

**UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE**

Rigorózní práce

Praha 2016

Kristýna Hudcová



UNIVERZITA KARLOVA



Přírodovědecká fakulta
UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA BIOCHEMIE

**Studium mikroRNA u pacientů se spinocelulárními karcinomy
hlavy a krku**

**Study of the microRNAs in patients with head and neck squamous
cell carcinoma**

Rigorózní práce
Kristýna Hudcová

Praha 2016

Abstrakt

Hledání markerů nemocí je v popředí vědeckého zájmu. Biomarker specifické nemoci by měl sloužit jako pomocník při léčbě dané nemoci – ať už pro diagnostiku onemocnění nebo pro prognózu jejího průběhu. V naší studii jsme se zaměřili na využití mikroRNA – krátkých RNA, které svým nasedáním na mRNA regulují průběh exprese jednotlivých proteinů. MiRNA jsou předmětem studia díky jejich stabilitě a funkci v regulaci mnoha buněčných procesů. V neposlední řadě mají možné uplnatění jako biomarker u mnoha onemocnění. V našem případě to jsou spinocelulární nádory hlavy a krku (HNSCC). Jelikož je tento druh nádorového onemocnění široce rozšířen a klinicky významné markery zde chybí, je naším zájmem hledat nové druhy markerů, umožňujících včasnou diagnostiku nemoci a co nejpřesnější stanovení prognózy.

Vybrali jsme 3 kandidátní miRNA (miR-29c-3p, miR-200b-5p, miR-375-3p), u kterých jsme metodou qRT-PCR provedli profilaci jejich exprese ve tkáních pacientů s HNSCC. Expresi miRNA ve 42 vzorcích nádorové tkáně jsme porovnali s expresí miRNA ve tkáních přiléhajících k nádoru. Tkáň obklopující nádor je zajímavá z hlediska svých vlastností, histologicky vypadá jako tkáň zdravá, ale při bližším zkoumání tomu tak není. Je ovlivněna tkání nádorovou a může přispívat k progresi nádoru. Podařilo se nám rozlišit tyto dvě tkáně pomocí miR-29c-3p a miR-375-3p. Další analýzy byly zaměřené na expresi miRNA korelovanou s klinicko-patologickými stavy pacientů jako je souvislost s pozitivním nálezem na uzlinách (miR-200b-5p) a souvislost s gradingem nádoru (miR-29c-3p, miR-200b-5p). U provedených analýz přežití byla identifikována exprese miR-29c, která se ukázala jako možný prognostický marker. Celkově jsou tyto výsledky přínosné pro možné budoucí využití miRNA jakožto diagnostických a prognostických biomarkerů HNSCC.

Abstract

Searching for markers of disease is at the forefront of scientific interest. Biomarker of a specific disease should help in disease management - whether for diagnosing a disease or predicting its progress. We picked microRNAs - short RNAs that regulate mRNA translation, due to their stability and function in the regulation of many cellular processes. Therefore they can be used as a biomarker for many diseases. In our study we focused on neck squamous cell carcinoma (HNSCC), since this type of cancer is widespread and clinically important markers are missing. It is in our interest to seek new kinds of markers, suitable for early diagnosis of the disease and the most accurate assessment of prognosis.

We selected 3 candidate miRNA (miR-29c-3p, miR-200b-5p, miR-375-3p) and used qRT-PCR method to profile their expression in tissues of patients with HNSCC. MiRNA expressions in 42 tumor samples were compared with the miRNA expression in adjacent tissue of the tumor. Adjacent tissue surrounds the tumor and has interesting properties, as it looks like a histological normal tissue, but on closer inspection it is not. It is affected by tumor tissue and may contribute to tumor progression. We managed to distinguish between these two tissues using miR-29c-3p and miR-375-3p. Additional analyzes were focused on miRNA expression and their correlation with clinic-pathological condition of the patient. We found the link between node positivity and expression of miR-200b-5p. MiR-29c-3p and miR-200b-5p were associated with tumor grade. Survival analysis revealed connection between miR-29c-3p and patients prognosis. Overall, these results are useful for assessment of selected miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers of HNSCC.

Seznam zkratek

HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
miRNA	mikroRNA
OPC	oral and pharyngeal cancer
HPV	human papillomavirus
TIL	tumor-infiltrating lymphocytes
TAM	tumor-associated macrophages
MSC	mesenchymal stem cells
CAF	cancer-associated fibroblast
ECM	extracelulární matrix
P	nádor-přilehlá tkáň
N	nádorová tkáň
nt	nukleotidy
3'UTR	3' untranslated region
pri-miRNA	primární miRNA
pre-miRNA	prekurzorová miRNA
RISC	RNA induced silencing komplex
mRNA	mesengerová RNA
EMT	epiteliálně-mezenchymální tranzice
ZEB1	zinc-finger E-box-binding homeobox 1
MSN	Membrane-Organizing Extension Spike Protein
FHOD1	Formin Homology 2 Domain Containing 1
CTNNB1	Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1
PLCG1	Phospholipase C Gamma 1
SEC23A	Sec23 Homolog A, Coat Complex II Component
CXCL1	C-X-C Motif Chemokine Ligand 1
PITX1	Paired Like Homeodomain 1
CDH1	Cadherin 1
CRB3	Crumbs 3, Cell Polarity Complex Component
PATJ	Protein Associated To Tight Junctions
LLGL2	Lethal Giant Larvae Homolog 2
cDNA	komplementární DNA
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová reakce v reálném čase

ROC	receiver-operator curves
ANOVA	analysis of variance
AUC	area under curves
PR	poměr rizik
CIP2A	cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A
MYC	V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Martině Raudenské, PhD za cenné rady a možnosti diskuze nad touto prací, dále RNDr. Michalu Masaříkovi, PhD za věcné připomínky při sepisování této práce. Také bych ráda poděkovala svým rodičům a Vítkovi za jeho celkovou podporu.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji rigorózní práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 1. 12. 2016

.....

Jméno Příjmení

Obsah

1.	Teoretický úvod.....	10
1.1.	Spinocelulární nádory hlavy a krku.....	10
1.2.	Diagnostika a léčba HNSCC	10
1.3.	Nádorová tkáň.....	11
1.4.	Tkáň přiléhající k nádoru.....	12
1.5.	MiRNA	13
1.5.1.	Biogeneze miRNA	13
1.5.2.	Funkce miRNA	14
1.5.2.1.	Tumor-supresorové miRNA	15
1.5.2.2.	OnkomiRNA.....	15
1.5.3.	MiR-29c-3p	15
1.5.4.	MiR-200b-5p.....	15
1.5.5.	MiR-375-3p.....	16
2.	Cíle práce.....	18
3.	Materiál a metody.....	19
3.1.	Příprava vzorku.....	19
3.2.	Izolace RNA, qRT-PCR	19
3.3.	Normalizace a vyhodnocení dat	20
4.	Výsledky.....	21
4.1.	Klinicko-patologická charakterizace vzorků pacientů	21
4.2.	Porovnání expresí studovaných miRNA ve tkáních.....	21
4.3.	Analýza exprimovaných miRNA korelovaná s parametry stádia nádoru	23
4.3.1.	Pozitivita uzlin.....	23
4.3.2.	Tumor grade	23
4.3.3.	Staging.....	24
4.3.4.	Metastázy	24

4.4. Asociace exprese miRNA s přežíváním pacientů.....	24
5. Diskuze.....	26
6. Závěr.....	29
7. Reference.....	30
8. Publikační činnost spojená s touto prací	35
Příloha	36

1. Teoretický úvod

1.1. Spinocelulární nádory hlavy a krku

Rakovina dutiny ústní a hltanu (oral and pharyngeal cancer (OPC)) je klasifikována jako maligní neoplasma rtů, dutiny ústní (jazyk, slinné žlázy, nádory, vyrůstající z kůže, cév, nervů a dalších tkání) a hltanu (orofarynx, nasopharynx a hypofarynx). Celých 90 % těchto nádorů tvoří spinocelulární karcinomy (dlaždicový karcinom, zhoubný nádor vycházející z epitelové tkáně). [1]

Spinocelulární karcinomy hlavy a krku (Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)) jsou šestým nejčastějším typem nádorů, u kterých je i přes nové léčebné přístupy celkové pětileté přežití těchto pacientů pouze 50%, hlavně kvůli vysoké míře recidivy a pokročilému stádiu choroby při diagnóze. [2, 3] V průběhu posledních 30 let se epidemiologie HNSCC rapidně změnila. Zatímco dříve byly tyto nádory častější u starších osob s historií požívání alkoholických a tabákových výrobků, nyní jsou pozorovány u osob ve věku 40-50 let bez této historie. Je to díky zvýšenému výskytu lidského papilomaviru (HPV), který je velkým rizikovým faktorem pro rozvoj HNSCC. Incidenci HNSCC asociovaného s HPV má na svědomí sexuální chování těchto mladších jedinců – nízký věk při prvním pohlavním styku, historie výskytu genitálních bradavic, vysoký počet sexuálních partnerů. [4, 5]

V roce 2015 bylo diagnostikováno odhadem 45 780 pacientů s OPC v USA (z toho 71.3% muži – toto číslo odpovídá 4% všech diagnostikovaných rakovin u mužů) a 8650 úmrtí (69,4% mužů) bude přičítáno OPC. [6] V důsledku těchto znepokojivých údajů je jasné, že je třeba, aby byl nalezen spolehlivý a specifický biomarker tohoto onemocnění – pro diagnózu, prognózu i predikci terapeutické odpovědi.

Pro brzký záchyt HNSCC stále chybí dostatečná screeningová metoda, která by onemocnění dokázala odhalit ve stádiu pre-maligních lézí či raném stádiu kancerogeneze. Účinný marker přítomnosti či progresu HNSCC by mohla být exprese miRNA specifických pro přítomnost nádorové tkáně.

1.2. Diagnostika a léčba HNSCC

Nádory hlavy a krku jsou často diagnostikovány zrakem, pohmatem, přímými a nepřímými endoskopickými metodami. Pro základní popis nádoru a prognózy slouží systém gradingu a stagingu. Jednotlivá nádorová onemocnění mají tento systém modifikován. [7] Grading se

určuje mikroskopicky, je tedy třeba histologický vzorek tkáně a popisuje diferencovanost nádoru.

Gradingové rozdělení pro HNSCC:

- GX: Grading nelze hodnotit
- G1: Dobře diferencovaný
- G2: Středně diferencovaný
- G3: Málo diferencovaný
- G4: Nediferencovaný

Staging popisuje rozsah nádoru, pro nějž používá systém TNM vyvinutý AJCC (American Point Committee on Cancer):

- T: velikost tumoru číselným označením
- N: rozšíření na lymfatické uzliny
- M: rozšířenost rakoviny a její metastázy

Metody přinášející informaci o rozšíření postižení (vč. lymfatických uzlin) jsou: rentgen, počítačová tomografie či magnetická rezonance. Metastatické postižení krčních uzlin je velmi časté a pro tuto diagnostiku lze použít sonografii krku. Uzliny postižené nádorem se označují jako pozitivní uzliny.

Léčba pak závisí na povaze nádoru a může zahrnovat: chirurgii, radioterapii, chemoterapii nebo nejčastěji kombinací těchto léčebných postupů. [8]

1.3. Nádorová tkáň

Za fyziologických podmínek je prostředí buňky důkladně regulováno velkým počtem molekul, které zajišťují rovnováhu mezi procesy jako je buněčná proliferace, diferenciace a apoptóza. [9] Narušení stability těchto procesů může vést ke karcinogenezi. Postup karcinogeneze, vedoucí ke vzniku nádoru, je dle Hanahana a Weinberga charakterizován deseti znaky maligní transformace:

- a) soběstačnost v produkci růstových signálů, necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus
- b) tvorba metastáz
- c) poškození apoptózy
- d) neomezený replikační potenciál
- e) posílení angiogeneze
- f) deregulace energetického metabolismu
- g) únik před imunitním systémem

- h) genomová nestabilita
- i) mutace a nádorem vyvolaný zánět.

Poslední dva znaky jsou podmiňující – bez nich by se ostatní podmínky maligní transformace neuskutečnily. [10]

Nádorové mikroprostředí můžeme rozdělit na nádorový parenchym, tvořící vlastní nádorové buňky a nádorové stroma, obsahující nenádorové buněčné i nebuněčné komponenty, které v důsledku působení transformovaných buněk nádoru poskytují podporu pro funkci a růst nádorových buněk. [11] Mezi nenádorové komponenty řadíme buňky imunitního systému: nádor infiltruující T-lymfocyty (tumor-infiltrating lymphocytes – TIL) či s nádorem asociované makrofágy (tumor-associated macrophages – TAM), mezenchymové kmenové buňky (mesenchymal stem cells – MSC), buňky krevních cév, pericyty a s nádorem asociované fibroblasty (cancer-associated fibroblasts – CAF). CAF jsou velmi znatelně spjaty s progresí nádorů. Nebuněčné komponenty nádorového stromatu jsou tvořeny především extracelulární matrix (ECM), v níž jsou soustředěny cytokiny, růstové a angiogenní faktory a různé bioaktivní molekuly. [12] Podstatné pro výsledný tvar a chování nádoru je poměr těchto dvou složek, převažuje-li stroma, nádor je tuhý až tvrdý (tzv. skirhotický), zatímco při převaze parenchymu je nádor měkký (tzv. medulární). Bývá velmi obtížné vymezit prostorové ohraničení nádoru, díky jeho komplexnosti a neustálé komunikaci buněk. Můžeme říct, že nádorovou tkáň obklopuje tkáň zdravá, dle histologického pohledu, tato tkáň je však výrazně ovlivněna přítomností nádoru, což může vést ke změnám expresních profilů oproti tkáni skutečně zdravé.

Nádorové mikroprostředí je rovněž charakterizováno kyslíkovou deprivací – hypoxií až anexií, deprivací glukózy a energie, vysokým množstvím laktátu a extracelulární acidózou. Toto mikroprostředí je do značné míry dáno abnormálním cévním zásobením nádoru a heterogenní mikrocirkulací. [13]

1.4. Tkáň přiléhající k nádoru

Okolí nádorového mikroprostředí není pevně odděleno „přepážkou“, která by razantně separovala nádor stroma a zdravou tkáň. Buňky mezi sebou stále komunikují a tím vytváří „meziprostředí“, které není ani zdravé a ani nádorové. Této tkáni říkáme nádor-přilehlá tkáň (P). Jde o histologicky normální tkáň, která je však parakrinně ovlivněna přítomností nádoru, takže změny v expresi miRNA v této tkáni mohou mít prognostický význam a ukazovat na míru pokročilosti nádoru a některé procesy, které by odhalily pozdější recidivu nádoru v tomtéž místě.

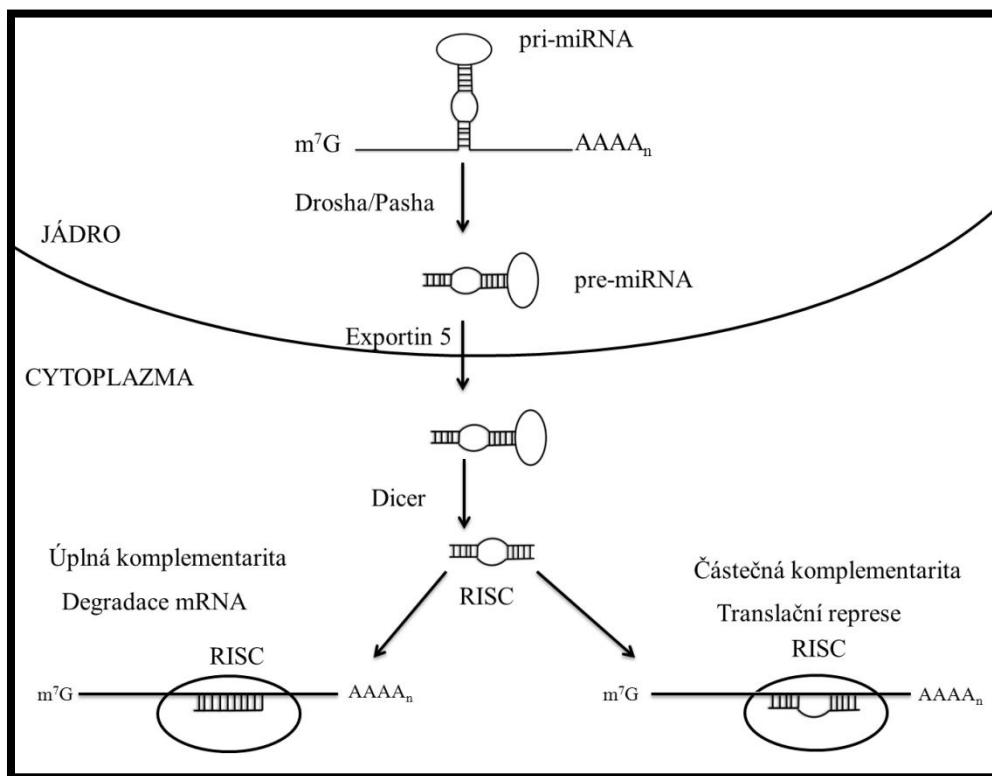
Tato tkáň obsahuje mnoho buněčných komponent, z nichž jsou nejzajímavější fibroblasty, které jsou zde v aktivované formě. Normální zdravé fibroblasty jsou zodpovědné za udržení tkáňové homeostázy a celistvost zdravých tkání. Podílejí se tak na celé řadě biologických procesů, jako je hojení ran a stárnutí. [12] Aktivované fibroblasty mají potenciál vyvolat karcinogenezi díky své vyšší proliferační a sekreční aktivitě, jsou výborným zdrojem pro tvorbu CAF. Nachází se v hojící-se tkáni, stejně jako na hranici tkáně, kde byl chirurgicky odstraněn nádor. Tam může hrát důležitou roli v recidivě nádorového onemocnění. [14, 15] U karcinomu jícnu byla studována miR-21, která svým působením pravděpodobně přispívá k aktivaci fibroblastů, tudíž i k tvorbě nových CAF. [16]

1.5. MiRNA

MiRNA jsou krátké nekódující regulátorové RNA o velikosti okolo 20 nukleotidů (nt), které ovlivňují genovou expresi na posttranskripční úrovni svým nasedáním na 3'UTR úseky cílových mRNA. Od roku 1993, kdy byly objeveny, se zájem o tyto vysoce konzervované modulátory genové exprese stále zvyšuje. [17]

1.5.1. Biogeneze miRNA

Geny pro miRNA obsahují vlastní promotory a přepisují se v jádře z DNA do RNA pomocí RNA polymerázy II. Výsledný primární transkript (pri-miRNA) se za pomoci specifických proteinů (Drosha a Pasha) sestříhává na prekurzorovou miRNA (pre-miRNA), která má podobu vlásenky a je pak transportována do cytoplazmy (pomocí transportního proteinu Exportinu 5). V cytoplasmě je vlásenka štěpena endonukleázou Dicer a první vlákno z vlásenky je degradováno, druhé je zapojeno do multiproteinového komplexu RISC (mi-RNA induced silencing komplex). To, které vlákno bude zapojeno do RISC, rozhoduje, zda je pak molekula nazvána s koncovou -3p nebo -5p. V tomto stádiu se může miRNA vázat na mRNA. Vzniká duplex miRNA-mRNA a stupeň homologie duplexu má pak rozhodující vliv pro konečný regulační účinek molekuly miRNA. Je-li komplementarita bází úplná, dojde k degradaci mRNA, při neúplné komplementaritě může dojít pouze k translační represí mRNA (obr. 1). Tím mRNA nedokončí proces translace – nepřeloží se do proteinové struktury a může nastat represe různých biologických drah týkající se dané mRNA. [18-23]



Obr. 1: Biogeneze miRNA. Primární transkript je v jádře procesován endonukleázami Drosha a Pasha do pre-miRNA, která je pak Exportinem 5 převedena do cytoplasmy. Dicer ihned rozpoznává pre-miRNA, štěpí ji a vmezeřuje do komplexu RISC pouze jedno vlákno (druhé je degradováno). Na základě komplementarity bází pak dojde k degradaci nebo translační represí mRNA.

1.5.2. Funkce miRNA

MiRNA ovlivňují dění v buňce zásadně – degradací cílové mRNA zabrání expresi proteinu, který může být velmi důležitý – buď jako tumor-supresorový protein nebo jako onkogen. Jediná miRNA může cílit až na stovky různých mRNA. [24] Viz obr. 2.

MiRNA jsou zapojeny do buněčných drah na mnoha úrovních jako je apoptóza, autofágie, nekroptóza, proliferace, diferenciace. [25-28] Všechny tyto dráhy mají při svém nefyziologickém chodu možnost účasti na tumorigenezi. Poškození u různých kroků při procesování miRNA může vést ke zvýšené tumorigenezi. [29] Tomuto ději nahrává i fakt, že více než polovina genů pro miRNA se nachází v regionech spojených s nádory nebo na fragilních částech chromozomů, které jsou nejčastěji při tumorigenezi mutovány. [30]

Mnoho studií už prokázalo, že deregulace určitých miRNA jsou velice úzce spojena s patogenezi nádorových onemocnění, vč. HNSCC. [31, 32] Tyto miRNA jsou pak v dané

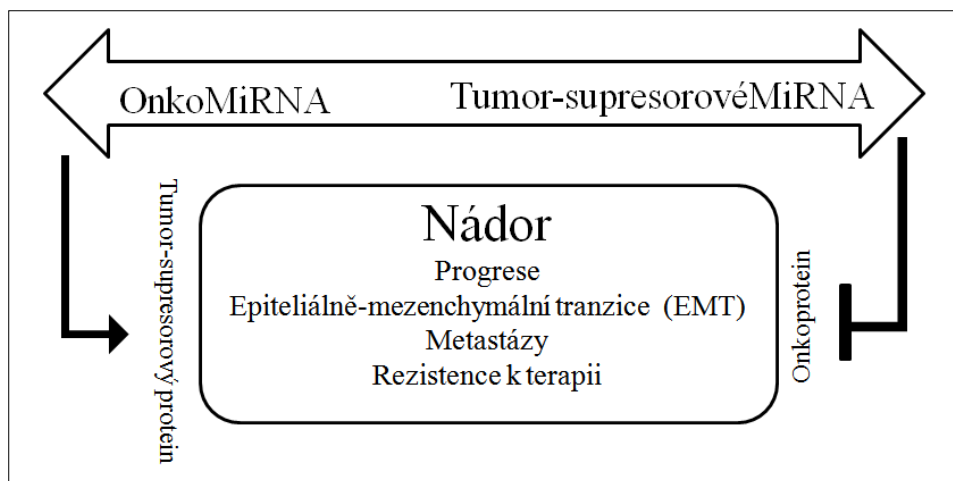
nemocné tkáni snížene či zvýšene exprimovány, a na profilaci jejich expresí se dá postavit velmi slibný a specifický biomarker. [31, 33, 34]

1.5.2.1. Tumor-supresorové miRNA

Tumor-supresorové miRNA cílí na onkoproteiny, čímž při své fyziologické funkci udržují v buňce vyrovnaný stav. Jsou velice často deregulované v nádorových buňkách, stejně tak i u HNSCC (většinou snížene exprimované).

1.5.2.2. OnkomiRNA

Onkogenní miRNA suprimují tumor-supresorové geny, čímž zvyšují možnost nádorového bujení. V nádorech jsou proto často hladiny onkogenních miRNA zvýšene. Jsou známy stovky miRNA zapojeny do různých nádorových fenotypů. [35]



Obr. 2: Schéma fungování onkogenních miRNA a tumor – supresorových miRNA

1.5.3. MiR-29c-3p

Primární sekvence: 5' - UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA – 3'

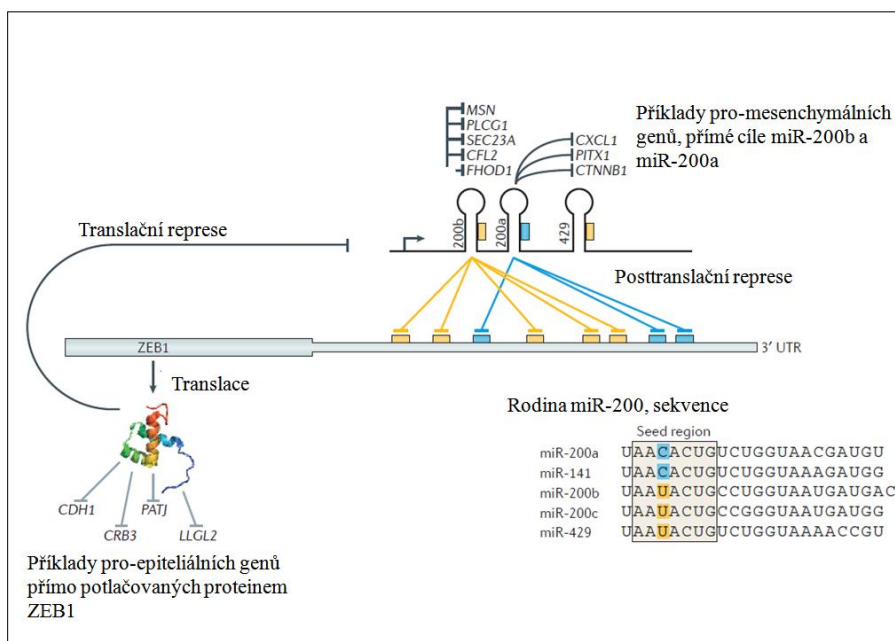
MiR-29c-3p je deregulována u různých typů nádorových onemocnění, včetně karcinomu nosohltanu a jícnu. [36-38] MiR-29c má tumor-supresorový efekt u hepatocelulárního karcinomu, u rakoviny slinivky břišní a žaludku. [39-41]

1.5.4. MiR-200b-5p

Primární sekvence: 5' - CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA – 3'

MiR-200b-5p patří do tumor-supresivní miRNA rodiny miR-200, která hraje klíčovou roli při epitheliálně-mezenchymální tranzici (EMT). Ta je významná fyziologicky v embryonálním vývoji a patologicky v procesu karcinogeneze, kde se díky EMT nežádoucně mění epitheliální buňka na mezenchymální a může tak projít skrze bazální membránu do krevního řečiště.

Takto mohou nádorové buňky pak migrovat v těle pacienta. [42] [43] Rodina MiR-200 je dobrým příkladem, jak z jednoho genu může být exprimováno více miRNA, které společně regulují několik cílů. V epiteliálních buňkách miR-200b a miR-200a silně potlačují expresi transkripčního faktoru zinc-finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1) přes vícero míst na 3'UTR dané mRNA. Pokud je ZEB1 exprese indukována (například transformací růstového faktoru β), tak ZEB1 potlačuje zpětně gen pro rodinu miR-200 a další epiteliální geny, čímž podporuje EMT. [44] Viz obrázek č. 3. MiR-200b-5p je studována také jako možný biomarker pro diagnostiku rakoviny plic a její progresi (rozdíl mezi adenokarcinomem plic a granulomem). [45]



Obr. 3: Regulační smyčka mezi rodinou miR-200 a proteinem ZEB1: V epiteliálních buňkách miR-200a a miR-200b silně potlačují expresi proteinu ZEB1 pomocí posttranslační represe na jeho 3'UTR mRNA. Dále zde potlačují expresi genů zapojených do cytoskeletální dynamiky (MSN, CFL2, FHOD1, CTNNB1), buněčné migrace (PLCG1, SEC23A) a buněčné diferenciaci (CXCL1, PITX1). ZEB1 po své translaci umlčuje pro-epiteliální geny (CDH1, CRB3, PATJ, LLGL2), čímž přispívá k EMT a zároveň umlčuje i expresi miR-200 mechanismem translační represe. Převzato a upraveno z [44]

1.5.5. MiR-375-3p

Primární sekvence: 5' - UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUA – 3'

Silně snížená exprese miR-375 je přítomna u 91% pacientů s HNSCC a může zapříčinit deregulaci proliferace a apoptózy, což ve výsledku může vést k nekontrolovatelnému buněčnému růstu. [46, 47] MiR-375 byla zkoumána i v souvislosti s miR-221, kdy jejich poměr v daných tkáních může indikovat, zda se jedná o nádorovou či zdravou tkáň. [48] Při výzkumu HPV-asociované karcinogeneze se miR-375 ukázala jako významný supresor mnoha onkogenních komponent. [49] Často užívané protinádorová léčiva jako jsou doxorubicin, 5 - fluorouracil, trichostatin A či etoposid reaktivují expresi miR-375 a jejího primárního transkriptu pri-miR-375 v nádorových buněčných liniích jazyka. Toto zjištění napovídá zapojení miR-375 do buněčných reakcí při odpovědi na léčbu uvedenými protinádorovými léčivy. [50]

2. Cíle práce

- Potvrdit předpokládaný tumor-supresorový efekt a deregulaci studovaných miRNA (miR-29c-3p, miR-200b-5p, miR-375-3p) ve vzorcích pacientů s HNSCC (u tkání primárního nádoru a u tkání přiléhající k nádoru)
- Vyhodnotit prognostický potenciál miRNA v tkáni přilehlé i nádorové, v závislosti na klinicko-patologických charakteristikách pacientů:
 - Pozitivita uzlin
 - Grading
 - Staging
 - Metastázy
- Vyhodnotit vhodné miRNA pro prognózu HNSCC na základě analýz přežití

3. Materiál a metody

3.1. Příprava vzorku

Všechny vzorky tkání byly získány od pacientů s diagnostikovaným HNSCC z Fakultní Nemocnice u Svaté Anny v Brně, v souladu s etickým kodexem Helsinské Deklarace (1964). Všechny vzorky byly od pacientů získány s jejich informovaným souhlasem.

Sbírány byly 2 typy tkáně: primární nádorová tkáň HNSCC (N) a nenádorová tkáň přilehlá nádoru (P). Tkáně byly ihned po vyjmutí z pacienta dány do roztoku RNA later (Ambion, USA), který RNA uchová a stabilizuje. Materiál byl skladován po dobu max. 24 hodin, než byl zpracován dále.

3.2. Izolace RNA, qRT-PCR

Celková RNA byla izolována ze vzorků tkání za použití TRIzol reagentie (Invitrogen, UK). Koncentrace a čistota RNA byla spektrofotometricky validována pomocí NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm byl použit jako ukazatel čistoty RNA – jeho hodnoty se pohybovaly v rozmezí 1.84 – 2.08, čímž se vyvrátila kontaminace vzorků proteiny. Taktéž byl použit poměr 260nm ku 230 nm, který nám dal informaci o kontaminaci chaotropními solemi a fenolem, u všech vzorků byl větší než 1.5.

Takto vyzolovaná RNA (10 ng) byla přetranskribována do komplementární DNA (cDNA) komerčním kitem TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). Pro následnou kvantitativní polymerázovou reakci v reálném čase (qRT-PCR) bylo použito 1.33 μ l cDNA. Pro transkripci a qRT-PCR byl použit set specifických primerů a fluorescenčních prób TaqMan miRNA expression assay: hsa-miR-29c (assay ID:00587), hsa-miR-200b (assay ID:002274) a hsa-miR-375 (assay ID:000564)), (Applied Biosystems, USA). Reakční směs pro qRT-PCR obsahovala: TaqMan[®] Small RNA Assay (1,00 μ l), produkt RT reakce (4,00 μ l), TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (10,00 μ l), Nuclease-free water (5, 00 μ l). Polymerázová reakce qRT-PCR probíhala v celkovém objemu 20 μ l za následujících podmínek: jednorázová iniciační denaturace 95°C/10 min, poté 45 cyklů 95°C/15s a 60°C/1 min na přístroji 7500real-time PCR system (Applied Biosystems, USA). Amplifikovaná DNA byla analyzována komparativní metodou za použití Ct (cycle of threshold) metody navržené Applied Biosystems, kdy jako endogenní kontrola posloužila exprese malé jaderné RNA: RNU44 (assay ID: 001094). Relativní kvantifikace byla

vyhodnocena pomocí metody $2^{-\Delta\Delta ct}$, dle vzorce: $2^{-(\Delta ct \text{ vzorku} - \Delta ct \text{ kontroly})}$, kde $\Delta ct = ct \text{ dané miRNA} - ct \text{ endogenní kontroly}$. [51]

3.3. Normalizace a vyhodnocení dat

Zlogaritmovaná data miRNA expresí byla vyhodnocena pomocí párového testu (primární nádor versus přilehlá tkáň) a s pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA). Analýza přežití byla analyzována za použití Coxova modelu proporcionálních rizik (COX proporční regrese) s miRNA expresními hladinami jako kovarianty. Analýza ROC (receiver-operator curves) křivek popisuje vztah senzitivity a specificity laboratorního testu při různých hodnotách cut-off (diskriminační hladiny). Test byl kalkulován s použitím Cutoff Finder programu. [52] Pokud není uvedeno jinak, p hodnota < 0.05 byla brána jako signifikantní. Hodnota p vyjadřuje statisticky nejmenší hladinu významnosti testu daného souboru dat, při níž ještě lze zamítnout nulovou hypotézu (=žádné parametry nekorelují). Čím nižší tedy je p -hodnota, tím menší je pravděpodobnost, že platí nulová hypotéza. Analýza probíhala s použitím softwaru Statistica 12 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

4. Výsledky

4.1. Klinicko-patologická charakterizace vzorků pacientů

Použito bylo 42 bioptických vzorků histologicky verifikovaných jako spinocelulární karcinom. Podmínky přijetí do studie: pacient bez předchozího maligního nálezu, muž, s popsáním nálezem HNSCC (histologie, staging a grading). Histologicky byly ověřeny i přilehlé tkáně (39 tkání), které byly použity pro následné analýzy jako komparativní tkáň.

Následná terapie pacienta nebyla brána v potaz, vzorky byly odebírány ještě před samotnou terapií. Bližší popis pacientů obsahuje tabulka č. 1.

Tab. 1: Charakteristika vzorků pacientů. Parametry grading a staging jsou udány pouze pro skupinu „Nádor“

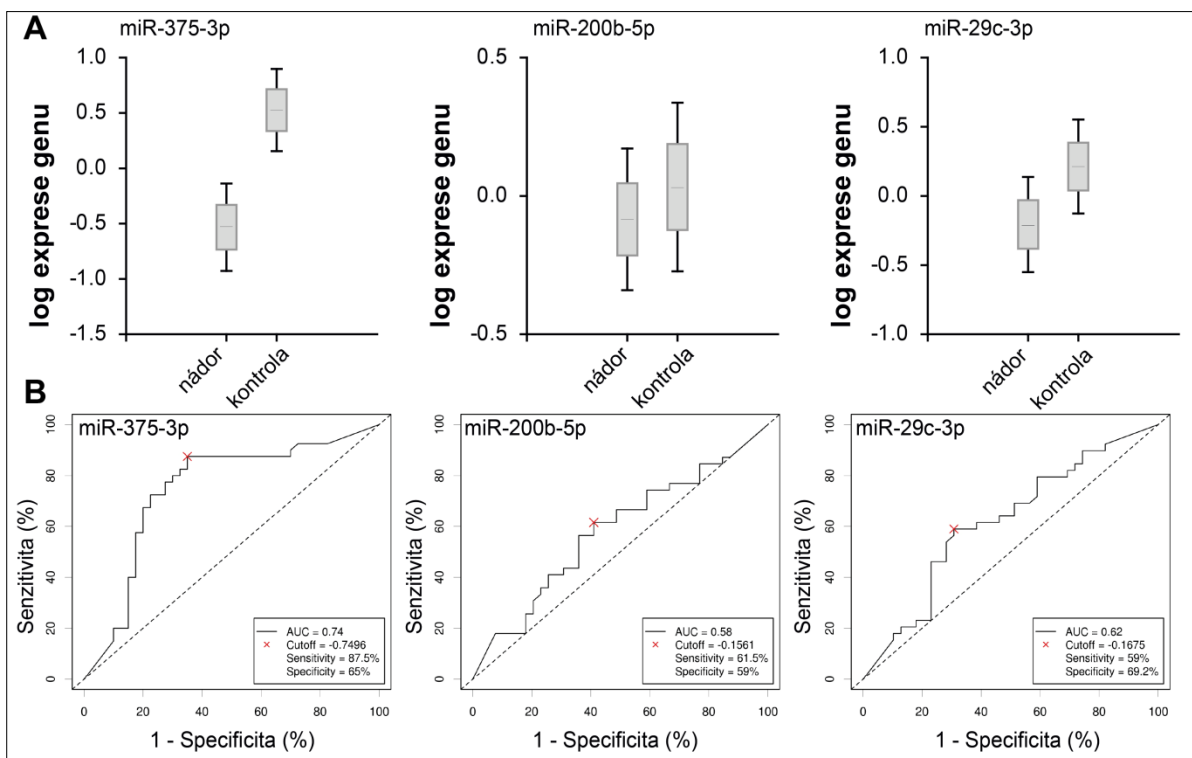
Faktor	Skupina	Počet	Věk – průměr (min-max)
Skupina	Nádor	42	63 (47-87)
	Přilehlá tkáň zdravá	39	62 (47-87)
Pohlaví	Muži	42	63 (47-87)
Grading	Vysoký (high)	35	64 (47-87)
	Nízký (low)	4	65 (56-79)
Staging	T1-2	18	62 (47-83)
	T3-4	22	65 (47-87)
Pozitivita uzlin	Ne	15	64 (51-83)
	Ano	20	64 (47-87)
Metastázy	Ne	31	64 (47-87)
	Ano	4	61 (55-71)

4.2. Porovnání exprese studovaných miRNA ve tkáních

Pomocí jednofaktorové ANOVA byl prokázán signifikantní efekt tkáně na expresi sledovaných miRNA ($F(6, 144) = 3.07, p = 0.007$).

Rozdíly v expresi miRNA u nádorové a přilehlé tkáně jsme analyzovali pomocí párového *t*-testu, signifikantní rozdíl byl pouze u dvou ze tří studovaných miRNA. Zvýšeně exprimovány u přilehlé tkáně byly miR-375-3p (11.59krát více, $p = 0.0001$) a miR-29c-3p (2.63krát více $p = 0.048$). Pro miR-200b-5p nebyla zaznamenána žádná signifikantně rozdílná exprese mezi N a P tkáni.

ROC analýza u miR-375-3p prokázala sensitivitu 87.5% (s 95% konfidenčním intervalem 94.5-73.9), specificitu 64% (s 95% konfidenčním intervalem 77.9-49.5) a plocha pod ROC křivkou (Area Under the ROC Curve, AUC) byla 0.74. Pro miR-29c-3p tato analýza ukázala sensitivitu 59.0% (s 95% konfidenčním intervalem 72.9-43.4), specificitu 69.2% (s 95% konfidenčním intervalem 81.4-53.6) a AUC = 0.62. ROC analýza uvedená na obrázku 4.



Obr. 4: exprese miRNA ve tkáních. A: Exprese studovaných miRNA v nádorové a přilehlé (=kontrola) tkáni vyjádřena jako logaritmus genové exprese. Zleva: exprese pro miR-375-3p, exprese pro miR-200b-5p a exprese pro miR-29c-3p. B: Vyjádření senzitivity a specificity jednotlivých miRNA, také parametru AUC (plocha pod ROC křivkou). Zleva: analýza vyjádřená pro miR- miR-375-3p, miR-200b-5p a miR-29c-3p.

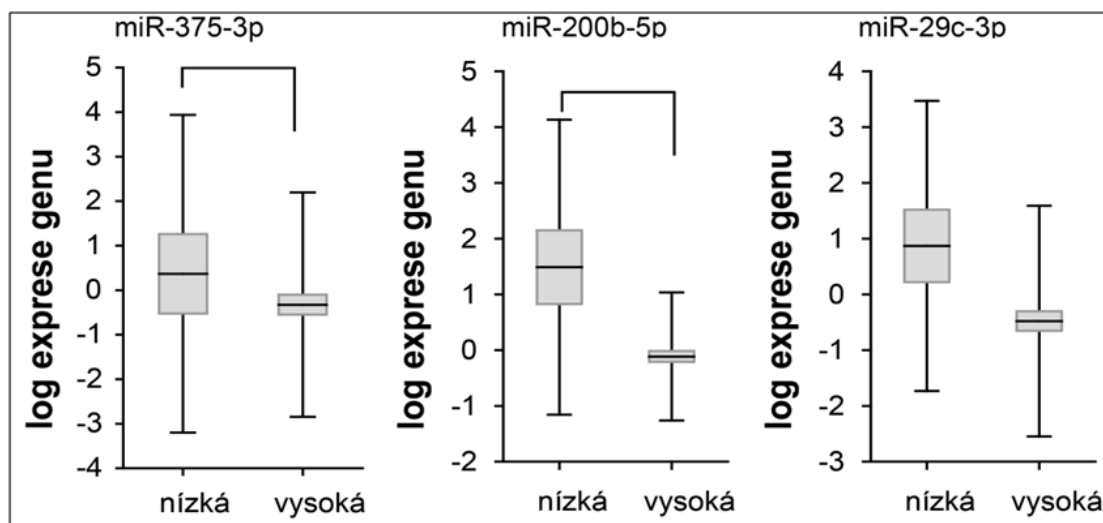
4.3. Analýza exprimovaných miRNA korelovaná s parametry stádia nádoru

4.3.1. Pozitivita uzlin

Pro analýzu pozitivity uzlin (U) a jejich souvislosti s expresí miRNA bylo studováno 35 N vzorků (U pozitivní = 20, U negativní = 15) a 33 P vzorků (U pozitivní = 19, U negativní = 14). Zde byla signifikantně snižená exprese miR-200b-5p ve vzorcích přilehlé tkáně (P) pacientů s pozitivním nálezem na uzlinách (0.17krát nižší exprese, s 95% konfidenčním intervalem 0.03-0.87).

4.3.2. Tumor grade

34 vzorků N (high grade = 30, low grade = 4) a 32 vzorků P (high grade = 29, low grade = 3) bylo podrobena analýze a signifikantní asociace mezi miRNA expresí a gradingem byla u dvou miRNA. MiR-200b-5p (0.03krát nižší exprese, s 95% konfidenčním intervalem 0.001-0.15, $p = 0.0001$) a miR-29c-3p (0.05krát nižší exprese, s 95% konfidenčním intervalem 0.001-0.63, $p = 0.0023$) byly sniženě exprimovány v nádorové tkáni (N) s vyšším gradingem (high grade). Výsledky jsou zobrazeny na obrázku č. 5.



Obr. 5: Expresa miRNA v nádorových tkáních pacientů s HNSCC v souvislosti s gradingem nádoru (nízký vs. vysoký grade). Expresa je vyjádřena jako logaritmus exprese. Zleva: exprese pro miR-375-3p, exprese pro miR-200b-5p a exprese pro miR-29c-3p. Vysoký grading je indikován jako >2.

4.3.3. Staging

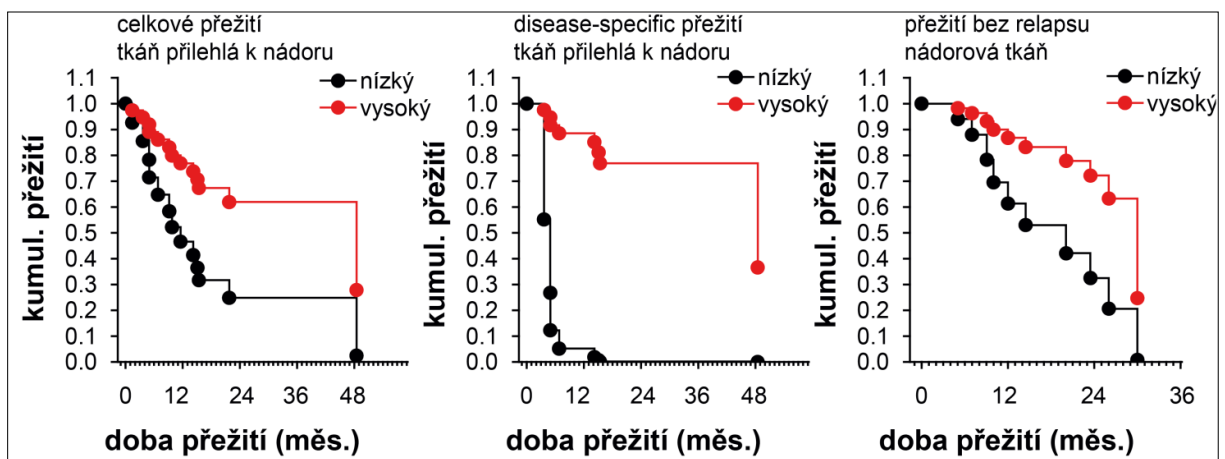
Nejdříve byly nádorové tkáně rozděleny dle TNM klasifikace na T1-2 a T3-4 a poté se studovaly expresní hladiny vybraných tří miRNA. Pro N tkáně bylo analyzováno 35 vzorků (T1-2 = 15 a T3-4 = 20), pro P tkáně bylo analyzováno 34 vzorků (T1-2 = 15 a T3-4 = 19). Neprojevila se žádná signifikantní změna exprese zmíněných miRNA u různých stádií nádorů - ani u N, ani u P vzorků.

4.3.4. Metastázy

Studium expresí miRNA u vzdálených metastáz (M) se provedlo na 35 vzorcích N (M pozitivní = 4, M negativní = 31), a 33 P vzorcích (M pozitivní = 4, M negativní = 29). Neprojevila se žádná změna v expresi zmíněných miRNA u pacientů s pozitivními či negativními vzdálenými metastázemi - ani u N, ani u P vzorků.

4.4. Asociace exprese miRNA s přežíváním pacientů

Pro analýzu přežití byl použit Coxův model proporcionálních rizik, hladina miRNA zde může mít prognostickou hodnotu. To jsme opět ověřovali jak u nádorové (N), tak u přiléhající (P) tkáně. Signifikantní efekt na celkové přežívání pacientů měla exprese miR-29c-3p v P tkáni (poměr rizik (PR) = 0.27, s 95% konfidenčním intervalem 0.01-0.07), pro tuto miRNA byl pozorován také efekt u přežití ve spojitosti s onemocněním (PR = 0.07, s 95% konfidenčním intervalem 0.01-0.59). Navíc vyšší exprese miR-29c-3p v nádorové tkáni (PR = 0.31, s 95% konfidenčním intervalem 0.10-0.91) byla signifikantně asociovaná s delším intervalem mezi léčbou a relapsem onemocnění. Viz. Obr. 6. MiR-200b-3p a miR-375-5p neměly v této analýze žádný signifikantní efekt. Tabulka č. 2 shrnuje výsledky pro všechny studované miRNA tohoto testu.



Obr. 6: Coxův proporcionální hazardní model zobrazující přežívání pacientů v asociaci s expresí miR-29c-3p. Nízká míra exprese miR-29c-3p zobrazena černě, vysoká míra exprese zobrazena červeně. Zleva: vysoká míra exprese miR-29c-3p v P tkáni pozitivně ovlivňuje celkovou dobu přežívání pacientů, vysoká míra exprese miR-29c-3p v P tkáni pozitivně ovlivňuje nemoc-specifické (disease - specific) přežívání pacientů a vysoká míra exprese miR-29c-3p v N tkáni koreluje s delším přežíváním pacientů bez relapsu onemocnění.

Tab. 2: Coxův model proporcionálních rizik pro celkové přežívání pacientů, nemoc-specifické přežití a pro přežití bez relapsu u obou druhů tkání (N i P).

Typ přežití	Tkáň	miRNA	Poměr rizik s 95% KI	<i>p</i> hodnota
Celkové přežití				
	Nádorová (N)	miR-200b	1.00 (0.42 – 2.38)	0.993
		miR-375	1.32 (0.76 – 2.27)	0.321
		miR-29c	0.89 (0.47 – 1.70)	0.732
	Přílehlá (P)	miR-200b	0.84 (0.30 – 2.40)	0.755
		miR-375	2.17 (0.83 – 5.65)	0.113
		miR-29c	0.27 (0.01 – 0.85)	0.024
Nemoc—specifické přežití				
	Nádorová (N)	miR-200b	1.25 (0.51 – 3.08)	0.63
		miR-375	1.45 (0.74 – 2.81)	0.278
		miR-29c	0.80 (0.37 – 1.75)	0.573
	Přílehlá (P)	miR-200b	0.44 (0.04 – 4.23)	0.488
		miR-375	4.48 (0.90 – 22.33)	0.067
		miR-29c	0.07 (0.01 – 0.59)	0.014
Bez relapsu				
	Nádorová (N)	miR-200b	0.91 (0.14 – 5.23)	0.924
		miR-375	1.77 (0.67 – 468)	0.248
		miR-29c	0.31 (0.10 – 0.91)	0.034
	Přílehlá (P)	miR-200b	0.09 (0.00 – 7.77)	0.290
		miR-375	3.09 (0.1 – 96.39)	0.521
		miR-29c	1.14 (0.06 – 21.08)	0.928

5. Diskuze

Nádorová onemocnění jsou stále na nejvyšších žebříčcích výzkumných zájmů naší společnosti. Pohled na studium řešení této problematiky je individuální pro každou výzkumnou skupinu. Ta naše se snaží skrze epigenetický faktor – mikroRNA – nahlédnout do zlomku fungování buňky. Studium genetiky a epigenetiky nádorového i nádor-přilehlého prostředí se již ukázalo jako nezbytný krok k pochopení složitých dějů účastnících se kancerogeneze. [53, 54] Profilace expresí miRNA v tkáních a následná korelace těchto výsledků s dalšími faktory se u různých druhů nádorů ukázala jako správný směr výzkumu. [55] Tímto směrem jsme se vydali i my v rámci naší studie.

Jak již zde bylo psáno, nádor není jednotná hmota oddělena od zdravé tkáně pevnou přepážkou. Je to heterogenní, stále se měnící masa buněk a jejich komponent, která postupně z epicentra nádoru přechází do zdravé tkáně. Ještě před touto zcela zdravou tkání je tzv. nádor-přilehlá tkáň, na kterou jsme se zaměřili. Histologicky tato tkáň vypadá jako nádorem nedotčená, ovšem její chování tomu neodpovídá. Studium změn v expresích miRNA bylo zkoumáno v nádorové, přilehlé a zdravé tkáně u plicního adenokarcinomu [56], zatím však ne u HNSCC.

Vybrali jsme tři miRNA (miR-29c-3p, miR-200b-5p a miR-375-3p) na základě jejich možného tumor-supresorového potenciálu v HNSCC. Mnohé miRNA mají své expresní hladiny závislé na pohlaví, nebo na estrogenu, proto byly do této studie vybrány pouze pacienti mužského pohlaví, abychom eliminovaly faktor ženského pohlaví. [57, 58]

Pro srovnání nádorové a přilehlé tkáně jsme výsledky expresí miRNA podrobili párovému *t*-testu a vyšly nám dvě miRNA signifikantně snižené u nádorové tkáně. MiR-29c-3p (2,63 krát méně oproti přilehlé tkáni) a miR-375-3p (11,59 krát méně oproti přilehlé tkáni), což poukazuje na jejich možný tumor-supresorový efekt. Snižená exprese miR-375-3p může vést k nekontrolované expresi proteinu CIP2A (cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A) a posílit tak stabilitu onkogenu MYC. Aktivace onkogenu MYC může mít v buňce za následek zvýšenou buněčnou proliferaci a transformaci. [59] Snižené hladiny miR-29c-3p v nádorových tkáních jsou taktéž v souladu s již dříve publikovanými studiemi. [60, 61] Chybějící signifikantní rozdíl expresí miR-200b-5p u přilehlé a nádorové tkáně může být zapříčiněn přítomností aktivovaných nádor-asociovaných fibroblastů v přilehlé tkáni. MiR-200b-5p je totiž dle Tang. et. al. zodpovědná za přeprogramování aktivovaných fibroblastů na CAF u prsního karcinomu. Normální fibroblasty se sníženou

expresí miR-200b přebírají rysy CAF se zvýšenou migrací a invazivitou. [62] Absence předpokládaného snížení exprese této miRNA u nádorové tkáně oproti tkáni k nádoru přilehlé může znamenat, že jak v přilehlé, tak i v nádorové tkáni se vyskytují aktivované fibroblasty a CAF.

Rozšíření nádoru na lymfatické uzliny je znakem již pokročilejšího stádia HNSCC a lékařům napomáhá při prognóze nemoci. Procesy odehrávající se ve tkáni přiléhající k nádoru (např. změny v expresi miRNA) mohou reflektovat míru progresu nádorového onemocnění. Zcela v souladu s tímto faktem korelovala snížená exprese miR-200b-5p u nádor-přilehlé tkáně s pozitivitou uzlin. Toto snížení svědčí o její tumor-supresorové funkci. Podobně tomu bylo ve studii Sun et. al., kde byla ve spinocelulárním nádoru jazyka miR-200b-5p též snížene exprimovaná a asociovaná s pozitivním nálezem na uzlinách. Tato snížená exprese pak indikuje špatnou prognózu pro pacienta. [63]

Grading je pro lékaře jedním ze základních parametrů, jak hodnotit nádorová onemocnění. Zjištění, že snížená exprese miR-200b-5p a miR-29c-3p v nádorové tkáni je asociovaná s vyšším gradingem tumoru, vedlo k další indikaci, že tyto miRNA mohou být využity jako prognostické markery pro HNSCC.

Další dva parametry, podrobeny analýze byla přítomnost metastáz a nádorový staging. Zde jsme nezaznamenali změny exprese související s přítomností metastáz nebo s vyšším stádiem nádoru u studovaných miRNA jak v nádorové, tak v přilehlé tkáni.

Důležitým prognostickým nástrojem jsou pro lékaře analýzy přežití. Na základě dat poskytnutých spolu se vzorky tkání pacientů jsme provedli analýzy přežití pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik, který je nejčastěji užívanou metodou pro popis vztahu mezi přežitím pacienta a jeho proměnnými. Těmito proměnnými mohou být data jako věk, pohlaví, krevní obraz, rodinná anamnéza, stadium onemocnění, atd. V našem případě to byly exprese studovaných miRNA. Provedli jsme 3 typy analýz, ve kterých jsme hodnotili celkové přežívání pacientů (které bere v potaz jakoukoliv smrt během pozorování), nemoc-specifické přežívání (které bere v potaz jen smrt v důsledku onemocnění) a délku přežívání pacientů bez relapsu onemocnění. Výsledky expresí miRNA byly významné jen pro jednu miRNA a to pro miR-29c-3p. Byl potvrzen signifikantní efekt expresí miR-29c-3p v přilehlé tkáni pro celkové a nemoc-specifické přežití, zatímco pro pacienty bez relapsu onemocnění byl efekt zaznamenán jen ve tkáni nádorové. Pacienti s vyšší expresí miR-29c-3p mají u celkového přežití pozitivně ovlivněné přežívání, u nemoc-specifického přežití je také pozitivní korelace – s vyšší expresí miR-29c-3p pacienti přežívají déle. Obě tyto skutečnosti byly zaznamenány u přilehlé tkáně. U tkáně nádorové byla pozitivní korelace exprese miR-29c-3p a delšího

intervalu bez relapsu – s vyšší expresí miR-29c-3p se těmto pacientům vrací nemoc později. Pacienti s nižší expresí miR-29c-3p tedy mají horší prognózu průběhu onemocnění a větší šanci, že se jim nemoc vrátí. Pro zbývající dvě miRNA (miR-200b-5p a miR-375-3p) nebyly u těchto analýz přežití jejich exprese nijak významně asociované s přežíváním pacientů ani s návratem onemocnění. To může být zapříčiněno působením, které je závislé na kontextu, ve kterém daná miRNA funguje – mohou být tumor-supresivní v kontextu progresu nádoru, ale zároveň mohou udělit buňce rezistenci k chemoterapii. [64] Například uměle vyvolaná exprese miR-375-3p snižuje senzitivitu k paclitaxelu v buňkách karcinomu děložního čípku in vitro a také in vivo. [65] Exprese miR-141 a miR-200b-5p mohou vést ke dvěma protichůdným efektům: na jedné straně mohou vyvolat rezistenci k platinovým částicím, na straně druhé zvýšenou senzitivitu k paclitaxelu. [64, 66]

6. Závěr

Naším cílem bylo prověřit možnost využití miRNA jako biomarkerů u HNSCC. Z výsledků lze odvodit, že miR-375-3p může představovat nadějný diagnostický marker, jelikož s její pomocí lze odlišit nádorovou a přilehlou tkáň. To jistě dává dobrý podklad pro studium této miRNA jako diagnostického markeru HNSCC, třeba v podobě volně cirkulujících miRNA. [67]

Další studovanou miRNA – miR-200b-5p – nemůžeme použít jako diagnostický marker pro HNSCC, ale jako prognostický marker se jeví velmi slibně. U pacientů s pozitivními nálezy na uzlinách byla snížene exprimována v přilehlé tkáni a u pacientů s vyšším gradingem zas ve tkáni nádorové. Její nízká exprese koreluje se špatnou prognózou pro pacienta.

Poslední miR-29c-3p může být vyhodnocena jako diagnostický i prognostický marker. Pomocí této miRNA můžeme rozeznat nádorovou a přilehlou tkáň, což z ní dělá diagnostický marker. Je ovšem také snížene exprimovaná v nádorové tkáni korelované s vyšším gradingem, což spolu s analýzami přežití, kde vyšla jako jediná významná, dělá z této miRNA nejslibnější prognostický marker ze všech tří studovaných.

Tato studie poukázala na důležitost nepodcenit studium tkáně přiléhající k nádoru, která sice histologicky může vykazovat známky zdravé tkáně, ale ověřili jsme si, že tomu tak není. Využití miRNA jako biomarkeru pro diagnózu a prognózu onemocnění se jeví stále jako nadějný směr hledání biomarkerů.

7. Reference

1. Organization WH: **International Classification of Diseases, Tenth Revision (ICD-10)**. 2010. In: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/>. Accessed 20 Mar 2015.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global Cancer Statistics**. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* 2011, **61**(2):69-90.
3. Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J: **Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma**. *International Journal of Experimental Pathology* 2005, **86**(6):347-363.
4. Young D, Xiao CC, Murphy B, Moore M, Fakhry C, Day TA: **Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV)**. *Oral Oncology* 2015, **51**(8):727-730.
5. Khode SR, Dwivedi RC, Rhys-Evans P, Kazi R: **Exploring the link between human papilloma virus and oral and oropharyngeal cancers**. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 2014, **10**(3):492-498.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A: **Cancer Statistics, 2015**. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* 2015, **65**(1):5-29.
7. Network NCC: **National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Head and Neck Cancers. V 1.2015**. Available at: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf. In.; 2015.
8. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL: **Head and neck cancer**. *Lancet* 2008, **371**(9625):1695-1709.
9. Bissell MJ, Radisky D: **Putting tumours in context**. *Nature Reviews Cancer* 2001, **1**(1):46-54.
10. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of Cancer: The Next Generation**. *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
11. Klener Pavel KPJ: **Principy systémové protinádorové léčby**. In. Praha: Grada Publishing; 2013.
12. Madar S, Goldstein I, Rotter V: **'Cancer associated fibroblasts' - more than meets the eye**. *Trends in Molecular Medicine* 2013, **19**(8):447-453.
13. Vaupel P: **Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology**. *Seminars in Radiation Oncology* 2004, **14**(3):198-206.
14. Castor CW, Wilson SM, Heiss PR, Seidman JC: **ACTIVATION OF LUNG CONNECTIVE-TISSUE CELLS INVITRO**. *American Review of Respiratory Disease* 1979, **120**(1):101-106.
15. Al-Rakan MA, Colak D, Hendrayani SF, Al-Bakheet A, Al-Mohanna FH, Kaya N, Al-Malik O, Aboussekhra A: **Breast stromal fibroblasts from histologically normal surgical margins are pro-carcinogenic**. *Journal of Pathology* 2013, **231**(4):457-465.
16. Nouraei N, Van Roosbroeck K, Vasei M, Semnani S, Samaei NM, Naghshvar F, Omid AA, Calin GA, Mowla SJ: **Expression, Tissue Distribution and Function of miR-21 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma**. *Plos One* 2013, **8**(9).
17. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: **THE C-ELEGANS HETEROCHRONIC GENE LIN-4 ENCODES SMALL RNAS WITH ANTISENSE COMPLEMENTARITY TO LIN-14**. *Cell* 1993, **75**(5):843-854.
18. Guo HL, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP: **Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels**. *Nature* 2010, **466**(7308):835-U866.

19. Chekulaeva M, Filipowicz W: **Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells.** *Current Opinion in Cell Biology* 2009, **21**(3):452-460.
20. Krol J, Loedige I, Filipowicz W: **The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay.** *Nature Reviews Genetics* 2010, **11**(9):597-610.
21. Friedlander MR, Lizano E, Houben AJS, Bezdan D, Banez-Coronel M, Kudla G, Mateu-Huertas E, Kagerbauer B, Gonzalez J, Chen KC *et al*: **Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs.** *Genome Biology* 2014, **15**(4).
22. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S: **Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.** *Nature Cell Biology* 2009, **11**(3):228-234.
23. Hoffmann TW, Duverlie G, Bengrine A: **MicroRNAs and hepatitis C virus: toward the end of miR-122 supremacy (vol 9, pg 109, 2012).** *Virology Journal* 2013, **10**.
24. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP: **The impact of microRNAs on protein output.** *Nature* 2008, **455**(7209):64-U38.
25. Jovanovic M, Hengartner MO: **miRNAs and apoptosis: RNAs to die for.** *Oncogene* 2006, **25**(46):6176-6187.
26. Su ZY, Yang ZZ, Xu YQ, Chen YB, Yu Q: **MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis.** *Oncotarget* 2015, **6**(11):8474-8490.
27. MacFarlane LA, Murphy PR: **MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer.** *Current Genomics* 2010, **11**(7):537-561.
28. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM: **bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila.** *Cell* 2003, **113**(1):25-36.
29. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T: **Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis.** *Nature Genetics* 2007, **39**(5):673-677.
30. Calin GA, Sevignani C, Dan Dumitru C, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M *et al*: **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* 2004, **101**(9):2999-3004.
31. Lan HY, Lu HQ, Wang X, Jin HC: **MicroRNAs as Potential Biomarkers in Cancer: Opportunities and Challenges.** *Biomed Research International* 2015.
32. Masood Y, Kqueen CY, Rajadurai P: **Role of miRNA in head and neck squamous cell carcinoma.** *Expert Review of Anticancer Therapy* 2015, **15**(2):183-197.
33. Thomson JM, Parker J, Perou CM, Hammond SM: **A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression.** *Nature Methods* 2004, **1**(1):47-53.
34. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebet BL, Mak RH, Ferrando AA *et al*: **MicroRNA expression profiles classify human cancers.** *Nature* 2005, **435**(7043):834-838.
35. Garzon R, Marcucci G, Croce CM: **Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges.** *Nature Reviews Drug Discovery* 2010, **9**(10):775-789.
36. Hezova R, Kovarikova A, Srovnal J, Zemanova M, Harustiak T, Ehrmann J, Hajduch M, Svoboda M, Sachlova M, Slaby O: **Diagnostic and prognostic potential of miR-21, miR-29c, miR-148 and miR-203 in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of esophagus.** *Diagnostic Pathology* 2015, **10**.

37. Liu N, Tang LL, Sun Y, Cui RX, Wang HY, Huang BJ, He QM, Jiang W, Ma J: **MiR-29c suppresses invasion and metastasis by targeting TIAM1 in nasopharyngeal carcinoma.** *Cancer Letters* 2013, **329**(2):181-188.
38. Jiang HS, Zhang G, Wu JH, Jiang CP: **Diverse roles of miR-29 in cancer (Review).** *Oncology Reports* 2014, **31**(4):1509-1516.
39. Bae HJ, Noh JH, Kim JK, Eun JW, Jung KH, Kim MG, Chang YG, Shen Q, Kim SJ, Park WS *et al*: **MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by direct targeting oncogenic SIRT1 in hepatocellular carcinoma.** *Oncogene* 2014, **33**(20):2557-2567.
40. Zou YK, Li JW, Chen ZY, Li XW, Zheng SG, Yi D, Zhong A, Chen J: **miR-29c suppresses pancreatic cancer liver metastasis in an orthotopic implantation model in nude mice and affects survival in pancreatic cancer patients.** *Carcinogenesis* 2015, **36**(6):676-684.
41. Gong JA, Li JX, Wang Y, Liu CZ, Jia HY, Jiang CL, Wang YX, Luo M, Zhao HM, Dong L *et al*: **Characterization of microRNA-29 family expression and investigation of their mechanistic roles in gastric cancer.** *Carcinogenesis* 2014, **35**(2):497-506.
42. Diaz-Martin J, Diaz-Lopez A, Moreno-Bueno G, Angeles Castilla M, Rosa-Rosa JM, Cano A, Palacios J: **A core microRNA signature associated with inducers of the epithelial-to-mesenchymal transition.** *Journal of Pathology* 2014, **232**(3):319-329.
43. Rhodes LV, Martin EC, Segar HC, Miller DFB, Buechlein A, Rusch DB, Nephew KP, Burow ME, Collins-Burow BM: **Dual regulation by microRNA-200b-3p and microRNA-200b-5p in the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer.** *Oncotarget* 2015, **6**(18):16638-16652.
44. Bracken CP, Scott HS, Goodall GJ: **A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer.** *Nat Rev Genet* 2016, **advance online publication**.
45. Cazzoli R, Buttitta F, Di Nicola M, Malatesta S, Marchetti A, Rom WN, Pass HI: **microRNAs Derived from Circulating Exosomes as Noninvasive Biomarkers for Screening and Diagnosing Lung Cancer.** *Journal of Thoracic Oncology* 2013, **8**(9):1156-1162.
46. Hui ABY, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, Perez-Ordóñez B, Jurisica I, O'Sullivan B, Waldron J *et al*: **Comprehensive MicroRNA Profiling for Head and Neck Squamous Cell Carcinomas.** *Clinical Cancer Research* 2010, **16**(4):1129-1139.
47. Siow MY, Ng LPK, Chong VKV, Jamaludin M, Abraham MT, Rahman ZAA, Kallarakkal TG, Yang YH, Cheong SC, Zain RB: **Dysregulation of miR-31 and miR-375 expression is associated with clinical outcomes in oral carcinoma.** *Oral Diseases* 2014, **20**(4):345-351.
48. Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ: **MicroRNA Expression Ratio Is Predictive of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.** *Clinical Cancer Research* 2009, **15**(8):2850-2855.
49. Jung HM, Phillips BL, Chan EKL: **miR-375 activates p21 and suppresses telomerase activity by coordinately regulating HPV E6/E7, E6AP, CIP2A, and 14-3-3 zeta.** *Molecular Cancer* 2014, **13**.
50. Jung HM, Benarroch Y, Chan EKL: **Anti-Cancer Drugs Reactivate Tumor Suppressor miR-375 Expression in Tongue Cancer Cells.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2015, **116**(5):836-843.
52. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyorffy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, Denkert C: **Cutoff Finder: A Comprehensive and Straightforward Web**

- Application Enabling Rapid Biomarker Cutoff Optimization.** *Plos One* 2012, **7**(12).
53. Zhou L, Jiang WH, Ren CP, Yin ZH, Feng XL, Liu WD, Tao O, Yao KT: **Frequent hypermethylation of RASSF1A and TSLC1, and high viral load of Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma and matched tumor-adjacent tissues.** *Neoplasia* 2005, **7**(9):809-815.
 54. Liu HY, Liu W, Wu YW, Zhou Y, Xue R, Luo C, Wang L, Zhao W, Jiang JD, Liu JW: **Loss of epigenetic control of Synuclein-gamma gene as a molecular indicator of metastasis in a wide range of human cancers.** *Cancer Research* 2005, **65**(17):7635-7643.
 55. Calin GA, Croce CM: **MicroRNA signatures in human cancers.** *Nature Reviews Cancer* 2006, **6**(11):857-866.
 56. Tian F, Li R, Chen ZZ, Shen YT, Lu JF, Xie XY, Ge QY: **Differentially Expressed miRNAs in Tumor, Adjacent, and Normal Tissues of Lung Adenocarcinoma.** *Biomed Research International* 2016.
 57. Nothnick WB, Healy C: **Estrogen Induces Distinct Patterns of MicroRNA Expression Within the Mouse Uterus.** *Reproductive Sciences* 2010, **17**(11):987-994.
 58. Klinge CM: **Estrogen Regulation of MicroRNA Expression.** *Current Genomics* 2009, **10**(3):169-183.
 59. Jung HM, Patel RS, Phillips BL, Wang H, Cohen DM, Reinhold WC, Chang LJ, Yang LJ, Chan EKL: **Tumor suppressor miR-375 regulates MYC expression via repression of CIP2A coding sequence through multiple miRNA-mRNA interactions.** *Molecular Biology of the Cell* 2013, **24**(11):1638-1648.
 60. Sengupta S, den Boon JA, Chen IH, Newton MA, Stanhope SA, Cheng YJ, Chen CJ, Hildesheim A, Sugden B, Ahlquist P: **MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(15):5874-5878.
 61. Park SY, Lee JH, Ha M, Nam JW, Kim VN: **miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85a and CDC42.** *Nature Structural & Molecular Biology* 2009, **16**(1):23-29.
 62. Tang X, Hou Y, Yang G, Wang X, Tang S, Du YE, Yang L, Yu T, Zhang H, Zhou M *et al*: **Stromal miR-200s contribute to breast cancer cell invasion through CAF activation and ECM remodeling.** *Cell Death and Differentiation* 2016, **23**(1):132-145.
 63. Sun L, Yao Y, Liu B, Lin Z, Lin L, Yang M, Zhang W, Chen W, Pan C, Liu Q *et al*: **MiR-200b and miR-15b regulate chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting BMI1.** *Oncogene* 2012, **31**(4):432-445.
 64. Brozovic A, Duran GE, Wang YC, Francisco EB, Sikic BI: **The miR-200 family differentially regulates sensitivity to paclitaxel and carboplatin in human ovarian carcinoma OVCAR-3 and MES-OV cells.** *Molecular Oncology* 2015, **9**(8):1678-1693.
 65. Shen Y, Wang P, Li Y, Ye F, Wang F, Wan X, Cheng X, Lu W, Xie X: **miR-375 is upregulated in acquired paclitaxel resistance in cervical cancer.** *British Journal of Cancer* 2013, **109**(1):92-99.
 66. Wiemer EAC: **Stressed tumor cell, chemosensitized cancer.** *Nature Medicine* 2011, **17**(12):1552-1554.
 67. Matamala N, Vargas MT, Gonzalez-Campora R, Minambres R, Arias JI, Menendez P, Andres-Leon E, Gomez-Lopez G, Yanowsky K, Calvete-Candenas J *et al*: **Tumor**

MicroRNA Expression Profiling Identifies Circulating MicroRNAs for Early Breast Cancer Detection. *Clinical Chemistry* 2015, **61**(8):1098-1106.

8. Publikační činnost spojená s touto prací

Expression profiles of miR-29c, miR-200b, and miR-375 in tumour- and tumour-adjacent tissues of head and neck cancers

Kristýna Hudcová, Martina Raudenská, Jaromír Gumulec, Hana Binková, Zuzana Horaková, Rom Kostřica, Petr Babula, and Michal Masařík. *Tumor Biology*. (2016). doi:10.1007/s13277-016-5147-2

Příloha