Gerstein M, Mick E, Rozowsky J, Levy D, Kitchen R, Das S, Shah R, Danielson K, Beaulieu L, Navarro FC, Wang Y, Galeev TR, Holman A, Kwong RY, Murthy V, Tanriverdi SE, Koupenova-Zamor M, Mikhalev E, Tanriverdi K. 2016. Diverse human extracellular RNAs are widely detected in human plasma. *Nature Communications* 7: 11106.
- Ganepola GA, Rutledge JR, Suman P, Yiengpruksawan A, Chang DH. 2014. Novel blood-based microRNA biomarker panel for early diagnosis of pancreatic cancer. *World Journal Of Gastrointestinal Oncology* 6 (1): 22–33.
- Gao S, Zhao ZY, Wu R, Zhang Y, Zhang ZY. 2018. Prognostic value of microRNAs in colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer management and research* 10: 907–29.
- Garofalo, M., Quintavalle, C., Romano, G., Croce, C. M., Condorelli, G. 2012. miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy. *Current Molecular Medicine* 12 (1): 27–33.
- Gbolahan OB, Tong Y, Sehdev A, O'Neil B, Shahda S. 2019. Overall survival of patients with recurrent pancreatic cancer treated with systemic therapy: a retrospective study. *BMC Cancer* 19 (1): 468.
- Gebert LFR, MacRae IJ. 2019. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20: 21–37.

- Gee HE, Buffa FM, Camps C, Ramachandran A, Leek R, Taylor M, Patil M, Sheldon H, Betts G, Homer J, West C, Ragoussis J, Harris AL. 2011. The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *British Journal Of Cancer* 104 (7): 1168–77.
- Giovannetti E, Funel N, Peters GJ, Del Chiaro M, Erozcenci LA, Vasile E, Leon LG, Pollina LE, Groen A, Falcone A, Danesi R, Campani D, Verheul HM, Boggi U. 2010. MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer Res* 70: 4528–38.
- Giraldez MD, Spengler RM, Etheridge A, Godoy PM, Barczak AJ, Srinivasan S, De Hoff PL, Tanriverdi K, Courtright A, Lu S, Khoory J, Rubio R, Baxter D, Driedonks T, Buermans H, Nolte-t Hoen E, Jiang H, Wang K, Ghira, I, Wang YE, Tewari M. 2018. Comprehensive multi-center assessment of small RNA-seq methods for quantitative miRNA profiling. *Nature Biotechnology* 36 (8): 746-57.
- Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, Chaix A, Fazli L, Motoo Y, Wang Q, Rocchi P, Russo A, Gleave M, Dagorn JC, Iovanna JL, Carrier A, Dusetti NJ. 2007. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155 and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (41): 16170–5.
- Glinge C, Clauss S, Boddum K, Jabbari R, Jabbari J, Risgaard B, Tomsits P, Hildebrand B, Käab S, Wakili R, Jespersen T, Tfelt-Hansen J. 2017. Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs - Pre-Analytic Methodological Considerations. *PloS One* 12 (2): e0167969.
- Gong L, Wang C, Gao Y, Wang J. 2016. Decreased expression of microRNA-148a predicts poor prognosis in ovarian cancer and associates with tumor growth and metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83: 58-63
- Goto T, Fujiya M, Konishi H, Sasajima J, Fujibayashi S, Hayashi A, Utsumi T, Sato H, Iwama T, Ijiri M, Sakatani A, Tanaka K, Nomura Y, Ueno N, Kashima S, Moriichi K, Mizukami Y, Kohgo Y, Okumura T. 201). An elevated expression of serum exosomal microRNA-191, -21, -451a of pancreatic neoplasm is considered to be efficient diagnostic marker. *BMC Cancer* 18 (1): 116.
- Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschläger C, Würfl P, Taubert H. 2010. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer* 126 (1): 73-80.
- Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. 2016. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med* 14 (1): 143.
- Ha M, Kim VN. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 509–24.
- Habbe N, Koorstra JB, Mendell JT, Offerhaus GJ, Ryu JK, Feldmann G, Mullendore ME, Goggins MG, Hong SM, Maitra A. 2009. MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer Biology And Therapy* 8 (4): 340–6.
- Hall JS, Taylor J, Valentine HR, Irlam JJ, Eustace A, Hoskin PJ, Miller CJ, West CM. 2012. Enhanced stability of microRNA expression facilitates classification of FFPE tumour samples exhibiting near total mRNA degradation. *British Journal Of Cancer* 107 (4): 684–94.

- Hannafon BN, Ding WQ. 2019. Functional Role of miRNAs in the Progression of Breast Ductal Carcinoma in Situ. *The American Journal of Pathology* 189 (5): 966-74.
- Hanoun N, Delpu Y, Suriawinata AA, Bournet B, Bureau C, Selves J, Tsongalis GJ, Dufresne M, Buscail L, Cordelier P, Torrisani J. 2010. The Silencing of MicroRNA 148a Production by DNA Hypermethylation Is an Early Event in Pancreatic Carcinogenesis, *Clinical Chemistry* 56 (7): 1107-18.
- Hansen CN, Ketabi Z, Rosenstjerne MW, Palle C, Boesen HC, Norrild B. 2007. Expression of CPEB, GAPDH and U6 snRNA in cervical and ovarian tissue during cancer development. *APMIS* 117 (1): 53–9.
- Hasan S, Jacob R, Manne U, Paluri R. 2019. Advances in pancreatic cancer biomarkers. *Oncol Rev* 13 (1): 410.
- Higgs, G, Slack F. 2013. The multiple roles of microRNA-155 in oncogenesis. *J Clin Bioinform* 3: 17.
- Ho AS, Huang X, Cao H, Christman-Skieller C, Bennewith K, Le QT, Koong AC. 2010. Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl Oncol* 3: 109–13.
- Hong TH, Park IY. 2014. MicroRNA expression profiling of diagnostic needle aspirates from surgical pancreatic cancer specimens. *Ann Surg Treat Res* 87 (6): 290–297.
- Hruban, RH, Fukushima N. 2008. Cystic lesions of the pancreas. *Diagnostic Histopathology* 14 (6): 260–5.
- Hruban, RH, Maitra A, Goggins M. 2008. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *International Journal Of Clinical And Experimental Pathology* 1 (4): 306–16.
- Huang C, Li H, Wu W, Jiang T, Qiu Z. 2013. Regulation of miR-155 affects pancreatic cancer cell invasiveness and migration by modulating the STAT3 signaling pathway through SOCS1. *Oncol Rep* 30 (3): 1223-30.
- Huang F, Tang J, Zhuang X, Zhuang Y, Cheng W, Chen W, Yao H, Zhang S. 2014. MiR-196a promotes pancreatic cancer progression by targeting nuclear factor kappa-B-inhibitor alpha. *PloS One* 9 (2): e87897.
- Huang J, Liu J, Chen-Xiao K, Zhang X, Lee WN, Go VL, Xiao GG. 2016. Advance in microRNA as a potential biomarker for early detection of pancreatic cancer. *Biomarker Research* 4: 20.
- Huang L, Jansen L, Balavarca Y, Babaei M, van der Geest L, Lemmens V, Van Eycken L, De Schutter H, Johannesen T. B, Primic-Žakelj M, Zadnik V, Besselink MG, Schrotz-King P, Brenner H. 2018. Stratified survival of resected and overall pancreatic cancer patients in Europe and the USA in the early twenty-first century: a large, international population-based study. *BMC Medicine* 16 (1): 125.
- Huang X, Lv W, Zhang JH, Lu DL. 2014. miR-96 functions as a tumor suppressor gene by targeting NUA1 in pancreatic cancer. *Int J Mol Med* 34 (6): 1599-605.
- Huang X, Zuo J. 2014. Emerging roles of miR-210 and other non-coding RNAs in the hypoxic response. *Acta Biochim Biophys Sin* 46 (3): 220-32.

- Huang J, Liu J, Chen-Xiao K, Zhang X, Lee WN, Go VL, Xiao GG. 2016. Advance in microRNA as a potential biomarker for early detection of pancreatic cancer. *Biomarker Research* 4: 20.
- Hwang JH, Voortman J, Giovannetti E, Steinberg SM, Leon LG, Kim YT, Funel N, Park JK, Kim MA, Kang GH, Kim SW, Del Chiaro M, Peters GJ, Giaccone G. 2010. Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *PloS One* 5 (5): e10630.
- Chang KH, Mestdagh P, Vandesompele J, Kerin MJ, Miller N. 2010. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC Cancer* 10: 173.
- Chang X, Yu C, Li J, Yu S, Chen J. 2017. hsa-miR-96 and hsa-miR-217 Expression Down-Regulates with Increasing Dysplasia in Pancreatic Intraepithelial Neoplasias and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Int J Med Sci* 14 (5): 412–8.
- 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. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 33 (20): e179.
- Chen DL, Zhang DS, Lu YX, Chen LZ, Zeng ZL, He MM, Wang FH, Li YH, Zhang HZ, Pelicano H, Zhang W, Xu RH. 2015. microRNA-217 inhibits tumor progression and metastasis by downregulating EZH2 and predicts favorable prognosis in gastric cancer. *Oncotarget* 6 (13): 10868–79.
- Chen K, Xu XW, Xie K, Zhou YC, Mou YP. 2012. Splenomegaly as the first manifestation of pancreatic adenosquamous carcinoma: a case report. *Turk J Gastroenterol* 23 (6): 799-803.
- Cho CS, Russ AJ, Loeffler AG, Rettammel RJ, Oudheusden G, Winslow ER, Weber SM. 2013. Preoperative classification of pancreatic cystic neoplasms: the clinical significance of diagnostic inaccuracy. *Ann Surg Oncol* 20: 3112–9.
- Chu Y, Corey DR. 2012. RNA sequencing: platform selection, experimental design and data interpretation. *Nucleic Acid Therapeutics* 22 (4): 271–4.
- James TA, Sheldon DG, Rajput A, Kuvshinoff BW, Javle MM, Nava HR, Smith JL, Gibbs JF. 2004. Risk factors associated with earlier age of onset in familial pancreatic carcinoma. *Cancer* 101 (12): 2722-6.
- Jamieson NB, Morran DC, Morton JP, Ali A, Dickson EJ, Carter CR, Sansom OJ, Evans TR, McKay CJ, Oien KA. 2012. MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 18 (2): 534-45.
- Jiao LR, Frampton AE, Jacob J, Pellegrino L, Krell J, Giamas G, Tsim N, Vlavianos P, Cohen P, Ahmad R, Keller A, Habib NA, Stebbing J, Castellano L. 2012. MicroRNAs targeting oncogenes are down-regulated in pancreatic malignant transformation from benign tumors. *PloS One* 7 (2): e32068.
- Jing W, Zhu G, Hu X, Jing G, Shao C, Zhou Y, He T, Zhang Y. 2013. Distal pancreatectomy with en bloc celiac axis resection for the treatment of locally advanced pancreatic body and tail cancer. *Hepatogastroenterology* 60 (121): 187-90.
- Jo MH, Shin S, Jung SR, Kim E, Song JJ, Hohng S. 2015. Human Argonaute 2 Has diverse reaction pathways on Target RNAs. *Mol Cell* 59: 117–24.

- Johnston M, Hutvagner G. 2011. Posttranslational modification of Argonautes and their role in small RNA-mediated gene regulation. *Silence* 2011; 2: 5.
- Jonas S, Izaurralde E. 2015. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* 16: 421–33.
- Jones RP, Psarelli EE, Jackson R, Ghaneh P, Halloran CM, Palmer DH, Campbell F, Valle JW, Faluyi O, O'Reilly DA, Cunningham D, Wadsley J, Darby S, Meyer T, Gillmore R, Anthony A, Lind P, Glimelius B, Falk S, Izbicki JR, Middleton GW, Cummins S, Ross PJ, Wasan H, McDonald A, Crosby T, Ting Y, Patel K, Sherriff D, Soomal R, Borg D, Sothi S, Hammel P, Lerch MM, Mayerle J, Tjaden C, Strobel O, Hackert T, Büchler MW, Neoptolemos JP; European Study Group for Pancreatic Cancer. 2019. Patterns of Recurrence After Resection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Secondary Analysis of the ESPAC-4 Randomized Adjuvant Chemotherapy Trial. *JAMA Surg* 154 (11): 1038–48.
- Joshi GK, Deitz-McElyea S, Liyanage T, Lawrence K, Mali S, Sardar R, Korc M. 2015. Label-Free Nanoplasmonic-Based Short Noncoding RNA Sensing at Attomolar Concentrations Allows for Quantitative and Highly Specific Assay of MicroRNA-10b in Biological Fluids and Circulating Exosomes. *ACS nano* 9 (11): 11075–89.
- Jung U, Jiang X, Kaufmann SH, Patzel V. 2013. A universal TaqMan-based RT-PCR protocol for cost-efficient detection of small noncoding RNA. *RNA* 19 (12), 1864–73.
- Kadera BE, Li L, Toste PA, Wu N, Adams C, Dawson DW, Donahue TR. 2013. MicroRNA-21 in pancreatic ductal adenocarcinoma tumor-associated fibroblasts promotes metastasis. *PLoS One* 8 (8): e71978.
- Kalra H, Adda CG, Liem M, Ang CS, Mechler A, Simpson RJ, Hulett MD, Mathivanan S. 2013. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics* 13: 3354–64
- Karamitopoulou E, Haemmig S, Baumgartner U, Schlup C, Wartenberg M, Vassella E. 2017. MicroRNA dysregulation in the tumor microenvironment influences the phenotype of pancreatic cancer. *Mod Pathol* 30: 1116–25.
- Karasek P, Gablo N, Hlavsa J, Kiss I, Vychytilova-Faltejskova P, Hermanova M, Kala Z, Slaby O, Prochazka V. 2018. Pre-operative Plasma miR-21-5p Is a Sensitive Biomarker and Independent Prognostic Factor in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Undergoing Surgical Resection. *Cancer Genomics And Proteomics* 15 (4): 321–7.
- Kato M. 2018. Target RNA-directed microRNA degradation; which controls which? *Noncoding RNA Investig* 2: 62.
- Kawaguchi T, Komatsu S, Ichikawa D, Morimura R, Tsujiura M, Konishi H, Takeshita H, Nagata H, Arita T, Hirajima S, Shiozaki A, Ikoma H, Okamoto K, Ochiai T, Taniguchi H, Otsuji E. 2013. Clinical impact of circulating miR-221 in plasma of patients with pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 108 (2): 361–9.
- Keane MG, Horsfall L, Rait G, Pereira SP. 2014. A case-control study comparing the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer. *BMJ Open* 4 (11): e005720.
- Kent OA, Mullendore M, Wentzel EA, López-Romero P, Tan AC, Alvarez H, Wes, K, Ochs MF, Hidalgo M, Arking DE, Maitra A, Mendell JT. 2009. A resource for analysis of microRNA



expression and function in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Biology And Therapy* 8 (21): 2013–24.

Khan K, Cunningham D, Peckitt C, Barton S, Tait D, Hawkins M, Watkins D, Starling N, Rao S, Begum R, Thomas J, Oates J, Guzzardo V, Fassan M, Braconi C, Chau I. 2016. miR-21 expression and clinical outcome in locally advanced pancreatic cancer: exploratory analysis of the pancreatic cancer Erbitux, radiotherapy and UFT (PERU) trial. *Oncotarget* 7 (11): 12672–81.

Kimura W, Morikane K, Esaki Y, Chan C, Pour PM. 1998. Histologic and biologic patterns of microscopic pancreatic ductal adenocarcinomas detected incidentally at autopsy. *Cancer* 82: 1839-49.

Kong X, Du Y, Wang G, Gao J, Gong Y, Li L, Zhang Z, Zhu J, Jing Q, Qin Y, Li Z. 2011. Detection of differentially expressed microRNAs in serum of pancreatic ductal adenocarcinoma patients: miR-196a could be a potential marker for poor prognosis. *Dig Dis Sci* 56: 602–9.

Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. 2010. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) [published correction appears in *Methods* 2010; 52 (3): 268]. *Methods* 50 (4): 298–301.

Kuninty PR, Bojmar L, Tjomsland V, M. Larsson, Gerrit Storm, A. Östman, P. Sandström, Jai Prakash. 2016. MicroRNA-199a and -214 as potential therapeutic targets in pancreatic stellate cells in pancreatic tumor. *Oncotarget* 7 (13): 16396–408.

Kwon JJ, Nabinger SC, Vega Z, Sahu SS, Alluri RK, Abdul-Sater Z, Yu Z, Gore J, Nalepa G, Saxena R, Korc M, Kota J. 2015. Pathophysiological role of microRNA-29 in pancreatic cancer stroma. *Scientific Reports* 5: 11450.

Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. 2015. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids* 4 (9): e252.

Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foà R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Tuschl T. 2007. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129 (7): 1401–14.

Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, Morgan DL, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD. 2007. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International Journal of Cancer* 120 (5): 1046–54.

Lee J, Cho BS, Kang MH, Kim Y, Yi KS, Park KS, Choi H, Choi JW, Son SM, Woo CG. 2018. Diagnosis of pancreatic intraepithelial neoplasia based on multimodal imaging findings: a case report and review of the literature. *Int J Clin Exp Med* 11 (9): 10062-68.

Lee LS, Szafranska-Schwarzbach AE, Wylie D, Doyle L, A Bellizzi AM, Kadiyala V, Suleiman S, Banks PA, Andruss BF, Conwell DL. 2014. Investigating MicroRNA Expression Profiles in Pancreatic Cystic Neoplasms. *Clinical And Translational Gastroenterology* 5 (1): e47.

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

Lei Z, van Mil A, Xiao J, Metz C, van Eeuwijk E, Doevendans PA, Sluijter J. 2018. MMISH: Multicolor microRNA in situ hybridization for paraffin embedded samples. *Biotechnology Reports* 18: e00255.

- Lemberger M, Loewenstein S, Lubezky N, Nizri E, Pasmanik-Chor M, Barazovsky E, Klausner JM, Lahat G. 2019. MicroRNA profiling of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) reveals signature expression related to lymph node metastasis. *Oncotarget* 10 (27): 2644–56.
- Leung AKL. 2015. The Whereabouts of microRNA Actions: Cytoplasm and Beyond. *Trends Cell Biol* 25 (10): 601–10.
- Levink I, Bruno MJ, Cahen DL. 2018. Management of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms: Controversies in Guidelines and Future Perspectives. *Current Treatment Options In Gastroenterology* 16 (3): 316–32.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120 (1): 15–20.
- Li A, Yu J, Kim H, Wolfgang CL, Canto MI, Hruban RH, Goggins M. 2013. MicroRNA array analysis finds elevated serum miR-1290 accurately distinguishes patients with low-stage pancreatic cancer from healthy and disease controls. *Clinical cancer research* 19 (13): 3600–10.
- Li C, Du X, Tai S, Zhong X, Wang Z, Hu Z, Zhang L, Kang P, Ji D, Jiang X, Zhou Q, Wan M, Jiang G, Cui Y. 2014. GPC1 regulated by miR-96-5p, rather than miR-182-5p, in inhibition of pancreatic carcinoma cell proliferation. *International Journal Of Molecular Sciences* 15 (4): 6314–27.
- Li D. Diabetes and pancreatic cancer. 2012. *Mol Carcinog* 51 (1): 64–74.
- Li H, Zhao J, Zhang JW, Huang QY, Huang JZ, Chi LS, Tang HJ, Liu GQ, Zhu DJ, Ma WM. 2013. MicroRNA-217, down-regulated in clear cell renal cell carcinoma and associated with lower survival, suppresses cell proliferation and migration. *Neoplasma* 60 (5): 511–5.
- Li S, Tian B. 2017. Acute pancreatitis in patients with pancreatic cancer: Timing of surgery and survival duration. *Medicine* 96 (3): e5908.
- Li W, Ruan K. 2009. MicroRNA detection by microarray. *Anal Bioanal Chem* 394 (4): 1117–24.
- Li X, Mauro M, Williams Z. 2015. Comparison of plasma extracellular RNA isolation kits reveals kit-dependent biases. *Biotechniques* 59 (1): 13–7.
- Liang L, Wei DM, Li JJ, Luo DZ, Chen G, Dang YW, Cai XY. 2018. Prognostic microRNAs and their potential molecular mechanism in pancreatic cancer: A study based on The Cancer Genome Atlas and bioinformatics investigation. *Molecular medicine reports* 17: 939–51.
- Liao X, Wang X, Huang K, Yang C, Yu T, Han C, Zhu G, Su H, Huang R, Peng T. 2018. Genome-scale analysis to identify prognostic microRNA biomarkers in patients with early stage pancreatic ductal adenocarcinoma after pancreaticoduodenectomy. *Cancer Management and Research* 10: 2537–51.
- Liffers S, Munding J, Vogt M, Kuhlmann JD, Verdoodt B, Nambiar S, Maghnooj A, Mirmohammadsadegh A, Hahn SA, Tannapfel A. 2011. MicroRNA-148a is down-regulated in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates cell survival by targeting CDC25B. *Lab Invest* 91: 1472–79.
- Lindsay CR, Edelstein LC. 2016. MicroRNAs in Platelet Physiology and Function. *Semin Thromb Hemost* 42 (3): 215–22.

- Link A, Becker V, Goel A, Wex T, Malfertheiner P 2012 Feasibility of Fecal MicroRNAs as Novel Biomarkers for Pancreatic Cancer. *PLoS ONE* 7 (8): e42933.
- Liu A, Xu X. (2011). MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods In Molecular Biology* 724: 259–67.
- Liu CG, Calin GA, Volinia S, Croce CM. 2008. MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat Protoc* 3 (4): 563-78.
- Liu J, Gao J, Du Y, Li Z, Ren Y, Gu J, Wang X, Gong Y, Wan W, Kong X. 2012. Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 131: 683-91.
- Liu M, Du Y, Gao J, Liu J, Kong X, Gong Y, Li Z, Wu H, Chen H. 2013. Aberrant expression miR-196a is associated with abnormal apoptosis, invasion and proliferation of pancreatic cancer cells. *Pancrea*. 42 (7): 1169-81.
- Liu R, Chen X, Du Y, Yao W, Shen L, Wang C, Hu Z, Zhuang R, Ning G, Zhang C, Yuan Y, Li Z, Zen K, Ba Y, Zhang CY. 2012. Serum microRNA expression profile as a biomarker in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Clin Chem* 58 (3): 610-8.
- Lou G, Ma N, Xu Y, Jiang L, Yang J, Wang C, Jiao Y, Gao X. 2015. "Differential distribution of U6 (RNU6-1) expression in human carcinoma tissues demonstrates the requirement for caution in the internal control gene selection for microRNA quantification". *International Journal of Molecular Medicine* 36 (5): 1400-8.
- Lu YC, Chang JT, Chan EC, Chao YK, Yeh TS, Chen JS, Cheng AJ. 2016. miR-196, an Emerging Cancer Biomarker for Digestive Tract Cancers. *Journal of Cancer* 7 (6): 650–5.
- Lubezky N, Loewenstein S, Ben-Haim M, Brazowski E, Marmor S, Pasmanik-Chor M, Oron-Karni V, Rechavi G, Klausner JM, Lahat G. 2013. MicroRNA expression signatures in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Surgery* 153 (5): 663–72.
- Ludwig N, Leidinger P, Becker K, Backes C, Fehlmann T, Pallasch C, Rheinheimer S, Meder B, Stähler C, Meese E and Keller A. 2016. Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Research* 44 (8): 3865–77.
- Ma L, Xu Z, Xu C, Jiang X. 2016. MicroRNA-148a represents an independent prognostic marker in bladder cancer. *Tumour Biol* 37 (6): 7915-20.
- Ma MZ, Kong X, Weng MZ, Cheng K, Gong W, Quan ZW, Peng CH. 2013. Candidate microRNA biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma: meta-analysis, experimental validation and clinical significance. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 32 (1): 71.
- Madhavan B, Yue S, Galli U, Rana S, Gross W, Müller M, Giese NA, Kalthoff H, Becker T, Büchler MW, Zöller M. 2015. Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity. *Int J Cancer* 136: 2616-27.
- Masamune A, Nakano E, Hamada S, Takikawa T, Yoshida N, Shimosegawa T. 2014. Alteration of the microRNA expression profile during the activation of pancreatic stellate cells, *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49 (3): 323-31.

- Mattiske S, Suetani RJ, Neilsen PM, Callen DF. 2012. The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21 (8): 1236-43.
- Mattiske S, Suetani RJ, Neilsen PM, Callen DF. 2012. The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21 (8): 1236-43.
- McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. 2018. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol* 24 (43): 4846–61.
- Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, LeBleu VS, Mittendorf EA, Weitz J, Rahbari N, Reissfelder C, Pilarsky C, Fraga MF, Piwnica-Worms D, Kalluri R. 2015. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 523 (7559): 177–182.
- Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A, Qiu L, Vitkin E, Perelman LT, Melo CA, Lucci A, Ivan C, Calin GA, Kalluri R. 2014. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer cell* 26 (5): 707–21.
- Meng Q, Shi S, Liang C, Liang D, Xu W, Ji S, Zhang B, Ni Q, Xu J, Yu X. 2017. Diagnostic and prognostic value of carcinoembryonic antigen in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *OncoTargets and Therapy* 10: 4591–98.
- Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L, Andreasen D, Bernard N, Chen C, Cheo D, D'Andrade P, DeMayo M, Dennis L, Derveaux S, Feng Y, Fulmer-Smentek S, Gerstmayer B, Gouffon J, Grimley C, Lader E, Lee KY, Luo S, Mouritzen P, Narayanan A, Patel S, Peiffer S, Rüberg S, Schroth G, Schuster D, Shaffer JM, Shelton EJ, Silveria S, Ulmanella U, Veeramachaneni V, Staedtler F, Peters T, Guettouche T, Wong L, Vandesompele J. 2014. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods* 11 (8): 809-15.
- Meyer SU, Pfaffl MW, Ulbrich SE. 2010. Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a 'normal' way to a hidden layer of complexity? *Biotechnol Lett* 32 (12): 1777-88.
- Mikamori M, Yamada D, Eguchi H, Hasegawa S, Kishimoto T, Tomimaru Y, Asaoka T, Noda T, Wada H, Kawamoto K, Gotoh K, Takeda Y, Tanemura M, Mori M, Doki Y. 2017. MicroRNA-155 Controls Exosome Synthesis and Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Scientific reports* 7: 42339.
- Milevskiy M, Gujral U, Del Lama Marques C, Stone A, Northwood K, Burke LJ, Gee J, Nephew K, Clark S, Brown MA. 2019. MicroRNA-196a is regulated by ER and is a prognostic biomarker in ER+ breast cancer. *British journal of cancer* 120 (6): 621–32.
- Miyamae M, Komatsu S, Ichikawa D, Kawaguchi T, Hirajima S, Okajima W, Ohashi T, Imamura T, Konishi H, Shiozaki A, Morimura R, Ikoma H, Ochiai T, Okamoto K, Taniguchi H, Otsuji E. 2015. Plasma microRNA profiles: identification of miR-744 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 113 (10): 1467–76.
- Morimura R, Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, Nagata H, Konishi H, Shiozaki A, Ikoma H, Okamoto K, Ochiai T, Taniguchi H, Otsuji E. 2011. Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 105 (11): 1733–40.

Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Sato N, Nabae T, Takahata S, Toma H, Nagai E, Tanaka M. 2009. MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion and chemoresistance. *Mol Cancer Ther* 8: 1067-74.

Müller S, Raulefs S, Bruns P, Afonso-Grunz F, Plötner A, Thermann R, Jäger C, Schlitter AM, Kong B, Regel I, Roth WK, Rotter B, Hoffmeier K, Kahl G, Koch I, Theis FJ, Kleeff J, Winter P, Michalski CW. 2015. Next-generation sequencing reveals novel differentially regulated mRNAs, lncRNAs, miRNAs, sRNAs and a piRNA in pancreatic cancer. *Molecular Cancer* 14: 94.

Munding JB, Adai AT, Maghnouj A, Urbanik A, Zöllner H, Liffers ST, Chromik AM, Uhl W, Szafranska-Schwarzbach AE, Tannapfel A, Hahn SA. 2012. Global microRNA expression profiling of microdissected tissues identifies miR-135b as a novel biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* 131: E86-E95.

Murakami T, Hiroshima Y, Matsuyama R, Homma Y, Hoffman RM, Endo I. 2019. Role of the tumor microenvironment in pancreatic cancer. *Ann Gastroenterol Surg* 3 (2): 130–7.

Nagao Y, Hisaoka M, Matsuyama A, Kanemitsu S, Hamada T, Fukuyama T, Nakano R, Uchiyama A, Kawamoto M, Yamaguchi K, Hashimoto H. 2012. Association of microRNA-21 expression with its targets, PDCD4 and TIMP3, in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 25: 112–21.

Nakamura S, Sadakari Y, Ohtsuka T, Okayama T, Nakashima Y, Gotoh Y, Saeki K, Mori Y, Nakata K, Miyasaka Y, Onishi H, Oda Y, Goggins M, Nakamura M. 2019. Pancreatic Juice Exosomal MicroRNAs as Biomarkers for Detection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 26 (7): 2104-11.

Namkung J, Kwon W, Choi Y, Yi SG, Han S, Kang MJ, Kim SW, Park T, Jang JY. 2016. Molecular subtypes of pancreatic cancer based on miRNA expression profiles have independent prognostic value. *J Gastroenterol Hepatol* 31 (6): 1160-7.

Negoï I, Hostiuc S, Sartelli M, Negoï RI, Beuran M. 2017. MicroRNA-21 as a prognostic biomarker in patients with pancreatic cancer - A systematic review and meta-analysis. *Am J Surg* 214: 515–24.

Nicolle R, Raffenne J, Paradis V, Couvelard A, de Reynies A, Blum Y, Cros J. 2019. Prognostic Biomarkers in Pancreatic Cancer: Avoiding Errata When Using the TCGA Dataset. *Cancers* 11 (1): 126.

Ning S, Liu H, Gao B, Wei W, Yang A, Li J, Zhang L. 2019. miR-155, miR-96 and miR-99a as potential diagnostic and prognostic tools for the clinical management of hepatocellular carcinoma. *Oncology letters* 18(3): 3381–7.

Novotvary 2016. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Praha. ISSN: 1210-857X, (0862-576X, 0862-5778)

O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. 2018. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions and Circulation. *Front Endocrinol* 9: 402.

Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C. 2010. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 12: 19-30; sup pp 1-13.

- Osugi J, Kimura Y, Owada Y, Inoue T, Watanabe Y, Yamaura T, Fukuhara M, Muto S, Okabe N, Matsumura Y, Hasegawa T, Yonechi A, Hoshino M, Higuchi M, Shio Y, Suzuki H, Gotoh M. 2015. Prognostic Impact of Hypoxia-Inducible miRNA-210 in Patients with Lung Adenocarcinoma. *Journal of oncology* 316745.
- Ottaviani S, Stebbing J, Frampton AE, Zagorac S, Krell J, de Giorgio A, Trabulo SM, Nguyen VTM, Magnani L, Feng H, Giovannetti E, Funel N, Gress TM, Jiao LR, Lombardo Y, Lemoine NR, Heeschen C, Castellano L. 2018. TGF- $\beta$  induces miR-100 and miR-125b but blocks let-7a through LIN28B controlling PDAC progression. *Nat Commun* 9 (1): 1845.
- Pang W, Su J, Wang Y, Feng H, Dai X, Yuan Y, Chen X, Yao W. 2015. Pancreatic cancer-secreted miR-155 implicates in the conversion from normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts. *Cancer Science* 106 (10): 1362–9.
- Papaconstantinou IG, Manta A, Gazouli M, Lyberopoulou A, Lykoudis PM, Polymeneas G, Voros D. 2013. Expression of microRNAs in patients with pancreatic cancer and its prognostic significance. *Pancreas* 42: 67–71.
- Peltier HJ, Latham GJ. 2008. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 14 (5): 844–52.
- Peng L, Liu Z, Xiao J, Tu Y, Wan Z, Xiong H, Li Y, Xiao W. 2017. MicroRNA-148a suppresses epithelial-mesenchymal transition and invasion of pancreatic cancer cells by targeting Wnt10b and inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Oncology Reports* 38 (1): 301-8.
- Permeth-Wey J, Chen YA, Fisher K, McCarthy S, Qu X, Lloyd MC, Kasprzak A, Fournier M, Williams VL, Ghia KM, Yoder SJ, Hall L, Georgeades C, Olaoye F, Husain K, Springett GM, Chen DT, Yeatman T, Centeno BA, Klapman J, Malafa M. 2015. A genome-wide investigation of microRNA expression identifies biologically-meaningful microRNAs that distinguish between high-risk and low-risk intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *PLoS One* 10 (1): e0116869.
- Peskoe SB, Barber JR, Zheng Q, Meeker AK, De Marzo AM, Platz EA, Lupold SE. 2017. Differential long-term stability of microRNAs and RNU6B snRNA in 12-20 year old archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *BMC Cancer* 17(1): 32.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 45e–45.
- Pitman MB, Lewandrowski K, Shen J, Sahani D, Brugge W, Fernandez-del Castillo C. 2010. Pancreatic cysts: preoperative diagnosis and clinical management. *Cancer Cytopathol* 118: 1–13.
- Poruk KE, Gay DZ, Brown K, Mulvihill JD, Boucher KM, Scaife CL, Firpo MA, Mulvihill SJ. 2013. The clinical utility of CA 19-9 in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and prognostic updates. *Current Molecular Medicine* 13 (3): 340–51.
- Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. 2004. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432: 226–30.

- Preis M, Gardner TB, Gordon SR, Pipas JM, Mackenzie TA, Klein EE, Longnecker DS, Gutmann EJ, Sempere LF, Korc M. 2011. MicroRNA-10b expression correlates with response to neoadjuvant therapy and survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 17: 5812–21.
- Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, Tait JF, Tewari M. 2012. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prevention Research* 5 (3): 492–7.
- Qi L, Bart J, Tan L. P, Platteel I, Sluis T, Huitema S, Harms G, Fu L, Hollema H, Berg A. 2009. Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. *BMC Cancer* 9: 163.
- Qi R, Weiland M, Gao XH, Zhou L, Mi QS. 2012 Identification of endogenous normalizers for serum microRNAs by microarray profiling: U6 small nuclear RNA is not a reliable normalizer. *Hepatology* 55: 1640–1642. author reply 1642-3.
- Qu A, Du L, Yang Y, Liu H, Li J, Wang L, Liu Y, Dong Z, Zhang X, Jiang X, Wang H, Li Z, Zheng G, Wang C. 2014. Hypoxia-inducible MiR-210 is an independent prognostic factor and contributes to metastasis in colorectal cancer. *PloS one* 9(3): e90952.
- Qu K, Zhang X, Lin T, Liu T, Wang Z, Liu S, Zhou L, Wei J, Chang H, Li K, Wang Z, Liu C, Wu Z. 2017. Circulating miRNA-21-5p as a diagnostic biomarker for pancreatic cancer: evidence from comprehensive miRNA expression profiling analysis and clinical validation. *Scientific Reports* 7 (1): 1692.
- Que R, Ding G, Chen J, Cao L. 2013. Analysis of serum exosomal microRNAs and clinicopathologic features of patients with pancreatic adenocarcinoma. *World J Surg Oncol* 11: 219.
- Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. 2014. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver and pancreas cancers in the united states. *Cancer Res* 74: 2913–21.
- Ren B, Liu X, Suriawinata. 2019. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions: Histopathology, Cytopathology and Molecular Pathology. *The American Journal of Pathology* 189 (1): 9-21.
- Ren Y, Gao J, Liu J, Wang X, Gu J, Huang H, Gong Y, Li Z. 2012. Differential signature of fecal microRNAs in patients with pancreatic cancer". *Molecular Medicine Reports* 6 (1): 201-9.
- Roberts TC. 2014. The MicroRNA Biology of the Mammalian Nucleus. *Mol Ther Nucleic Acids* 3 (8): e188.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14 (10A): 1902–10.
- Rounge TB, Lauritzen M, Langseth H, Enerly E, Lyle R, Gislefoss RE. 2015. microRNA Biomarker Discovery and High-Throughput DNA Sequencing Are Possible Using Long-term Archived Serum Samples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 24 (9): 1381-7;
- Ryu JK, Hong SM, Karikari CA, Hruban RH, Goggins MG, Maitra A. 2010. Aberrant microRNA-155 expression is an early event in the multistep progression of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology* 10 (1): 66–73.

- Ryu JK, Matthaei H, Dal Molin M, Hong SM, Canto MI, Schulick RD, Wolfgang C, Goggins MG, Hruban RH, Cope L, Maitra A. 2011. Elevated microRNA miR-21 levels in pancreatic cyst fluid are predictive of mucinous precursor lesions of ductal adenocarcinoma. *Pancreatology* 11 (3): 343–50.
- Sadakari Y, Ohtsuka T, Ohuchida K, Tsutsumi K, Takahata S, Nakamura M, Mizumoto K, Tanaka M. 2010. MicroRNA expression analyses in preoperative pancreatic juice samples of pancreatic ductal adenocarcinoma. *JOP* 11: 587-92.
- Salvia R, Fernández-del Castillo C, Bassi C, Thayer SP, Falconi M, Mantovani W, Pederzoli P, Warshaw AL. 2004 Main duct intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: clinical predictors of malignancy and long-term survival following resection. *Ann Surg* 239: 678–87.
- Samaan S, Khella HW, Girgis A, Scorilas A, Lianidou E, Gabril M, Krylov SN, Jewett M, Bjarnason GA, El-said H, Yousef GM. 2015. miR-210 is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *J Mol Diagn* 17(2): 136-44.
- Santo E, Bar-Yishay I. 2017. Pancreatic solid incidentalomas. *Endosc Ultrasound* 6 (Suppl 3): 99–103.
- Sathipati Y, Ho SY. 2017. Identifying the miRNA signature associated with survival time in patients with lung adenocarcinoma using miRNA expression profiles. *Scientific reports* 7(1): 7507.
- Seufferlein T, Ettrich TJ. 2019. Treatment of pancreatic cancer-neoadjuvant treatment in resectable pancreatic cancer (PDAC). *Transl Gastroenterol Hepatol* 4: 21.
- Sheedy P, Medarova Z. 2018. The fundamental role of miR-10b in metastatic cancer. *American Journal Of Cancer Research* 8 (9): 1674–88.
- Shi Xh, Li X, Zhang H, He Rz, Zhao Y, Zhou M. 2018. A Five-microRNA Signature for Survival Prognosis in Pancreatic Adenocarcinoma based on TCGA Data. *Sci Rep* 16: 7638.
- Shirai Y, Shiba H, Horiuchi T, Saito N, Furukawa K, Sakamoto T, Gocho T, Ishida Y, Yanaga K. 2016. Assessment of Outcome After Pancreaticoduodenectomy by Junior Surgeons. *Anticancer Res* 36 (7): 3505-10.
- Schmittgen T, Livak K. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3: 1101–8.
- Schultz NA, Andersen KK, Roslind A, Willenbrock H, Wøjdemann M, Johansen JS. 2012 Prognostic MicroRNAs in Cancer Tissue from Patients Operated for Pancreatic Cancer-Five MicroRNAs in a Prognostic Index. *World J Surg* 36: 2699–707.
- Schultz NA, Dehlendorff C, Jensen BV, Bjerregaard JK, Nielsen KR, Bojesen SE, Calatayud D, Nielsen SE, Yilmaz M, Holländer NH, Andersen KK, Johansen JS. 2014. MicroRNA Biomarkers in Whole Blood for Detection of Pancreatic Cancer. *JAMA* 311 (4): 392–404.
- Schultz NA, Werner J, Willenbrock H, Roslind A, Giese N, Horn T, Wøjdemann M, Johansen JS. 2012. MicroRNA expression profiles associated with pancreatic adenocarcinoma and ampullary adenocarcinoma. *Modern Pathology* 25: 1609–22.
- Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, Pantel K. 2015. Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem* 61 (11): 1333–42.



- Sicard F, Gayral M, Lulka H, Buscail L, Cordelier P. 2013. Targeting miR-21 for the therapy of pancreatic cancer. *Mol Ther* 21 (5): 986–94.
- Sohel MH. 2016. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achievements in the Life Sciences* 10 (2): 175-86,
- Steiman-Shimony A, Shtrikman O, Margalit H. 2018. Assessing the functional association of intronic miRNAs with their host genes. *RNA* 24 (8): 991–1004.
- Suh N. 2018. MicroRNA controls of cellular senescence. *BMB Rep* 51: 493–499.
- Sun Z, Shi K, Yang S, Liu J, Zhou Q, Wang G, Song J, Li Z, Zhang Z, Yuan W. 2018. Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications. *Molecular Cancer* 17 (1): 147.
- Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnoij A, Labourier E, Hahn SA. 2007. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adeno-carcinoma. *Oncogene* 26: 4442–52.
- Szafranska AE, Davison TS, Shingara J, Doleshal M, Riggenbach JA, Morrison CD, Jewell S, Labourier E. 2008. Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling. *The Journal Of Molecular Diagnostics* 10 (5): 415–23.
- Szafranska AE, Doleshal M, Edmunds HS, Gordon S, Luttes J, Munding JB, Barth RJ Jr, Gutmann EJ, Suriawinata AA, Marc Pipas J, Tannapfel A, Korc M, Hahn SA, Labourier E, Tsongalis GJ. 2008. Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clinical Chemistry* 54 (10): 1716–24.
- Szary NM, Al-Kawas FH. 2013. Complications of endoscopic retrograde cholangiopancreatography: how to avoid and manage them. *Gastroenterol Hepatol* 9 (8): 496–504.
- Takahashi M, Cuatrecasas M, Balaguer F, Hur K, Toiyama Y, Castells A, Boland CR, Goel A. 2012. The clinical significance of MiR-148a as a predictive biomarker in patients with advanced colorectal cancer. *PloS One* 7 (10): e46684.
- Takikawa T, Masamune A, Yoshida N, Hamada S, Kogure T, Shimosegawa T. 2017. Exosomes Derived From Pancreatic Stellate Cells: MicroRNA Signature and Effects on Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas* 46 (1): 19-27.
- Tang L, Chen HY, Hao NB, Tang B, Guo H, Yong X, Dong H, Yang SM. 2017. microRNA inhibitors: Natural and artificial sequestration of microRNA. *Cancer Lett* 407: 139-47.
- Tao BB, Liu XQ, Zhang W, Li S, Dong D, Xiao M, Zhong J. 2017. Evidence for the association of chromatin and microRNA regulation in the human genome. *Oncotarget* 8 (41): 70958–966.
- Thayalasekaran S, Liddicoat H, Wood E. 2009. Thrombophlebitis migrans in a man with pancreatic adenocarcinoma: a case report. *Cases J* 2: 6610.
- Tian YW, Shen Q, Jiang QF, Wang YX, Li K, Xue HZ. 2017. Decreased levels of miR-34a and miR-217 act as predictor biomarkers of aggressive progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Minerva Med* 108(2): 108-13.
- Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. 2015. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemporary Oncology* 19 (1A): A68–A77.

- Vasudevan S, Steitz JA. 2007. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128: 1105–18.
- Vester B, Wengel J. 2004. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry* 43 (42): 13233–41.
- Vidigal JA, Ventura A. 2015. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol* 25 (3): 137–47.
- Vila-Navarro E, Vila-Casadesús M, Moreira L, Duran-Sanchon S, Sinha R, Ginés À, Fernández-Esparrach G, Miquel R, Cuatrecasas M, Castells A, Lozano JJ, Gironella M. 2017. MicroRNAs for Detection of Pancreatic Neoplasia: Biomarker Discovery by Next-generation Sequencing and Validation in 2 Independent Cohorts. *Annals of Surgery* 265 (6): 1226–234.
- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. 2011. Pancreatic cancer. *Lancet* 378 (9791): 607–20.
- Vojtechova Z, Zavadil J, Klozar J, Grega M, Tachezy R. 2017. Comparison of the miRNA expression profiles in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tonsillar tumors. *PLoS One* 12 (6): e0179645.
- Voss M, Hammel P, Molas G, Palazzo L, Dancour A, O'Toole D, Terris B, Degott C, Bernades P, Ruszniewski P. 2000. Value of endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration biopsy in the diagnosis of solid pancreatic masses. *Gut* 46 (2): 244–49.
- Vychytilova-Faltejskova P, Kiss I, Klusova S, Hlavsa J, Prochazka V, Kala Z, Mazanec J, Hausnerova J, Kren L, Hermanova M, Lenz J, Karasek P, Vyzula R, Slaby O. 2015. MiR-21, miR-34a, miR-198 and miR-217 as diagnostic and prognostic biomarkers for chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Diagnostic Pathology* 10: 38.
- Wald P, Liu XS, Pettit C, Dillhoff M, Manilchuk A, Schmidt C, Wuthrick E, Chen W, Williams TM. 2017. Prognostic value of microRNA expression levels in pancreatic adenocarcinoma: a review of the literature. *Oncotarget* 8 (42): 73345–61.
- Wang HL, Zhou R, Liu J, Chang Y, Liu S, Wang XB, Huang MF, Zhao Q. 2017. MicroRNA-196b inhibits late apoptosis of pancreatic cancer cells by targeting CADM1. *Scientific Reports* 7 (1): 11467.
- Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzesse JL, Frazier ML, Killary AM, Sen S. 2009. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prevention Research* 2 (9): 807–13.
- Wang J, Mei J, Ren G. 2019. Plant microRNAs: Biogenesis, Homeostasis and Degradation. *Front Plant Sci* 10: 360.
- Wang J, Paris PL, Chen J, Ngo V, Yao H, Frazier ML, Killary AM, Liu CG, Liang H, Mathy C, Bondada S, Kirkwood K, Sen S. 2015. Next generation sequencing of pancreatic cyst fluid microRNAs from low grade-benign and high grade-invasive lesions. *Cancer Lett* 356: 404–9.
- Wang J, Raimondo M, Guha S, Chen J, Diao L, Dong X, Wallace MB, Killary AM, Frazier ML, Woodward TA, Wang J, Sen S. 2014. Circulating microRNAs in Pancreatic Juice as Candidate Biomarkers of Pancreatic Cancer. *J Cancer* 5 (8): 696–705.
- Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. 2012. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS one* 7 (7): e41561.

- Wang P, Zhuang L, Zhang J, Fan J, Luo J, Chen H, Wang K, Liu L, Chen Z, Meng Z. 2013. The serum miR-21 level serves as a predictor for the chemosensitivity of advanced pancreatic cancer and miR-21 expression confers chemoresistance by targeting FasL. *Molecular Oncology* 7 (3): 334–45.
- Wang Y, Huang JW, Calses P, Kemp CJ, Taniguchi T. 2012. MiR-96 downregulates REV1 and RAD51 to promote cellular sensitivity to cisplatin and PARP inhibition. *Cancer Res* 72 (16): 4037–46.
- Wang Z, Yao H, Lin S, Zhu X, Shen Z, Lu G, Poon WS, Xie D, Lin MC, Kung HF. 2013. Transcriptional and epigenetic regulation of human microRNAs. *Cancer Lett* 331 (1): 1–10.
- Wei L, Yao K, Gan S, Suo Z. 2018. Clinical utilization of serum- or plasma-based miRNAs as early detection biomarkers for pancreatic cancer: A meta-analysis up to now. *Medicine* 97 (35): e12132.
- Wei X, Wang W, Wang L, Zhang Y, Zhang X, Chen M, Wang F, Yu J, Ma Y, Sun G. 2016. MicroRNA-21 induces 5-fluorouracil resistance in human pancreatic cancer cells by regulating PTEN and PDCD4. *Cancer medicine* 5 (4): 693–702.
- Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, Arnold MA, Chang DC, Coleman J, Hodgins MB, Sauter PK, Hruban RH, Riall TS, Schulick RD, Choti MA, Lillemoe KD, Yeo CJ. 2006. 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. *J Gastrointest Surg* 10 (9): 1199–210
- Witwer KW. 2012. XenomiRs and miRNA homeostasis in health and disease: evidence that diet and dietary miRNAs directly and indirectly influence circulating miRNA profiles. *RNA Biol* 9 (9): 1147–54.
- Witwer KW. 2015. Circulating MicroRNA Biomarker Studies: Pitfalls and Potential Solutions. *Clinical Chemistry* 61 (1): 56–63.
- Wu L, Qiu W, Sun J. 2018. Down regulation of miR-148a is related to enhanced pancreatic cancer pathogenesis through targeting GLUT1. *Int J Clin Exp Pathol* 11 (10): 4950–6.
- Xia J, Guo X, Yan J, Deng K. 2014. The role of miR-148a in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 140 (9): 1451–6.
- Xu J, Cao Z, Liu W, You L, Zhou L, Wang C, Lou W, Sun B, Miao Y, Liu X, Zhang T, Zhao Y. 2016. Plasma miRNAs Effectively Distinguish Patients With Pancreatic Cancer From Controls: A Multicenter Study. *Ann Surg* 263 (6): 1173–9.
- Xu TP, Zhu CH, Zhang J, Xia R, Wu FL, Han L, Shen H, Liu LX, Shu YQ. 2013 MicroRNA-155 expression has prognostic value in patients with non-small cell lung cancer and digestive system carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev* 14 (12): 7085–90.
- Xu X, Zhang Y, Jasper J, Lykken E, Alexander PB, Markowitz GJ, McDonnell DP, Li Q, Wang X. 2016. MiR-148a functions to suppress metastasis and serves as a prognostic indicator in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 7: 20381–94.
- Xu YF, Hannafon BN, Zhao YD, Postier RG, Ding WQ. 2017. Plasma exosome miR-196a and miR-1246 are potential indicators of localized pancreatic cancer. *Oncotarget* 8 (44): 77028–40.
- Xue Y, Abou Tayoun AN, Abo KM, Pipas JM, Gordon SR, Gardner TB, Barth RJ Jr, Suriawinata AA, Tsongalis GJ. 2013. MicroRNAs as diagnostic markers for pancreatic ductal

adenocarcinoma and its precursor, pancreatic intraepithelial neoplasm. *Cancer Genet* 206 (6): 217–21.

Yamao K, Takenaka M, Nakai A, Omoto S, Kamata K, Minaga K, Miyata T, Imai H, Sakurai T, Watanabe T, Nishida N, Matsumoto I, Takeyama Y, Chikugo T, Kudo M. 2017 Detection of High-Grade Pancreatic Intraepithelial Neoplasia without Morphological Changes of the Main Pancreatic Duct over a Long Period: Importance for Close Follow-Up for Confirmation. *Oncology* 93 Suppl 1: 81-6.

Yamao K, Yanagisawa A, Takahashi K, Kimura W, Doi R, Fukushima N, Ohike N, Shimizu M, Hatori T, Nobukawa B, Hifumi M, Kobayashi Y, Tobita K, Tanno S, Sugiyama M, Miyasaka Y, Nakagohri T, Yamaguchi T, Hanada K, Abe H, Tada M, Fujita N, Tanaka M. 2011. Clinicopathological features and prognosis of mucinous cystic neoplasm with ovarian-type stroma: a multi-institutional study of the Japan pancreas society. *Pancreas* 40 (1): 67-71.

Yan Y, Fu G, Ming L. 2018. Role of exosomes in pancreatic cancer. *Oncol Lett.* 15 (5): 7479–88.

Yang JY, Sun YW, Liu DJ, Zhang JF, Li J, Hua R. 2014. MicroRNAs in stool samples as potential screening biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma cancer. *Am J Cancer Res* 4 (6): 663–73.

Yang Y, Huang Q, Luo C, Wen Y, Liu R, Sun H, Tang L. 2019. MicroRNAs in acute pancreatitis: From pathogenesis to novel diagnosis and therapy. *J Cell Physiol* 235: 1948–61.

Yang Z, Zhao N, Cui J, Wu H, Xiong J, Peng T. 2020. Exosomes derived from cancer stem cells of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells enhance drug resistance by delivering miR-210. *Cell Oncol* 43 (1): 123-36.

Yau TO, Tang CM, Harriss EK, Dickins B, Polytarchou C. 2019. Faecal microRNAs as a non-invasive tool in the diagnosis of colonic adenomas and colorectal cancer: A meta-analysis. *Scientific Reports* 9 (1): 9491.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17 (24): 3011–16.

You L, Wang J, Zhang F, Zhang J, Tao H, Zheng X, Hu Y. 2019. Potential four-miRNA signature associated with T stage and prognosis of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma identified by co-expression analysis. *Molecular medicine reports* 19: 441–51.

Yu J, Li A, Hong SM, Hruban RH, Goggins M. 2012. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias. *Clin Cancer Res* 18 (4): 981–92.

Yu Q, Xu C, Yuan W, Wang C, Zhao P, Chen L, Ma J. 2017. Evaluation of Plasma MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Pancreatic Adenocarcinoma: miR-196a and miR-210 Could Be Negative and Positive Prognostic Markers, Respectively. *BioMed Research International* 6495867.

Yu S, Lu Z, Liu C, Meng Y, Ma Y, Zhao W, Liu J, Yu J, Chen J. 2010. miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer. *Cancer Res* 70 (14): 6015-25.

Yu SN, Ma YH, Zhao WG, Jin XL, Yang HY, Liu PP, Chen J. 2016. KRAS-related noncoding RNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Chronic Diseases And Translational Medicine* 2 (4): 215–22.

- Zhang D, Xie L, Jin Y. 2015. In situ Detection of MicroRNAs: The Art of MicroRNA Research in Human Diseases. *Journal Of Cytology And Histology Suppl* 3 (1): 013.
- Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S. 2015. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting and function. *Genomics, Proteomics And Bioinformatics* 13 (1): 17–24.
- Zhang L, Yao J, Li W, Zhang C. 2018. Micro-RNA-21 Regulates Cancer-Associated Fibroblast-Mediated Drug Resistance in Pancreatic Cancer. *Oncol Res* 26 (6): 827-35.
- Zhang R, Li M, Zang W, Chen X, Wang Y, Li P, Du Y, Zhao G, Li L. 2014. MiR-148a regulates the growth and apoptosis in pancreatic cancer by targeting CCKBR and Bcl-2. *Tumour Biol* 35: 837–44.
- Zhang Y, Guan DH, Bi RX, Xie J, Yang CH, Jiang YH. 2017. Prognostic value of microRNAs in gastric cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 8 (33): 55489–510.
- Zhang Y, Li M, Wang H, Fisher WE, Lin PH, Yao Q, Chen C. 2009. Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J Surg* 33 (4): 698-709.
- Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. 2019. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci* 9: 19.
- Zhang L, Liao Y, Tang L. 2019 MicroRNA-34 family: a potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 38: 53.
- Zhao G, Jiang T, Liu Y, Huai G, Lan C, Li G, Jia G, Wang K, Yang M. 2018. Droplet digital PCR-based circulating microRNA detection serve as a promising diagnostic method for gastric cancer. *BMC Cancer* 18 (1): 676.
- Zhao G, Zhang JG, Liu Y, Qin Q, Wang B, Tian K, Liu L, Li X, Niu Y, Deng SC, Wang CY. 2013. miR-148b functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting AMPK $\alpha$ 1. *Mol Cancer Ther* 12 (1): 83-93.
- Zhao Q, Chen S, Zhu Z, Yu L, Ren Y, Jiang M, Wen, J, Li B. 2018. miR-21 promotes EGF-induced pancreatic cancer cell proliferation by targeting Spry2. *Cell death and disease* 9 (12): 1157.
- Zhao WG, Yu SN, Lu ZH, Ma YH, Gu YM, Chen J. 2010. The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS. *Carcinogenesis* 31 (10): 1726–33.
- Zhou K., Liu M., Cao Y. 2017. New Insight into microRNA Functions in Cancer: Oncogene-microRNA-Tumor Suppressor Gene Network. *Frontiers In Molecular Biosciences* 4: 46.
- Zhou X, Huang Z, Xu L, Zhu M, Zhang L, Zhang H, Wang X, Li H, Zhu W, Shu Y, Liu P. 2016. A panel of 13-miRNA signature as a potential biomarker for predicting survival in pancreatic cancer. *Oncotarget* 7: 69616-24.
- Zhu W, Xu B. 2014. MicroRNA-21 identified as predictor of cancer outcome: a meta-analysis. *PLoS One* 9 (8): e103373.
- Zhu ZM, Xu YF, Su QJ, Du JD, Tan XL, Tu YL, Tan JW, Jiao HB. 2014. Prognostic significance of microRNA-141 expression and its tumor suppressor function in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cell Biochem* 388: 39–49.

## SEZNAM PUBLIKACÍ

### Publikace vztahující se k disertační práci

Popov A, **Szabo A**, Mandys V. 2015. Small nucleolar RNA U91 is a new internal control for accurate microRNAs quantification in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 15: 774. (IF 3.265).

**Szabo A**, Gurlich R, Liberko M, Soumarova R, Vernerova Z, Mandys V, Popov A. 2020. Expression of selected MicroRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma: is there relation to tumor morphology, progression and patient's outcome? *Neoplasma*. (IF 1.771). **Práce byla přijata k publikaci.**

### Další publikace

Benešová M, Trejbalová K, Kučerová D, Vernerová Z, Hron T, **Szabó A**, Amouroux R, Klézl P, Hajkova P, Hejnar J. 2017. Overexpression of TET dioxygenases in seminomas associates with low levels of DNA methylation and hydroxymethylation. *Mol Carcinog* 56 (8): 1837-50. (IF 3.851).

Hoffmanova I, Gurlich R, Janik V, **Szabo A**, Vernerova Z. 2016. Dilemmas in autoimmune pancreatitis. Surgical resection or not? *Bratisl Lek Listy* 117 (8): 463-7. (IF 0.64).

**Szabó A**, Richter I, Frydrychová D, Saláková M, Jirásek T. 2017. Lymph node metastasis of Merkel cell carcinoma without known cutaneous primary - case report. *Cs Patol* 53 (3): 135-8.

## 1. Příloha – 1. studie

Popov et al. *BMC Cancer* (2015) 15:774  
DOI 10.1186/s12885-015-1785-9



## RESEARCH ARTICLE

## Open Access



# Small nucleolar RNA U91 is a new internal control for accurate microRNAs quantification in pancreatic cancer

Alexey Popov\*, Arpad Szabo and Václav Mandys

## Abstract

**Background:** RT-qPCR quantification of miRNAs expression may play an essential role in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) diagnostics. RT-qPCR-based experiments require endogenous controls for the result normalization and reliability. However, expression instability of reference genes in tumors may introduce bias when determining miRNA levels.

**Methods:** We investigated expression of 6 miRNAs, isolated from FFPE samples of pancreatic adenocarcinomas. Four internal controls were utilized for RT-qPCR result normalization: artificial miR-39 from *C. elegans*, U6 snRNA, miR-16 and snoRNA U91.

**Results:** We found miR-21, miR-155 or miR-217 expression values in tumors may differ up to several times, depending on selected internal controls. Moreover, different internal controls can produce controversial results for miR-96, miR-148a or miR-196a quantification. Also, expression of our endogenous controls varied significantly in tumors. U6 demonstrated variation from  $-1.03$  to  $8.12$ -fold, miR-16 from  $-2.94$  up to  $7.38$ -fold and the U91 from  $-3.05$  to  $4.36$ -fold respectively. On the other hand, the most stable gene, determined by NormFinder algorithm, was U91. Each miRNA normalized relatively to the spike or U91, demonstrated similar expression values. Thus, statistically significant and insignificant differences between tumors and normal tissues for miRNAs were equal for the spike and the U91. Also, the differences between the spike and U91 were statistically insignificant for all of miRs except miR-217. Among three endogenous controls, U91 had the lowest average expression values and standard deviation in cancer tissues.

**Conclusions:** We recommend U91 as a new normalizer for miRNA quantification in PDACs.

**Keywords:** miRNA, Pancreatic cancer, Internal control, RT-qPCR (reverse transcription quantitative PCR), Pancreatic ductal adenocarcinoma

## Background

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common and the most aggressive primary pancreatic neoplasm. The majority of patients are diagnosed by the time the tumor had already invaded peripancreatic structures or has metastasized [1]. Therefore, there is a need for biomarkers enabling early detection of asymptomatic PDACs. miRNAs are stable in tissues and blood plasma [2]; consequently they are ideal molecules to be

utilized as biomarkers. miRNAs are involved in oncogenesis, apoptosis and cell growth; thereby functioning as tumor suppressors or oncogenes [3–6]. A large number of miRNAs are proven to be overexpressed in pancreatic cancer [7–11]. On the other hand, the expression of miRNA-coding genes, which act as tumor suppressors, could be inhibited in cancer cells [12–16]. Alterations in the miRNAs expression profile of cancer in comparison with normal tissues could be used in pancreatic cancer diagnostics. The high sensitivity of reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) has made it a popular method in the measurement of tumor miRNA expression. RT-qPCR-based experiments require endogenous controls

\* Correspondence: alexey.popov@lf3.cuni.cz  
Department of Pathology, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague and University Hospital Kralovske Vinohrady, Srobarova 50, 100 00, Prague 10, Czech Republic



© 2015 Popov et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

for result normalization, reliability and reproducibility. The endogenous control helps to correct differences between sample quality and variations during RNA extraction or reverse transcription procedures. Housekeeping genes, ribosomal, small nuclear or nucleolar RNAs can play the role of such internal controls. However, according to experimental data, expression levels of these genes may differ in neoplastic and normal tissues [17–19]. These variations may introduce bias to experiment results.

In this study we compared the expression of selected miRNAs in samples from pancreatic cancer and normal pancreatic parenchyma and evaluated the influence of different internal controls on the expression data alterations.

## Methods

### Patients and tissue specimens

FFPE blocks of pancreatic ductal adenocarcinomas were retrieved from the archive of the Department of Pathology of the 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine of the Charles University and University Hospital Kralovske Vinohrady in Prague. The samples were collected from 24 patients, who had undergone pancreatoduodenectomy, distal pancreatectomy or total pancreatectomy between 2007 and 2012. Participants signed a written informed consent before the study. The study was performed according to the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Third Faculty of Medicine (Charles University in Prague, Czech Republic). The resolution 1006/2012 was signed by Dr. Marek Vacha, Ph.D, Head of the Ethics Committee.

In the selected FFPE blocks the tumor occupied the majority of the slide. As negative control, FFPE blocks containing normal pancreatic tissue of the respective patients were selected.

### Clinicopathological features

The age of patients with resected pancreatic adenocarcinoma ranged from 36 to 83 years, with a median of 65.5 years. In total, 11 patients were women and 13 patients were men. Genetic syndromes were described in none of the patients. Grossly, 18 tumors were located in the head of the pancreas, 1 in the body of the pancreas and 5 in the tail of the pancreas.

The tumors showed in all of the selected cases the features of conventional ductal pancreatic adenocarcinoma. According to the guidelines of the WHO Classification of Tumors of the Gastrointestinal Tract, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> edition, 1 tumor was well differentiated, 14 tumors were moderately differentiated and 9 tumors were poorly differentiated. In one patient, a synchronous mucinous cystic neoplasm (MCN) was identified in the cauda of the pancreas. In another patient the tumor originated from an MCN. In 3 patients the resected tumor was

described as pT1, in 5 patients pT2, in 15 patients pT3 and in one patient pT4. Additionally, lymph node metastases were confirmed in the resected specimens of 18 patients.

### RNA isolation and reverse transcription

One to three 6 µm thick unstained paraffin embedded tissue sections were procured for RNA extraction, using the miRNeasy FFPE kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. Two microliters of isolated RNA were used for RNA quantity and purity analysis. Optical density at 260 and 280 nm was measured with a multi-detection microplate reader Synergy HT (BioTek), including Take3 micro-volume plate. RNA integrity was assessed with denaturing agarose gel electrophoresis and GeneTools 3.08 software (SynGene).

A mix of 10 stem-loop primers was used for miRNA reverse transcription. Stem-loop primers were selected for the analysis, because their structure reduces annealing of the primer to pre- and pri-miRNAs, therefore increasing the specificity of the assay. Primers were designed with miRNA primer designer software, kindly provided by Dr. Fuliang Xie, East Carolina University. The stem-loop primer sequences for the internal controls, including the alien spike (miR-39 from *C. elegans*), and the examined pancreatic miRNAs are listed in Tables 1 and 2. The spike RNA was added to the reaction mix directly before the reverse transcription. Alien spike can't be used as a normalizer for differences between samples during the RNA isolation, because tissue sections may contain different amounts of tissue. Therefore, the addition of spike before RNA isolation may introduce bias, because a ratio between amount of the RNA and the alien spike concentration may vary from sample to sample.

Reverse transcription was carried out, using RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific), in a 50 µl reaction mixture, containing the following reagents: 1 µg of DNA-free RNA, reaction buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25 °C), 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub> and 50 mM DTT]; 1 mM of dATP, dTTP, dCTP, dGTP; 20 IU rRNasin ribonuclease inhibitor; 100 IU of moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MuLV RT) and the primer mix, including 20 pmol of each stem-loop

**Table 1** Stem-loop primers for the internal controls

Control name	Stem-loop primer sequence
mir-39 <i>C. elegans</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGCACT GGATACGACTATTAC
U6	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGCACT GGATACGACAAAAATATGG
U91 snoRNA	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGCACT GGATACGACCCGCCT
miR-16	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGCACT GGATACGACCCGCAA



**Table 2** Stem-loop primers for the miRNAs

miRNA name	Stem-loop primer sequence
miR-21	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGAT ACGACTCAACA
miR-96	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGAT ACGACAGCAAAAATGTG
miR-148a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGAT ACGACAGTCGGAG
miR-155	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGAT ACGACACCCCTATCACG
miR-196a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGAT ACGACCCCAACAACATG
miR-217	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGAT ACGACTCCAATCAGTTC

primer. Artificial spike RNA (miR-39 from *C. elegans*,  $5 \times 10^8$  copies) was also added to the reaction as internal control. After initial denaturation (5 min at 70 °C, then cooling samples on ice), the reactions were incubated at 25 °C (10 min), and then at 42 °C for 1 h. To stop the reaction, the mixture was heated at 70 °C for 10 min.

#### Real-time qPCR

cDNA samples were amplified in duplicates, using the Applied Biosystems 7500 Fast real-time PCR system and Hot FirePol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne). The reaction mix included 10 pmol of each primer (miRNA specific and the universal (Table 3)) and 2 µl of cDNA.

Amplification of the cDNAs was performed at the following thermal conditions: denaturation at 94 °C for 15 min, followed by 40 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 15 s, annealing at 48 °C for 60 s and DNA synthesis at 72 °C for 40 s. Reaction product specificity was controlled with their respective melting curves.

#### Statistical analysis

The expression of miRNAs in neoplastic and normal tissues was compared utilizing a paired two-tailed Student's

**Table 3** Real-time qPCR primers

Primer name	Primer sequence
Universal primer	ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
mir-39 <i>C. elegans</i>	GCGGCGGAGCTGATTTCTCTTG
U6	GCGGCGGCGCAAGGATGACACG
U91 snoRNA	GCGGCGGTGGCCGATGATGACG
miR-16	GCGGCGGTAGCAGCACGTAAT
miR-21	GCGGCGGTAGCTTATCAGACTG
miR-96	GCGGCGGTTGGCACTAGCAC
miR-148a	GCGGCGGAAAGTTCTGAGACTCC
miR-155	GCGGCGGTTAATGCTAATCGTG
miR-196a	GCGGCGGTAGGTAGTTTCATGTTG
miR-217	GCGGCGGTACTGCATCAGGAAC

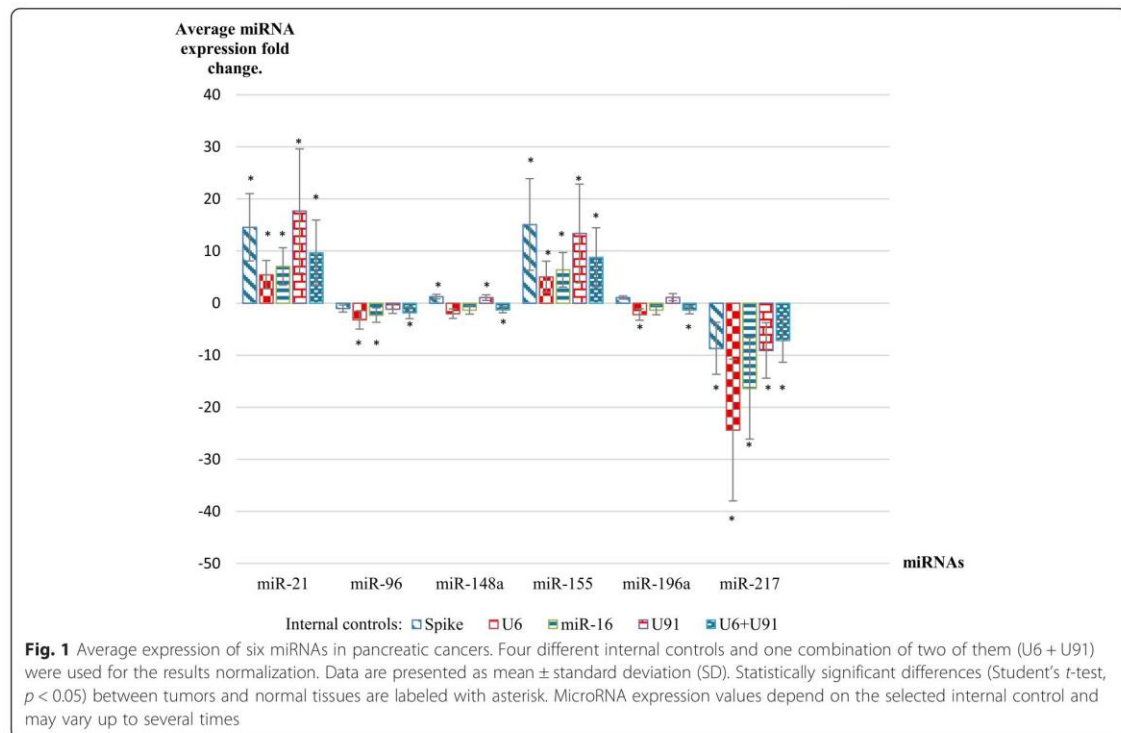
*t* test as well as a one-way ANOVA analysis. *P*-values below 0.05 were regarded as statistically significant. RT-qPCR data (threshold cycles) were linearized, and the NormFinder algorithm was used to calculate the most stable gene among the internal controls.

## Results

### Evaluation of miRNA expression levels in PDAC samples

We investigated the expression of 6 miRNAs isolated from FFPE samples of pancreatic adenocarcinomas from 24 patients. The following microRNAs were selected: miR-21, which promotes cell proliferation and may accelerate tumorigenesis [8, 9, 20]; miR-155, which interacts with TP53 INP1 and transforming growth factor β (TGF-β) [11, 21, 22]; miR-96 and miR-217, which may act as a tumor suppressors, inhibiting the KRAS-signaling pathway [13, 14] also miR-148a and miR-196a, which are frequently included in experimental panels for pancreatic carcinoma diagnosis [23–29].

Four internal controls were utilized for qRT-PCR result normalization: an alien spike (artificial miR-39 from *C. elegans*) and three endogenous controls – U6 snRNA, miR-16 and snoRNA U91. miRNA expression values were normalized relative to each of these controls, and significant variations for the same miRNAs were found (Fig. 1, Table 4). In comparison with normal pancreatic tissue, miR-21 was significantly overexpressed, up to 14.56-fold ( $p < 0.01$ ) in the case of the alien spike. However, for other internal controls, fold change values were shifted to 5.44 for U6 ( $p < 0.01$ ), 7.03 for miR-16 ( $p < 0.01$ ) and 17.71 for U91 ( $p < 0.01$ ), respectively (Table 4, Fig. 1). The miR-155 also demonstrated increased expression levels with great variations between internal controls: 15.1-fold for the spike ( $p < 0.01$ ); 5.05-fold for U6 ( $p < 0.01$ ); 6.39-fold for miR-16 ( $p < 0.01$ ) and 13.36-fold for U91 ( $p < 0.01$ ). miRNA miR-96 in pancreatic carcinoma did not show significant differences in comparison with normal tissues, when normalizing to the alien spike (−1.04-fold,  $p > 0.05$ ), as well as to U91 (−1.17-fold,  $p > 0.05$ ). But, this miRNA was significantly down-regulated, when the expression was measured relative to U6 (−3.22-fold,  $p < 0.01$ ) or miR-16 (−2.32-fold,  $p < 0.01$ ). Also, no significant differences were found for miR-148a, normalized to spike (1.25 fold,  $p > 0.05$ ) and U91 (1.06,  $p > 0.05$ ). But, this miRNA was significantly inhibited for U6 (−1.33 fold,  $p < 0.01$ ) and miR-16 (−2.04 fold,  $p < 0.01$ ). Expression of miR-196a was slightly up-regulated relatively the alien spike (1.09-fold) and U91 (1.13-fold), without the results being statistically significant ( $p > 0.05$ ). On the other hand, miR-196a was significantly down-regulated for U6 (−2.22-fold,  $p < 0.01$ ), as well as not statistically significant for the miR-16 (−1.35,  $p > 0.05$ ). The expression of miR-217 was significantly lower in all PDACs than in normal pancreatic



tissues for all the examined internal controls (*p* < 0.01) (Table 4, Fig. 1).

NormFinder algorithm was used to calculate the most stable pairing of internal controls. According to our results, the best combination was U6 and U91 (stability value = 0036; Table 5) for the miRNAs expression evaluation. Normalized to this most stable pair, miRNAs miR-21 and miR-155 demonstrated significant upregulation (9.67-fold and 8.79-fold, *p* < 0.01). Activity of miR-96, miR-196a and miR-217 was significantly inhibited (−1.85-

fold, −1.34-fold and −7.19-fold, *p* < 0.01). The miR-148a expression also was down-regulated, but the decrease was not statistically significant (−1.27-fold, *p* > 0.05).

#### Determination of the best normalizers for the miRNAs expression measuring

To find the best normalizer, we compared miRNA expression levels, normalized relatively the artificial spike and other endogenous controls, including the combination of U6 + U91, with one-way ANOVA analysis for

**Table 4** Average miRNAs fold change values in pancreatic cancers in comparison with normal tissues

miRNAs	Internal controls				
	Spike	U6	miR-16	U91	U6 + U91
miR-21	14.56 ± 6.468; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	5.44 ± 2.73; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	7.03 ± 3.614; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	17.71 ± 11.922; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	9.67 ± 6.287; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>
miR-96	−1.04 ± 0.668; <i>p</i> > 0.05	−3.22 ± 1.766; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	−2.32 ± 1.376; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	−1.17 ± 0.831; <i>p</i> > 0.05	−1.85 ± 1.134; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>
miR-148a	1.25 ± 0.429; <i>p</i> > 0.05	−2.04 ± 0.92; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	−1.33 ± 0.782; <b><i>p</i> &lt; 0.05</b>	1.06 ± 0.549; <i>p</i> > 0.05	−1.27 ± 0.594; <i>p</i> > 0.05
miR-155	15.1 ± 8.786; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	5.05 ± 2.992; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	6.39 ± 3.312; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	13.36 ± 9.477; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	8.79 ± 5.675; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>
miR-196a	1.09 ± 0.306; <i>p</i> > 0.05	−2.22 ± 1.09; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	−1.35 ± 0.905; <i>p</i> > 0.05	1.13 ± 0.676; <i>p</i> > 0.05	−1.34 ± 0.726; <b><i>p</i> &lt; 0.05</b>
miR-217	−8.69 ± 4.99; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	−24.39 ± 13.616; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	−16.39 ± 9.71; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	−9.09 ± 5.323; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>	−7.19 ± 4.161; <b><i>p</i> &lt; 0.01</b>

MicroRNAs expression was measured relative to four different internal controls and combination of two of them (U6 + U91). Negative fold change values indicate downregulation of the miRNAs in cancer samples. Data are presented as means ± standard deviation (SD). *p* < 0.05 is considered as statistically significant. *P* values of the Student's *t*-test for the significant differences are shown in bold

**Table 5** Stability evaluation of all internal controls using NormFinder algorithm

Gene name	Stability value	Best gene: U91
Spike	0.085	Stability value: 0.056
U6	0.056	
miR-16	0.078	Best combination of two genes: U6 and U91
U91	0.056	Stability value for best combination of two genes: 0.036
Intragroup variation		
Group identifier	Normal	PDACs
Spike	0.061	0.065
U6	0.013	0.026
miR-16	0.023	0.086
U91	0.017	0.053
Intergroup variation		
Group identifier	Normal	PDACs
Spike	0.054	-0.054
U6	-0.026	0.026
miR-16	-0.043	0.043
U91	0.016	-0.016

each individual miRNA. The null hypothesis ( $H_0$ ) was, that average fold change values, calculated for the each individual miRNA, are the same for all the internal controls. However, the differences were significant in the case of miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155 and miR-196a ( $p < 0.01$ ). For miR-217, the difference was not statistically significant ( $p > 0.05$ ). Consequently, we compared miRNA expression normalized to the spike, with their normalization to the other individual examined endogenous controls, using a paired two-tailed Student's *t*-test. Differences of miRNA expression, normalized to U6 or the combination of U6 and U91, in comparison with the alien spike, were statistically significant for all

miRNAs ( $p < 0.01$ ; Table 6). In the case of miR-16, the difference was not significant for miR-217 only ( $p > 0.05$ ; Table 6). On the other hand, the difference between spike and the U91 was statistically insignificant for all miRNAs ( $p > 0.05$ ; Table 6), except for miR-217 ( $p < 0.05$ ; Table 6). Thus, one endogenous control was found which demonstrated a behavior very similar to the alien spike.

We investigated the causes of miRNA expression variations and their dependence on certain normalizers, and thus attempted to find the most suitable normalizer. The  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method was used for the miRNAs expression quantification, where CT is cycle threshold and  $\Delta\Delta CT = ((CT_{miRNA})_{tumor} - (CT_{control})_{tumor}) - ((CT_{miRNA})_{normal} - (CT_{control})_{normal})$ . For accurate miRNA quantification, in theory, CT values for the internal control gene should be very close for tumors and normal tissues, ideally  $(CT_{control})_{tumor} = (CT_{control})_{normal}$ . However, this  $CT_{control}$  value may be shifted up to several cycles in tumors (for example, up to  $\pm n$  cycles), if the expression of endogenous control differs in tumor and normal tissue. This difference may introduce a bias to the miRNA fold change calculations:

$$\Delta\Delta CT = ((CT_{miRNA})_{tumor} - ((CT_{control})_{normal} \pm n)) - ((CT_{miRNA})_{normal} - (CT_{control})_{normal})$$

While analyzing the amplification curves of the different internal controls, almost in all tumor samples a cycle threshold (CT) shift of  $n = 5$  or even 6 cycles upwards in comparison with the normal tissue was apparent (Table 7). For example, CT values of the spike were very similar for PDAC and the normal tissues, they differed less than  $n = 0.8$  cycle (Table 7). Nevertheless, for other normalizers these values varied from  $n = -6.20$  up to  $n = 5.8$  cycles (Table 7). We measured expression levels of our endogenous controls, using the alien spike for normalization. As expected, U6 expression in tumors varied from -1.03 to 8.12-fold, miR-16 showed variations from -2.94 up to 7.38-fold in different tumors, and the U91 from -3.05 to 4.36-fold

**Table 6** The difference between normalizers

miRNAs	Internal controls			
	U6	miR-16	U91	U6 + U91
miR-21	2.97E-06; <b><math>p &lt; 0.001</math></b>	0.003404; <b><math>p &lt; 0.01</math></b>	0.7979; $p > 0.05$	0.000789; <b><math>p &lt; 0.01</math></b>
miR-96	0.003078; <b><math>p &lt; 0.01</math></b>	0.02723; <b><math>p &lt; 0.05</math></b>	0.639203; $p > 0.05$	0.038631; <b><math>p &lt; 0.05</math></b>
miR-148a	4.66E-06; <b><math>p &lt; 0.001</math></b>	0.007849; <b><math>p &lt; 0.01</math></b>	0.3078; $p > 0.05$	0.000586; <b><math>p &lt; 0.01</math></b>
miR-155	6.13E-05; <b><math>p &lt; 0.01</math></b>	0.000873; <b><math>p &lt; 0.01</math></b>	0.534202; $p > 0.05$	0.001831; <b><math>p &lt; 0.01</math></b>
miR-196a	7.93E-07; <b><math>p &lt; 0.001</math></b>	0.042034; <b><math>p &lt; 0.05</math></b>	0.862491; $p > 0.05$	0.000117; <b><math>p &lt; 0.01</math></b>
miR-217	0.003951; <b><math>p &lt; 0.01</math></b>	0.065696; $p > 0.05$	0.024668; <b><math>p &lt; 0.05</math></b>	0.008373; <b><math>p &lt; 0.05</math></b>

MicroRNA expression levels were normalized relative to the alien spike, in comparison with the normalizations relative to other internal controls. Data are presented as *P*-values of the paired Student's *t*-test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant. *P*-values for the statistically significant differences are shown in bold

**Table 7** Cycle threshold values (CT) for endogenous controls are different in tumors and normal tissues

CT values shift (n) between tumors and normal tissues	Internal controls			
	Spike	U6	miR-16	U91
Min	0,61	5,02	5,80	1,90
Max	-0,70	-5,79	-6,20	-2,06
Average ± SD	-0,13 ± 0,251	-1,23 ± 1,127	-0,78 ± 1,315	-0,36 ± 0,833

These values are often shifted ± n cycles in tumors. It means that expression of endogenous control genes can vary in tumors

respectively. The difference in expression was statistically significant for all endogenous controls ( $p < 0.01$ ; Table 8). Also, U6 was overexpressed in 22 tumors from 24, miR-16 in 18 tumors and U91 in 14 correspondently. miR-16 was downregulated in 6 tumors and U91 in 5 tumor samples (Table 9). Thus, all selected endogenous controls demonstrated expression instability in tumor samples.

To identify the most stable internal control, the NormFinder algorithm was used. RT-qPCR expression data for all internal controls were linearized and compared in two groups: tumors and normal pancreatic tissues (Table 5). The most stable gene was U91 (stability value = 0.056), but stability values for all internal controls were close (0.085; 0.056 and 0.078 for the spike, U6 and miR-16, respectively; Table 5). U6 had the same stability value as U91 (0.056), but it demonstrated higher levels of intergroup variation (Table 5). Surprisingly, the most unstable control was the artificial spike (0.085; Table 5). The NormFinder can calculate variations between two groups, including all normal or cancer samples, but it is unable to evaluate the differences between normal and cancer tissues among individual patients. This may be the reason for the "instability" of the alien spike. The most stable pair of internal controls was a combinations of two genes, U6 and U91 (stability value = 0.036; Table 5).

## Discussion

### MicroRNA expression values depend on a selected internal control

Pancreatic ductal adenocarcinoma is one of the most frequently occurring solid cancers and it carries an

**Table 9** Expression of the endogenous controls is unstable in all tumor samples

Expression of the endogenous controls in tumors	Endogenous controls		
	U6	miR-16	U91
Upregulated	22	18	14
Downregulated	0	6	5
Close to normal tissues	2	0	6
Total number of patients	24		

extremely poor prognosis. As such, an extensive search for biomarkers of early disease is undergoing, miRNAs may have the ideal characteristics to fulfil this role. Due to their stability and resistance against RNase degradation, they are viable in a wide range of samples. Viable miRNAs for PDAC diagnosis may be isolated from frozen and paraffin embedded tissue samples, stool, blood plasma, or pancreatic juice, [24, 28, 30, 31].

For our analysis we have selected miRNAs, frequently described to be dysregulated in various types of PDACs samples. Studies mapping microRNA expression using microarrays have proven considerable heterogeneity in pancreatic carcinomas. Zhang et al. have demonstrated relative expression values miRNAs spanning 6-logs (from 0.01–10,000) among individual cases [27]. Among tumor samples we determined up to 45-fold variability in both miR-21 and miR-155 levels. During our brief review of literature we have noticed that the mean values of miRNA-levels in tumors varied among studies. There are many factors including differences in reagents/materials for miRNAs quantification protocols and data-processing algorithms, which can contribute to the variation. One of these factors is a variety of controls, which were used for normalization. Thus, the differences in the mean expression of miRNAs may be at least partially explained by the choice of controls for normalization.

For example, when normalizing with snoRNA U6, Bloomston et al. measured a median 2.2-fold increase in tumor miR-21 levels [24]. Zhang et al., using the same internal control, found that expression of miR-21 was up-regulated up to 6888-fold in several tumors [27]. Hong et al. reported about up to 550-fold increase in PDACs, normalizing relative to U6 [31]. When using

**Table 8** Expression values of candidate endogenous control genes are highly variable in PDACs in comparison with normal tissues

Fold change values in PDACs, measured relative to the spike	Genes		
	U6	miR-16	U91
Min	-1.03	-2.94	-3.05
Max	8.12	7.38	4.36
Average ± SD	3.13 ± 1.331; $p < 0.01$	2.69 ± 1.540; $p < 0.01$	1.61 ± 0.730; $p < 0.01$

P values of the Student's t-test, when  $p < 0.05$ , were considered statistically significant

both U6 and 5S as endogenous controls, du Rieu et al. detected a 20.1-fold tumor miR-21 up-regulation [8]. In our study, when normalizing with U6, a mean 5.5-fold increase in miR-21 in tumors was present. However, when normalizing to miR-16 a 7.03-fold increase was present ( $p < 0.01$ , Table 4). Wang et al. detected in plasma samples with miR-16 only a mean 2.42-fold up-regulation [30]. On the other hand, when normalizing to the artificial spike or with U91 we detected a mean 14.56-fold and 17.71-fold increase ( $p < 0.01$ , Table 4).

The data about miR-96 expression in PDAC are controversial. Several groups of authors reported about miR-96 expression fold increase in experiments with microarray [24, 32]. For example, Bloomston et al. measured an average 1.77-fold increase, when determining miR-96 levels in PDACs [24]. Kent et al. also demonstrated 2.7-fold up-regulation of miR-96 in pancreatic cancer cell lines [32]. On the other hand, miR-96 has been shown to be frequently down-regulated in experiments, utilizing Northern blot or RT-qPCR [13, 15, 25, 31, 33]. Szafranzka et al. determined in their study a -4.35-fold decrease in tumor miR-96 expression, when normalizing to miR-24 [25]. Hong et al. as well as Feng et al. showed that miR-96, normalized to U6, was downregulated in PDAC samples up to -8-fold [31, 33]. With U6, miR-16 and combination of U6 + U91 respectively, we demonstrated a statistically significant mean -3.22-fold, -2.32-fold and -1.85-fold decrease in tumor tissue ( $p < 0.01$ , Table 4). However, expression analysis with the artificial spike and U91 alone yielded a statistically insignificant alteration in miR-96 expression in tumors in comparison with normal tissues ( $p > 0.05$ , Table 4).

miRNA miR-148a expression is described to be down-regulated in PDAC due to promoter hypermethylation, which represents an early event in pancreatic carcinogenesis [15]. Bloomston et al. as well as Jamieson et al. measured an average -5.5-fold and -7.14-fold decrease respectively, when determining miR-148 expression with a microarray [24, 29]. In experiments, utilizing RT-qPCR, Szafranzka et al. demonstrated -6.15-fold decrease of miR-148a levels, with miR-24 as normalizer [25]. However, Ma et al. and Zhang et al., normalizing to U6, determined a respective -2.86-fold and -2.5-fold downregulation in PDAC samples [34, 35]. Hanoun et al. also reported about miR-148a down-regulation, using U6 like the endogenous control [15]. In our study, tumor miR-148a levels were -2.04-fold and -1.33-fold decreased with U6 and miR-16 as a normalizers, respectively ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , Table 4). On the other hand, analysis of miR-148a expression, normalized to the alien spike, U91 and a combination of U6 and U91 did not determine statically significant differences in expression between cancerous and non-cancerous tissues ( $p > 0.05$ , Table 4).

The miR-155 is an onco-miR, overexpressed in early pancreatic adenocarcinoma precursors and invasive PDAC [11]. The miR-155 expression in PDACs and pancreatic cancer cell lines, measured by microarray, ranged from 1.8 to 2.9-fold in different studies [24, 28, 29, 36, 37]. On the other hand, Habbe et al. found a mean 11.6-fold increase in intraductal papillary mucinous neoplasms, which was measured by RT-qPCR relative to U6 [11]. Zhang et al. also used U6 like a normalizer in their study. They reported about up to 52-fold increase in individual cases [27]. In our pancreatic carcinomas a mean 5.05-fold increase was present, when normalizing to U6 ( $p < 0.01$ , Table 4). However, Ma et al. measured only a 2.11-fold increase with the same endogenous control [34]. Wang et al. determined a 3.74-fold increase in serum miR-155 levels in cancer, when normalizing with miR-16 [30]. Our PDAC samples showed, on the other hand, a mean 6.39-fold increase with miR-16 as internal control ( $p < 0.01$ , Table 4). However, the expression levels were several times higher, measured relative to the alien spike or U91 - 15.1 and 13.36-fold respectively ( $p < 0.01$ , Table 4).

The miR-196a is an onco-miR reported to be frequently dysregulated in PDAC [27, 30]. Zhang et al. measured, when normalizing to U6, 0.35-1557-fold variations in tumor miR-196 expression [27]. In our tumors we determined a mean -2.2-fold decrease, when normalizing to U6 ( $p < 0.01$ , Table 7). Wang et al. demonstrated 16.05-fold increase in plasma samples with miR-16 as the endogenous control [30]. On the other hand, for miR-16, as well as for the alien spike or U91 we did not find significant differences in miR-196a expression between cancer and normal tissues ( $p > 0.05$ , Table 4).

The miR-217 inhibits in vitro tumor cell growth and it functions as a potential tumor-suppressor by influencing the Akt/KRAS signaling pathway, therefore, miR-217 is frequently down-regulated in PDAC. MicroRNA miR-217 was down-regulated 10-fold in the study by Szafranzka et al., normalized relative to miR-24 [25]. However, Greither et al. determined only a mean -2-fold decrease with 18S as internal control [22]. Ma et al. demonstrated -3.91-fold decrease, using U6 for normalization [34]. On the other hand, Hong et al. found, that expression of miR-217 was down-regulated up to -62.5-fold in PDACs. They also used U6 like internal control [31]. In our samples, miR-217 expression was significantly down-regulated across all internal controls, with a maximum -24.39-fold decrease with U6 and a minimum -7.19-fold decrease with U6 + U91 combination ( $p < 0.01$ , Table 4).

Thus, for miRNAs with high positive or negative expression levels, such as miR-21, miR-155 or miR-217, fold change values may differ up to several times,

depending on selected internal controls. Moreover, different internal controls can produce controversial results for miRNAs quantification, as it was demonstrated for miR-96, miR-148a or miR-196a.

#### Comparing internal controls: U91 is a new endogenous control for microRNAs quantification in pancreatic cancer

RT-qPCR quantification of tumor miRNA expression may play an essential role in PDAC diagnostics, chemotherapy resistance and survival prediction. RT-qPCR-based experiments require endogenous controls for the result normalization, reliability and reproducibility. U6 small nuclear RNA [8–11, 14, 15, 27, 30, 37, 38], 18S [7] and 5S ribosomal RNAs [8, 15, 39, 40], small nucleolar RNAs RNU48, RNU43, RNU44 – commercial available Applied Biosystems assays [41], or miR-16 [30, 42, 43] were often used as the endogenous controls for miRNAs expression evaluation. However, there are data indicating, that expression levels of these reference genes may differ significantly in neoplastic and normal tissues [17–19]. This expression instability may introduce bias, when determining miRNA dysregulation in tumors. For example, U6 small nuclear RNA was the most common internal control [8–11, 14, 15, 27, 30, 38] for the quantification of miRNAs expression in PDAC. However, there are data, implying that U6 expression may be unstable in breast and cervical cancers [17, 19, 42]. Also, the amount of U6 may vary significantly in serum samples from patients with breast and colorectal cancers [18, 42]. According to our findings, U6 expression may show as high as an 8-fold difference in PDAC and normal pancreatic tissue (Table 8). On the other hand, U6 was determined as the second most stable gene by the NormFinder algorithm (Table 5). U6 also demonstrated greater expression stability in breast carcinoma tissue samples when compared with the snoRNAs RNU44, RNU48 and RNU43. Furthermore, changes in levels of these snoRNAs correlated with tumor morphology and patient prognosis [41]. However, U6 alongside 5S and miR-16 showed remarkable expression variability in tissue samples from patients with breast carcinoma [42].

The data about miR-16 expression in serum samples from the breast cancer patients are controversial. On the first look, this miRNA demonstrated significant expression variations [18, 42]. On the other hand, analysis with the geNorm algorithm has identified miR-16 as well as miR-425 as the most stable normalizers [43]. According to our measurements, expression of miR-16 varied significantly in pancreatic carcinomas ( $p < 0.01$ , Table 7). In addition, miR-16 was marked by the NormFinder algorithm as the least stable of the analyzed endogenous controls (Table 5).

Another possibility for RT-qPCR result normalization is the use of alien spike RNAs, such as miR-39 from *C.*

*elegans* [18, 44], as internal controls. Also, these spike RNAs should be selected while taking into consideration that the same RNA sequences may already exist in the human genome. Surprisingly, according to the NormFinder analysis, the artificial spike was the least stable control (stability 0.085; Table 5). It must be taken into consideration, that the NormFinder algorithm can calculate variations between two groups including all normal and cancer samples, but it is unable to evaluate the differences between normal and cancer tissues from the individual patients. Accordingly, this may be the reason for the “instability” of the alien spike.

In this study, we compared the expression of 4 internal controls to determine the most stable of them. On the first look, the best internal control is the artificial spike, due to its amplification curves and threshold cycles, which have demonstrated to be very close for cancers and normal tissues (Table 7). On the other hand, according to the results, yielded by the NormFinder analysis, the best normalizer is the combination of U6 and U91. This combination has the best stability value, but as normalization results show, it differs significantly from the artificial spike ( $p < 0.01$ , Table 6). The most stable gene, determined by NormFinder, was U91 (Table 5). Each miRNA normalized relatively to the spike or U91, demonstrated similar expression values. Thus, statistically significant and insignificant differences between tumors and normal tissues for miRNAs were equal for the spike and the U91 (Table 4). Also, the differences between the spike and U91 were statistically insignificant for all of miRs except of miR-217 (Table 6). Among three endogenous controls, the U91 had the lowest average expression values and standard deviation in cancer tissues (Table 8).

Thus, we recommend U91 as a new normalizer of miRNA expression in pancreatic adenocarcinoma.

#### Conclusions

We found expression of traditional endogenous controls, such as U6 and miR-16 can be unstable in pancreatic tumors and may vary up to several times. This instability may introduce bias to the miRNAs quantification. On the other hand, U91, the new stable internal control for miRNAs expression evaluation in pancreatic cancers was found.

#### MIQE guidelines

This study was carried out in compliance to the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE; [45]).

#### Availability of data

Data files, including raw CT values or fold change tables are available on request, please, contact the correspondence author.

## Abbreviations

PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma; RT-qPCR: Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; FFPE: Formalin-fixed, paraffin-embedded (tissues); CT: Cycle threshold.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

AP carried out the molecular genetic studies, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. AS provided technical and material support, helped in acquisition of data and drafted the manuscript. VM conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

This work was technically supported by the project OPPK No. CZ.2.16/3.1.00/24.024, awarded by European Fund for Regional Development (Prague & EU – We invest for your future) and by the project PRVOUK Oncology P27, awarded by Charles University in Prague.

Received: 22 June 2015 Accepted: 12 October 2015

Published online: 24 October 2015

## References

- Hidalgo M. Pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*. 2010;362(17):1605–17. doi:10.1056/NEJMra0901557.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *P Natl Acad Sci USA*. 2008;105(30):10513–8. doi:10.1073/pnas.0804549105.
- Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA – implications for cancer. *Virchows Arch*. 2008;452(1):1–10. doi:10.1007/s00428-007-0532-2.
- Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metast Rev*. 2009;28(3–4):369–78. doi:10.1007/s10555-009-9188-5.
- Zhang BH, Pan XP, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007;302(1):1–12. doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.028.
- Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev*. 2009;84(1):55–71. doi:10.1111/j.1469-185X.2008.00061.x.
- Lee EJ, Gusev Y, Jiang JM, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2007;120(5):1046–54. doi:10.1002/ijc.22394.
- du Rieu MC, Torrioni J, Selves J, Al Saati T, Souque A, Dufresne M, et al. MicroRNA-21 Is Induced Early in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Precursor Lesions. *Clin Chem*. 2010;56(4):603–12. doi:10.1373/clinchem.2009.137364.
- Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Sato N, Nabae T, et al. MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(5):1067–74. doi:10.1158/1535-7163.Mct-08-0592.
- Ryu JK, Hong SM, Karikari CA, Hruban RH, Goggins MG, Maitra A. Aberrant MicroRNA-155 Expression Is an Early Event in the Multistep Progression of Pancreatic Adenocarcinoma. *Pancreatology*. 2010;10(1):66–73. doi:10.1159/000231984.
- Habbe N, Koorstra JBM, Mendell JT, Offerhaus GJ, Ryu JK, Feldmann G, et al. MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(4):340–6. doi:10.4161/Cbt.8.4.7338.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 MicroRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635–47. doi:10.1016/j.cell.2005.01.014.
- Yu SN, Lu ZH, Liu CZ, Meng YX, Ma YH, Zhao WG, et al. miRNA-96 Suppresses KRAS and Functions as a Tumor Suppressor Gene in Pancreatic Cancer. *Cancer Res*. 2010;70(14):6015–25. doi:10.1158/0008-5472.Can-09-4531.
- Zhao WG, Yu SN, Lu ZH, Ma YH, Gu YM, Chen J. The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS. *Carcinogenesis*. 2010;31(10):1726–33. doi:10.1093/carcin/bqg160.
- Hanoun N, Delpu Y, Suriawinata AA, Bournet B, Bureau C, Selves J, et al. The Silencing of MicroRNA 148a Production by DNA Hypermethylation Is an Early Event in Pancreatic Carcinogenesis. *Clin Chem*. 2010;56(7):1107–18. doi:10.1373/clinchem.2010.144709.
- Mardin W, Mees ST. MicroRNAs: Novel Diagnostic and Therapeutic Tools for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma? *Ann Surg Oncol*. 2009;16(11):3183–9. doi:10.1245/s10434-009-0623-1.
- Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *Rna*. 2008;14(5):844–52. doi:10.1261/Rna.939908.
- Xiang MQ, Zeng Y, Yang RR, Xu HF, Chen Z, Zhong J, et al. U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. *Biochem Biophys Res Co*. 2014;454(1):210–4. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.064.
- Hansen CN, Ketabi Z, Rosenstjerne MW, Palle C, Boesen HC, Norrild B. Expression of CPEB, GAPDH and U6snRNA in cervical and ovarian tissue during cancer development. *Apmis*. 2009;117(1):53–9. doi:10.1111/j.1600-0463.2008.00015.x.
- Qi LQ, Bart J, Tan LP, Platteeel I, van der Sluis T, Huijtema S et al. Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. *Bmc Cancer*. 2009;9. doi: 10.1186/1471-2407-9-163.
- Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, et al. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(41):16170–5. doi:10.1073/pnas.0703942104.
- Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschlager C, Wurl P, Taubert H. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer*. 2010;126(1):73–80. doi:10.1002/ijc.24687.
- Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghrouj A, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*. 2007;26(30):4442–52. doi:10.1038/sj.onc.1210228.
- Bloomston M, Frankel WL, Petrocra F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *Jama*. 2007;297(17):1901–8. doi:10.1001/jama.297.17.1901.
- Szafranska AE, Doleshal M, Edmunds HS, Gordon S, Luttgens J, Munding JB, et al. Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clin Chem*. 2008;54(10):1716–24. doi:10.1373/clinchem.2008.109603.
- Huang F, Tang J, Zhuang X, Zhuang Y, Cheng W, Chen W, et al. MiR-196a promotes pancreatic cancer progression by targeting nuclear factor kappa-B-inhibitor alpha. *PLoS one*. 2014;9(2):e87897. doi:10.1371/journal.pone.0087897.
- Zhang Y, Li M, Wang H, Fisher WE, Lin PH, Yao Q, et al. Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World journal of surgery*. 2009;33(4):698–709. doi:10.1007/s00268-008-9833-0.
- Link A, Becker V, Goel A, Wex T, Malfertheiner P. Feasibility of Fecal MicroRNAs as Novel Biomarkers for Pancreatic Cancer. *PLoS one*. 2012;7(8):e42933. doi:10.1371/journal.pone.0042933.
- Jamieson NB, Morran DC, Morton JP, Ali A, Dickson EJ, Carter CR, et al. MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(2):534–45. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0679.
- Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzesse JL, et al. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer prevention research*. 2009;2(9):807–13. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-09-0094.
- Hong TH, Park IY. MicroRNA expression profiling of diagnostic needle aspirates from surgical pancreatic cancer specimens. *Annals of surgical treatment and research*. 2014;87(6):290–7. doi:10.4174/ast.2014.87.6.290.
- Kent OA, Mullendore M, Wentzel EA, Lopez-Romero P, Tan AC, Alvarez H, et al. A resource for analysis of microRNA expression and function in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(21):2013–24.
- Feng J, Yu JB, Pan XL, Li ZL, Chen Z, Zhang WJ, et al. HEG1 functions as an oncogene in pancreatic cancer and is downregulated by miR-96. *Oncotarget*. 2014;5(14):5832–44.
- Ma MZ, Kong X, Weng MZ, Cheng K, Gong W, Quan ZW, et al. Candidate microRNA biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma: meta-analysis, experimental validation and clinical significance. *J Exp Clin Onc Res*. 2013;32:71. doi:10.1186/1756-9966-32-71.
- Zhang R, Li M, Zang W, Chen X, Wang Y, Li P, et al. MiR-148a regulates the growth and apoptosis in pancreatic cancer by targeting CCKBR and Bcl-2. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(1):837–44. doi:10.1007/s13277-013-1115-2.

36. Schultz NA, Werner J, Willenbrock H, Roslind A, Giese N, Horn T, et al. MicroRNA expression profiles associated with pancreatic adenocarcinoma and ampullary adenocarcinoma. *Modern Pathol.* 2012;25(12):1609–22. doi:10.1038/modpathol.2012.122.
37. Wang J, Raimondo M, Guha S, Chen JY, Diao LX, Dong XQ, et al. Circulating microRNAs in Pancreatic Juice as Candidate Biomarkers of Pancreatic Cancer. *J Cancer.* 2014;5(8):696–705. doi:10.7150/Jca.10094.
38. Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Kayashima T, Ikenaga N, Sakai H, et al. MicroRNA-10b is overexpressed in pancreatic cancer, promotes its invasiveness, and correlates with a poor prognosis. *Surgery.* 2011;150(5):916–22. doi:10.1016/j.surg.2011.06.017.
39. Sun M, Estrov Z, Ji Y, Coombes KR, Harris DH, Kurzrock R. Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(3):464–73. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-2272.
40. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004;64(11):3753–6. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0637.
41. Gee HE, Buffa FM, Camps C, Ramachandran A, Leek R, Taylor M, et al. The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *Brit J Cancer.* 2011;104(7):1168–77. doi:10.1038/sj.bjc.6606076.
42. Appaiah HN, Goswami CP, Mina LA, Badve S, Sledge GW, Liu YL, et al. Persistent upregulation of U6:SNORD44 small RNA ratio in the serum of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2011;13(5):R86. doi:10.1186/Bcr2943.
43. McDermott AM, Kerin MJ, Miller N. Identification and Validation of miRNAs as Endogenous Controls for RQ-PCR in Blood Specimens for Breast Cancer Studies. *PLoS one.* 2013;8(12):e83718. doi:10.1371/journal.pone.0083718.
44. Liu JQ, Gao J, Du YQ, Li ZS, Ren Y, Gu JJ, et al. Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2012;131(3):683–91. doi:10.1002/ijc.26422.
45. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611–22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





## 2. Příloha – 2. studie

**Running title:** *Expression of 7 miRNAs in PDACs has no predictive functions*

**Expression of selected MicroRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma: is there relation to tumor morphology, progression and patient's outcome?**

Arpad Szabo<sup>1</sup>, Robert Gurlich<sup>2</sup>, Marian Liberko<sup>3</sup>, Renata Soumarova<sup>3</sup>, Zdenka Vernerova<sup>1</sup>, Vaclav Mandys<sup>1</sup> and Alexey Popov<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague 100 34, Czech Republic. <sup>2</sup>Department of Surgery, 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague 100 34, Czech Republic. <sup>3</sup>Department of Radiotherapy and Oncology, 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague 100 34, Czech Republic.

\*Correspondence to: [alexey.popov@lf3.cuni.cz](mailto:alexey.popov@lf3.cuni.cz)

### Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) remains a disease with extremely poor prognosis and limited effective available treatment. Differential expression of miRNAs isolated from tumor tissue has been proposed as a marker for tumor diagnosis, progression and prognosis. Nevertheless, prognostic value of miRNAs expression in PDACs for patient outcome still remains unclear. Expression of 7 selected miRNAs, isolated from FFPE samples of 54 PDAC patients, was quantified using RT-qPCR. The relationship of miRNA expression levels with tumor histology, clinico-pathological characteristics, patient overall survival (OS) and progress-free survival (PFS), was subsequently evaluated. Overexpression of miR-21, miR-155 and miR-210 was observed in PDACs (up to 72.62-fold, 232.36 and 181.38-fold respectively), in comparison with non-neoplastic tissues. On the other hand, miR-96 and miR-217 were significantly downregulated in PDACs (up to one hundred times). No differences were, however, noticed between cancer and normal tissues for the expression levels of miR-148a and miR-196a. On the other hand, expression levels of all 7 miRNAs failed to demonstrate significant correlation with parameters of tumor progression, such as tumor stage, grade, nodal involvement, perineural and vascular invasion. Positive correlation of miR-210 levels was, however, observed with patient age ( $\rho=0.35$ ). Additionally, miR-

148a and miR-217 expression have shown positive association with tubular tumor growth pattern ( $\rho=0.39$ ;  $\rho=0.28$ ). Negative correlation of miR-148a values was also demonstrated with dissociative growth pattern and nuclear atypia ( $\rho=-0.30$ ;  $\rho=-0.27$ ). Finally, no statistically significant correlation could be demonstrated with the expression levels of all 7 tested miRNAs and PDAC patient survival; neither for OS nor for PFS ( $p>0.05$ ). Our data has confirmed abnormal miRNAs expression in PDACs in comparison with adjacent non-neoplastic tissue. On the other hand, no correlation was discovered between miRNA expression and parameters of tumor progression. We have found significant association between histologic tumor growth patterns and miRNA expression, making this work the first study which analyzes this aspect of PDAC. Finally, in our group of patients, no relationship of miRNA levels and patient prognosis could be demonstrated. Therefore, further investigation is required to evaluate the predictive and prognostic potential of miRNAs in a clinical setting.

**Keywords:** miRNA, pancreatic ductal adenocarcinoma, RT-qPCR (reverse transcription quantitative PCR), overall survival, progression-free survival

## **Introduction**

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common primary pancreatic neoplasm, with great potential for locoregional spread (close to 35% of cases) and, in up to 50% of patients, with metastatic disease at the time of diagnosis. Furthermore, PDAC is highly resistant to chemoradiotherapy [1–3]. Curative resection is possible only in 15–20% of the patients, with 5 year overall survival (OS) of 5–7% [4–8]. Despite dramatic progress in the management of malignancies, the outcome of PDAC patients failed to show significant improvement and by 2030, PDAC is estimated to be the second leading cause of cancer-related death [9]. Therefore, there is an intensive ongoing search for biomarkers permitting tumor detection, characterization of cancer progression and prediction of patient survival.

MicroRNAs (miRNAs) have emerged as a new class of such biomarkers [10, 11].

Dysregulation in miRNA expression profiles has been detected in a wide variety of neoplastic diseases [12–14]. They have been theorized to act as oncogenes and tumor suppressors, with aberrant miRNA expression being already presented in neoplastic precursor lesions [15–17]. MiRNAs can be isolated from plasma, tissue samples and excretions, while maintaining sample integrity due to their stability [18–20]. Moreover,

miRNAs are preserved after formalin fixation and can be isolated from paraffin embedded tissue, yielding similar results to fresh material [21].

Several microRNAs across numerous publications have been proposed as predictive factors for disease progression, chemotherapy outcome and patient survival. Of these markers, miR-21 has received the most attention, elevated expression levels being regularly suggested as a predictor of poor patient prognosis [22]. Jamieson et al. have also discovered the relationship of miR-21, alongside miR-146a, and miR-628 with tumor grade, stage and lymph node status [23]. Other miRNAs have shown promise as prognostic markers, as well; but were analyzed to a more limited degree, sometimes yielding inconsistent results among studies. Kong et al. have proposed elevated miR-196a serum levels as a predictor of poor survival, besides being able to differentiate resectable and unresectable patients [24]. MiR-155 has also been linked to advanced tumor stage and poor survival [25, 26]. Greither et al. have proposed a prognostic panel consisting of miR-155, -203, -210 and -222, where their elevated expression is a predictor of poor outcome [27]. On the other hand, increased plasma levels of miR-210 were linked to better patient survival [28]

In this study, the expression of 7 miRNAs (miR-21, miR-96 miR-148a, miR-155, miR-196a and miR-210 and miR-217), described to be dysregulated in PDAC, was analyzed. Three of the selected miRNAs, miR-21, miR-155 and miR-217 were described to be differentially expressed in relationship with tumor progression [23, 25, 29]. MiR-21, miR-155, miR-196a and miR-210 were selected, due to them having been proposed as prognostic markers [22, 27, 30]. The role of miR-96 as well as miR-148a and miR-217 expression in patient prognosis has not been analyzed extensively yet. The aim of this work was evaluation of the relationship of miRNA expression levels with tumor morphology, progression and patients' survival.

## **Patients and methods.**

### *Patients and tissue specimens*

For this study, tissue samples were collected from patients, who had undergone pancreatoduodenectomy (Whipple and Traverso-Longmire), distal pancreatectomy or total pancreatectomy for PDAC between 2007 and 2015. Formalin fixed paraffin embedded (FFPE) blocks with tumor and with normal pancreatic tissue used as negative control, were retrieved from the archive of the Department of Pathology of the

University Hospital Kralovske Vinohrady in Prague. Tumor tissue represented at least two thirds of the volume of the histologic slide. Negative controls of non-neoplastic pancreatic tissue were procured at least 15 mm away from the tumor. The diagnosis of PDAC was confirmed by two pathologists (A. Sz. and V. M.) according to the WHO Classification of Tumors of the Gastrointestinal Tract, 4<sup>th</sup> edition. Patient data, including age, gender, tumor grade and TNM status was collected for analysis. Patients were followed up until January of 2018, with a median follow-up time of 19 months.

#### *Morphological analysis of tumors*

Microscopic patterns of PDAC were classified into tubular, cribriform, solid-trabecular, mucinous, clear cell, dissociative and signet ring; quantified in increments of 5%, taking into account all the available slides with tumor. Tumor growth patterns are illustrated in Fig. 1. Nuclear atypia was semiquantitatively graded as low, medium or high. Mitotic count for each tumor was also performed in 10 high power fields (HPF) (Olympus microscope BX43 and objective Olympus Plan 40x/0.65).

#### *MicroRNAs isolation and reverse transcription.*

Three 6µm thick unstained sections from selected FFPE blocks where the tumor occupied at least two thirds, were procured for RNA extraction, using the miRNeasy FFPE kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. Reverse transcription was carried out as described in our previous work [31]. The stem-loop primer sequences for the examined pancreatic miRNAs and the internal control, alien spike miRNA (miR-39 from *C. elegans*) are listed in Table 1. The alien spike was selected for normalization based on its performance in our previous work [31].

#### *Real-time qPCR.*

cDNA samples were amplified in duplicates, using the Applied Biosystems 7500 Fast real-time PCR system and Hot FirePol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne). The reaction mix included 10 pmol of each primer (miRNA specific and the universal (Table 2)) and 2µl of cDNA. Amplification of the cDNAs was performed at the following thermal conditions: denaturation at 94°C for 15 min, followed by 40 cycles consisting of denaturation at 94°C for 15 sec, annealing at 62°C for 60 sec and DNA synthesis at 72°C for 40 sec. Reaction product specificity was controlled with their respective

melting curves. The  $\Delta\Delta C_t$  method was applied to measure the values of miRNA expression of interest [32].

#### *Statistical analysis.*

All statistical analyses were performed using GenEx 6, S.A.S. release 9.4 (SAS Inc., Cary, NC, USA) and SPSS (IBM Corporation). The expression of miRNAs in neoplastic and normal tissues was compared by a Wilcoxon's paired test. Spearman rank correlation was used to evaluate correlation between expression levels of different miRNAs. Cox proportional-hazards model was used for analyses of overall and progression-free survival (PFS). Univariate Cox regression analysis was utilized to assess relationship of miRNA expression and overall survival in the group of patients from the "The Cancer Genome Atlas" (TCGA) database. All tested hypotheses were two-sided. The level of significance was selected as  $\alpha = 0.05$ , therefore p-values below 0.05 were considered as statistically significant.

## **Results.**

### *Clinico-pathological characteristics of PDAC patients*

Of 54 patients with PDAC, 27 (50%) were men and 27 (50%) were women. The age of patients ranged from 34 to 83 years, median 63 years (Table 3). Four cancers were well differentiated, 27 cancers were moderately differentiated and 23 cancers were poorly differentiated. In one patient, the tumor originated from a mucinous cystic neoplasm (MCN); the analyzed sample was selected to contain only malignant tumor. The tumor progression was classified in 4 patients pT1, in 7 patients pT2, in 41 patients pT3 and in 2 patients pT4. Lymph node metastases were discovered in 37 specimens. Perineural propagation was present in 47, and lymphovascular invasion in 29 cases. The resection margin was negative (R0) in 40 and positive (R1) in 14 patients (Table 3).

### *Correlation of tumor histological characteristics*

Analysis of the relations of particular histomorphological patterns of PDACs using Spearman's correlation showed negative correlation of tubular tumor pattern (being present in tumors with lower grade) with solid trabecular ( $p < 0.001$ ) and dissociative ( $p < 0.001$ ) growth patterns, high nuclear atypia ( $p < 0.001$ ) and mitotic count ( $p < 0.001$ ). Hallmarks of high tumor grade, which are solid trabecular and dissociative growth

patterns were, on the other hand, associated with higher degrees of nuclear atypia ( $p<0.001$ ). High mitotic count in PDAC was also related with nuclear atypia ( $p<0.001$ ).

### *Survival*

Data on progression-free survival were available in 42 patients, with a median of 13 months. Overall survival of the entire group ranged between 1-81 months, with a median of 19 months. Seven patients have shown no recurrence of the disease and have survived for 20-81 months, still being alive at the end of the follow-up period (Table 3).

### *Relationship of tumor parameters and patient survival.*

Evaluation of prognostic significance of tumor stage was limited by the number of the patients. No difference in prognosis could be demonstrated between grade 2 and grade 3 PDACs ( $p>0.05$ ). The small number of grade 1 tumors ( $n=4$ ) in our group prevented us from further characterizing deviation in survival according to this parameter. Positive resection margin was associated with shorter PFS ( $p<0.05$ ). Vascular invasion was significantly correlated with poor patient OS ( $p<0.05$ ). No such relationship was apparent in perineural invasion and lymph node status. Microscopic tumor growth patterns, including tubular, cribriform, solid trabecular and dissociative, were not associated with patient prognosis. The strongest correlation of OS and PFS was with tumor mitotic count ( $p=0.093$  and  $p=0.063$ ). We identified a cut-off point of 3 mitoses on 10 HPF 40x to distinguish between patients with poor and good prognosis.

### *Abnormal miRNA expression in pancreatic cancers.*

We observed significant overexpression of miR-21, miR-155 and miR-210 (up to 72.62-fold, 232.36-fold and 181.38-fold correspondently;  $p<0.01$ , Table 4) in PDACs in comparison with adjacent normal tissues. On the other hand, miR-96 was significantly downregulated in PDACs (-1.42-fold,  $p<0.01$ ). Expression of the miR-217 often was inhibited, up to one hundred times and was not detected in 15 PDAC samples (Table 4). However, we did not find any significant differences between cancer and normal tissues for the expression levels of miR-148a and miR-196a ( $p>0.05$ , Table 4).

We detected significant positive correlation between expression levels of different miRNAs. High levels of miR-21 correlated with high levels of the miR-155 ( $\rho=0.48$ ,  $p<0.01$ ) and miR-210 ( $\rho=0.36$ ,  $p<0.01$ , Table 5). Downregulation of miR-96 correlated with miR-196a ( $\rho=0.42$ ,  $p<0.01$ , Table 5). Correlation between miR-155 and miR-210

( $\rho=0.30$ ,  $p<0.05$ ) as well as between miR-148a and miR-217 ( $\rho=0.27$ ,  $p=0.048$ ) was significant for the 95% and insignificant for 99% confidence interval (Table 5).

#### *MiRNAs expression and clinico-pathological characteristics*

Comparison of miRNA expression with clinico-pathological characteristics of patients disclosed positive correlation of miR-210 expression with patient age ( $\rho=0.35$ ,  $p<0.01$ ; Table 6). Expression levels of all 7 miRNAs, failed to demonstrate significant correlation with other parameters, such as tumor stage, grade, nodal involvement, perineural and vascular invasion (Table 6).

#### *MiRNA expression and microscopic tumor growth patterns.*

Evaluation of the relationship between miRNA expression and microscopic tumor patterns, using Spearman's correlation discovered statistically significant association of miR-148a and miR-217 expression and tubular tumor growth pattern, characteristic for cancers of lower grade ( $\rho=0.39$ ,  $p<0.01$ ;  $\rho=0.28$ ,  $p<0.05$ ; Table 7). MiR-148a values have shown a negative correlation with nuclear atypia ( $\rho=-0.30$ ,  $p<0.05$ ; Table 7) and dissociative growth pattern ( $\rho=-0.28$ ,  $p<0.05$ ; Table 7). Additionally, miR-155 level had positive correlation with high tumor mitotic count ( $\rho=0.27$ ,  $p<0.05$ ; Table 7).

#### *MiRNA expression and patient's survival.*

Analysis of a prognostic role of expression of tested miRNAs in PDAC did not discover any significant evidence for OS ( $p>0.05$ , Table 8). Correlation between miRNA levels and duration of PFS was also statistically insignificant for all seven selected miRNAs ( $p>0.05$ , Table 9).

#### *In silico survival analysis of survival of PDAC patients from TCGA database*

“The Cancer Genome Atlas” (TCGA) database represents miRnome of 178 pancreatic carcinomas analyzed by Illumina seq (<https://gdc.cancer.gov>, oncolnc.org), alongside with the detailed clinical patient data. After review of the TCGA cohort, we excluded cases of neuroendocrine carcinomas and adenocarcinomas other than conventional PDAC; the size of the analyzed TCGA cohort was thus reduced to 160 patients. The relationship of copy numbers of selected miRNAs in tumors and patient survival was evaluated with Cox regression analysis, but none of the selected miRNAs were related to shorter patient OS (Supplementary table 1,  $p<0.05$ ).

## **Discussion**

*MicroRNAs are overexpressed or downregulated in pancreatic cancer.*

For our analysis we have selected miRNAs, frequently described to be deregulated in PDACs [30, 33, 34]. Zhang et al. have demonstrated relative expression values of miRNAs spanning 6-logs (from 0.01–10,000) among individual cases [35].

Expression levels of miR-21 are increased in PDAC and vary greatly in individual studies [30, 33, 36, 37]. For example, Bloomston et al. measured with microarray a median 2.2-fold increase in FFPE tumor samples [30], and Zhang et al. detected upregulated expression of miR-21 up to 6888-fold in several tumors using RT-qPCR arrays [35]. In our study, a mean 12.01-fold increase of miR-21 was observed and a maximum 72-fold elevation was present in tumors (Table 4).

The data about miR-96 expression in PDAC are controversial. This miRNA has been shown to be downregulated in several studies performed on FFPE tumor samples utilizing microarrays and RT-qPCR [19, 33, 39, 40]. On the other hand, Bloomston et al. measured an average 1.77-fold increase, when determining miR-96 levels in PDACs [30]. Kent et al. also demonstrated 2.7-fold upregulation of miR-96 in pancreatic cancer cell lines using custom microarrays [38]. We found that miR-96 expression was significantly downregulated in cancers in comparison with normal tissues (up to -18-fold, mean was -1.42-fold,  $p < 0.01$ , Table 4).

Decrease of miR-148a levels has been consistently identified in PDAC tissue samples, across several studies analyzing FFPE tumor tissues with microarrays and RT-qPCR [19, 30, 41]. In contrast with the cited literature, we found slightly decreased miR-148a mean level in tumors (-1.63-fold), but insignificantly in comparison with normal tissues ( $p > 0.05$ , Table 4). However, this miRNA was inhibited, up to -55-fold, in several PDACs (Table 4).

Overexpression of miR-155 in paraffin embedded PDAC samples and pancreatic cancer cell lines measured by microarrays and RT-qPCR, ranged from 1.8 to 2.9-fold in different studies [30, 35, 43]. Zhang et al. reported up to 52-fold increase in individual cases [35]. In our group of samples a mean 22.9-fold increase was present ( $p > 0.05$ , Table 4).

Abnormalities in miR-196a expression have been described in pancreatic cancer and in other malignancies as well [34, 35, 44, 45]. Wang et al. detected with RT-qPCR 16.05-



fold increase in plasma samples of patients with PDAC [34]. Additionally, Xu et al. discovered with RT-qPCR significant increase of miR-196a in plasma exosomes of PDAC patients in comparison with healthy controls [46]. In our group of PDAC patients we determined a great variation of miR-196a expression, from -15-fold up to 25.9-fold in different tumors (Table 4). On the other hand, we did not find significant differences in miR-196a expression between cancer and normal tissues (mean was 0.913-fold,  $p > 0.05$ ; Table 4).

Elevation in miR-210 levels have been consistently described across several studies performed on frozen and FFPE tumor tissues with microarrays and RT-qPCR [19, 27]. Greither et al. detected up to 39.9-fold increase in snap-frozen surgical resection specimens [27]. Wang et al. reported about a 2-28-fold elevation in miR-210 plasma levels in PDAC patients [34]. In our study we observed up to 181-fold increase of miR-210 expression in PDACs in comparison with normal tissues (mean 15.68-fold,  $p < 0.01$ ; Table 4)

Down-regulation of miR-217 is a frequently described phenomenon in PDACs. Greither et al. determined only a mean -2-fold decrease of miR-217 expression in snap-frozen tumor samples [27]. In FFPE tumor tissues, Ma et al. demonstrated -3.91-fold decrease [47], Szafranska et al. have shown downregulation up to -10-fold as well [19]. Hong et al. found significant (up to -62.5-fold) downregulation of miR-217 expression of in fine needle aspirates from PDACs [33]. In our samples, miR-217 expression was significantly downregulated, with up to -100-fold decrease. Additionally, this miRNA was not detected in 15 PDACs ( $p < 0.01$ , Table 4).

Besides identifying abnormalities in the expression of single miRNAs, we have also discovered a positive correlation between high expression levels of the three onco-miRNAs: miR-21, miR-155a and miR-210 (Table 5). Acting together, these miRNAs may promote cancer development and progression [48–51]. Moreover, positive correlation was detected for downregulation of tumor suppressing miRNAs miR-148a and miR-217 (Table 5). Both of them inhibit cell proliferation [52, 53], therefore it may be necessary to deactivate them in tumors for successful cancerogenesis. Additionally, positive correlation was detected for downregulation of miR-96 and upregulation of miR-196a (Table 5). MiR-96 is inhibitor of KRAS, limiting tumor cells proliferation [39, 40, 54], but miR-196a is oncomiR and it acts quite opposite, preventing apoptosis [55], promoting cell proliferation and migration [48]. Accordingly, downregulation of miR-96 and upregulation of miR-196a looks like a necessary condition for tumor

survival and development.

Thus, we observed that selected miRNAs were abnormally up- or downregulated in pancreatic cancers. Five of seven selected miRNAs demonstrated significant differences of expression levels in tumors in comparison with adjacent normal tissues (Table 4). Therefore, differential miRNAs expression may be a very sensitive tool for the pancreatic cancer diagnostics.

#### *Correlation of clinicopathological features of tumors with microRNA expression*

In surgical resection specimens, the relationship of abnormal miRNA expression with tumor morphology and progression has been investigated less frequently, compared with miRNA diagnostic and prognostic utility. Additionally, conclusions are inconsistent in different publications. Jamieson et al. have demonstrated elevated expression of miR-21, miR-146a, and decreased expression of miR-628 to be linked to tumor grade, stage and lymph node status in FFPE tumor samples investigated with RT-qPCR [23]. Frampton et al. [56] and Giovanetti et al. [57], on the other hand, found in formalin fixed PDAC tissue samples statistically significant association only between elevated miR-21 levels and tumor grade, but not with other clinicopathological parameters. Dillhoff et al. couldn't identify with in situ hybridization in FFPE tumor samples any correlation of miR-21 expression with tumor size, differentiation, nodal status, or tumor stage [58]. Deng et al. demonstrated in snap-frozen and FFPE samples of a group of 54 PDAC patients positive correlation of down-regulated miR-217 with progressed tumor stage, lymphatic invasion, vascular infiltration and distant metastasis [29]. Schultz et al, in microdissected FFPE tumor samples in a group of 170 PDAC patients, could not identify a reliable miRNA profile to categorize patients according to tumor stage and lymph node status [59].

In our cases, we haven't detected significant correlation of miRNA expression with tumor progression, grade, perineural, vascular invasion and lymph node status. Positive association was, however, discovered between patient age and miR-210 levels (Table 6). This finding could be in part related to the proposed role of miR-210 in cellular senescence [60]. Further investigation is, therefore warranted to analyze the potential of miRNA signatures in predicting the extent of tumor progression.

*Prognostic role of miRNAs expression profiles for PDAC patient's overall and progression-free survival.*

The only clinically available biomarker capable of assessing the prognosis of PDAC patients is CA19-9, yet its utility is limited by non-specific positivity and false negativity in multiple neoplastic and non-neoplastic diseases [61]. There is increasing evidence that miRNA expression profiles could have a potential to provide tumor-specific prognostic information. Several recent works have reported associations between microRNA expression and overall survival in PDAC patients [22, 57, 62, 63].

Among the dysregulated miRNAs in PDAC, miR-21 has been the most widely studied potential prognostic factor. This onco-miRNA has also been proposed as a marker for patient survival in a large number of other malignancies [64]. Several meta-analyses, assessing more than 20 articles, published from 2007 to 2016, including more than 2000 PDAC cases [22, 62–65] have postulated that high miR-21 expression, detected with microarrays and RT-qPCR in tumor tissue samples procured from surgical specimens, is consistently linked to poor OS and PFS. Similarly, Karasek et al. described the association of poor patient OS and elevated plasma levels of miR-21 detected with RT-qPCR [66]. The literature is, however, not in total agreement regarding the prognostic role of miR-21. Calatayud et al. and Schultz et al. did not find any significant correlation between miR-21 expression, measured with RT-qPCR arrays on FFPE material, and OS in their groups of 165 and 277 PDAC patients [59, 67]. Worse PFS was observed by Khan et al. in patients with inoperable PDAC with elevated plasma miR-21 detected with digital droplet PCR, but no association of circulating miR-21 levels with OS was detected [68]. Moreover, there is disagreement in the literature over the significance of miR-21 overexpression in the cancer cells or in tumor-associated fibroblasts for patient survival. Donahue et al. described worse OS in patients receiving 5-fluorouracyl chemotherapy with elevated miR-21 expression in cancer associated fibroblasts detected with in situ hybridization, but not in patients treated with gemcitabine [69]. Kadera et al. identified through in situ hybridization that only elevated miR-21 expression in tumor-associated fibroblasts was linked with poor prognosis and lymph node metastases. On the other hand, miR-21 expression in tumor cells had no effect on survival [70]. Giovanetti et al. detected, however, significantly higher miR-21 levels in microdissected tumor cells, correlating with shorter OS [57]

The role of miR-96 expression levels in patient prognosis has not been analyzed extensively. Only one group demonstrated that downregulated expression of miR-96-5p

in FFPE tumor samples measured with RT-qPCR was associated with a decreased overall survival in patients with PDAC [71].

The value of miR-148a as a prognostic marker for PDAC has also been assessed to a limited degree, with controversial conclusions. Schultz et al. identified in FFPE PDAC samples, utilizing RT-qPCR arrays, low miR-148a expression as a predictor of short OS [59]. On the other hand, in FFPE samples from a group of 78 PDAC patients, miR-148 expression levels, quantified with RT-qPCR, were not statistically significant with regards to overall survival [47].

Overexpression of miRNAs miR-155, miR-196a and miR-210 detected in microarrays and with RT-qPCR performed on frozen and FFPE tumor samples has been observed in pancreatic cancer patients who had a poor overall survival rate [27, 30]. These findings were confirmed with RT-qPCR by Ma et al. and Papaconstantinou et al. for miR-155 in operatively collected FFPE tumor samples [25, 47]; as well as by Greither et al. for miR-155 and miR-210 in microdissected snap-frozen tumor samples [27]. Mikamori et al. showed that both OS and DFS were significantly shorter in the high miR-155 expression group of microdissected FFPE pancreatic cancer samples [26]. Bloomston et al. have linked high miR-196a in FFPE samples from PDAC, measured with microarrays, with shorter OS [30]. Kong et al. also reported correlation of elevated miR-196a measured with RT-qPCR in blood sera of PDAC patients with poor survival and advanced disease stage [24]. Yu et al. analyzed plasma levels of miR-196a and miR-210 with RT-qPCR in a cohort of 31 PDAC patients. High miR-196a expression was associated with poor OS, whereas high miR-210 expression was significantly associated with improved survival [28].

The effect of miR-217 expression levels on patient prognosis has been evaluated only by Ma et al. and Vychytilova et al., investigating FFPE tumor samples utilizing RT-qPCR. In these studies, no association of miR-217 expression with OS and PFS was described [47, 72].

In our study, we could not confirm any significant prognostic value of the seven selected miRNAs, neither for OS nor for PFS (Table 8 and 9).

Several studies have examined *in silico* the RNA sequencing data of pancreatic cancers from the TCGA database, in order to select miRNAs predicting survival length [73-76]. These publications are also not in agreement about the panels of predictive miRNAs for patient OS, which varied significantly in composition (Supplementary table 2). The miR-21 was determined as significant for patient prognosis in only one of the studies

[73]. MiR-196a expression was identified as significant for predicting survival in univariate Cox regression analysis in one study, but this miRNA was insignificant for OS in the multivariate analysis in a combination with another miRNAs [75]. We also analyzed the cohort of 160 PDAC patients from this database [77], but none of the selected miRNAs were related to shorter patient OS (Supplementary table 1). Discrepancies in selected prognostic miRNAs may be due to differences study design and statistical data analysis.

The data about prognostic role of miRNAs expression in PDACs are insufficient and debatable. The number of performed studies is low; as such bias introduced by the composition and ethnicity of the patient cohort may be regarded as a significant source of variability [65, 78]. The choice of different PDAC samples types, including frozen and FFPE tumor tissues from surgical resection specimens, plasma or blood serum, each necessitating different technical approaches during measurement of miRNA expression, can potentially decrease the comparability of results across studies [79-81]. MiRNA yields can also be influenced by the length of storage in fixative agents and by the choice of isolation methods [79, 82]. In retrospective studies, storage time of archived FFPE samples may also influence the results due to gradual decrease in global miRNA yield and selective degradation of individual miRNAs [79,83]. Utilization of microdissection in tissue samples could alter the results by excluding miRNAs from tumor-associated fibroblasts [57]. The different analytical methods utilized for quantification of miRNA expression may be an additional source of variability. The comparison of 12 commercially available platforms based on RT-qPCR, microarrays and RNA seq demonstrated significant differences in the profile of detected miRNAs [84]. The choice of normalization can also significantly alter the detected values of miRNA expression in RT-qPCR [31].

In conclusion, we could not confirm the predictive function of our selected miRNAs, miR-21, miR-96, miR-148a, miR-155, miR-196a, miR-210 and miR-217, for OS and PFS in PDAC patients. Values of miRNA expression showed, however, significant variability among individual studies. Levels of detected miRNAs can be influenced by several factors, including manipulation with samples, choice of miRNA isolation protocols, detection methods and normalization. These factors limit the comparability of miRNA expression results across the literature. Thus, further large-scale studies under

standardized sample procurement and analysis protocols are needed to validate, whether miRNAs could serve as prognostic biomarkers for PDAC in the clinical setting.

### **Abbreviations**

PDAC: pancreatic ductal adenocarcinoma

RT-qPCR: reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

FFPE: formalin-fixed, paraffin-embedded (tissues)

OS: overall survival

PFS: Progression-free survival

### **Acknowledgments**

We sincerely thank Dr. Ladislav Pecen for his kindly help with statistical analysis and Dr. Josef Dvorak for kindly providing us with follow-up data.

### **Funding**

This work was supported by the Charles University research program PROGRES Q 28 (Oncology).

### **Availability of Data**

Data files, including raw CT values or fold change tables are available on request, please contact the corresponding author.

### **Authors' contributions**

AS performed histologic revision of all cases and provided technical and material support, helped in collection and analysis of data and drafted the manuscript. AP designed and performed the molecular genetic studies, carried out a significant part of the statistical analysis and drafted the manuscript. RG provided the resection specimens and clinical data. ML, RS and ZV provided follow-up data. VM conceived of the study and participated in its design and coordination, performed histologic revision of all

cases and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Ethics approval and consent to**

All patients provided informed written consent for their tissues to be used for scientific research and to publish their case details. The study was performed according to the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Third Faculty of Medicine (Charles University in Prague, Czech Republic). The resolution 1006/2012 was signed by Dr. Marek Vacha, Ph.D., Head of the Ethics Committee.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **References**

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A, LOCKWOOD WW, SIEGEL R, et al. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10–29.
- [2] PREIS M, KORC M. Kinase signaling pathways as targets for intervention in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2010; 9: 754–63.
- [3] ADAMSKA A, DOMENICHINI A, FALASCA M. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Current and evolving therapies. *Int J Mol Sci* 2017; 18.
- [4] VINCENT A, HERMAN J, SCHULICK R, HRUBAN RH, GOGGINS M. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011; 378: 607–620.
- [5] LIM JE, CHIEN MW, EARLE CC. Prognostic factors following curative resection for pancreatic adenocarcinoma: A population-based, linked database analysis of 396 patients. *Ann Surg* 2003; 237: 74–85.
- [6] SENER SF, FREMGEN A, MENCK HR, WINCHESTER DP. Pancreatic cancer: A report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg* 1999; 189: 1–7.
- [7] WAGNER M, REDAELLI C, LIETZ M, SEILER CA, FRIESS H, et al. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 2004; 91: 586–594.
- [8] REGINE WF, WINTER KA, ABRAMS RA, SAFRAN H, HOFFMAN JP, et al. Fluorouracil vs gemcitabine chemotherapy before and after fluorouracil-based chemoradiation following resection of pancreatic adenocarcinoma: A randomized controlled trial. *JAMA - J Am Med Assoc* 2008; 299: 1019–1026.

- [9] RAHIB L, SMITH BD, AIZENBERG R, ROSENZWEIG AB, FLESHMAN JM, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. *Cancer Res* 2014; 74: 2913–2921.
- [10] ETHERIDGE A, LEE I, HOOD L, GALAS D, WANG K. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 2011; 717: 85–90.
- [11] CHEUNG PY, SZAFRANSKA-SCHWARZBACH AE, SCHLAGETER AM, ANDRUSS BF, WEISS GJ. No miR quirk: dysregulation of microRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Microna*. 2012; 1: 49-58.
- [12] SASSEN S, MISKA EA, CALDAS C. MicroRNA - Implications for cancer. *Virchows Arch* 2008; 452: 1–10.
- [13] IORIO MV, CROCE CM. MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012; 4: 143–159.
- [14] EUN JL, GUSEV Y, JIANG J, NUOVO GJ, LERNER MR, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2007; 120: 1046–1054.
- [15] SHENOUDA SK, ALAHARI SK. MicroRNA function in cancer: Oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28: 369–378.
- [16] ZHANG B, PAN X, COBB GP, ANDERSON TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302: 1–12.
- [17] DU RIEU MC, TORRISANI J, SELVES J, AL SAATI T, SOUQUE A, et al. MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin Chem* 2010; 56: 603–612.
- [18] LE LARGE TYS, MEIJER LL, MATO PRADO M, KAZEMIER G, FRAMPTON AE, et al. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for pancreatic cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2015; 15: 1525–1529.
- [19] SZAFRANSKA AE, DOLESHAL M, EDMUNDS HS, GORDON S, LUTTGES J, et al. Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clin Chem* 2008; 54: 1716–1724.
- [20] LINK A, BECKER V, GOEL A, WEX T, MALFERTHEINER P. Feasibility of fecal microRNAs as novel biomarkers for pancreatic cancer. *PLoS ONE* 2012; 7.
- [21] LIU A, XU X. MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2011; 724: 259–267.
- [22] NEGOI I, HOSTIUC S, SARTELLI M, NEGOI RI, BEURAN M. MicroRNA-21 as a prognostic biomarker in patients with pancreatic cancer - A systematic review and meta-analysis. *Am J Surg* 2017; 214: 515–524.
- [23] JAMIESON NB, MORRAN DC, MORTON JP, ALI A, DICKSON EJ, et al. MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2012; 18: 534–545.
- [24] KONG X, DU Y, WANG G, GAO J, GONG Y, et al. Detection of differentially expressed microRNAs in serum of pancreatic ductal adenocarcinoma patients: miR-196a could be a potential marker for poor prognosis. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 602–609.
- [25] PAPACONSTANTINO IG, MANTA A, GAZOULI M, LYBEROPOULOU A, LYKOURDIS PM, et al. Expression of microRNAs in patients with pancreatic cancer and its prognostic significance. *Pancreas* 2013; 42: 67–71.



- [26] MIKAMORI M, YAMADA D, EGUCHI H, HASEGAWA S, KISHIMOTO T, et al. MicroRNA-155 Controls Exosome Synthesis and Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Sci Rep* 2017; 7: 42339.
- [27] GREITHER T, GROCHOLA LF, UDELNOW A, LAUTENSCHLÄGER C, WÜRL P, et al. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer* 2010; 126: 73–80.
- [28] YU Q, XU C, YUAN W, WANG C, ZHAO P, et al. Evaluation of Plasma MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Pancreatic Adenocarcinoma: miR-196a and miR-210 Could Be Negative and Positive Prognostic Markers, Respectively. *BioMed Res Int* 2017; 2017: 6495867.
- [29] DENG S, ZHU S, WANG B, LI X, LIU Y, et al. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer demonstrate active epithelial-mesenchymal transition profile, regulated by miR-217-SIRT1 pathway. *Cancer Lett* 2014; 355: 184–191.
- [30] BLOOMSTON M, FRANKEL WL, PETROCCA F, VOLINIA S, ALDER H, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *J Am Med Assoc* 2007; 297: 1901–1908.
- [31] POPOV A, SZABO A, MANDYS V. Small nucleolar RNA U91 is a new internal control for accurate microRNAs quantification in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2015; 15: 774.
- [32] PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 45e–45.
- [33] HONG TH, PARK IY. MicroRNA expression profiling of diagnostic needle aspirates from surgical pancreatic cancer specimens. *Ann Surg Treat Res* 2014; 87: 290.
- [34] WANG J, CHEN J, CHANG P, LEBLANC A, LI D, et al. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res Phila Pa* 2009; 2: 807–813.
- [35] ZHANG Y, LI M, WANG H, FISHER WE, LIN PH, et al. Profiling of 95 MicroRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J Surg* 2009; 33: 698–709.
- [36] SZAFRANSKA AE, DAVISON TS, JOHN J, CANNON T, SIPOS B, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2007; 26: 4442–4452.
- [37] DU RIEU MC, TORRISANI J, SELVES J, AL SAATI T, SOUQUE A, et al. MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin Chem* 2010; 56: 603–612.
- [38] KENT OA, MULLENDRE M, WENTZEL EA, LÓPEZ-ROMERO P, TAN AC, et al. A resource for analysis of microRNA expression and function in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 2013–2024.
- [39] YU S, LU Z, LIU C, MENG Y, MA Y, et al. miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2010; 70: 6015–6025.
- [40] FENG J, YU J, PAN X, LI Z, CHEN Z, et al. HERG1 functions as an oncogene in pancreatic cancer and is downregulated by miR-96. *Oncotarget* 2014; 5: 5832–5844.
- [41] HANOUN N, DELPU Y, SURIAWINATA AA, BOURNET B, BUREAU C, et al. The Silencing of MicroRNA 148a Production by DNA Hypermethylation Is an Early Event in Pancreatic Carcinogenesis. *Clin Chem* 2010; 56: 1107–1118.

- [42] LUBEZKY N, LOEWENSTEIN S, BEN-HAIM M, BRAZOWSKI E, MARMOR S, et al. MicroRNA expression signatures in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Surgery* 2013; 153: 663–672.
- [43] WANG J, RAIMONDO M, GUHA S, CHEN J, DIAO L, et al. Circulating microRNAs in Pancreatic Juice as Candidate Biomarkers of Pancreatic Cancer. *J Cancer* 2014; 5: 696–705.
- [44] LUTHRA R, SINGH RR, LUTHRA MG, LI YX, HANNAH C, et al. MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene* 2008; 27: 6667–6678.
- [45] LEE YS, KIM H, KIM HW, LEE J-C, PAIK K-H, et al. High Expression of MicroRNA-196a Indicates Poor Prognosis in Resected Pancreatic Neuroendocrine Tumor. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94:e2224.
- [46] XU YF, HANNAFON BN, ZHAO YD, POSTIER RG, DING WQ. Plasma exosome miR-196a and miR-1246 are potential indicators of localized pancreatic cancer. *Oncotarget* 2017; 8: 77028–77040.
- [47] MA MZ, KONG X, WENG MZ, CHENG K, GONG W, et al. Candidate microRNA biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma: meta-analysis, experimental validation and clinical significance. *J Exp Clin Cancer Res* 2013; 32: 71.
- [48] SCHULTZ NA, WERNER J, WILLENBROCK H, ROSLIND A, GIESE N, et al. MicroRNA expression profiles associated with pancreatic adenocarcinoma and ampullary adenocarcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2012; 25: 1609–1622.
- [49] QI L, BART J, TAN LP, PLATTEEL I, VAN DER SLUIS T, et al. Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. *BMC Cancer* 2009; 9.
- [50] HO AS, HUANG X, CAO H, CHRISTMAN-SKIELLER C, BENNEWITH K, et al. Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl Oncol* 2010; 3: 109–113.
- [51] HUANG X, LE Q-T, GIACCIA AJ. MiR-210--micromanager of the hypoxia pathway. *Trends Mol Med* 2010; 16: 230–237.
- [52] ZHAO WG, YU SN, LU ZH, MA YH, GU YM, et al. The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS. *Carcinogenesis* 2010; 31: 1726–1733.
- [53] FENG H, WANG Y, SU J, LIANG H, ZHANG C-Y, et al. MicroRNA-148a Suppresses the Proliferation and Migration of Pancreatic Cancer Cells by Down-regulating ErbB3: *Pancreas* 2016; 45: 1263–1271.
- [54] CHANG X, YU C, LI J, YU S, CHEN J. hsa-miR-96 and hsa-miR-217 Expression Down-Regulates with Increasing Dysplasia in Pancreatic Intraepithelial Neoplasias and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Int J Med Sci* 2017; 14: 412–418.
- [55] HABBE N, KOORSTRA JBM, MENDELL JT, OFFERHAUS GJ, JI KR, et al. MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 340–346.
- [56] FRAMPTON AE, CASTELLANO L, COLOMBO T, GIOVANNETTI E, KRELL J, et al. MicroRNAs cooperatively inhibit a network of tumor suppressor genes to promote pancreatic tumor growth and progression. *Gastroenterology* 2014; 146: 268-277.e18.
- [57] GIOVANNETTI E, FUNEL N, PETERS GJ, DEL CHIARO M, EROZENCI LA, et al. MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects

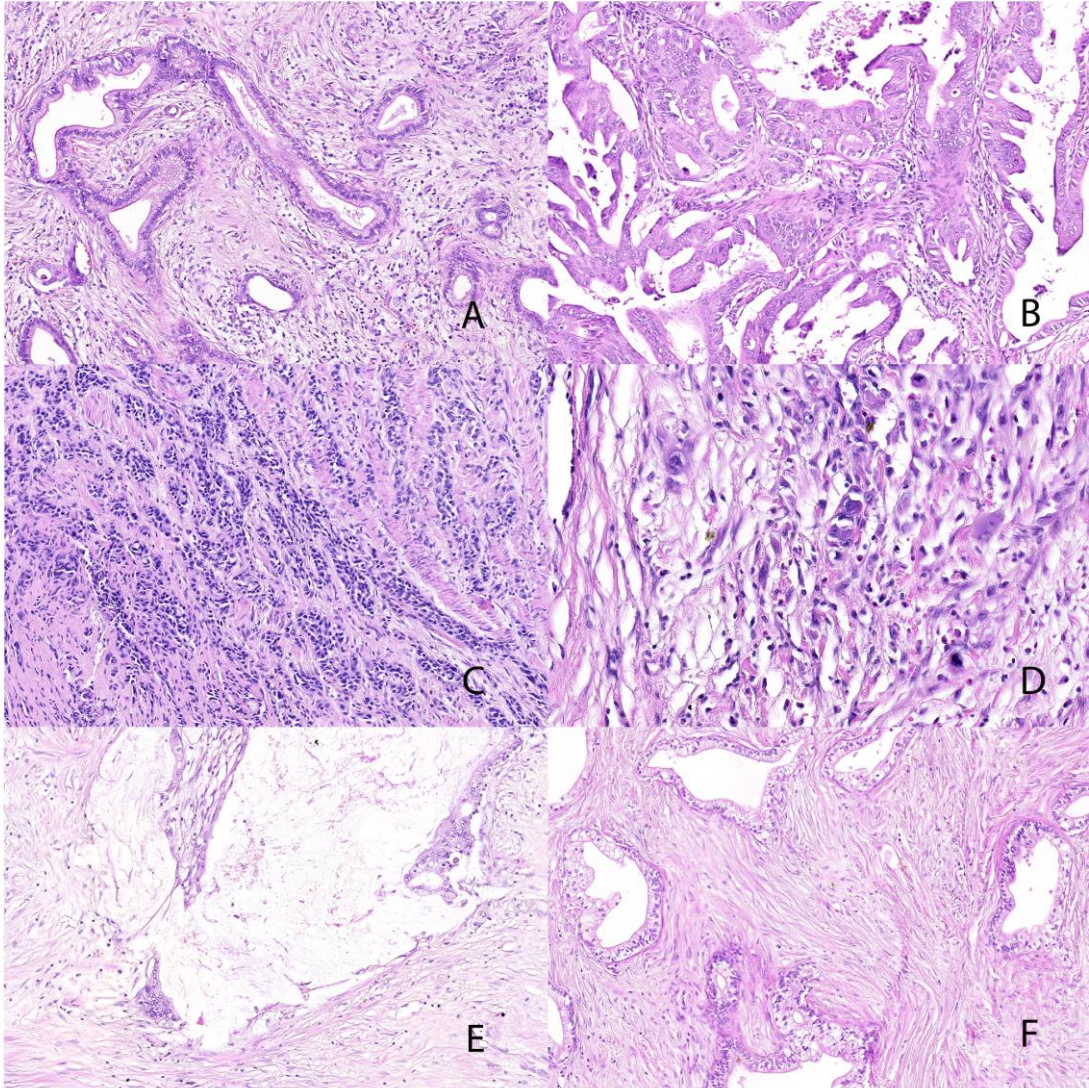
- underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer Res* 2010; 70: 4528–4538.
- [58] DILLHOFF M, LIU J, FRANKEL W, CROCE C, BLOOMSTON M. MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract* 2008; 12: 2171–2176.
- [59] SCHULTZ NA, ANDERSEN KK, ROSLIND A, WILLENBROCK H, WØJDEMANN M, et al. Prognostic MicroRNAs in Cancer Tissue from Patients Operated for Pancreatic Cancer—Five MicroRNAs in a Prognostic Index. *World J Surg* 2012; 36: 2699–2707.
- [60] SUH N. MicroRNA controls of cellular senescence. *BMB Rep* 2018; 51: 493–499.
- [61] BALLEHANINNA UK, CHAMBERLAIN RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J Gastrointest Oncol* 2012; 3: 105–119.
- [62] WALD P, LIU XS, PETTIT C, DILLHOFF M, MANILCHUK A, et al. Prognostic value of microRNA expression levels in pancreatic adenocarcinoma: a review of the literature. *Oncotarget* 2017; 8: 73345–73361.
- [63] HU G, TAO F, WANG W, JI K. Prognostic value of microRNA-21 in pancreatic ductal adenocarcinoma: a meta-analysis. *World J Surg Oncol* 2016; 14: 82.
- [64] ZHU W, XU B. MicroRNA-21 Identified as Predictor of Cancer Outcome: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0103373.
- [65] FRAMPTON AE, KRELL J, JAMIESON NB, GALL TMH, GIOVANNETTI E, et al. microRNAs with prognostic significance in pancreatic ductal adenocarcinoma: A meta-analysis. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2015; 51: 1389–1404.
- [66] KARASEK P, GABLO N, HLAVSA J, KISS I, VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA P, et al. Pre-operative Plasma miR-21-5p Is a Sensitive Biomarker and Independent Prognostic Factor in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Undergoing Surgical Resection. *Cancer Genomics Proteomics*. 2018;15: 321–327.
- [67] CALATAYUD D, DEHLENDORFF C, BOISEN MK, HASSELBY JP, SCHULTZ NA, et al. Tissue MicroRNA profiles as diagnostic and prognostic biomarkers in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma and periampullary cancers. *Biomark Res* 2017; 5: 8.
- [68] KHAN K, CUNNINGHAM D, PECKITT C, BARTON S, TAIT D, et al. miR-21 expression and clinical outcome in locally advanced pancreatic cancer: exploratory analysis of the pancreatic cancer Erbitux, radiotherapy and UFT (PERU) trial. *Oncotarget* 2016; 7: 12672–12681.
- [69] DONAHUE TR, NGUYEN AH, MOUGHAN J, LI L, TATISHCHEV S, et al. Stromal MicroRNA-21 Levels Predict Response to 5-Fluorouracil in Patients with Pancreatic Cancer. *J Surg Oncol* 2014; 110: 952–959.
- [70] KADERA BE, LI L, TOSTE PA, WU N, ADAMS C, et al. MicroRNA-21 in pancreatic ductal adenocarcinoma tumor-associated fibroblasts promotes metastasis. *PloS One* 2013; 8:e71978.
- [71] LI C, DU X, TAI S, ZHONG X, WANG Z, et al. GPC1 Regulated by miR-96-5p, Rather than miR-182-5p, in Inhibition of Pancreatic Carcinoma Cell Proliferation. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 6314–6327.
- [72] VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA P, KISS I, KLUSOVA S, HLAVSA J, PROCHAZKA V, et al. MiR-21, miR-34a, miR-198 and miR-217 as diagnostic and prognostic biomarkers for chronic

- pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Diagn Pathol* 2015; 10. doi:10.1186/s13000-015-0272-6.
- [73] ZHOU X, HUANG Z, XU L, ZHU M, ZHANG L et al. A panel of 13-miRNA signature as a potential biomarker for predicting survival in pancreatic cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 69616–69624.
- [74] LIANG L, WEI DM, LI JJ, LUO DZ, CHEN G et al. Prognostic microRNAs and their potential molecular mechanism in pancreatic cancer: A study based on The Cancer Genome Atlas and bioinformatics investigation. *Molecular medicine reports* 2018; 17: 939–951.
- [75] [SHI XH](#), [LI X](#), [ZHANG H](#), [HE RZ](#), [ZHAO Y](#), [ZHOU M](#) et al. A Five-microRNA Signature for Survival Prognosis in Pancreatic Adenocarcinoma based on TCGA Data. *Sci Rep* 2018; 16: 7638.
- [76] YOU L, WANG J, ZHANG F, ZHANG J, TAO H et al. Potential four-miRNA signature associated with T stage and prognosis of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma identified by co-expression analysis. *Molecular medicine reports* 2019; 19: 441–451.
- [77] ANAYA J. OncoLnc: linking TCGA survival data to mRNAs, miRNAs, and lncRNAs. *PeerJ Comput. Sci.* 2016; 2: e67.
- [78] MAXWELL GL, SHOJI Y, DARCY K. MicroRNAs in endometrial cancers from black and white patients. *Am J Obstet Gynecol.* 2015; 212: 191.e1-10.
- [79] BOISEN MK, DEHLENDORFF C, LINNEMANN D, SCHULTZ NA, JENSEN BV, HØGDALL EV and JOHANSEN JS. MicroRNA Expression in Formalin-fixed Paraffin-embedded Cancer Tissue: Identifying Reference MicroRNAs and Variability. *BMC Cancer* 2015; 15, 1024.
- [80] VOJTECHOVA Z, ZAVADIL J, KLOZAR J, GREGA M, TACHEZY R. Comparison of the miRNA expression profiles in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tonsillar tumors. *PLoS One* 2017; 12: e0179645.
- [81] LE LARGE TY, MEIJER LL, PRADO MM, KAZEMIER G, FRAMPTON AE, GIOVANNETTI E. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for pancreatic cancer, *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2015; 15: 1525-1529,
- [82] CARLSSON J, DAVIDSSON S, FRIDFELDT J, GIUNCHI F, FIANO V, et al. Quantity and quality of nucleic acids extracted from archival formalin fixed paraffin embedded prostate biopsies. *BMC Medical Research Methodology* 2018; 18: 161.
- [83] SZAFRANSKA AE, DAVISON TS, SHINGARA J, DOLESHAL M, RIGGENBACH JA et al. Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling. *J Mol Diagn.* 2008; 10: 415–423.
- [84] MESTDAGH P, HARTMANN N, BAERISWYL L, ANDREASEN D, BERNARD N, et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods.* 2014; 11: 809-815.

**Figure legend.**

**Figure 1.** Growth patterns in PDAC.

**A** – tubular (20x magnification). **B** – cribriform (20x). **C**- solid trabecular (20x). **D** – dissociative (40x). **E** – mucinous (20x). **F**– clear cell (20x).



**Tables.****Table 1. Stem-loop primers for the miRNAs.**

miRNA name:	Stem-loop Primer sequence:
miR-39 C. elegans	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACTATTAC
mir-21	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACTCAACA
miR-96	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACAGCAAAAATGTG
miR-148a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACAGTCGGAG
miR-155	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACACCCCTATCACG
miR-196a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACCCCAACAACATG
miR-210	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACTCAGCCGCTGTC
miR-217	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACTCCAATCAGTTC

**Table 2. Real-time qPCR primers.**

Primer name:	Primer sequence:
Universal primer	ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
mir-39 C. elegans	GCGGCGGAGCTGATTCGTCTTG
mir-21	GCGGCGGTAGCTTATCAGACTG
miR-96	GCGGCGGTTTGGCACTAGCAC
miR-148a	GCGGCGGAAAGTTCTGAGACTCC
miR-155	GCGGCGGTTAATGCTAATCGTG
miR-196a	GCGGCGGTAGGTAGTTTCATGTTG
miR-210	GCGGCGGCTGTGCGTGTGACAG
miR-217	GCGGCGGTAATGCTAATCGTG

**Table 3. Clinico-pathological characteristics of 54 PDAC patients.**

Age (Median)	63
Gender (male/female)	27/27
Tumor grade (1/2/3)	4/27/23
Tumor stage (pT1/T2/T3/T4)	4/7/41/2
Lymph node metastasis (N1/N0)	37/16
Perineural invasion (yes/no)	47/7
Lymph vessel invasion (yes/no)	29/25
Resection margin (R1/R0)	14/40
PFS length (in months)	0-81
median	13
OS length (in months)	5-81
median	19

**Table 4. Average miRNAs fold change values in pancreatic cancers in comparison with normal tissues.** Data are presented as means  $\pm$  standard deviation (SD). Negative fold change values indicate downregulation of the miRNAs in cancer samples. P-value  $p < 0.05$  is considered as statistically significant. P-values of the Wilcoxon's test for the significant differences are shown in bold. \*Expression of miR-217 was not detected in 15 PDACs.

miRNAs	miRNAs expression fold change		
	Min	Max	Mean $\pm$ SD
miR-21	-16.12	72.62	12.01 $\pm$ 14.242 <b>p&lt;0.001</b>
miR-96	-18.52	6.22	-1.42 $\pm$ 3.981 <b>p&lt;0.001</b>
miR-148a	-55.56	42.3	-1.63 $\pm$ 10.762 p=0.08
miR-155	-13.16	232.36	22.91 $\pm$ 38.526 <b>p&lt;0.001</b>
miR-196a	-15.38	25.9	0.913 $\pm$ 5.574 p=0.91
miR-210	-4.0	181.38	15.68 $\pm$ 28.869 <b>p&lt;0.001</b>
miR-217	-100 (0*)	15.87	-7.45 $\pm$ 16.537 <b>p&lt;0.001</b>
<b>Total number of patients 54</b>			



**Table 5. Correlation of expression levels between different miRNAs.** Values of the Spearman rank correlation ( $\rho$ ) for the significant differences are shown in bold. P-value  $p < 0.05$  is considered as statistically significant. They are shown in bold, too.

**Values of the Spearman rank correlation.**

	miR-21	miR-96	miR-148a	miR-155	miR-196a	miR-210	miR-217
<b>miR-21</b>	1 $p=0$	0.11 $p=0.39$	0.12 $p=0.41$	<b>0.48</b> <b><math>p &lt; 0.001</math></b>	0.18 $p=0.21$	<b>0.36</b> <b><math>p &lt; 0.01</math></b>	-0.04 $p=0.77$
<b>miR-96</b>	0.11 $p=0.39$	1 $p=0$	0.11 $p=0.42$	0.12 $p=0.40$	<b>0.43</b> <b><math>p &lt; 0.01</math></b>	-0.004 $p=0.97$	0.02 $p=0.92$
<b>miR-148a</b>	0.12 $p=0.41$	0.11 $p=0.42$	1 $p=0$	0.09 $p=0.54$	-0.16 $p=0.26$	0.08 $p=0.55$	<b>0.28</b> <b><math>p=0.048</math></b>
<b>miR-155</b>	<b>0.48</b> <b><math>p &lt; 0.001</math></b>	0.12 $p=0.40$	0.09 $p=0.54$	1 $p=0$	-0,06 $p=0.66$	<b>0.30</b> <b><math>p=0.03</math></b>	-0.11 $p=0.43$
<b>miR-196a</b>	0.18 $p=0.21$	<b>0.43</b> <b><math>p &lt; 0.01</math></b>	-0.16 $p=0.26$	-0.06 $p=0.$	1 $p=0$	0.05 $p=0.74$	0.04 $p=0.77$
<b>miR-210</b>	<b>0.36</b> <b><math>p &lt; 0.01</math></b>	-0.004 $p=0.97$	0.08 $p=0.55$	<b>0.30</b> <b><math>p=0.03</math></b>	0.05 $p=0.74$	1 $p=0$	-0.06 $p=0.69$
<b>miR-217</b>	-0.04 $p=0.77$	0.02 $p=0.92$	<b>0.28</b> <b><math>p=0.048</math></b>	-0.11 $p=0.43$	0.04 $p=0.77$	-0.06 $p=0.69$	1 $p=0$

**Table 6. Correlation of clinico-pathological characteristics with miRNAs expression levels.**

Values of the Spearman rank correlation ( $\rho$ ) were used to assess the relationship of morphological tumor parameters with miRNAs expression. P-value  $p < 0.05$  is considered as statistically significant. This value is shown in bold.

miRNA	Patient parameters						
	Age	Grade	Tumor	Lymph node metastasis	Perineural invasion	Vascular invasion	Resection margin
<b>miR-21</b>	0.22 $p=0.12$	0.14 $p=0.33$	0.08 $p=0.55$	-0.06 $p=0.63$	0.02 $p=0.85$	0.01 $p=0.92$	-0.03 $p=0.78$
<b>miR-96</b>	0.03 $p=0.80$	0.003 $p=0.98$	0.14 $p=0.31$	0.22 $p=0.11$	0.07 $p=0.62$	-0.05 $p=0.70$	0.05 $p=0.71$
<b>miR-148a</b>	-0.09 $p=0.48$	-0.15 $p=0.28$	-0.006 $p=0.96$	0.12 $p=0.37$	0.05 $p=0.69$	-0.09 $p=0.52$	0.15 $p=0.25$
<b>miR-155</b>	0.19 $p=0.18$	0.02 $p=0.85$	0.14 $p=0.31$	0.0243 $p=0.86$	0.16 $p=0.24$	-0.006 $p=0.96$	-0.09 $p=0.49$
<b>miR-196a</b>	0.14 $p=0.31$	0.05 $p=0.72$	0.15 $p=0.29$	0.16 $p=0.26$	-0.08 $p=0.53$	0.02 $p=0.89$	0.19 $p=0.14$
<b>miR-210</b>	0.35 <b><math>P &lt; 0.01</math></b>	0.03 $p=0.82$	0.03 $p=0.80$	0.03 $p=0.81$	0.09 $p=0.53$	-0.01 $p=0.89$	0.02 $p=0.83$
<b>miR-217</b>	-0.24 $p=0.07$	-0.06 $p=0.66$	0.15 $p=0.26$	0.01 $p=0.91$	0.04 $p=0.74$	-0.21 $p=0.13$	0.09 $p=0.48$

**Table 7. Correlation of microscopic tumor growth patterns, nuclear atypia and mitotic activity with miRNAs expression levels.**

Values of the Spearman rank correlation ( $\rho$ ) were used to assess the relationship of morphological tumor parameters with miRNAs expression. P-value  $p < 0.05$  is considered as statistically significant. They are shown in bold.

Tumor parameters	miRNAs						
	miR-21	miR-96	miR-148a	miR-155	miR-196a	miR-210	miR-217
Tubular pattern	-0.06 $p=0.64$	0.20 $p=0.14$	0.39 <b><math>p &lt; 0.01</math></b>	-0.18 $p=0.18$	0.07 $p=0.56$	-0.17 $p=0.21$	0.28 $p=0.03$
Cribriform pattern	-0.003 $p=0.98$	0.049 $p=0.72$	0.010 $p=0.93$	0.06 $p=0.63$	-0.07 $p=0.60$	0.16 $p=0.23$	-0.07 $p=0.60$
Solid trabecular	0.027 $p=0.84$	-0.09 $p=0.49$	-0.21 $p=0.12$	0.15 $p=0.26$	-0.06 $p=0.65$	-0.01 $p=0.92$	-0.10 $p=0.44$
Dissociative pattern	-0.04 $p=0.74$	-0.08 $p=0.55$	-0.28 <b><math>p=0.033</math></b>	0.03 $p=0.77$	-0.05 $p=0.67$	0.01 $p=0.93$	-0.11 $p=0.41$
Clear cell pattern	0.158 $p=0.25$	0.051 $p=0.70$	-0.005 $p=0.9$	0.17 $p=0.21$	0.09 $p=0.47$	0.19 $p=0.14$	-0.15 $p=0.27$
Nuclear atypia	0.09 $p=0.50$	-0.038 $p=0.78$	-0.30 <b><math>p=0.02</math></b>	0.11 $p=0.40$	-0.05 $p=0.71$	0.04 $p=0.75$	-0.01 $p=0.89$
Mitotic activity	0.18 $p=0.16$	-0.16 $p=0.22$	-0.10 $p=0.45$	0.27 <b><math>p=0.046</math></b>	-0.01 $p=0.89$	0.08 $p=0.54$	-0.24 $p=0.07$

**Table 8. Overall survival and miRNAs expression levels in PDAC patients.**

Cox proportional-hazards model was utilized to estimate prognostic functions of miRNAs. P-value of  $p < 0.05$  is considered as statistically significant.

<i>miRNA</i>	Parameter Estimate	Standard Error	Chi-Square	P-value	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
miR-21	0.004	0.01	0.156	0.69	1.004	0.984	1.025
miR-96	0.023	0.143	0.026	0.87	1.023	0.772	1.356
miR-148a	0.003	0.022	0.023	0.87	1.003	0.961	1.048
miR-155	0.002	0.004	0.556	0.45	1.003	0.995	1.011
miR-196a	-0.017	0.045	0.147	0.70	0.983	0.899	1.074
miR-210	0.004	0.005	0.699	0.40	1.004	0.994	1.014
miR-217	0.07	0.08	0.776	0.37	1.073	0.917	1.255

**Table 9. Progression-free survival and miRNAs expression levels in PDAC patients.**

Cox proportional hazards model was used to estimate prognostic functions of miRNAs. P-value  $p < 0.05$  is considered as statistically significant.

<i>miRNA</i>	Parameter Estimate	Standard Error	Chi-Square	P-value	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
miR-21	0.007	0.009	0.502	0.47	1.007	0.988	1.027
miR-96	0.014	0.131	0.011	0.91	1.014	0.783	1.313
miR-148a	0.046	0.024	3.605	0.06	1.047	0.999	1.099
miR-155	0.003	0.003	0.991	0.31	1.004	0.997	1.011
miR-196a	-0.029	0.043	0.440	0.50	0.971	0.892	1.058
miR-210	0.005	0.004	1.527	0.21	1.006	0.997	1.015
miR-217	0.047	0.076	0.387	0.53	1.049	0.903	1.218

**Supplementary table 1. Relationship between miRNA expression and patient overall survival.**

Univariate Cox regression analysis was performed after logarithmic transformation of the miRNA expression data. Clinical information and miRNA expression data were retrieved from the TCGA portal ([gdc.cancer.gov](http://gdc.cancer.gov)) and from the oncolnc.org website [74]. P-value  $p < 0.05$  is considered as statistically significant.

	B	SE	Wald	df	Sig (p).	HR	95,0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
miR-21-5p	0,175	0,34	0,267	1	0,606	1,192	0,613	2,318
miR-96-5p	-0,066	0,146	0,207	1	0,649	0,936	0,704	1,245
miR-148a-5p	-0,098	0,159	0,377	1	0,539	0,907	0,664	1,239
miR-155-5p	0,241	0,203	1,406	1	0,236	1,272	0,854	1,895
miR-196a-5p	0,138	0,076	3,302	1	0,069	1,148	0,989	1,331
miR-217	0,026	0,051	0,258	1	0,611	1,026	0,928	1,135

**Supplementary table 2. Composition of panels containing the most significant miRNAs for patient survival.**

Review of literature identified several publications analysing TCAG data to select prognostically significant miRNAs.

Composition of prognostic panels for PDAC	Author
" <u>protective</u> " miRNAs: miR-103-2, miR-125a, miR-126, miR-328, miR-340, miR-361, miR-374b, miR-454, miR-627 and miR-664	[73]
" <u>risky</u> " miRNAs: miR-193b, miR-21 and miR-584	
miR-1301, miR-125a, miR-376c, miR-328 and miR-376b	[74]
miR-203, miR-424, miR-1266, miR-1293 and miR-4772	[75]
miR-1197, miR-218-2, miR-889 and miR-487a	[76]