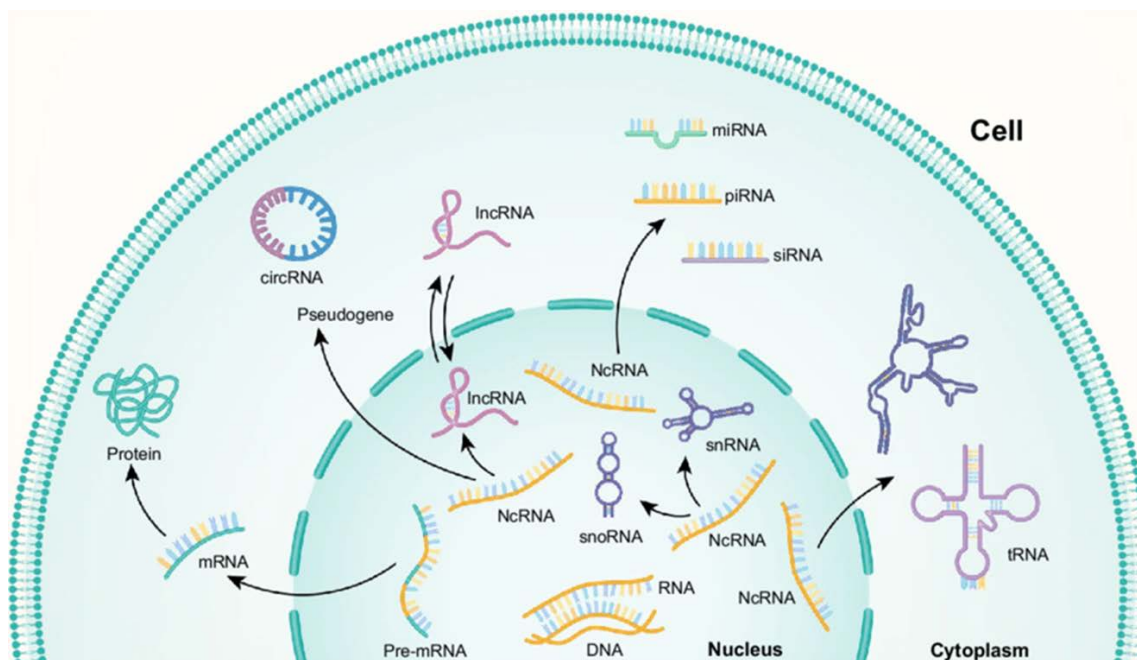


Nekódující molekuly RNA

Doc. RNDr. Sabina Ševčíková, PhD
Babákova myelomová skupina
UPF LF MU



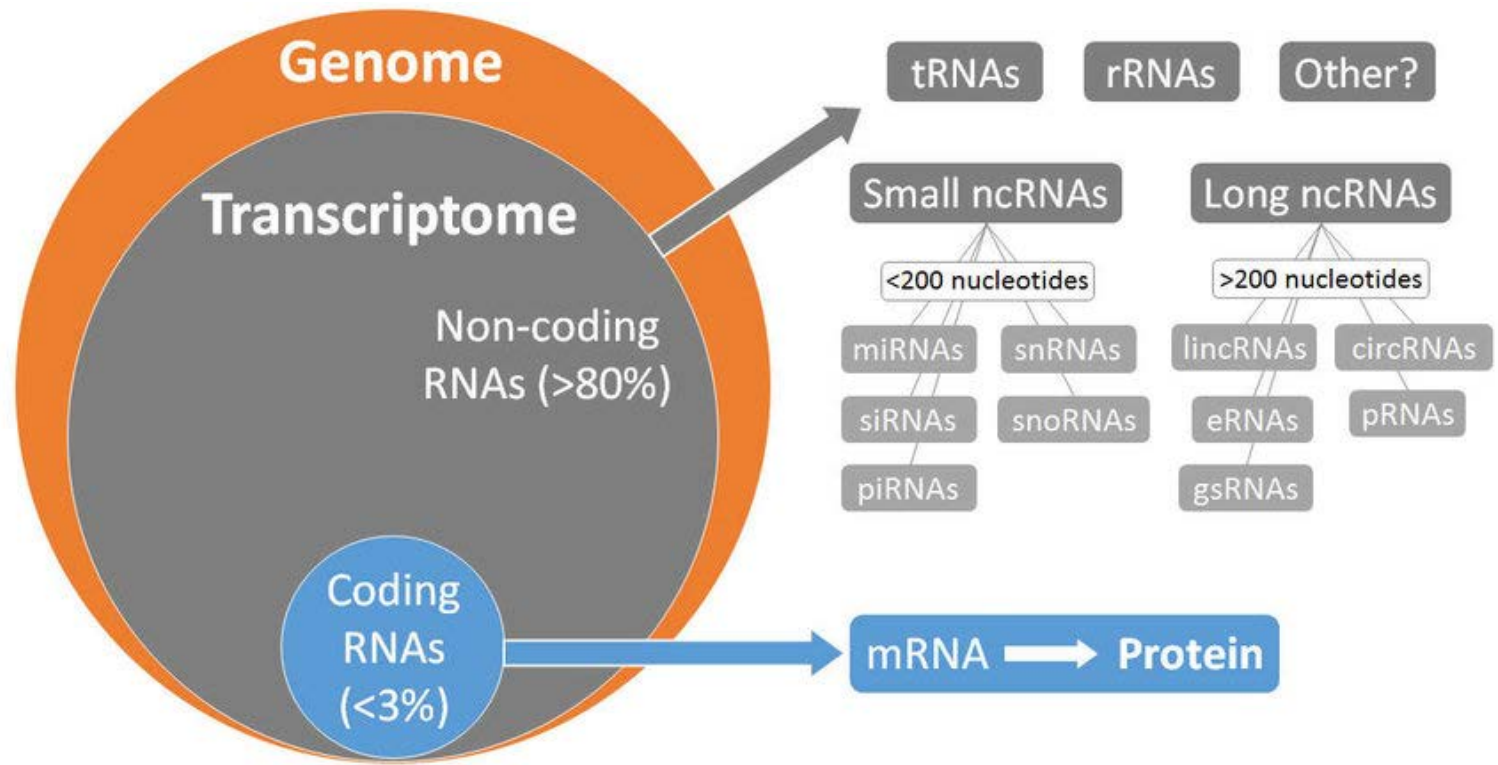
Nekódující molekuly RNA



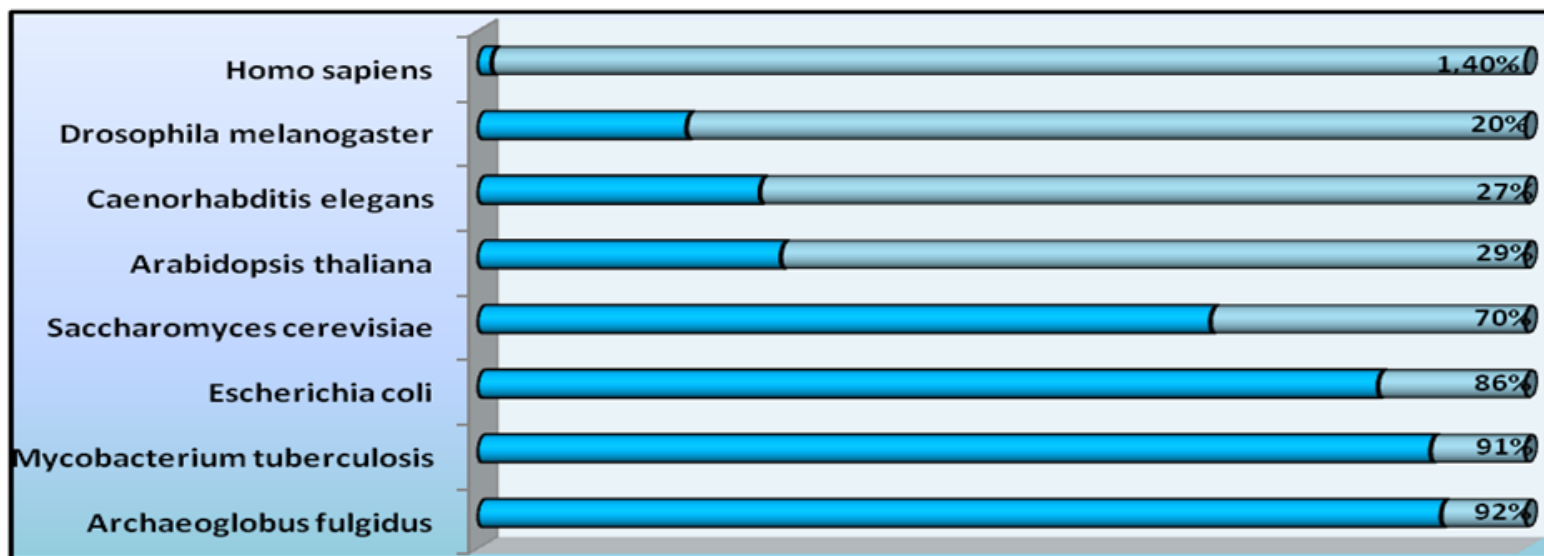
Nekódující RNA představují novou úroveň regulace genové exprese v biologických systémech

**Komplexnost organismů narůstá s
množstvím nekódujících RNA**





Kódující molekuly RNA



Sana et al, 2012



Babak Myeloma Group
Department of Pathophysiology
Faculty of Medicine, Masaryk University

MUNI
MED

Obecná charakteristika ncRNA

- Protein-kódující geny - pouze asi 1,5 % lidského genomu
- Více než 90 % genomu transkripčně aktivní
- Nekódující oblasti - junk DNA
 - Evolučně nahromaděný odpad bez funkce?
- Dnes: funkce při mnoha biologických procesech (proliferace, apoptóza,...)
- Nejznámější rRNA, tRNA

Stein et al, 2004
Taft et al, 2010



Babak Myeloma Group
Department of Pathophysiology
Faculty of Medicine, Masaryk University

MUNI
MED

Klasifikace ncRNA

- Krátké ncRNA
 - miRNA, piRNA, snoRNA, pyknony...
 - Všechny eukaryota včetně člověka
- Dlouhé ncRNA
 - lincRNA, intronické RNA...



Krátké nekódující molekuly RNA

mikroRNA



Jak to začalo?



Caenorhabditis elegans

- 1998 sekvence známá
- Snadno se chová
- Dá se zamrazit
- Lehce se rozmnožuje

- 1031 buněk u dospělého samce
- 19 000 genů





mikroRNA



- Studium genů regulujících vývojová stádia *C. elegans*
- V laboratoři Dr. Horwitze - Dr. Ambros a Dr. Ruvkun (1979-1983)
- Lin-4 - inaktivační mutace - zásadní vývoj. vady
- Lin-14 - mutace zvrátí efekt inaktivace lin-4
- Lin-4 - nekóduje protein (Ambros)
- Lin-14 regulován posttranskripčně na 3'UTR (Ruvkun)
- 1992 – transkript lin-4 reguluje posttranskripčně lin-14 vazbou na 3'UTR (Cell, 1993)
- 2000 - let-7 Ruvkun (*lethal-7*)

Lee et al, 1993



Babak Myeloma Group
Department of Pathophysiology
Faculty of Medicine, Masaryk University

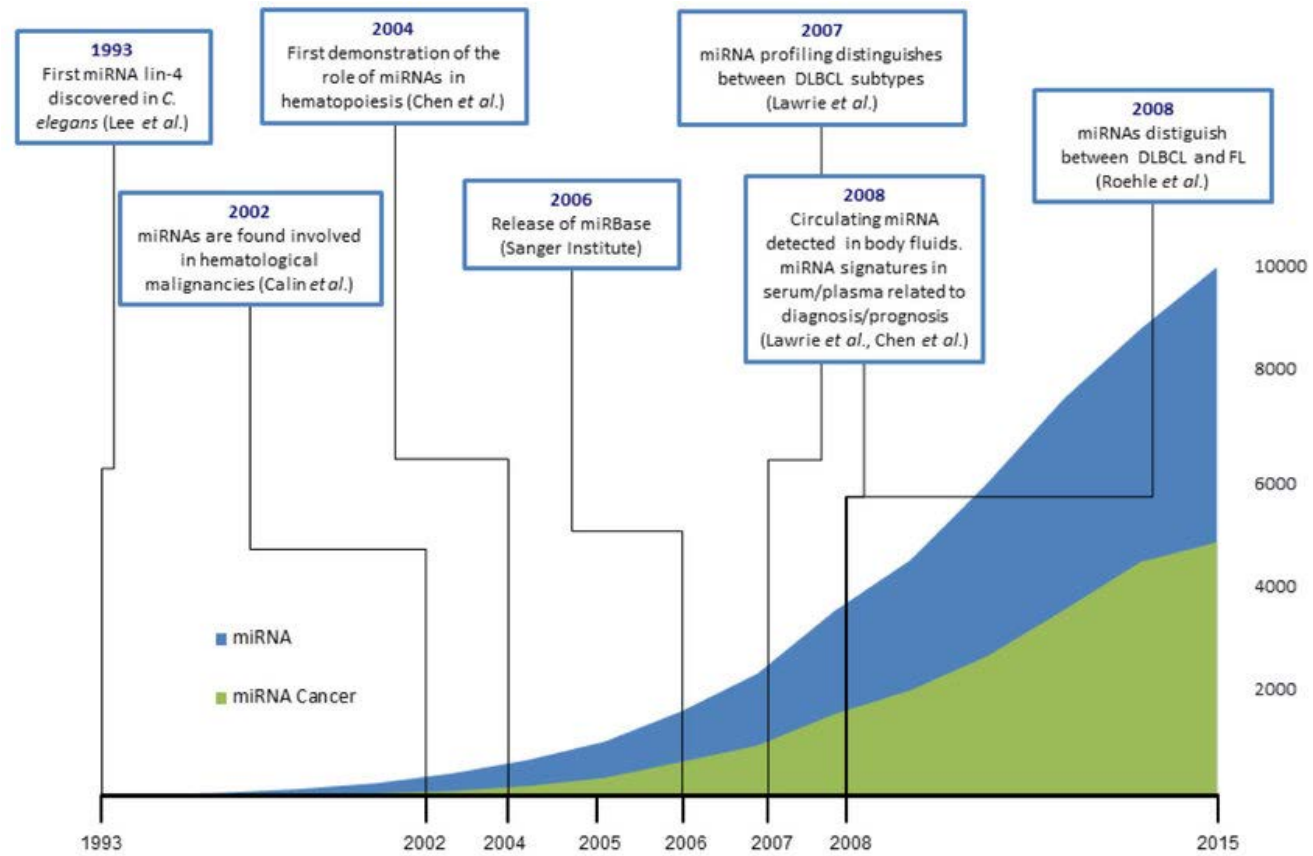
MUNI
MED

mikroRNA

- 18-25 nt, jednořetězcové molekuly
- posttranskripčně regulují genovou expresi
- 2694 lidských miRNA (miRBASE v 22, březen 2018) – 2200 lidských genů pro miRNA
- evolučně konzervované
- 1-2 % genomu
- geny pro miRNA na všech lidských chromozomech kromě Y
- regulace exprese až 50 % protein-kódujících genů
- jedna miRNA může regulovat desítky až stovky cílových mRNA

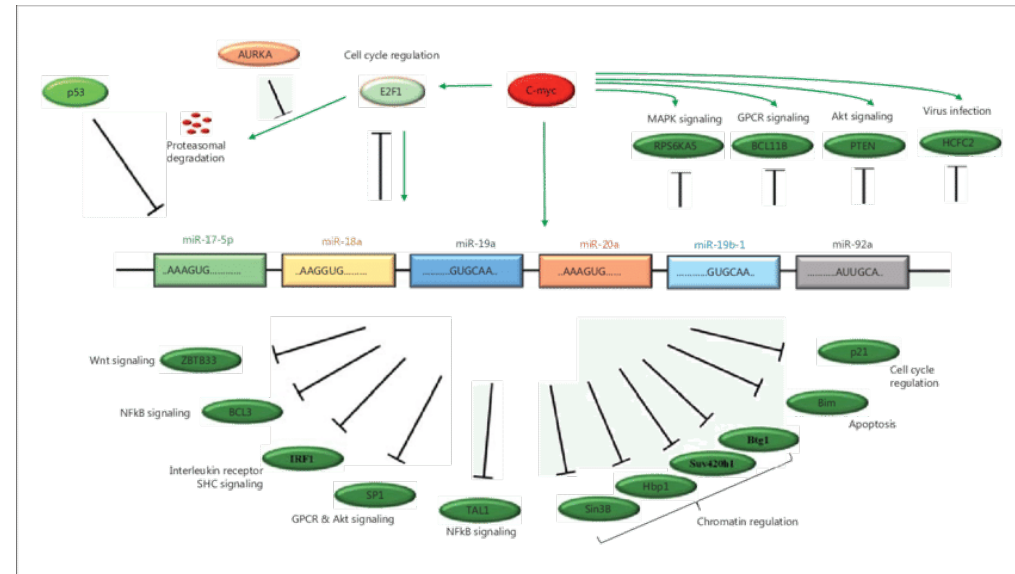
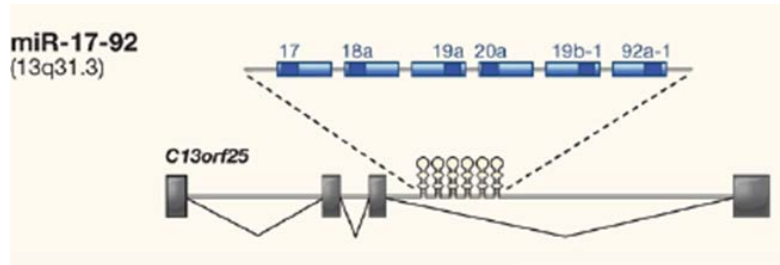
Lee et al., 1993
Krol et al., 2010

mikroRNA



mikroRNA – klastry a rodiny

- miRNA často tvoří klastry (miR-17-92) nebo sekvenční rodiny (let-7)
- miRNA klastr: skupina miRNA, jejichž geny jsou kódovány na stejném chromozomu velice blízko sebe



miRNA rodina: skupina miRNA ze stejného předchůdce: let-7

Consensus	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	u
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
cel-let-7	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
dme-let-7	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	-
xtr-let-7a	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
dre-let-7a	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
gga-let-7a	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
cfa-let-7a	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
mmu-let-7a	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
hsa-let-7a	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U

- Evolučně konzervovaná
- Podobné fyziologické funkce
- Nemusí mít konzervovanou strukturu
- let-7 rodina: 401 miRNA
- u Drosophil a nematod 1 izoforma
- u lidí 9 isoformem

Seed sequence – sekvence v pozici 2-7 na 5'konci miRNA, kterou se váže k cílové sekvenci mRNA



Hsa-let-7 rodina

B

Consensus	u	G	A	G	G	U	A	G	u	A	g	g	U	U	G	u	a	u	a	G	U	U
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
hsa-let-7a-1	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
hsa-let-7a-2	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
hsa-let-7a-3	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
hsa-let-7b	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	G	U	G	G	U	U
hsa-let-7c	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	G	G	U	U
hsa-let-7d	A	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	C	A	U	A	G	U	U
hsa-let-7e	U	G	A	G	G	U	A	G	G	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
hsa-let-7f-1	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	A	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
hsa-let-7f-2	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	A	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
hsa-let-7g	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U
hsa-let-7i	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	U	U	U	G	U	G	C	U	G	U	U
hsa-miR-98	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	A	G	U	U	G	U	A	U	U	G	U	U



Názvosloví mikroRNA

- Názvy přiřazené validovaným miRNA před publikací
- miR-25 – číslo -pořadí objevu
- mir – pre-miRNA
- miR- maturovaná forma
- Pokud blízká homologie – miR-27a, miR-27b
- Organismus původu – hsa-miR-27a
- Někdy 2 formy – predominantní miR-56, druhá forma miR-56*
- Pokud není zřejmé, 2 formy -5p, -3p podle raménka stem cell loop



Distribuce genů pro miRNA v lidském genomu

- Na všech chromozomech kromě Y
- 50 % genů v podobě klastrů (u člověka 55 klastrů) – přepis jako polycistronní transkripty
- miRNA v jednom klastru spřízněny-genovou duplikací?
- Ale nemusí být v žádném vztahu – podobná funkce cílením stejných nebo podobných genů v jedné signální dráze



Distribuce genů pro miRNA v lidském genomu

- Mezigénové : zhruba 50 % - monocistronní nebo polycistronní
- Intronové - zhruba 40 % - v intronových oblastech kódujících genů nebo genů pro nekódující RNA
- Exonové – na přechodu exonu a intronu v rámci genu pro nekódující RNA – z promotoru hostitelského genu – maturace vede k inaktivaci transkriptu



Biogeneze miRNA

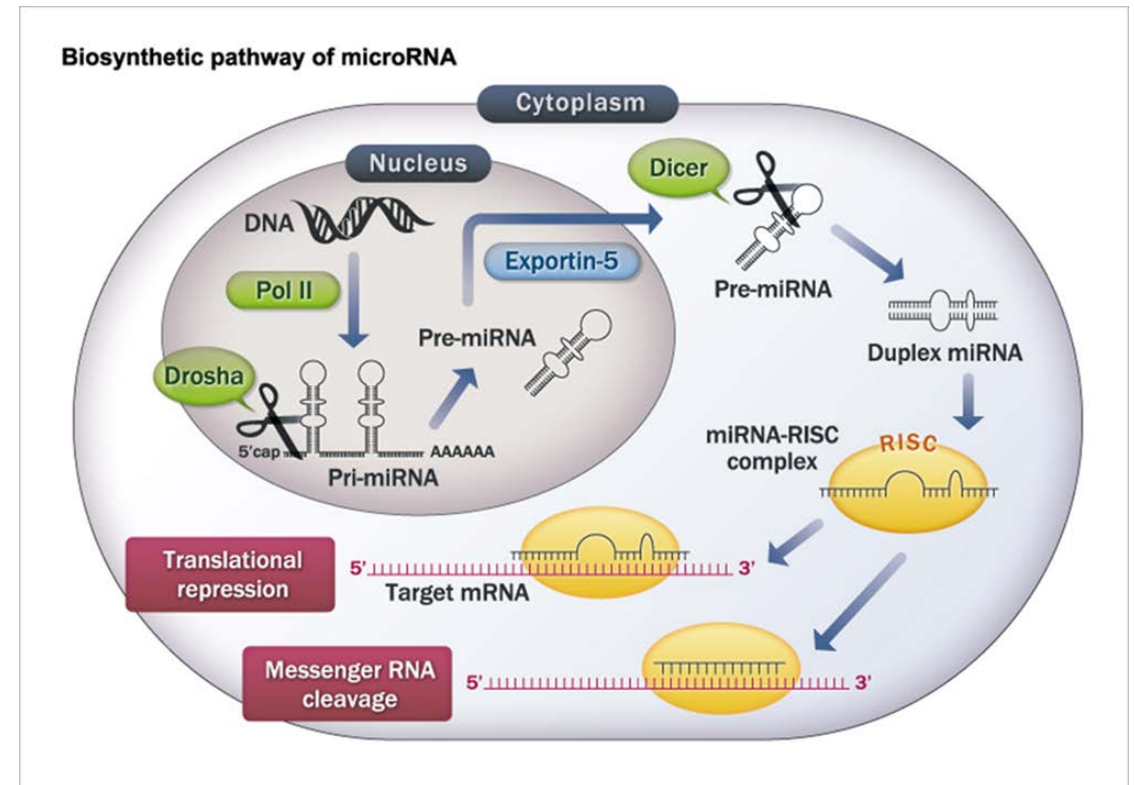


Babak Myeloma Group
Department of Pathophysiology
Faculty of Medicine, Masaryk University

MUNI
MED

Kanonický model biogeneze

- Přepis pomocí RNA polymerázy II (III)
- Primární transkript – pri-miRNA
- Sestřih na krátké 70 nt vlásenkové pre-miRNA (Drosha, Pasha)
- Do cytoplasmy pomocí exportinu 5 maturované dvouřetězce (Dicer), rozvinutí
- Guide strand – do mi-RISC komplexu (Argonaut)
- Passenger strand uvolněn a degradován (miRNA*)
- Podle nové nomenklatury – 5p, 3p



Kanonický model biogeneze

- Obecně – geny pro miRNA produkují jen 1 dominantní řetězec miRNA
- Poměr miRNA/miRNA* různý v různých tkáních, vývojových stádiích a maligní transformaci
- Maturovaná miRNA vazba na neúplně komplementární mRNA (3'UTR)
- 3'UTR kontrolují transport, lokalizaci, translaci i stabilitu mRNA (vazebná místa pro proteiny a miRNA)
- Ale i vazba na 5'UTR i kódující oblasti



Kanonický model biogeneze

- miRNA inhibují expresi cílového genu post-transkripčně
- mi-RISC- Argonaut AGO1-4, GEMIN3 a GEMIN4
- Úplná komplementarita miRNA s mRNA – degradace přes AGO2
- Neúplná komplementarita – inhibice translace



RISC komplex

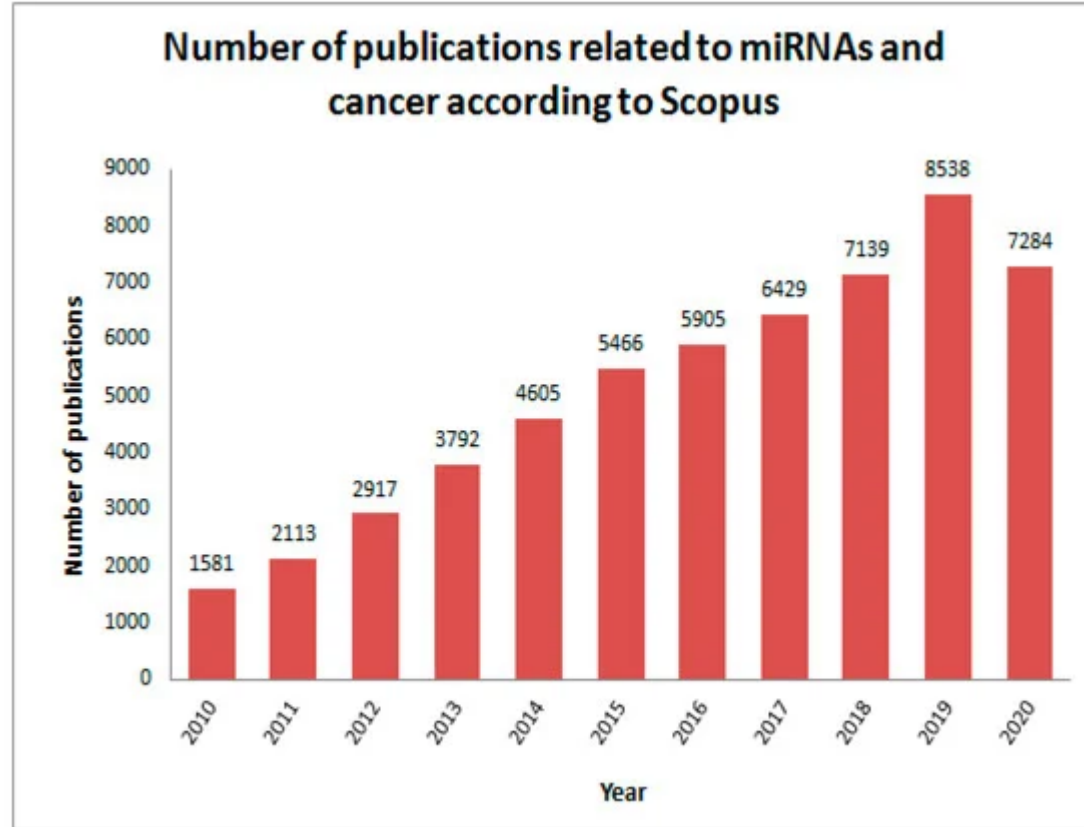
- Dicer (Rnáza) – štěpí dsRNA na 21-23 nt dlouhé fragmenty s 2 nukleotidovým převisem na 3' konci
- Tyto dsRNA fragmenty se dostanou do RISC komplexu
 - Fragment s méně stabilním 5' koncem je guide strand a proteinem Argonaut se dostane do RISC komplexu
 - Druhý fragment je degradován
- RISC targetuje komplementární 3' nepřekládanou oblast (UTR) mRNA transkriptu pomocí W-C párování
 - Degradace mRNA (protein Slicer, Ago rodina) - rostliny
 - Destabilizace mRNA zkrácením polyA konce
 - Translační represi



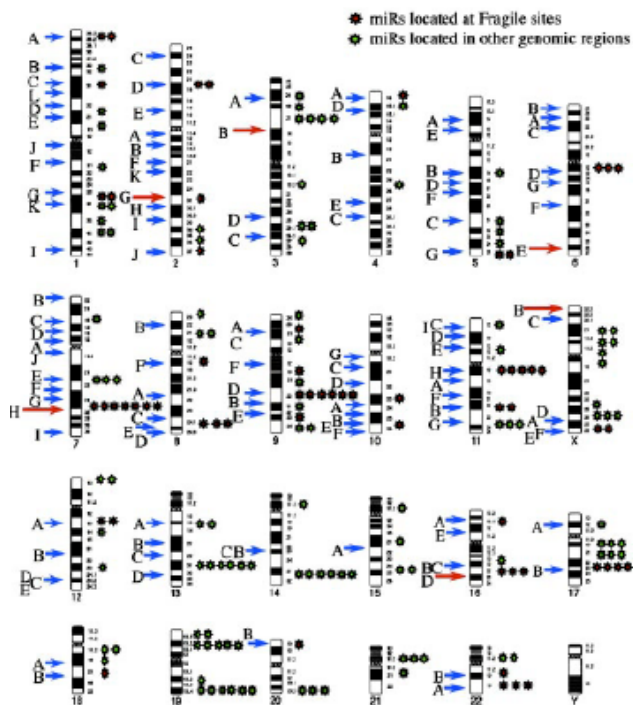
mikroRNA
v nádorové biologii

Počet publikací

miRNA 175 756
miRNA and cancer 83 053
9.12.2024



MiRNA vstupují do nádorové biologie



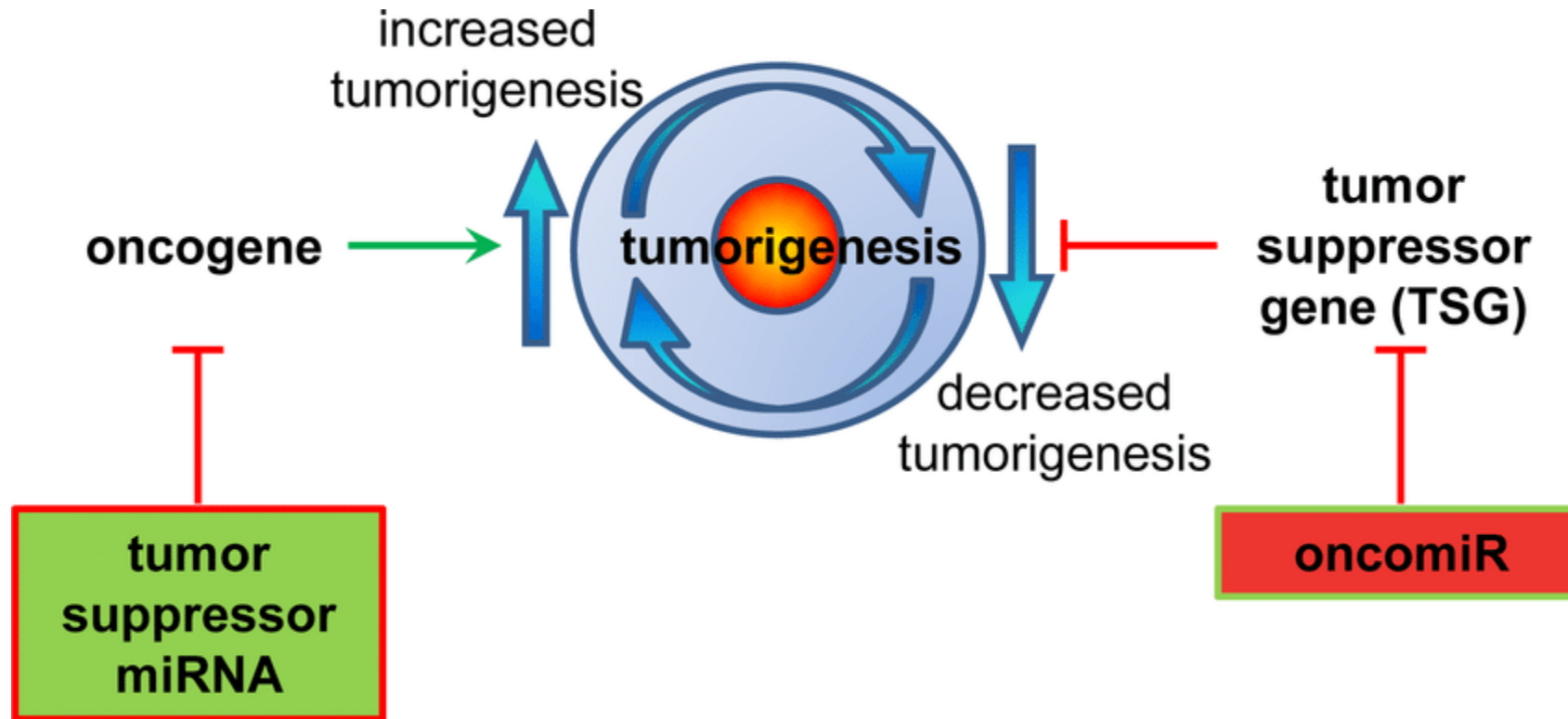
Přibližně 50% známých genů pro miRNA leží ve fragilních částech oblastech chromozómů, které jsou často zmnoženy nebo ztraceny v nádorových buňkách

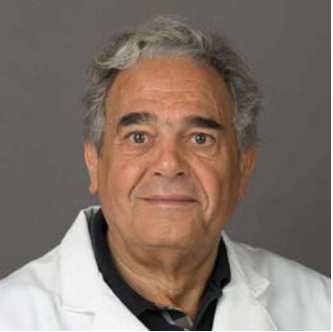
Geny pro miR-15a a miR-16a leží v regionu 13q14, který je často deletován u CLL

Calin et al, PNAS, 2004



miRNA fungují jako onkogeny a supresory





mikroRNA a nádory

- Carlo Croce – Ohio State university, výzkum Burkittova lymfomu, akutních leukemií
- George Calin – miRNA u CLL
- 2002 PNAS – nádorově supresorová funkce miR-15 a miR-16 u CLL
- 2006- první hybridizační čip pro expresi miRNA- srovnali 540 vzorků 6 typů solidních nádorů a nenádorových tkání
 - Významné rozdíly v expresi mezi nádory a nenádorovou tkání
- **Carlo Croce: H index 244, 279 482 citací**
- **George Calin: H index 153, 144 001 citací**



mikroRNA jako biomarkery

v onkologii

Croce 2006

- Expresní profil 6 typů solidních nádorů a párových nenádorových tkání
- První práce, která ukázala významné změny v expresi miRNA
- Více než 1000 citací
- Od té doby stovky studií definujících nádorová onemocnění na základě profilu miRNA
- Známé profily ale nejsou definitivní – nové miRNA stále objevovány
- Robustní výsledky u nádorů s vysokou incidencí – nádory prsu, karcinom plic, kolorektální karcinom



miRNA jako biomarkery

- Post-transkripční regulace genové exprese supresorů a onkogenů
- Specifické profily v nádorové tkáni
- Markery predikce, prognózy a diagnostiky
- Ideální biomarkery:
 - Vysoká stabilita
 - Snadná detekce
 - Široký dynamický rozsah
 - Korelace se známými faktory



Tkáňové miRNA

- Změny v expresních profilech miRNA mnoha nádorů
- Většinou pokles globální exprese miRNA ve srovnání se zdravou tkání
- Porovnání expresních profilů mRNA a miRNA – u epiteliálních nádorů lepší rozlišení u miRNA
- miRNA vypovídají více o charakteru onemocnění než genové exprese
- Vhodnější pro molekulární klasifikaci nádorů



Tkáňové miRNA

- Snadnější identifikace
- Stabilita (i z parafilmových bločků) – obrovské retrospektivní studie
- Specifické asaye na RT-PCR velice citlivé jen 10-25 ng celkové RNA



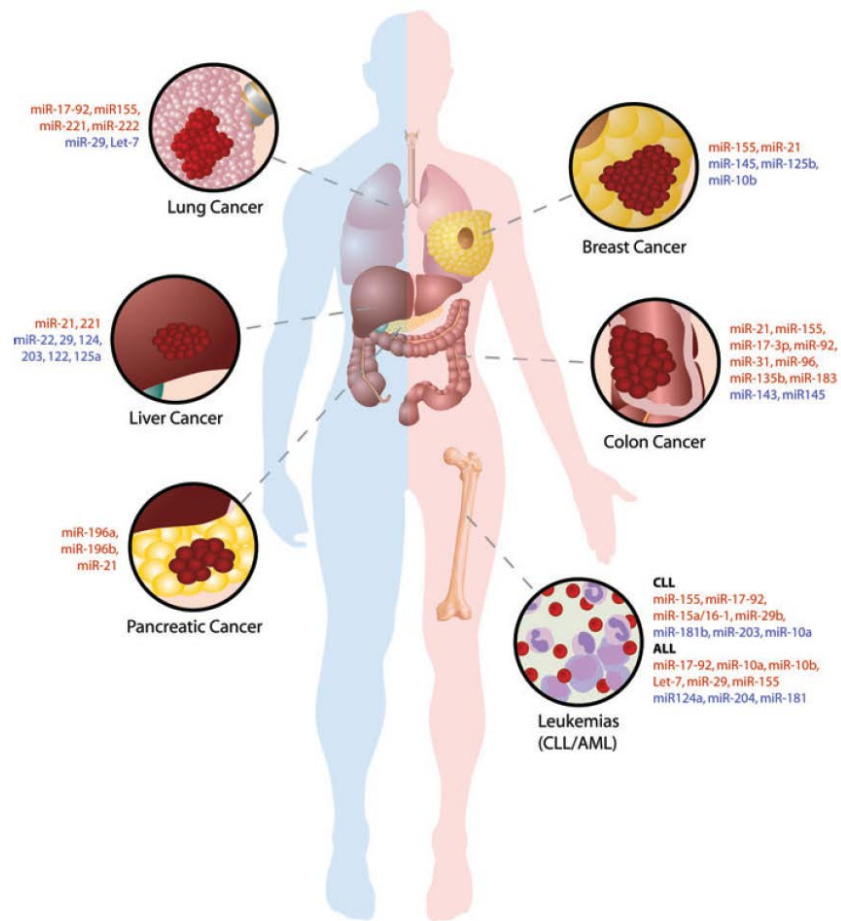


Figure 1. Deregulated miRNA in cancer: red represents increased miRNA, and blues are decreased miRNA.



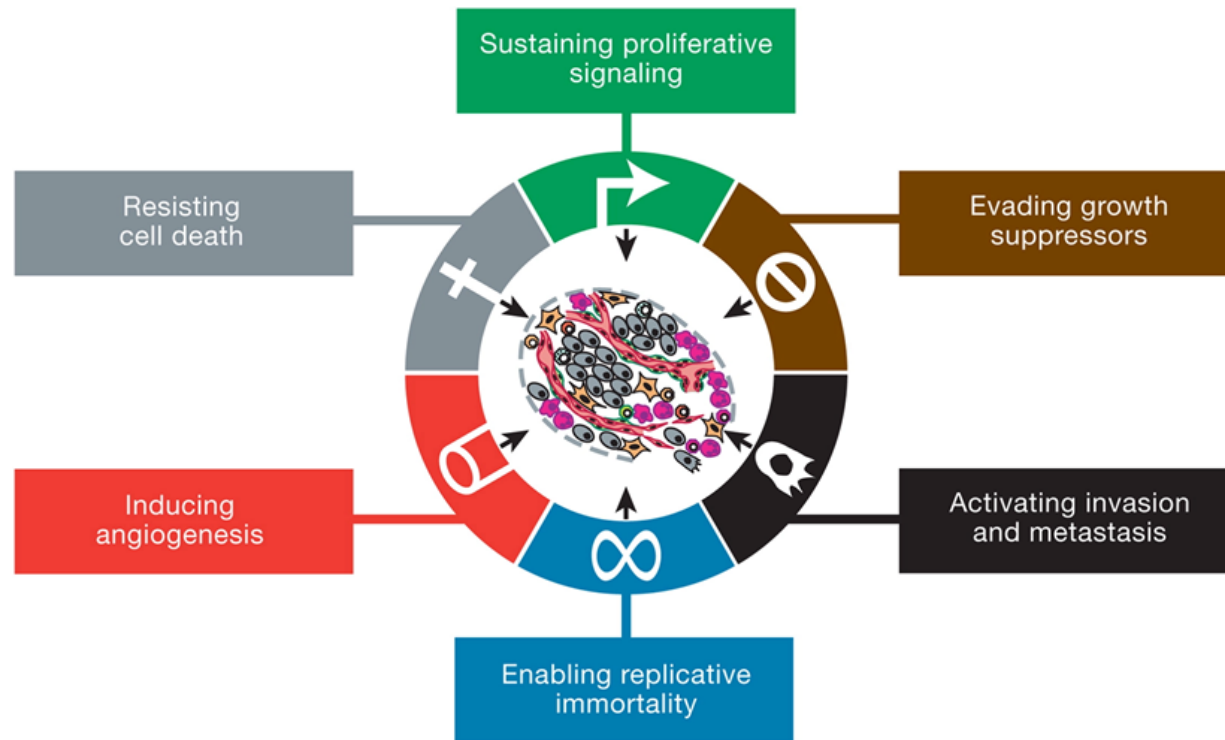
mikroRNA v patogenezi nádorů

Nádorová onemocnění

- Vznik a vývoj několikastupňový proces
- Poškození normálních buněk



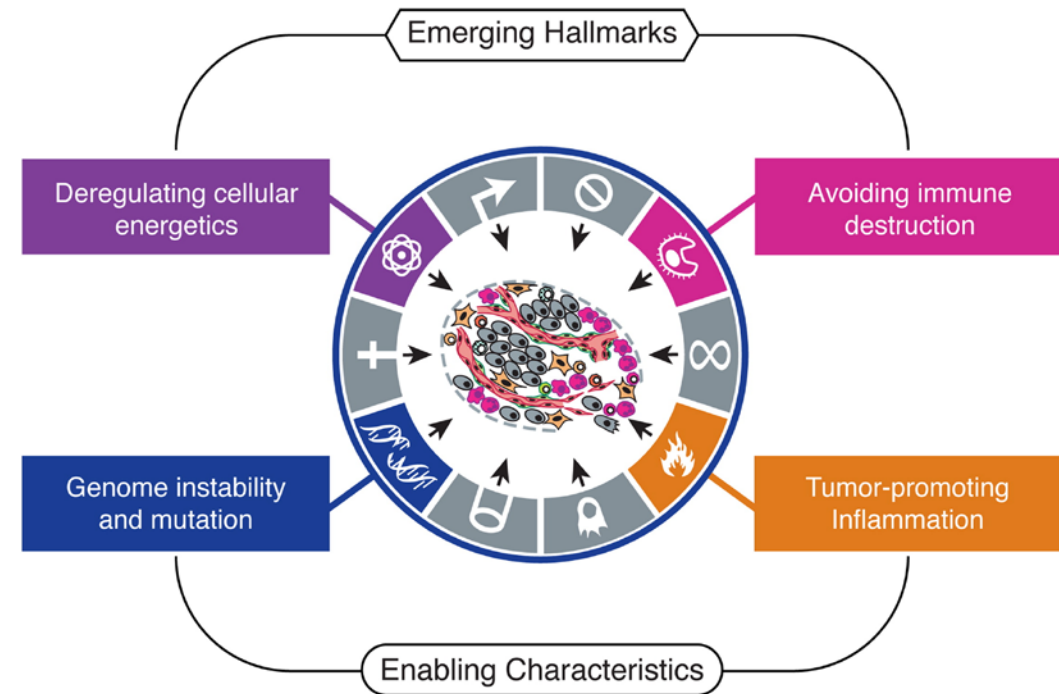
Hallmarks of cancer – 44 115x citováno



Hanahan a Weinberg 2000

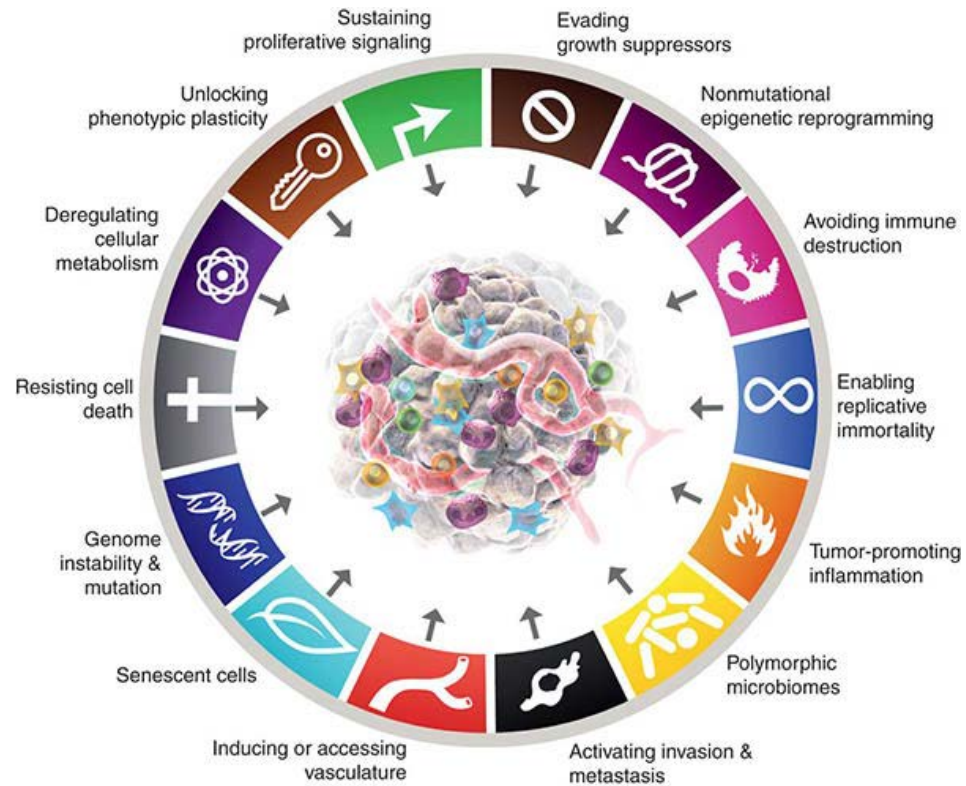
Hallmarks of cancer - the next generation (79 063x citováno)

- Deregulace energetického metabolismu
- Únik před imunitním systémem
- Genomová nestabilita a mutace
- Nádorem vyvolaný zánět



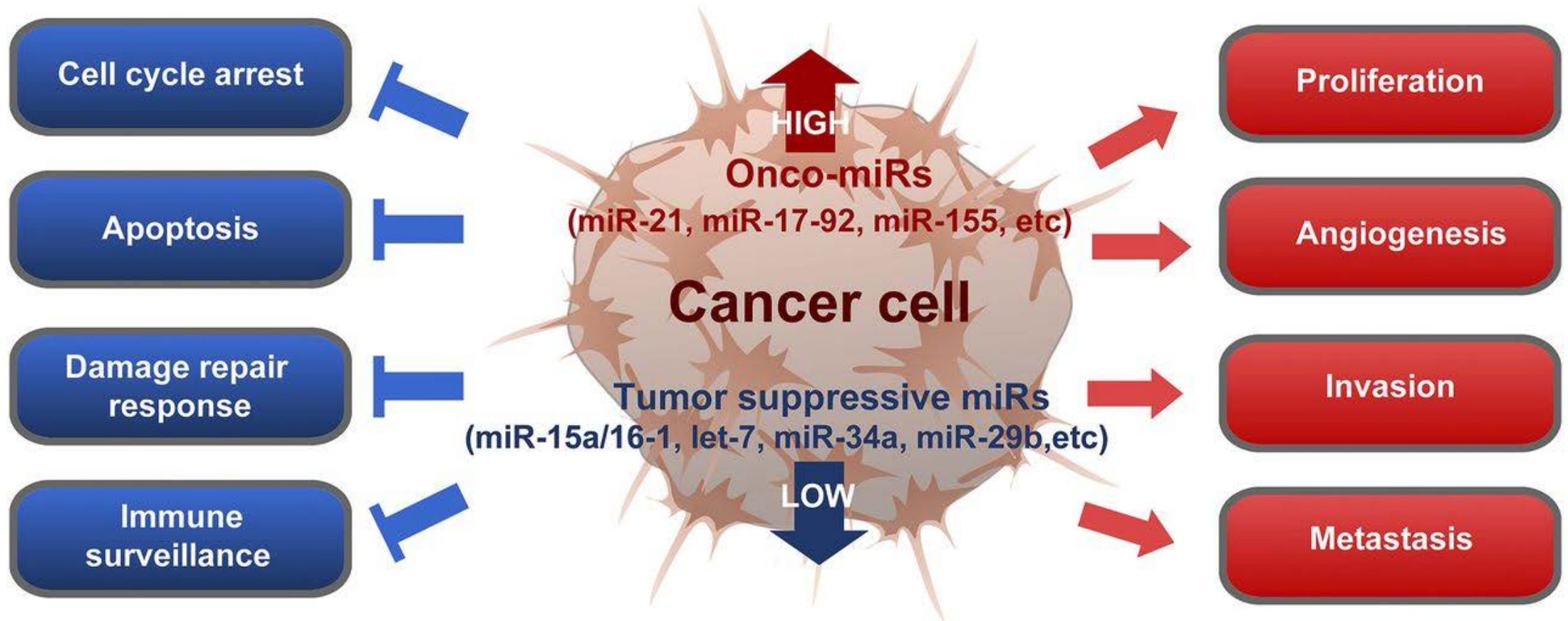
Weinberg and Hanahan, 2011

NEW DIMENSIONS (2022) (6232X CITOVÁNO)

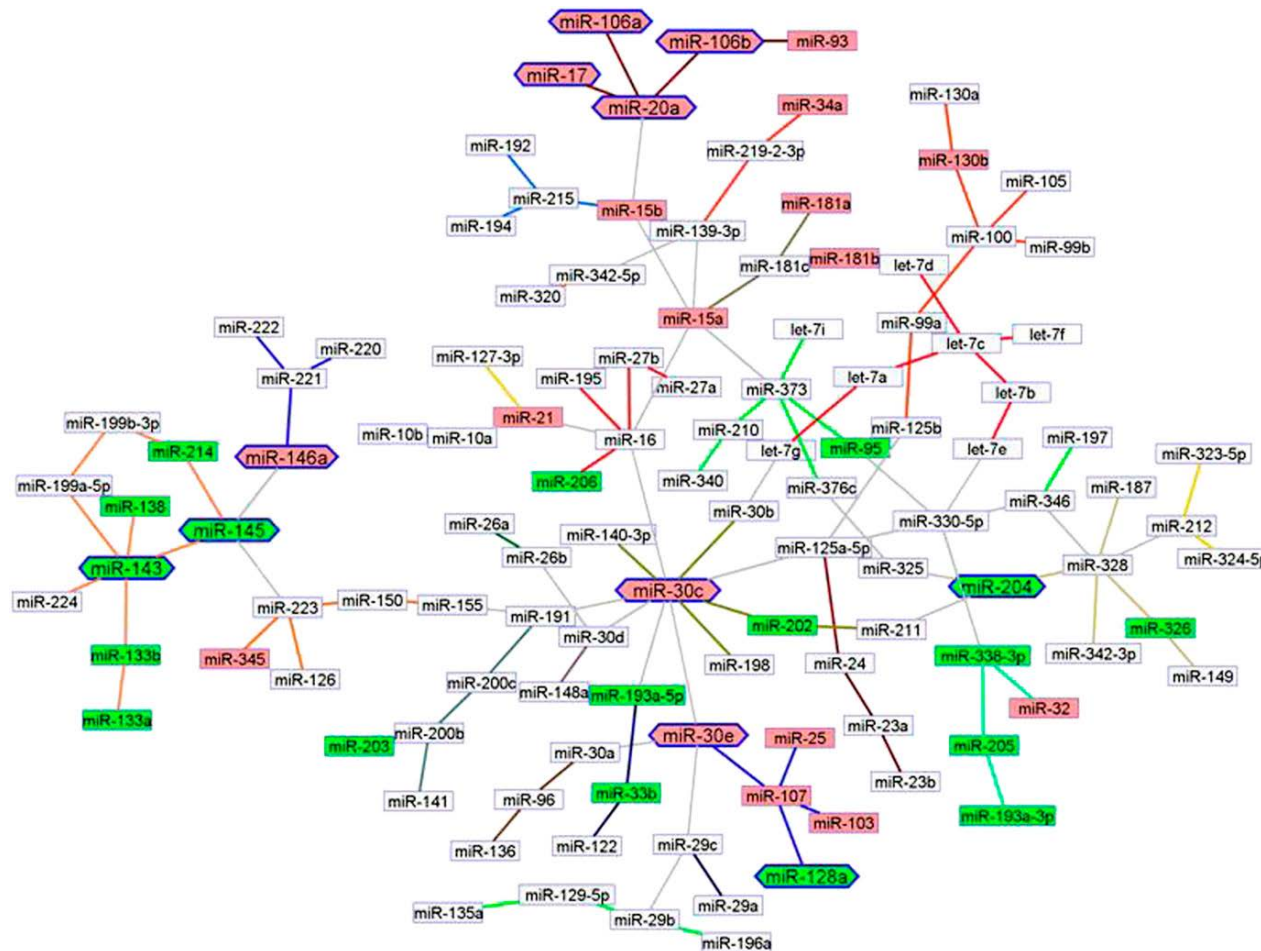


Hanahan 2022

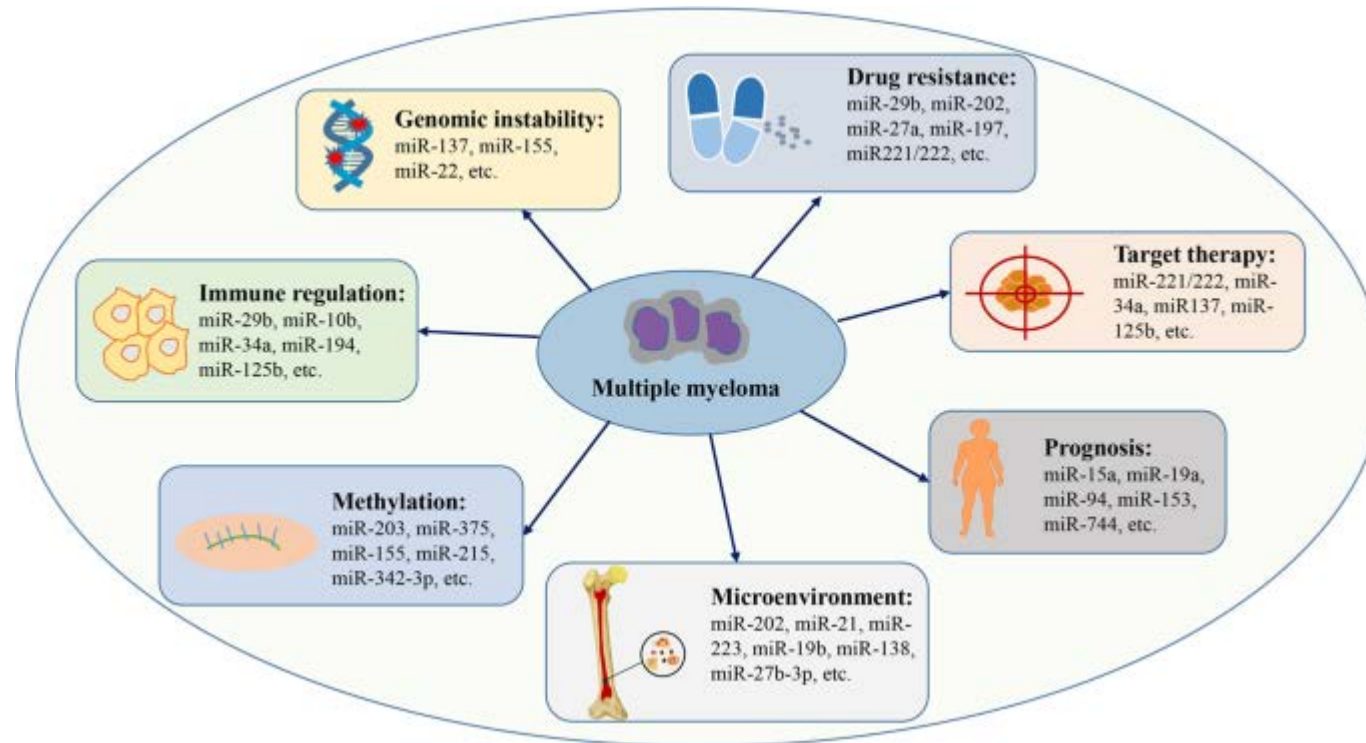
Hallmarks of cancer and microRNA



miRNA network in solid tumors



MiRNA u mnohočetného myelomu



Cirkulující miRNA



Cirkulující miRNA

- Ve všech tělních tekutinách
- Sérum, plasma, moč, sliny, mateřské mléko
- Stabilní, resistantní ke štěpení, odolné vůči extrémní teplotě i pH
- Stabilní i po opakovaném rozmražení
- Funkce neobjasněná
- Profily exprese korelují s patologickými stavy (malignity, diabetes, poškození tkání)
- Biomarkery infarktu myokardu (miR-208a), sepse (miR-223)



Cirkulující miRNA

- 2008- sérové hladiny miRNA u pacientů s B-lymfomem – zvýšení miR-21 (Lawrie et al)
- Mitchell – plasma –miRNA jako volné struktury
- Chen – profily sérových miRNA jako markerů nádorů, diabetu a zdravých jedinců
- Celkem v 11 tělních tekutinách
- Nádory močového měchýře – miR-126 a 182 v moči
- Nádory ústní dutiny – miR-96 a 183 ve slinách



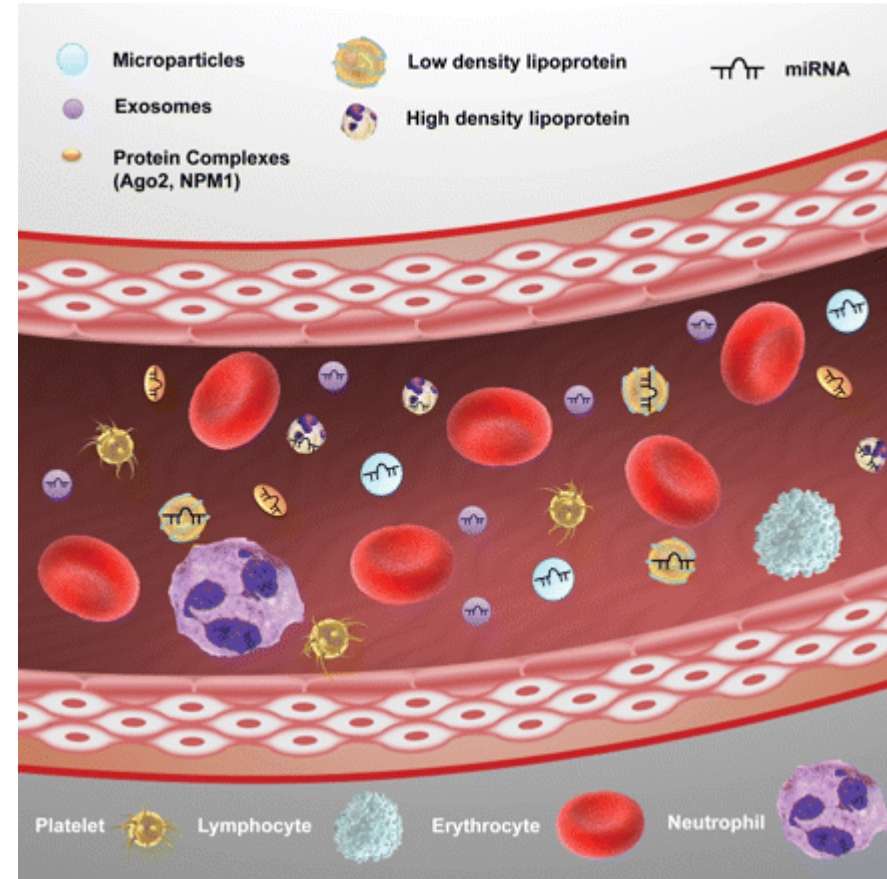
Cirkulující miRNA

- Diagnostické biomarkery
 - U nádorů bez markeru – renální karcinom
 - Vylepšení specificity a sensitivity testů
- Molekulární klasifikace nádorů
 - Minimálně invazivní marker
 - Hladina miR-375 a miR-141 lze identifikovat rizikové pacienty s karcinomem prostaty



Cirkulující miRNA -vznik

- Pasivní uvolnění z poškozených, nekrotických nebo apoptotických buněk
- Aktivní sekrece cestou buněčných vezikul
- Vezikuly z kultivovaných buněk nebo periferní krve obsahují miRNA
- Transportní mechanismu pro doručení miRNA



Cirkulující miRNA- stabilita

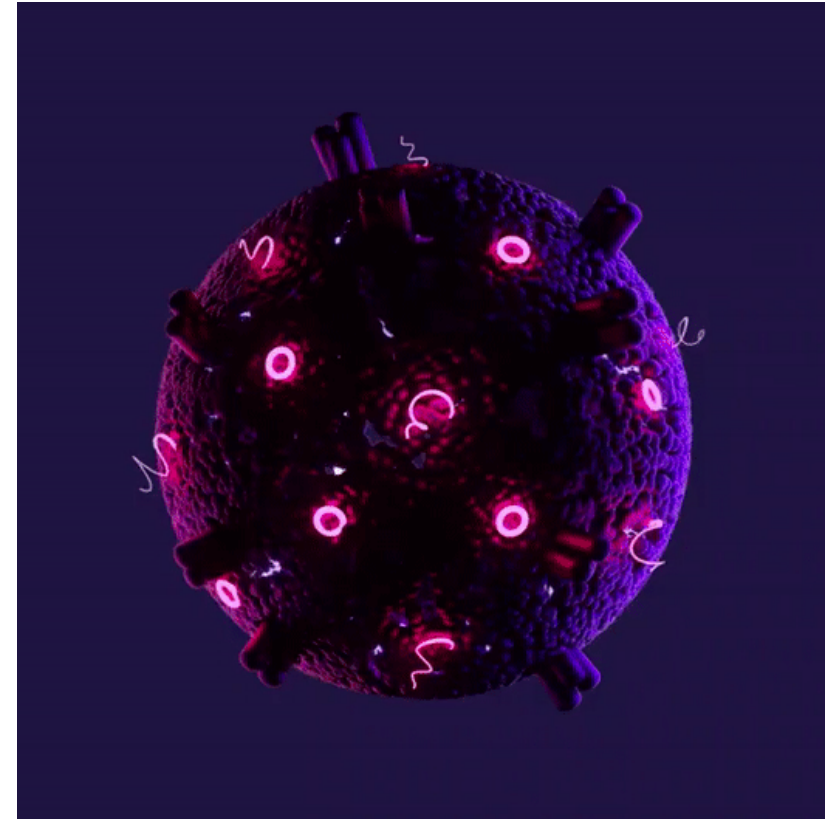
- Chráněny zabalením do mikrovezikul
- Vazbou na jiné proteiny
- Modifikace

- Možná kombinace všech ale zatím neprokázáno



Exozomy

- Extracelulární váčky o velikosti 30-100 nm
- Vylučovány všemi buněčnými typy
- Nachází se ve všech tělních tekutinách
- Obsah: DNA, RNA, proteiny, lipidy
- Role v mezibuněčné komunikaci
- Aktivní sekrece z buněk
- Mění genovou expresi, signalizaci v buňkách
- Udržují resistenci k chemoterapii
- Podporují tumorigenezi – předávání miRNA



www.izon.com/qev



Babak Myeloma Group
Department of Pathophysiology
Faculty of Medicine, Masaryk University

MUNI
MED

miRNA jako terapeutické cíle

mikroRNA jako terapeutické cíle

- Významně pozměněná exprese- nádor-zdravá tkáň
- Funkce jako supresor nebo onkogen
- Terapeutické cíle?
- miRNA- schopnost regulovat desítky až stovky genů v rámci jedné signální sítě - účinný regulátor fyziologických procesů ale i maligní transformace



mikroRNA jako terapeutické cíle

- Inhibiční strategie
- Substituční strategie



Inhibiční strategie

- Nízkomolekulární inhibitory ribonukleáz nebo proteinů zapojených do biogeneze a funkce miRNA (inhibice citlivější u nádorové buňky)
- Specifická skupina antagonistů (anti-miR)- tlumení exprese miRNA v nádoru s patologickou aktivací



Farmaceutické společnosti zabývající se miRNA

- Santaris Pharma- Miravirsen
- Regulus Therapeutics
- Mirna Therapeutics
- MIRagen Therapeutics



Miravirsen

- Úspěšné ukončení fáze II klinického testování
- Léčba hepatitidy C
- LNA-antimiR cílí miR-122, specifická pro jaterní buňky a nezbytná pro replikaci viru
- Ovlivňuje hostitele ale ne virus – nízká pravděpodobnost vzniku resistance



Substituční strategie

- U nádorů globální snížení miRNA – zaměření na miRNA se sníženou expresí v nádoru
- miRNA mimics – dvouřetězcové oligonukleotidy- stejná sekvence s endogenní miRNA – regulace stejného souboru genů
- Chemické modifikace ke zlepšení farmakokinetických vlastností
- Modifikace do passenger řetězce – neovlivní se regulační potenciál vedoucího řetězce
- Naklonovat prekurzor do adenovirového vektoru



Transportní systémy pro miRNA

- Nutné zajistit stabilitu a specificitu oligonukleotidů při podání
- Předpoklad nežádoucích účinků- hepatotoxicita, imunitní odpověď, nespecifická regulace exprese necílových genů
 - Virová strategie
 - Nevirová strategie – chemické modifikace, liposomy, biopolymery, nanočástice...



Metody detekce miRNA

Identifikace nových miRNA

- Přímá genetika – analýza mutantních genů
- Klonování miRNA- knihovny cDNA, sekvenování
- Sekvenování nové generace – krátké sekvence
- Bioinformatika – doplňující metoda – predikce nových miRNA
- miRscan
- miRank



Identifikace cílových genů miRNA

- Vazebná místa pro miRNA v 3' UTR mRNA
- Krátká oblast (6-8 nt) v 5' konci maturovaných miRNA je klíčová pro interakci mRNA-miRNA
- Krátká délka párování - spousta falešně pozitivních výsledků
 - TargetScan
 - miRanda
 - PicTar



Databáze miRNA a jejich cílů

- MiRBase microrna.sanger.ac.uk
- TarBase diana.cslab.ece.nuta.gr/tarbase
- miRWalk www.ma.uni-heidelberg.de
- miRecords mirecords.biolead.org
- 21 264 miRNA – release 19 (srpen 2012)



Metody detekce miRNA

- Northern blot
- *In situ* hybridizace
- qRT-PCR
- Microarrays - profilování miRNA
- NGS



RNA interference



Babak Myeloma Group
Department of Pathophysiology
Faculty of Medicine, Masaryk University

MUNI
MED

RNA interference

- 1990- Jorgensen – petúnie – změna barvy zvýšením hladiny enzymu pro barvu
- Výsledek: snížení hladiny jak endogenního tak vloženého genu
- U živočichů- Cornell university C.elegans 1995
- 1998- Fire, Mello RNA interference – současné podávání sense i antisense RNA aditivní efekt- nutné použít dsRNA
- 2006 Nobelova cena za fyziologii a medicínu



RNA interference

- post-transkripční utišování genů (gene silencing)
- dsRNA je rozštípána na 21-23 nt fragmenty
 - small interfering RNA
 - mikroRNA
 - enzymem Dicer
- siRNAs nebo miRNA je inkorporována do „RNA-induced silencing complex“ (RISC)



RNA interference

Medicine



The Nobel Prize in Physiology or
Medicine 2006

"for their discovery of RNA interference - gene silencing by
double-stranded RNA"



Photo: L. Cicero/Stanford

Andrew Z. Fire

🏆 1/2 of the prize



Photo: R. Carlin/UMMAS

Craig C. Mello

🏆 1/2 of the prize

- 1998 – Fire a Mello na *C. elegans*
- RNAi- obrana proti virům? dsRNA
meziprodukt při replikaci virů
- Specifická degradace cílových mRNA
- Post-transkripční regulace genové
exprese

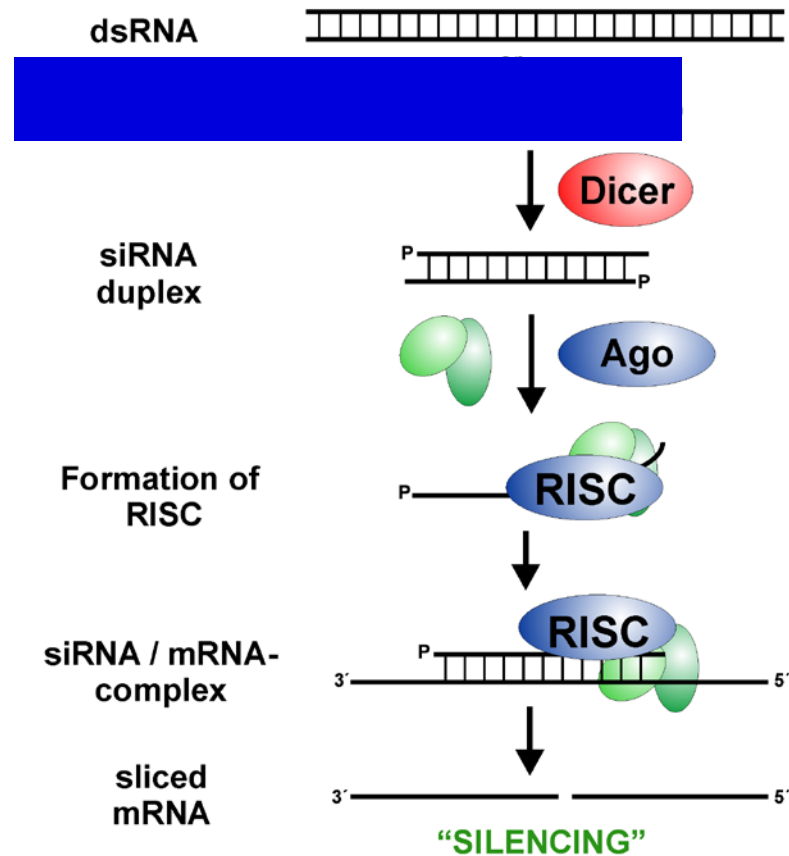
siRNA – small interfering RNA

- dsRNA, 19-23 nt, cizorodá
- Může být i endogenní (přepisem centromerické nebo repetitivní oblasti DNA)
- Využití v *in vitro* pokusech
- Syntetická siRNA do buněk – specifické umlčení exprese jakéhokoliv genu

Noll et al., 2011
Marinez et al., 2002
Wang et al., 2011



siRNA silencing



Další typy krátkých ncRNA

piRNA (piwi associated RNA)

- Délka 24-32 nt
- PIWI proteiny (jaderné proteiny, příbuzné Ago)
- Mechanismus biogeneze neznámý
- Tumorigeneze

snoRNA

- Délka 60-300 nt
- Jadérko



Další typy krátkých ncRNA

- paRNA (promotor associated RNA)
 - Délka 18-200 nt
 - Regulace exprese protein-kódujících genů umlčováním epigenetických komplexů
 - Lokalizace v blízkosti promotorů

Počet genů paRNA koreluje s aktivitou promotoru

- RNA interagující s centromerickými repeticemi

Costa, 2010

Morris *et al.*, 2008



Dlouhé nekódující molekuly RNA

lncRNA



Dlouhé nekódující molekuly RNA

- > 200 nt
- Intergenové, intronové, ...
- Většinou v jádře
- Transkripce RNA polymerázou II (III)
- Post-transkripční modifikace
- Nepřítomnost otevřených čtecích rámců (ORF)
- Tkáňově specifická exprese
- Regulace genové exprese

Mercer, 2009

Derrien, 2012



Babak Myeloma Group
Department of Pathophysiology
Faculty of Medicine, Masaryk University

MUNI
MED

LncRNA u nádorů

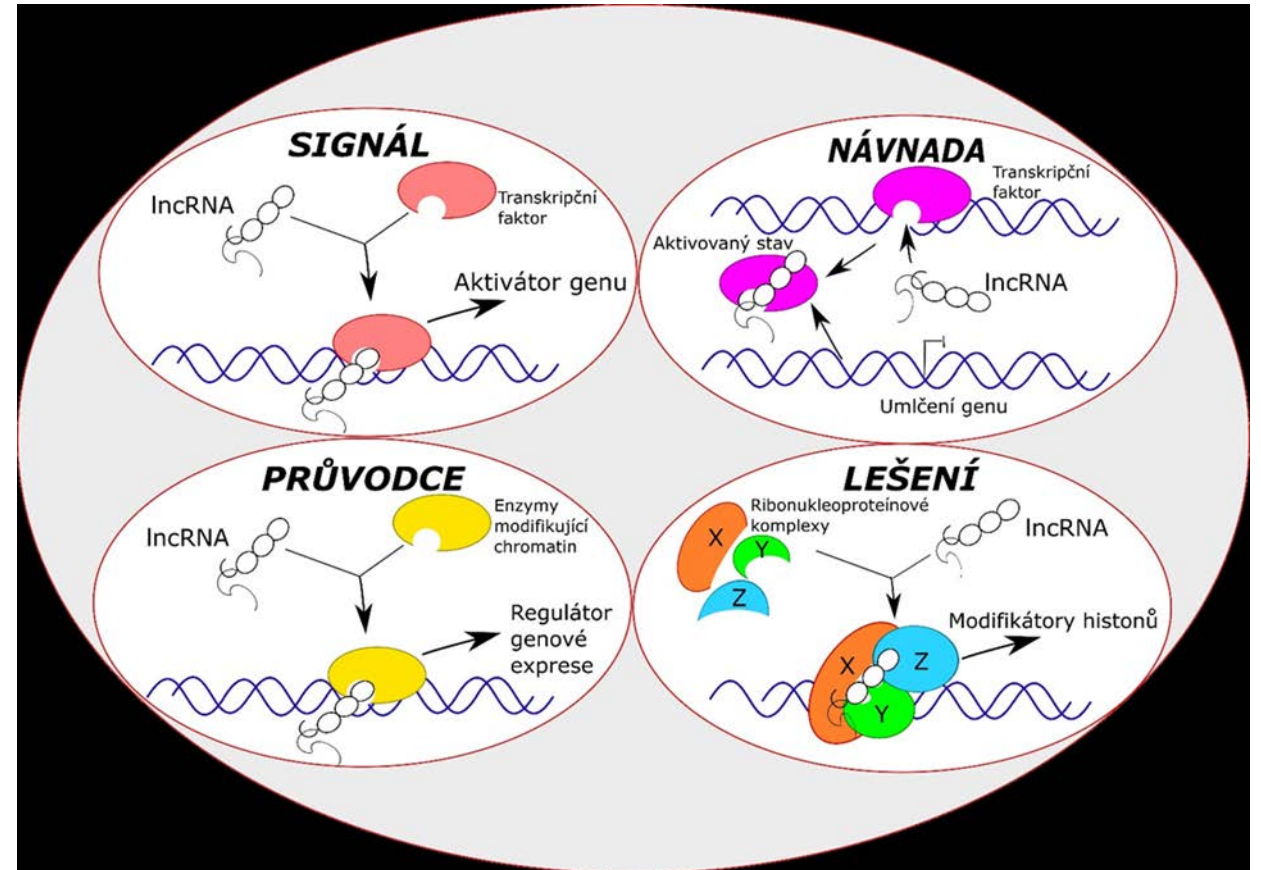
- Účast na mnoha biologických procesech, včetně tumorigeneze
- Změny exprese u různých nádorů
- Některé specifické pro daný typ nádoru – PCA3 u karcinomu prostaty

Isin, 2015
Zhou, 2015



Molekulární podstata funkce lncRNA

- Aktivace transkripce genů
- Represe transkripce genů
- Modifikace funkce chromatinu a histonů



Mercer, 2009

Derrien, 2012



LncRNA v nádorech

- Účast v mnoha procesech včetně tumorigeneze
- Změny exprese u různých nádorů
- Některé specifické pro daný typ nádoru
 - PCA3 u karcinomu prostaty
- Onkogeny – HOTAIR vysoká exprese v nádorech prsu
- Vznik metastáz a prognóza – HOTAIR
- Supresory – MEG3 – stimuluje transaktivaci p53

Mercer, 2009

Derrien, 2012



Babak Myeloma Group
Department of Pathophysiology
Faculty of Medicine, Masaryk University

MUNI
MED

lincRNA

- Délka 100-10 000 nt
- Lokalizace mezi geny
- Vysoký stupeň evoluční konzervace
- Více než 3000 lidských lincRNA
- Funkce: genomový imprinting, vývoj, tumorigeneze
- Prognostické a terapeutické markery, cílená terapie?
- „miRNA houby“ -> redukce hladiny miRNA



Dlouhé intronické ncRNA

- Lokalizace v intronech
- Vysoký stupeň evoluční konzervace
- Regulace genové exprese
- Tumorigeneze

Louro et al., 2008
Rearick et al., 2011
Tahira et al., 2011



Další typy ncRNA

- S telomerami asociované ncRNA
 - Délka 100 bp – 9kb
 - Lokalizace genů v telomerických oblastech
 - Regulace telomerázové aktivity
 - Eukaryontní organismy včetně člověka
- Dlouhé ncRNA s duální funkcí
 - Regulační funkce + kódování proteinů

Isken et al., 2009
Schoeftner et al., 2008
Ulveling et al., 2011



Take home message

- Nekódující molekuly RNA – zajímavý typ molekul
- Účastní se fyziologických i patologických dějů v buňce
- Mohou se vyskytovat jako cirkulující formy v periferní krvi
- Velký potenciál jako markery nemocí
- Terapeutické targety?



M U N I
M E D

Děkuji za pozornost



Babak Myeloma Group
Department of Pathophysiology
Faculty of Medicine, Masaryk University