

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Optimalizace podmínek izolace miRNA z biologického materiálu pomocí TiO₂
mikrosfér

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Stýblová**
Osobní číslo: **C19592**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Optimalizace podmínek izolace miRNA z biologického materiálu pomocí TiO₂ mikrosfér**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

- 1) Ribonukleové kyseliny – typy, struktura, funkce a výskyt
- 2) RNA a miRNA jako diagnostický marker
- 3) Metody izolace RNA molekul se zaměřením na metody specifické pro izolaci miRNA – současný stav výzkumu a vývoje, komerční soupravy pro rutinní izolace
- 4) Analytické metody vhodné pro analýzu nukleových kyselin

Experimentální část:

- Izolace miRNA komerčními soupravami
- Práce s TiO₂ materiálem a jeho využití pro separaci a izolaci RNA
- Příprava buněčných lysátů eukaryotních buněk
- Optimalizace protokolu pro izolaci celkové RNA a miRNA pomocí TiO₂ mikrosfér z různých biologických matric
- Analýza nukleových kyselin pomocí vybraných analytických technik, především pomocí gelové elektroforézy

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Rudolf Kupčík, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Denisa Smělá**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Práci s názvem Optimalizace podmínek izolace miRNA z biologického materiálu pomocí TiO₂ mikrosfér jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Bc. Adéla Stýblová v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Zde bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Rudolfovi Kupčíkovi, Ph. D. za čas, který mi věnoval během tvorby diplomové práce, za cenné rady ochotu a odborný dohled. Dále bych chtěla poděkovat mé konzultantce Mgr. Denise Smělé za seznámení s prací v laboratoři, za veškeré rady spojené s průběhem práce, za rady při tvorbě textu i zpracovávání výsledků. Zejména bych jí chtěla moc poděkovat za trpělivost i za všechny čas, který mi věnovala. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mojí rodině, která mě při studiu vždy podporovala.

ANOTACE

Nekódující RNA, mezi něž patří i miRNA, jsou předmětem výzkumu s cílem jejich použití jako biomarkerů pro odlišení fyziologického od patologického stavu lidského organismu. To vedlo k potřebě jejich účinné izolace z komplexních biologických vzorků za účelem jejich následné detekce.

Tato diplomová práce se zabývá izolací miRNA pomocí TiO₂ mikrosfér z biologických vzorků představujících buňky a sérum. Hlavní úkol spočíval v zavedení možnosti izolace miRNA z lidského séra pomocí TiO₂ mikrosfér. K tomu bylo nutné provést několik optimalizačních kroků v již známém protokolu s cílem minimalizovat působení RNAs při zachování účinnosti izolace, které je běžně dosahováno např. u buněčného lyzátu. Samotné vyšetření séra je oproti cytologickému vyšetření např. biopsii mnohem méně invazivní, což umožňuje nejen diagnostiku v počátku onemocnění, ale také možnost průběžného sledování stavu pacienta. Dále byla zkoumána kompatibilita optimalizovaného izolačního postupu s detekcí pomocí polymerázové řetězové reakce, která se pro detekci miRNA využívá z důvodu vysoké citlivosti. Metoda s vysokou citlivostí je zapotřebí kvůli přirozeně nízké koncentraci miRNA v biologických vzorcích.

Tato metoda izolace miRNA pomocí TiO₂ mikrosfér a následné detekce pomocí polymerázové řetězové reakce by mohla potencionálně sloužit pro sledování změn v expresi miRNA v sérech pacientů. Na základě změn exprese miRNA by docházelo k včasnému odhalení rakovinného onemocnění bez nutnosti odběru tkáně.

KLÍČOVÁ SLOVA

RNA, miRNA, izolace RNA, TiO₂ mikrosféry, extrakce na pevné fázi, extrakce kapalina-kapalina, gelová elektroforéza, polymerázová řetězová reakce

TITLE

Optimization of miRNA isolation from biological material using TiO₂ microspheres

ANNOTATION

The non-coding RNAs, including microRNAs, are researched with the aim to use them as biomarker to distinguish physiological and pathological conditions of the human organism. Because of this, there is a greater demand for efficiency of their isolation from complex biological samples for a purpose of their subsequent detection.

This diploma thesis deals with the isolation of miRNAs from biological samples such as cells and serum with the use of TiO₂ microspheres. The main task was to implement a method with the option of miRNAs isolation from human serum. For that, it was necessary to optimize steps of an already established protocol to minimize the effect of RNases, while maintaining the isolation efficiency, commonly achieved, for example with a cell lysate. The collection process for serum samples is much less invasive in comparison to cytological samples (biopsy). This provides, not only the possibility of an early diagnosis at the beginning stage of the disease but also the chance to monitor the patient's conditions continuously. Next, the compatibility of the optimized isolation procedure with the polymerase chain reaction was studied. This method is used for miRNAs detection because of its sensitivity. A method with high sensitivity is necessary to use due to the naturally low concentration of miRNAs in biological samples.

This miRNAs isolation method using TiO₂ microspheres and subsequent detection by polymerase chain reaction has a great potential for the observation of the changes in miRNAs expression in patient's serum. With accurate and reliable data about the changes in miRNAs expression, the cancer disease would be detected in time without the need for tissue collection.

KEY WORDS

RNA, miRNA, biomarker, RNA isolations, TiO₂ microspheres, solid phase extraction, liquid-liquid extraction, gel electrophoresis, polymerase chain reaction

OBSAH

0	Úvod	14
1	Teoretická část.....	15
1.1	Nukleové kyseliny.....	15
1.1.1	Centrální dogma.....	15
1.1.2	Ribonukleové kyseliny	16
1.1.3	Struktura a vznik RNA	16
1.2	Druhy RNA a jejich funkce.....	20
1.2.1	Kódující RNA	20
1.2.2	Nekódující RNA	20
1.2.3	Dlouhé nekódující RNA	21
1.2.4	Krátké nekódující.....	22
1.3	RNA jako diagnostický biomarker.....	25
1.3.1	mRNA.....	27
1.3.2	lncRNA	29
1.3.3	sncRNA.....	31
1.3.4	miRNA.....	32
1.4	Metody izolace RNA.....	40
1.4.1	Fenol-chloroformová extrakce.....	41
1.4.2	Extrakce na pevné fázi	44
1.5	Metody pro detekci nukleových kyselin	49
1.5.1	Gelová elektroforéza	50
1.5.2	Northern blot.....	51
1.5.3	Polymerázová řetězová reakce.....	52
1.5.4	Mikročipy.....	54
1.5.5	Hmotnostní spektrometrie.....	55
2	Cíle diplomové práce.....	57
3	Experimentální část	58
3.1	Laboratorní pomůcky a přístroje	58
3.2	Chemikálie a reagensie	59
3.3	Nosiče.....	60
3.4	Výchozí materiál	61

3.5	Gelová elektroforéza pro detekci nukleových kyselin (UREA-PAGE).....	62
3.6	Gelová elektroforéza pro detekci proteinů (SDS-PAGE)	63
3.7	Polymerázová řetězová reakce pro detekci miRNA (PCR)	66
3.8	Izolace RNA z buněk pomocí činidla TRIzol™	67
3.9	Měření čistoty a koncentrace RNA pomocí UV/VIS spektrofotometru	67
3.10	Izolace oligo miRNA pomocí TiO ₂ materiálu	68
3.11	Izolace oligo miRNA pomocí TiO ₂ materiálu z buněk	69
3.12	Odsolení séra.....	71
3.13	Izolace oligo miRNA pomocí TiO ₂ materiálu ze séra	72
4	Výsledky a diskuze.....	74
4.1	Gelová elektroforéza standardních roztoků oligo RNA, koncentrační řada roztoku standardu oligo RNA 23-mer	74
4.2	Optimalizace času inkubace vzorku s částicemi při izolaci oligo miRNA pomocí TiO ₂ materiálu.....	77
4.3	Optimalizace času lyze buněk při izolaci oligo miRNA pomocí TiO ₂ materiálu	80
4.4	Optimalizace izolace miRNA pomocí TiO ₂ materiálu ze vzorku lidského séra	83
4.5	PCR elučních frakcí z izolace oligo miRNA pomocí TiO ₂ materiálu	90
5	Závěr.....	95
6	Zdroje	97

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek č. 1: Centrální dogma	16
Obrázek č. 2: Struktura RNA.....	17
Obrázek č. 3: Útvary sekundární struktury RNA: a) křížení, b) intramolekulární smyčky, c) boule, d) vlásenka	17
Obrázek č. 4: Příklad struktury RNA: a) sekundární, b) terciální (konkrétně tRNA)	18
Obrázek č. 5: Biogeneze a funkce miRNA	23
Obrázek č. 6: Druhy cfRNA vyskytující se v lidské krvi a jejich biologické funkce.....	27
Obrázek č. 7: Pozměněná exprese dvou skupin miRNA v rakovinné a normální tkáni.....	34
Obrázek č. 8: Obecný postup při přípravě vzorku NK pro molekulární detekci	40
Obrázek č. 9: Obecný princip fenol-chloroformové extrakce	42
Obrázek č. 10: Postup extrakce na pevné fázi	44
Obrázek č. 11: Princip izolace NK za pomoci magnetických částic	47
Obrázek č. 12: Magnetické částice modifikované oxidem křemičitým (TEM mikroskopie) ..	48
Obrázek č. 13: Blotovací techniky.....	52
Obrázek č. 14: Schéma PCR, 3 kroky: denaturace, nasednutí primerů a prodloužení	53
Obrázek č. 15: Princip miRNA profilování pomocí mikročipů.....	55
Obrázek č. 16: UREA-PAGE standardních roztoků oligo RNA 10, 20, 23, 30 a 40 nukleotidů	74
Obrázek č. 17: UREA-PAGE koncentrační řady roztoku standardu oligo RNA 23-mer.....	75
Obrázek č. 18: UREA-PAGE optimalizace času inkubace vzorku s částicemi 1.....	79
Obrázek č. 19: UREA-PAGE optimalizace času inkubace vzorku s částicemi 2.....	79
Obrázek č. 20: Znázornění přečištění RNA pomocí NaCl a isopropanolu, stav po centrifugaci	81
Obrázek č. 21: UREA-PAGE (vlevo) a SDS-PAGE (vpravo) optimalizace času lyze buněk, seznámení s postupem	81
Obrázek č. 22: UREA-PAGE (vlevo) a SDS-PAGE (vpravo) optimalizace času lyze buněk ..	82
Obrázek č. 23: UREA-PAGE optimalizace prostředí vazby miRNA na částice TiO ₂ , různé koncentrace SDS.....	85
Obrázek č. 24: UREA-PAGE optimalizace prostředí vazby miRNA na částice TiO ₂ , GuSCN, SDS, odsolení.....	86
Obrázek č. 25: UREA-PAGE (vlevo) a SDS-PAGE (vpravo) optimalizace prostředí vazby miRNA na částice TiO ₂ , isopropanol, octan, různé koncentrace GuSCN	89

Obrázek č. 26: Průběh PCR	91
Graf č. 1: Kalibrační křivka standardu oligo RNA 23-mer	76
Graf č. 2: Kalibrační křivka PCR.....	92
Tabulka č. 1: Příklady potencionálních mRNA biomarkerů	29
Tabulka č. 2: Příklady potencionálních miRNA biomarkerů pro odhalení onemocnění rakovinou.	38
Tabulka č. 3: Komerčně dostupné magnetické částice s povrchovou modifikací pro izolaci RNA i DNA	48
Tabulka č. 4: Data z UREA-PAGE koncentrační řady roztoku standardu oligo RNA 23-mer	75
Tabulka č. 5: Data ze spektrofotometrie produktu izolace RNA z buněk pomocí činidla TRIZol™	77
Tabulka č. 6: Data z UREA-PAGE, optimalizace času inkubace vzorku s částicemi.....	80
Tabulka č. 7: Data z UREA-PAGE, přidavek SDS, různé koncentrace	85
Tabulka č. 8: Data z UREA-PAGE, přidavek 4 M GuSCN, 1% SDS a odsolení	87
Tabulka č. 9: Data z UREA-PAGE, různé koncentrace GuSCN.....	90
Tabulka č. 10: Data pro kalibrační křivku PCR.....	91
Tabulka č. 11: Data, vyhodnocení PCR.....	92
Tabulka č. 12: Porovnání PCR dat s daty z UREA-PAGE.....	93

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

sncRNA	malé nekódující ribonukleové kyseliny
ncRNA	nekódující ribonukleové kyseliny
miRNA	mikro RNA
RNA	ribonukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
NK	nukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
lncRNA	dlouhá nekódující ribonukleová kyselina
siRNA	krátká interferující ribonukleová kyselina
A	adenin
C	cytosin
G	guanin
U	uracil
T	thymin
UTRs	nepřekládané koncové části
MALAT1 lncRNA	„ <i>metastasis associated lung adenocarcinoma 1</i> “ dlouhá nekódující ribonukleová kyselina
HOTAIR lncRNA	„ <i>homeobox transkript antisense ribonucleic acid</i> “ dlouhá nekódující ribonukleová kyselina
pri-miRNA	primární mikro ribonukleová kyselina
pre-miRNA	prekurzorová mikro ribonukleová kyselina
RISC	„ <i>RNA-induced silencing complex</i> “, umlčovací komplex indukovaný ribonukleovou kyselinou
tasiRNA	<i>trans</i> -působící ribonukleová kyselina
NAT-siRNA	přírodní reverzní transkript krátké inhibiční RNA
snRNA	krátká nukleární ribonukleová kyselina
sno-RNA	krátká nukleolární ribonukleová kyselina
piRNA	ribonukleová kyselina interagující s piwi proteiny
vaultRNA	ribonukleová kyselina asociovaná s ribonukleoproteinem vault

cfRNAs	volná mimobuněčná ribonukleová kyselina
hTERT mRNA	„ <i>telomerase reverse transcriptase</i> “ telomerázová reverzní transkriptasová mediátorová ribonukleová kyselina
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
circRNA	cirkulární ribonukleová kyselina
Ago2	protein Argonaut-2
CLDN1	gen pro protein Claudin-1
DEPC	diethylpyrokarbonát
GuSCN	guanidium thiokyanát
rGO	redukovaný oxid grafenu
MS	hmotnostní spektrometrie
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
UV	ultrafialové záření „ <i>ultraviolet</i> “
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
MALDI	ionizace laserem za pomoci matrice
SDS	dodecylulfát sodný
CT	„ <i>cycle of treshold</i> “

0 Úvod

S neustálým rozvojem moderní medicíny je kladen důraz na používání biomarkerů. Diagnostické biomarkery slouží k indikaci stavu organismu, zejména pro rozlišení normálního a patologického stavu organismu. Jinými typy biomarkerů lze získat i podrobnější informace. Prognostické biomarkery slouží k předpovědi recidivy patologického stavu a prediktivní slouží k předpovědi reakce pacienta na léčbu. Zároveň se začíná hledat způsob co možná nejméně invazivního testování. V tomto ohledu vyhovuje testování z lidské krve či séra. Dochází k objevení nových druhů krátkých ribonukleových kyselin (sncRNA) řadících se mezi nekódující ribonukleové kyseliny (ncRNA). I přes to, že nenesou genetickou informaci přepisovanou do proteinu zastávají významné role v regulaci mnoha procesů v lidském těle. Jejich koncentrace je proměnná podle aktuálního stavu organismu. Proto se začíná uvažovat o sncRNA jako potencionálních kandidátech na biomarkery. Použití mikro ribonukleových kyselin (miRNA) jako biomarkerů je zajímavé hlavně kvůli jejich širokým regulačním schopnostem a proměnným koncentracím mezi patologickým a normálním stavem způsobených odlišnou expresí. Z tohoto důvodu vzrůstá potřeba jejich účinné a rychlé izolace z lidského séra, plazmy či buněk a následné spolehlivé detekce.

Existuje řada různých druhů izolačních i detekčních metod. V této práci byla používána metoda izolace miRNA na pevnou fázi za pomoci mikrosfér z oxidu křemičitého (TiO_2) při uspořádání částic v roztoku. Částice byly z roztoku separovány centrifugací. Jako detekční metoda byla zvolena gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu. V gelu byly ribonukleové kyseliny (RNA) následně detekovány pomocí barviva SYBR Green II RNA Gel Stain. Další použitou detekční metodou byla polymerázová řetězová reakce (PCR). Vzorke RNA jsou velmi citlivé na rozložení RNasami. Čím déle RNasy působí na vzorek RNA, tím je RNA více rozložená, což je nežádoucí. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili zejména na zkrácení některých inkubačních kroků a urychlení procesu izolace. Dále jsme se zaměřili na optimalizaci izolace miRNA ze séra, kde jsme měli za cíl eliminovat působení RNas za pomoci přísadků specifických látek.

1 Teoretická část

1.1 Nukleové kyseliny

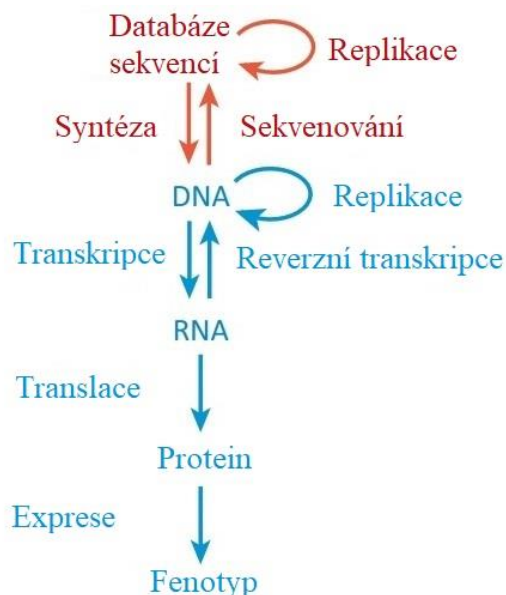
Nukleové kyseliny (NK) patří mezi biologické makromolekuly spolu s proteiny, sacharidy a tuky. Všechny tyto makromolekuly jsou nezbytné pro fungování mnoha procesů v lidském těle. NK se skládají z nukleotidových podjednotek a rozdělují se na dvě skupiny, a to na deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) a na RNA (Sims a kol., 2012). Ve své primární struktuře obsahuje DNA genetickou informaci, která se předává z generace na generaci. Podle vzoru DNA vzniká následně RNA, která slouží jako vzor pro syntézu proteinů.

V každé buňce vzniká řada druhů RNA. Mezi druhy RNA je například mediátorová ribonukleová kyselina (mRNA), která vzniká přepisem genetické informace z úseku DNA a slouží jako vzor pro syntézu bílkovin. Dalšími základními typy, kterými jsou produkty jiných sekvencí DNA, a již nejsou kódující, jsou například ribozomální (rRNA) nebo transferová ribonukleová kyselina (tRNA). Do dvou hlavních skupin se dělí ncRNA podle délky na sncRNA s méně jak 200 nukleotidy v řetězci a na dlouhé nekódující RNA (lncRNA) s více jak 200 nukleotidy. Mezi krátké patří zejména miRNA a krátká interferující RNA (siRNA).

1.1.1 Centrální dogma

Základní myšlenku molekulární genetiky zastává centrální dogma viz Obrázek č. 1. Jedná se o biologický postulát, který vznikl po roce 1950. Hlavní myšlenkou centrálního dogmatu je uložení genetické informace v DNA. Dále určuje tok genetické informace a tím i vztahy mezi NK a proteiny. Výchozí molekulu zde představuje DNA, ze které je syntetizována molekula RNA procesem transkripce. Z RNA je následně syntetizován protein procesem translace. Další tok genetické informace představuje replikace DNA. Je to proces, kdy je DNA duplikována a předána další generaci v nezměněné formě (Gillings a Westoby, 2019). Dalším základním procesem je reverzní transkripce, kterým je genetická informace přepisována z RNA do DNA. Tento proces byl objeven na základě objevení reverzní transkriptasy. Reverzní transkriptasa se vyskytuje jak u prokaryot, tak u eukaryot. Odhaduje se, že až třetina našeho genomu pochází z reverzní transkripce (Shapiro, 2009). V dnešní době jsou k centrálnímu dogmatu vloženy nové kroky, které zahrnují další předávání genetické informace. Jedná se o možnost získání sekvence DNA a jejího následného uložení v databázích. Dále je možnost zpětně tuto DNA uměle syntetizovat. Rozšíření centrálního dogmatu s sebou nese do budoucna

výhody, ale i určitá rizika (Gillings a Westoby, 2019). Výhoda spočívá ve využití získaných informací v oblasti medicíny a zemědělství. Riziko představují geneticky modifikované organismy. Navzdory snaze o jejich kontrolu se mohou dostat do přirozených ekosystémů a svou přítomností narušit jeho přirozené fungování (Dana a kol., 2012).



Obrázek č. 1: Centrální dogma, převzato a upraveno z (Gillings a Westoby, 2019).

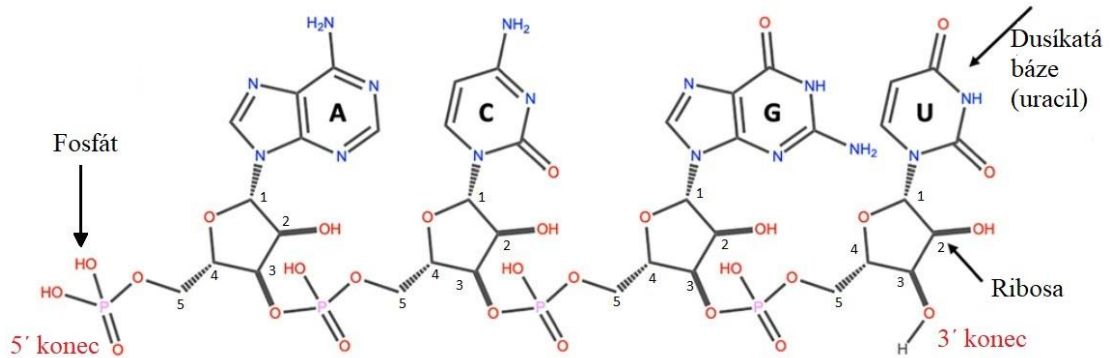
1.1.2 Ribonukleové kyseliny

Všestrannými přírodními makromolekulami jsou RNA. Ve své lineární sekvenci uchovávají velké množství informací, včetně informace o stavbě proteinu a informace o jejich složení do specifické struktury. Specifická struktura umožňuje vykonávání velmi důležitých a rozmanitých funkcí v buňkách organismů (Blackburn a kol., 2006). Chemicky je RNA velmi podobná DNA, skládá se z kostry obsahující cukr a fosfát a ze čtyř odlišných bází představujících adenin (A), cytosin (C), guanin (G) a uracil (U) (Ramos a Laederach, 2014). Uracil je v DNA nahrazen (T) thyminem (Jonsson a kol., 1996).

1.1.3 Struktura a vznik RNA

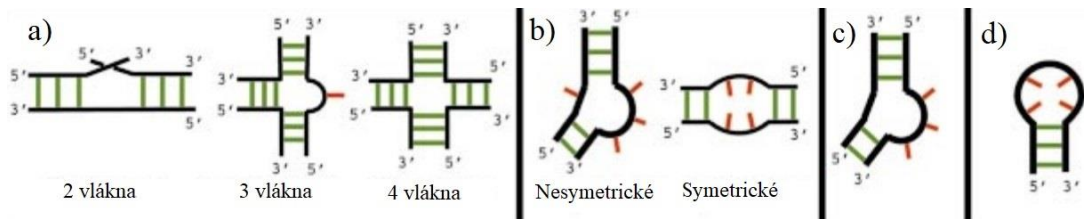
Nukleotidy se skládají z pěti-uhlíkatého cukru ribosy, fosfátu a dusíkaté báze. V případě RNA se jedná o A, G, C a U (Minchin a Lodge, 2019, Westhof a Auffinger, 2006). Jednotlivé nukleotidy jsou k sobě vázány fosfodiesterovou vazbou (Westhof a Auffinger, 2006). Tato vazba spočívá ve vazbě fosfátu na ribosu v její poloze uhlíku 3 a 5. Fosfát a ribosa tvoří základní kostru molekuly. Tato kostra na jednom konci obsahuje fosfát, který se označuje jako 5' konec

a na druhém konci se nachází hydroxylová skupina ribosy a představuje 3' konec. Dusíkatá báze se váže na ribosu v poloze jejího prvního uhlíku viz Obrázek č. 2 (Minchin a Lodge, 2019).



Obrázek č. 2: Struktura RNA, převzato a upraveno z (Minchin a Lodge, 2019).

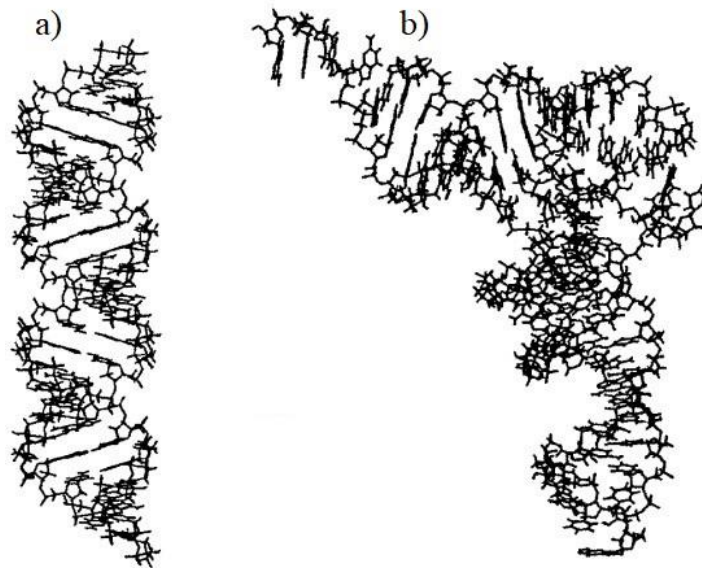
Primární struktura RNA je tvořena sekvencí nukleotidů. Sekundární strukturu představují oblasti párování bází vlastního řetězce a vytváření dvouvláknových RNA duplexů, šroubovic, které jsou místy narušeny jednovláknovou strukturou (Westhof a Auffinger, 2006). Sekundární struktura se dělí do čtyř útvarů: šroubovice, smyčky, křížení a boule. Smyčky, křížení a boule představují nepárující se jednovláknové úseky zakončené duplexy (Tinoco a Bustamante, 1999). Útvary jsou na Obrázku č. 3.



Obrázek č. 3: Útvary sekundární struktury RNA: a) křížení, b) intramolekulární smyčky, c) boule, d) vlásenka, převzato a upraveno z (Gan a kol., 2003).

Šroubovice RNA je na Obrázku č. 4 a). Šroubovice jsou většinou typu A s jedenácti nukleotidy na otáčku a utváří specifické struktury, jako jsou velký a malý žlábek (Blackburn a kol., 2006). Terciární strukturu představuje další skládání sekundární struktury v třírozměrném prostoru. Příklad třírozměrné struktury je na Obrázku č. 4 b). Řetězce spolu interagují slabými vazebnými interakcemi, zejména Van der Waalsovými silami (Westhof a Auffinger, 2006). Terciární struktura, do které se skládají některé RNA molekuly, je důležitá pro jejich biologickou funkci (Conn a Draper, 1998). Specifickou terciární třírozměrnou strukturu mají

například tRNA a rRNA. Tato třírozměrná struktura spočívá v tzv. koaxiálním skládání krátkých úseků RNA. Jedná se o interakci dvou přilehlých smyček. Stabilitu terciární struktury zlepšují interagující ionty kovů, nejčastěji to jsou ionty hořečnaté a draselné. Ionty s RNA interagují několika způsoby. Buď ionty upraví náboj kostry RNA vlákna, která je negativně nabitá a způsobí větší přitažlivost dvou vláken RNA nebo s RNA ionty interagují prostřednictvím molekul vody (Blackburn a kol.,2006).



Obrázek č. 4: Příklad struktury RNA: a) sekundární, b) terciální (konkrétně tRNA), převzato a upraveno z (Westhof a Auffinger, 2006).

V molekule RNA se vyskytuje párování typu Watson-Crick, C se páruje s G a U se páruje s A (Westhof a Auffinger, 2006, Ramos a Laederach, 2014). Párování bází se ve většině případů vyskytuje v těchto formách. V RNA molekulách se ale také mohou vyskytovat speciální typy párování bází jako je například párování G s U nebo G s A (Blackburn a kol., 2006).

Ve struktuře RNA často dochází k modifikacím dusíkatých bází. K modifikacím bází dochází jak u kódujících, tak hojně i u nekódujících. Modifikace se mohou objevovat uvnitř řetězce, ale i na bázích vyskytujících se na koncích řetězce přidaných posttranskripční úpravou. Nejčastější vnitřní modifikovanou bází mRNA a obecně lncRNA je N⁶-methyladenin (Roundtree a kol., 2017). Dalšími modifikovanými bázemi, které se vyskytují v mRNA, jsou N⁷-methylguanin (v čepičce) a 5-methylcytosin. V ribosomální RNA se velmi často vyskytuje modifikovaná báze pseudouridin. Jednou z RNA, která obsahuje modifikované báze hojně je tRNA. Může obsahovat okolo 15 až 25 % modifikovaných bází. Příkladem modifikovaných

bázi v tRNA jsou: 5-methoxykarbonylmethyluridin, 5-methoxykarbonylmethyl-2-thiouridin, N⁶-isopentenyladenosin (Wang a He, 2014). Chemické modifikace mají vliv na výslednou strukturu dané RNA nebo pomáhají k interakci s některými vazebnými proteiny. Jejich přítomnost je dynamická, což znamená, že je proměnná v závislosti na podmínkách prostředí (Nachtergaele a He, 2017).

Proces vzniku RNA začíná transkripcí, která spočívá v tom, že z molekuly DNA je syntetizována RNA za účasti RNA polymerasy, která vlákno RNA syntetizuje od 5' konce k 3' konci. Pro spuštění transkripce, musí RNA polymerasa najít na vlákně DNA promotorovou sekvenci (Blackburn a kol., 2006). Promotor se skládá z repetitivní sekvence TATA-box (opakující se sekvence TA) nebo z další sekvence označované jako CCAAT-box (Kitazawa a kol., 1998). Vytvoří se transkripční bublina a následně heteroduplex RNA s DNA. To znamená, že jedno vlákno představuje původní DNA vzor a druhé vlákno napojené na vzor je nově syntetizovaná RNA. Pokud RNA polymerasa zaznamená na vlákně DNA sekvenci označovanou jako terminátor, dojde k ukončení transkripce (Minchin a Lodge, 2019). Po transkripci RNA není funkční a musí být upravena (Blackburn a kol., 2006). Úpravy představují tři hlavní kroky: navázání čepičky, navázání polyadenylového ocásku a sestřih. Ze všeho nejdříve dochází k vazbě čepičky na 5' konec. Reakce probíhá již při transkripci, při odhalení 5' konce RNA. Na koncový nukleotid je 5'-5' vazbou připojen methylovaný guanosintrifosfát. Čepička chrání molekulu RNA před 5' exonukleasami (Proudfoot a kol., 2002).

Druhým krokem je polyadenylace neboli vytváření polyadenylového ocásku. Jeho formování je určeno specifickou sekvencí poblíž 3' konce RNA. Specifická sekvence se skládá z AAUAAA. Dochází ke štěpení vlákna RNA v místě za specifickou sekvencí a pomocí enzymu poly-A polymerasy jsou ke 3' konci připojovány adenosinové jednotky (Blackburn a kol., 2006).

Třetím krokem úpravy RNA je sestřih. Na vlákně RNA se nacházejí oblasti kódující protein nazývané exony a nekódující oblasti nazývané introny. Cílem sestřihu je nekódující oblasti introny z RNA vlákna odstranit (Shafee a Lowe, 2017). Někdy dochází k tzv. alternativnímu sestřihu, který zpříčiní vznik většího počtu druhů proteinů z jednoho genu (Blackburn a kol., 2006). Samotný sestřih probíhá za pomoci spliceosomů, které rozeznávají 3' a 5' sestřihové místo. (Conti a kol., 2013). Dochází k propojení 3' konce s 5' koncem exonu. Exony jsou krátké úseky, zatímco introny představují dlouhé úseky sekvence RNA (Blackburn a kol., 2006).

Posledním krokem úpravy je případné odštěpení nekódující koncové části vlákna RNA za pomoci RNasy P nebo RNasy III (Blackburn a kol., 2006). U eukaryot je transkripce, a tedy

i genová exprese řízena více faktory, a to z důvodu větší složitosti organismu, který se skládá z více typů tkání oproti prokaryotickým organismům (Shafee a Lowe, 2017). Probíhá zde také regulace genové exprese a úpravy primárního transkriptu, které se u prokaryotních organismů nevyskytují (Minchin a Lodge, 2019, Shafee a Lowe, 2017).

1.2 Druhy RNA a jejich funkce

Lidský genom obsahuje kolem 20-25 tisíc genů kódujících proteiny, to je pouze přibližně 1,2 % z celého lidského genomu (Minchin a Lodge, 2019, Mattick a Makunin, 2006). Ostatní nekódující sekvence mohou sloužit jako templát pro vznik tRNA či rRNA a dalších ncRNA důležitých pro buněčné procesy (Minchin a Lodge, 2019).

1.2.1 Kódující RNA

Jedinou kódující RNA je mRNA. Funkcí mRNA je přenos genetické informace. Kóduje tedy proteinovou sekvenci, která představuje pořadí aminokyselin v proteinovém řetězci (Ralsler, 2014). Vzniká procesem transkripce a následnými posttranskripčními úpravami. Před sestříhem se tato RNA nazývá jako prekurzorová mRNA. Z této prekurzorové mRNA se nejprve odstraní introny a zbylé exony se spojí (Minchin a Lodge, 2019). Terciální strukturu vytvářejí koncové části (UTRs), které se do proteinu nepřekládají (Blackburn a kol., 2006). Terciální strukturu představují mimo jiné útvary nazývané G-kvadruplexy, vyskytující se jak v oblastech UTRs, tak i mimo ně. Slouží jako vazebné místo pro proteiny vážící se na RNA (Soemedi a kol., 2017). Na UTRs závisí účinnost translace, celková stabilita mRNA a je díky nim umožněn transport mRNA z jádra do cytoplazmy (Mignone a kol., 2002). Chemické modifikace se u mRNA vyskytují ve formě N⁶-methyladenosinu, inosinu, pseudouridinu, 5-methylcytidinu, 5-hydroxymethylcytidinu a také N¹-methyladenosinu. Tyto modifikace mají zásadní roli v párování bází, změně konformace molekuly a schopnosti vázat se s proteiny (Harcourt a kol., 2017).

1.2.2 Nekódující RNA

Mezi nejznámější ncRNA patří tRNA a rRNA. Struktura tRNA spočívá v jednovláknové RNA dlouhé 73 až 90 nukleotidů. Tato jednovláknová RNA se skládá do sekundární struktury specifického tvaru jetelového listu. Sekundární struktura obsahuje útvary jako je akceptorové rameno, D-rameno, antikodonové rameno neboli antikodon, T-rameno

(Ishitani a kol., 2003) a variabilní rameno (Watson a kol., 2019). Antikodon tvoří tři nukleotidové báze na konci antikodonového ramena, které slouží k interakci s kodonem. Kodon tvoří trojice bází v mRNA (Allnér a Nilsson, 2011). Terciální strukturu představuje složení sekundární struktury v prostoru do tvaru L. Skládání se odehrává za vzniku interakcí v centru molekuly tRNA, kde spolu interagují variabilní rameno spolu s ramenem D. Tvaru L napomáhá interakce mezi D a T-ramenem. Modifikované báze v řetězci tRNA hrají roli při interakcích ramen (Ishitani a kol., 2003). K syntéze proteinu je tRNA také zapotřebí (Blackburn a kol. 2006). Aminokyseliny se váží k tRNA za účasti enzymu aminoacyl-tRNA-syntetasy. K určitému druhu tRNA se váže specificky pouze určitý druh aminokyseliny. Selektivní vazbu zajišťuje specifita enzymu (Minchin a Lodge, 2019).

Ribosom se skládá z proteinů a z rRNA. Malá podjednotka obsahuje pouze jedno vlákno rRNA 16 Svedberg (S) a velká eukaryotní podjednotka obsahuje dvě menší vlákna rRNA 5,8 S a jedno větší vlákno rRNA 23 S (Allnér a Nilsson, 2011). Malá podjednotka získává informace z mRNA a velká podjednotka vytváří vazby mezi jednotlivými aminokyselinami (Minchin a Lodge, 2019).

1.2.3 Dlouhé nekódující RNA

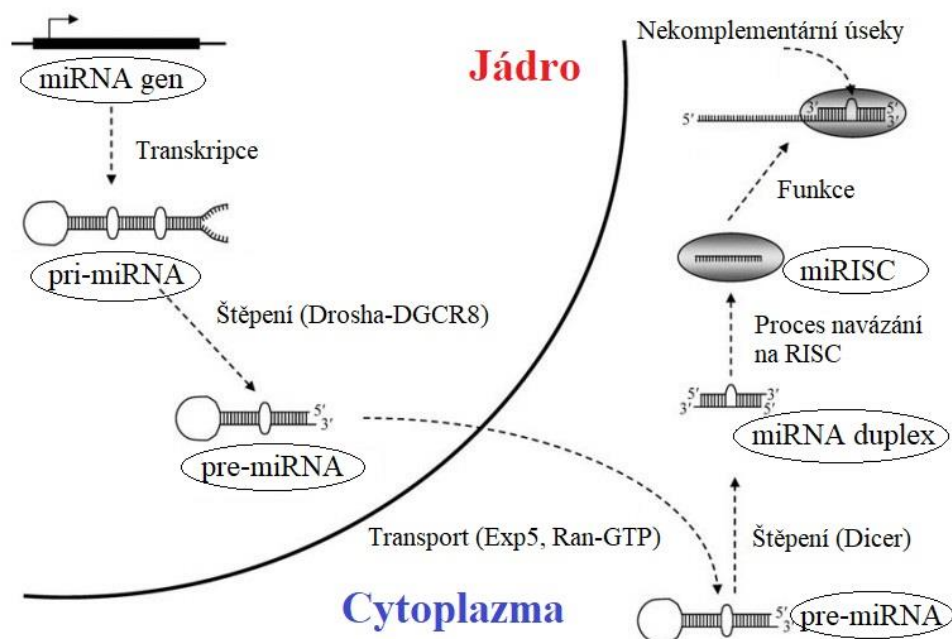
Do skupiny lncRNA patří RNA molekuly, které dosahují délky více než 200 nukleotidů (Röther a Meister, 2011). Tyto lncRNA vznikají transkripcí za pomoci enzymu RNA polymerasy II (Wang a kol., 2017, Röther a Meister, 2011). Probíhají zde i stejné posttranskripční úpravy (Dhanao a kol., 2018). Obsahují většinou čepičku, polyA konec a dochází u nich i k odstranění intronů, liší se pouze v malém počtu otevřených čtecích rámců (Wang a kol., 2017). Jejich funkce závisí na umístění v buňce a jedná se o regulaci genové exprese na více úrovních: transkripční, posttranskripční a epigenetické. V důsledku ovlivňují zejména buněčný růst (Camacho a kol., 2018).

Rozdělení těchto lncRNA do skupin se v publikacích mírně liší. Publikace se shodují na rozdělení do skupin: přírodní reverzní transkripty, dlouhé intergenové ncRNA, transkribované ultra-zachované regiony, cirkulární RNA a RNA asociované se zesilovačem (Spurná a kol., 2018, Camacho a kol., 2018). Dalšími zmiňovanými skupinami jsou RNA asociované s promotorem (Camacho a kol., 2018), pseudogeny (Spurná a kol., 2018), odlišné a intronické (Wang a kol., 2017), přímé a obousměrné RNA (Dhanao a kol., 2018). Příklady jednotlivých druhů lncRNA jsou „*metastasis associated lung adenocarcinoma transkript 1*“ (MALAT-1) a „*homeobox transcript antisense ribonucleic acid*“ (HOTAIR) (Wang a kol., 2017, Camacho a

kol., 2018) a představují onkogenní biomarkery pro více druhů karcinomů (Camacho a kol., 2018). Dalšími potencionálními biomarkery rakoviny jsou „*zinc finger E-box binding protein 1 antisense ribonucleic acid 1*“ lncRNA pro karcinom žaludku a dlouhá nekódující RNA aktivovaná růstovým faktorem beta „*long non-coding ribonucleic acid activated by transforming growth factor-beta*“ pro hepatocelulární karcinom (Wang a kol., 2017).

1.2.4 Krátké nekódující

Do skupiny sncRNA molekul patří RNA, které mají ve svém řetězci 200 nukleotidů a méně (Wang a kol., 2017). Velmi zajímavou skupinou jsou miRNA. Strukturně se jedná o molekuly složené z jednoho vlákna. Délka tohoto vlákna je uváděna v publikacích odlišně. Uvádí se, že se jedná o vlákno dlouhé nejméně 17 nukleotidů a jeho maximum může dosahovat až 25 nukleotidů (Wang a kol., 2017, Spurná a kol., 2018, Morelli a kol., 2020, Röther a Meister, 2011). Vznikají v jádře jako primární miRNA (pri-miRNA), mají délku kolem tisíc nukleotidů a sekundární strukturu ve tvaru vlásenky. Transkripce u nich probíhá za pomoci enzymů RNA polymerasy II a výjimečně i RNA polymerasy III (Chu a Rana, 2007). V jádře následně dochází ke štěpení pri-miRNA na prekurzorovou miRNA (pre-miRNA), která obsahuje 70 nukleotidů. Štěpení probíhá za pomoci enzymového komplexu Drosha-DGCR8. Oříznutá pre-miRNA vstupuje z jádra do cytoplazmy za pomoci proteinu exportinu 5 a jaderného proteinu Ran-GTP. V cytoplazmě je pre-miRNA štěpena za pomoci endonukleasy Dicer na dvouvláknovou miRNA o délce 22 nukleotidů (miRNA duplex). Tento miRNA duplex je připraven k navázání do umlčovacího komplexu indukovaného ribonukleovou kyselinou, „*ribonucleic acid-induced silencing complex*“ (RISC). V průběhu začleňování miRNA do komplexu dojde k opětovnému působení enzymu Dicer na miRNA. Enzym Dicer působí tentokrát svou helikasovou aktivitou a rozvolní dvouvláknovou miRNA na dvě samostatná vlákna: přímé a reverzní. Do komplexu miRNA s RISC se začlení pouze reverzní vlákno a druhé je degradováno (Choudhuri, 2010). Proces biogeneze a znázornění funkce miRNA je na Obrázku č. 5.



Obrázek č. 5: Biogeneze a funkce miRNA, převzato a upraveno z (Choudhuri a kol., 2010).

K inhibici translace mRNA dochází dvěma způsoby. Prvním je štěpení mRNA pomocí endonukleas a druhému předchází deadenylace a následné působení exonukleas. První způsob je častější u rostlin, kde je téměř 100% komplementarita mezi cílovou mRNA a miRNA. U savců probíhá druhá možnost z důvodu nedostatečné komplementarity bází (Spurná a kol., 2018). K tomu, aby se určitá miRNA navázala na úsek mRNA je zapotřebí spárování minimálně 6 nukleotidů (Spurná a kol, 2018, Mattick a Makunin, 2006). Funkcí aktivované miRNA v komplexu RISC je tedy posttranskripční umlčování genů specifickým navázáním se na cílovou mRNA a iniciace její degradace (Romano a kol., 2017). Jednotlivé miRNA mohou genovou expresi buď snižovat, ale existují případy, kdy určité miRNA genovou expresi zvyšují. Expresi několika genů může ovlivnit zároveň jeden druh miRNA, což značně komplikuje její použití pro genovou terapii (Spurná a kol., 2018).

Podobu jednovláčkové molekuly RNA má siRNA o délce 20 až 25 nukleotidů (Spurná a kol., 2018), někdy až 30 nukleotidů (Dana a kol., 2017). Oproti miRNA se u ní vyskytuje významný rozdíl. Má exogenní virový původ, tedy vzniká z dvouvláčkové molekuly RNA virů (Spurná a kol., 2018). Společným krokem vzniku miRNA a siRNA je štěpení RNAsou Dicer. Dlouhé dvouvláčko se rozštěpí na kratší dvouvláčkové úseky siRNA (Tang, 2005). Má stejnou funkci jako miRNA, tedy tlumí genovou expresi (Minchin a Lodge, 2019) s rozdílem, že ji tlumí u genů virového původu. Dalším rozdílem mezi miRNA a siRNA je, že u siRNA je

zapotřebí 100% shody v komplementaritě bází při vazbě na mRNA v procesu tlumení genové exprese (Choudhuri, 2010).

Sekundárními endogenními druhy siRNA jsou *trans*-působící RNA (tasiRNA) a přírodní reverzní transkript malé interferující RNA (Röther a Meister, 2011). Odlišností tasiRNA od siRNA je její rozdílné cílení. Zatímco siRNA cílí na stejný lokus genu, ze kterého vznikla, tasiRNA cílí na lokus jiný (Spurná a kol., 2018).

Krátká nukleární RNA (snRNA) dosahuje délky okolo 150 nukleotidů (Wang a kol., 2017) a neobsahuje polyadenylové ocásky. Svou funkci vykonává v nukleoplazmě (Spurná a kol., 2018). Její funkcí je vytvářet komplexy s proteiny za vzniku malých nukleárních ribonukleoproteinových částic. Tyto částice se rozdělují na druhy U1, U2, U4, U5 a U6. Všechny druhy malých nukleárních ribonukleoproteinových částic spolu mohou interagovat prostřednictvím vzájemných komplementárních úseků za vzniku spliceosomů (Wang a kol., 2017, Watson a kol., 2019).

Krátká nukleolární RNA (snoRNA) je poddruhem snRNA a její řetězec může dosahovat délky 60 až 300 nukleotidů. I přes jejich délku 300 nukleotidů je publikace zařazuje mezi snRNA, stejně jako v případě RNA označované jako 7SK (Wang a kol., 2017). Funkce snoRNA spočívá v chemické modifikaci rRNA. Existují dvě hlavní skupiny snoRNA: C/D box a H/ACA box (Scott a Ono, 2011). Vlákno C/D boxu dosahuje délky 60 až 200 nukleotidů a obsahuje specifické struktury jako je C box a D box. Vlákno H/ACA boxu dosahuje délky 120 až 250 nukleotidů a obsahuje dvě vlásenkové struktury spojené s H boxem. Dalším útvarem v H/ACA boxu je ACA box (Kiss, 2001), který je umístěn na 3' konci (Spurná a kol., 2018). Působení snoRNA se vztahuje i na tRNA (Wang a kol., 2017, Röther a Meister, 2011), snRNA (Morreli a kol., 2020) a mRNA (Mattick a Makunin, 2006), u kterých dochází také k chemické modifikaci.

Dalším druhem sncRNA je RNA interagující s piwi proteiny (piRNA). Podle různých publikací dosahuje délky nejméně 24 a nejvíce 32 nukleotidů. Je součástí komplexu s proteiny piwi (Wang a kol., 2017, Spurná a kol., 2018, Romano a kol., 2017, Morreli a kol., 2020, Watson a kol., 2019, Röther a Meister, 2011). Je součástí komplexu RISC podobně jako miRNA a její funkce spočívá v umlčování některých genů (Siomi a kol., 2011). Podskupinou piRNA jsou krátké ribonukleové kyseliny asociované s opakováním „*repeat associated small interfering ribonucleic acids*“, které udržují strukturu heterochromatinu a provádějí kontrolu transkripce repetitivních úseků (Spurná a kol., 2018).

Existuje několik druhů YRNA: hY1, hY3, hY4, hY5 (Spurná a kol., 2018). Jsou součástí ribonukleoproteinové partikule spolu s proteinem Ro60, Ro52 a La stabilizují ostatní malé

nekódující RNA. Jsou nezbytné pro zahájení replikace u obratlovců (Kowalski a Krude, 2015). V průběhu replikace YRNA interagují s chromatinem a iniciačními proteiny (Wang a kol., 2017).

Dalšími druhy sncRNA jsou RNA označované jako 7SL a 7SK. Regulace translace a transportu proteinu po translaci probíhá pomocí 7SL a 7SK reguluje transkripci (Wang a kol., 2017). Délku 331 nukleotidů dosahuje 7SK RNA a ve svém vlákně obsahuje několik vlásenek za sebou (Spurná a kol., 2018). Na 7SK RNA se může navázat také proteinový komplex složený z proteinů 1 a 2 indukovaných hexamethylenbisacetamidem „*hexamethylene bisacetamid inducible protein 1 a 2*“ a tím způsobit změnu konformace celé 7SK RNA a zastavit proces elongace transkribované RNA (Diribarne a Bensaude, 2009). Součástí částice pro rozpoznání signálu spolu s 6 proteiny je 7SL. Funkce této sncRNA se týká strukturního uspořádání částice pro rozpoznání signálu. Má afinitu k proteinům v této částici a slouží zde jako matrice pro jejich sestavení do správné konformace (Walter a Blobel, 1993).

Krátká řídicí RNA dosahuje délky 50-70 nukleotidů. Tato sncRNA vykonává funkci editace mitochondriální RNA během jejího vzniku. Váže se na předem upravenou mitochondriální RNA a slouží k rozhodování pro inserci nebo delecii uracilu. Její primární sekvence nukleotidů se dělí do tří funkčních úseků. Jedná se o kotevní sekvenci nacházející se na 5' konci, která interaguje s upravovanou RNA. Druhým úsekem je informační sekvence, která určuje druh editační reakce. Třetím úsekem je posttranskripčně přidaná sekvence, která obsahuje nukleotid U a dosahuje délky 20 nukleotidů (Souza a kol., 1997).

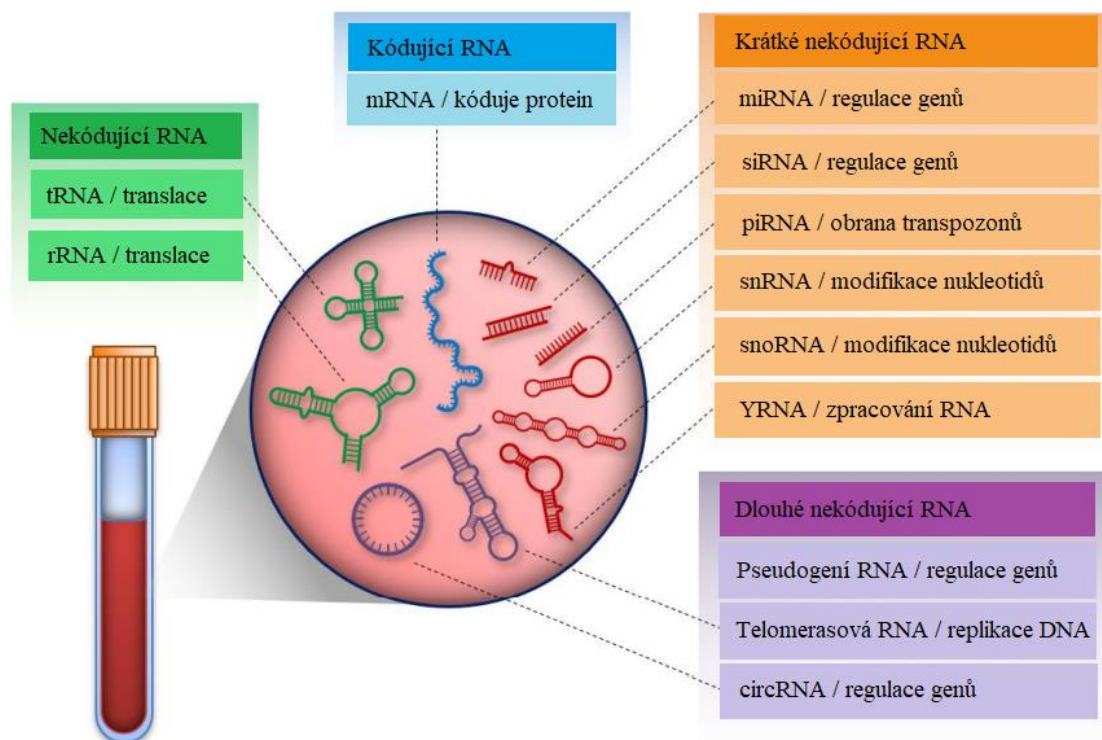
Dalšími druhy sncRNA jsou například RNA asociovaná s počátkem transkripce, nukleární „run-on“ RNA, RNA odvozené od tRNA indukované stresem a RNA asociovaná s vault ribonukleoproteinem (vaultRNA) (Spurná a kol., 2018).

1.3 RNA jako diagnostický biomarker

Moderní medicína si klade za cíl se více zaměřit na pacienta jako jednotlivce. V důsledku toho dochází k rozvoji molekulární medicíny, pro kterou jsou důležitým nástrojem biomarkery. Biomarker představuje indikátor, jehož hodnotu můžeme změřit a který vypovídá o stavu organismu (Zhang a kol., 2017). Vhodnost určitého biomarkeru se určuje hodnocením jeho selektivity a citlivosti pro dané onemocnění nebo podtyp onemocnění. Dokonalý biomarker by měl mít ideálně 100 % citlivost a 100 % specifitu. Stoprocentní citlivost znamená, že všichni testovaní pacienti s diagnostikovaným daným onemocněním nebo podtypem daného onemocnění mají test na daný biomarker pozitivní. Stoprocentní specifita znamená, že všichni

pacienti, kteří dané onemocnění nemají, mají test na daný biomarker negativní. V praxi však je tento model prakticky nedosažitelný. Diagnostické biomarkery se používají zejména pro určení, zda je pacientův stav normální či patologický. Mimo diagnostických biomarkerů existují i další typy biomarkerů, které se dělí podle jejich funkce. Například prognostické biomarkery dokáží předpovědět pravděpodobnost recidivy patologického stavu. Prediktivní biomarkery dokáží určit reakci na danou léčbu (FDA-NIH Biomarker Working Group, 2016).

Biomarkerem mohou být jak proteiny, tak i genové transkripty (Zhang a kol., 2017) nebo samotná pozměněná DNA (Swarzenbach a kol., 2011). NK jsou uvolňovány z buněk pomocí přirozených procesů jako je sekrece, apoptóza, či nekróza nádorových buněk. V oběhu setrvávají po dobu 15 minut až několik hodin a jsou degradovány v játrech a ledvinách. Volné RNA mohou být nalezeny v různých buněčných sekretech a jsou označovány jako volné mimobuněčné NK a slouží jako potencionální biomarkery. Do této skupiny je zařazována volná DNA, mRNA a miRNA (Swarzenbach a kol., 2011, Schwarzenbach, 2013). První průkaz RNA z krve pochází z roku 1948 (Mandel a Metais, 1948). Dalšími příklady tělních tekutin obsahující volné mimobuněčné RNA (cfRNAs) jsou moč, sliny, likvor a mateřské mléko (Swarzenbach a kol., 2011). Ve studii z roku 1979 autoři porovnávali hladiny RNA v plazmě u zdravých jedinců a u jedinců s mnohočetným myelomem (Hamilton a kol., 1979). Z toho vyplývá myšlenka o využití znalosti koncentrace RNA v plazmě jako indikátoru onemocnění. Vhodný způsob detekce cfRNAs je ze vzorků krve, resp. plazmy nebo séra, z důvodu možnosti opakovaného odběru, který umožňuje sledování stavu pacienta v průběhu léčby. V ideálním případě není invazivní biopsie rakovinné tkáně zapotřebí a další výhodou je i možnost sledování nenádorových onemocnění (Swarzenbach a kol., 2011). V lidské krvi se nachází řada různých cfRNA jak je zobrazeno na Obrázku č. 6 (Szilagyi a kol., 2020).



Obrázek č. 6: Druhy cfRNA vyskytující se v lidské krvi a jejich biologické funkce, převzato a upraveno z (Szilagyi a kol., 2020).

Skupina cfRNA se dělí na čtyři podskupiny. Jedná se o kódující RNA, do které patří mRNA, nekódující RNA zahrnující tRNA, rRNA a početnější skupiny krátkých a dlouhých nekódujících RNA.

1.3.1 mRNA

Obecně jsou mRNA v krvi méně stabilní než molekuly DNA, navíc jsou degradovány RNasami (Kopreski a kol., 1999). V krvi se vyskytují RNasy ve větší míře při rakovině než při fyziologickém stavu organismu (Reddi a Holand, 1976). Před RNasami přítomnými v krvi je mRNA chráněna, je stabilní a je možné ji následně amplifikovat a detekovat. Ochranu pravděpodobně způsobuje vložení mRNA do lipidových váčků (Kopreski a kol., 1999). Tato teorie byla zmíněna již v dřívější studii z roku 1988. Tato studie demonstrovala vylučování extracelulárních váčků nesoucích mRNA molekuly z nádorových buněk u pacientů s rakovinou tlustého střeva (Rosi a kol., 1988). Dalšími potvrzenými váčky přenášející mRNA jsou exosomy (György a kol., 2011).

První detekce extracelulární nádorové mRNA proběhla ze séra pacienta s maligním melanomem. Jednalo se o lidskou tyrosinasovou mRNA (Kopreski a kol., 1999). Zvýšená

hladina β -kateninové mRNA se vyskytovala u pacientů s kolorektálním karcinomem a adenomem. Koncentrace β -kateninové mRNA se snížila u některých pacientů po odstranění nádoru a u pacientů po odstranění adenomu. Zvýšená koncentrace β -kateninové mRNA odráží zejména fázi kolorektálního karcinomu a nezávisí na věku, ani na pohlaví pacienta. V této studii byla dále sledována koncentrace glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenásové mRNA, která byla u všech testovaných podobná (Wong a kol., 2004) a tudíž nevýznamná pro funkci biomarkeru.

U kolorektálního karcinomu lze využít i další potenciální biomarker telomerasová reverzní transkriptasová „*telomerase reverse transcriptase*“ mediátorová ribonukleová kyselina (hTERT mRNA). Podle koncentrace hTERT mRNA ale nelze určit fázi karcinomu a u zdravých kontrol jsou zaznamenány mírně vyšší hodnoty u žen (Lledó a kol., 2004). Využití hTERT mRNA jako biomarkeru je zajímavé u pacientů s karcinomem jater. Koncentrace hTERT opět nezávisí na fázi nádoru a na ostatních parametrech jako je počet nádorů nebo jeho velikost. Byly porovnávány dva užitečné biomarkery karcinomu jater: alfa-fetoproteinová mRNA a hTERT. Spolehlivějším biomarkerem byla hTERT mRNA (Miura a kol., 2005). Potenciálním biomarkerem rakoviny prsu se stává hTERT společně s lidskou telomerasovou mRNA (Chen a kol., 2000). V poslední řadě by hTERT mRNA mohla sloužit jako biomarker u folikulárního lymfomu (Dasí a kol., 2001). Potenciálním biomarkerem rakoviny nosohltanu je RNA asociovaná s virem Epstein-Baar (Lo a kol., 1999).

Další studie zkoumala přítomnost cytokeratin 19 mRNA společně s mammaglobinovou mRNA v plazmě u pacientů s karcinomem prsu (Silva a kol., 2001). Dále byla zkoumána cytokeratin 19 mRNA společně s karcinoembryonální antigenovou mRNA u pacientů s kolorektálním karcinomem. Byla zde nalezena asociace mezi oběma cirkulujícími mRNA a nádorovými buňkami v plazmě (Silva a kol., 2002). Sledováním koncentrace dvou biomarkerů jako je mRNA asociovaná s heterogenním nukleárním ribonukleoproteinem A1 a B1 a specifická receptorová tyrosin-protein-kinasová mRNA je umožněno zachycení všech pacientů s karcinomem plic (Fleischhacker, 2006).

Další studie zkoumala dva biomarkery, cyklinovou D1 mRNA a thymidylát synthasovou mRNA, u pacientů s rakovinou prsu, za účelem posouzení asociace výskytu těchto markerů v plazmě s prognózou. Dále zkoumala míru získaných informací při zahrnutí obou markerů a při použití pouze jednoho. Analýza byla provedena kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí s reverzní transkripcí (qRT-PCR). Detekce obou biomarkerů nezvyšovala míru získaných informací o stavu pacienta. Přítomnost thymidylát synthasové mRNA v plazmě indikuje špatnou prognózu a značí pokročilé stádium nemoci. Cyklinová D1 mRNA je biomarker přežití (García a kol., 2008). Všechny interpretace výsledků studií se musí

brát s ohledem na počet testovaných jedinců (Buchholtz, 2016). Souhrnný přehled zmiňovaných mRNA biomarkerů zobrazuje Tabulka č. 1.

Tabulka č. 1: Příklady potenciálních mRNA biomarkerů, převzato a upraveno z (Fleischhacker, 2006).

Druh onemocnění:	Biomarker mRNA:	Detekční metoda:	Výchozí materiál:
Melanom	tyrosinásová, c-abl	RT-PCR	sérum/plazma
Folikulární lymfom	hTERT		
Rakovina prsu	cyklinová D1, TS	qRT-PCR	
	mammaglobinová, CK19, hTR, hTERT	RT-PCR	
Kolorektální karcinom	β -kateninová, hTERT	qRT-PCR	
	CEA, CK19	RT-PCR	
Rakovina jater	hTERT, AFP	qRT-PCR	
Rakovina plic	hnRNP-B1, Her2/neu-specifická	RT-PCR	
Rakovina nosohltanu	EBER-1		

1.3.2 lncRNA

Za zajímavé neinvazivní biomarkery jsou považovány lncRNA a jsou podobně jako ostatní nádorové cfRNAs vylučovány do oběhu pacienta s rakovinou. U rakovinového onemocnění dochází ke zvýšení nebo snížení jejich exprese (Siddiqui a kol., 2019).

Nadměrná exprese HOTAIR lncRNA v nádorové tkáni má souvislost s více druhy nádorů (Svoboda a kol., 2014), například s vysoce rizikovým gastrointestinálním stromálním karcinomem (Niinuma a kol., 2012), nádorem prsu s budoucím vznikem metastáz (Gupta a kol., 2010), nádory pankreatu s horší prognózou (Kim a kol., 2013), nádory jater (Geng a kol., 2011) a nádory nosohltanu (Nie a kol., 2013). Exprese HOTAIR lncRNA byla zkoumána v souvislosti s kolorektálním karcinomem. Hodnoty v krvi u pacientů s kolorektálním karcinomem byly vyšší než u zdravých kontrol. Můžeme usuzovat, že zvýšená exprese HOTAIR lncRNA je spojena zejména s horší prognózou u kolorektálního karcinomu (Svoboda a kol., 2014).

V nádorových buňkách u více typů nádorů je zvýšená exprese MALAT1 lncRNA (Hu a kol., 2016), například u kolorektálního karcinomu (Yang a kol., 2015) nebo u rakoviny plic s metastázemi do mozku (Shen a kol., 2015). Studie potenciálu MALAT1 jako biomarkeru sledovaného v krvi byla provedena v roce 2020. Detekce cirkulující MALAT1 v krvi má potenciál pro diagnostiku rakoviny plic. Biomarker MALAT1 má nízkou specifitu, proto je nutno ověřit pozitivní nález rakoviny doplňujícími metodami (Pan a kol., 2020).

Dalším zajímavým potencionálním biomarkerem ze skupiny lncRNA, která je označována jako H19. Při analýze z nádorové tkáně u kolorektálního karcinomu byla vyhodnocena jako biomarker přežití pacientů a zároveň byla nezávislá na stádiu nádoru (Ohtsuka a kol., 2016). Studie role H19 při rakovině žaludku využívala možnosti detekce biomarkeru z plazmy. Zvýšená exprese H19 v plazmě byla spojena s rakovinou žaludku zejména v pozdních stádiích. Ke screeningové detekci rakoviny je vhodné použití kombinace H19 a karcinoembryonální antigenovou mRNA (Hashad a kol., 2016). Další studie o vztahu exprese cirkulující H19 a rakoviny žaludku potvrzovala vhodné použití kombinace více markerů společně s H19. Dále je vyšší exprese H19 spojená s výskytem menších nádorů u pacientů. H19 je asociována s ranými stádii rakoviny žaludku (Yoruker a kol., 2018), což odporuje předchozí studii (Hashad a kol., 2016). Rozdílné výsledky studií poukazují na studium odlišných typů rakoviny žaludku nebo na odlišnou etnickou příslušnost pacienta (Cheng a kol., 2016). Cirkulující H19 je potencionální biomarker více druhů rakovin, například rakoviny prsu v raném stádiu, kde by mohl sloužit ke stanovení prognózy (Zhang a kol., 2016). Dalším příkladem onemocnění, kde H19 zastává roli jako potencionální cirkulující biomarker je mnohočetný myelom. Zvýšené hodnoty exprese H19 se vyskytují v séru pacientů s mnohočetným myelomem oproti zdravým kontrolám. Míra exprese H19 navíc souvisí se stádiem rakoviny (Pan a kol., 2018).

Dalším druhem lncRNA s potenciálem biomarkeru je cirkulární RNA (circRNA). Mají strukturu kruhu a kvůli tomu jsou stabilní a chráněné před exonukleasami (Lu, 2020). Různá exprese circRNA byla zkoumána v tkáni. Například v rakovinné tkáni žaludku byly zjištěny některé circRNA s rozdílnou expresí oproti odpovídající zdravé tkáni. Z onkogenu „*plasmocytoma variant translocation 1*“ (PVT1) existuje odvozená circPVT1, která je potencionálním prognostickým biomarkerem u pacientů s rakovinou žaludku (Chen a kol., 2017a). Pro diagnózu samotného onemocnění rakoviny žaludku byla objevena hsa_circ_0000190. Jak exprese této circRNA v rakovinné tkáni, tak její koncentrace v plazmě byly obě sniženy u probíhajícího rakovinného onemocnění. Je předpoklad, že by mohla sloužit jako biomarker velikosti nádoru (Chen a kol., 2017b). Dalšími příklady jsou hsa_circ_0005075

(Shang a kol., 2016) a hsa_circ_0013958 (Zhu a kol., 2017). Zvýšená exprese hsa_circ_0005075 byla následně nalezena v játrech při srovnání rakovinné a zdravé tkáně (Shang a kol., 2016). U adenokarcinomu plic byla zvýšená exprese hsa_circ_0013958 opět v rakovinné oproti zdravé tkáni (Zhu a kol., 2017).

Novější studie byly zaměřeny na analýzu circRNA v exosomech, vyskytujících se v séru pacientů. U studie biomarkerů kolorektálního karcinomu byly zjištěny zvýšené hodnoty exprese hsa_circ_0101802 v séru pacientů s kolorektálním karcinomem oproti zdravé kontrole a hsa_circ_0101802 byla vyhodnocena jako biomarker vhodný pro detekci kolorektálního karcinomu (Xie a kol., 2020). V další studii, kde circRNA byly zkoumány opět ze sérových exosomů, byla zjištěna zvýšená exprese tří circRNA: hsa_circ_020135, hsa_circ_007293, hsa_circ_031752 a snížená exprese devatenácti circRNA ve vzorcích pacientů s papilárním karcinomem štítné žlázy oproti zdravým kontrolám. Sérové exosomální circRNA představují potenciální biomarkery i pro papilární adenokarcinom štítné žlázy (Yang a kol., 2019).

Expese lncRNA „*small nucleolar ribonucleic acid host gene 11*“ cirkulující v krvi závisí na výskytu kolorektálního karcinomu. lncRNA „*small nucleolar ribonucleic acid host gene 11*“ prokazuje vhodnost k detekci kolorektálního karcinomu již v raném stádiu nádoru (Xu a kol., 2020). Pro nemalobuněčný karcinom plic byla v roce 2020 nalezena potenciální kombinace čtyř cirkulujících lncRNA biomarkerů, jednalo se o lncRNA „*ribonucleic acid component of mitochondrial ribonucleic acid processing endoribonuclease*“, „*nuclear enriched abundant transcript 1*“, „*taurine upregulated 1*“ a MALAT1 (Yuan a kol., 2020). Dalším objevem pro diagnostiku nemalobuněčného karcinomu plic byla kombinace lncRNA s označením RP11-438N5.3 společně s biomarkerem mRNA „*stromal interaction molecule 1*“. Vyšší míra exprese cirkulující lncRNA RP11-438N5.3 souvisela s lepší prognózou nemoci (Chen a kol., 2020).

1.3.3 sncRNA

Potenciální biomarkery můžeme hledat i mezi sncRNA. Jedná se zejména o RNA patřící do skupin: piRNA, YRNA, vaultRNA a miRNA (Szilagyi a kol., 2020). Skupina piRNA patří do sncRNA, které se v různé míře vyskytují v tkáních v závislosti na typu tkáně. Bylo prokázáno, že úroveň jejich exprese pravděpodobně závisí i na výskytu rakoviny (Yu a kol., 2019). Například exprese piR-651 byla detekována zvýšená v rakovinné tkáni oproti normální tkáni u rakoviny žaludku, tlustého střeva, plic i prsu (Cheng a kol., 2011). Expese piRNA, konkrétně piR-823 byla také pozorována u rakoviny ledvin. Míra exprese piR-823 v rakovinné

tkáni byla nižší než ve zdravé tkáni ledviny. Expres piR-823 v séru pacienta byla naopak zvýšená u pacientů s karcinomem ledvin v porovnání se zdravými kontrolami. Z toho bylo usouzeno, že se pravděpodobně jedná o aktivní sekreci piR-823 z buněk nádoru do krevního řečiště. Ke zlepšení detekční účinnosti biomarkeru piR-823 pomohla kombinace s dalším biomarkerem s řady miRNA (Iliev a kol., 2016). U kolorektálního karcinomu byla zjištěna zvýšená exprese piR-1245 v rakovinné tkáni v porovnání se zdravou tkání. Expres piR-1245 v tkáni měla také souvislost se stádiem nádoru a metastázemi (Weng a kol., 2018). Vhodnými biomarkery kolorektálního karcinomu, které je možné detekovat ze séra, jsou piR-020619 a piR-020450. Kombinací těchto dvou biomarkerů a jejich exprese v séru lze detekovat kolorektální karcinom, zároveň jejich množství koreluje s velikostí nádoru. U piR-020619 a piR-020450 nebyly detekovány odlišné koncentrace v sérech u pacientů s rakovinou žaludku, plic a prsu (Wang a kol., 2020), což zvyšuje specifitu dané kombinace biomarkerů.

Dalším druhem krátkých RNA, který má potenciál jako rakovinný biomarker, je YRNA. Zvýšená exprese v hY3 a hY4 byla pozorována v nádorové tkáni ledvin (Nientiedt a kol., 2018). V sérech byly nalezeny odlišné koncentrace YRNA fragmentů odvozených od 3' konce nebo od 5' konce při porovnání v sérech od pacientů s rakovinou prsu a v sérech od zdravých jedinců (Dhahbi a kol., 2014). Koncentrace 5' YRNA fragmentů v séru u pacientů s orálním spinocelulárním karcinomem byla snížena u čtyř druhů 5' YRNA fragmentů, například u RNY4-201, oproti zdravé kontrole. Nebyl prokázán rozdílný výskyt těchto 5' YRNA mezi tkání karcinomu a zdravou tkání (Dhahdi a kol., 2019).

Expres vaultRNA, byla prozkoumána prozatím pouze v tkáni. Nadměrná exprese vaultRNA byla detekována především v rakovinné tkáni, která byla odolná proti chemoterapeutiku mitoxantronu. Při potlačení exprese vaultRNA byla následně potlačena i tato rezistence (Gopinath a kol., 2010).

Komplexní profil sncRNA byl analyzován z lidského séra v roce 2018 (Umu a kol., 2018). Profil obsahoval velké množství různých sncRNA, které se mohou stát předmětem zkoumání o jejich potencionálním využití jako biomarkerů (Szilagyi a kol., 2020, Umu a kol., 2018).

1.3.4 miRNA

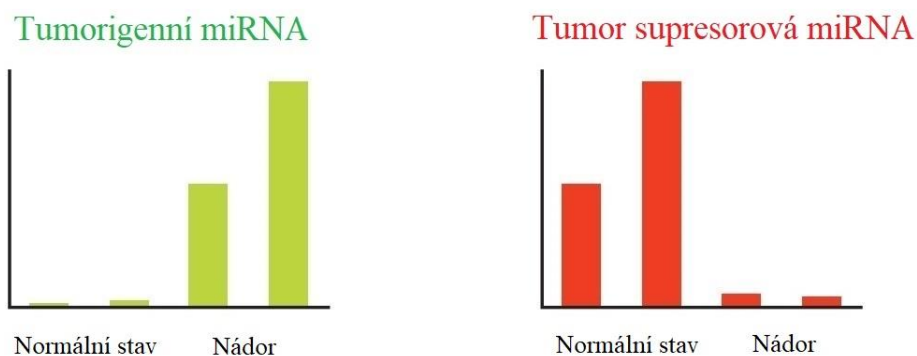
První zpráva o výskytu různých kombinací druhů cirkulujících miRNA v plazmě pochází z roku 2008 (Lawrie a kol., 2008). V této publikaci byla dokázána přítomnost miRNA v biologických tekutinách a začalo se uvažovat o využití miRNA jako užitečného biomarkeru

rakoviny. Tím, co vedlo k myšlence využití miRNA jako biomarkeru, byla zejména její regulační schopnost. Významnou roli v procesech jako je diferenciace, proliferace, přežívání a apoptóza buněk zastává právě miRNA. V důsledku patologického procesu, zejména rakoviny, dochází ke změnám ve výskytu různých druhů miRNA. Ke změnám dochází kvůli odlišné expresi genů mezi normálními a nádorovými buňkami (Di Leva a Groce, 2013). Expresní miRNA profil je specifický pro určitý druh tkáně (Lu a kol., 2005) a lze ho tedy využít i k určení druhu nádoru, budoucí prognózy nebo míry odpovědi na léčbu (Di Leva a Groce, 2013).

Dalším příznivým faktorem nutným pro použití miRNA je její stabilita v krvi. Díky stabilitě oproti ostatním druhům NK, je miRNA velmi atraktivní pro studie, kde je zkoumána jako klinický biomarker (Nair a kol., 2014). Stabilitu miRNA v lidské plazmě potvrzují studie z roku 2008 (Mitchell a kol., 2008, Chen a kol., 2008) i když přesný mechanismus nebyl ještě znám. Potvrdilo se, že je endogenní miRNA odolná proti RNasam. Dále studie porovnávala stanovení miRNA v plazmě oproti stanovení v séru. Měření v séru a v plazmě spolu úzce souvisela a obě byla vhodná pro zkoumání miRNA. Dále bylo zjištěno pomocí studie na myších, že nádorové miRNA jsou vylučovány do oběhu a mohou tedy sloužit k detekci rakoviny (Mitchel a kol., 2008).

Mechanismus stability miRNA v krvi byl dodatečně zkoumán. Existují dva mechanismy miRNA ochrany před účinky RNas. První způsob představuje minoritní zastoupení takto chráněné miRNA v krvi a jedná se o ochranu vytvořením transportního váčku zapouzdřením miRNA (Arroyo a kol., 2011), tzv. extracelulárního váčku (Bayraktar a kol., 2014). Potvrzenými druhy váčků, které obsahují a přenášejí miRNA jsou i exosomy (György a kol., 2011) a mikrovezikuly (Zhao a kol., 2019). Druhým a častějším způsobem je vytváření komplexů s proteiny. Efektorovým proteinem v procesu tlumení genové exprese pomocí miRNA je protein Argonaut-2 (Ago2). Bylo zjištěno, že Ago2 je přítomen v plazmě spolu s miRNA a je společně eluován kapalinovou chromatografií. Výsledným zjištěním bylo, že velká část miRNA je chráněna vytvářením nukleoproteinových komplexů s Ago2 proteinem a minoritní část se vyskytuje v plazmě ve formě transportních váčků (Arroyo a kol., 2011).

Jednotlivé druhy miRNA se dají obecně dělit do dvou skupin na základě jejich odlišného chování v rakovinném onemocnění. Jedná se o rozdílnou expresi v rakovinné tkáni, viz Obrázek č. 7 (Di Leva a Groce, 2013). Některé miRNA zastávají onkogenní roli, jejich exprese je vyšší u rakoviny než u normálního stavu organismu a nazývají se tumorigenní miRNA. Některé miRNA hrají naopak roli v potlačení nádoru. Jejich exprese je v tomto případě naopak při rakovinném onemocnění snížena a nazývají se tumor supresorové miRNA (Shajari a Mollasalehi, 2020).



Obrázek č. 7: Pozměněná exprese dvou skupin miRNA v rakovinné a normální tkáni, převzato a upraveno z (Di Leva a Groce, 2013).

Příkladem miRNA z tumorigenní skupiny je zejména již poměrně dobře charakterizovaná miRNA spojovaná s rakovinou, miR-21 (Shajari a Mollasalehi, 2020, Di Leva a Groce, 2013). Zvýšená exprese miR-21 byla nalezena v postižené tkáni u více druhů rakoviny oproti zdravé tkáni (Selcuklu a kol., 2009), například u rakoviny prostaty, žaludku a pankreatu (Volinia a kol., 2005). Dále byla nalezena zvýšená exprese miR-21 i v sérech u pacientů s několika různými druhy rakoviny v porovnání se séry zdravých pacientů, například u pacientů s rakovinou prsu nebo žaludku (Wang a Zhang, 2012). U nádorových buněk miR-21 funguje jako inhibitor apoptózy (Chen a kol., 2008) a má pozitivní vliv na růst nádoru. Bylo prokázáno, že inhibicí miR-21 pomocí anti-miR-21 dojde k potlačení růstu rakovinných buněk prsu (Si a kol., 2007). Další funkcí miR-21 je cílení na tumor supresorové geny a jejich utlumení, což následně umožňuje invazi nádoru a vznik metastází (Zhu a kol., 2008). Díky těmto poznatkům je tedy miR-21 považována za všeobecný biomarker rakovinného onemocnění s vysokou citlivostí. Má potenciál zejména pro využití u detekce rakoviny prsu, kolorektálního karcinomu, rakoviny plic, žaludku a jícnu (Wang a Zhang, 2012).

V další studii byla zkoumána miR-155, která se v některých případech chovala jako tumorigenní miRNA a někdy jako tumor supresorová miRNA (Shajari a Mollasalehi, 2020). Tumorigenní chování bylo potvrzeno její zvýšenou expresí v rakovinné tkáni prsu (Iorio a kol., 2005). Následně byla zjištěna zvýšená koncentrace miR-155 v plazmě či séru i u rakoviny plic (Sun a kol., 2012). Tato miRNA inhibuje apoptózu u leukemických T-buněk a u buněk rakoviny prsu blokuje aktivitu kaspasy 3 (Ovcharenko a kol., 2007). Dále zvyšuje migraci nádorových buněk (Kong a kol., 2008), a aktivně se účastní růstu metastází (Sun a kol., 2012).

U některých typů rakoviny se miR-155 chovala jako tumor supresorová miRNA (Shajari a Mollasalehi, 2020). Například u rakoviny žaludku byla zjištěna její snížená exprese

v rakovinné tkáni oproti tkáni normální. K ověření tumor supresorové funkce miR-155 byl testován účinek zvýšené exprese této miRNA na liniích nádorových buněk. Syntetické miR-155 byly přeneseny do nádorových buněk žaludku. V rakovinných buňkách žaludku následně došlo k obnovení exprese miR-155. Tyto buňky měly sníženou migraci, potřebnou pro vytváření metastáz (Li a kol., 2012). Dalším typem rakoviny, u níž se miR-155 chovala jako tumor supresorová miRNA, byla rakovina vaječníků. Gen pro Claudin-1 protein (CLDN1) je důležitý pro tumorigenezi jednoho typu rakovinných buněk vaječníku. Přítomná miR-155 tlumila expresi genu CLDN1. Při snížené expresi miR-155 v rakovinných buňkách docházelo ke zvýšené expresi CLDN1 a ke zvýšené tumorigenezi. Po transfekci a obnovení exprese miR-155 v rakovinných buňkách se snížila exprese CLDN1 a tím i tumorigeneze (Qin a kol., 2013).

V plazmě byly zkoumány hladiny markerů miRNA prostaty, které jsou obvykle exprimovány v rakovinných buňkách. Jako marker s největší odezvou, tedy s nejvíce odlišnou expresí oproti zdravé kontrole, byl miR-141 (Mitchell a kol., 2008). V roce 2020 byly objeveny další dva potencionální biomarkery rakoviny prostaty. Jednalo se o miR-10a a miR-29b z extracelulárních váčků přítomných v plazmě (Worst a kol., 2020). U difúzního velkobuněčného lymfomu se jako o biomarkerech uvažovalo o miR-21, miR-210, miR-155. S vyšší expresí miR-21 bylo spojeno přežití bez relapsu (Lawrie a kol., 2008). Z exosomů z plazmy byla izolována miR-146a. Byla určena jako vhodný prognostický i prediktivní biomarker u difúzního velkobuněčného lymfomu (Zare a kol., 2019).

Také v roce 2008 byla provedena analýza miRNA v séru a byly objeveny rozdíly v expresi miRNA u pacientů a zdravých kontrol. U pacientů s rakovinou plic byly v sérech například nalezeny specifické miRNA: miR-25 a miR-223, které vykazovaly zvýšenou expresi. Dále byl v séru zdravých jedinců mužského a ženského pohlaví pozorován výskyt specifických miRNA. Pro mužské sérum byly nalezeny typické miRNA: miR-100, miR-184 a miR-923, které se u ženského séra nevyskytovaly. Zatímco v ženském séru byla přítomna zejména miR-222 (Chen a kol., 2008). Vyšší koncentrace miR-10b, miR-141 a miR-155 byly detekovány v séru u pacientů s rakovinou plic jako indikátory maligního nádoru. Vysoké hodnoty miR-10b v séru pacienta s rakovinou plic signalizovaly metastáze do lymfatických uzlin (Roth a kol., 2010).

V další studii bylo zkoumáno osm miRNA: miR-4481, miR-4436b, miR-3620, let-7b, let-7e, miR-4716, miR-1249, miR-6766. Využití jejich kombinace je vhodné pro předpověď rizika relapsu po operaci nádoru plic (Rossi a kol., 2020). Pro diagnostiku kolorektálního karcinomu ze séra pacientů bylo v roce 2020 sestavena kombinace šesti miRNA biomarkerů: miR-19a, miR-20a, miR-143, miR-145, miR-150, let-7a (Maminezhad a kol., 2020). V roce

2009 byla objevena kombinace biomarkerů pro detekci rakoviny pankreatu. Touto kombinací byly: miR-21, miR-210, miR-155 a miR-196a. Navíc miR-155 představovala potenciál pro detekci rané pankreatické neoplazie a miR-196a měla asociaci s vývojem onemocnění (Wang a kol., 2009). Jako potencionální biomarker pro rozlišení rakoviny pankreatu a chronického zánětu pankreatu je vhodná miR-210 (Guz a kol., 2021).

Ze séra pacientek s karcinomem vaječníků byly detekovány miRNA s odlišnou expresí oproti zdravým kontrolám. Nejvíce se lišily expresí tyto čtyři miRNA: miR-22, miR-93, miR-106b a miR-451 a mohly by sloužit jako neinvazivní biomarkery rakoviny vaječníků (Ji a kol., 2014). V roce 2020 byla zjištěna zvýšená exprese miR-141 v plazmě pacientů s epiteliálním karcinomem vaječníků oproti zdravým kontrolám. Jeho zvýšená exprese souvisela i se stádiem nádoru (Fitriawan a kol., 2020).

Pro detekci rakoviny jater byly objeveny biomarkery: miR-125b a miR-223 (Giray a kol., 2014). K detekci metastází do plic u rakoviny jater je potencionálně vhodná kombinace tří biomarkerů: miR-18a, miR-20b a miR-221 (Huang a kol., 2021). Potencionálními biomarkery vývoje rakoviny žaludku, prognózy a terapeutického účinku léčby jsou miR-17 a miR-20a (Wang a kol., 2012a). Pro včasnou diagnostiku rakoviny žaludku by mohl sloužit miR-1246 (Shi a kol., 2020). Dalšími příklady potencionálních biomarkerů je kombinace miR-21, miR-15b, miR-23a a miR-146b. Jejich využití spočívá v potencionálním odhalení dětských pacientů s rakovinou mozku, konkrétně s juvenilním pilocytickým astrocytome (Bookland a kol., 2018).

Rakovina prsu je jednou z nejčastějších rakovin u žen, na kterou ženy umírají po celém světě. Počáteční studie se zabývaly zejména expresí miRNA přímo v rakovinné tkáni. Výrazná změna exprese byla zjištěna u některých miRNA. Jednalo se konkrétně o pět biomarkerů: miR-10b, miR-125b, miR-145, miR-21 a miR-155. Dva z nich, miR-21 a miR-155, měli zvýšenou expresi. Ostatní tři, miR-10b, miR-125b a miR-145, měli sníženou expresi v rakovinných buňkách (Iorio a kol., 2005). Další studie se zabývala také rakovinou prsu a byly zde poprvé prokázány specifické změny již v cirkulujících miRNA. Zkoumaly se tři druhy miRNA: miR-16, miR-145 a miR-155 a porovnávaly se jejich koncentrace v séru u zdravých a nemocných pacientek s rakovinou prsu. Bohužel se jejich koncentrace významně nelišila, a tudíž byly pro diagnostiku onemocnění nevýznamné. Vyšší hladiny miR-155 svědčily pouze o přítomnosti nádoru pozitivního na progesteronový receptor (Zhu a kol., 2009).

V roce 2012 byla opět testována exprese miR-155 ze séra pacientek s rakovinou prsu a zdravých pacientek. Relativní výskyt miR-155 byl zvýšen v sérech pacientek s rakovinou, avšak nebyla prokázána souvislost mezi koncentrací miR-155 a stádiem nemoci nebo velikostí

nádoru. Dále byly sledovány hladiny miR-155 po léčbě, které se výrazně snížily a dosahovaly úroveň zdravých kontrol. K určení nemoci a odpovědi na léčbu lze použít miR-155 (Sun a kol., 2012). Potenciál biomarkerů miR-145 a miR-155 byl potvrzen i dalšími studiemi, která zároveň rozšiřovala potenciální biomarkery o miR-382, miR-10b, miR-21, miR-125b a miR-191. Kombinace sledování exprese tří biomarkerů miR-145, miR-155 a miR-382 v séru má silný diagnostický potenciál pro detekci rakoviny prsu. Detekce rané fáze rakoviny pomocí všech sedmi miRNA: miR-21, miR-10b, miR-125b, miR-145, miR-155, miR-191 a miR-382 bohužel není možná. Jejich koncentrace se příliš nelišily v porovnání sér pacientek v rané fázi rakoviny se séry od zdravých kontrol (Mar-Aguilar a kol., 2013).

Porovnáním exprese miRNA v plné krvi u pacientek s raným stádiem nádoru a zdravých kontrol metodou detekce na mikročipech bylo zjištěno, že celkem 59 miRNA má odlišnou expresi. Mezi miRNA s nejvíce zvýšenou expresí patřily miR-4306, miR-202 a miR-4257. Mezi miRNA s nejvíce sníženou expresí patřily miR-718, miR-625 a miR-1471 (Schrauder a kol., 2012). Do skupiny let-7 miRNA patří i miR-202. Dále jsou ve skupině let-7 miRNA podílející se na tumorigenezi a obnově rakovinných buněk prsu (Yu a kol., 2007).

Kostní metastázy jsou poměrně časté u pacientek s pokročilým stádiem karcinomu prsu (Coleman, 2001). Jako biomarker rakoviny prsu s metastázami do kostí je vhodný miR-10b. (Zhao a kol., 2012). Potencionálním biomarkerem rakoviny prsu s metastázami do lymfatických uzlin je miR-10b spolu s miR-373 (Chen a kol., 2013). Obecnými biomarkery metastáz jsou miR-299-5p, miR-411 a miR-215, u kterých byly detekovány největší rozdíly v expresi mezi vzorky séra zdravých pacientů a u pacientek s metastazující rakovinou prsu (van Schooneveld a kol., 2012). Pro detekci rakoviny prsu je významným biomarkerem i miR-21. Slouží potenciálně jak k detekci rakoviny, tak miR-21 vysoké sérové koncentrace mají vztah se vznikem viscerálních metastáz (Asaga a kol., 2011). V další studii byl porovnáván miR-21 s dalším biomarkerem miR-92a. Kombinací těchto dvou biomarkerů a sledováním jejich sérových hladin v porovnání s klinicko-patologickými daty byla zjištěna asociace s velikostí nádoru a s přítomností metastáz do lymfatických uzlin u rakoviny prsu (Si a kol., 2013). Dalším potenciálním biomarkerem rakoviny prsu s metastázami do blízkých lymfatických uzlin je miR-214. Indikuje zároveň i malignitu nádoru (Schwarzenbach a kol., 2012).

V rakovinných buňkách prsu zvýšená exprese mi-125b souvisela s vyšší proliferací tkáně a s menší mírou apoptózy. Na rakovinné tkáni *in vivo* byl sledován účinek chemoterapie, který závisel na přítomnosti miR-125b. Vyšší koncentrace miR-125b znamenala vyšší rezistenci na léčbu chemoterapií. Biomarkerem rezistence na chemoterapii je tedy cirkulující miR-125b (Wang a kol., 2012b). Pacientky s nádorem prsu pozitivním na lidský epidermální

růstový receptor jsou léčeny pomocí Trastuzumabu. Některé jsou však k léčbě rezistentní. U rezistentních pacientek byla nalezena odlišná exprese cirkulujících miRNA. Koncentrace miR-210 v krevním oběhu souvisela s citlivostí na léčbu Trastuzumabem a s přítomností nádoru a s metastázemi (Jung a kol., 2011). S nepříznivou prognózou rakoviny prsu můžeme také spojit miR-210 (Ivan a kol., 2008). Další studie byla zaměřená na detekci raného stádia rakoviny prsu pomocí kombinace několika miRNA biomarkerů detekovaných v plazmě pacienta pomocí metody qRT-PCR. Jednalo se o kombinaci miR-1246, miR-1307, miR-4634, miR-6861 a miR-6875 (Shimomura a kol., 2016). V Tabulce č. 2 jsou uvedeny zmíněné příklady biomarkerů. Jedná se o neustále se rozvíjející komplexní problematiku, které se věnuje mnoho publikací.

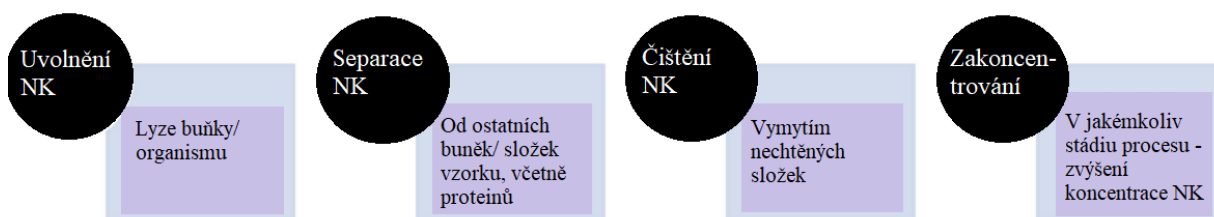
Tabulka č. 2: Příklady potencionálních miRNA biomarkerů pro odhalení onemocnění rakovinou. Uvedené symboly ↑↓ u jednotlivých miRNA označují zvýšenou nebo sníženou expresi v daném biologickém materiálu. Pokud symbol není uveden jedná se o prognostický nebo prediktivní biomarker.

Druh onemocnění:	Biomarkery miRNA:	Výchozí materiál:
Rakovina prostaty	miR-141 ↑, miR-10a ↑, miR-29b ↑	plazma
	miR-21 ↑	buňky
Difúzní velkobuněčný lymfom	miR-21 ↑, miR-210 ↑, miR-155 ↑	sérum
	miR-146a	plazma
Rakovina plic	miR-25 ↑, miR-223 ↑, miR-10b ↑, miR-141 ↑, miR-155 ↑, miR-21 ↑	sérum
	miR-155 ↑, miR-4481, miR-4436b, miR-3620, miR-4716, miR-6766, let-7b, let-7e	plazma
Kolorektální karcinom	miR-19a ↑, miR-20a ↑, miR-150 ↑, let-7a ↑, miR-143 ↓, miR-145 ↓	sérum
Rakovina pankreatu	miR-210 ↑	sérum
	miR-21 ↑, miR-210 ↑, miR-155 ↑, miR-196a ↑	plazma

Druh onemocnění:	Biomarkery miRNA:	Výchozí materiál:
Rakovina vaječnicků	miR-22 ↑, miR-93 ↑, miR-106b, miR-451	sérum
Rakovina vaječnicků	miR-141 ↑	plazma
	miR-155 ↓	buňky
Rakovina jater	miR-125b ↑, miR-223 ↓, miR-18a, miR-20b, miR-221	plazma
Rakovina žaludku	miR-21 ↑, miR-1246 ↑	sérum
	miR-17 ↑, miR-20a ↑	plazma
	miR-21 ↑, miR-155 ↓	buňky
Rakovina mozku	miR-21 ↑, miR-15b ↑, miR-23a ↑, miR-146b ↑	sérum
Rakovina jícnu	miR-21 ↑	sérum
Rakovina prsu	miR-21 ↑, miR-155 ↑, miR-145 ↑, miR-382 ↑, miR-10b ↑, miR-125b ↑, miR-191 ↑, miR-1246 ↑, miR-1307 ↑, miR-6861 ↑, miR-4634 ↓, miR-6875 ↓, miR-141, miR-214, miR-125b	sérum
	miR-10b, miR-373, miR-210	plazma
	miR-4306 ↑, miR-202 ↑, miR-4257 ↑, miR-718 ↓, miR-625 ↓, miR-1471 ↓	plná krev
	miR-155 ↑, miR-21 ↑, miR-299 ↑, miR-411 ↑, miR-215 ↑, miR-10b ↓, miR-125b ↓, miR-145 ↓, miR-92a ↓	buňky

1.4 Metody izolace RNA

Příprava vzorku NK pro molekulární detekci spočívá v několika postupných krocích. Prvním krokem je uvolnění RNA/DNA z případné biologické matrice, zejména z buňky procesem buněčné lyze. Druhý krok představuje izolaci neboli separaci RNA/DNA od okolního buněčného i nebuněčného materiálu, například od proteinů. V třetím kroku dochází k purifikaci vzorku neboli čištění od nežádoucích látek, které se do vzorku dostaly v předchozím kroku. Nežádoucími látkami, které musí být před detekcí odstraněny nebo inaktivovány jsou chaotropní soli, alkoholy, proteasy, ostatní soli (Thatcher, 2015), lipidy nebo karbohydráty. V neposlední řadě očištěná RNA nesmí obsahovat DNA, a naopak očištěná DNA nesmí obsahovat RNA (Buckingham, 2019). Posledním krokem je zakoncentrování, které napomáhá při stanovení analytu s nízkou koncentrací ve vzorku a lze ho provést i mezi ostatními kroky viz Obrázek č. 8. Ne všechny kroky jsou vždy zapotřebí (Thatcher, 2015).



Obrázek č. 8: Obecný postup při přípravě vzorku NK pro molekulární detekci, převzato a upraveno z (Thatcher, 2015).

Při odběru vzorku krve a následné analýze RNA z plazmy je vhodný přídavek antikoagulačních činidel. Vhodným antikoagulačním činidlem, co se týče následné kvality izolované RNA, je citrát sodný (Holland a kol., 2003). Přítomnost citrátu sodného ale není žádoucí pro následnou analýzu metodou PCR, stejně je tomu tak i u heparinu (Boeckel a kol., 2013, Zampetaki a Mayr, 2012). Nejvhodnějším antikoagulačním činidlem je ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Zampetaki a Mayr, 2012).

Při práci v laboratoři je RNA v porovnání s DNA mnohem méně stabilní (Lehman, 2010). Nejen v laboratoři dochází k degradaci RNA pomocí všudypřítomných RNAs. Zabránit tomuto ději lze pomocí dvou hlavních zásad. První je manipulace se vzorkem v prostředí bez RNAs. Druhou zásadou je použití komerčně dostupných inhibitorů RNAs (Holland a kol., 2003). Zajištění prostředí bez RNAs představuje vyčlenění speciálního prostoru v laboratoři určeného k práci s RNA, práce v rukavicích a používání vyčleněného laboratorního vybavení pro práci

s RNA. Mezi inhibitory RNAs patří například diethylpyrokarbonát (DEPC). Používá se k trvalému odstranění účinku RNAs potlačením jejich rozpustnosti. Přidává se zejména do vody a do používaných pufrů (Buckingham, 2019). Je dobré též zachovat sterilitu vzorku, pokud chceme předejít kontaminaci a izolovat pouze RNA (Holland a kol., 2003).

Dalším faktorem ovlivňujícím stabilitu RNA je teplota skladování vzorku (Holland a kol., 2003). V plazmě jsou miRNA stabilní po dobu 24 h při pokojové teplotě (Glinge a kol., 2017, Mitchel a kol., 2008). Pro dlouhodobé skladování je vhodná teplota $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Grasedieck a kol., 2012) až $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Glinge a kol., 2017). Při použití teploty $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ je celkové množství miRNA ve vzorcích stabilní i při dlouhodobém skladování (2-4 roky), dochází pouze k malým změnám v množství u několika jednotlivých druhů miRNA (Grasedieck a kol., 2012). Následně izolovanou miRNA je vhodné skladovat při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sourvinou a kol., 2013).

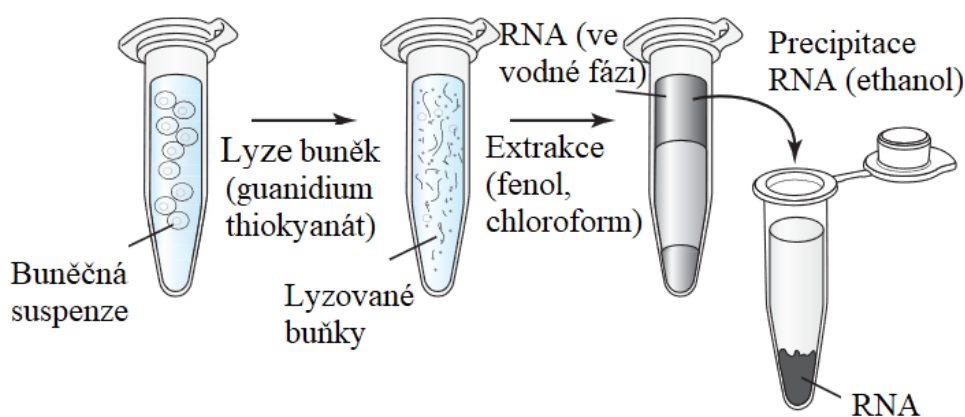
Izolace a purifikace RNA molekul jsou zásadními kroky pro úspěšné získání čisté a stabilní RNA pro další analýzy. Metody izolace se dělí na dva hlavní typy. Prvním typem je chemická izolace RNA. Jedná se o extrakci za použití organických rozpouštědel a denaturačních činidel. Druhý typ představuje extrakci na pevné fázi. Jedná se o zachycení RNA na pevném nosiči (Martins a kol., 2014).

1.4.1 Fenol-chloroformová extrakce

Fenol-chloroformová extrakce je široce používaná metoda pro izolaci obou typů nukleových kyselin (Tan a Yiap, 2009). Jedná se o extrakci ve fázích kapalina-kapalina, představující dvě nemísitelná rozpouštědla (Emaus a kol., 2020). Postupně dochází k zakoncentrování extrahované látky v jedné ze dvou fází (Sarafraz-Yazdi a Amiri, 2010). Hlavním rozdílem mezi fenol-chloroformovou extrakcí DNA a extrakcí RNA je odlišné pracovní pH. U extrakce RNA se musí pohybovat v kyselé oblasti (Tan a Yiap, 2009, Chomczynski a Sacchi, 2006).

Obecný princip extrakce (Obrázek č. 9) zahrnuje lyzi vzorku za použití detergentu guanidium thiokyanátu (GuSCN). V této fázi se někdy přidává i 2-merkptoethanol jako redukční činidlo. Následuje organická extrakce přidáním směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1). Přídavek fenolu s nízkým pH 4-5 zajistí separaci DNA od RNA. Isoamylalkohol zabrání pění a chloroform tvoří organickou fázi. Jednu fázi představuje vodný buněčný lyzát a druhou nemísitelnou fázi představuje organické rozpouštědlo chloroform (Buckingham a kol., 2019). Roztoky jsou důkladně promíchány a následuje centrifugace. Centrifugací dojde k opětovnému rozdělení obou roztoků na horní a

dolní fázi. Mezi horní a dolní fází se může objevit mezifáze ve formě bílého prstence vysrážených proteinů (Vomelová a kol., 2009). Horní fáze je vodná a obsahuje RNA, zatímco mezifáze a dolní organická fáze obsahuje většinu DNA a proteiny (Chomczynski a Sacchi, 2006). Horní fáze obsahující RNA je následně přemístěna do sterilní zkumavky. K horní fázi je přidán isopropanol (Vomelová a kol., 2009, Buckingham a kol., 2019) nebo ethanol a dochází k vysrážení RNA. Přidáním glykogenu se zlepší formování pelety (Buckingham a kol., 2019). Zkumavka je centrifugována a výsledným produktem je peleta obsahující celkovou RNA. Peleta obsahuje soli, které se vysrážely spolu s RNA, které jsou následně odstraněny omytím pelety 75-90% ethanolem. Peleta je rozpuštěna ve vodě ošetřené DEPC nebo v daném pufru (Vomelová a kol., 2009, Buckingham a kol., 2019). Nakonec je přidána DNasa k odstranění DNA kontaminace, která může být přidána již během kroku buněčné lyze (Buckingham a kol., 2019).



Obrázek č. 9: Obecný princip fenol-chloroformové extrakce, převzato a upraveno z (Buckingham a kol., 2019).

Izolace RNA fenol-chloroformovou extrakcí se postupem času vyvíjela různými směry, které měly za cíl usnadnit a urychlit celý proces. Významným pokrokem je metoda izolace RNA pomocí jedнокrokové kyselého guanidinium thiokyanát-fenol-chloroformové extrakce (Chomczynski a Sacchi, 1987). Vznikla v návaznosti na dříve velmi používanou, účinnou, ale zdlouhavou metodu podle Chirgwin (Chirgwin a kol., 1977). U jedнокrokové extrakce je použit předpřipravený denaturační roztok D, který obsahuje GuSCN, citrát sodný, sarkosyl a 2-merkapt ethanol. Po homogenizaci tkáně je přidán acetát sodný pH 4, vodný roztok fenolu a směsný roztok chloroformu s isoamylalkoholem (24:1). Po přidání každého reakčního činidla k homogenátu je směs vždy promíchána. Na konci je celá směs centrifugována a je odebrána

horní vodná fáze s RNA do nové zkumavky. Následuje vysrážení RNA isopropanolem. Tímto procesem lze dosáhnout vysoké čistoty i výtěžku při době trvání procesu pod 4 h. Touto metodou je eliminována potřeba ultracentrifugace, které bylo zapotřebí u dřívější používané metody (Chozymski a Sacchi, 1987).

Metoda jedнокrokové kyselého guanidinium thiokyanát-fenol-chloroformové extrakce byla modifikována v roce 1993. Ke stávající metodě byl přidán doplňující krok po přidání roztoku s GuSCN a homogenizaci tkáně. Krok představoval selektivní srážení RNA ethanolem. Touto modifikací se výrazně snížila kontaminace výsledného produktu molekulami DNA, která nebyla žádoucí při následné analýze pomocí PCR (Siebert a Chenchik, 1993). Při následující optimalizaci byly přidávány další doplňující kroky k odstranění kontaminace přebytkem fenolu, chloroformu nebo solemi. Přidané kroky představovaly dvojité promývání precipitátu RNA 75% roztokem ethanolu a jeden extrakční krok navíc. (Toni a kol., 2018).

Pro fenol-chloroformovou extrakci také existují již připravená reakční činidla na bázi fenolu. Jedná se o TRIzolTM Reagent od firmy Thermo Fisher Scientific a QIAzol lysis Reagent od firmy Qiagen. Používání těchto činidel je ekonomičtější, ale dochází k výskytu kontaminantů v získané RNA (Toni a kol., 2018). Při izolaci RNA za použití činidla TRIzol nebo QIAzol se postup liší od klasické fenol-chloroformové extrakce. Po správném použití daného činidla podle typu vzorku stačí již přidat ke směsi pouze chloroform (bez RNAs) a je umožněn průběh extrakce (Toni a kol., 2018, Green a Sambrook, 2020).

Postup při využití modifikované fenol-chloroformové extrakce miRNA spočívá v použití TRIzol činidla (Moldovan a kol., 2014). Po proběhnutí extrakce je RNA vysrážena isopropanolem. Ke zvýšení podílu malých RNA v celkové izolované RNA probíhalo srážení přes noc (Hunter a kol., 2008) při -20 až -80 °C, následované centrifugací 1 h při 4 °C (Moldovan a kol., 2014). Bohužel bylo později zjištěno, že dochází ke ztrátám specifických miRNA s nízkým obsahem bází GC, popřípadě i jiných druhů sncRNA při použití TRIzolu (Kim a kol., 2012). Tyto faktory by mohly ovlivnit i izolaci miRNA ze séra či plazmy a je nutné je brát v úvahu (Moldovan a kol., 2014).

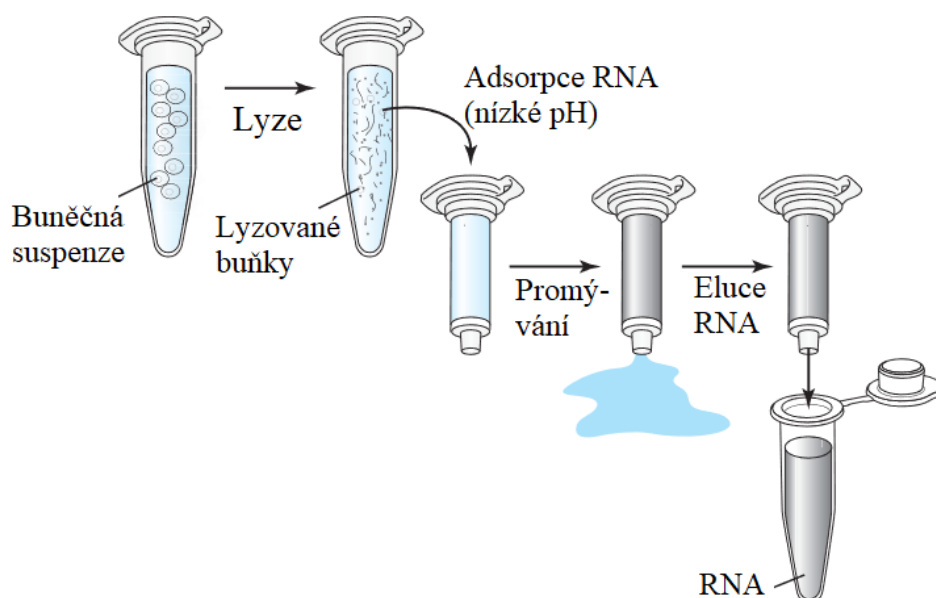
Při izolaci miRNA za použití různých metod dochází k různé účinnosti izolace miRNA odlišného původu a k proměnlivým výsledkům analýzy. Fenol-chloroformová extrakce je převážně koncipována pro extrakci RNA z tkáně či z buněk. Izolace RNA nebo miRNA fenol-chloroformovou extrakcí z tělních tekutin je obtížná z důvodu velkého objemu vodné fáze (Moldovan a kol., 2014). Pro izolaci miRNA se využívá principu metody fenol-chloroformové extrakce s různými modifikacemi, resp. optimalizacemi (Lekchnov a kol., 2016), zejména pak

kombinace metod fenol-chloroformové extrakce a extrakce za pomoci kolonek (Eldh a kol., 2012).

1.4.2 Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi probíhá ve dvou fázích kapalina-pevná fáze. Izolovaná složka je separována z roztoku na základě různých vlastností pevné i kapalné fáze. Extrakce na pevné fázi je slibnou možností, jak izolovat RNA. Značnou výhodou těchto metod je omezené použití organických rozpouštědel (Emaus a kol., 2020). Další výhodou je odstranění problému nedokonalé separace fází jako je tomu u extrakce kapalina-kapalina a urychlení celého procesu. Tyto metody se skládají obecně z několika hlavních kroků. Jedná se o lyzi materiálu, následovanou adsorpcí RNA na povrch pevné fáze, promýváním a poslední fází je eluce RNA (Tan a Yaip, 2009), jak je zobrazeno na Obrázku č. 10.

Adsorpce NK na povrch pevné fáze je zajištěna vytvořením specifické vazby k povrchu. K vytvoření vazby je zapotřebí přítomnost chaotropních solí (Vomelová a kol., 2009) a pufrů k zajištění vhodného pH prostředí. Adsorpce funguje na základě tvorby vodíkových můstků, afinitě dané NK k povrchům nebo na iontové výměně. Eluce je zajištěna nejčastěji použitím pufru o složení Tris-EDTA či vody (Tan a Yiap, 2009).



Obrázek č. 10: Postup extrakce na pevné fázi, převzato a upraveno z (Buckingham a kol., 2019).

Pro izolaci RNA pomocí extrakce na pevné fázi se k lyzi využívá analogického principu jako u fenol-chloroformové extrakce (Buckingham a kol., 2019). Často se využívá kombinace fenolu a GuSCN. K samotné extrakci se jako základní pevné fáze využívají matrice ve formě předpřipravených naplněných kolonek nebo magnetických částic (Martins a kol., 2014). Další formou uspořádání je extrakce v roztoku, kdy se pevná fáze neboli částice od roztoku oddělují sedimentací. Mezi druhy pevných fází určených pro extrakci RNA patří například materiál na bázi polystyrenlatexu, celulózové matrice nebo skelná vlákna (Vomelová a kol., 2009).

Mezi nejreprezentativnější materiál, který slouží k vazbě NK, patří oxid křemičitý (SiO_2), který je většinou ve formě naplněných kolonek, membrán (Jimenez a kol., 2018, Martins a kol., 2014) nebo částic. Silikonové částice jsou zejména používány pro izolaci DNA (Boom a kol., 1990), ale tato metoda izolace NK za pomoci silikonových částic je později aplikována i na RNA (Chungue a kol., 1993). Bylo prokázáno, že NK jsou schopné se vázat za přítomnosti GuSCN na pevnou fázi představující silikonové částice (Boom, 1990). Role GuSCN spočívala v lyzi buněk a denaturaci RNAs, které by jinak snižovaly stabilitu RNA (Jimenez a kol., 2018). Do rutinní praxe tento přístup nebyl prozatím zaveden.

Dalším materiálem vhodným pro extrakci NK na pevné fázi je oxid titaničitý (TiO_2) (Jimenez a kol., 2018). K extrakci fosforylovaných peptidů a proteinů byl použit TiO_2 z důvodu své afinity k fosfátovým skupinám (Thingholm a Larsen, 2016). Následně byla potvrzena i jeho afinita k NK. Tuto afinitu lze následně využít u extrakce RNA, protože TiO_2 má silnou afinitu k fosfátové kostře NK (Jimenez a kol., 2018).

Některé společnosti vyvinuly nové soupravy na základě využití silikonových membrán, na které se lépe vázala RNA oproti DNA. Příkladem souprav jsou RNeasy[®] od firmy Quiagen, PureLINK[™] RNA od firmy Invitrogen, Nucleospin[®] RNA od firmy MACHEREY-NAGEL. Jedná se o kombinaci technologií využívající selektivní vazby RNA na silikonovou membránu a rychlosti díky formátu centrifugačních mikrokolonek. Průběh izolace se skládá klasicky z lyze a homogenizace výchozího materiálu pomocí pufu obsahujícího GuSCN. Rozdíl je v tom, že po tomto kroku se přidává ke vzorku ethanol. Ten slouží ke zlepšení vazby RNA na membránu. Nečistoty jsou odstraněny omýváním membrány promývacím pufrem. Eluce RNA probíhá promytím membrány vodou bez RNAs za podmínek nízké iontové síly. Pokud je zapotřebí vysoce čisté RNA je nutné za tento postup zařadit použití DNAs nebo použít dodatečný postup přečištění pomocí kolonky pro extrakci na pevné fázi s vyšší selektivitou na RNA (Martins a kol., 2014) nebo na určitý druh RNA jako je například mRNA nebo miRNA (Chatterjee a kol., 2010). Takto se například v jedné studii izolovala nejdříve celková RNA pomocí RNeasy[®] midi

kit od firmy Quiagen a následně byla izolována pouze mRNA za pomoci soupravy Oligotex mRNA kit také od firmy Quiagen (Dudas a kol., 2005).

Pro technologii centrifugačních mikrokolonek jsou vyvíjeny nové pevné materiály v nano a mikro měřítku, například vlákna. Tyto materiály mají vysoký poměr povrchu k objemu a urychlují průběh reakce lepším přenosem hmoty či tepla. Vlákna mohou být i derivatizovaná (Du a kol., 2019)

Značnou výhodou použití souprav založených na využití silikonových membrán je v možnosti automatizace procesu izolace. Automatizace spočívá ve využití soupravy RNasy 96 BioRobot 8000 kit a přístroje s názvem BioRobot Gene Expression od firmy Qiagen. Přístroj je schopný automaticky izolovat RNA až ze 192 vzorků najednou v čase 75 až 90 minut. Delší čas 90 minut je zapotřebí pro volitelné konečné čištění DNasou (Ullmann a kol., 2004).

Pro izolaci miRNA pomocí metod extrakce na pevné fázi založených na adsorpci na silikonových materiálech jsou dostupné široce používané komerční soupravy s názvem miRVanaTM PARISTM a miRNeasy[®] mini kits. Metoda miRVanaTM PARISTM kit využívá k lyzi vzorku detergent. Lyze je následována fenol-chloroformovou extrakcí. Následně je miRNA izolována filtrací přes membránu ze skelných vláken. Filtrace je prováděna dvousložkovým roztokem se zvyšující se koncentrací ethanolu. U tohoto způsobu získáme frakci bohatou na RNA s délkou pod 200 nukleotidů. Tato metoda je vhodnější při izolaci miRNA z tkáně (Moldovan a kol., 2014), ale byla již využita i u izolace miRNA z tělních tekutin (D'Alessandra a kol., 2010).

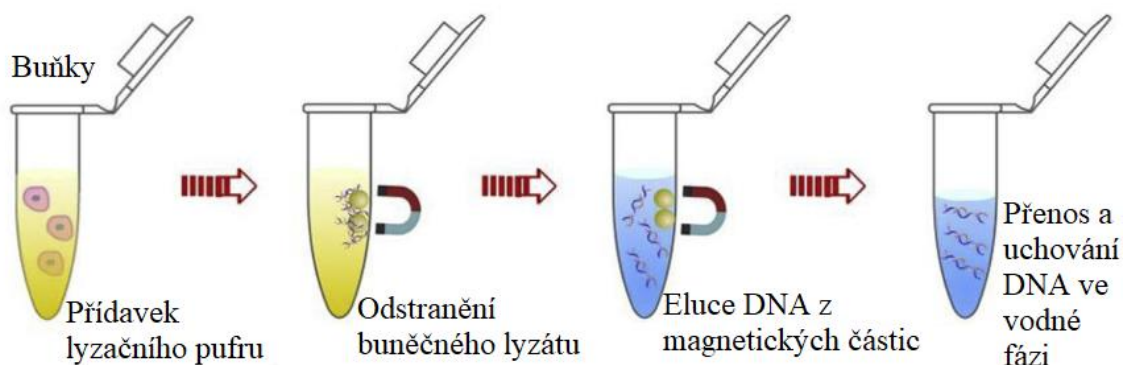
Souprava miRNeasy[®] mini kit využívá k izolaci miRNA kolonku naplněnou silikagelem. V porovnání se soupravou miRVanaTM PARISTM kit má metoda miRNeasy[®] mini kit vyšší výtěžky u izolace miRNA z tkáně ((Moldovan a kol., 2014). U izolace z tělních tekutin lze metodu také aplikovat (Weber a kol., 2010).

Další soupravou pro izolaci miRNA je miRNA Extraction kit. Touto metodou se extrahuje celková RNA i miRNA (Baggish a kol., 2011). Přechištění RNA od DNA probíhá pomocí DNasy na kolonce s názvem NucleoPurTM spin (Moldovan a kol., 2014). Soupravu Master PureTM Purification Kit lze použít k izolaci celkové RNA společně s miRNA (Widera a kol., 2011). Obě tyto soupravy se osvědčily pro izolaci RNA za účelem studování několika druhů miRNA (Moldovan a kol., 2014). Souprava Exiqon miRCURYTM RNA isolation kit využívá k adsorpci materiály na bázi pryskyřice. Tato souprava poskytuje potencionálně nejvyšší výtěžky miRNA (Eldh a kol., 2012). Další zajímavou soupravou je miR Premier[®] microRNA Isolation Kit od firmy Sigma-Aldrich[®], která dokáže účinně izolovat a purifikovat

miRNA. Využívá se zde extrakce RNA pomocí adsorpce na kolonci se silikagelem (Moldovan a kol., 2014).

Předchozí metody extrakce využívaly k izolaci pevné fáze od kapalné centrifugaci či vakuem. U následující metody stačí k oddělení pouze externí magnet (Emaus a kol., 2020). Byly vyvinuty povrchově modifikované magnetické částice. Magnetické znamená, že po aplikaci magnetického pole permanentního magnetu získá částice magnetický moment a může být odstraněna z roztoku. Částice s výběrem vhodného pufru představují rychlý a účinný způsob extrakce RNA (i DNA) na pevné fázi. Další výhodou mimo rychlosti celého procesu je možnost izolace RNA z větších objemů vzorku, možnost automatizace metody a snížení rizika degradace NK, která může nastat v průběhu procesu centrifugace (Berensmeier, 2006).

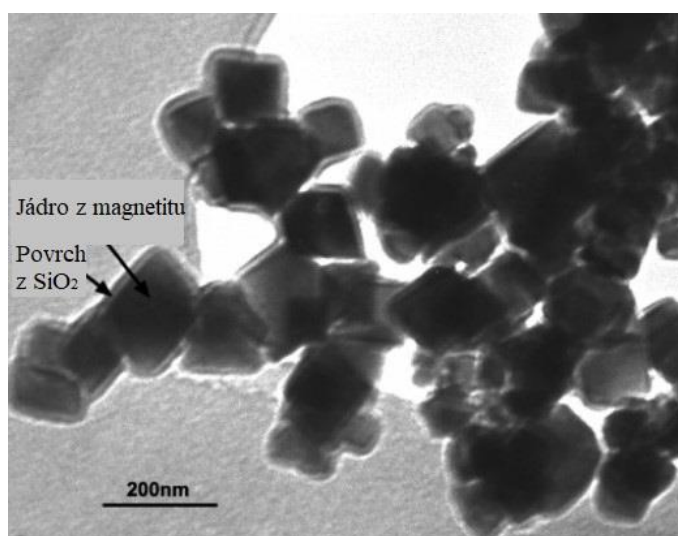
Obecný princip separace NK na magnetických částicích (Obrázek č. 11) začíná prvním krokem představujícím lyzi vzorku, následuje vazba NK na magnetické částice a odstranění ostatních buněčných složek. Po tomto kroku následuje promývání ethanolem, a eluce NK puftrem s nízkou iontovou silou (Liu a kol., 2019).



Obrázek č. 11: Princip izolace NK za pomoci magnetických částic, převzato a upraveno z (Liu a kol., 2019).

Magnetické částice můžeme rozdělit do dvou skupin podle velikosti, a to na mikročástice a na nanočástice (Liu a kol., 2019). Nejčastěji používané nanočástice mají velikost 1-100 nm (Wierucka a Biziuk, 2014) a nejčastěji používané mikročástice mají velikost 1-50 μm (Liu a kol., 2019). Magnetické částice se skládají z hlavní složky představující magnetický anorganický materiál. Tímto materiálem jsou oxidy železa, například oxid železnato-železitý neboli magnetit, γ -oxid železitý nebo ferrity. Tyto částice jsou následně povrchově modifikovány. Povrchové modifikace představují zejména silanizaci (Berensmeier, 2006). Povrch magnetické částice se pokryje vrstvou oxidu křemičitého (Sen a kol., 2006) viz Obrázek č. 12. Další způsob silanizace představuje například modifikace alkoxyxilany, kdy

kromě modifikace oxidem křemičitým dojde k navázání aminových skupin (Bruce a Sen, 2005). Další povrchovou modifikací je například modifikace polyethyleniminy (Chiang a kol., 2005), uhlíkovými nanotrubičkami (Razmi a Jabbari, 2015), oxidy grafenu (Taghvini a kol., 2016), „*metal-organic frameworks*“ neboli organokovovými kostrami (Zhang a kol., 2018) a molekulárně vtištěnými polymery (Xu a kol., 2012). Modifikace protilátkami slouží zejména k separaci celých buněk. Příkladem je modifikace monoklonální protilátkou proti proteinu vyskytujícímu se na povrchu spermie. Jedná se o modifikaci proteinem „*motile sperm domain containing 3*“, která slouží k separaci spermií od buňkách epitelálních buněk (Li a kol., 2014).



Obrázek č. 12: Magnetické částice modifikované oxidem křemičitým (TEM mikroskopie), převzato a upraveno z (Bruce a Sen, 2005).

Komerčně dostupné povrchově modifikované magnetické částice pro izolaci RNA, ale popřípadě i DNA se nacházejí v Tabulce č. 3 (Berenmeier a kol., 2006). Pro automatizaci izolace RNA za použití principu izolace na magnetických částicích slouží přístroj BioRobot 9604 od firmy Qiagen (Mitsunaga a kol., 2002).

Tabulka č. 3: Komerčně dostupné magnetické částice s povrchovou modifikací pro izolaci RNA i DNA, převzato z (Berensmeier, 2006).

Produkt:	Firma:	Průměr částic [μm]:	Druh modifikace:	Druh izolované NK:
AGOWA [®] mag	AGOWA, Berlín, Německo	5-10	-	DNA, RNA

Produkt:	Firma:	Průměr částic [μm]:	Druh modifikace:	Druh izolované NK:
MagaZorb [®]	Cortex Biochem San Leandro, CA, USA	1-10	celulóza	DNA, RNA
MagneSil	Promega, Madison, WI, USA	5-8,5	silanizace	DNA, RNA
MagSi	MagmaMedics, Aachen, Německo	1; 2; 5	-	DNA, RNA
MGP	Roche Diagnostic	-	sklo	DNA, RNA
M-PVA	Chemagen Biopolymer Technology,	0,5-1; 1-3; 5-8	polyvinyl alkohol	DNA, RNA
SiMAG	Chemicell, Berlín, Německo	0,5; 0,75; 1	silanizace	DNA, RNA

Pouze pro extrakci RNA byly magnetické částice modifikovány například pomocí „*metall-organic frameworks*“ neboli organokovovou kostrou složenou z UiO-66-NH₂ a jako základní magnetický materiál byl použit oxid železnato-železitý neboli magnetit. Částice jsou schopné selektivně extrahovat pouze RNA na úkor DNA a ostatních kontaminantů. Vazba spočívá ve vytváření vodíkových můstků, hydrofobních a elektrostatických interakcí a chelatačních interakcí. Částice lze i opakovaně používat po regeneraci za pomoci hluboce eutektického rozpouštědla (Meng a kol., 2020). Výhodou materiálu Ui-66-NH₂ je vysoká chemická i tepelná stabilita (Cavka a kol., 2008).

Pro izolaci miRNA je také možno využít povrchově modifikovaných magnetických částic redukovanými oxidy grafenu (rGO) (Yan a kol., 2017). Tyto oxidy se vyskytují ve formě jak rGO, tak i neredukované a vykazují značnou afinitu k jednovláknovým strukturám NK, která je způsobena tvorbou vodíkových můstků a π - π interakcemi. Selektivní izolace miRNA pomocí rGO spočívá ve využití kinetiky adsorpce na rGO a π - π interakcí. Modifikace rGO se jevila jako slibná k selektivní izolaci miRNA z celkové RNA (Yan a kol., 2017).

1.5 Metody pro detekci nukleových kyselin

Potřeba analyzovat NK stoupla zejména při zjištění, že se dají využít jako biomarkery různých patologických stavů organismu jako je zejména rakovina (Ouyang a kol., 2020). Mezi

klasické metody molekulární detekce patří zejména metoda gelové elektroforézy (Petrov a kol., 2013), Northern blot, hmotnostní spektrometrie (MS) a PCR. Nové metody se spoléhají zejména na různé strategie amplifikace a technologii mikročipů (Ouyang a kol., 2020).

1.5.1 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je významným nástrojem pro analýzu vzorků obsahujících RNA (Petrov a kol., 2013) i DNA (Stellwagen, 2009). Principem této metody je pohyb nabitých molekul analyzované látky v elektrickém poli v prostředí matrice. Rychlost pohybu závisí na použité matrici, separačních vlastnostech matrice a na složení použitého pufru. Za denaturačních podmínek dochází k rozdílné rychlosti migrace u různě dlouhých NK, které se v gelu rozdělí podle své délky. Tento proces poskytuje informace o složení vzorku. Za nedenaturačních podmínek dochází k rozdílné rychlosti migrace NK v závislosti na jejím prostorovém uspořádání. Tímto se zkoumají alternativně složené druhy NK (Petrov a kol., 2013).

Postupem času byly vyvinuty matrice vhodné pro analýzu DNA nebo pro RNA (Stellwagen, 2009). Matricí vhodnou pro analýzu DNA je například škrob (Matsubara a Takagi, 1962) nebo agarózový gel (Helling a kol., 1974). Mezi známou matrici pro gelovou elektroforézu patří zejména polyakrylamidový gel. Lze ho využít k analýze RNA i DNA (Bishop a kol., 1967). Polyakrylamidové gely formují tzv. síť tvořenou akrylamidovými vlákny, která jsou propojena bisakrylamidovými můstky. Důležitým parametrem je velikost pórů sítě. Tu lze ovlivnit celkovou koncentrací akrylamidu při tvorbě gelu a poměrem koncentrace akrylamidu ke koncentraci N,N'-metylenbisakrylamidu, činidla způsobujícího zesíťování. Při zvyšující se koncentraci akrylamidu se snižuje velikost pórů a lze separovat menší molekuly RNA (Holmes a Stellwagen, 1991). Škrob a agarózový gel patří do přírodních matric, zatímco polyakrylamidový gel se řadí do matric syntetických (Perrett, 2000).

Při gelové elektroforéze NK v gelu je nutná jejich vizualizace. Nejčastějším způsobem je barvení. DNA i RNA lze barvit pomocí fluorescenčního barviva ethidium bromidu. Toto fluorescenční barvivo má ale značné toxické a mutagenní účinky, které jsou při použití v laboratoři nežádoucí. Proto dochází k používání bezpečnějších fluorescenčních barviv pro DNA jako je například GelRedTM využívající UV excitaci nebo GelGreenTM, DiamondTM Nucleic Acid Dye využívající k excitaci modré světlo a SYBR green I, které ale vykazuje mírné mutagenní účinky (Haines a kol., 2015). Pro barvení RNA se používá toluidinová modř, barvivo SYBR green II nebo ethidium bromid. Alternativní metodou je vizualizace spočívající

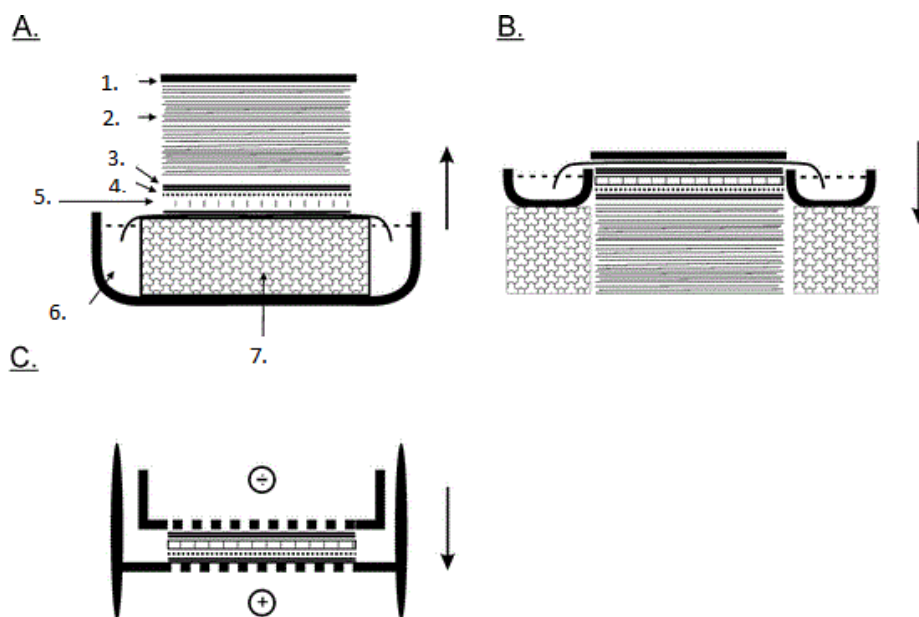
v radioaktivním značení RNA a následné autoradiografii (Petrov a kol., 2013). Toluidinová modř je thiazinové metachromatické barvivo, které vykazuje afinitu ke kyselým složkám tkání s vysokým obsahem RNA či DNA. Metachromatické znamená, že reaguje s danou tkání či složkou tkáně za vzniku odlišného zbarvení, než bylo jeho původní zbarvení před reakcí (Sridgharan a Shankar, 2012). Ethidium bromid a SYBR green II jsou interkalační fluorescenční barviva (Spiess a Ivell, 2018). Interkalační znamená, že interagují s nukleovými kyselinami vkládáním se mezi páry bází v dsDNA, ale mohou s NK interagovat i jinými způsoby jako je interakce barviva a povrchu NK. Jedná se vždy o nekovalentní interakci (Deligeorgiev a kol., 2009).

1.5.2 Northern blot

Mezi klasické metody pro analýzu RNA patří zejména metoda s názvem „Northern blot“ (Ouyang a kol., 2020). Základní stručný princip u analýzy RNA pomocí metody Northern blot spočívá v počátečním štěpení vzorku RNA pomocí enzymu s názvem restrikční endonukleasa. V dalších krocích dochází k separaci pomocí gelové elektroforézy na agarózovém gelu a u malých RNA na polyakrylamidovém gelu, k denaturaci a k přenosu vzorku na nitrocelulóзовý film nebo nylonovou membránu. Na filmu či na membráně následně dochází k detekci RNA. K RNA se naváže neboli hybridizuje značená sonda specifická pro danou RNA a umožní tak detekci. Tato metoda se také využívá pro detekci miRNA (Ye a kol., 2019).

Northern blot umožňuje, jak kvalitativní měření, díky kterému získáme průkaz určité molekuly RNA ve vzorku, tak i kvantitativní měření množství RNA. Kvantitativní měření RNA probíhá srovnávací metodou nikoliv měřením absolutního množství z důvodu neoptimální hybridizace, která je závislá na pracovních podmínkách (Josepsen a Nielsen, 2011).

Přenos NK z gelu na membránu či film se nazývá blotování. Blotování může probíhat dvěma hlavními způsoby, kterými jsou kapilární blotování či elektroblotování. Kapilární blotování se provádí u agarózových gelů a spočívá v nasakování přenosového pufru přes membránu zachycující RNA do vrstvy papírových ručníků. Toto blotování má dvě varianty: rychlejší sestupnou a vzestupnou. Elektroblotování se provádí zejména u polyakrylamidových gelů ale lze provést i u gelů agarózových (Bittner a kol., 1980). Spočívá v působení elektrického pole na gel. U obou typů blotování se ještě používá speciální papír Whatman 3 mm, který je navlhčený přenosovým pufrem (Josepsen a Nielsen, 2011). Typy blotování jsou zobrazeny na Obrázku č. 13.



Obrázek č. 13: Blotovací techniky: A. představuje vzestupné kapilární blotování (1. skleněná podložka, 2. vrstva papírových ručníků, 3. Whatman 3 mm, 4. membrána, 5. gel, 6. přenosový pufr, 7. houba pro podporu nasakování pufru). B. představuje sestupné uspořádání, C. představuje elektroblotování, převzato a upraveno z (Josephsen a Nielsen, 2011).

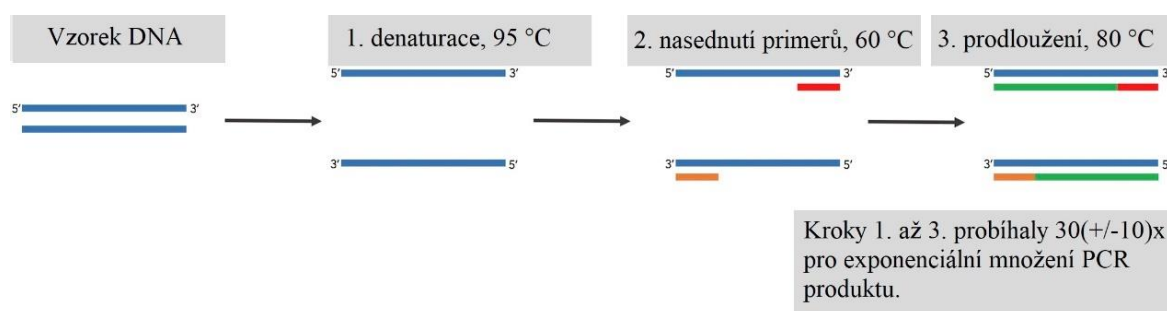
Pro přenos RNA se často využívá nylonová membrána, na které poté dochází k fixaci dané RNA použitím UV světla. UV světlo zajistí kovalentní vazbu RNA s membránou aktivací pyrimidinových bází vázajících se s aminovými skupinami na povrchu membrány. Místo UV světla se dá použít inkubace membrány 1 až 2 h v 65 °C. Fixace je důležitá pro omezení ztrát při následné detekci. Následuje detekce za pomoci hybridizace značenou sondou nejběžněji radioaktivně značenou (Josephsen a Nielsen, 2011). Pro detekci krátkých miRNA se používají oligonukleotidové sondy modifikované molekulami nazývanými jako tzv. uzamčené nukleové kyseliny, „*locked nucleic acids*“. Tyto sondy jsou vysoce afinitní analogy příslušných miRNA a zajišťují citlivou a specifickou detekci (Válóczi a kol., 2004).

1.5.3 Polymerázová řetězová reakce

Metoda PCR vznikla na základě inspirace základní reakcí molekulární biologie, kterou představuje syntéza DNA za pomoci DNA polymerasy. Tato reakce byla přenesena do laboratorních podmínek v prostředí *in vitro*. K reakci je zapotřebí stejně jako u klasické syntézy DNA enzym DNA polymerasa (získaná z bakterie *Thermus aquaticus* – Taq). Výsledkem reakce je několik miliónů kopií vybraného fragmentu DNA (Łaczmańska a kol., 2009).

K provedení PCR je za potřebí vzorek DNA představující templát, dva druhy DNA primerů, DNA polymeráza, pufr a deoxyribonukleotid trifosfáty (Maiz a Bhat, 2018). Reakce

probíhá v zařízení nazývaném termocykler a skládá se ze tří hlavních kroků, probíhajících za sebou viz Obrázek č. 14. První krok představuje denaturaci. Reakční směs je zahřívána nad teplotu tání dvouvlákna DNA templátu. Dojde k oddělení vláken dsDNA a vznikne jednovláknová DNA. Druhým krokem je nasednutí primerů, které probíhá již za nižší teploty. Posledním krokem je prodloužení. Spočívá v opětovném zvýšení teploty, kdy je DNA polymerasa schopná připojovat jednotlivé deoxyribonukleotid trifosfáty (Garibyan a Avashia, 2013). Výsledkem první PCR jsou dva fragmenty dvouvláknové DNA identické s oblastí mezi dvěma primery. Tato reakce se znovu opakuje a při každém opakování (cyklu) se získá dvojnásobný počet DNA fragmentů, než bylo na začátku reakce (Maiz a Bhat, 2018). Vizualizace následně získaného PCR produktu probíhá zásadně dvěma způsoby. Prvním způsobem je barvení získané DNA například pomocí ethidium bromidu. Druhý způsob probíhá již před samotnou PCR reakcí. Jedná se o značení výchozích primerů nebo výchozích deoxyribonukleotid trifosfátů fluorescenčním barvivem (Garibyan a Avashia, 2013).



Obrázek č. 14: Schéma PCR, 3 kroky: denaturace, nasednutí primerů a prodloužení, převzato a upraveno z (Maiz a Bhat, 2018).

Pro případ, kdy je výchozím vzorkem RNA se využívá modifikovaná metoda RT-PCR. Dochází k přidání jednoho počátečního kroku předcházejícího celému procesu klasické metody PCR. Jedná se o reverzní transkripci, kdy se z výchozí RNA syntetizuje DNA pomocí enzymu reverzní transkriptasy (Maiz a Bhat, 2018).

Další modifikací je tzv. kvantitativní PCR nebo qRT-PCT, která se používá nejen pro detekci, ale i pro kvantifikaci dané NK, která se vyskytuje ve vzorku většinou v malém množství (Łaczmajska a kol., 2009, Garibyan a Avashia, 2013). Funguje na principu sledování průběhu opakujících se PCR cyklů. Na počátku je dostatečné množství reagentů a málo PCR produktu, následně reakci nic nebrzdí a probíhá ze 100 %. Pokud stoupá množství produktu a ubývají reagenty, dochází k tomu, že reakce probíhá nedokonale. Exponenciální produkce PCR produktu se stává lineární, až postupně upadá do fáze plató, kdy je produkce zcela

zastavena (VanGuilder a kol., 2018). Data mohou být vyhodnocena dvěma způsoby, a to buď relativní kvantifikací či absolutní kvantifikací (VanGuilder a kol., 2018). Nejčastější metodou relativní kvantifikace je zvolení prahové hodnoty „*cycle of theshold*“ (CT). Hodnota CT představuje počet cyklů, které je nutné provést pro dosažení určité hodnoty fluorescence (Livak a Schmittgen, 2001). Metoda qRT-PCR je ideální možností pro detekci miRNA i v rutinním použití. Je to z důvodu její vysoké citlivosti a specifity (Gan a kol., 2011).

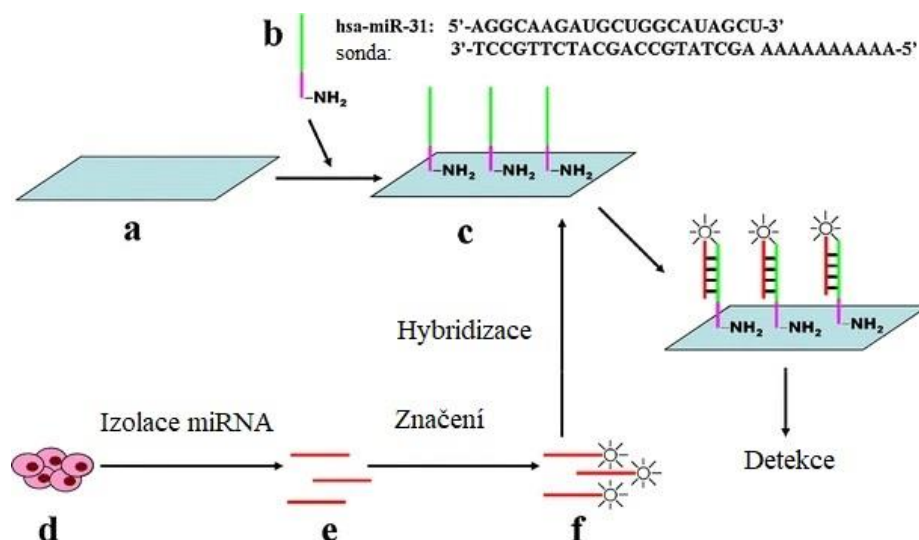
Modifikovanou metodou PCR je alelově specifická polymerázová řetězová reakce nebo PCR-*restriction fragment lenght polymorphism* (Sommers a kol., 1992).

1.5.4 Mikročipy

V mnoha studiích genové exprese je zapotřebí najednou analyzovat více sekvencí než jenom jednu, jak to bylo u předchozích metod. Proto je nutné zvýšit výkonnost prováděných analýz. Mikročipy se skládají ze snímacích prvků o velikosti menší než 200 μm . Tyto snímací prvky jsou umístěny na neporézním materiálu, který představuje sklo, křemík nebo nylon. Detekce probíhá většinou měřením fluorescence (Epstein a kol., 2002). Mikročipy mohou analyzovat tisíc vzorků za den, ale jejich použití je cenově náročné (Cissell a Deo, 2009).

U detekce ze vzorku RNA je provedena reverzní transkripce za vzniku komplementární DNA (cDNA). Ta je následně vázána s biotinem nebo označena fluorescenční sondou. Tyto cDNA jsou aplikovány na imobilizované oligonukleotidy. Po navázání cDNA na oligonukleotidy následuje série promývacích kroků. Pokud byla cDNA značená biotinem, dojde k interakci se streptavidinem, který nese fluofofor. Pokud byla cDNA již značená fluorescenční sondou může být fluorescence měřena bez další úpravy (Ye a kol., 2019). Jako výchozí vzorek může být i cRNA a lze provádět její značení (Do a Choi, 2007).

Pro detekci miRNA pomocí mikročipů se používají imobilizované miRNA oligonukleotidové sondy, které mají na svém 5' konci aminoskupiny, umožňující vazbu na skleněný nosič. U miRNA proběhne značení fluorescenčním barvivem a následuje hybridizace s příslušnými sondami. Následně detekujeme fluorescenci z navázaných miRNA na různých pozicích (Li a Ruan, 2009) viz Obrázek č. 15.



Obrázek č. 15: Princip miRNA profilování pomocí mikročipů (a: amin-reaktivní skleněná podložka, b: miRNA sonda modifikovaná aminoskupinou obsahující záchytnou sekvenci označenou zeleně a sekvenci linkeru označenou fialově, c: skleněná podložka mikročipu připravená k použití, d: vzorek představující buňky, e: izolovaná miRNA, f: miRNA označená fluorescenčním barvivem), převzato a upraveno z (Li a Ruan, 2009).

1.5.5 Hmotnostní spektrometrie

Metoda MS spočívá v ionizaci vzorku v iontovém zdroji. Po ionizačním procesu putují vzniklé ionty do hmotnostního analyzátoru, kde jsou odděleny podle jejich poměru m/z a detekovány na hmotnostním detektoru (Feng a kol., 2008).

Významnou roli v analýze NK zastává MS. Lze získat informace o sekvenci a modifikacích NK (Nordhoff a kol., 1996). K analýze se nejvíce využívají dva přístupy. Prvním přístupem je kombinace kapalinové chromatografie s ionizací za atmosférického tlaku pomocí elektrospreje (ESI) a tandemové MS. Druhým přístupem k analýze je využití ionizace za atmosférického tlaku pomocí desorpce laserem za přítomnosti matrice (MALDI) (Zhao a kol., 2021).

Pro separaci NK lze použít až 6 druhů kapalinové chromatografie: gelová permeační iontově výměnná, chromatografie na reverzní fázi, chromatografie na reverzní fázi s iontovým párováním, smíšená a afinitní. Výhody gelové permeační chromatografie je odsolení a přenesení vzorku NK do vhodného pufru. Nevýhodou je malá účinnost separace jednotlivých NK, jedná se pouze o prvotní frakcionaci před vlastní separací přímo spojenou s MS (Huber a Oberacher, 2001). Často používanou chromatografií pro detekci oligonukleotidů ve spojení s ionizací ESI je chromatografie na reverzní fázi s iontovým párováním (Gong, 2015).

Způsob ESI spočívá v aplikaci vysokého napětí na kovovou kapiláru za vzniku nabitých kapiček analytu. Z kapiček jsou následně uvolněny ionty analytu (Bruins, 1988). Ionizace

MALDI spočívá v krystalizaci analyzovaného vzorku s matricí. Následně je použit UV laser, který způsobí odpaření matrice a uvolnění analytu ve formě iontů plynu. Mezi používané hmotnostní analyzátory v kombinaci s ionizací ESI patří kvadrupól, iontová past, analyzátor doby letu, iontová cyklotronová rezonance či Orbitrap. MALDI se používá nejčastěji v kombinaci s analyzátozem doby letu (Feng a kol., 2008).

U MALDI ionizace při analýze NK je zásadní zvolit správný druh matrice vhodný pro ionizaci oligonukleotidů (Gao a kol., 2012). Mezi matrice umožňující analýzu RNA patří 2,5 dihydroxybenzoová kyselina, kyselina sinapová a 3-hydroxypikolinová kyselina (Wambua a kol., 2014).

2 Cíle diplomové práce

Předním cílem diplomové práce bylo optimalizovat zavedenou metodu izolace miRNA z různých biologických matric jako jsou buňky a sérum za pomoci částic na bázi TiO₂.

Jednotlivé cíle:

- 1) Seznámení s danou oblastí výzkumu.
- 2) Seznámení s prací s TiO₂ částicemi a se vzorky obsahujícími RNA.
- 3) Seznámení s jednotlivými izolačními metodami včetně metody izolace RNA pomocí komerčního činidla TRIZol™.
- 4) Seznámení s detekčními metodami jako je gelová elektroforéza pro analýzu nukleových kyselin a proteinů a s metodou PCR.
- 5) Optimalizace času inkubace vzorku s částicemi při izolaci oligo miRNA pomocí TiO₂ materiálu.
- 6) Optimalizace času lyze buněk při izolaci oligo miRNA pomocí TiO₂ materiálu.
- 7) Optimalizace izolace miRNA pomocí TiO₂ materiálu ze vzorku lidského séra

3 Experimentální část

3.1 Laboratorní pomůcky a přístroje

- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn, GmbH, Balingen, Německo)
- stanice pro produkci ultračisté vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- aparatura pro gelovou elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA USA)
- mikropipety (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- špičky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- mikrozkušavky (BioTech a. s., Praha, Česká republika; Eppendorf, Hamburg, Německo)
- zkumavky s upraveným vnitřním povrchem Protein LoBind (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- třepačka Multi-functional Orbital Shaker PSU-20i (Biosan SIA, Riga, Lotyšsko)
- pH metr model Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- magnetické míchadlo s ohřevem model MSH-300 (Biosan SIA, Riga, Lotyšsko)
- ultrazvuk Sonorex Digitec (Bandelin, Německo)
- vortex mixer Wx (Velp Scientifica, Usmate, Itálie)
- zdroj napětí Powerpac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- inkubátor Memmert INE 400 (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Německo)
- mikrostříkačka Hamilton (Hamilton AG, Bonaduz, GR, Švýcarsko)
- přístroj pro záznam gelů ChemiDoc™ XRS+ s programem ImageLab (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- termoblok BTD Grant Bio (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- vakuový koncentrátor Concentrator Plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- spektrofotometr Nano-MD UV-Vis Bio Spectrophotometr s nástavcem NanoStick-D (SCINCO Co. Ltd., Seoul, Korea)
- rotátor RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- sprej proti RNasam RNaseZap™ RNase Decontamination Solution (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

- UVC/T-AR DNA/RNA UV cleaner box (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- termocykler TProfessional Basic Thermocycler, Biometra Ltd (Analytik Jena GmbH, Jena, Německo)
- detekční systém RT-PCR reakce Rotor-Gene, RG-3000A, (Corbett Research, Sydney, Austrálie)
- odsolovací kolonky SPIN-Pure™ G-25 COLUMNS (Pure Biotech LLC, NJ, USA)

3.2 Chemikálie a reagensy

- močovina, UREA (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N'-metylenbisakrylamid 98 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ultračistá voda
- ultračistá voda autoklávaná
- destilovaná voda
- DEPC-T voda, DEPC-Treated water (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA, part no. AM9915G, lot no. 1606045)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Tris (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kyselina boritá (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- kyselina ethylendiamintetraoctová, EDTA (Lachema, Neratovice, Česká republika)
- persíran amonný, APS (Lachema, Neratovice, Česká republika)
- N, N, N, N – tetramethylenethylendiamin, TEMED (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ficoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- bromfenolová modř (Lachema, Neratovice, Česká republika)
- barvivo xylene cyanole FF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ethanol 96% (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- marker Invitrogen™ Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- barvivo SYBR™ Green II RNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- dodecylsulfát sodný, SDS (Lachema, Neratovice, Česká republika)
- glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kyselina chlorovodíková 35%, HCl (Penta, Chrudim, Česká republika)

- vzorkový pufr Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- marker molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, 10-250 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- amoniak vodný roztok 25-29% (Penta, Chrudim, Česká republika)
- dusičnan stříbrný, AgNO₃ (Penta, Chrudim, Česká republika)
- formaldehyd vodný roztok 36-38% (Penta, Chrudim, Česká republika)
- glutaraldehyd 50% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hydroxid sodný, NaOH (Penta, Chrudim, Česká republika)
- kyselina citrónová bezvodá (Penta, Chrudim, Česká republika)
- kyselina octová 99%, CH₃COOH (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- chloroform (Penta, Chrudim, Česká republika)
- isopropanol (Penta, Chrudim, Česká republika)
- TRIZol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- octan sodný (Penta, Chrudim, Česká republika)
- DEPC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- TRITON X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, Na₂HPO₄ · 12 H₂O (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- kyselina octová (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- chlorid sodný, NaCl (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- guanidium thiokyanát, GuSCN (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- souprava TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- PCR primer a sonda pro hsa-miR-18a* TaqMan™ MicroRNA Assay (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

3.3 Nosiče

- Titansphere TiO (GL Sciences Inc, Tokyo, Japan)

3.4 Výchozí materiál

- oligo RNA 10-mer (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika)
- oligo RNA 20-mer (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika)
- oligo RNA 23-mer (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika)
- oligo RNA 30-mer (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika)
- oligo RNA 40-mer (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika)
- buňky JURKAT (lidské T-lymfatické buňky akutní lymfoblastické leukémie, ACC 282)
- lidské sérum od zdravého dárce

3.5 Gelová elektroforéza pro detekci nukleových kyselin (UREA-PAGE)

Použité roztoky:

- roztok 10× koncentrovaný TBE pufr: 0,89 M Tris, 0,89 M kyselina boritá, 0,02 M EDTA, pH cca 8,3
- 45% roztok akrylamidu: akrylamid:N,N'-methalenbisakrylamid v poměru (28:1)
- 10% roztok persíranu amonného (APS)
- roztok dávkovacího pufru: 0,089 M Tris, 0,089 M kyselina boritá, 0,002 M EDTA, 7 M močovina, 12% ficoll, 0,01% bromfenolová modř s xylene cyanole FF

Výchozí materiál:

- produkty izolace oligo miRNA pomocí TiO₂ materiálu z buněk/séra
- roztoky standardů oligo RNA 10-mer, 20-mer, 23-mer, 30-mer, 40-mer

Postup:

1. Příprava gelů (tloušťka gelu: 0,75 mm, 20% gel s 8 M močovinou):

Do zkumavky (15 ml) bylo naváženo 5,76 g močoviny na přípravu dvou gelů. K močovíně bylo pipetováno 1,2 ml ultračisté vody, 1,2 ml 10× TBE pufru a nakonec 5,32 ml roztoku 45% akrylamidu a zkumavka byla krátce zahřáta než došlo k rozpuštění močoviny. Po rozpuštění byla zkumavka s roztokem vložena do ultrazvuku na 5 min. Do zkumavky s odvdzdušeným roztokem bylo pipetováno 6 µl TEMED a roztok byl krátce promíchán. Do zkumavky bylo pipetováno 63,4 µl roztoku 10% APS a zkumavka byla uzavřena a 2× promíchána pomalým otočením. Roztok byl dávkován mezi příslušná skla předem připravené elektroforetické aparatury tak, aby sahal až k horní hranici nižšího skla. Následně byly mezi skla vloženy šablony pro tvorbu jamek (0,75 mm, 15 jamek). Gel byl ponechán 10 min polymerovat.

2. Příprava elektrodového pufru a elektrodové vany:

Elektrodový pufr byl připraven naředěním TBE pufr:ultračistá voda v poměru 1:9. Zpolymerovaný gel se skly a se šablonami pro tvorbu jamek byl přenesen do stojánků pro elektroforézu. Tyto stojánky byly následně vloženy do elektrodové vany a elektrodová vana byla naplněna elektrodovým pufrem. Tato naplněná vana byla vložena do inkubátoru (40 min, 42 °C).

3. Příprava vzorků pro dávkování na gel:

Příprava vzorků a jejich dávkování probíhalo ve sterilním prostředí bez RNAs. Všechny vzorky a markery byly připravovány do zkumavek (0,2 ml). Marker Ultra Low Range DNA Ladder byl připraven podle instrukcí od dodavatele. Pro každý gel byl připraven samostatný marker. Roztoky standardů byly ředěny DEPC-T vodou na požadovanou koncentraci. Vzorky z izolací a vzorky standardů byly připravovány mísením s dávkovacím pufrem v poměru 1:1. Vzorky smíchané s dávkovacím pufrem byly inkubovány v termobloku (4 min, 70 °C).

4. Postup dávkování vzorků na gel a průběh elektroforetické separace:

Po ukončení inkubace elektrodové vany byly z gelů vyjmuty šablony pro tvorbu jamek. Každá jamka v gelu byla 3× vypláchnuta elektrodovým pufrem pomocí pipety. Vzorky byly dávkovány do jednotlivých jamek mikrostríkačkou Hamilton, která byla promyta 6× ethanolem a 6× autoklávovanou vodou. Nejprve byla dávkována vazebná frakce a eluce a poté byly dávkovány původní vzorky (původní vzorky, přečištěné či nepřečištěné lyzáty či séra) a marker. Při dávkování docházelo k vynechání jamek mezi markerem a vzorky a mezi jednotlivými sériemi vzorků. Do prázdných jamek byl dávkován dávkovací pufr bez úpravy, přibližně do 2/3 objemu jamky. Elektrodová vana byla uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Na zdroji byly nastaveny parametry elektroforézy (180 V, 400 mA, 120 min) a následně probíhala vlastní elektroforetická separace.

5. Barvení gelů pomocí SYBR Green II RNA Gel Stain:

Tricet minut před koncem gelové elektroforézy byly připraveny roztoky pro barvení gelů. Do nádoby přikryté alobalem bylo pipetováno 18 ml ultračisté vody, 2 ml 10× TBE pufru a 2 μl SYBR Green II RNA Gel Stain. Po ukončení elektroforetické separace byly gely vyjmuty ze skel pomocí plastové špachtle a vloženy do nádob s barvicím roztokem. Gely byly obarveny na třepačce ve tmě po dobu 40 min.

6. Záznam obarvených gelů:

Po obarvení byly gely foceny na přístroji pro záznam gelů ChemiDoc XRS+ s programem ImageLab za nastavených parametrů (Nukleové kyseliny – barvení SYBR Green, Bio-Rad Mini-PROTEAN Gel, expozice byla nastavena manuálně na 2,5 s). V tomto programu následovalo i příslušné vyhodnocení gelů.

3.6 Gelová elektroforéza pro detekci proteinů (SDS-PAGE)

Použité roztoky:

- roztok A: 29,2% akrylamid, 0,8% N,N'-methylbisakrylamid

- roztok B: 1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8
- roztok C: 1 M Tris-HCl pufr, pH 6,8
- roztok D: 10% SDS
- roztok E: 10% APS
- roztok 10× koncentrovaný elektrodový pufr: 0,25 M Tris; 1,92 M glycin; 1% SDS; pH 8,3 – 8,6
- 10% roztok glutaraldehydu
- roztok fixační: 5% kyselina octová, 50% ethanol
- roztok ustalovací: 5% kyselina octová
- roztok vyvolávací: 0,05% kyselina citronová, 0,04% formaldehyd

Výchozí materiál:

- produkty izolace oligo miRNA pomocí TiO₂ materiálu z buněk/séra

Postup:

1. Příprava gelů (tloušťka gelu: 0,75 mm, 12% dělicí gel, 5% zaostřovací gel):

Byla připravena aparatura pro nalévání gelů. Do zkumavky (15 ml) byl připraven roztok pro dělicí gel v množství na 2 gely pipetováním 3,36 ml destilované vody; 4 ml roztoku A; 2,5 ml roztoku B a 0,1 ml roztoku D. Tento roztok byl promísen pomalým otáčením zkumavky. K roztoku byly pipetovány 4 μl TEMED a zkumavka byla promísená. Dále bylo pipetováno 100 μl roztoku E, roztok byl opět promísen a dávkován mezi skla přibližně 1,5 cm pod okraj nižšího skla. Dávkovaný roztok byl převrstven butanolem. Roztok byl ponechán 20 minut polymerizovat.

Po zpolymerizování byl butanol odtažen filtračním papírem. Byl připraven roztok pro zaostřovací gel do zkumavky (10 ml) pipetováním 2,1 ml destilované vody; 0,495 ml roztoku A; 0,375 ml roztoku C a 0,030 ml roztoku D. K roztoku byly pipetovány 3 μl TEMED a roztok byl promísen. Dále bylo pipetováno 30 μl roztoku E, roztok byl promísen a dávkován mezi skla na zpolymerizovaný dělicí gel. Po dávkování byly mezi skla vloženy šablony pro tvorbu jamek (0,75 mm, 15 jamek). Roztok byl ponechán 20 minut polymerizovat.

2. Příprava elektrodového pufru a elektrodové vany:

Elektrodový pufr byl připraven naředěním v poměru elektrodový pufr:destilovaná voda 1:9. Elektrodový pufr byl ředěn z roztoku 10× koncentrovaného elektrodového pufru o složení: 0,25 M Tris; 1,92 M glycin; 1% SDS; pH 8,3 – 8,6. Zpolymerovaný gel se skly a se šablonami

pro tvorbu jamek byl přenesen do stojánek pro elektroforézu, které byly následně vloženy do elektrodové vany a elektrodová vana byla naplněna elektrodovým pufrem.

3. Příprava vzorků pro dávkování na gel:

Všechny vzorky i markery byly připravovány do zkumavek (0,2 ml). Pro každý gel byl připraven samostatný marker pipetováním 5 μ l markeru molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards do zkumavky (0,2 ml). Vzorky z izolací byly připraveny jejich smícháním se vzorkovým pufrem Laemmler Sample Buffer v poměru 1:1. Vzorky smíchané se vzorkovým pufrem (mimo marker) byly inkubovány v termobloku (3 min, 100 °C).

4. Postup dávkování vzorků na gel a průběh elektroforetické separace:

Šablony pro tvorbu jamek byly vyjmuty a jamky byly propláchnuty najednou pomalým tahem pipety podél hrany skla a postupným vypouštěním elektrodového pufru. Vzorky byly po jejich inkubaci dákovány do jamek mikrostříkačkou Hamilton předem vypláchnutou 6× ethanolem a 6× destilovanou vodou. Po ukončení dávkování vzorků byla elektroforetická vana připojena ke zdroji napětí. Na zdroji byly nastaveny parametry (180 V, 400 mA, 45 min) a následně probíhala vlastní elektroforetická separace.

5. Barvení gelů pomocí stříbra

Po proběhnutí gelové elektroforézy byly gely vyjmuty ze skel pomocí plastové špachtle a vloženy do Petriho misek. Veškeré kroky barvení probíhaly na orbitální třepačce při laboratorní teplotě. Gely byly postupně inkubovány 30 min ve fixačním roztoku, 30 min v destilované vodě, 30 min v 10% roztoku glutaraldehydu a 6× 10 min v destilované vodě.

Při posledním promytí vodou byl připraven roztok amoniakálního stříbra. Do Erlenmeyerovy baňky (100 ml) bylo pipetováno 10,5 ml destilované vody, 700 μ l roztoku vodného amoniaku a 120 μ l roztoku 9 M NaOH. K tomuto roztoku byl pipetován roztok 20% AgNO₃ do vzniku světle hnědého zabarvení. Poté byl tento roztok doplněn na objem 50 ml. Gely byly 12 min inkubovány v tomto roztoku. Po uplynutí 12 minut byly gely promyty destilovanou vodou a následně inkubovány ve vyvolávacím roztoku, dokud se nezačaly objevovat obarvené pruhy. Poté byly gely převrstveny ustalovacím roztokem.

6. Záznam obarvených gelů

Gely byly foceny na přístroji pro záznam gelů ChemiDoc XRS+ s programem ImageLab s nastavenými parametry (Proteiny – barvení stříbrem, Bio-Rad Mini-PROTEAN Gel, automatická expozice). V tomto programu následovalo i příslušné vyhodnocení gelů.

3.7 Polymerázová řetězová reakce pro detekci miRNA (PCR)

Výchozí materiál:

- roztok standardu oligo RNA 23-mer
- vzorky elucí z izolace oligo miRNA pomocí TiO₂ materiálu ze séra

Postup:

1. Příprava roztoků standardů:

Práce byla provedena v prostředí bez RNas. Práce s roztoky probíhala v UV dekontaminačním boxu. Výchozí roztok standardu oligo RNA 23-mer o koncentraci 100 pmol/μl byl naředěn 10 000× na výslednou koncentraci 0,01 pmol/μl. Dalším ředěním 5× byl do zkumavky (0,2 ml) připraven roztok ST1 o koncentraci 0,002 pmol/μl. Ostatní standardy pro kalibraci byly připraveny desítkovým ředěním výchozího roztoku ST1. Bylo připraveno celkem 5 standardů.

2. Reverzní transkripce (RT):

Do zkumavky (0,5 ml) byl připraven RT mix na 10 vzorků pipetováním 43,7 μl PCR vody; 1,995 μl RNase inhibitor, 20 U/μl; 15,75 μl 10× RT buffer; 10,5 μl MultiScribe RT a 1,575 μl 100 mM dNTP. Zkumavka s RT mixem byla vortexována a krátce centrifugována. RT mix o objemu 7 μl byl pipetován k 5 μl vzorku (vzorky standardů, negativní kontrola DEPC-T voda a vzorky elucí). Poté byly všechny zkumavky krátce centrifugovány a byly k nim pipetovány 3 μl primeru TaqManTM Micro RNA Assay. Zkumavky byly znovu vortexovány, krátce centrifugovány a následně inkubovány 5 min na ledu. Vzorky byly vloženy do termocyklueru TProfessional Basic Thermocycler, Biometra Ltd a byl spuštěn program pro RT (krok 1: 16 °C, 30 min; krok 2: 42 °C, 30 min; krok 3: 85 °C, 5 min; krok 4: udržovat teplotu 4 °C).

3. Kvantitativní PCR:

Pro každý vzorek bylo do zkumavky (0,2 ml) pipetováno 26,9 μl PCR vody; 35 μl roztoku TaqManTM Universal PCR Master Mix II; 4,66 μl produktu RT a 3,50 μl roztoku obsahujícího sondu TaqManTM Small RNA assay. Všechny 10 zkumavek bylo krátce vortexováno a centrifugováno. Do 0,2 ml zkumavek s plochým víčkem pro PCR byly připraveny triplicáty všech vzorků v objemu 20 μl. Připravené zkumavky byly vloženy do detektoru PCR reakce RotorGene, RG-3000A, Corbett Research; a byl spuštěn program (krok 1: 95 °C, 10 min; krok 2: 40 cyklů se střídáním teplot; 95 °C, 15 s; 60 °C, 60 s; fluorescence zaznamenávána v kanálu FAM). Vyhodnocení dat probíhalo v programu RotorGene.

3.8 Izolace RNA z buněk pomocí činidla TRIzol™

Použité roztoky:

- 75% roztok etanolu v DEPC-T vodě

Výchozí materiál:

- buňky JURKAT, 3×10^6 buněk (skladování -80 °C)

Postup:

Veškeré práce probíhaly v prostředí bez RNas. Pracovní povrchy byly ošetřeny sprejem proti RNasam. Voda byla autoklávována nebo obsahovala přídavek DEPC, tak aby byl eliminován vliv RNas na zkoumané vzorky.

V digestoři bylo do zkumavky s čerstvě rozmraženými buňkami pipetováno 750 μ l TRIzol™ činidla. Špičkou pipety byl obsah zkumavky promíchán a ponechán inkubovat 5 min při laboratorní teplotě. K tomuto roztoku bylo pipetováno 150 μ l chloroformu a zkumavka byla vortexována (2,5 min; nízké otáčky) a centrifugována (15 min; 13400 rpm; laboratorní teplota). Ve zkumavce došlo k oddělení fází roztoků. Všechny centrifugace probíhaly na centrifuze Eppendorf MiniSpin.

Do zkumavky (1,5 ml) byla odebrána horní bezbarvá fáze. K horní fázi bylo pipetováno 375 μ l isopropanolu a zkumavka byla inkubována (10 min, laboratorní teplota). Po 10 minutách byla zkumavka centrifugována (10 min, 13400 rpm, laboratorní teplota). Supernatant byl odebrán do odpadu. Zkumavka s peletou RNA byla vložena do koncentrátoru (mód: V-AL, teplota: 30 °C), kde byl odpařen zbytkový supernatant.

Po usušení bylo k peletě pipetováno 50 μ l DEPC-T vody a zkumavka byla inkubována v termobloku (15 min, 850 rpm, 55 °C). Po inkubaci byl roztok pipetován po 10 μ l alikvotech do 4 zkumavek (0,2 ml). Poslední 10 μ l alikvot byl ponechán v původní zkumavce pro následné měření čistoty a koncentrace RNA pomocí UV/VIS spektrofotometru. Takto izolovaná RNA byla skladována při -20 °C.

3.9 Měření čistoty a koncentrace RNA pomocí UV/VIS spektrofotometru

Výchozí materiál:

- produkt izolace RNA z buněk pomocí TRIzol™ činidla

Postup:

Nanokyveta 0,5 mm byla očištěna pomocí bezprachových ubrousků a pro měření byly pipetovány postupně 3 μ l DEPC-T vody jako slepého vzorku a vzorku izolace RNA pomocí TRIZol™ činidla. Nanokyveta byla vložena do spektrofotometru a s pomocí programu LabPro Plus s parametry nastavenými pro měření RNA byla zaznamenána absorbance vzorků. V programu byla zobrazena získaná data a zároveň vyhodnoceny poměry R (260/280) a R (260/230) a výsledná koncentrace RNA. Po měření byla nanokyveta opět vyčištěna pomocí bezprachových ubrousků.

3.10 Izolace oligo miRNA pomocí TiO₂ materiálu

Použité roztoky:

- **roztok vazebný a promývací:** 100 mM CH₃COONa, pH 4,40 (upraveno pomocí 6 M CH₃COOH)
- **roztok eluční:** 200 mM roztok Na₂HPO₄, pH cca 9,2
- 80% roztok ACN s 0,1% TFA
- 5% roztok TFA
- zásobní roztok částic: TiO₂ v 80% roztoku ACN s 0,1% TFA: 1 mg částic TiO₂ ve 25 μ l roztoku

Nosiče:

- Titansphere TiO (GL Sciences Inc, Tokyo, Japan)

Výchozí materiál:

- roztok standardu oligo RNA 23-mer
- produkt izolace RNA z buněk pomocí TRIZol™ činidla

Postup:

1. Příprava částic TiO₂:

Veškerá práce probíhala v prostředí bez RNAs. Pro každou izolaci byl použit 1 mg částic TiO₂. Všechny centrifugační kroky pro oddělení částic TiO₂ od roztoku probíhaly na centrifuze Eppendorf MiniSpin 1 min, 3000 rpm při laboratorní teplotě. K částicím bylo pipetováno 500 μ l promývacího roztoku a zkumavka byla inkubována v termobloku (2 min, 1200 rpm, 37 °C). Poté byla centrifugována a supernatant byl odebrán do odpadu. Promytí bylo 2× opakováno.

2. Příprava roztoku vzorku:

Roztok byl připraven pipetováním produktu izolace RNA z buněk pomocí TRIZol™ činidla, roztoku standardu oligo RNA 23-mer a vazebného roztoku. Koncentrace izolované RNA pomocí TRIZol™ činidla byla 0,01 µg/µl a oligo RNA 23-mer byla 0,5 pmol/µl v roztoku vzorku.

3. Izolace miRNA na částicích TiO₂:

K částicím bylo pipetováno 200 µl roztoku vzorku. Zkumavka byla inkubována v termobloku (40 min, 1200 rpm, 37 °C). Zbytek tohoto roztoku byl ponechán jako původní vzorek (PV). Po inkubaci byla zkumavka centrifugována a supernatant byl odebrán do zkumavky (0,5 ml) jako vazebná frakce (VF).

4. Promytí částic TiO₂ po vazbě:

K částicím bylo pipetováno 500 µl promývacího roztoku a zkumavka byla inkubována v termobloku (3 min, 1200 rpm, 37 °C). Po inkubaci byla zkumavka centrifugována a supernatant byl odebrán do odpadu. Promytí bylo 4× opakováno.

5. Eluce:

K částicím bylo pipetováno 100 µl elučního roztoku a zkumavka byla inkubována v termobloku (10 min, 1200 rpm, 37 °C). Po inkubaci byla centrifugována a supernatant byl odebrán do nové zkumavky (0,5 ml) jako 1. eluce (EL1.1). Pro druhou eluci byl postup eluce opakován za získání roztoku 2. eluce (EL 1.2). Obě eluce byly okyseleny přidáním 30 µl 5% TFA.

Optimalizace: čas inkubace vzorku s částicemi. V tomto protokolu je uveden optimalizovaný čas 40 min.

3.11 Izolace oligo miRNA pomocí TiO₂ materiálu z buněk

Použité roztoky:

- **roztok lyzační:** 100 mM CH₃COONa, 2% TRITON X-100, 0,1% DEPC, pH neupravené, příprava den předem
- **roztok vazebný a promývací:** 100 mM CH₃COONa, pH 4,40 (upraveno pomocí 6 M CH₃COOH)
- **roztok eluční:** 200 mM roztok Na₂HPO₄, pH cca 9,2
- 80% roztok ACN s 0,1% TFA
- 5% roztok TFA

- zásobní roztok částic: TiO_2 v 80% ACN a 0,1% TFA: 1 mg částic TiO_2 ve 25 μl roztoku

Nosiče:

- Titansphere TiO (GL Sciences Inc, Tokyo, Japan)

Výchozí materiál:

- roztok standardu oligo RNA 23-mer
- buňky JURKAT, 10×10^6 buněk (skladování -80°C)

Postup:

1. Lyze buněk:

Práce byla provedena v prostředí bez RNAs. Při práci s buňkami bylo do zkumavky k buňkám pipetováno 260 μl lyzačního roztoku a roztok standardu oligo RNA 23-mer o původní koncentraci 100 pmol/ μl , tak aby jeho koncentrace v lyzačním roztoku byla 0,5 pmol/ μl . Buňky ve zkumavce byly lyzovány (20 s vortex, laboratorní teplota). Poté byl roztok přemístěn do nové zkumavky (0,5 ml) a centrifugován (10 min, 13400 rpm, laboratorní teplota). Centrifugace probíhala vždy na centrifuze Eppendorf MiniSpin.

2. Přechištění RNA pomocí NaCl a isopropanolu:

Do zkumavky (0,5 ml) na analytických vahách byl navážen NaCl a byl pipetován isopropanol. Koncentrace NaCl v isopropanolu byla 4 M. Bylo odebráno 230 μl roztoku lyzovaných buněk, který byl pipetován do zkumavky s NaCl a isopropanolem. Tato směs byla následně vložena do rotátoru (10 min; otáčky 3,5; laboratorní teplota), kde s postupným rozpuštěním NaCl došlo k oddělení vodné a organické fáze. Zbytek roztoku (30 μl) byl přemístěn do zkumavky (0,2 ml) jako nepřečištěný lyzát (NL).

3. Příprava částic TiO_2 :

Pro každou izolaci byl použit 1 mg částic TiO_2 . Všechny centrifugační kroky pro oddělení částic od roztoku probíhaly na centrifuze Eppendorf MiniSpin 1 min, 3000 rpm při laboratorní teplotě. Částice byly promyty 3×500 μl promývacího roztoku.

4. Práce se vzorkem po přečištění:

Zkumavka z rotátoru byla centrifugována (30 s, 3000 rpm, laboratorní teplota) a horní fáze byla odebrána do odpadu. Mikrostříkačkou Hamilton, předem vypláchnutou $6 \times$ ethanolom a $6 \times$ autoklávovanou vodou, byla odebrána spodní fáze do nové zkumavky (0,5 ml). Ta byla okyselená pipetováním 3,75 μl 6 M CH_3COOH , krátce vortexována a centrifugována.

5. Izolace miRNA na částicích TiO₂, promytí částic TiO₂ po vazbě a eluce:

Roztok odebrané spodní fáze byl po okyselení pipetován v objemu 200 µl k částicím TiO₂ a zkumavka byla inkubována v termobloku (40 min, 1200 rpm, 37 °C). Po inkubaci byla zkumavka centrifugována a supernatant, odebraný do nové zkumavky (0,5 ml), byl uschován pro analýzu vazebné frakce (VF). Po vazbě byly částice promývány 5× 500 µl promývacího roztoku. Po posledním promytí bylo k částicím pipetováno 100 µl elučního roztoku a zkumavka byla vložena do termobloku (10 min, 1200 rpm, 37 °C). Po inkubaci byla zkumavka centrifugována a supernatant byl odebrán a označen jako první eluční frakce (EL1.1). Pro druhou eluci (EL1.2) byl postup od přidání elučního roztoku opakován. Obě eluce byly okyseleny přidáním 30 µl 5% TFA.

Optimalizované parametry: čas lyze buněk. Uvedený čas 20 s v tomto protokolu je již optimalizovaný.

3.12 Odsolení séra

Výchozí materiál:

- lidské sérum
- roztok standardu oligo RNA 23-mer

Použité roztoky:

- 100 mM CH₃COONa, 0,1% DEPC, pH 4,40 (upraveno pomocí 6 M CH₃COOH)

Postup:

Práce byla provedena v prostředí bez RNas. Do odsolovacích kolonek bylo do každé pipetováno 750 µl roztoku 100 mM CH₃COONa, 0,1% DEPC o pH 4,40. Poté byly kolonky uzavřeny a 10 s vortexovány. Bubliny uvnitř roztoku byly odstraněny klepnutím do kolonky. Kolonky byly inkubovány ve stojánku (30 min, laboratorní teplota). Kolonkám byla sejmuta víčka a byly vloženy do sběrných zkumavek. Ve sběrných zkumavkách se nacházely další, předem navážené látky představující SDS nebo GuSCN v množství, aby dosahovaly potřebné koncentrace SDS 1% a GuSCN 4 M po převedení filtrátu z kolonky. Do každé z kolonek bylo pipetováno 50 µl séra a byly otevřené vloženy do centrifugy (2 min, 3300 rpm, laboratorní teplota). Po centrifugaci byly kolonky vyjmuty ze sběrných zkumavek, kde se nacházela odsolená séra v potřebných vazebných roztocích. Roztoky vzorků pro postup kapitol 3.13 byly

vytvořeny pipetováním 329 μl odsoleného séra (nacházející se ve vazebném roztoku) a 1,65 μl roztoku standardu oligo RNA 23-mer.

3.13 Izolace oligo miRNA pomocí TiO_2 materiálu ze séra

Použité roztoky:

- **vazebný:** 100 mM CH_3COONa , 0,1% DEPC, 2% TRITON X-100, 2 M GuSCN, pH 4,40 (upraveno pomocí 6 M CH_3COOH)
- **promývací 1:** stejné složení jako vazebný
- **promývací 2:** 100 mM CH_3COONa , 0,1% DEPC, pH 4,40 (upraveno pomocí 6 M CH_3COOH)
- **roztok eluční:** 200 mM roztok Na_2HPO_4 , pH cca 9,2
- 80% roztok ACN s 0,1% TFA
- 5% roztok TFA
- zásobní roztok částic: TiO_2 v 80% ACN a 0,1% TFA: 1 mg částic TiO_2 ve 25 μl roztoku

Nosiče:

- Titansphere TiO (GL Sciences Inc, Tokyo, Japan)

Výchozí materiál:

- roztok standardu oligo RNA 23-mer
- lidské sérum

Postup:

1. Příprava roztoku séra:

Práce probíhala v prostředí bez RNAs. Sérum bylo pipetováno do vazebného roztoku a následně byl přidán roztok standardu oligo RNA 23-mer. Sérum bylo v roztoku 10 \times naředěné a koncentrace oligo RNA 23-mer činila 0,5 pmol/ μl ve vazebném roztoku.

2. Přečištění RNA pomocí NaCl a isopropanolu:

Do zkumavky byl na analytických vahách navážen NaCl, ke kterému byl pipetován isopropanol. Koncentrace NaCl v isopropanolu činila 4 M. Z roztoku naředěného séra bylo odebráno 300 μl a pipetováno k NaCl a isopropanolu. Zbytek roztoku byl uchován jako nepřečištěné sérum (NS). Poté byla zkumavka s roztokem, isopropanolem a NaCl vložena do

rotátoru (10 min; otáčky 3,5; laboratorní teplota), kde s postupným rozpouštěním NaCl došlo k oddělení vodné a organické fáze.

3. Příprava částic TiO₂:

Pro každou izolaci byl použit 1 mg částic TiO₂. Všechny centrifugační kroky pro oddělení částic od roztoku probíhaly na centrifuze Eppendorf MiniSpin 1 min, 3000 rpm při laboratorní teplotě. Částice byly 3× promyty promývacím roztokem 1.

4. Práce se vzorkem po přečištění:

Po inkubaci v rotátoru byla zkumavka centrifugována (30 s, 3000 rpm, laboratorní teplota) a horní fáze byla odebrána do odpadu. Mikrostríkačkou Hamilton, předem vypláchnutou 6× ethanolem a 6× autoklávovanou vodou, byla odebrána spodní fáze do nové zkumavky (0,5 ml).

5. Izolace miRNA na částicích TiO₂, promytí částic TiO₂ po vazbě a eluce:

Tato spodní fáze byla opět v objemu 200 µl pipetována k částicím TiO₂ a zkumavka byla inkubována v termobloku (40 min, 1200 rpm, 37 °C). Zbytek spodní fáze byl uschován jako přečištěné sérum (PS). Po inkubaci byla zkumavka centrifugována a supernatant, odebraný do nové zkumavky (0,5 ml), byl uschován pro analýzu vazebné frakce (VF). Po vazbě byly částice promývány 2× 500 µl a promývacím roztokem 1, poté 3× 500 µl promývacím roztokem 2. Po posledním promytí bylo k částicím pipetováno 100 µl elučního roztoku a zkumavka byla vložena do termobloku (10 min, 1200 rpm, 37 °C). Po inkubaci byla zkumavka centrifugována a supernatant byl odebrán a označen jako první eluční frakce (EL1.1). Pro druhou eluci (EL1.2) byl postup od přidání elučního roztoku opakován. Obě eluce byly okyseleny přidáním 30 µl 5% TFA.

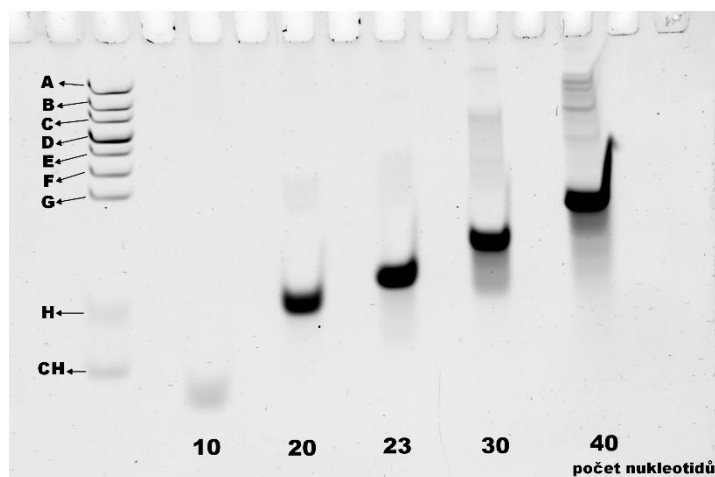
Optimalizované parametry: prostředí vazby miRNA na částice TiO₂. Uvedené roztoky v tomto protokolu jsou již optimalizované.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Gelová elektroforéza standardních roztoků oligo RNA, koncentrační řada roztoku standardu oligo RNA 23-mer

Pro počáteční seznámení s metodou gelové elektroforézy a ověření schopnosti touto metodou detekovat oligo RNA o odlišných délkách byla provedena gelová elektroforéza roztoků standardů oligo RNA dosahujících délek 10, 20, 23, 30 a 40 nukleotidů. Gelová elektroforéza pro detekci nukleových kyselin probíhala vždy v 20% polyakrylamidovém gelu s 8 M močovinou, jako standard byl použit marker Invitrogen™ Ultra Low Range DNA Ladder. Vizualizace nukleových kyselin probíhala barvivem SYBR™ Green II RNA Gel Stain. Odlišné pozice pruhů detekovaných standardů RNA viz Obrázek č. 16. Vypovídaly o jejich odlišných délkách a jejich účinné rozlišení bylo tímto potvrzeno.

Při dlouhodobém uchovávání v -20 °C dochází postupně k určitému rozpadu RNA, jak lze vidět na Obrázku č. 16. Nejvýrazněji můžeme vliv dlouhodobého skladování pozorovat u nejdelšího testovaného oligo RNA o délce 40 nukleotidů, kde kromě intenzivního pruhu tohoto standardu vidíme i několik méně výrazných pruhů RNA s odlišnou velikostí.



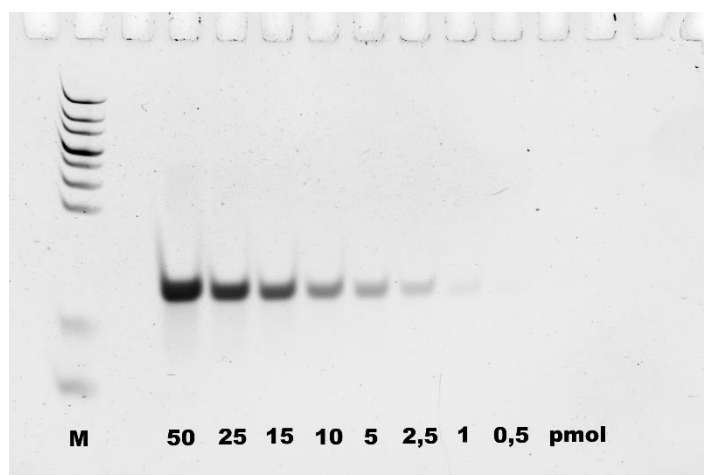
Obrázek č. 16: UREA-PAGE standardních roztoků oligo RNA 10, 20, 23, 30 a 40 nukleotidů. M označuje marker molekulových hmotností, písmena představují jednotlivé složky markeru (A: 300 bp, B: 200 bp, C: 150 bp, D: 100 bp, E: 75 bp, F: 50 bp, G: 35 bp, H: 20 bp, CH: 10 bp) a hodnoty bp označují počet párů bází.

Oligo RNA 23-mer (navržená podle sekvence hsa-miR-18a) byla následně zvolena jako hlavní standard, který bude ve formě přísady ke vzorkům před izolačním procesem sloužit k lepší odezvě na změny v izolačním protokolu a zajistí usnadnění a urychlení optimalizačních kroků. Pro ověření schopnosti detekovat i nižší koncentrace oligo RNA 23-mer touto metodou

byla vytvořena a analyzována koncentrační řada tohoto standardu gelovou elektroforézou (Obrázek č. 17). Data z koncentrační řady byla následně vyhodnocena pro určení spolehlivosti získané kalibrační závislosti.

Barvivo SYBRTM Green II RNA Gel Stain patří mezi nejvíce citlivá barviva pro detekci RNA na gelové elektroforéze. Detekční limit SYBRTM Green II RNA Gel Stain je od výrobce stanoven na 4 až 0,1 ng RNA na jeden pruh podle zvoleného způsobu focení a druhu gelu (Molecular Probes, Inc., 2001).

Uvedené výsledky v Tabulce č. 4 potvrzují schopnost této metody spolehlivě zaznamenat miRNA do množství 3,6 ng na jeden pruh. Spolehlivost R^2 vytvořené kalibrační závislosti představovala hodnotu 0,9654 (Graf č. 1). Kalibrační závislost byla vyhodnocena jako spolehlivá.

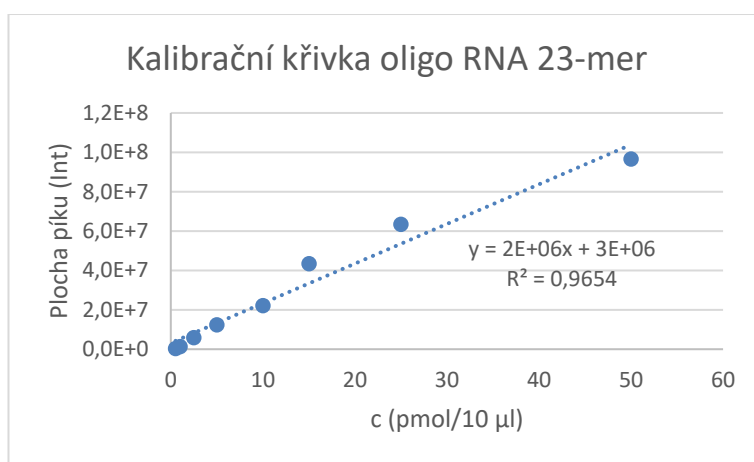


Obrázek č. 17: UREA-PAGE koncentrační řady roztoku standardu oligo RNA 23-mer. M označuje marker molekulových hmotností a hodnoty pmol označují dané množství oligo RNA 23-mer v příslušné jamce.

Tabulka č. 4: Data z UREA-PAGE koncentrační řady roztoku standardu oligo RNA 23-mer

Koncentrace oligo RNA 23-mer [pmol/10 μ l]:	Koncentrace oligo RNA 23-mer [ng/10 μ l]:	Plocha píku [Int]:	Relativní kvantifikace [%]:
50	362	96 552 800	100
25	181	63 368 320	65,63
15	109	43 449 760	45,00
10	72	22 058 400	22,85
5	36	12 286 960	12,73

Koncentrace oligo RNA 23-mer [pmol/10 μ l]:	Koncentrace oligo RNA 23-mer [ng/10 μ l]:	Plocha píku [Int]:	Relativní kvantifikace [%]:
2,5	18	5 767 120	5,97
1	7,3	1 240 560	1,28
0,5	3,6	325 280	0,34



Graf č. 1: Kalibrační křivka standardu oligo RNA 23-mer

4.2 Optimalizace času inkubace vzorku s částicemi při izolaci oligo miRNA pomocí TiO₂ materiálu

Pro potřeby optimalizace byla nejdříve provedena extrakce RNA ze vzorku buněk JURKAT (3×10^6 buněk) pomocí komerčního činidla TRIzolTM. Byly změřeny hodnoty absorbance na spektrofotometru při specifických vlnových délkách pro určení koncentrace RNA a zhodnocení její čistoty. Naměřená data jsou uvedena v Tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Data ze spektrofotometrie produktu izolace RNA z buněk pomocí činidla TRIzolTM

A (260 nm):	0,28809
A (280 nm):	0,13365
A (230 nm):	0,41922
R (260/280 nm):	2,15559
R (260/230 nm):	0,68721
c (ng/μl):	230,4722

Poměr R (260/280 nm) dosahuje hodnot kolem 2,1, na základě snížení jeho hodnoty lze usuzovat na kontaminaci proteiny. Hodnota R (260/280) u výsledku spektrofotometrie byla 2,16. Z toho můžeme usoudit, že RNA nebyla kontaminována proteiny. Druhý poměr R (260/230 nm) je citlivý indikátor celé řady kontaminantů jako jsou proteiny, detergenty či fenol. Vyskytují se u něj vyšší odchylky při kontaminaci. Hodnoty pro dsDNA se pohybují v rozmezí 2,3-2,4 a pro RNA v rozmezí 2,1-2,3 (Koetsier a Cantor, 2019). Hodnota R (260/230 nm) u výsledku spektrofotometrie byla bohužel významně snížena. Jelikož byla předtím vyloučena kontaminace proteiny, jednalo se pravděpodobně o kontaminaci složkami přítomnými v činidle TRIzolTM, kterými jsou zejména fenol a GuSCN (Simms a kol., 1993). Vzhledem k tomu, že tento vzorek je následně využíván pro testování izolace RNA, kde dochází k dalšímu přečištění, nebyla tato pravděpodobná kontaminace dále zohledňována.

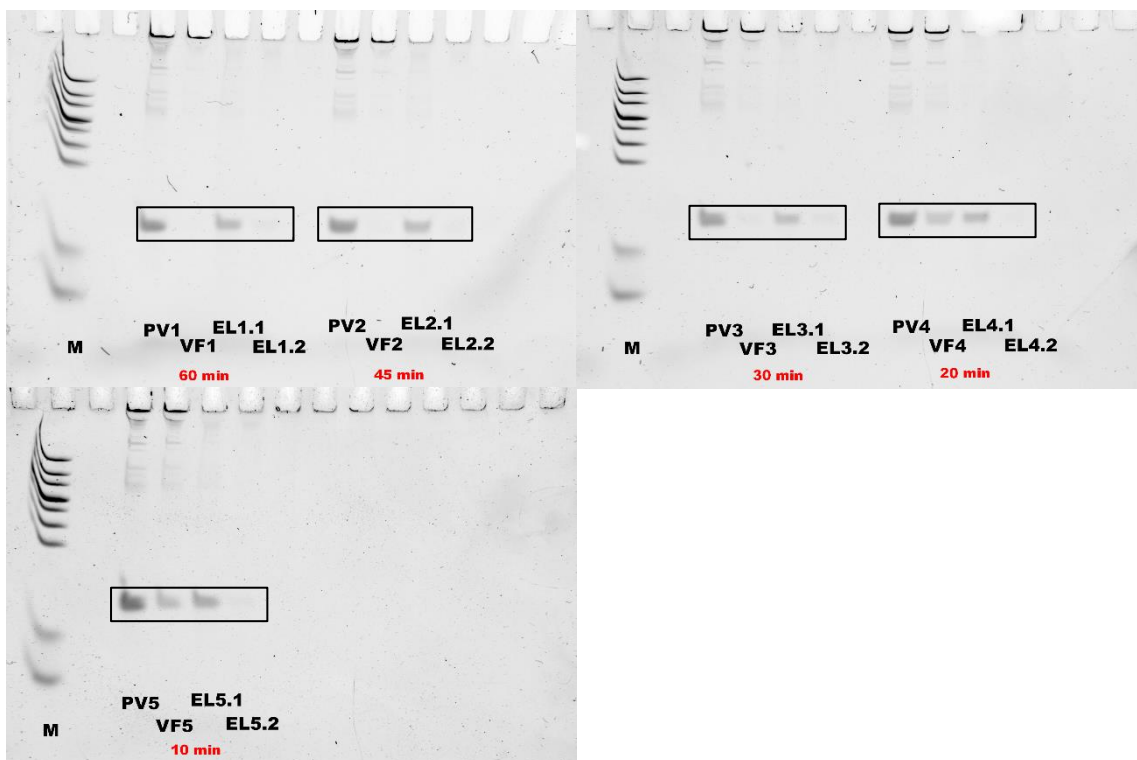
Úkolem této optimalizace bylo zkrácení času vazby miRNA na částice TiO₂, které by nepředstavovalo výrazné snížení procentuální výtěžnosti miRNA v eluční frakci.

Na základě změřené koncentrace RNA bylo vypočteno potřebné množství pro vytvoření roztoků vzorků z izolované RNA pomocí TRIzolTM činidla, oligo RNA 23-mer a vazebného roztoku. Vazebný roztok měl složení 100 mM octan sodný s pH 4,40. Koncentrace izolované RNA byla v roztoku vzorku 0,01 μg/μl a oligo RNA 23-mer byla 0,5 pmol/μl. Takto připravený roztok byl inkubován s připravenými částicemi TiO₂. Bylo připraveno celkem 5 stejných

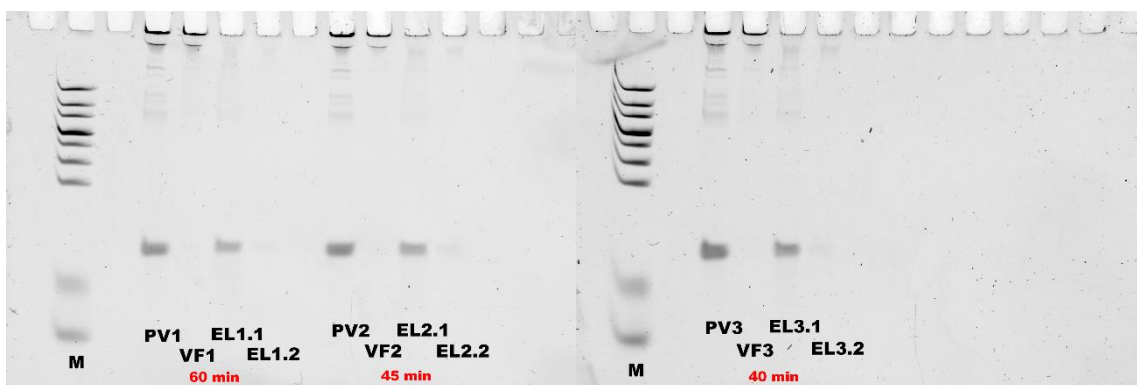
vzorků a následně u nich byly voleny odlišné časy inkubace. Celkem bylo testováno 5 časů: 60 min (původní čas), 45 min, 30 min, 20 min a 10 min. Po inkubaci byly částice promyty promývacím roztokem a oligo RNA 23-mer byla eluována. Následně byla provedena gelová elektroforéza pro detekci NK vzorků z tohoto experimentu.

Vyhodnocení získaných záznamů gelů probíhalo v programu ImageLab. Byly označeny jednotlivé pruhy oligo RNA 23-mer, které se nacházely v daných oblastech gelu na Obrázku č. 18, černé rámce. Následně byla provedena relativní kvantifikace, kdy se označil pruh oligo RNA 23-mer nacházející se ve vzorku původní frakce. Byla mu následně přiřazena hodnota 100 %. Ostatní pruhy, nacházející se ve vazebných frakcích či elucích, byly hodnoceny porovnáním jejich intenzity s pruhem představujícím 100 %. Jejich porovnáním byla získána procentuální hodnota v daném pruhu neboli vzorku. U vzorků elucí byla hodnota vynásobena ředícím faktorem, který představoval hodnotu 0,65. Vyhodnocení ostatních experimentů probíhalo analogicky.

Z Obrázku č. 18 a Tabulky č. 6, Experiment 1 vyplývá, že významnějšímu snížení procentuální výtěžnosti RNA 23-mer v eluční frakci docházelo až od inkubačního času 30 min a kratšího. Zároveň bylo pozorováno zvýšené množství RNA 23-mer ve vazebné frakci, což ukazuje, že vazba miRNA nebyla dostatečná. Na základě těchto dat byl vybrán čas 45 min, jako nejlepší poměr mezi časovými nároky celé izolace a výtěžkem RNA 23-mer. Pro potvrzení vhodnosti tohoto času byl experiment zopakován a byly již zvoleny pouze časy inkubace 60 min (pro porovnání), 45 min a nově 40 min.



Obrázek č. 18: UREA-PAGE optimalizace času inkubace vzorku s částicemi 1. M označuje marker molekulových hmotností, PV1-5 jsou původní frakce, VF1-5 jsou vazebné frakce, EL1.1-5.1 jsou první eluční frakce a EL1.2-5.2 jsou druhé eluční frakce. Červeným písmem je označen čas inkubace vzorku s částicemi. Oblasti v černém rámcí označují pruhy oligo RNA 23-mer.



Obrázek č. 19: UREA-PAGE optimalizace času inkubace vzorku s částicemi 2. M označuje marker molekulových hmotností, PV1-3 jsou původní frakce, VF1-3 jsou vazebné frakce, EL1.1-3.1 jsou první eluční frakce a EL1.2-3.2 jsou druhé eluční frakce. Červeným písmem je označen čas inkubace vzorku s částicemi.

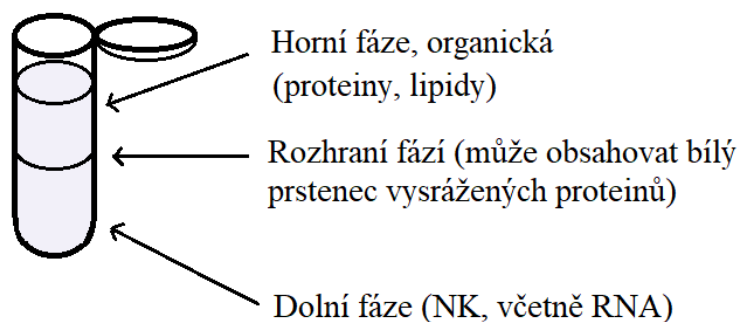
Tabulka č. 6: Data z UREA-PAGE, optimalizace času inkubace vzorku s částicemi

Název vzorku:	Čas inkubace [min]:	Vazebná frakce [%]:	Eluční frakce [%]:
Experiment 1:			
1	60	0,48	29,51
2	45	1,18	28,40
3	30	2,85	25,34
4	20	33,56	24,53
5	10	23,65	23,02
Experiment 2:			
1	60	0,70	30,89
2	45	0,94	34,39
3	40	1,21	33,64

Z Tabulky č. 6, Experiment 2 obsahující relativní kvantifikaci oligo RNA 23-mer ve vazebných a elučních frakcích podle sytosti jednotlivých pruhů v gelech a z Obrázku č. 19 vyhodnocených softwarem ImageLab vyplývá, že při izolaci se zvoleným časem 40 min jsme dosáhli relativní výtěžnosti, která byla srovnatelná s ostatními relativními výtěžnostmi při zvolení delších časů inkubace, kterými byly 60 a 45 min. Zkrácením času izolace dojde také pravděpodobně i k částečné minimalizaci působení RNAs. Na základě výsledků byl čas inkubace výchozího roztoku s částicemi TiO₂ zkrácen na 40 min.

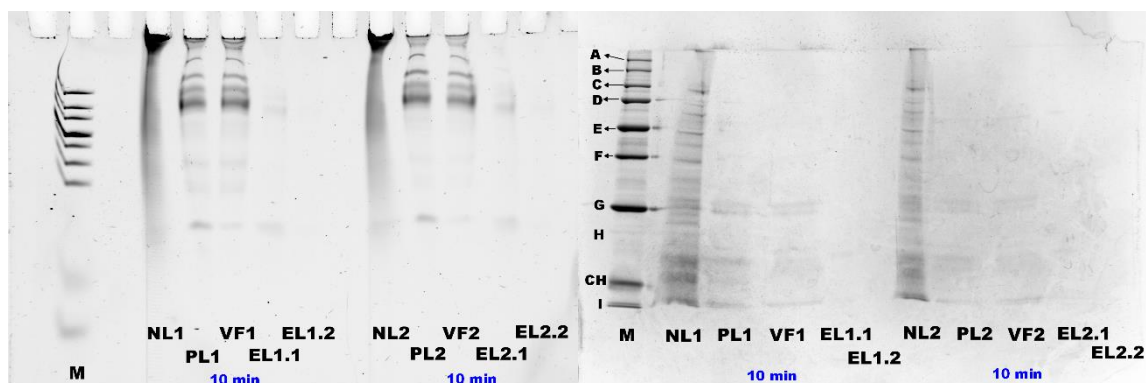
4.3 Optimalizace času lyze buněk při izolaci oligo miRNA pomocí TiO₂ materiálu

Prvotním úkolem byl test již zavedeného protokolu izolace miRNA pomocí částic TiO₂ z buněk. Test byl proveden z důvodu ověření správného fungování původního způsobu lyze buněk a pro potvrzení fungování izolace miRNA pomocí TiO₂ částic v daném prostředí. Po ověření následně došlo k jeho optimalizaci. K buňkám JURKAT (5×10^6 buněk) byl přidán lyzační roztok obsahující 100 mM octan sodný, 0,1% DEPC a 2% TRITON X-100. Dále byl k buňkám přidán roztok standardu oligo RNA 23-mer, tak aby měl koncentraci 0,5 pmol/ μ l v lyzačním roztoku. Byl zvolen původní způsob lyze buněk, který představoval 10 min inkubaci při laboratorní teplotě. Po lyzi buněk následovala centrifugace lyzátu z důvodu odstranění buněčných zbytků. Následně probíhalo přečištění RNA za pomoci NaCl a isopropanolu. Toto přečištění spočívalo v přenesení lyzátu do zkumavky s NaCl a isopropanolem, zkumavka byla následně inkubována v rotátoru, po rotátoru byla zkumavka stočena a došlo k oddělení jednotlivých fází roztoku, jak je znázorněno na Obrázku č. 20.



Obrázek č. 20: Znárodnění přečištění RNA pomocí NaCl a isopropanolu, stav po centrifugaci

Po přečištění byla odebrána spodní fáze, která byla následně pipetována k připraveným částicím TiO_2 , na kterých proběhla vazba miRNA, která byla následně eluována za pomoci elučního roztoku. Vzorky byly analyzovány pomocí gelové elektroforézy (Obrázek č. 21).

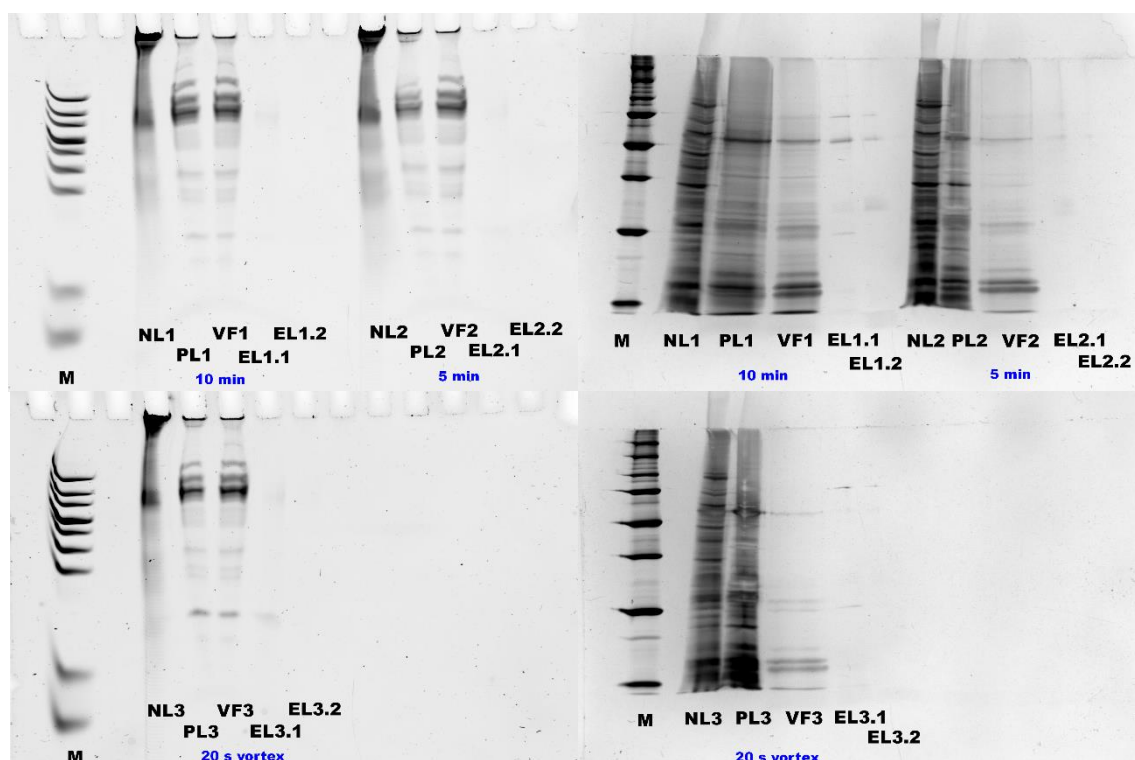


Obrázek č. 21: UREA-PAGE (vlevo) a SDS-PAGE (vpravo) optimalizace času lyze buněk, seznámení s postupem. M označuje marker molekulových hmotností, složky markeru u SDS-PAGE (A: 250 kDa, B: 150 kDa, C: 100 kDa, D: 75 kDa, E: 50 kDa, F: 37 kDa, G: 25 kDa, H: 20 kDa, CH: 15 kDa, I: 10 kDa), NL1 a NL2 jsou nepřečištěné lyzáty, PL1 a PL2 jsou přečištěné lyzáty, VF1 a VF2 jsou vazebné frakce, EL1.1 a EL2.1 jsou první eluční frakce a EL1.2 a EL2.2 jsou druhé eluční frakce.

Pro potvrzení správného fungování buněčné lyze byl zkoumán celkový obsah RNA ve vzorcích po proběhnutí buněčné lyze označených jako nepřečištěné lyzáty (NL1 a NL2) viz Obrázek č. 21 (vlevo). Z gelové elektroforézy vyplývá, že RNA byla přítomna, což značí účinnou lyzi buněk. Dále byl testován protokol izolace miRNA na TiO_2 částicích a bylo provedeno vyhodnocení relativní výtěžnosti oligo RNA 23-mer v elučních frakcích. Vyhodnocením relativní kvantifikace bylo zjištěno, že výtěžek této oligo RNA 23-mer v elučních frakcích činil 38,33 % a 46,33 %. Navíc bylo zjištěno, že většina dlouhých RNA

zůstává ve vazebné frakci. Eluční frakce je tedy od dlouhých RNA očištěna. Schopnost správného fungování dílčích kroků tohoto izolačního protokolu byla tímto potvrzena.

Dalším úkolem bylo zjistit, jestli zkrácení doby lyze buněk bude mít vliv na míru jejich dezintegrace, a tedy i na obsah RNA v nepřečištěných lyzátech. Byl znovu proveden celý izolační postup ze tří vzorků buněk JURKAT (10×10^6 buněk) stejným způsobem, ale u jednotlivých vzorků byly zvoleny odlišné časy inkubace při lyzi buněk. Jednalo se o časy: 10 min (původní), 5 min a 20 s (za současného vortexování).



Obrázek č. 22: UREA-PAGE (vlevo) a SDS-PAGE (vpravo) optimalizace času lyze buněk. M označuje marker molekulových hmotností, NL1-NL3 jsou nepřečištěné lyzáty, PL1-PL3 jsou přečištěné lyzáty, VF1-VF3 jsou vazebné frakce, EL1.1-EL3.1 jsou první eluční frakce a EL1.2-3.2 jsou druhé eluční frakce.

Znovu byl zhodnocen obsah RNA ve vzorcích nepřečištěných lyzátů. Z uvedené gelové elektroforézy NK na Obrázku č. 22 (vlevo) vyplývá, že u obou vzorků, kde byl zvolen kratší čas lyze buněk, byly buňky úspěšně lyzovány. Na základě tohoto zjištění byla zvolena jako optimální nejkratší možná doba pro lyzi buněk, tedy 20 s za současné podpory lyze buněk vortexováním.

Obrázek č. 21 a 22 také obsahují záznamy proteinové elektroforézy SDS-PAGE (vždy vlevo). Na těchto gelech je možné pozorovat, že došlo k postupnému očištění vzorku od

kontaminujících proteinů. Zároveň je množství proteinů v nepřečištěných lyzátech dalším důkazem úspěšné lyze buněk.

4.4 Optimalizace izolace miRNA pomocí TiO₂ materiálu ze vzorku lidského séra

Metoda izolace miRNA ze séra pomocí TiO₂ materiálu byla již v minulosti testována v laboratořích imunochemie. Bohužel kvůli složení vzorku obsahujícího velké množství kontaminujících proteinů a kvůli přítomnosti RNas se nepodařilo provést izolaci s uspokojivými výsledky. Sledovaná miRNA byla ve vzorku rozložena RNasami a nedocházelo k vazbě miRNA na částice TiO₂. Proto bylo nutné tuto metodu izolace optimalizovat.

Úkolem této optimalizace bylo zamezení působení RNas ve vzorku séra přidavkem vybrané látky o její vhodné koncentraci, která by zároveň vytvářela správné prostředí pro vazbu miRNA na částice TiO₂ a umožnila tak její izolaci. Dále bylo vhodné co nejvíce odstranit přítomné proteiny či jiné kontaminanty ve vzorku séra, které nebyly žádoucí pro následnou analýzu pomocí RT-PCR. Výběr, použití a ověření funkčnosti této látky byla stěžejním úkolem této diplomové práce.

Vzorky pro jednotlivé experimenty byly připravovány smícháním vzorku lidského séra, standardu oligo RNA 23-mer a vazebného roztoku o složení 100 mM octan sodný o pH 4,40. Hodnota pH 4,40 byla u vazebných a promývacích roztoků vždy dodržována. Sérum bylo ve vzorku 10× naředěné a koncentrace oligo RNA 23-mer byla 0,5 pmol/μl v daném vzorku. Vzorek byl následně přečištěn pomocí NaCl a isopropanolu. Byla odebrána spodní vodná fáze, která obsahovala přečištěnou RNA ve vazebném roztoku. Tato spodní fáze byla pipetována k částicím, na kterých proběhla vazba oligo RNA 23-mer. Po vazbě následovalo odebrání vazebné frakce a promývání promývacím roztokem o složení 100 mM octan sodný o pH 4,40. Po promytí následovala eluce za použití elučního roztoku.

Nejprve byla provedena izolace miRNA pomocí TiO₂ materiálu ze séra za použití vazebného a promývacího roztoku o původním složení bez optimalizace. Vazebný a promývací roztok v tomto případě obsahoval pouze 100 mM octan sodný. Zároveň byla provedena i druhá izolace stejným postupem, u které byl zvolen přídavek látky do vazebného roztoku TRITON X-100 a DEPC. Vazebný roztok měl v tomto případě složení 100 mM octan sodný, 0,1% DEPC a 2% TRITON X-100. Po přečištění NaCl a isopropanolem a po vazbě následovalo opět promývání. V tomto případě byly zvoleny dva promývací roztoky. Promývací roztok 1 měl složení 100 mM octan sodný, 0,1% DEPC a 2% TRITON X-100 a promývací roztok 2

obsahoval pouze 100 mM octan sodný a 0,1 % DEPC. Promývacím roztokem 2 se částice promývaly těsně před elucí, aby se omezila přítomnost detergentu TRITON X-100 a dalších přidaných látek ve vzorku eluční frakce, která by nebyla vhodná pro případnou analýzu pomocí PCR.

Složka DEPC působí jako ochrana proti RNasam (Chomczynski a Sacchi, 2006). Neiontový detergent TRITON X-100 je schopný vázat se na proteiny, například na albumin a solubilizovat je (Vlasova a kol., 2013). Proteiny se poté nachází rozptýleny v roztoku a lze je snáze vymýt promývacími kroky.

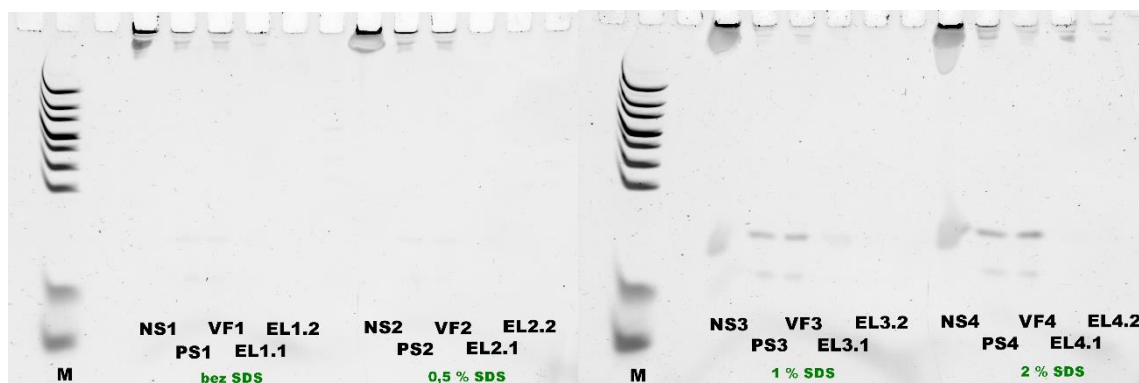
Vzorky z těchto dvou izolací byly analyzovány gelovou elektroforézou a množství oligo RNA 23-mer ve vzorcích bylo vyhodnoceno relativní kvantifikací. Porovnáním relativní kvantifikace oligo RNA 23-mer ve vzorcích mezi oběma izolacemi, bylo usouzeno, že u izolace s použitím vazebného roztoku o složení 100 mM octan sodný, 0,1% DEPC a 2% TRITON X-100 docházelo k mírnému zamezení rozkladu této RNA ve vzorcích. Na základě tohoto zjištění byl pro všechny další experimenty zvolen izolační postup s upraveným složením promývacího a vazebného roztoku: 100 mM octan sodný, 0,1% DEPC a 2% TRITON. Pro zvýšení relativní výtěžnosti bylo ovšem třeba provést další optimalizace vazby.

V dalším experimentu byl testován vliv přídavku dodecylsulfátu sodného (SDS) do vazebného roztoku, který byl zvolen z důvodů jeho ochranných účinků proti RNasam (Chomczynski a Sacchi, 2006). Byl testován v koncentracích: 0,5%; 1% a 2% SDS a jedna izolace byla provedena bez SDS pro porovnání účinku jeho přítomnosti. Vazebné roztoky u jednotlivých izolací obsahovaly 100 mM octan sodný; 0,1% DEPC, 2% TRITON X-100 a testovanou koncentraci SDS. Následný postup byl analogický jako u předchozího experimentu. Opět zde byly voleny i dva promývací roztoky jako v předchozím případě.

Na Obrázku č. 23 se nacházejí výsledky gelové elektroforézy z tohoto izolačního experimentu. Na základě viditelných pruhů oligo RNA 23-mer ve vzorcích nepřečištěných, přečištěných sér a vazebných frakcích gelu u izolačního postupu s použitím 1% SDS a 2% SDS viz Obrázek č. 23 vpravo, bylo určeno, že přídavek SDS je vhodný pro ochranu miRNA proti RNasam, což částečně splňuje cíl optimalizace. Dále byla u těchto dvou izolačních experimentů s 1% SDS a 2% SDS hodnocena relativní výtěžnost oligo RNA 23-mer v elučních frakcích (vzorky označené jako EL3.1 a EL4.1) a relativní obsah oligo RNA 23-mer ve vazebných frakcích (vzorky VF3 a VF4) pro zhodnocení dosažení dalšího cíle optimalizace, čímž bylo vytvoření vhodného prostředí pro izolaci.

Relativní kvantifikace byla vztažena ke vzorkům přečištěných sér (PS1 a PS2), které představovaly hodnotu 100 %. Na základě výsledků uvedených v Tabulce č. 7 bylo pozorováno

vysoké zastoupení oliga RNA 23-mer ve vazebných frakcích a zároveň se však prakticky žádná nenacházela v eluční frakci. To znamená, že SDS o koncentraci 1% a vyšší sice zabrání rozkladu vzorku RNAsami, ale zároveň potlačuje vazbu miRNA na TiO₂ částice. Proto byla nutná další optimalizace obměnou této látky za vhodnější.



Obrázek č. 23: UREA-PAGE optimalizace prostředí vazby miRNA na částice TiO₂, různé koncentrace SDS. M označuje marker molekulových hmotností, NS1-NS4 jsou nepřečištěná séra, PS1-PS4 jsou přečištěná séra, VF1-VF4 jsou vazebné frakce, EL1.1-EL4.1 jsou první eluční frakce a EL1.2-EL4.2 jsou druhé eluční frakce.

Tabulka č. 7: Data z UREA-PAGE, přidavek SDS, různé koncentrace

Extrakce – isopropanol, octan, různé koncentrace SDS:			
Přidaná látka a její koncentrace:	Vazebná frakce [%]:	Eluční frakce [%]:	Pozn.:
1% SDS	94,79	19,85	ztráta ve VF
2% SDS	120,22	4,58	ztráta ve VF

Na základě zjištění, že SDS potlačoval vazbu v prostředí 100 mM octanu sodného, 0,1% DEPC a 2% TRITON X-100 jsme se pokusili zachovat jeho přítomnost ve vazebném roztoku, ale změnit podmínky tak, aby byla vazba miRNA na TiO₂ úspěšná.

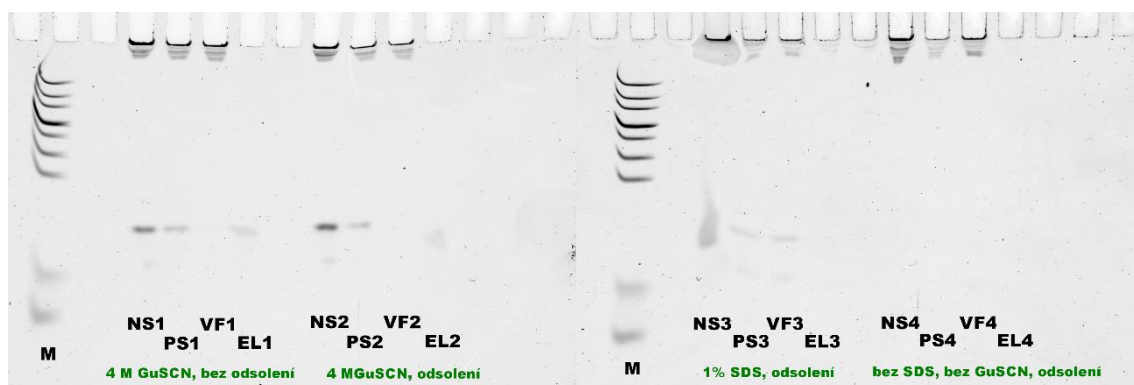
Změněné podmínky spočívaly v obměně octanu sodného přítomného ve vazebných a promývacích roztocích za MES a obměně isopropanolu potřebného při přečištění RNA za aceton. První dvě izolace probíhaly při stejném složení vazebného a promývacího roztoku: 100 mM MES; 0,1% DEPC; 2% TRITON X-100. Vzorky připravené s tímto vazebným roztokem byly následně přečištěny jeden pomocí NaCl a isopropanolu a druhý pomocí NaCl a acetonu. Po přečištění následovala vazba na TiO₂ částicích, promývání pomocí promývacího roztoku 1 o stejném složení jako vazebný roztok a promývání roztokem 2 o složení 100 mM MES; 0,1% DEPC. Druhé dva vzorky byly připraveny analogicky jako předchozí dva, jen s tím rozdílem,

že vazebný roztok obsahoval přídavek 1% SDS. Následně byla provedena gelová elektroforéza všech získaných vzorků ze čtyř izolací. Bohužel nebyla zaznamenána změna v úspěšnosti vazby miRNA na částice nebo ve snížení rozkladu RNA ve vzorcích.

Jelikož přechod na MES roztok jako základní složku vazebného roztoku a na aceton pro přečištění nebyl úspěšný bylo rozhodnuto, že přečištění RNA ze séra bude probíhat dále opět s využitím isopropanolu a jako základní prostředí pro vazbu bude nadále 100 mM octan sodný. Bude nutné tedy najít jiný vhodný inhibitor RNAs.

Na základě rešerže byl zvolen přídavek GuSCN do vazebného a promývacího roztoku v koncentraci 4 M. Jednalo se o látku často využívanou při extrakcích RNA (Tan a Yiap, 2009), která denaturuje proteiny, tedy i RNasy a chrání tak RNA před jejich účinkem (Jacobsen a kol., 2011, Chirgwin a kol., 1979). Bylo tedy očekáváno, že nedojde k rozkladu vzorku a zároveň nebude ovlivněna kvalita izolace miRNA na TiO₂ částicích.

Mimo standardní postup izolace s GuSCN byl také zkoumán vliv odsolení vzorku před celým izolačním postupem, které bylo prováděno na odsolovacích kolonkách SPIN-Pure™ G-25 COLUMNS. Odsolení vzorku séra bylo prováděno z důvodu odstranění přirozeně se vyskytujících fosfátů v séru (Haap a kol., 2006). Materiály na bázi TiO₂ vykazují vysokou afinitu k fosfátové kostře RNA (Jimenez a kol., 2018) a obecně tedy k fosfátovým skupinám (Tingholm a Larsen, 2016). Byl předpoklad, že fosfáty přítomné v séru soutěží společně s miRNA o vazebné místo na TiO₂ částicích. Fosfáty tímto brání částečně nebo úplně vazbě miRNA na částice. Odsolením se zbavíme fosfátů a zabráníme tak této fosfátové kompetici. Odsolené sérum bylo upraveno tak, aby ve výsledném roztoku vzorku, který byl následně přidáván k částicím byl buď 4 M GuSCN nebo 1% SDS a pro porovnání také vzorek bez přídavku dalších reagensů. Byly tak připraveny 3 typy vzorků shrnuté v Tabulce č. 8.



Obrázek č. 24: UREA-PAGE optimalizace prostředí vazby miRNA na částice TiO₂, GuSCN, SDS, odsolení. M označuje marker molekulových hmotností, NS1-NS4 jsou nepřečištěná séra, PS1-PS4 jsou přečištěná séra, VF1-VF4 jsou vazebné frakce, EL1-EL4 jsou první eluční frakce a druhé eluce z úspory času neprobíhaly.

Tabulka č. 8: Data z UREA-PAGE, přidavek 4 M GuSCN, 1% SDS a odsolení

Extrakce – isopropanol, GuSCN, SDS, odsolení:				
Odsolení:	Přidaná látka a její koncentrace:	Vazebná frakce [%]:	Eluční frakce [%]:	Pozn.:
×	4 M GuSCN	8,43	51,19	
√	4 M GuSCN	5,46	53,36	rozložení v EL
√	1% SDS	98,48	8,20	ztráty VF
√	bez SDS, bez GuSCN	73,62	35,61	rozložení ve všech vzorcích

Z gelové elektroforézy viz Obrázek č. 24 bylo zjištěno, že u vzorků získaných při použití izolačního protokolu modifikovaného pouze předchozím odsolením dochází k rozkladu RNasami ve všech vzorcích. Na základě toho byl tento postup zavrhnut. Následně byl hodnocen přidavek 1% SDS do vazebného roztoku s předchozím odsolením. U izolačního postupu s použitím přídatku 1% SDS docházelo ke značným ztrátám oligo RNA 23-mer ve vazebné frakci, jak již bylo zjištěno dříve při provedení izolace se stejným přídatkem bez odsolení. Odsolení tedy nemělo na zlepšení vazby vliv a začalo se uvažovat, že fosfáty danou vazbu miRNA na částice TiO₂ v tomto případě neblokuje.

Podle viditelných pruhů oligo RNA 23-mer ve vzorcích nepřečištěného, přečištěného séra a eluce na Obrázku č. 24 u izolačního postupu s použitím přídatku 4 M GuSCN bylo usouzeno, že tento přídatek je vhodný pro ochranu miRNA před RNasami, což splňuje cíle optimalizace.

Dále byl hodnocen vliv odsolení u těchto izolačních postupů se zvolenými přídatky 4 M GuSCN. Při porovnání relativních výtěžků RNA 23-mer v elučních frakcích vyplývá, že mírně lepšího relativního výtěžku bylo dosaženo u izolačního postupu s odsolením. Při pohledu na tento vzorek na gelu viz Obrázek č. 24 (vlevo) na vzorky elučních frakcí (EL2) byl tento pruh RNA 23-mer izolovaný při použití postupu s odsolením na nižší pozici než u vzorku bez odsolení (EL1). Pruh byl také více rozptýlený, což značí o nízké kvalitě izolované oligo RNA 23-mer. Bylo usouzeno, že zde dochází k rozkladu RNasami. Tento rozklad byl pravděpodobně způsoben prodloužením času práce se vzorkem přidaným odsolovacím krokem a RNasy měly tak více času tento vzorek rozložit, což je nežádoucí. Bylo rozhodnuto, že odsolení nemá

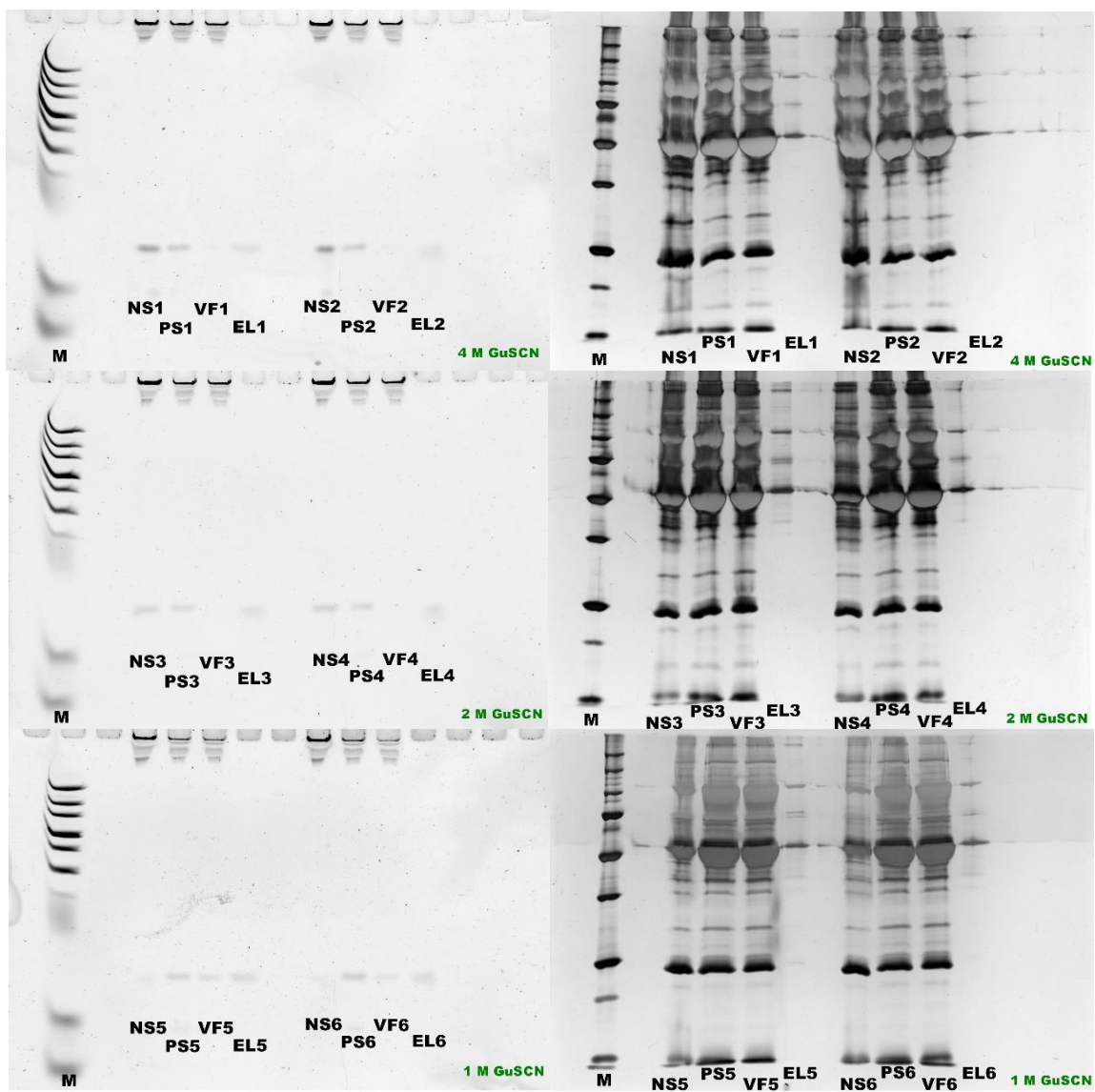
výrazný pozitivní vliv a jeho provádění je nadbytečné. Přídavek látky do vazebného roztoku splňující všechny dílčí cíle optimalizace byl GuSCN o koncentraci 4 M.

Cílem dalšího experimentu byla optimalizace koncentrace přidávaného GuSCN. Pro toto ověření byly zvoleny přídavky GuSCN do vazebného a promývacího roztoku o koncentracích 4 M, 2 M a 1 M. Každý promývací a vazebný roztok tedy obsahoval 100 mM octan sodný, 0,1% DEPC, 2% TRITON X-100 a zvolenou koncentrací GuSCN. Jako u předchozích experimentů bylo provedeno přečištění pomocí NaCl a isopropanolu a následná izolace miRNA na TiO₂ částicích. Byla provedena gelová elektroforéza pro detekci NK při použití odlišných koncentrací GuSCN, která je na Obrázku č. 25. (vlevo). Pro porovnání úspěšnosti vazby miRNA na TiO₂ částice byly vyhodnoceny relativní výtěžnosti oligo RNA 23-mer v elučních frakcích a byla provedena relativní kvantifikace oligo RNA 23-mer i ve vazebných frakcích. Data jsou uvedeny v Tabulce č. 9.

Podle vyhodnocených dat byly jako vhodné koncentrace přídavku GuSCN vyhodnoceny 4 M a 2 M. U použití 2 M koncentrace GuSCN byla vazba miRNA na částice lepší a docházelo k vyšší výtěžnosti RNA 23-mer a to i přesto, že porovnáním vzorků těchto dvou variant koncentrací na gelové elektroforéze se zdá, že u použití koncentrace 2 M dochází u vzorků k většímu rozkladu RNA 23-mer než u koncentrace 4 M. Poté se může zdát, že je procentuální výtěžnost v eluční frakci u 2 M GuSCN vyšší, z důvodu vyššího rozkladu ve vzorku (PS), který představuje 100 % a ostatní frakce jsou k němu vztahovány.

Přídavkem GuSCN do vazebného a promývacího roztoku bylo dosaženo cíle optimalizace. Oligo RNA 23-mer se přestala ve vzorku rozkládat RNasami a díky vhodnému prostředí docházelo k její vazbě na částice TiO₂ a k následné izolaci. Nejvhodnější koncentrací tohoto přídavku byla koncentrace 2 M, kdy docházelo k nejvyšší relativní výtěžnosti v eluční frakci a k nejmenším ztrátám ve vazebné frakci. Optimalizované složení vazebného a promývacího roztoku bylo: 100 mM octan sodný, 0,1% DEPC, 2% TRITON X-100, 2 M GuSCN.

Komplikací zůstává, že u zvolených koncentrací 4 M a 2 M nedocházelo k oddělení fází v roztoku při přečištění pomocí NaCl a isopropanolu, čímž docházelo ke ztrátám RNA ještě před samotnou izolací na TiO₂ částicích. U koncentrace 1 M sice k oddělení fází docházelo, ale tato koncentrace byla vyhodnocena jako nevhodná. Na eliminaci těchto ztrát při přečištění pomocí NaCl a isopropanolu by bylo dobré se v budoucnu zaměřit.



Obrázek č. 25: UREA-PAGE (vlevo) a SDS-PAGE (vpravo) optimalizace prostředí vazby miRNA na částice TiO₂, isopropanol, octan, různé koncentrace GuSCN. M označuje marker molekulových hmotností, NS1-NS6 jsou nepřečištěná séra, PS1-PS6 jsou přečištěná séra, VF1-VF6 jsou vazebné frakce, EL1-EL6 jsou první eluční frakce a druhé eluce z úspory času neprobíhaly.

Tabulka č. 9: Data z UREA-PAGE, různé koncentrace GuSCN

Extrakce – isopropanol, octan, různé koncentrace GuSCN:				
Přídavek specifické látky a jeho koncentrace:	Duplikát:	Vazebná frakce [%]:	Eluční frakce [%]:	Pozn.:
4 M GuSCN	1.	8,32	39,55	
	2.	11,81	49,12	
2 M GuSCN	1.	5,03	72,52	
	2.	5,56	68,16	
1 M GuSCN	1.	56,87	64,04	ztráta ve VF
	2.	36,20	50,89	

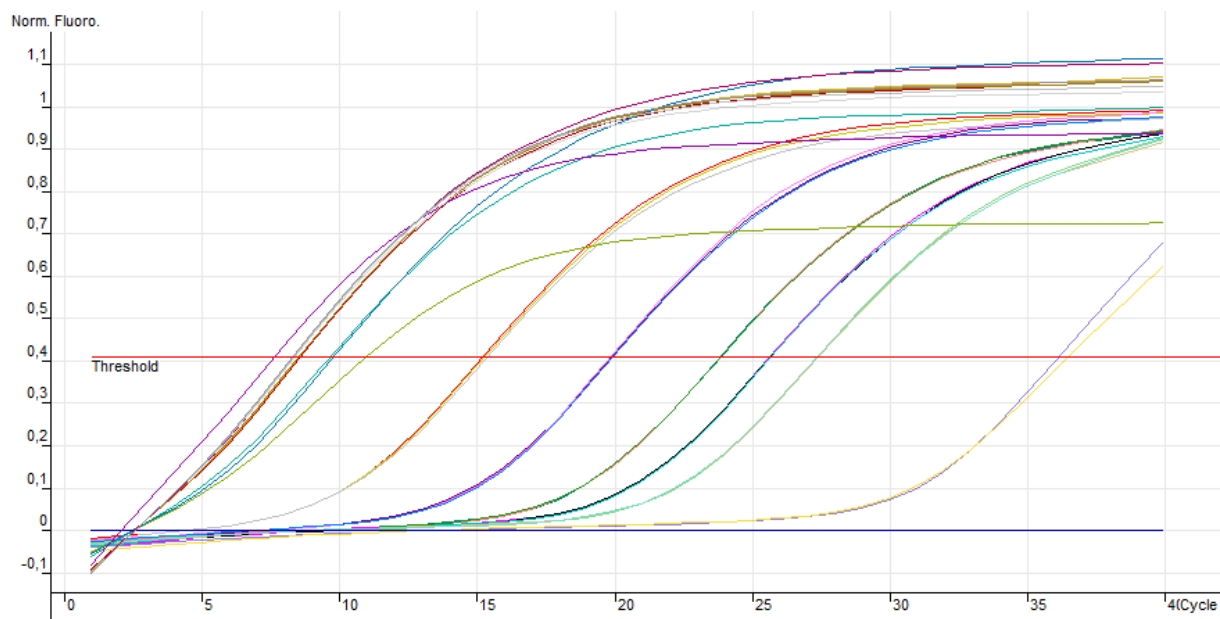
4.5 PCR elučních frakcí z izolace oligo miRNA pomocí TiO₂ materiálu

Na základě analýzy pomocí gelové elektroforézy vzorků séra s optimalizovaným izolačním postupem pro izolaci miRNA s použitím přídavků GuSCN o koncentracích 2 M a 4 M jsme se rozhodly tyto vzorky analyzovat i na PCR. Byla zvolena metoda qRT-PCR, která se běžně využívá pro detekci a kvantifikaci miRNA z důvodu její vysoké citlivosti a specifity (Gan a kol., 2011). Nevýhoda této metody spočívá v tom, že je náchylná k inhibici některými látkami ze vzorku, které mohou ovlivnit citlivost metody natolik, že dojde k falešně nižším nebo negativním výsledkům. Existuje celá řada PCR inhibitorů a řadí se mezi ně například proteasy, detergenty, fenol a další (Schrauder a kol., 2012). Proto je důležité, aby ze vzorku byly tyto kontaminanty odstraněny během přečištění a izolace miRNA.

Analýza pomocí PCR byla zvolena právě z důvodu ověření, zda je optimalizovaný izolační protokol kompatibilní s touto metodou detekce a nedochází k případné inhibici PCR. Tato kompatibilita je důležitá při použití optimalizovaného postupu izolace v reálných vzorcích bez přídavku standardu, kdy koncentrace miRNA je velmi nízká a je pro její analýzu nutná citlivá metoda.

Nejprve byla vytvořena koncentrační řada standardu oligo RNA 23-mer (vzorky označené jako ST1-ST5). Tato koncentrační řada byla zpracovávána spolu se vzorky elucí stejným způsobem. Analyzovány byly eluční frakce obou duplikátů získaných zmíněným optimalizovaným izolačním postupem. Jednalo se o 4 M GuSCN: vzorky r1 a r2 a 2 M GuSCN: vzorky r1 a r2. Negativní kontrolu představoval roztok DEPC-T vody. Dále byla provedena





reverzní transkripce všech vzorků i s negativní kontrolou. Z každého vzorku po reverzní transkripci byl připraven směsný roztok, který obsahoval mimo jiné reagentie potřebné pro PCR. Roztok byl připraven v trojnásobném množství a poté byl rozdělen pro každý vzorek na triplikáty. Následovala samotná PCR všech triplikátů vzorků. Průběh PCR je zobrazen na Obrázku č. 26.

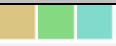


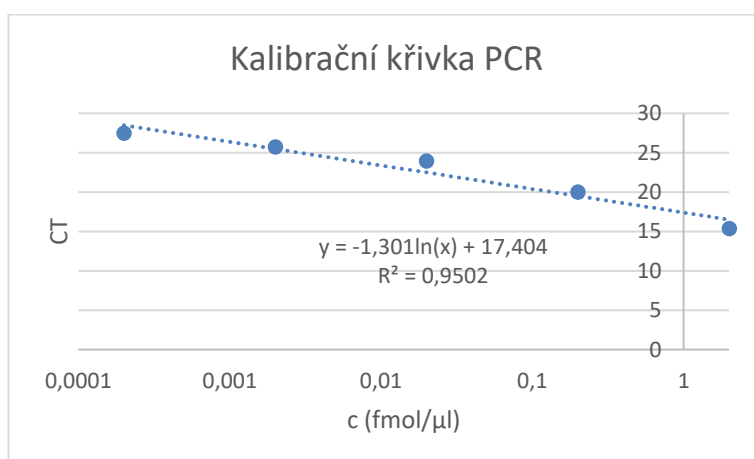
Obrázek č. 26: Průběh PCR

Nejprve byla vyhodnocena získaná data z koncentrační řady standardů oligo RNA 23-mer viz Tabulka č. 10 získaná metodou PCR. Byla vytvořena kalibrační křivka viz Graf č. 2 z naměřených a zprůměrovaných hodnot CT vztažených ke koncentracím jednotlivých roztoků z koncentrační řady:

Tabulka č. 10: Data pro kalibrační křivku PCR

Označení:	Koncentrace standardu oligo RNA 23-mer [fmol/ μ l]:	Hodnoty CT v triplikátech:			Průměr hodnot CT \pm s (směrodatná odchylka):
ST1 	$2 \cdot 10^0$	15,28	15,35	15,45	$15,36 \pm 0,09$
ST2 	$2 \cdot 10^{-1}$	19,96	19,95	20,04	$19,98 \pm 0,05$
ST3 	$2 \cdot 10^{-2}$	23,90	23,93	23,94	$23,92 \pm 0,02$
ST4 	$2 \cdot 10^{-3}$	25,73	25,75	25,76	$25,75 \pm 0,02$




Označení:	Koncentrace standardu oligo RNA 23-mer [fmol/μl]:	Hodnoty CT v triplikátech:			Průměr hodnot CT ± s (směrodatná odchylka):
ST5 	$2 \cdot 10^{-4}$	27,49	27,43	27,45	$27,46 \pm 0,03$





Graf č. 2: Kalibrační křivka PCR

Z rovnice kalibrační křivky a ze zprůměrovaných hodnot CT vzorků byla vypočtena koncentrace analyzovaných vzorků viz Tabulka č. 11. Pouze u dvou analyzovaných vzorků bylo možné využít hodnoty všech 3 technických replikátů. V jednom případě nebyla platná hodnota analyzována vůbec a v druhém případě byla jedna hodnota příliš rozdílná od druhých dvou replikátů (označeno červeně).

Tabulka č. 11: Data, vyhodnocení PCR

Označení:	Naměřené hodnoty CT v triplikátech:			Průměr hodnot CT ± s (směrodatná odchylka):	Průměrná koncentrace RNA 23-mer ± s [pmol/μl]:
NK 	-	36,18	36,53	$36,36 \pm 0,25$	$3,10 \cdot 10^{-10} \pm 0,59 \cdot 10^{-10}$
4 M GuSCN, r1 	8,62	8,67	8,60	$8,63 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,02$
4 M GuSCN, r2 	11,05	9,75	9,88	$9,82 \pm 0,09$	$0,22 \pm 0,02$

Označení:	Naměřené hodnoty CT v triplicátech:			Průměr hodnot CT ± s (směrodatná odchylka):	Průměrná koncentrace oligo RNA 23-mer ± s [pmol/μl]:
2 M GuSCN, r1 	-	7,71	8,42	8,07 ± 0,50	0,88 ± 0,33
2 M GuSCN, r2 	8,45	8,41	8,37	8,41 ± 0,04	0,66 ± 0,02

I tak se ve všech vzorcích podařilo přítomnost oligo RNA 23-mer prokázat i přes to, že se hodnoty vzorků nacházely mimo kalibrační rozmezí a tím nebylo přesné určení koncentrace věrohodné. K určení přesné hodnoty koncentrace by bylo potřeba experiment zopakovat s naředěnými vzorky, což již z časových důvodů nebylo možné. Z pohledu kvality je však průkaz miRNA dostatečně věrohodný, i vzhledem k její vysoké koncentraci ve vzorku, a navržený postup izolace by bylo možné použít pro izolaci miRNA z lidského séra i s následnou detekcí pomocí PCR.

Dodatečným úkolem bylo porovnat získaná data s daty získanými pomocí gelové elektroforézy z důvodu ověření správnosti naměřených PCR dat. Porovnávaná data jsou v Tabulce č. 12 označeny modře.

Tabulka č. 12: Porovnání PCR dat s daty z UREA-PAGE

Název vzorku:	Koncentrace oligo RNA 23- mer před izolací [pmol/μl]:	Koncentrace oligo RNA 23- mer po izolaci [pmol/μl] – data z PCR:	Koncentrace oligo RNA 23- mer po izolaci [pmol/μl] – data z UREA-PAGE:	Relativní výtěžnost oligo RNA 23-mer [%] – data z UREA-PAGE:
4 M GuSCN, r1	0,5	0,55	0,20	40
4 M GuSCN, r2		0,22	0,25	49
2 M GuSCN, r1		0,88	0,37	73
2 M GuSCN, r2		0,66	0,34	68

Na základě porovnání hodnot je zřejmé, že i přesto, že u PCR se jedná o odhad hodnoty z důvodu příliš vysoké koncentrace oligo RNA 23-mer v eluční frakci vykazují obě měření

podobný trend. V porovnání 4 M GuSCN a 2 M GuSCN vychází vyšší koncentrace, a tedy i výtěžnost u 2 M GuSCN. Tato koncentrace je tedy vhodnější a byla zařazena do finálního optimalizovaného protokolu.

5 Závěr

Úkolem této práce byla optimalizace již zavedených laboratorních metod pro izolaci miRNA z buněk či ze séra za pomoci TiO₂ částic. Jednalo se většinou o zkrácení některých inkubačních kroků, které by nemělo vliv na účinnost prováděné izolace. Důvodem zkrácení inkubačních kroků bylo urychlení práce se vzorky obsahující RNA a tím snížení rizika rozkladu vzorku RNAsami.

Prvním optimalizovaným krokem byla doba inkubace částic se vzorkem obsahujícím standard oligo RNA 23-mer a RNA izolovanou pomocí činidla TRIzol™ z buněčného lyzátu. Tato doba činila v původním protokolu 60 min. Následně byly provedeny jednotlivé izolace s použitím zkrácených časů inkubace. Jednotlivé izolace byly následně mezi sebou porovnávány s využitím analýzy vzorků na gelové elektroforéze. Na základě vyhodnocení gelové elektroforézy relativní kvantifikací byly získány hodnoty relativní výtěžnosti izolace a výskytu oligo RNA 23-mer ve vazebných frakcích. Z výsledků je zřejmé, že minimální dobou nutnou pro inkubaci vzorku s TiO₂ částicemi je 40 min. Tato doba nezpůsobovala ztrátu miRNA prostřednictvím vazebné frakce, ke které docházelo při zvolení kratších časů inkubace.

Dále byl optimalizován krok buněčné lyze při izolaci miRNA z buněk. Původní čas lyze buněk byl 10 min. Zkoumalo se, jestli zkrácením doby lyze nedojde ke snížení obsahu celkové RNA ve vzorku. Bylo dokázáno, že zkrácením této doby z 10 min na 20 s za současného mechanického rozrušení buněk pomocí vortexu, nemělo na obsah RNA ve vzorku žádný negativní vliv. Obě uvedené analýzy již znamenají celkovou dobu úspory času o 30 min, což sníží možnost rozkladu miRNA RNAsami v průběhu izolačního procesu.

Závěrečným a nejdůležitějším krokem byla optimalizace prostředí vazby miRNA na částice TiO₂ při izolaci ze séra s přidavkem oligo RNA 23-mer standardu. Z důvodu přítomných RNAs ve vzorku séra docházelo ke značnému rozkladu miRNA. Druhým problémem byla nedokonalá vazba miRNA na TiO₂ částice. Kvůli této nedokonalé vazbě a rozkladu RNA RNAsami nebylo téměř možné miRNA izolovat.

Na základě těchto problémů byly testovány látky o různých koncentracích, které se přidávaly k vazebnému a promývacímu roztoku za účelem zamezení rozkladu miRNA ve vzorku a zároveň za účelem pozitivního vlivu na vazbu. Nakonec optimální přídavek látky představoval GuSCN o koncentraci 2 M. Ta na rozdíl oproti koncentraci 4 M poskytovala vyšší výtěžnosti v eluční frakci. Při použití přídavku 2 M GuSCN ve vazebném a promývacím roztoku bylo možné prokázat přítomnost miRNA nejen pomocí gelové elektroforézy, ale i pomocí PCR. Tím byla potvrzena úspěšná izolace miRNA ze vzorku séra. Bohužel pomocí

PCR analýzy se již nepodařilo tuto miRNA přesně kvantifikovat z důvodu příliš vysoké koncentrace miRNA ve vzorku eluční frakce, která překročila horní mez kalibračního rozmezí. Průkaz miRNA v eluční frakci byl i přes to věrohodný, pouze pro přesné určení koncentrace by bylo vhodné tuto závěrečnou analýzu zopakovat, což již v našem případě nebylo možné.

6 Zdroje

- (1) ALLNÉR, Olof a Lennart NILSSON. Nucleotide modifications and tRNA anticodon–mRNA codon interactions on the ribosome. *RNA*. **2011**, 17(12), 2177–2188. ISSN 1355-8382, 1469-9001.
- (2) ARROYO, Jason D., John R. CHEVILLET, Evan M. KROH, Ingrid K. RUF, Colin C. PRITCHARD, Donald F. GIBSON, Patrick S. MITCHELL, Christopher F. BENNETT, Era L. POGOSOVA-AGADJANYAN, Derek L. STIREWALT, Jonathan F. TAIT a Muneesh TEWARI. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2011**, 108(12), 5003–5008. ISSN 0027-8424, 1091-6490.
- (3) ASAGA, Sota, Christine KUO, Tung NGUYEN, Marilou TERPENNING, Armando E GIULIANO a Dave SB HOON. Direct Serum Assay for MicroRNA-21 Concentrations in Early and Advanced Breast Cancer. *Clinical Chemistry*. **2011**, 57(1), 84–91. ISSN 0009-9147.
- (4) BAGGISH, Aaron L., Andrew HALE, Rory B. WEINER, Gregory D. LEWIS, David SYSTROM, Francis WANG, Thomas J. WANG a Stephen Y. CHAN. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *The Journal of Physiology*. **2011**, 589(16), 3983–3994. ISSN 1469-7793.
- (5) BAYRAKTAR, Recep, Katrien Van ROOSBROECK a George A. CALIN. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. *Molecular Oncology*. **2017**, 11(12), 1673–1686. ISSN 1878-0261.
- (6) BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2006**, 73, 495–504. ISSN 1432-0614.
- (7) BISHOP, D. H. L., J. R. CLAYBROOK a S. SPIEGELMAN. Electrophoretic separation of viral nucleic acids on polyacrylamide gels. *Journal of Molecular Biology*. **1967**, 26, 373–387. ISSN 0022-2836.
- (8) BITTNER, Michael, Patricia KUPFERER a Charles F. MORRIS. Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Analytical Biochemistry*. **1980**, 102, 459–471. ISSN 0003-2697.

- (9) BLACKBURN, G. Michael, Michael J. GAIT, David LOAKES a David M. WILLIAMS. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. 3. vyd. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, **2006**, 503, ISBN 978-1-78262-577-3.
- (10) BOECKEL, Jes-Niels, Claudia E THOMÉ, David LEISTNER, Andreas M ZEIHNER, Stephan FICHTLSCHERER a Stefanie DIMMELER. Heparin Selectively Affects the Quantification of MicroRNAs in Human Blood Samples. *Clinical Chemistry*. **2013**, 59(7), 1125–1127. ISSN 0009-9147.
- (11) BOOKLAND, Markus, Min TANG-SCHOMER, Eileen GILLAN a Antonina KOLMAKOVA. Circulating serum oncologic miRNA in pediatric juvenile pilocytic astrocytoma patients predicts mural nodule volume. *Acta Neurochirurgica*. **2018**, 160, 1571–1581. ISSN 0942-0940.
- (12) BOOM, R., C. J. SOL, M. M. SALIMANS, C. L. JANSEN, P. M. Wertheim-van DILLEN a J. van der NOORDAA. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. **1990**, 28(3), 495–503. ISSN 0095-1137, 1098-660X.
- (13) BRUCE, Ian J. a Tapas SEN. Surface Modification of Magnetic Nanoparticles with Alkoxysilanes and Their Application in Magnetic Bioseparations. *Langmuir*. **2005**, 21(15), 7029–7035. ISSN 0743-7463.
- (14) BRUINS, Andries P. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*. **1998**, 794, 345–357. ISSN 0021-9673.
- (15) BUCKINGHAM, Lela. *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications*. 3. vyd. Philadelphia: F. A. Davis Company, **2019**, 560. ISBN 978-0-8036-9954-0.
- (16) BUCHHOLZ, M. Circulating RNAs in medical diagnostics and as disease-relevant biomarkers. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2016**, 71(1), 17–20.
- (17) CAMACHO, Cristel V., Ramesh CHOUDHARI a Shrikanth S. GADAD. Long noncoding RNAs and cancer, an overview. *Steroids*. **2018**, 133, 93–95. ISSN 0039-128X.
- (18) CAVKA, Jasmina Hafizovic, Søren JAKOBSEN, Unni OLSBYE, Nathalie GUILLOU, Carlo LAMBERTI, Silvia BORDIGA a Karl Petter LILLERUD. A New Zirconium Inorganic Building Brick Forming Metal Organic Frameworks with Exceptional Stability. *Journal of the American Chemical Society*. **2008**, 130(42), 13850–13851. ISSN 0002-7863.

- (19) CISSELL, Kyle A. a Sapna K. DEO. Trends in microRNA detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2009**, 394, 1109–1116. ISSN 1618-2650.
- (20) COLEMAN, R. E. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treatment Reviews*. **2001**, 27, 165–176. ISSN 0305-7372.
- (21) CONN, Graeme L a David E DRAPER. RNA structure. *Current Opinion in Structural Biology*. **1998**, 8(3), 278–285. ISSN 0959-440X.
- (22) CONTI, Laura De, Marco BARALLE a Emanuele BURATTI. Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *WIREs RNA*. **2013**, 4(1), 49–60. ISSN 1757-7012.
- (23) D’ALESSANDRA, Yuri, Paolo DEVANNA, Federica LIMANA, Stefania STRAINO, Anna DI CARLO, Paola G. BRAMBILLA, Mara RUBINO, Maria Cristina CARENA, Liana SPAZZAFUMO, Marco DE SIMONE, Barbara MICHELI, Paolo BIGLIOLI, Felice ACHILLI, Fabio MARTELLI, Stefano MAGGIOLINI, Giancarlo MARENZI, Giulio POMPILIO a Maurizio C. CAPOGROSSI. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European Heart Journal*. **2010**, 31, 2765–2773. ISSN 0195-668X.
- (24) DANA, Genya V., Todd KUIKEN, David REJESKI a Allison A. SNOW. Four steps to avoid a synthetic-biology disaster. *Nature*. **2012**, 483(7387), 29. ISSN 1476-4687.
- (25) DANA, Hassan, Ghanbar Mahmoodi CHALBATANI, Habibollah MAHMOODZADEH, Rezvan KARIMLOO, Omid REZAIEAN, Amirreza MORADZADEH, Narges MEHMANDOOST, Fateme MOAZZEN, Ali MAZRAEH, Vahid MARMARI, Mohammad EBRAHIMI, Mohammad Menati RASHNO, Saeid Jan ABADI a Elahe GHARAGOUZLO. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *International Journal of Biomedical Science*. **2017**, 13(2), 48–57.
- (26) DASÍ, Francisco, Salvador LLEDÓ, Eduardo GARCÍA-GRANERO, Roberto RIPOLL, Maribel MARUGÁN, Mar TORMO, Javier GARCÍA-CONDE a Salvador F. ALIÑO. Real-Time Quantification in Plasma of Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) mRNA: A Simple Blood Test to Monitor Disease in Cancer Patients. *Laboratory Investigation*. **2001**, 81(5), 767–769. ISSN 1530-0307.
- (27) DELIGEORGIEV, Todor G., Stefka KALOYANOVA a Juan J. VAQUERO. Intercalating Cyanine Dyes for Nucleic Acid Detection. *Recent Patents on Materials Science*. **2009**, 2(1), 1–26.
- (28) DHAHBI, Joseph M., Stephen R. SPINDLER, Hani ATAMNA, Dario BOFFELLI a David I.K. MARTIN. Deep Sequencing of Serum Small RNAs Identifies Patterns of 5’

- tRNA Half and YRNA Fragment Expression Associated with Breast Cancer. *Biomarkers in Cancer*. **2014**, 6, 37–47. ISSN 1179-299X.
- (29) DHAHBI, Joseph, Yury O. NUNEZ LOPEZ, Augusto SCHNEIDER, Berta VICTORIA, Tatiana SACCON, Krish BHARAT, Thaddeus MCCLATCHEY, Hani ATAMNA, Wojciech SCIERSKI, Pawel GOLUSINSKI, Wojciech GOLUSINSKI a Michal M. MASTERNAK. Profiling of tRNA Halves and YRNA Fragments in Serum and Tissue From Oral Squamous Cell Carcinoma Patients Identify Key Role of 5' tRNA-Val-CAC-2-1 Half. *Frontiers in Oncology*. **2019**, 9(959), 1–16. ISSN 2234-943X.
- (30) DHANOA, Jasdeep Kaur, Ram Saran SETHI, Ramneek VERMA, Jaspreet Singh ARORA a Chandra Sekhar MUKHOPADHYAY. Long non-coding RNA: its evolutionary relics and biological implications in mammals: a review. *Journal of Animal Science and Technology*. **2018**, 60(1), 25. ISSN 2055-0391.
- (31) DI LEVA, Gianpiero a Carlo M CROCE. miRNA profiling of cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*. **2013**, 23, 3–11. ISSN 0959-437X.
- (32) DIRIBARNE, Gaelle a Olivier BENSAUDE. 7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor. *RNA Biology*. **2009**, 6(2), 122–128. ISSN 1547-6286.
- (33) DO, J. H. a D.-K. CHOI. cDNA Labeling Strategies for Microarrays Using Fluorescent Dyes. *Engineering in Life Sciences*. **2007**, 7(1), 26–34. ISSN 1618-2863.
- (34) DU, Xiang-Yun, Qing LI, Guan WU a Su CHEN. Multifunctional Micro/Nanoscale Fibers Based on Microfluidic Spinning Technology. *Advanced Materials*. **2019**, 31(1903733), 1–38. ISSN 1521-4095.
- (35) DUDAS, Paul L., Ryan M. PELIS, Eldon J. BRAUN a J. Larry RENFRO. Transepithelial urate transport by avian renal proximal tubule epithelium in primary culture. *Journal of Experimental Biology*. **2005**, 208, 4305–4315. ISSN 0022-0949, 1477-9145.
- (36) ELDH, Maria, Jan LÖTVALL, Carina MALMHÄLL a Karin EKSTRÖM. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods. *Molecular Immunology*. **2012**, 50, 278–286. ISSN 0161-5890.
- (37) EMAUS, Miranda N., Marcelino VARONA, Derek R. EITZMANN, Shu-An HSIEH, Victoria R. ZEGER a Jared L. ANDERSON. Nucleic acid extraction: Fundamentals of sample preparation methodologies, current advancements, and future endeavors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2020**, 130, 115985. ISSN 0165-9936.

- (38) EPSTEIN, Jason R, Israel BIRAN a David R WALT. Fluorescence-based nucleic acid detection and microarrays. *Analytica Chimica Acta*. **2002**, 469, 3–36. ISSN 0003-2670.
- (39) FDA-NIH BIOMARKER WORKING GROUP. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US), **2016**, 1–53, ID: NBK326791.
- (40) FENG, Xiaojun, Xin LIU, Qingming LUO a Bi-Feng LIU. Mass spectrometry in systems biology: An overview. *Mass Spectrometry Reviews*. **2008**, 27, 635–660. ISSN 1098-2787.
- (41) FITRIAWAN, Akbar Satria, Aprilia Indra KARTIKA, Siti Nur CHASANAH, Teguh ARYANDONO a Sofia Mubarika HARYANA. Expression of Circulating MicroRNA-141 in Epithelial Ovarian Cancer. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. **2020**, 27(6), 27–38. ISSN 1394-195X.
- (42) FLEISCHHACKER, Michael. Biology of Circulating mRNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **2006**, 1075(1), 40–49. ISSN 1749-6632.
- (43) GAN, Yin-bo, Zhong-jing ZHOU, Li-jun AN, Sheng-jie BAO a Brian G FORDE. A Comparison Between Northern Blotting and Quantitative Real-Time PCR as a Means of Detecting the Nutritional Regulation of Genes Expressed in Roots of *Arabidopsis thaliana*. *Agricultural Sciences in China*. **2011**, 10(3), 335–342. ISSN 1671-2927.
- (44) GAO, Xiang, Boon-Huan TAN, Richard J. SUGRUE a Kai TANG. MALDI Mass Spectrometry for Nucleic Acid Analysis. In: Zongwei CAI a Shuying LIU, Applications of MALDI-TOF Spectroscopy. Berlin, Heidelberg: Springer, **2013**, Topics in Current Chemistry, 55–77. ISBN 978-3-642-35665-0.
- (45) GARCÍA, Vanesa, José M. GARCÍA, Cristina PEÑA, Javier SILVA, Gemma DOMÍNGUEZ, Yolanda LORENZO, Raquel DIAZ, Pablo ESPINOSA, Javier García DE SOLA, Blanca CANTOS a Félix BONILLA. Free circulating mRNA in plasma from breast cancer patients and clinical outcome. *Cancer Letters*. **2008**, 263, 312–320. ISSN 0304-3835.
- (46) GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase chain reaction. *The Journal of Investigative Dermatology*. **2013**, 133, 1–4. ISSN 1523-1747.
- (47) GENG, YJ, SL XIE, Q LI, J MA a GY WANG. Large Intervening Non-Coding RNA HOTAIR is Associated with Hepatocellular Carcinoma Progression. *Journal of International Medical Research*. **2011**, 39, 2119–2128. ISSN 0300-0605.
- (48) GILLINGS, Michael R. a Mark WESTOBY. DNA technology and evolution of the Central Dogma. *Trends in Ecology & Evolution*. **2014**, 29(1), 1–2. ISSN 01695347.

- (49) GIRAY, Burcu Gurer, Gurol EMEKDAS, Seda TEZCAN, Mahmut ULGER, Mehmet Sami SERIN, Orhan SEZGIN, Engin ALTINTAS a Eyup Naci TIFTIK. Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Molecular Biology Reports*. **2014**, 41(7), 4513–4519. ISSN 0301-4851.
- (50) GLINGE, Charlotte, Sebastian CLAUSS, Kim BODDUM, Reza JABBARI, Javad JABBARI, Bjarke RISGAARD, Philipp TOMSITS, Bianca HILDEBRAND, Stefan KÄÄB, Reza WAKILI, Thomas JESPERSEN a Jacob TFELT-HANSEN. Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs – Pre-Analytic Methodological Considerations. *PLOS ONE*. **2017**, 12(2), 1–16. ISSN 1932-6203.
- (51) GONG, Lingzhi. Comparing ion-pairing reagents and counter anions for ion-pair reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry analysis of synthetic oligonucleotides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2015**, 29, 2402–2410. ISSN 1097-0231.
- (52) GOPINATH, Subash C. B., Renu WADHWA a Penmetcha K. R. KUMAR. Expression of Noncoding Vault RNA in Human Malignant Cells and Its Importance in Mitoxantrone Resistance. *Molecular Cancer Research*. **2010**, 8(11), 1536–1546. ISSN 1541-7786, 1557-3125.
- (53) GRASEDIECK, S., N. SCHÖLER, M. BOMMER, J. H. NIESS, H. TUMANI, A. ROUHI, J. BLOEHDORN, P. LIEBISCH, D. MERTENS, H. DÖHNER, C. BUSKE, C. LANGER a Florian KUCHENBAUER. Impact of serum storage conditions on microRNA stability. *Leukemia*. **2012**, 26(11), 2414–2416. ISSN 1476-5551.
- (54) GREEN, Michael R. a Joseph SAMBROOK. Purification of Total RNA from Mammalian Cells and Tissues. *Cold Spring Harbor Protocols*. **2020**, 1, 16–20. ISSN 1940-3402, 1559-6095.
- (55) GUPTA, Rajnish A., Nilay SHAH, Kevin C. WANG, Jeewon KIM, Hugo M. HORLINGS, David J. WONG, Miao-Chih TSAI, Tiffany HUNG, Pedram ARGANI, John L. RINN, Yulei WANG, Pius BRZOSKA, Benjamin KONG, Rui LI, Robert B. WEST, Marc J. VAN DE VIJVER, Saraswati SUKUMAR a Howard Y. CHANG. Long noncoding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. **2010**, 464(7291), 1071–1076. ISSN 0028-0836.
- (56) GUZ, Malgorzata, Witold JELENIEWICZ, Marek CYBULSKI, Joanna KOZICKA, Jacek KURZEPA a Agnieszka MADRO. Serum miR-210-3p can be used to differentiate between patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Biomedical Reports*. **2021**, 14(10), 1–6. ISSN 2049-9434.

- (57) GYÖRGY, Bence, Tamás G. SZABÓ, Mária PÁSZTÓI, Zsuzsanna PÁL, Petra MISJÁK, Borbála ARADI, Valéria LÁSZLÓ, Éva PÁLLINGER, Erna PAP, Ágnes KITTEL, György NAGY, András FALUS a Edit I. BUZÁS. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **2011**, 68, 2667–2688. ISSN 1420-9071.
- (58) HAAP, M., E. HELLER, C. THAMER, O. TSCHRITTER, N. STEFAN a A. FRITSCHÉ. Association of serum phosphate levels with glucose tolerance, insulin sensitivity and insulin secretion in non-diabetic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*. **2006**, 60, 734–739. ISSN 0954-3007.
- (59) HAINES, Alicia M., Shanan S. TOBE, Hilton J. KOBUS a Adrian LINACRE. Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis. *Electrophoresis*. **2015**, 36(6), 941–944. ISSN 1522-2683.
- (60) HAMILTON, Tc, Ag SMITH, Ca GRIFFIN a Rj HENDERSON. Ribonucleic-Acid in Plasma from Normal Adults and Multiple-Myeloma Patients. *Clinical Chemistry*. **1979**, 25(10), 1774–1779. ISSN 0009-9147.
- (61) HARCOURT, Emily M., Anna M. KIETRYS a Eric T. KOOL. Chemical and structural effects of base modifications in messenger RNA. *Nature*. **2017**, 541(7637), 339–346. ISSN 1476-4687.
- (62) HASHAD, Doaa, Amany ELBANNA, Abeer IBRAHIM a Gihan KHEDR. Evaluation of the Role of Circulating Long Non-Coding RNA H19 as a Promising Novel Biomarker in Plasma of Patients with Gastric Cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. **2016**, 30, 1100–1105. ISSN 1098-2825.
- (63) HELLING, Robert B., Howard M. GOODMAN a Herbert W. BOYER. Analysis of Endonuclease R·EcoRI Fragments of DNA from Lambdoid Bacteriophages and Other Viruses by Agarose-Gel Electrophoresis. *Journal of Virology*. **1974**, 14(5), 1235–1244. ISSN 0022-538X, 1098-5514.
- (64) HOLLAND, Nina T, Martyn T SMITH, Brenda ESKENAZI a Maria BASTAKI. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. **2003**, 543, 217–234. ISSN 1383-5742.
- (65) HOLMES, Diana L. a Nancy C. STELLWAGEN. Estimation of polyacrylamide gel pore size from Ferguson plots of linear DNA fragments. II. Comparison of gels with different crosslinker concentrations, added agarose and added linear polyacrylamide. *Electrophoresis*. **1991**, 12(9), 612–619. ISSN 1522-2683.

- (66) HU, Zhi-Yan, Xiao-Yan WANG, Wen-bin GUO, Lin-Ying XIE, Yu-qi HUANG, Yan-Ping LIU, Li-Wei XIAO, Sheng-Nan LI, Hui-Fang ZHU, Zu-Guo LI a Heping KAN. Long non-coding RNA MALAT1 increases AKAP-9 expression by promoting SRPK1-catalyzed SRSF1 phosphorylation in colorectal cancer cells. *Oncotarget*. **2016**, 7(10), 11733–11743. ISSN 1949-2553.
- (67) HUANG, Chunyu, Shuiying TANG, Dong SHEN, Xiangzhao LI, Li LIANG, Yanqing DING a Bihong XU. Circulating plasma exosomal miRNA profiles serve as potential metastasis-related biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*. **2021**, 21(168), 1–12. ISSN 1792-1074.
- (68) HUBER, Christian G. a Herbert OBERACHER. Analysis of nucleic acids by on-line liquid chromatography–Mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. **2001**, 20, 310–343. ISSN 1098-2787.
- (69) HUNTER, Melissa Piper, Noura ISMAIL, Xiaoli ZHANG, Baltazar D. AGUDA, Eun Joo LEE, Lianbo YU, Tao XIAO, Jeffrey SCHAFER, Mei-Ling Ting LEE, Thomas D. SCHMITTGEN, S. Patrick NANA-SINKAM, David JARJOURA a Clay B. MARSH. Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLOS ONE*. **2008**, 3(11, e3694), 1–11. ISSN 1932-6203.
- (70) CHATTERJEE, Anirban, Paul L. MIRER, Elvira ZALDIVAR SANTAMARIA, Catherine KLAPPERICH, Andre SHARON a Alexis F. SAUER-BUDGE. RNA Isolation from Mammalian Cells Using Porous Polymer Monoliths: An Approach for High-Throughput Automation. *Analytical Chemistry*. **2010**, 82(11), 4344–4356. ISSN 0003-2700.
- (71) CHEN, Jie, Yan LI, Qiupeng ZHENG, Chunyang BAO, Jian HE, Bin CHEN, Dongbin LYU, Biqiang ZHENG, Yu XU, Ziwen LONG, Ye ZHOU, Huiyan ZHU, Yanong WANG, Xianghuo HE, Yingqiang SHI a Shenglin HUANG. Circular RNA profile identifies circPVT1 as a proliferative factor and prognostic marker in gastric cancer. *Cancer Letters*. **2017a**, 388, 208–219. ISSN 0304-3835.
- (72) CHEN, Qingjuan, Chenjing ZHU, Yingying JIN, Xiaomin SI, Wan JIAO, Wenjing HE, Wei MAO, Ming LI a Guomin LUO. Plasma Long Non-Coding RNA RP11-438N5.3 as a Novel Biomarker for Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Management and Research*. **2020**, 12, 1513–1521. ISSN 1179-1322.
- (73) CHEN, Shijun, Tianwen LI, Qianfu ZHAO, Bingxiu XIAO a Junming GUO. Using circular RNA hsa_circ_0000190 as a new biomarker in the diagnosis of gastric cancer. *Clinica Chimica Acta*. **2017b**, 466, 167–171. ISSN 0009-8981.

- (74) CHEN, Weijie, Fengfeng CAI, Bei ZHANG, Zeinab BAREKATI a Xiao Yan ZHONG. The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers. *Tumor Biology*. **2013**, 34, 455–462. ISSN 1423-0380.
- (75) CHEN, Xi, Yi BA, Lijia MA, Xing CAI, Yuan YIN, Kehui WANG, Jigang GUO, Yujing ZHANG, Jiangning CHEN, Xing GUO, Qibin LI, Xiaoying LI, Wenjing WANG, Yan ZHANG, Jin WANG, Xueyuan JIANG, Yang XIANG, Chen XU, Pingping ZHENG, Juanbin ZHANG, Ruiqiang LI, Hongjie ZHANG, Xiaobin SHANG, Ting GONG, Guang NING, Jun WANG, Ke ZEN, Junfeng ZHANG a Chen-Yu ZHANG. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*. **2008**, 18, 997–1006. ISSN 1748-7838.
- (76) CHEN, Xu qi, Hervé BONNEFOI, Marie-Françoise PELTE, Jacqueline LYAUTEY, Christine LEDERREY, Sina MOVAREKHI, Pierre SCHAEFFER, Hugh E. MULCAHY, Pierre MEYER, Maurice STROUN a Philippe ANKER. Telomerase RNA as a Detection Marker in the Serum of Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*. **2000**, 6, 3823–3826. ISSN 1078-0432, 1557-3265.
- (77) CHENG, Jia, Jun-Ming GUO, Bing-Xiu XIAO, Ying MIAO, Zhen JIANG, Hui ZHOU a Qing-Ning LI. piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clinica Chimica Acta*. **2011**, 412, 1621–1625. ISSN 0009-8981.
- (78) CHENG, Xiao Jiao, Jia Cheng LIN a Shui Ping TU. Etiology and Prevention of Gastric Cancer. *Gastrointestinal Tumors*. **2016**, 3(1), 25–36. ISSN 2296-3774, 2296-3766.
- (79) CHIANG, Chen-Li, Ching-Shan SUNG, Ting-Feng WU, Chuh-Yean CHEN a Chiung-Yuen HSU. Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells. *Journal of Chromatography B*. **2005**, 822, 54–60. ISSN 1570-0232.
- (80) CHIRGWIN, John M., Alan E. PRZYBYLA, Raymond J. MACDONALD a William J. RUTTER. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. **1979**, 18(24), 5294–5299. ISSN 0006-2960, 1520-4995.
- (81) CHOMCZYNSKI, Piotr a Nicoletta SACCHI. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. **1987**, 162, 156–159. ISSN 0003-2697.
- (82) CHOMCZYNSKI, Piotr a Nicoletta SACCHI. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*. **2006**, 1, 581–585. ISSN 1750-2799.

- (83) CHOUDHURI, Supratim. Small noncoding RNAs: Biogenesis, function, and emerging significance in toxicology. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. **2010**, 24(3), 195–216. ISSN 1099-0461.
- (84) CHU, Chia-Ying a Tariq M. RANA. Small RNAs: Regulators and guardians of the genome. *Journal of Cellular Physiology*. **2007**, 213(2), 412–419. ISSN 1097-4652.
- (85) CHUNGUE, Eliane, Claudine ROCHE, Marie-France LEFEVRE, P. BARBAZAN a Suzanne CHANTEAU. Ultra-rapid, simple, sensitive, and economical silica method for extraction of dengue viral RNA from clinical specimens and mosquitoes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology*. **1993**, 40, 142–145. ISSN 1096-9071.
- (86) ILIEV, Robert, Michal FEDORKO, Tana MACHACKOVA, Hana MLCOCHOVA, Marek SVOBODA, Dalibor PACIK, Jan DOLEZEL, Michal STANIK a Ondrej SLABY. Expression Levels of PIWI-interacting RNA, piR-823, Are Deregulated in Tumor Tissue, Blood Serum and Urine of Patients with Renal Cell Carcinoma. *Anticancer Research*. **2016**, 36, 6419–6423. ISSN 0250-7005, 1791-7530.
- (87) IORIO, Marilena V., Manuela FERRACIN, Chang-Gong LIU, Angelo VERONESE, Riccardo SPIZZO, Silvia SABBIONI, Eros MAGRI, Massimo PEDRIALI, Muller FABBRI, Manuela CAMPIGLIO, Sylvie MÉNARD, Juan P. PALAZZO, Anne ROSENBERG, Piero MUSIANI, Stefano VOLINIA, Italo NENCI, George A. CALIN, Patrizia QUERZOLI, Massimo NEGRINI a Carlo M. CROCE. MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Research*. **2005**, 65(16), 7065–7070. ISSN 0008-5472, 1538-7445.
- (88) ISHITANI, Ryuichiro, Osamu NUREKI, Nobukazu NAMEKI, Norihiro OKADA, Susumu NISHIMURA a Shigeyuki YOKOYAMA. Alternative Tertiary Structure of tRNA for Recognition by a Posttranscriptional Modification Enzyme. *Cell*. **2003**, 113(3), 383–394. ISSN 0092-8674.
- (89) IVAN, Mircea, Adrian L. HARRIS, Fabio MARTELLI a Ritu KULSHRESHTHA. Hypoxia response and microRNAs: no longer two separate worlds. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **2008**, 12(5a), 1426–1431. ISSN 1582-4934.
- (90) JACOBSEN, Nana, Jens ERIKSEN a Peter Stein NIELSEN. Efficient Poly(A)+ RNA Selection Using LNA Oligo(T) Capture. In: Henrik NIELSEN, *RNA: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, **2011**, *Methods in Molecular Biology*, 43–51. ISBN 978-1-59745-248-9.
- (91) JI, Ting, Zhi-Guo ZHENG, Feng-Mei WANG, Li-Jian XU, Lu-Feng LI, Qi-Hui CHENG, Jiang-Feng GUO a Xian-Feng DING. Differential microRNA Expression by

- Solexa Sequencing in the Sera of Ovarian Cancer Patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. **2014**, 15(4), 1739–1743. ISSN 1513-7368.
- (92) JIMENEZ, Luis A., Marissa A. GIONET-GONZALES, Sabrina SEDANO, Jocelyn G. CARBALLO, Yomara MENDEZ a Wenwan ZHONG. Extraction of microRNAs from biological matrices with titanium dioxide nanofibers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2018**, 410(3), 1053–1060. ISSN 1618-2650.
- (93) JONSSON, J., M. SANDBERG a S. WOLD. The evolutionary transition from uracil to thymine balances the genetic code. *Journal of Chemometrics*. **1996**, 10(2), 163–170. ISSN 0886-9383.
- (94) JOSEFSEN, Knud a Henrik NIELSEN. Northern Blotting Analysis. In: Henrik NIELSEN, ed. *RNA: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, **2011**, 87–105, ISBN 978-1-59745-248-9.
- (95) JUNG, Eun-Jung, Libero SANTARPIA, Juyeon KIM, Francisco J. ESTEVA, Erica MORETTI, Aman U. BUZDAR, Angelo Di LEO, Xiao-Feng LE, Robert C. BAST, Soon-Tae PARK, Lajos PUSZTAI a George A. CALIN. Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer*. **2012**, 118(10), 2603–2614. ISSN 1097-0142.
- (96) KIM, K., I. JUTOORU, G. CHADALAPAKA, G. JOHNSON, J. FRANK, R. BURGHARDT, S. KIM a S. SAFE. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. *Oncogene*. **2013**, 32, 1616–1625. ISSN 1476-5594.
- (97) KIM, Young-Kook, Jinah YEO, Boseon KIM, Minju HA a V. Narry KIM. Short Structured RNAs with Low GC Content Are Selectively Lost during Extraction from a Small Number of Cells. *Molecular Cell*. **2012**, 46, 893–895. ISSN 10972765.
- (98) KISS, Tamás. Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *The EMBO Journal*. **2001**, 20(14), 3617–3622. ISSN 0261-4189.
- (99) KITAZAWA, Sohei, Riko KITAZAWA, Hiroshi TAMADA a Sakan MAEDA. Promoter structure of human sonic hedgehog gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. **1998**, 1443(3), 358–363. ISSN 0167-4781.
- (100) KOETSIER, Giron, Eric CANTOR, **2019**. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. In: Bioke.com [online] 2019 [cit. 20. 7. 2021]. Dostupné z: <https://www.bioke.com/support/appnotes/1345/a-practical-guide-to-analyzing-nucleic-acid-concentration-and-purity-with-microvolume-spectrophotometers.html>.

- (101) KONG, William, Hua YANG, Lili HE, Jian-jun ZHAO, Domenico COPPOLA, William S. DALTON a Jin Q. CHENG. MicroRNA-155 Is Regulated by the Transforming Growth Factor β /Smad Pathway and Contributes to Epithelial Cell Plasticity by Targeting RhoA. *Molecular and Cellular Biology*. **2008**, 28(22), 6773–6784. ISSN 0270-7306, 1098-5549.
- (102) KOPRESKI, Michael S., Floyd A. BENKO, Larry W. KWAK a Christopher D. GOCKE. Detection of Tumor Messenger RNA in the Serum of Patients with Malignant Melanoma. *Clinical Cancer Research*. **1999**, 5(8), 1961–1965. ISSN 1078-0432, 1557-3265.
- (103) KOWALSKI, Madzia P. a Torsten KRUDE. Functional roles of non-coding Y RNAs. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **2015**, 66, 20–29. ISSN 1357-2725.
- (104) ŁACZMAŃSKA, Izabela, Karolina PESZ a Łukasz ŁACZMAŃSKI. Application of Selected Methods Based on the Polymerase Chain Reaction in Medical Molecular Diagnostics. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. **2009**, 18(1), 85–92. ISSN 1899-5276.
- (105) LAWRIE, Charles H., Shira GAL, Heather M. DUNLOP, Beena PUSHKARAN, Amanda P. LIGGINS, Karen PULFORD, Alison H. BANHAM, Francesco PEZZELLA, Jacqueline BOULTWOOD, James S. WAINSCOAT, Christian S. R. HATTON a Adrian L. HARRIS. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*. **2008**, 141(5), 672–675. ISSN 1365-2141.
- (106) LEHMAN, Niles. RNA in evolution. *WIREs RNA*. **2010**, 1, 202–213. ISSN 1757-7012.
- (107) LEKCHNOV, Evgeny A., Ivan A. ZAPOROZHCHENKO, Evgeny S. MOROZKIN, Olga E. BRYZGUNOVA, Valentin V. VLASSOV a Pavel P. LAKTIONOV. Protocol for miRNA isolation from biofluids. *Analytical Biochemistry*. **2016**, 499, 78–84. ISSN 0003-2697.
- (108) LI, Cheng-Long, Hui NIE, Ming WANG, Li-Ping SU, Jian-Fang LI, Ying-Yan YU, Min YAN, Qin-Long QU, Zheng-Gang ZHU a Bing-Ya LIU. microRNA-155 is downregulated in gastric cancer cells and involved in cell metastasis. *Oncology Reports*. **2012**, 27, 1960–1966. ISSN 1021-335X.
- (109) LI, Wei a Kangcheng RUAN. MicroRNA detection by microarray. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2009**, 394, 1117–1124. ISSN 1618-2650.

- (110) LI, Xue-Bo, Qing-Shan WANG, Yu FENG, Shu-Hua NING, Yuan-Ying MIAO, Ye-Quan WANG a Hong-Wei LI. Magnetic bead-based separation of sperm from buccal epithelial cells using a monoclonal antibody against MOSPD3. *International Journal of Legal Medicine*. **2014**, 128, 905–911. ISSN 1437-1596.
- (111) LIU, Cong, Shifan WU, Yibo YAN, Ying DONG, Xiantao SHEN a Chuixiu HUANG. Application of magnetic particles in forensic science. *Trends in Analytical Chemistry*. **2019**, 121, 1–10. ISSN 0165-9936.
- (112) LIVAK, Kenneth J. a Thomas D. SCHMITTGEN. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*. **2001**, 25, 402–408. ISSN 1046-2023.
- (113) LLEDÓ, S. M., E. GARCIA-GRANERO, F. DASÍ, R. RIPOLI, S. A. GARCÍA, A. CERVANTES a S. F. ALIÑO. Real time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in patients with colorectal cancer. *Colorectal Disease*. **2004**, 6, 236–242. ISSN 1463-1318.
- (114) LO, Kwok-Wai, YM Dennis LO, Sing-Fai LEUNG, Yuen-Shan TSANG, Lisa YS CHAN, Philip J JOHNSON, N Magnus HJELM, Joseph CK LEE a Dolly P HUANG. Analysis of Cell-free Epstein-Barr Virus-associated RNA in the Plasma of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma. *Clinical Chemistry*. **1999**, 45(8), 1292–1294. ISSN 0009-9147.
- (115) LU, Jun, Gad GETZ, Eric MISKA, Ezequiel ALVAREZ-SAAVEDRA, Justin LAMB, David PECK, E. SWEET-CORDERO, Benjamin EBERT, Ros MAK, Adolfo FERRANDO, James DOWNING, Tyler JACKS, H HORVITZ a Todd GOLUB. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. **2005**, 435, 834–8.
- (116) LU, Minghon. Circular RNA: functions, applications and prospects. *ExRNA*. **2020**, 2(1), 1–7. ISSN 2398-0060.
- (117) MAIZ, Alejandra M. a Pooja BHAT. Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Uveitis. *Advances in Ophthalmology and Optometry*. **2018**, 3, 389–406. ISSN 2452-1760.
- (118) MAMINEZHAD, Hamidreza, Sharareh GHANADIAN, Katayoon PAKRAVAN, Ehsan RAZMARA, Fatemeh ROUHOLLAH, Majid MOSSAHEBI-MOHAMMADI a Sadegh BABASHAH. A panel of six-circulating miRNA signature in serum and its potential diagnostic value in colorectal cancer. *Life Sciences*. **2020**, 258, 1–10. ISSN 0024-3205.

- (119) MANDEL, P. a P. METAIS. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales*. **1948**, 142(3–4), 241–243. ISSN 0037-9026.
- (120) MAR-AGUILAR, Fermín, Jorge A. MENDOZA-RAMÍREZ, Ismael MALAGÓN-SANTIAGO, Perla K. ESPINO-SILVA, Sandra K. SANTUARIO-FACIO, Pablo RUIZ-FLORES, Cristina RODRÍGUEZ-PADILLA a Diana RESÉNDEZ-PÉREZ. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers. *Disease Markers*. **2013**, 34(3), 163–169. ISSN 0278-0240.
- (121) MARTINS, R., J. A. QUEIROZ a F. SOUSA. Ribonucleic acid purification. *Journal of Chromatography A*. **2014**, 1355, 1–14. ISSN 0021-9673.
- (122) MATSUBARA, Kenichi a Yasuyuki TAKAGI. Electrophoretic separation of single-stranded deoxyribonucleic acid from double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **1962**, 55, 389–392. ISSN 0926-6550.
- (123) MATTICK, John S. a Igor V. MAKUNIN. Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*. **2006**, 15(1), R17–R29. ISSN 0964-6906.
- (124) MENG, Jiaojiao, Yuzhi WANG, Yigang ZHOU, Jing CHEN, Xiaoxiao WEI, Rui NI, Ziwei LIU a Fangting XU. A composite consisting of a deep eutectic solvent and dispersed magnetic metal-organic framework (type UiO-66-NH₂) for solid-phase extraction of RNA. *Microchimica Acta*. **2019**, 187(58), 1–9. ISSN 1436-5073.
- (125) MIGNONE, Flavio, Carmela GISSI, Sabino LIUNI a Graziano PESOLE. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology*. **2002**, 3(3), 1–10. ISSN 1474-760X.
- (126) MINCHIN, Steve a Julia LODGE. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays in Biochemistry*. **2019**, 63, 433–456. ISSN 0071-1365.
- (127) MITCHELL, Patrick S., Rachael K. PARKIN, Evan M. KROH, Brian R. FRITZ, Stacia K. WYMAN, Era L. POGOSOVA-AGADJANYAN, Amelia PETERSON, Jennifer NOTEBOOM, Kathy C. O'BRIANT, April ALLEN, Daniel W. LIN, Nicole URBAN, Charles W. DRESCHER, Beatrice S. KNUDSEN, Derek L. STIREWALT, Robert GENTLEMAN, Robert L. VESSELLA, Peter S. NELSON, Daniel B. MARTIN a Muneesh TEWARI. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2008**, 105(30), 10513–10518. ISSN 0027-8424, 1091-6490.
- (128) MITSUNAGA, Shigeki, Kayoko FUJIMURA, Chieko MATSUMOTO, Rieko SHIOZAWA, Shinichi HIRAKAWA, Kazunori NAKAJIMA, Kenji TADOKORO a Takeo JUJI. High-throughput HBV DNA and HCV RNA detection system using a

- nucleic acid purification robot and real-time detection PCR: its application to analysis of posttransfusion hepatitis. *Transfusion*. **2002**, 42, 100–106. ISSN 0041-1132, 1537-2995.
- (129) MIURA, Norimasa, Yoshiko MAEDA, Takamasa KANBE, Hiroaki YAZAMA, Yohei TAKEDA, Reina SATO, Tomoe TSUKAMOTO, Emi SATO, Akira MARUMOTO, Tomomi HARADA, Akiko SANO, Yosuke KISHIMOTO, Yasuaki HIROOKA, Yoshikazu MURAWAKI, Junichi HASEGAWA a Goshi SHIOTA. Serum Human Telomerase Reverse Transcriptase Messenger RNA as a Novel Tumor Marker for Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. **2005**, 11(9), 3205–3209. ISSN 1078-0432, 1557-3265.
- (130) MOLDOVAN, Leni, Kara E. BATTE, Joanne TRGOVCICH, Jon WISLER, Clay B. MARSH a Melissa PIPER. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **2014**, 18(3), 371–390. ISSN 1582-4934.
- (131) Molecular Probes Inc., **2011**. SYBR® Green II RNA Gel Stain. In: *Thermofisherscientific.com* [online] 3. 4. 2001 [cit. 20. 7. 2021]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2Fmp07568.pdf&title=U11CUiBHcmVlbiBJSSBSTkEgR2VsIFN0YWlu>.
- (132) MORELLI, Eugenio, Annamaria GULLÀ, Roberta ROCCA, Cinzia FEDERICO, Lavinia RAIMONDI, Stefano MALVESTITI, Valter AGOSTI, Marco ROSSI, Giosuè COSTA, Gianluca GIAVARESI, Abdel Kareem AZAB, Antonia CAGNETTA, Michele CEA, Pierosandro TAGLIAFERRI, Antonino NERI, Nikhil C. MUNSHI, Giuseppe VIGLIETTO, Pierfrancesco TASSONE a Nicola AMODIO. The Non-Coding RNA Landscape of Plasma Cell Dyscrasias. *Cancers*. **2020**, 12(320), 1–25.
- (133) NACHTERGAELE, Sigrid a Chuan HE. The emerging biology of RNA post-transcriptional modifications. *RNA Biology*. **2017**, 14(2), 156–163. ISSN 1547-6286.
- (134) NAIR, Viswam S., Colin C. PRITCHARD, Muneesh TEWARI a John P. A. IOANNIDIS. Design and Analysis for Studying microRNAs in Human Disease: A Primer on -Omic Technologies. *American Journal of Epidemiology*. **2014**, 180(2), 140–152. ISSN 0002-9262.
- (135) NIE, Yan, Xiang LIU, Shaohua QU, Erwei SONG, Hua ZOU a Chang GONG. Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker for nasopharyngeal

- carcinoma progression and survival. *Cancer Science*. **2013**, 104(4), 458–464. ISSN 1349-7006.
- (136) NIENTIEDT, Malin, Doris SCHMIDT, Glen KRISTIANSEN, Stefan C. MUELLER a Joerg ELLINGER. YRNA Expression Profiles are Altered in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *European Urology Focus*. **2018**, 4(2), 260–266.
- (137) NIINUMA, Takeshi, Hiromu SUZUKI, Masanori NOJIMA, Katsuhiko NOSHO, Hiroyuki YAMAMOTO, Hiroyuki TAKAMARU, Eiichiro YAMAMOTO, Reo MARUYAMA, Takayuki NOBUOKA, Yasuaki MIYAZAKI, Toshirou NISHIDA, Takeo BAMBA, Tatsuo KANDA, Yoichi AJIOKA, Takahiro TAGUCHI, Satoshi OKAHARA, Hiroaki TAKAHASHI, Yasunori NISHIDA, Masao HOSOKAWA, Tadashi HASEGAWA, Takashi TOKINO, Koichi HIRATA, Kohzoh IMAI, Minoru TOYOTA a Yasuhisa SHINOMURA. Upregulation of miR-196a and HOTAIR Drive Malignant Character in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer Research*. **2012**, 72(5), 1126–1136. ISSN 0008-5472, 1538-7445.
- (138) NORDHOFF, E., F. KIRPEKAR a P. ROEPSTORFF. Mass spectrometry of nucleic acids. *Mass Spectrometry Reviews*. **1996**, 15(2), 67–138. ISSN 1098-2787.
- (139) OHTSUKA, Masahisa, Hui LING, Cristina IVAN, Martin PICHLER, Daisuke MATSUSHITA, Matthew GOBLIRSCH, Verena STIEGELBAUER, Kunitoshi SHIGEYASU, Xinna ZHANG, Meng CHEN, Fnu VIDHU, Geoffrey A. BARTHOLOMEUSZ, Yuji TOIYAMA, Masato KUSUNOKI, Yuichiro DOKI, Masaki MORI, Shumei SONG, Jillian R. GUNTHER, Sunil KRISHNAN, Ondrej SLABY, Ajay GOEL, Jaffer A. AJANI, Milan RADOVICH a George A. CALIN. H19 Noncoding RNA, an Independent Prognostic Factor, Regulates Essential Rb-E2F and CDK8- β -Catenin Signaling in Colorectal Cancer. *EBioMedicine*. **2016**, 13, 113–124. ISSN 2352-3964.
- (140) OUYANG, Jun, Xuyi ZHAN, Suhang GUO, Sheng CAI, Jinxiu LEI, Su ZENG a Lushan YU. Progress and trends on the analysis of nucleic acid and its modification. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2020**, 191(113589), 1–19. ISSN 0731-7085.
- (141) OVCHARENKO, Dmitriy, Kevin KELNAR, Charles JOHNSON, Nan LENG a David BROWN. Genome-Scale MicroRNA and Small Interfering RNA Screens Identify Small RNA Modulators of TRAIL-Induced Apoptosis Pathway. *Cancer Research*. **2007**, 67(22), 10782–10788. ISSN 0008-5472, 1538-7445.
- (142) PAN, Jie, Yuan BIAN, Zhuo CAO, Limei LEI, Jiongwei PAN, Jinwei HUANG, Xiaoping CAI, Xiang LAN a Hao ZHENG. Long noncoding RNA MALAT1 as a

candidate serological biomarker for the diagnosis of non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Thoracic Cancer*. **2020**, 11, 329–335. ISSN 1759-7706.

- (143) PAN, Yafang, Hongmei CHEN, Xianjuan SHEN, Xudong WANG, Shaoqing JU, Meihong LU a Hui CONG. Serum level of long noncoding RNA H19 as a diagnostic biomarker of multiple myeloma. *Clinica Chimica Acta*. **2018**, 480, 199–205. ISSN 0009-8981.
- (144) PERRETT, D. ELECTROPHORESIS. In: Ian D. WILSON. *Encyclopedia of Separation Science*. Oxford: Academic Press, **2000**, 103–118. ISBN 978-0-12-226770-3.
- (145) PETROV, Alexey, Albet TSA a Joseph D. PUGLISI. Analysis of RNA by Analytical Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: *Methods in Enzymology*. B.m: Elsevier, **2013**, 301–313. ISBN 978-0-12-420037-1.
- (146) PROUDFOOT, Nick J., Andre FURGER a Michael J. DYE. Integrating mRNA Processing with Transcription. *Cell*. **2002**, 108(4), 501–512. ISSN 0092-8674.
- (147) QIN, Wenxing, Qiusheng REN, Te LIU, Yongyi HUANG a Jiejun WANG. MicroRNA-155 is a novel suppressor of ovarian cancer-initiating cells that targets CLDN1. *FEBS Letters*. **2013**, 587, 1434–1439. ISSN 0014-5793.
- (148) RALSER, Markus. The RNA world and the origin of metabolic enzymes. *Biochemical Society Transactions*. **2014**, 42, 985–988. ISSN 0300-5127, 1470-8752.
- (149) RAMOS, Silvia B. V. a Alain LAEDERACH. Molecular biology: A second layer of information in RNA. *Nature*. **2014**, 505(7485), 621–622. ISSN 0028-0836.
- (150) RAZMI, Habib a Mohammad JABBARI. Development of graphene-carbon nanotube-coated magnetic nanocomposite as an efficient sorbent for HPLC determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. **2015**, 95(14), 1353–1369. ISSN 0306-7319.
- (151) REDDI, K. K. a J. F. HOLLAND. Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1976**, 73(7), 2308–2310. ISSN 0027-8424, 1091-6490.
- (152) ROMANO, Giulia, Dario VENEZIANO, Mario ACUNZO a Carlo M. CROCE. Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis*. **2017**, 38(5), 485–491. ISSN 0143-3334.
- (153) ROSI, A., L. GUIDONI, A. M. LUCIANI, G. MARIUTTI a V. VITI. RNA-lipid complexes released from the plasma membrane of human colon carcinoma cells. *Cancer Letters*. **1988**, 39(2), 153–160. ISSN 0304-3835.

- (154) ROSSI, G., S. COCO, L. LONGO, G. CHIORINO, P. OSTANO, M. G. DAL BELLO, M. GRASSI, C. VENTURI, L. MASTRACCI, M. TAGLIAMENTO, C. DELLEPIANE, L. ZULLO, K. BESHIRI, A. ALAMA, E. BENNICELLI, A. BOTTINI, P. PRONZATO a C. GENOVA. A circulating exosomal miRNA-based risk score as a predictive biomarker of relapse in early stage non-small cell lung cancer. *Annals of Oncology*. **2020**, 31, S795. ISSN 0923-7534.
- (155) ROTH, Carina, Brigitte RACK, Volkmar MÜLLER, Wolfgang JANNI, Klaus PANTEL a Heidi SCHWARZENBACH. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research*. **2010**, 12(R90), 1–8. ISSN 1465-542X.
- (156) RÖTHER, Susanne a Gunter MEISTER. Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. *Biochimie*. **2011**, 93, 1905–1915. ISSN 0300-9084.
- (157) ROUNDTREE, Ian A., Molly E. EVANS, Tao PAN a Chuan HE. Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell*. **2017**, 169(7), 1187–1200. ISSN 0092-8674.
- (158) SCOTT, Michelle S. a Motoharu ONO. From snoRNA to miRNA: Dual function regulatory non-coding RNAs. *Biochimie*. **2011**, 93(11), 1987–1992. ISSN 0300-9084.
- (159) SELCUKLU, S. Duygu, Mark T.A. DONOGHUE a Charles SPILLANE. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochemical Society Transactions*. **2009**, 37(4), 918–925. ISSN 0300-5127.
- (160) SEN, Tapas, Antonio SEBASTIANELLI a Ian James BRUCE. Mesoporous Silica–Magnetite Nanocomposite: Fabrication and Applications in Magnetic Bioseparations. *Journal of the American Chemical Society*. **2006**, 128, 7130–7131. ISSN 0002-7863.
- (161) SHAFEE, Thomas a Rohan LOWE. Eukaryotic and prokaryotic gene structure.. *WikiJournal of Medicine*. **2017**, 4(1), 1–5.
- (162) SHAJARI, Elmira a Hamidreza MOLLASALEHI. Ribonucleic-acid-biomarker candidates for early-phase group detection of common cancers. *Genomics*. **2020**, 112, 163–168. ISSN 0888-7543.
- (163) SHANG, Xingchen, Guanzhen LI, Hui LIU, Tao LI, Juan LIU, Qi ZHAO a Chuanxi WANG. Comprehensive Circular RNA Profiling Reveals That hsa_circ_0005075, a New Circular RNA Biomarker, Is Involved in Hepatocellular Crcinoma Development. *Medicine*. **2016**, 95(22), 1–7. ISSN 0025-7974.

- (164) SHAPIRO, James A. Revisiting the Central Dogma in the 21st Century. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **2009**, 1178(1), 6–28. ISSN 1749-6632.
- (165) SHEN, Liqin, Lei CHEN, Yongsheng WANG, Xiaochun JIANG, Hongping XIA a Zhixiang ZHUANG. Long noncoding RNA MALAT1 promotes brain metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in lung cancer. *Journal of Neuro-Oncology*. **2015**, 121, 101–108. ISSN 1573-7373.
- (166) SHIMOMURA, Akihiko, Sho SHIINO, Junpei KAWAUCHI, Satoko TAKIZAWA, Hiromi SAKAMOTO, Juntaro MATSUZAKI, Makiko ONO, Fumitaka TAKESHITA, Shumpei NIIDA, Chikako SHIMIZU, Yasuhiro FUJIWARA, Takayuki KINOSHITA, Kenji TAMURA a Takahiro OCHIYA. Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Science*. **2016**, 107(3), 326–334. ISSN 1349-7006.
- (167) SCHRADER, C., A. SCHIELKE, L. ELLERBROEK a R. JOHNE. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. **2012**, 113, 1014–1026. ISSN 1365-2672.
- (168) SCHRAUDER, Michael G., Reiner STRICK, Rüdiger SCHULZ-WENDTLAND, Pamela L. STRISSEL, Laura KAHMANN, Christian R. LOEHLBERG, Michael P. LUX, Sebastian M. JUD, Arndt HARTMANN, Alexander HEIN, Christian M. BAYER, Mayada R. BANI, Swetlana RICHTER, Boris R. ADAMIETZ, Evelyn WENKEL, Claudia RAUH, Matthias W. BECKMANN a Peter A. FASCHING. Circulating MicroRNAs as Potential Blood-Based Markers for Early Stage Breast Cancer Detection. *PLOS ONE*. **2012**, 7(1,e29770), 1–9. ISSN 1932-6203.
- (169) SCHWARZENBACH, Heidi, Dave S. B. HOON a Klaus PANTEL. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*. **2011**, 11(6), 1–12. ISSN 1474-175X, 1474-1768.
- (170) SCHWARZENBACH, Heidi, Karin MILDE-LANGOSCH, Bettina STEINBACH, Volkmar MÜLLER a Klaus PANTEL. Diagnostic potential of PTEN-targeting miR-214 in the blood of breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*. **2012**, 134(3), 933–941. ISSN 1573-7217.
- (171) SCHWARZENBACH, Heidi. Circulating nucleic acids as biomarkers in breast cancer. *Breast Cancer Research*. **2013**, 15(5, 211), 1–9. ISSN 1465-542X.
- (172) SI, Haiyan, Xiaoming SUN, Yingjian CHEN, Yuan CAO, Shimin CHEN, Huanchun WANG a Chengjin HU. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. **2013**, 139, 223–229. ISSN 1432-1335.

- (173) SI, M.-L., S. ZHU, H. WU, Z. LU, F. WU a Y.-Y. MO. miR-21 -mediated tumor growth. *Oncogene*. **2007**, 26, 2799–2803. ISSN 1476-5594.
- (174) SIDDIQUI, Halima, Ayat AL-GHAFARI, Hani CHOUDHRY a Huda AL DOGHAITHER. Roles of long non-coding RNAs in colorectal cancer tumorigenesis: A Review. *Molecular and Clinical Oncology*. **2019**, 11, 167–172. ISSN 2049-9450.
- (175) SIEBERT, P D a A CHENCHIK. Modified acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction method which greatly reduces DNA contamination. *Nucleic Acids Research*. **1993**, 21(8), 2019–2020. ISSN 0305-1048.
- (176) SILVA, J. M., R. RODRIGUEZ, J. M. GARCIA, C. MUÑOZ, J. SILVA, G. DOMINGUEZ, M. PROVENCIO, P. ESPAÑA a F. BONILLA. Detection of epithelial tumour RNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advanced stages and circulating tumour cells. *Gut*. **2002**, 50(4), 530–534. ISSN 0017-5749, 1468-3288.
- (177) SILVA, Jose M., Gemma DOMINGUEZ, Javier SILVA, Jose M. GARCIA, Antonio SANCHEZ, Oscar RODRIGUEZ, Mariano PROVENCIO, Pilar ESPAÑA a Felix BONILLA. Detection of Epithelial Messenger RNA in the Plasma of Breast Cancer Patients Is Associated with Poor Prognosis Tumor Characteristics. *Clinical Cancer Research*. **2001**, 7(9), 2821–2825. ISSN 1078-0432, 1557-3265.
- (178) SIM, Adelene YL, Peter MINARY a Michael LEVITT. Modeling nucleic acids. *Current Opinion in Structural Biology*. **2012**, 22(3), 273–278. ISSN 0959-440X.
- (179) SIMMS, D., P. CIZDZIEL a P. CHOMCZYŃSKI. TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*. **1993**, 15(4), 532–535.
- (180) SIOMI, Mikiko C., Kaoru SATO, Dubravka PEZIC a Alexei A. ARAVIN. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2011**, 12(4), 246. ISSN 1471-0080.
- (181) SOEMEDI, Rachel, Kamil J. CYGAN, Christy L. RHINE, David T. GLIDDEN, Allison J. TAGGART, Chien-Ling LIN, Alger M. FREDERICKS a William G. FAIRBROTHER. The effects of structure on pre-mRNA processing and stability. *Methods*. **2017**, 125, 36–44. ISSN 1046-2023.
- (182) SOMMER, S S, A R GROSZBACH a C D BOTTEMA. PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes. *BioTechniques*. **1992**, 12(1), 82–87. ISSN 1940-9818.
- (183) SOURVINO, Ioanna S., Athina MARKOU a Evi S. LIANIDOU. Quantification of Circulating miRNAs in Plasma: Effect of Preanalytical and Analytical Parameters on

- Their Isolation and Stability. *The Journal of Molecular Diagnostics*. **2013**, 15(6), 827–834. ISSN 1525-1578.
- (184) SOUZA, A E, T HERMANN a H U GÖRINGER. The guide RNA database. *Nucleic acids research*. **1997**, 25(1), 104–106. ISSN 1362-4962.
- (185) SPIESS, Andrej-Nikolai a Richard IVELL. Normalization of RNA Hybridization Signals by Means of SYBR® Green II-Stained 28S or 18S Ribosomal RNA and a Phosphor Imager. *BioTechniques*. **1999**, 26, 46–50. ISSN 0736-6205.
- (186) SPURNÁ, K., J. VIKTOROVÁ a T. RUML. Přehled malých nekódujících RNA. *Chemické listy*. **2018**, 112(12), 811–818. ISSN 1213-7103.
- (187) SRIDHARAN, Gokul a Akhil A SHANKAR. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. **2012**, 16(2), 251–255. ISSN 0973-029X.
- (188) STELLWAGEN, Nancy C. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis*. **2009**, 30(1), S188–S195. ISSN 0173-0835.
- (189) SUN, Yu, Minjie WANG, Guigao LIN, Shipeng SUN, Xuexiang LI, Jun QI a Jinming LI. Serum MicroRNA-155 as a Potential Biomarker to Track Disease in Breast Cancer. *PLOS ONE*. **2012**, 7(10, e47003), 1–8. ISSN 1932-6203.
- (190) SVOBODA, Miroslav, Jana SLYSKOVA, Michaela SCHNEIDEROVA, Peter MAKOVICKY, Ludovit BIELIK, Miroslav LEVY, Ludmila LIPSKA, Beata HEMMELOVA, Zdenek KALA, Marketa PROTIVANKOVA, Ondrej VYCITAL, Vaclav LISKA, Lucie SCHWARZOVA, Ludmila VODICKOVA a Pavel VODICKA. HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients. *Carcinogenesis*. **2014**, 35(7), 1510–1515. ISSN 0143-3334.
- (191) SZILAGYI, Melinda, Ondrej POS, Eva MARTON, Gergely BUGLYO, Beata SOLTESZ, Judit KESERU, Andras PENYIGE, Tomas SZEMES a Balint NAGY. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**, 21(6827), 1–20.
- (192) TAGHVIMI, Arezou, Hamed HAMISHEHKAR a Mahmoud EBRAHIMI. The application of magnetic nano graphene oxide in determination of methamphetamine by high performance liquid chromatography of urine samples. *Journal of the Iranian Chemical Society*. **2016**, 13, 1471–1480. ISSN 1735-207X.
- (193) TAGHVIMI, Arezou, Hamed HAMISHEHKAR a Mahmoud EBRAHIMI. The application of magnetic nano graphene oxide in determination of methamphetamine by

- high performance liquid chromatography of urine samples. *Journal of the Iranian Chemical Society*. **2016**, 13, 1471–1480. ISSN 1735-2428.
- (194) TAN, Siun Chee a Beow Chin YIAP. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2009**, e574398, 1–10. ISSN 2314-6133.
- (195) TANG, Guiliang. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends in Biochemical Sciences*. **2005**, 30(2), 106–114. ISSN 0968-0004.
- (196) THATCHER, Stephanie A. DNA/RNA Preparation for Molecular Detection. *Clinical Chemistry*. **2015**, 61(1), 89–99. ISSN 0009-9147.
- (197) THINGHOLM, Tine E. a Martin R. LARSEN. The Use of Titanium Dioxide for Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides. In: Louise VON STECHOW, Phospho-Proteomics: Methods and Protocols. New York, NY: Springer, **2016**, 135–146, ISBN 978-1-4939-3049-4.
- (198) TINOCO, Ignacio a Carlos BUSTAMANTE. How RNA folds. *Journal of Molecular Biology*. **1999**, 293(2), 271–281. ISSN 0022-2836.
- (199) TONI, Lee S., Anastacia M. GARCIA, Danielle A. JEFFREY, Xuan JIANG, Brian L. STAUFFER, Shelley D. MIYAMOTO a Carmen C. SUCHAROV. Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX*. **2018**, 5, 599–608. ISSN 2215-0161.
- (200) ULLMANN, Susanne, Thorsten HAGE, Regina DRAHEIM, Ute EGERLAND, Uwe OELMÜLLER, Kay BRUNE a Andreas PAHL. RNA-Based Drug Screening Using Automated RNA Purification and Real-time RT-PCR1. *Journal of Biomolecular Screening*. **2004**, 9(2), 95–102. ISSN 1087-0571.
- (201) UMU, Sinan Uğur, Hilde LANGSETH, Cecilie BUCHER-JOHANNESSEN, Bastian FROMM, Andreas KELLER, Eckart MEESE, Marianne LAURITZEN, Magnus LEITHAUG, Robert LYLE a Trine B. ROUNGE. A comprehensive profile of circulating RNAs in human serum. *RNA Biology*. **2018**, 15(2), 242–250. ISSN 1547-6286.
- (202) VÁLÓCZI, Anna, Csaba HORNYIK, Nóra VARGA, József BURGÝÁN, Sakari KAUPPINEN a Zoltán HAVELDA. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research*. **2004**, 32(22), e175–e175. ISSN 0305-1048.
- (203) VAN SCHOONEVELD, Eleni, Maartje C. A. WOUTERS, Ilse VAN DER AUWERA, Dieter J. PEETERS, Hans WILDIERS, Peter A. VAN DAM, Ignace VERGOTE, Peter B. VERMEULEN, Luc Y. DIRIX a Steven J. VAN LAERE. Expression profiling of

- cancerous and normal breast tissues identifies microRNAs that are differentially expressed in serum from patients with (metastatic) breast cancer and healthy volunteers. *Breast Cancer Research*. **2012**, 14(1, R34), 1–16. ISSN 1465-542X.
- (204) VANGUILDER, Heather D., Kent E. VRANA a Willard M. FREEMAN. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*. **2008**, 44(5), 619–626.
- (205) VLASOVA, I. M., V. V. ZHURAVLEVA a A. M. SALETSKY. Determination of the parameters of the rotational diffusion of complexes of serum albumins with Triton X-100 from analysis of tryptophan fluorescence. *Russian Journal of Physical Chemistry B*. **2013**, 32(10), 53–58. ISSN 1990-7923.
- (206) VOLINIA, Stefano, George A. CALIN, Chang-Gong LIU, Stefan AMBS, Amelia CIMMINO, Fabio PETROCCA, Rosa VISIONE, Marilena IORIO, Claudia ROLDO, Manuela FERRACIN, Robyn L. PRUEITT, Nozumu YANAIHARA, Giovanni LANZA, Aldo SCARPA, Andrea VECCHIONE, Massimo NEGRINI, Curtis C. HARRIS a Carlo M. CROCE. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2006**, 103(7), 2257–2261. ISSN 0027-8424, 1091-6490.
- (207) VOMELOVÁ, I., Z. VANÍCKOVÁ a A. SEDO. Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome. *Folia Biologica*. **2009**, 55(6), 243–251. ISSN 0015-5500.
- (208) WALTER, Peter a Günter BLOBEL. Disassembly and reconstitution of signal recognition particle. *Cell*. **1983**, 34(2), 525–533. ISSN 0092-8674.
- (209) WAMBUA, Dickson M., Masaaki UBUKATA, John DANE, Robert B. CODY a Norman H. L. CHIU. Bottom-up mass spectrometric sequencing of microRNA. *Analytical Methods*. **2014**, 6(21), 8829–8839. ISSN 1759-9679.
- (210) WANG, Bing a Qingyun ZHANG. The expression and clinical significance of circulating microRNA-21 in serum of five solid tumors. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. **2012**, 138, 1659–1666. ISSN 1432-1335.
- (211) WANG, Hongjiang, Guang TAN, Lei DONG, Lei CHENG, Kejun LI, Zhongyu WANG a Haifeng LUO. Circulating MiR-125b as a Marker Predicting Chemoresistance in Breast Cancer. *PLOS ONE*. **2012b**, 7(4, e34210), 1–8. ISSN 1932-6203.
- (212) WANG, Jin, Jinyun CHEN, Ping CHANG, Aimee LEBLANC, Donghui LI, James L. ABBRUZZESSE, Marsha L. FRAZIER, Ann M. KILLARY a Subrata SEN. MicroRNAs in Plasma of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients as Novel Blood-

- Based Biomarkers of Disease. *Cancer Prevention Research*. **2009**, 2(9), 807–813. ISSN 1940-6207, 1940-6215.
- (213) WANG, Jing, David C. SAMUELS, Shilin ZHAO, Yu XIANG, Ying-Yong ZHAO a Yan GUO. Current Research on Non-Coding Ribonucleic Acid (RNA). *Genes*. **2017**, 8(12), 366.
- (214) WANG, Mei, Hongbing GU, Sheng WANG, Hui QIAN, Wei ZHU, Ling ZHANG, Chonghui ZHAO, Yang TAO a Wenrong XU. Circulating miR-17-5p and miR-20a: Molecular markers for gastric cancer. *Molecular Medicine Reports*. **2012a**, 5(6), 1514–1520. ISSN 1791-2997.
- (215) WANG, Xiao a Chuan HE. Dynamic RNA Modifications in Posttranscriptional Regulation. *Molecular Cell*. **2014**, 56(1), 5–12. ISSN 1097-2765.
- (216) WANG, Zhenfei, Hao YANG, Daguang MA, Yongping MU, Xiaohui TAN, Qin HAO, Li FENG, Junqing LIANG, Wen XIN, Yongxia CHEN, Yingcai WU, Yongfeng JIA a Haiping ZHAO. Serum PIWI-Interacting RNAs piR-020619 and piR-020450 Are Promising Novel Biomarkers for Early Detection of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. **2020**, 29, 990–998. ISSN 1055-9965, 1538-7755.
- (217) WATSON, Callum N., Antonio BELLI a Valentina DI PIETRO. Small Non-coding RNAs: New Class of Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Neurodegenerative Disease. *Frontiers in Genetics*. **2019**, 10(364), 1–14. ISSN 1664-8021.
- (218) WEBER, Jessica A, David H BAXTER, Shile ZHANG, David Y HUANG, Kuo HOW HUANG, Ming JEN LEE, David J GALAS a Kai WANG. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry*. **2010**, 56(11), 1733–1741. ISSN 0009-9147.
- (219) WENG, Wenhao, Na LIU, Yuji TOIYAMA, Masato KUSUNOKI, Takeshi NAGASAKA, Toshiyoshi FUJIWARA, Qing WEI, Huanlong QIN, Haifan LIN, Yanlei MA a Ajay GOEL. Novel evidence for a PIWI-interacting RNA (piRNA) as an oncogenic mediator of disease progression, and a potential prognostic biomarker in colorectal cancer. *Molecular Cancer*. **2018**, 17(16), 1–12.
- (220) WESTHOF, Eric a Pascal AUFFINGER. RNA Tertiary Structure. In: Meyers, Robert A. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Larkspur, CA, USA: American Cancer Society, 2006. ISBN 978-0-470-02731-8.
- (221) WIDERA, Christian, Shashi K. GUPTA, Johan M. LORENZEN, Claudia BANG, Johann BAUERSACHS, Kerstin BETHMANN, Tibor KEMPF, Kai C. WOLLERT a

- Thomas THUM. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. **2011**, 51, 872–875. ISSN 0022-2828.
- (222) WIERUCKA, Marta a Marek BIZIUK. Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples. *Trends in Analytical Chemistry*. **2014**, 59, 50–58. ISSN 0165-9936.
- (223) WONG, Sze Chuen Cesar, Siu Fong Elena LO, Moon Tong CHEUNG, Kai On Enders NG, Chun Wah TSE, Bo San Paul LAI, King Chung LEE a Y. M. Dennis LO. Quantification of Plasma β -Catenin mRNA in Colorectal Cancer and Adenoma Patients. *Clinical Cancer Research*. **2004**, 10, 1613–1617. ISSN 1078-0432, 1557-3265.
- (224) WORST, Thomas Stefan, Christopher PREVITI, Katja NITSCHKE, Nicolle DIESSL, Julia Christina GROSS, Lena HOFFMANN, Lisa FREY, Vanessa THOMAS, Christoph KAHLERT, Karen BIEBACK, Adriana TORRES CRIGNA, Fabia FRICKE, Stefan PORUBSKY, Niklas WESTHOFF, Jost VON HARDENBERG, Philipp NUHN, Philipp ERBEN, Maurice Stephan MICHEL a Michael BOUTROS. miR-10a-5p and miR-29b-3p as Extracellular Vesicle-Associated Prostate Cancer Detection Markers. *Cancers*. **2020**, 12(43), 1–21.
- (225) XIE, Yan, Juan LI, Peilong LI, Ning LI, Ying ZHANG, Helen BINANG, Yinghui ZHAO, Weili DUAN, Yingjie CHEN, Yunshan WANG, Lutao DU a Chuanxin WANG. RNA-Seq Profiling of Serum Exosomal Circular RNAs Reveals Circ-PNN as a Potential Biomarker for Human Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*. **2020**, 10(982), 1–13. ISSN 2234-943X.
- (226) XU, Changgang, Xiantao SHEN a Lei YE. Molecularly imprinted magnetic materials prepared from modular and clickable nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*. **2012**, 22(15), 7427–7433. ISSN 1364-5501.
- (227) XU, Wei, Gai ZHOU, Huizhi WANG, Yawen LIU, Baoding CHEN, Wei CHEN, Chen LIN, Shuhui WU, Aihua GONG a Min XU. Circulating lncRNA SNHG11 as a novel biomarker for early diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *International Journal of Cancer*. **2020**, 146(10), 2901–2912. ISSN 0020-7136.
- (228) YAN, He, Youchun XU, Ying LU a Wanli XING. Reduced Graphene Oxide-Based Solid-Phase Extraction for the Enrichment and Detection of microRNA. *Analytical Chemistry*. **2017**, 89, 10137–10140. ISSN 0003-2700.
- (229) YANG, Chunjiang, Youchun WEI, Leitao YU a Yong XIAO. Identification of Altered Circular RNA Expression in Serum Exosomes from Patients with Papillary Thyroid Carcinoma by High-Throughput Sequencing. *Medical Science Monitor: International*

- Medical Journal of Experimental and Clinical Research. **2019**, 25, 2785–2791. ISSN 1234-1010.
- (230) YANG, Min-Hui, Zhi-Yan HU, Chuan XU, Lin-Ying XIE, Xiao-Yan WANG, Shi-You CHEN a Zu-Guo LI. MALAT1 promotes colorectal cancer cell proliferation/migration/invasion via PRKA kinase anchor protein 9. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **2015**, 1852, 166–174. ISSN 0925-4439.
- (231) YE, Jiawei, Mingcheng XU, Xueke TIAN, Sheng CAI a Su ZENG. Research advances in the detection of miRNA. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. **2019**, 9, 217–226. ISSN 2095-1779.
- (232) YORUKER, Ebru Esin, Metin KESKIN, Cemil Burak KULLE, Stefan HOLDENRIEDER a Ugur GEZER. Diagnostic and prognostic value of circulating lncRNA H19 in gastric cancer. *Biomedical Reports*. **2018**, 9(2), 181–186. ISSN 2049-9434.
- (233) YU, Fengyan, Herui YAO, Pengcheng ZHU, Xiaoqin ZHANG, Qihui PAN, Chang GONG, Yijun HUANG, Xiaoqu HU, Fengxi SU, Judy LIEBERMAN a Erwei SONG. let-7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. *Cell*. **2007**, 131, 1109–1123. ISSN 0092-8674.
- (234) YU, Yaya, Jing XIAO a Swei Sunny HANN. The emerging roles of PIWI-interacting RNA in human cancers. *Cancer Management and Research*. **2019**, 11, 5895–5909. ISSN 1179-1322.
- (235) YUAN, Shuai, Ying XIANG, Xiaoping GUO, Yao ZHANG, Chengying LI, Weijia XIE, Na WU, Long WU, Tongjian CAI, Xiangyu MA, Zubin YU, Li BAI a Yafei LI. Circulating Long Noncoding RNAs Act as Diagnostic Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer. *Frontiers in Oncology*. **2020**, 10(537120), 1–10. ISSN 2234-943X.
- (236) ZAMPETAKI, Anna a Manuel MAYR. Analytical challenges and technical limitations in assessing circulating MiRNAs. *Thrombosis and Haemostasis*. **2012**, 108, 592–598. ISSN 0340-6245, 2567-689X.
- (237) ZARE, Nasrin, Nahid ESKANDARI, Valiollah MEHRZAD a Shaghayegh Haghjooy JAVANMARD. The expression level of hsa-miR-146a-5p in plasma-derived exosomes of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Research in Medical Sciences*. **2019**, 24(10), 1–7. ISSN 1735-1995.
- (238) ZHANG, Kaijiong, Zhenglian LUO, Yi ZHANG, Li ZHANG, Lichun WU, Lian LIU, Jie YANG, Xiaoyu SONG a Jinbo LIU. Circulating lncRNA H19 in plasma as a novel

- biomarker for breast cancer. *Cancer Biomarkers*. **2016**, 17(2), 187–194. ISSN 1574-0153.
- (239) ZHANG, Liqin, Shuo WAN, Ying JIANG, Yanyue WANG, Ting FU, Qiaoling LIU, Zhijuan CAO, Liping QIU a Weihong TAN. Molecular Elucidation of Disease Biomarkers at the Interface of Chemistry and Biology. *Journal of the American Chemical Society*. **2017**, 139(7), 2532–2540. ISSN 0002-7863.
- (240) ZHANG, Suling, Weixuan YAO, Defeng FU, Chunxiao ZHANG a Hongting ZHAO. Fabrication of magnetic zinc adeninate metal–organic frameworks for the extraction of benzodiazepines from urine and wastewater. *Journal of Separation Science*. **2018**, 41, 1864–1870. ISSN 1615-9314.
- (241) ZHAO, F-L, G-D HU, X-F WANG, X-H ZHANG, Y-K ZHANG a Z-S YU. Serum Overexpression of MicroRNA-10b in Patients with Bone Metastatic Primary Breast Cancer. *Journal of International Medical Research*. **2012**, 40(3), 859–866. ISSN 0300-0605.
- (242) ZHAO, Chihao, Xinlei SUN a Limin LI. Biogenesis and function of extracellular miRNAs. *ExRNA*. **2019**, 1(38), 1–9. ISSN 2398-0060.
- (243) ZHAO, Yongxi, Xiaolei ZUO, Qian LI, Feng CHEN, Yan-Ru CHEN, Jinqi DENG, Da HAN, Changlong HAO, Fujian HUANG, Yanyi HUANG, Guoliang KE, Hua KUANG, Fan LI, Jiang LI, Min LI, Na LI, Lin ZHENYU, Dingbin LIU, Juewen LIU a Chunhai FAN. *Nucleic Acids Analysis. Science China-Chemistry*. **2021**, 64(2), 171–203.
- (244) ZHU, Weizhu, Wenyi QIN, Ulus ATASOY a Edward R. SAUTER. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Research Notes*. **2009**, 2(89), 1–5. ISSN 1756-0500.
- (245) ZHU, Xiaoli, Xiyong WANG, Shuzhen WEI, Yan CHEN, Yang CHEN, Xiaobo FAN, Shuhua HAN a Guoqiu WU. hsa_circ_0013958: a circular RNA and potential novel biomarker for lung adenocarcinoma. *The FEBS Journal*. **2017**, 284, 2170–2182. ISSN 1742-4658.