

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



Biologická aktivita miRNA

Bakalářská práce

Autor:	Tereza Virglová
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.
Konzultant práce:	Mgr. Zdeněk Dostál

Olomouc 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití informačních zdrojů, které uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci,

.....

Tereza Virglová

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce Prof. Mgr. Martinu Modrianskému, PhD. za rady a připomínky při vypracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Zdeňku Dostálovi, který mě uvedl do laboratorní praxe a pomáhal mi při řešení problémů, které se během práce v laboratoři naskytly. Velké poděkování také patří celému Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP v Olomouci, za možnost vypracovat zde bakalářskou práci. Velkou úlohu sehrála také má rodina, která mě podporovala během celého studia, za což jim také patří velké díky.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Tereza Virglová
Název práce:	Biologická aktivita miRNA
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Ústav lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého, Olomouc
Vedoucí práce:	Prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D
Konzultant:	Mgr. Zdeněk Dostál
Rok obhajoby práce:	2018
Abstrakt:	MiRNA patří mezi krátké nekódující RNA, které ovlivňují širokou škálu buněčných aktivit. Ovlivněním exprese cílového proteinu MCL-1, mohou miRNA zvyšovat citlivost nádorů vůči chemoterapii. Cílem bylo posoudit alternativní splicing indukovaný vybranými miRNA a možné zvyšování citlivosti buněk na chemoterapii vlivem transportu miRNA 101 a jeho vybraných mutantů do jádra. Pro experimentální práci byly použity metody fluorescenční detekce, imunodetekce a RT-PCR.
Klíčová slova:	miRNA 101, apoptóza, MCL-1
Počet stran:	55
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Tereza Virglová
Title:	Biological activity of miRNA
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc
Advisor:	Prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.
Consultant:	Mgr. Zdeněk Dostál
The year of presentation:	2018
Abstract:	MiRNA is a short, non-coding RNA that could influence a wide variety of cellular processes. By affecting the expression of Mcl-1 protein miRNA may increase the sensitivity of a tumor towards chemotherapies. Aim of this work was to evaluate alternative splicing induced by selected miRNAs and possible increase in cell sensitivity towards chemotherapy due to nuclear transport of miRNA 101 and its mutants. Methods of fluorescent detection immunodetection and RT-PCR were used for experiments.
Keywords:	miRNA 101, apoptosis, MCL-1
Number of pages:	55
Number of appendixes:	0
Language:	Czech

Seznam použitých zkratek

miRNA -	micro RNA
pre-mRNA -	primární transkript mRNA
pri-miRNA -	primární transkript microRNA
pre-miRNA-	prekurzorová microRNA
RISC -	RNA-induced silencing protein
mRNA -	mediátorová RNA
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8 (Pasha)
Exportin 5-	enzym transportující pre-miRNA z jádra do cytoplazmy
tRNA -	transferová RNA
ncRNA -	nekódující RNA
lnc RNA -	dlouhé nekódující RNA
snRNA -	malé jaderné RNA
RNA -	ribonukleová kyselina
DNA -	deoxyribonukleová kyselina
PCNA -	svírací protein při replikaci
TFIID -	obecný transkripční faktor
TATA box –	klíčová část promotoru
poly(A) sekvence -	sekvence opakujících se adeninových bází
snRNP –	malé jaderné ribonukleotidové částice (protein)
3'UTR -	nepřekládaní část nukleotidů mRNA
BCA	kyselina bicinchoninová
IAP	inhibitor apoptózy
TNF	tumor nekrotizující faktor
MDM2	ubiquitin ligase mouse double-minute 2
Bcl-2	lymfom B-buněk
TaqMan polymeráza	Taq polymeráza + PacMan = TaqMan

Obsah

<i>Bakalářská práce</i>	- 1 -
1 Úvod.....	- 8 -
2 Teoretická část	- 9 -
2.1 Genetická informace	- 9 -
2.1.1 Replikace.....	- 10 -
2.1.2 Transkripce.....	- 11 -
2.1.3 Druhy RNA.....	- 14 -
2.1.4 Nekódující RNA (ncRNA).....	- 14 -
2.2 Buněčná smrt – apoptóza a nekróza.....	- 17 -
2.2.1 Nekróza	- 18 -
2.2.2 Apoptóza	- 18 -
2.2.3 Iniciace apoptózy.....	- 19 -
2.3 Topoizomerázy.....	- 24 -
2.3.1 Topoizomerázové inhibitory	- 25 -
3 Cíle práce.....	- 28 -
4 Experimentální část.....	- 29 -
4.1 Chemikálie.....	- 29 -
4.2 Kultivační médium.....	- 29 -
4.3 Biologický materiál.....	- 29 -
4.4 Přístroje	- 30 -
4.5 Metody.....	- 30 -
4.5.1 Pasážování buněk.....	- 30 -
4.5.2 Kultivace buněk.....	- 31 -
4.5.3 Výsev buněk	- 31 -
4.5.4 Transfekce	- 31 -
4.5.5 Lýza buněk.....	- 32 -
4.5.6 Trizolová metoda	- 32 -
4.5.7 Spektrofotometrické stanovení	- 33 -
4.5.8 Stanovení proteinu metodou BCA	- 33 -
4.5.9 Elektroforéza	- 33 -
4.5.10 Western immunoblotting.....	- 35 -

4.5.11	Extrakce jádra.....	- 37 -
4.5.12	RT-PCR (PCR spojená s reverzní transkripcí)	- 38 -
5	Výsledky a diskuze.....	- 41 -
6	Závěr.....	- 47 -
7	Literatura	- 49 -

1 Úvod

Díky stále se vyvíjejícímu zdravotnictví, které jde ruku v ruce s výzkumem, dochází prakticky denně k vývoji nových léků a léčebných metod, které by měly přispět k rychlejšímu uzdravení pacienta.

Prakticky jakákoli nemoc je u každého jedince modifikována genetickou výbavou, kterou získal od svých rodičů, avšak s různým podílem. Snahou moderní medicíny je odhalit genetickou podstatu vážných nemocí a včasným zásahem ji řešit. Jelikož jsou nemoci důsledkem genetické variability, nabízí se možnost ovlivnění především maligního onemocnění, které se mezi populací objevuje v širokém měřítku, pomocí nekódujících RNA, respektive pomocí terapie založené na změnách exprese ncRNA. Tyto změny by mohly pomoci při léčbě maligního onemocnění, kdy dochází ke snížení účinku léku v organismu a pomoci tak znovu navýšit jejich účinnost. Díky této metodě by bylo možné vyvinout léčivo, které by se zaměřilo na správné fungování apoptózy a s tím spojené zastavení růstu nádorových buněk. Při léčbě nádorových onemocnění se předpokládá, že buňky, které jsou citlivé vůči vyvolání apoptózy, budou lépe reagovat na léčbu, než buňky, které tuto citlivost nemají¹. Značnou výhodou pro pacienta by pak bylo snížení účinné dávky léku a zmírnění vedlejších účinků léku.

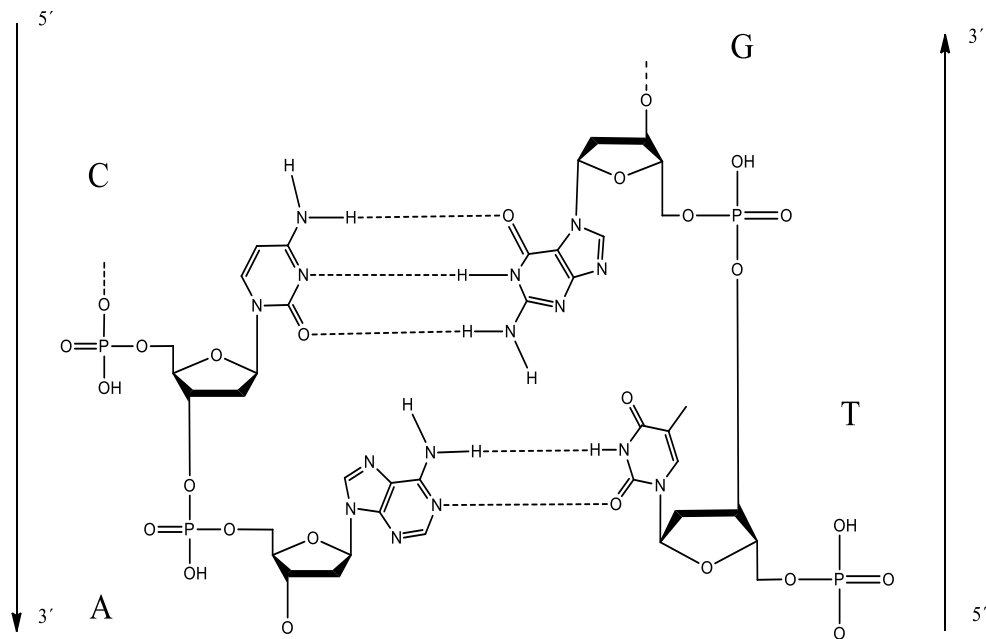
2 Teoretická část

2.1 Genetická informace

Je složena ve formě kódu pouze ze čtyř typů nukleotidů, které jsou základní stavební jednotkou molekuly DNA. Každý nukleotid se skládá z nukleové báze (adenin, guanin, cytosin a thymin), což je dusíkatá heterocyklická sloučenina, připojená pomocí N-glykosidové vazby. Součástí nukleotidů je také zbytek kyseliny fosforečné, který je navázán na 5' konci každého nukleotidu a v neposlední řadě deoxyribózy, vyskytující se v podobě furanózy. Jednotlivé nukleotidy jsou uspořádány podle komplementarity bází (A-T, C-G) do dvou polynukleotidových vláken spojených vodíkovými můstky. Základem molekulární biologie je fakt, že DNA řídí syntézu RNA a dochází k syntéze proteinů.

Soubor celé genetické informace se nazývá genom a během S-fáze dochází k tvorbě kopie. Procesu se říká replikace a níže si postup vysvětlíme. Poté dochází k transkripci, tedy přepisu DNA do mRNA, upravení mRNA pro přenos do cytoplazmy a následný překlad mRNA do proteinu.

V mRNA jsou poskládány jednotlivé nukleotidy do kodonů, tedy tripletů, které tvoří tři po sobě jdoucí báze. Na tRNA jsou k jednotlivým kodonům komplementární antikodony, které nesou aminokyseliny. Všechny aminokyseliny jsou kódovány více triplety, avšak každý jednotlivý triplet kóduje pouze jednu aminokyselinu. Existují i univerzální kodony, bez kterých by syntéza neproběhla, start kodony neboli iniciační kodony jsou místem zahájení translace (AUG, popř. GUG) a stop kodony tzv. terminační kodony ukončují translaci (UAG, UGA, UAA)^{2,3,4}.



Obr. 1: Komplementarita bází v DNA.

2.1.1 Replikace

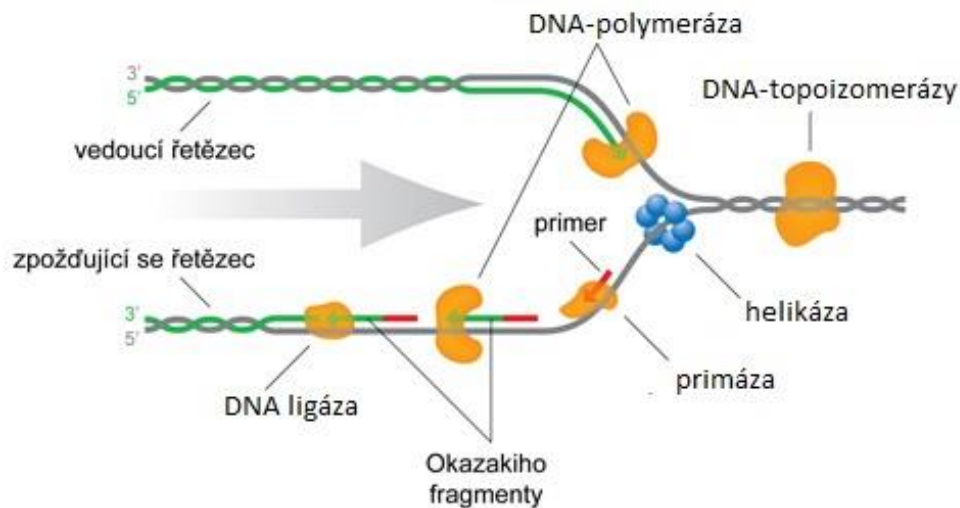
Replikace začíná vytvořením kopie genomu v S-fázi buněčného cyklu. Začíná v replikačních počátcích a pokračuje oběma směry. Dochází k tvorbě dvou replikačních vidlic a replikaci obou řetězců. Z jedné mateřské molekuly DNA vzniknou dvě dceřiné DNA, kdy v každé je jedno vlákno z původní DNA a druhé je nově syntetizované.

Replikaci obstarává řada proteinů, mezi které patří DNA topoizomeráza I, která rozvolňuje stočenou DNA, a helikáza, sloužící k rozvíjení DNA. Mezi tyto proteiny také patří svírací protein (PCNA – proliferating cell nuclear antigen), který upevňuje DNA polymerázu k řetězci DNA. Díky této funkci je polymeráza schopna vytvořit i tisíce nukleotidů bez disociace z vlákna. Jedno z vláken v DNA je vždy vedoucí (leading strand) a druhé opožďující (lagging strand).

Syntéza na vedoucím vlákně probíhá pomocí primázy (DNA-dependentní RNA polymeráza), která vytvoří krátký RNA primer. Pomocí DNA polymerázy pak dochází k navázání prvního nukleotidu. Dochází k syntéze ve směru od 5' k 3'.

Na opožďeném vlákně dochází k replikaci pomocí tzv. Okazakiho fragmentů. Na fragmenty se připojí primery (Pol α /primáza), které jsou startem pro DNA polymerázu.

Po tvorbě tisíců nukleotidů se syntéza zastaví a vznikají další fragmenty. Okazakiho fragmenty obsahují RNA primery, které se odstraní a fragmenty se vyplní pomocí DNA-ligázy^{3,4}.



Obr. 2: Grafické znázornění replikace DNA.

Pomocí topoisomerázy dochází k rozvolnění dvoušroubovice. Od 5' konce dochází ke vzniku vedoucího řetězce pomocí DNA-polymerázy, od 3' konce řetězce dochází pomocí primeru k vytvoření Okazakiho fragmentů, které spojí DNA ligázou a řetězec je opožděný.

(Převzato http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=retezec_zpozdujici_se 23. 8. 2017)

2.1.2 Transkripce

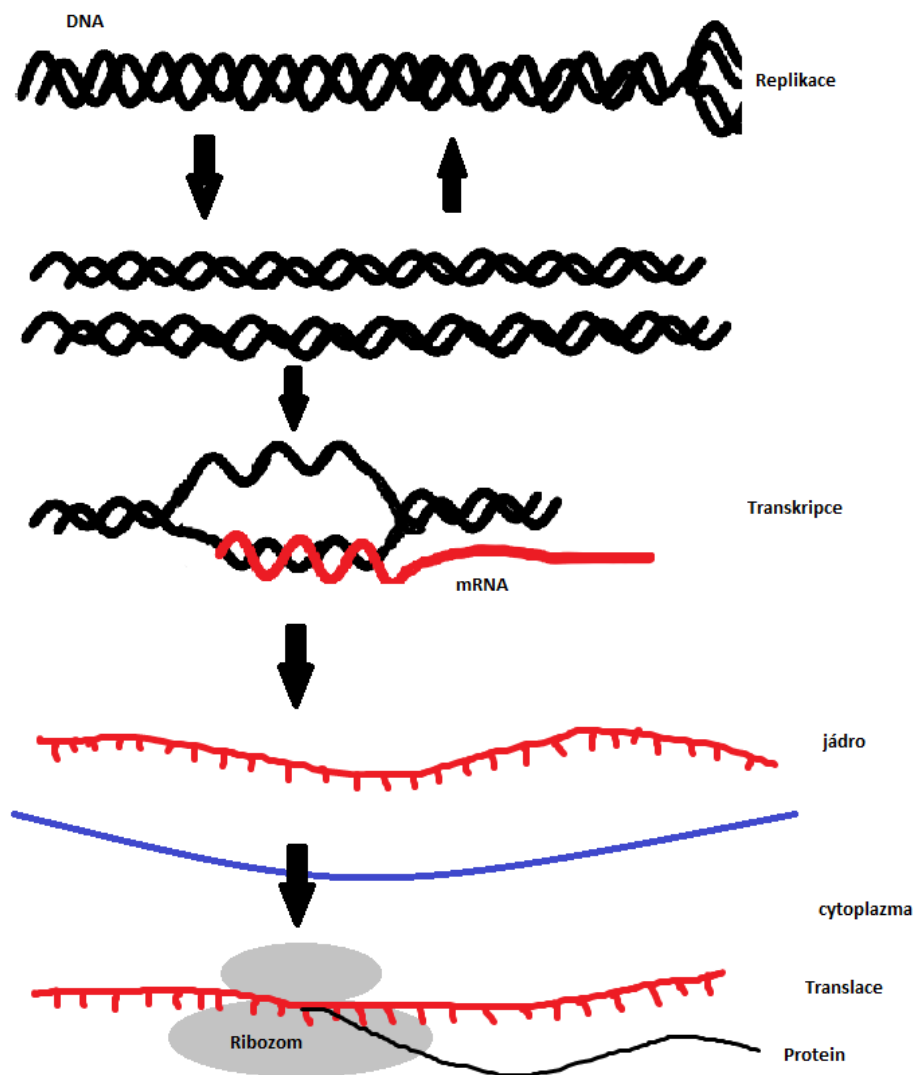
Pomocí transkripce dochází k přepsání DNA do RNA. Nejprve dochází k malému rozvolnění dvoušroubovice a nasednutí RNA polymerázy (ve směru od 5' konce k 3' konci). RNA polymeráza není schopna zahájit transkripci sama a k tomu jí pomáhají obecné transkripční faktory v nasednutí na promotor, oddělení řetězců i v uvolnění z promotoru. Krátká sekvence DNA tzv. TATA box je rozpoznán TFIID, kdy dochází k ohybu DNA a nasednutí transkripčních faktorů a RNA polymerázy k promotoru vede ke vzniku transkripčního komplexu. Pomocí ATP dojde ke změně konformace a uvolnění RNA polymerázy. Obecné transkripční faktory se uvolní také a poslouží k iniciaci v jiném místě. Ve fázi iniciace se dvoušroubovice po navázání rozvolní a jedno vlákno je templátem pro RNA. Během elongace se řetězec RNA prodlužuje a DNA se spojí a stočí do šroubovice. RNA je vytěsněna jako jednovláknová tzv. pre-RNA. Replikace si je

s transkripcí v jistých ohledech podobná. RNA-polymeráza však postrádá oproti DNA-polymeráze korektorskou schopnost. Transkripce však nemusí být tak přesná jako replikace DNA, protože RNA není určena k trvalému uchování genetické informace.

Takto vzniklá RNA podléhá v jádře posttranskripčním úpravám. Na 5' konec se přidá čepička, tvořená z 7-methylguanozinu, která je spojena esterovou vazbou s 5'OH skupinou ribózy. Na 3' konec je přidána sekvence adeninových bází (poly(A) sekvence). Tyto modifikace chrání RNA před předčasným enzymatickým štěpením, pomáhají při transportu z jádra do cytoplazmy a stabilizují molekulu RNA.

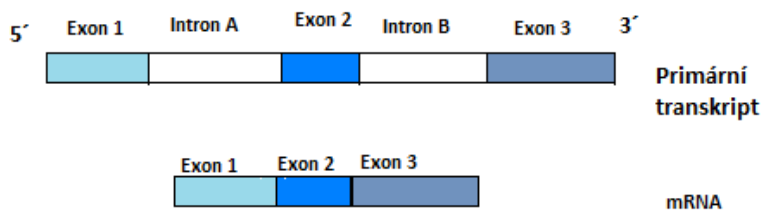
Po transkripci dochází k sestřihu (splicing) a odstranění nekódujících částí (intronů). Sestřih probíhá pomocí spliceozomů, které jsou tvořeny snRNP částicemi (small nuclear ribonucleoprotein particles). Specifické sekvence intronu jsou rozpoznávány těmito částicemi, které rozštěpí transkript v místě hranice exonu a intronu a propojí exony.

Po skončení všech posttranskripčních úprav dochází k transportu RNA přes jaderné póry do cytoplazmy. V cytoplazmě dochází k translaci neboli překlada RNA v protein^{3,4}.



Obr. 3: Grafické znázornění transkripce a translace.

V jádře nejprve dochází k vzniku mRNA, která putuje z jádra do cytoplazmy po posttranskripčních úpravách. Poté dochází k translaci a vzniku proteinu.



Obr. 4: Schéma sestřihu primárního transkriptu.

Po transkripci dochází k sestřihu kódujících částic (exonů) a odstranění nekódujících částí (intronů).

2.2 Druhy RNA

Mezi RNA patří i krátké a dlouhé nekódující RNA, které se nepřekládají do proteinů⁵. Mezi tyto typy patří skoro všechny RNA, kromě mRNA. RNA je v jistých ohledech podobná DNA, avšak má své specifické vlastnosti. Mezi ně patří sacharidová část, kterou je u RNA ribóza místo deoxyribózy. Oproti DNA se s adeninem páruje uracil namísto thyminu a je jednořetězová. Některé typy RNA jsou součástí proteosyntézy. Mezi ně patří mRNA, tRNA a rRNA.

2.2.1 Kódující RNA

2.2.1.1 mRNA

mRNA (mediátorová RNA) je jednou z nejrozšířenějších typů. Její hlavní úloha spočívá v přenosu genetické informace z DNA. Aby mRNA mohla prostoupit do cytoplazmy je na 5' konci čepička a na 3' konci poly(A) sekvence. Tyto modifikace se dějí během transkripce (kotranskripčně). Spojuje se s velkou a malou podjednotkou rRNA a překládá informaci v protein⁶.

2.2.2 Nekódující RNA (ncRNA)

Nekódující RNA se podle velikosti dělí do dvou skupin – krátké a dlouhé nekódující RNA. Jejich hlavní odlišností od kódujících je nemožnost překlada do proteinu. Dlouhé nekódující RNA se staly podnětem pro mnoho výzkumů, jelikož se účastní mnoha regulací⁷. Mezi krátké nekódující RNA (20-30 nukleotidů dlouhé⁸) patří například miRNA, siRNA a piRNA. Do dlouhých spadají lincRNA, TERRA a další⁵.

2.2.2.1 Transferová RNA (tRNA)

tRNA pomáhá mRNA dekódovat sekvenci do proteinu. tRNA má tvar jetelového listu se čtyřmi rameny. Jedním z nich je akceptorové rameno, které váže aminokyselinu, dále dihydrouracilové a pseudouridylové. Další částí je antikodonové rameno s tripletem (antikodonem), které se páruje s příslušným kodonem na mRNA.

2.2.2.2 Ribozomální RNA (rRNA)

Je významná pro svou stavební funkci v ribozomu, který je složen hlavně z rRNA. Ribozom slouží k syntéze proteinů, na němž interaguje mRNA s tRNA. Ribozom eukaryot se skládá z malé (40S) a velké (60S) podjednotky⁹.

2.2.2.3 Malá jaderná RNA (snRNA)

Tyto jaderné RNA se vyskytují v jádře buněk a podílí se na sestřihu mRNA. snRNA tvoří ribonukleoproteinové komplexy (spliceozomy).

2.2.2.4 Dlouhé nekódující RNA (lncRNA)

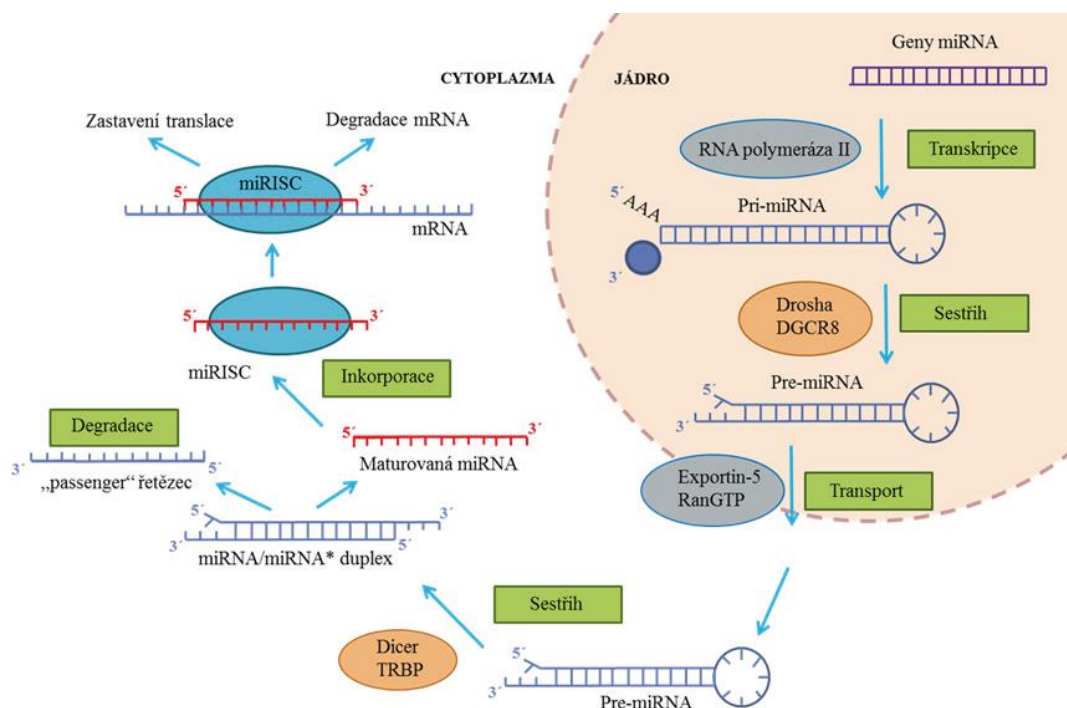
Do této skupiny patří RNA, které dosahují délky kolem 200 nukleotidů¹⁰. Odhaduje se, že jsou zastoupeny v takovém počtu jako kódující proteiny a představují tedy nejrozšířenější typ nekódujících RNA. lncRNA má jistou podobnost v mRNA, jelikož je také zaopatřena na 5'konci čepičkou a na 3'konci je poly(A) sekvence. Dlouhé nekódující RNA se vyskytují z větší části v jádře, kde řídí jaderná tělíska. Tělíska se vyskytují jako jednotlivé komponenty a shlukují se, pokud buňka potřebuje jejich větší aktivitu.

2.2.2.5 Micro RNA (miRNA)

Když se v roce 1993 dostal do podvědomí první článek o miRNA, mnoho vědců se začalo miRNA zabývat. Základem této práce bylo zjištění, že miRNA je ve dvou formách, delší a kratší, kdy delší je prekurzorem kratší variantě. Hlavním milníkem v této práci je fakt, že tyto molekuly RNA se nepřepisují do žádného proteinu¹¹. V dnešní době existuje více než 12 600 publikací¹² o vztahu miRNA a její spojitosti s rezistencí léčiv. Tato spojitost vede ke snaze vyrobit léčivo, které by mělo výbornou účinnost, zásadní vliv na zdraví pacienta a snížení celkových nákladů na jeho léčbu¹³. Objev miRNA a jeho následný důsledek při léčbě rakoviny otevřel dveře novým terapeutickým studiím. Stabilita, snadné zacházení a snadná detekce vede k lepším individuálním léčbám a monitoringu rakoviny. Velký potenciál v miRNA je z důvodu použití jako diagnostického markeru pro zjištění návratu onemocnění, její odpovědi na léčbu a předurčení, zda dojde ke vzniku metastáz. Díky jejímu navázání na mRNA by mohlo docházet k cílenému zastavení proliferace nádorových buněk¹².

Jedná se o malé nekódující částice, které jsou 19–23 nukleotidů dlouhé. Jsou komplementární k mRNA a ovlivňují její regulaci. MiRNA vzniká transkripcí z DNA. Jelikož se však nachází v intronech, nekóduje tedy proteiny a nepodléhá translaci. Během transkripce dochází ke vzniku tzv. primárního transkriptu (pri-miRNA) pomocí RNA polymerázy II¹⁴. Výsledný transkript, který je stovky až tisíce nukleotidů dlouhý je zaopatřen na 5'konci čepičkou a na 3'konci poly(A) sekvencí. První úpravy začínají pomocí proteinového komplexu (Mikroprocesor), který je složený z nukleázy jménem

Drosha¹⁵ (RNAáza III) a DGCR8 (Pasha)^{16,17}. Drosha rozezná pri-miRNA od ostatních prekurzorů RNA, které nesou vlásenky. Protein Pasha rozezná dsRNA a hledá místo sestřihu, který učiní Drosha. Dojde tak ke změně pri-miRNA na pre-miRNA, která je kratší a tvaruje se také do vlásenkové struktury. Pre-miRNA se pomocí Exportinu 5¹⁸ transportuje skrze jaderné póry z jádra do cytoplazmy. Pre-miRNA je rozpoznána ATP-dependentním multidoménovým enzymem Dicer a sestřihne asi 70 nukleotidů dlouhou pre-miRNA na 19–23 nukleotidů a vytvoří se dvouvláknová miRNA. Tento duplex má vedoucí řetězec, který má za následek umlčení mRNA a vedlejší je určen k degradaci. Takto vzniklá miRNA je schopna vázat se do komplexu RNA-induced silencing complex (RISC)¹² a naváže se na 3'UTR konec mRNA, podle komplementarity bází^{19,20,21}.



Obr. 5: Grafické znázornění biogeneze miRNA.

Nejprve dochází k transkripci miRNA na pri-miRNA, poté pomocí endonukleáz Drosha a Pasha (DGCR8) dojde k sestřihu a tvorbě pre-miRNA, která se pomocí exportinu dostává z jádra do cytoplazmy. Po spojení s enzymem Dicer dochází znovu k sestřihu na 19–23 nukleotidů za tvorby duplexu. Následně dojde k navázání s RISC.

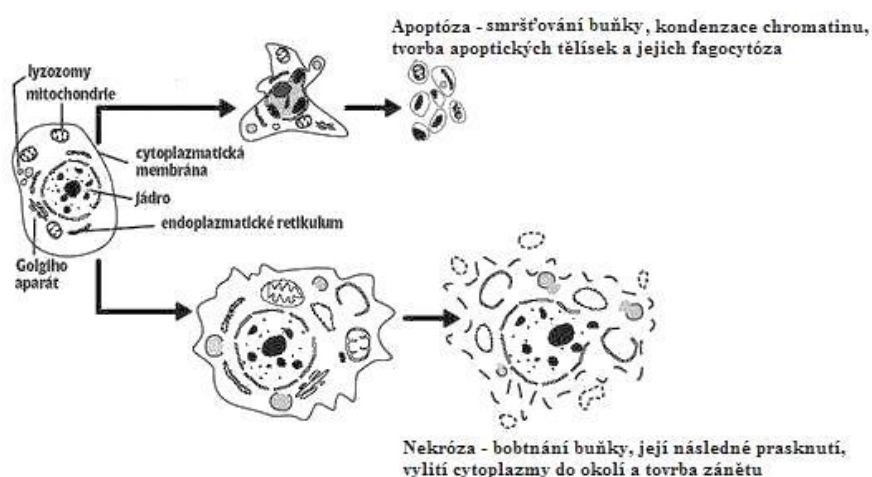
(Převzato z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0114/pdf/08-mirna-biogeneze-lekarstvi.pdf 24. 8. 2017)

2.3 Buněčná smrt – apoptóza a nekróza

Buněčnou smrtí se rozumí ukončení života buňky pomocí dvou dějů. První a zároveň nejznámější mechanismus, který se používá v biochemickém světě, je náhodná smrt, což se může stát ve chvíli, kdy je buňka vystavena určitým vlivům a není schopna tomuto vlivu čelit. Dalším velice důležitým dějem je programovaná buněčná smrt. Tento děj je považován za nezbytný pro správné fungování orgánu nebo snad celého organismu.

Důležitým bodem v organismu je homeostáza, která udržuje rovnováhu mezi buněčnou proliferací a smrtí buňky. Signál pro aktivaci apoptózy je ze samotné buňky, okolních buněk nebo ze samotného imunitního systému²².

Pojmy apoptóza a nekróza se dlouho považovali za dva odlišné procesy buněčné smrti, kdy každý měl jinou biochemickou, morfologickou a funkční charakteristiku^{23,24}. Oba mechanismy se v jistých ohledech liší, avšak není mezi nimi ostrá hranice a dochází k jejich kombinacím.



Obr. 6: Rozdíly mezi apoptózou a nekrózou.

V horní části obrázku je znázorněna apoptóza, kdy dochází k smršťování buňky, kondenzaci chromatinu a následná tvorba apoptických tělísek, která jsou poté fagocytována. Při apoptóze je třeba dodání energie.

V dolní části obrázku je jasně vidět cesta nekrózy. Během ní buňka bobtná, buněčná stěna není schopna tento stav udržet a praskne. Dojde k vylití obsahu buňky do okolí a tvorbě zánětu.

(Převzato a upraveno z <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2004/cislo-8/bunecna-smrt.html> 19. 2. 2018)

2.3.1 Nekróza

Nekróza je jistou alternativou k apoptóze. Při nekróze dochází k tvorbě cytoplazmatických vakuol, praskání mitochondrií, roztržení lyzozomů, narušení membrány organel a narušení celé buněčné membrány. To vede ke ztrátě membránové integrity, uvolnění cytoplazmy a vylití celého obsahu buňky^{25,23}. Charakteristickou vlastností nekrózy je zánětlivá odpověď²⁶. Jedná se o pasivní proces bez spotřeby energie. Nekróza byla považována za neregulovatelnou náhodnou buněčnou smrt, avšak objevují se domněnky, že by také mohla být regulována signálními dráhami a katabolickými mechanismy²⁷. Nekróza se děje u skupin buněk a je aktivována nefyziologickými podněty²².

Nekróza může být aktivována proteázovými inhibitory, buněčným stresem buňky, například pomocí radioaktivního záření, nadbytku vápníku a dalších²⁸.

2.3.2 Apoptóza

Termín apoptóza pochází z řeckého jazyka a ve svém překladu znamená spadnutí okvětních listů z květu nebo opadávání stromů na podzim. Apoptóza byla poprvé popsána v roce 1842 německým vědcem Carlem Vogtem²⁹. První zmínka o průběhu apoptózy je z roku 1972 od J. F. R. Kerr, který popsal morfologické změny při buněčné smrti²⁵. Hlavním cílem apoptózy je odstranění buněk, které jsou škodlivé nebo nechtěné během embryonálního vývoje, tkáňové homeostáze nebo odstranění pomocí imunitního regulačního systému. Porozumění mechanismu apoptózy se hojně využívá při léčbě onkologických onemocnění³⁰. V embryonální fázi je žádoucím dějem takzvaná morfogenetická smrt, kdy dochází k smrti buněk, které dotváří konečnou podobu končetin a orgánů³¹.

Morfologické změny zahrnují kondenzaci chromatinu, smršťování buněk, kondenzace jádra, smršťování cytoplazmy, fragmentace DNA, tvorba apoptických tělísek a jejich následná fagocytóza. Tento děj se vyskytuje u jednotlivých buněk a nedochází k tvorbě zánětu²². Dochází k tvorbě vychlípenin tzv. blebbing^{1,27}. Apoptóza je aktivní proces a je závislá na energii (ATP).

2.3.3 Iniciační apoptózy

Signál pro apoptózu může přijít vnitřní nebo vnější cestou v buňce. Nyní se na tyto dvě cesty detailněji podíváme.

- Vnější cesta

Zahrnuje transmembránové receptory, které jsou součástí receptoru tumor nekrotizujícího faktoru (TNF)³². Receptory, které spadají do TNF rodiny, sdílejí podobné extracelulární domény. Jsou bohaté na cystein a mají cytoplasmatickou doménu o 80 aminokyselinách, kterým se říká domény smrti. Jejich hlavní rolí je přenos signálu smrti z buněčného povrchu k intracelulárním signalizačním cestám³³. K aktivaci vnější dráhy dochází pomocí vazby ligandů smrti (TNF, TRAIL, FasL) na receptory smrti (TNFR, DR4/DR5, Fas). Receptory smrti tvoří trimery a přes další proteiny aktivují prokaspázu-8³⁴.

Kaspázy, rodina cysteinových proteáz, provádějí apoptózu. Obvykle štěpí substrát v místě asparagové kyseliny³⁵. Porozuměním těchto regulací můžeme dospět k terapeutickému zisku. Při apoptóze fungují kaspázy efektorově a iniciačně. Iniciační kaspázy zahrnují savčí kaspázu-9, efektorové zahrnují kaspázu-3 a -7³⁵. Jsou podobné v sekvenci, struktuře a substrátové specifitě k aminokyselinám. Nachází se v cytosolu ve formě proenzymu (30-50 kDa), který obsahuje tři domény: NH₂-terminální doménu, velkou a malou podjednotku³⁵. Aktivace zahrnuje proteolytický proces mezi jednotkami a spojení podjednotek do heterodimeru. Dva heterodimery se spojují v tetramer, který má dvě katalytická místa. V každé katalytické doméně jsou podjednotky úzce spojeny a jsou důležité pro vazbu a katalýzu substrátu³⁶.

Aby byla cesta apoptózy započata, musí nejprve docházet k aktivaci iniciačních kaspáz (kaspázy-8 a -9). Následnou aktivací efektorových kaspáz (kaspázy-3 a -6 a -7) dochází k buněčným změnám během apoptózy.

Inhibitory apoptózy (inhibitor of apoptosis – IAP) jsou proteiny, které potlačují apoptózu pomocí interakce a inhibice aktivačního enzymu. V každém IAP proteinu je funkční

jednotkou BIR doména (bakulovirální IAP). Lidské IAP proteiny se pomocí vazby připojí na efektorové kaspázy (-3 a -7) a blokují vnější i vnitřní cestu apoptózy. Během apoptózy je inhibice kaspáz potlačena rodinou s tetrapeptidovým motivem, do které spadá Smac (DIABLO). Nachází se v mezimembránovém prostoru a poté je uvolňován do cytosolu. Zatímco cytochrom c aktivuje přes apoptozom apoptózu, DIABLO reaguje s IAP proteiny a zmírňuje inhibici zapříčiněnou iniciačními a efektorovými kaspázami³⁵.

Nadměrná apoptóza souvisí s mnoha patologickými nálezy, u kterých jsou terapeutické možnosti velmi omezené. Mezi tyto patologické nálezy patří neurodegenerativní onemocnění a ischemicko reperfuční onemocnění. Kaspázy by tedy mohly být výbornými terapeutickými cíli pro léčbu.

Hlavní problémy onkologické terapie spočívají v usmrcení jak buněk rakovinotvorných, tak zdravých. Alternativní cesta by zahrnovala kaspázy, které by byly aktivovány přímo. Nabízí se možnost aktivovat komplexy receptoru smrti, které jsou spojeny s iniciačními kaspázami. Jelikož jsou receptory smrti i u zdravých buněk je potřeba tyto komplexy aktivovat selektivně. Dalším významným objevem je regulace buněčného cyklu, aktivace kaspáz a následná indukce apoptózy³⁶.

FLIP inhibitor je exprimován ve svalech a lymfoidních tkáních. Tento protein existuje v krátké a dlouhé formě. Krátká forma obsahuje dvě efektorové domény smrti. Obdobné struktury FLIP proteinů se nacházejí u virů, kde slouží proti apoptóze. Dlouhá forma obsahuje doménu podobné kaspáze, kde aktivní cysteinové centrum je substituované tyrozinovými zbytky. Obě formy FLIP inhibitoru reagují s proteinem FADD a proteázou FLICE. Inhibují apoptózu ve všech lidských buňkách pomocí receptorů smrti³⁷.

Receptory smrti jsou na povrchu buněk, na které se vážou ligandy. Navázáním ligandu dochází ke změně konformace receptoru a přenesení signálu do buňky přes transmembránové proteiny receptorů. Mezi ligandy patří TNF ligand, který se vyskytuje u receptorů TNFR-1 a -2. Do rodiny TNF dále patří FasL (pro receptor Fas, označovaný také jako Apo-1 nebo CD95), DR4 a DR5 (pro TRAIL ligand). Rodina TNF se dělí na dva typy, kdy typ I obsahuje intracelulární domény smrti v cytoplazmě, zatímco typ II doménu smrti neobsahuje²².

- Vnitřní cesta

Aktivace této cesty souvisí s ireverzibilním poškozením DNA. Do této cesty se zapojuje celá řada pro- a anti-apoptotických proteinů, které budou v kapitole objasněny. Mezi nejdůležitější patří proteiny z rodiny Bcl-2 a p53³⁴. Mitochondrie hrají zásadní roli v regulacích apoptózy a jsou místem výskytu těchto proteinů²⁹. Poměr pro- a anti-apoptotických proteinů vede k následné inhibici či aktivaci apoptotické dráhy. Po aktivaci proteinů dochází k uvolnění cytochromu C z mezimembránového prostoru mitochondrie. Ten interaguje s proteinem Apaf-1 a prokaspázou-9. Jedná se o komplex zvaný apoptozom a neaktivní prokaspáza-9 se zaktivuje na kaspázu-9. Tyto aktivní kaspázy aktivují efektorové kaspázy a dochází k odstranění poškozené buňky¹. Pro vytvoření apoptozomu a aktivaci kaspázy je třeba dodat energii štěpením, hydrolyzou dATP na dADP.

Pomocí proteinu p53 dochází vnitřní cestou k apoptóze. Hlavním cílem tohoto proteinu je chránit buňku před vznikem nádoru. Jakékoli poškození nádorového supresoru p53 je jednou z hlavních vlastností nádorového bujení. Protein p53 zprostředkovává změny v genové expresi, které podporují apoptózu a kontrolní body buněčného cyklu^{38,39}. Základním cílem protinádorové léčby je aktivace proteinu p53.

V běžné buňce je koncentrace proteinu nízká, avšak DNA poškození a stres může tuto hodnotu zvýšit. Hlavním cílem u poškozené buňky je zastavit její růst, zastavit buněčný cyklus, opravit chybnou replikaci v poškozené DNA a přechod buňky do apoptózy, aby se zabránilo proliferaci DNA⁴⁰.

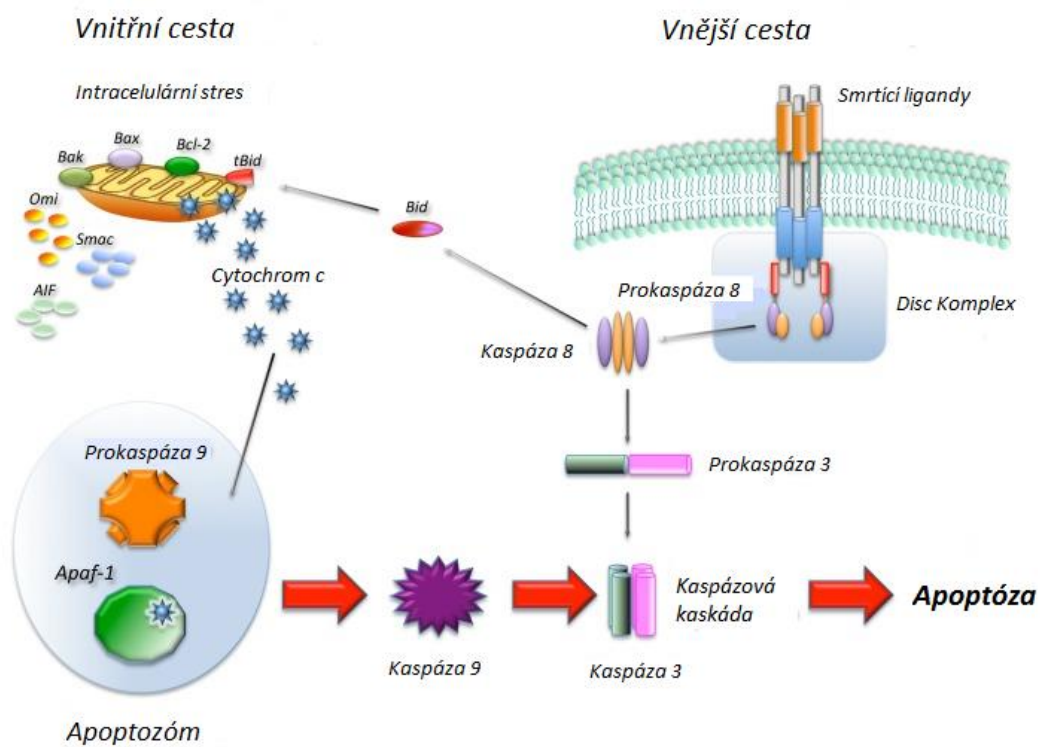
Protein p53 je regulován pomocí enzymu MDM2 (ubiquitin ligase mouse double-minute 2). Tento enzym pracuje jako ubikvitin ligáza 2, který předává p53 do proteasomu k degradaci⁴¹. P53 může být regulován fosforylací pomocí kináz, které jsou aktivovány stresovými signály⁴¹. Dalším regulačním proteinem je MDM4 (MDMX), který se podobá struktuře MDM2. MDM4 nemůže zprostředkovat ubikvitinylaci a inhibuje protein p53 přímo⁴².

Mezi další vnitřní apoptotickou cestu spadají proteiny z rodiny Bcl. Jedná se o pro- a anti-apoptotické proteiny. Mezi pro-apoptotické proteiny patří Bax a Bak a do anti-

apoptotických zařadíme Bcl-2, Mcl-1 a Bcl-xl. Rodina Bcl je odvozena od lymfomu B-buněk (B-cell lymphoma), jelikož byl v roce 1984 poprvé objeven v lidském folikulárním lymfomu B-buněk. Inhibitory Bcl-2 rodiny se objevily jako slibná léčiva v boji proti leukémii⁴³.

Proteiny obsahují sekvence BH1-BH4, avšak největší pro-apoptotické vlastnosti má zejména doména BH3. U proteinů s doménou BH3 může docházet ke konformační změně, která indukuje Bax a Bak oligomerizaci. Tato oligomerizace mění formování mitochondriálních pórů⁴⁴. Proteiny obsahující pouze BH3 doménu se mohou chovat jako senzory buněčného stresu⁴⁵. Bax a Bak proteiny mají schopnost vmezeřit se do mitochondriální membrány, vytváří póry a spouštějí propustnost mitochondriální membrány. Dochází k uvolnění cytochromu c z vnitřní membrány mitochondrie do cytoplazmy, následně k tvorbě apoptozomu s prokaspázou 9 a Apaf-1, přeměně prokaspázy na aktivní kaspázu, a samotné apoptóze. Bcl-2, Mcl-1 a Bcl-xl naopak zamezují tvorbě pro-apoptotických proteinů⁴³. Tyto proteiny se mohou vázat na aktivované Bax a Bak proteiny a mohou tak zabránovat oligomerizaci a pórům. K blokaci těchto proteinů může docházet, pokud nedojde k uvolnění cytochromu c a následné aktivaci kaspázy 9 nebo zabránění tvorby apoptozomu navázáním se na Apaf-1^{34,46}.

Detailněji se dále budeme věnovat proteinu Mcl-1, který byl klíčový při mé práci. Protein Mcl-1 patří do anti-apoptotické rodiny Bcl-2 rodiny, který byl identifikován roku 1993⁴⁷. Protein je lokalizován na chromozomu 1q21 (1, pozice 21). Obsahuje sekvence BH1 – BH4 a vyskytuje se u něj C-terminální transmembránová doména, která slouží k lokalizaci intracelulárních membrán, hlavně mitochondriální. Lokalizace je spojená s kontrolou mitochondriálních dějů při apoptóze. Protein je složen z Mcl-1L formy a po jejím alternativním sestřihu vystřihnutím druhého exonu získáme izoformu Mcl-1S/ Δ TM. Izoformě chybí BH1, 2 a transmembránová doména⁴⁸. Výzkumy ukazují, že by se protein Mcl-1 mohl stát výborným markerem pro předpovězení nádorového bujení. Pokud by došlo k indukci exprese Mcl-1 pomocí signálů přežití, buňky by byly k apoptóze rezistentní a nekontrolovaně by se množily. Na druhou stranu snížením exprese pomocí pro-apoptotických signálů by došlo k aktivaci apoptózy⁴⁹.



Obr. 7: Vnější a vnitřní cesta apoptózy.

Vnitřní cesta probíhá přes proteiny z rodiny Bcl-2, následným uvolněním cytochromu c, tvorba apoptozomu s Apaf-1, prokaspázou-9 a cytochromem c. Vnější cesta probíhá přes receptory smrti.

(Převzato a upraveno z: http://www.aging-us.com/img?size=hero&img=iJ6aHGY2FNZrcgaYX_f1.png 26. 2. 2018)

2.4 Topoizomerázy

Jedná se o izomerázové enzymy, které se účastní hlavně replikace DNA⁵⁰. Zajišťují, aby došlo k snadnému rozštěpení DNA vlákna a poté k jeho snadnému spojení do celistvé podoby.

Topoizomerázy se dostaly do povědomí pro léčbu zásadních nemocí. Bakteriální gyráza (topoizomeráza II) a topoizomeráza IV jsou cílem antibiotických léčiv, zejména kumarinů a chinolonů. Tato antibiotika se používají hlavně proti malárii, zápalu plic a tuberkulóze⁵¹.

Eukaryotické topoizomerázy jsou cílem léčiv, která se používají proti rakovině^{52,53}, jejichž počet se neustále zvyšuje. Základem léčiva je inhibice těchto enzymů. Dochází k blokování reakce, která má za následek pevné sevření zlomů v DNA.

Ačkoliv je vazba léčiva vratná, pokud replikační vidlička narazí na blokovanou topoizomerázu může dojít k uvolnění kusu rozštěpeného řetězce a dojde k trvalému poškození DNA, která vede ke smrti buněk (apoptóze)⁵³. Většina léčiv se specializuje buď na topoizomerázu I nebo II, ale mohou se zaměřit na oba enzymy.

Eukaryotické topoizomerázy můžeme rozdělit do dvou skupin. U topoizomeráz I je jedno z vláken rozštěpeno a navázáno na tyrosinový zbytek enzymu. Tento zbytek se váže buď na 5' konec (topo IA) nebo na 3' konec (topo IB). Topoizomerázy II rozštěpí obě vlákna dvoušrobovice DNA. Díky této schopnosti reguluje nadobrátky (supercoils) a opravuje uzly na molekule DNA. Potřebují ke své činnosti ATP^{2,54,55}.

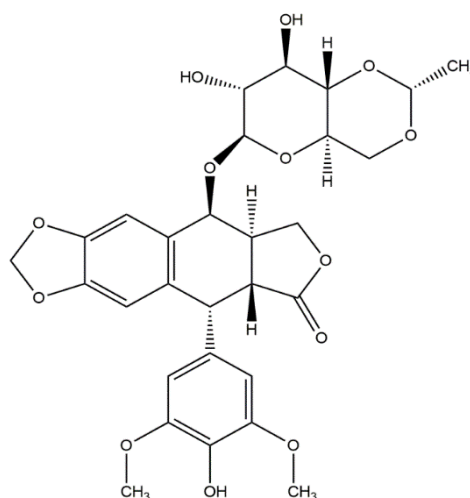
Topoizomerázy typu II mají dvě izoformy, α a β . Liší se v kódování genu a mohou být odlišeny jejich molekulovou hmotností promotoru. Buněčná funkce těchto izoform odrazí její fyziologickou funkci více než enzymologickou. α forma inhibitoru se zvyšuje během S fáze buněčného cyklu a vrcholu dosahuje v G2/M fázi. Tato forma má hlavní úlohu v DNA replikaci a segregaci chromozomu. Zajímavostí však je, že β forma je na buněčném cyklu nezávislá^{56,57}.

2.4.1 Topoizomerázové inhibitory

Jedná se o chemické sloučeniny, blokující topoizomerázovou aktivitu. Mezi inhibitory TopoI patří camptothecin, topotecan a irinotecan⁵⁸. Do inhibitorů Topo II zařazujeme etoposid, doxorubicin, daunorubicin a mitoxantron^{57,50}. Několik derivátů přírodních fenolů (quercetin, resveratrol) mají silnou schopnost ovlivňovat oba typy enzymů, tak jako inhibitory topoizomerázy.

2.4.1.1 Etoposid (4'-demethyl-9-[4,6-O-ethyliden-D-glukopyranosid])

Etoposid je chemoterapeutikum spojené s léčbou různých typů závažných onemocnění, především rakoviny plic, vaječnicků, neuroblastomů, leukémie a dalších. Léčivo je podáváno hlavně injekční formou do žíly. S etoposidem je bohužel spojena řada velmi častých vedlejších účinků. Mezi ně patří hlavně nechut', ztráta vlasů, horečka a mnoho dalších⁵⁴. Etoposid se poprvé objevil v roce 1983 ve Spojených státech a je jedním z nejvíce efektivních a účinných medikamentů ve zdravotnictví.



Obr. 8: Struktura etoposidu.

Jelikož je špatně rozpustný ve vodě, rozpouští se v solubilizátoru polysorbátu 80, polyethylenglykolu a alkoholu, zředěném na koncentraci menší než 0,4 mg/ml, aby se nevysrážel. Přidání těchto sloučenin vede ke zvyšování krevního tlaku. 1/3 intravenózně podávaného léčiva je vylučována močí a méně než 2 % žlučí. Vyloučení etoposidu se snižuje u pacientů s ledvinovou dysfunkcí.

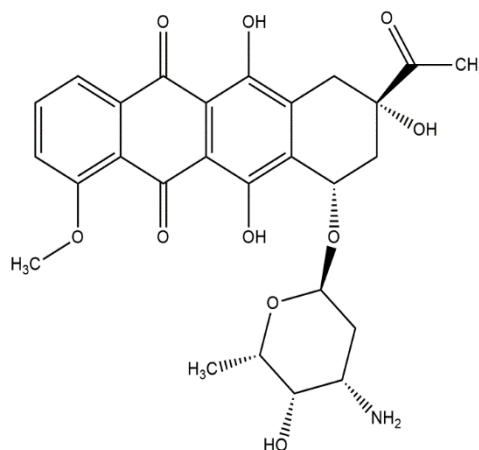
Etoposid aktivuje dvě cesty, které vedou k zastavení G2-M fáze buněčného cyklu. Jedna cesta závisí na přítomnosti proteinu p53, druhá na tomto proteinu nezávisí. Vysoká aktivita oprav DNA zlomů však může vést k rezistenci na etoposid⁵⁴.

Předtím než chemoterapeutikum bude schopné aktivovat buněčnou smrt, musí se nejprve vytvořit ternární komplex pomocí 3 různých cest. Lék se tedy může vázat na binární komplex topoizomerázy DNA a má minimální vliv na interakci s DNA nebo s enzymem.

Vstup léčiva do komplexu taky může být prostřednictvím interakce s DNA nebo enzymem⁵⁶.

2.4.1.2 Daunorubicin ((7S,9S)-9-acetyl-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-4-methoxy-8,10-dihydro-7H-tetracene-5,12-dion)

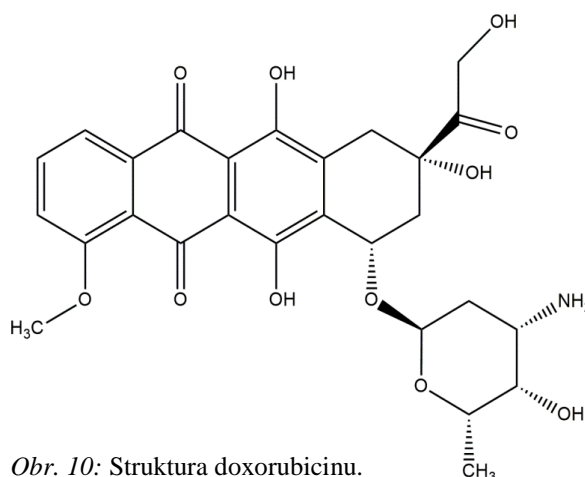
Obsahuje chinon, na který se váže aromatická struktura (dihydroxyantrachinon). Aromatická struktura je spojena s aminoskupinou. Analogem daunorubicinu je doxorubicin, který se liší pouze částí molekuly, na které je hydroxylová skupina. Zatímco daunorubicin má na svém konci skupinu methylovou. Tato malá změna v molekule vytváří velké rozdíly v aktivitě a farmakokinetice⁵⁹. Doxorubicin a daunorubicin jsou izolovány z bakterie rodiny *Streptomyces*. Poprvé byly izolovány v 60. letech 20. století⁶⁰.



Obr. 9: Struktura daunorubicinu.

2.4.1.3 Doxorubicin ((7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-9-(2-hydroxyacetyl)-4-methoxy-8,10-dihydro-7H-tetracene-5,12-dion)

Doxorubicin, také znám jako Adriamycin se používá hlavně proti rakovině prsu, mozku, plic, leukémii, Hodgkinovu lymfomu a dalších^{61,62}. Často se spojuje s dalšími protinádorovými léčivy. Mezi nežádoucí účinky patří například ztráta vlasů, zvracení, vyrážka, zánět v ústech, poškození srdce a další⁶³.



Obr. 10: Struktura doxorubicinu.

Doxorubicin se v rakoviných buňkách nejprve vmezeří mezi DNA a přeruší replikaci, která je zprostředkována topoizomerázou II⁶³. Chemoterapeutikum však nemusí pracovat pouze na tomto principu. Doxorubicin může být oxidovaný na semichinon, který je nestabilní, znovu se přemění na chinonovou

formu a uvolňuje deriváty kyslíku – superoxid, peroxid vodíku a hydroxylový radikál (reactive oxygen species)^{64,65}. Tato reakce následně vede k indukci apoptózy a smrti buňky^{66,67}.

3 Cíle práce

Hlavním cílem je ovlivnění exprese proteinu MCL-1 pomocí miRNA v návaznosti na snížení efektivní koncentrace etoposidu či jiného protinádorového léčiva⁶⁸. Sekundárním cílem bylo určit buněčnou lokalizaci miRNA, především cytosol/jádro. Transportem mutantních miRNA do jádra/cytosolu je možné ovlivnit expresi Mcl-1.

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie

TRIzol Reagent, chloroform, isopropanol, deionizovaná voda, methanol, ethanol, TEMED (N,N,N',N' - tetramethylenethyldiamin), 40% monomer solution (akrylamid/bisakrylamid), 10% peroxodisíran amonný (APS), 3-hydroxy-4-(2-sulfo-4-[4-sulfofenylazo]fenylazo)-2,7-naftalendisulfonová kyselina (Ponceau S), Running gel pufr, Stacking gel pufr, migrační pufr, transferový pufr, Tris - buffered saline (TBS), Tris - buffered saline + Tween (TBS/T), 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol (Tris), 10% dodecylsírán sodný (SDS), 1X transferový blotovací pufr (100ml 5x transfer turbo-blot pufr, 300 ml H₂O, 100 ml ethanol), Immuno Cruz wester blotting luminol reagent (A, B roztok), mléko, Opti-MEM, Lipofectamine 2000, Nuclear Extrakt Kit, TaqMan MicroRNA Assays kit, TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit, TaqMan Universal PCR Master Mix, kyselina bicinchoninová (BCA), albumin, BCA working reagent – reagent A/ reagent B (50:1), fetální bovinní sérum, penicilin/streptomycin, neesenciální aminokyseliny, Triton X-100, trypanová modř (0,4% roztok), trypsin – EDTA (0,25% roztok),

4.2 Kultivační médium

Dulbeccem modifikované Eaglovo médium slouží ke kultivaci buněk. Médium dále obsahuje fetální bovinní sérum, penicilin/streptomycin a neesenciální aminokyseliny. Fetální bovinní sérum neboli FBS je frakce krve, která zůstane po odstranění přirozené koagulace krve pomocí centrifugace, která odstraní jakékoli zbytky červených krvinek. Penicilin/streptomycin slouží k zabránění bakteriální kontaminace buněčných kultur.

4.3 Biologický materiál

Pro experimenty sloužila buněčná linie Hela. Jedná se o nejstarší a nejvíce využívanou linii. Buňky byly odebrány z karcinomu děložního hrdla v roce 1951 Američance Henriettě Lacksové⁶⁹.

4.4 Přístroje

Centrifuga MiniSpin® (Eppendorf)

Chlazená centrifuga Mikro 22 (Hettich Zentrifugen)

Termocykler MiniOpticon® (BioRad)

Termomixer Comfort (Eppendorf)

Mikroskop CK40-F200 (Olympus Optical)

UV-VIS spektrofotometr UV-2401PC (Shimadzu)

Mixér REAX top (Heidolph Instruments, Schwabach)

Inkubátor MCO-17A/C (Sanyo Electric Biomedical)

Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systém (Bio-Rad)

4.5 Metody

4.5.1 Pasážování buněk

Dochází k rozdělení buněk do nových kultivačních nádob. K buňkám se přidá čerstvé médium, aby mohlo dojít k další proliferaci. Pasážování slouží k vyšetí buněk pro experiment. Pasážování adherentních buněk se provádí, pokud jsou stěny nádoby pokryty asi z 80%. Pro pasážování se používá trypsin, díky kterému se buňky pustí kultivační stěny nádoby. Následně se buňky spočítají v Bürkerově komůrce. Pokud začne buněčná linie přerůstat, mohou se změnit její vlastnosti, jelikož při proliferaci vylučují buňky metabolity, které slouží jako signál k zastavení růstu nebo odumírání.

Popis:

- Buňky se prozkoumají pod mikroskopem a poté můžeme přestoupit k pasážování. Nejprve pomocí 10x ředěného FBS buňky promyju od zbytků média a poté přidám 1 ml trypsinu. Prozkoumám buňky pod mikroskopem a následně přidám 9 ml média. Poté buňky zcentrifuguji, vyleji médium a přidám 5 ml nového.

Následně buňky přidám k trypanové modři a spočítám v Bürkerově komůrce. Poté buňky pipetuji do nové láhve a přidám do 25 ml médium.

4.5.2 Kultivace buněk

Buňky se po pasážování kultivují v inkubátoru při teplotě 37 °C, v atmosféře 5% CO₂ a prostoru nasyceném vodní parou.

4.5.3 Výsev buněk

Buňky se vysejí do šesti jamkové desky. Na každou jamku se vyseje cca 1.10⁶ buněk ve 2 ml média. Buňky se nejprve spočítají v Bürkerově komůrce a poté se pomocí trojčlenky vypočítá objem média a suspenze buněk. Celková suspenze se zhomogenizuje a ve správném objemu se přepipetuje do jamek.

4.5.4 Transfekce

Popis:

- Smíchám 512,5 µl Opti-MEM a 10,25 µl lipofectamine 2000. Lipofectamine 2000 přidávám po kapkách, jelikož by zůstal na stěně. Následně vše promíchám a inkubuji 5 minut. Poté napipetuji na dno zkumavky 4,1 µl pre-miRNA a přidám 512,5 µl Opti-MEM. Opatrně nakapu směs Opti-MEM a lipofectamine 2000 na miRNA a protřepu jemným poklepáním zkumavky. Poté nechám 15 minut inkubovat a ke směsi přidám 3060,65 µl média, které obsahuje 1.10⁶ buněk. Jemně směs promíchám a nanesu do 5 jamek na šesti jamkové desce 2000 µl. Poté navážím 0,85 mg etoposidu, rozpustím v 24 µl DMSO a naředím směs na 22 ml finálního rozotku. Z jamek odsaji médium sterilní hadičkou a přidám 2 ml etoposidu na každou jamku. Jedna jamka bude neošetřená a do ní nanesu DMSO. Hodnoty jsou navýšené kvůli rezervě.

4.5.5 Lýza buněk

Lyzování buněk slouží k získání proteinu. Dochází k porušení buněčné membrány v důsledku osmotického zbobtnání.

Popis:

- Buňky seškrábu do média a přepipetuji do 2 ml eppendorfky a centrifuguji při 4 000 RPM, 5 minut a 4 °C. Následně médium odeberu tak, abych neodebrala pelet, a přidám studené FBS. Následně zhomogenizuji pipetou a znovu centrifuguji při stejných podmínkách. Roztok nad peletem znovu odeberu a přidám FBS, zhomogenizuji, centrifuguji a následně roztok nad peletem odeberu a vzorek zamrazím do – 80 °C nebo pracuji dál. Pokud vzorek použiji dál, přidám k peletu 150 µl HUVEC pufru. Inkubuji 30 minut při 4 °C, kdy minimálně 3x zvortexuji. Následně propipetuji pipetou, centrifuguji 13 minut při 13 000 RPM a 4 °C. Supernatant odeberu do čisté eppendorfky a pelet vyhodím. Poté stanovím proteiny pomocí BCA nebo Bradfordové metody. Následně mohu eppendorfky zamrazit do – 80 °C. Vzorek se může následně využít pro elektroforézu (ELFO). K 20 µl 5x treatment pufru přidám 80 µl vzorku. Vzorky následně povařím 5 minut při 95 °C, zchladím, krátce zcentrifuguji a mohu zamrazit.

4.5.6 Trizolová metoda

Používá se fenol, chloroform a guanidin thiokyanát. Směs se rozdělí na vodnou a chloroformovou fázi. Vodná fáze obsahuje RNA, na rozhraní jsou vysrážené proteiny a organická chloroformová fáze obsahuje DNA. Poté dochází k promytí ethanolem.

Popis:

- Ke vzorku jsem přidala 1 ml TRIzol reagentu. Poté jsem každý vzorek 30 sekund vortexovala. Následně jsem vzorky inkubovala 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci jsem přidala 200 µl chloroformu a poté 30 sekund vortexovala. Následovalo dalších 5 minut inkubace. Poté jsem vzorky centrifugovala 15 minut při 13 000 RPM a 4 °C. Po centrifugaci došlo k rozdělení fází. Vodnou fázi jsem odebrala do čisté eppendorfky (400 µl). K vodné fázi jsem přidala stejné množství izopropanolu (400 µl). Následně jsem vzorky 10 minut inkubovala a poté 10 minut centrifugovala při 13 000 RPM a 4 °C. Roztok nad peletem jsem odebrala a

k peletu přidala 1 ml 75% ethanolu, který se uchovává v mrazáku. Eppendorfku jsem promíchala překlopením a centrifugovala 5 minut při 9 600 RPM a 4 °C. Roztok nad peletem jsem odstranila, krátce zcentrifugovala a odstranila zbytky ethanolu. Eppendorfky jsem nechala otevřené ve stojánku a po odstranění zbytků ethanolu jsem přidala 20 µl vody. Vzorky jsem proměřila ve spektrofotometru a následně uchovala při – 80 °C^{70,71}.

4.5.7 Spektrofotometrické stanovení

Pro měření v UV oblasti jsem použila křemenné kyvety. Čistota RNA se vyhodnocuje z poměru 260/280 nm, kdy hodnota $A_{260/280} \geq 1,8$ udává čistotu RNA. Z poměru absorbance 260/230 nm se hodnotí čistota RNA z pohledu kontaminace fenolem a aromatických látek. Hodnota $A_{260/230} \geq 1,8$ se udává jako ideální. Zpravidla se tato hodnota neměří, ale slouží ke stanovení správnosti provedení metody.

4.5.8 Stanovení proteinu metodou BCA

Pro měření se používá kyselina bicinchoninová⁷² (BCA) ke stanovení proteinu ve vzorku. Dochází k redukci měďnatého iontu na měďný pomocí proteinu. Následná chelatace měďného iontu pomocí BCA vede k červenému zbarvení. Vzorek jsem naředila 10x. Tedy použila jsem 5 µl vzorku a 45 µl PBS. Poté jsem napipetovala do jamky 10 µl finálního vzorku a ke každému přidala 200 µl BCA. Vzorek jsem poté nechala 30 minut při 37 °C inkubovat a následně změřila absorbanci při 532 nm.

4.5.9 Elektroforéza

Tato metoda slouží k separaci molekul, které mají rozdílnou molekulovou hmotnost. Princip spočívá v pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Pohyb je závislý na velikosti celkového náboje, velikosti a tvaru molekuly a koncentraci.

Popis:

- Nejprve si připravím running a stacking gel. Každý se skládá z roztoku 40% akrylamidu, pufru (running nebo stacking), deionizované vody a 10% dodecylsírany sodného (SDS). Vše řádně promíchám a nanáším mezi čistá skla, která jsou uchycena ve vrátkách. Dodecylsírany sodný je denaturační činidlo, které proteiny obalí a denaturuje. Po přimíchání 10% peroxidisírany amonného a tetramethylethylendiaminu dochází k tuhnutí running gelu. Na running gel

napipetuji isopropanol a nechám 30 minut polymerovat. Až gel zpolymeruje, isopropanol vyleji a stříčkou jemně propláchnu prostor nad gelem. Přebytečnou vodu vyleji do výlevky a lehce prostor nad gelem odsaji filtračním papírem. Poté pipetuji směs stacking gelu, do které jsem přidávala APS a TEMED jako poslední složku a nechám polymerovat.

Po přípravě gelu můžeme přejít na samotnou elektroforézu, kdy jsou skla upevněna do vrátek a vložena do vany. Vzorky před dávkováním na gel povaříme (5 minut při 95 °C) a poté pipetujeme do jamek (objem je navolen tak aby odpovídal 30 µg pro následnou detekci Mcl-1 a 10 µg pro detekci cytozol/jádro). Po bocích vzorků napipetujeme 3 µl markeru. Vanu naplníme migračním pufrem a můžeme připojit ke zdroji. Na začátku nastavíme konstantní proud 30 mA, jakmile vzorky vyjedou z jamek a nahromadí se na rozhraní stacking a running gelu změním proud na 60 mA. V závislosti na proteinu, který hledáme, necháme marker dojet do patřičného místa a vypneme od zdroje. Díky tomu se nám proteiny více roztáhnou na gelu a to nám pomůže při stříhání membrány. Migrační pufr vylejeme, vytáhneme sklíčka s gely, špachtlí oddělíme skla od sebe, vyndáme gel, seškrábneme stacking gel a roh gelu, a vložíme do misky s TBS/T.

Při své práci jsem používala 12,5% gely o tloušťce 1,5 mm, které se díky své šířce netrhaly. Podle tabulky 1 jsem si připravila running gel.

Látka	Objem (µ l)
40% Akrylamid	6250
ddH ₂ O	8550
4X Runnig pufr	5000
10% SDS	200
10% APS	200
TEMED	20

Tab. 1: Obsah roztoku running gelu při koncentraci 12% a tloušťce 1,5 mm.

Podle tabulky 2 jsem připravila stacking gel.

Látka	Objem (μ l)
40% Akrylamid	800
ddH ₂ O	5120
4X Stacking pufr	2000
10% SDS	80
10% APS	60
TEMED	8

Tab. 2: Obsah roztoku stacking gelu při koncentraci 12% a tloušťce 1,5 mm.

4.5.10 Western immunoblotting

Popis:

- Nejprve se provede elektroforéza zkoumaných proteinů. Poté jsou proteiny přeneseny z gelu na membránu použitím semi-dry (polosuchého) elektroblottingu, kdy se do kazety vloží blotovací houba a filtrační papír, které jsem namočila ve studeném transblot pufru. Polyvinylfluoridovou membránu (PVDF) jsem odloupla pinzetou z modrého papíru a vložila do misky s methanolem na 5 sekund, aby zprůhlednila (hydratace membrány). Methanol jsem vylila a do misky nalila ddH₂O. Vodu jsem vylila a ponořila do transblot pufru. PVDF membránu poté položila na filtrační papír, na ni pinzetou položila gel a následně znovu filtrační papír a blotovací houbu. Před každým skládáním jsem vše pečlivě uhladila válečkem. Po 30 minutách dochází k přenosu vlivem elektrického pole.
- Po přenosu jsem membrány vytáhla a 3x promyla v TBS/T po 5 minutách. Po posledním vymytí jsem TBS/T vylila a na 3 minuty nalila do misky Ponceau S. Membránu jsem následně vytáhla a nechala osušit na filtračním papíře. Během sušení jsem na membránu vepsala jednotlivé molekulové hmotnosti a rozstříhala ji tak, abych získala svůj protein, určený k detekci. Po osušení membrány je provedena imunodetekce použitím protilátek. Usušenou membránu vložím do methanolu a následně 2x promyji v TBS/T po dobu 5 minut.

- Poté se po dobu 1 hodiny blokují mlékem zbývající vazebná místa na membráně (roztok sušeného mléka rozpuštěný v TBS/T). Membránu promyji 3x 10 minut v TBS/T a nanesu primární protilátku (1:1000). Nechám ji inkubovat po dobu 24 hodin při 4°C. Po vymytí primární protilátky jsem nanesla sekundární protilátku (1:10 000, β -tubulin 1:5 000) a inkubovala po dobu 1,5 hodiny za laboratorní teploty. Sekundární protilátka se promyje 3x v TBS/T (10 minut) a na membránu nanesu substrát.
- Substrát je složen z roztoku A a B, které smíchám v poměru 1:1 (dohromady asi 1 ml). Směs nechám 1 minutu inkubovat na membráně, vložím mezi dvě folie, vytlačím přebytečnou směs a bublinky pomocí filtračního papíru a buničiny. Membránu, kterou mám ve folii, umístím do vyvolávací kazety. Přemístím se do tmavé místnosti, otevřu kazetu, na folii vložím film, uzavřu a nechám přenášet. Kazetu poté otevřu a promyji ve vývojce. Jakmile uvidím na filmu bandy, rychle vložím do misky s vodou a poté do ustalovače. Pro získání výsledků se používají denzitometrické softwary. Membrány promyji v TBS/T a nechám vysušit⁷³. Expozice proteinu Mcl-1 trvala 10 minut, laminu 60 sekund a β -tubulinu 20 sekund.

4.5.11 Extrakce jádra

Metoda slouží k oddělení jádra od zbytku buňky. Jedná se o rychlou, jednoduchou a efektivní cestu zisku proteinů, které se nacházejí v jádře. Nejprve si připravím všechny komponenty podle tabulky č. 3.

Příprava reagentů	Komponenty	8,8 x 10 ⁶ buněk
PBS/Inhibitory fosfatáz	10x PBS	0,8 ml
	Destilovaná voda	6,8 ml
	Inhibitory fosfatáz	0,4 ml
	Celkový objem	8,0 ml
1x hypotonický pufr	10x hypotonický pufr	50 μ l
	Destilovaná voda	450 μ l
	Celkový objem	500,0 μ l
Kompletní lyzační pufr	10 mM DTT	5 μ l
	Lyzační pufr AMI	44,5 μ l
	Směs proteázových inhibitorů	0,5 μ l
	Celkový objem	50,0 μ l
Detergenty	Celkový objem	2,5 μ l

Tab. 3: Příprava reagentů pro extrakci jádra z buněk.

Odsaji médium z Petriho misky. Promyji s 5 ml chlazeného PBS/Inhibitory fosfatáz. Odsaji směs a znovu přidám 3 ml směsi. Mezitím si vychladím centrifugu na 4 °C. Poté buněčnou suspenzi zcentrifuguji 5 minut na 200 RPM. Opatrně odstraním směs tak, aby mi dole v eppendorfce zůstal pelet. Pelet resuspenduji pipetou nahoru a dolů v 500 μ l 1x hypotonického pufru. Směs přepipetuji do vychlazených falkon a nechám buňky 15 minut na ledu. Poté přidám 25 μ l detergentu a zvortexuji po dobu 10 sekund na nejvyšší otáčky. Následně malý vzorek zkontroluji pod mikroskopem, zda se uvolnila jádra. Pokud se jádro neuvolnilo, znovu vzorky pipetuji nahoru a dolů. Poté vzorky centrifuguji 30 sekund, 14 000 RPM při 4 °C. Supernatant přepipetuji do vychlazených falkon a uložím do -80 °C.

Mezitím použiji pelet pro nukleární frakci. Pelet resuspenduji pipetováním nahoru a dolů v 50 μ l kompletního lyzačního pufru, přidám 2,5 μ l detergentu. Suspenzi inkubuji 30

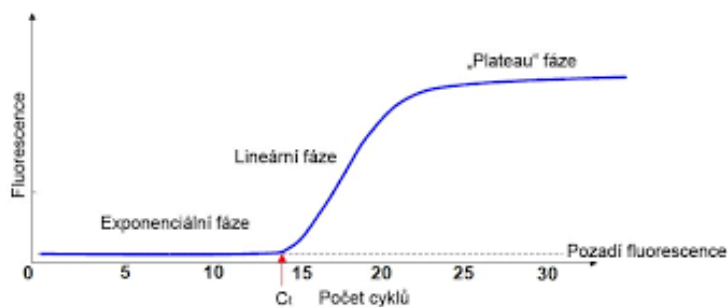
minut na ledu a zcentrifuguji lehce při 150 RPM. Zvortexuji 30 sekund na nejvyšší otáčky, centrifuguji 10 minut na 14 000 RPM při 4 °C. Supernatant (jaderná frakce) přepipetuji do vychlazených ependorfech a zmrazím na -80 °C. Poté pomocí BCA metody zjistím koncentraci⁷⁴.

4.5.12 RT-PCR (PCR spojená s reverzní transkripcí)

Nejprve své vzorky musím podrobit reverzní transkripci, kdy převedu RNA na cDNA. Pro přepis použiji specifické primery pro miRNA, které se skladují v lednici při -20 °C. Primery by měly být zcela komplementární k úseku miRNA-101-m3 a miRNA-101-29b. Při metodě je třeba také použití polymerázy, která by měla během denaturační fáze vydržet vysoké teploty. Dnes se používá Taq polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus*, která je termostabilní a její teplotní optimum se pohybuje kolem 75 °C. Tato polymeráza z bakterie žije v horkých pramenech a při 90 °C není aktivní, ale nedochází k denuraci enzymu. Pro RT-PCR se používá TaqMan polymeráza, která má na jednom konci fluorescenční značku a na druhém zhášecí. Pokud DNA narazí na značený nukleotid, dojde k vytěsnění z templátu a štěpení. Tímto principem se uvolní fluorescenční sonda a změřím fluorescenci. Pro správný průběh stačí malé množství templátu, avšak je potřeba, aby vzorek nebyl kontaminován díky nesprávnému postupu při práci. RNA rychle denaturuje pomocí RNáz, které jsou velmi stabilní.

Během metody se kontinuálně zaznamenává množství DNA v průběhu každého cyklu. Pomocí fluorescenčního substrátu, který se váže na DNA, je možné množství DNA detekovat. PCR jsem prováděla na 96ti jamkových destičkách. Nejprve dochází k exponencionálnímu nárůstu množství DNA, ale fluorescence nepřesahuje pozadí. Během reakce je syntéza ve fázi, kdy fluorescence přesahuje pozadí a je zachycena detektorem. Poté dochází k lineární fázi a nárůstu fluorescence. Následně se reakce zpomaluje z důvodu spotřeby některých komponent („Plateau“ fáze).

Metoda je založena na C_t hodnotě (cyklus prahu), kdy dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí a může být detekována. Čím je tato hodnota nižší, tím více bylo templátové DNA dodáno⁷⁵.



Obr. 11: Schéma PCR grafu.

Graf závislosti osy x (počet cyklů) na y (fluorescence). V prvních patnácti cyklech vidíme exponenciální fázi nárůstu množství DNA, poté lineární fázi a nárůstu fluorescence a poslední je „plateau“ fáze, ve které dochází ke zpomalování reakce z důvodu klesání koncentrace primerů, dNTPs a pomalá ztráta aktivity polymerázy.

(Převzato z: <http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/> 23. 3. 2018)

Nejprve je nutné si připravit RT master mix volume. Jednotlivé komponenty RT master mixu jsou uvedeny v tabulce níže. Objemy jsou uvedeny pro jeden vzorek, takže je třeba hodnoty všech komponent vynásobit požadovaným počtem vzorků. Do celkového objemu musíme započítat i ztráty při pipetování (objem jsem navýšila o 15%). Do eppendorfky jsem vždy napipetovala 7 μ l master mixu a 5 μ l RNA. Eppendorfku jsem následně promíchala a zcentrifugovala. Poté přidám do eppendorfky 3 μ l primeru, znovu promíchám a zcentrifuguji. Vzorky nechám následně inkubovat 5 min na ledu a nastavím si termocykler pro objem 15 μ l⁷⁶.

Komponenty	Master mix (15 μ l reakce) [μ l]
100mM dNTPs	0,15
MultiScribe® reverzní transkriptáza	1,00
10x reverzní transkripční pufr	1,50
RNase inhibitor	0,19
Voda bez nukleáz	4,16
Celkový objem	7,00

Tab. 4: Komponenty pro transkripci miRNA.

Krok	Čas	Teplota [°C]
1	30	16
2	30	42
3	5	85

Tab. 5: Parametry termocycleru.

Poté připravím vzorky pro RT-PCR podle tabulky č. 6 (níže) a provedu samotnou RT-PCR.

Komponenty	Master mix (10 μ l reakce) [μ l]
TaqMan MicroRNA Assay (20x)	0,50
Produkt z reverzní transkripce	0,665
TaqMAN 2x Universal Master Mix	5,00
Voda bez nukleáz	3,835
Celkový objem	10

Tab. 6: Složení směsi pro RT-PCR.

Krok	Aktivita enzymu AmpliTaqGold®	PCR	
	HOLD	Cyklus (40 cyklů)	
Čas	10 min.	15 sec.	60 sec.
Teplota [°C]	95	95	60

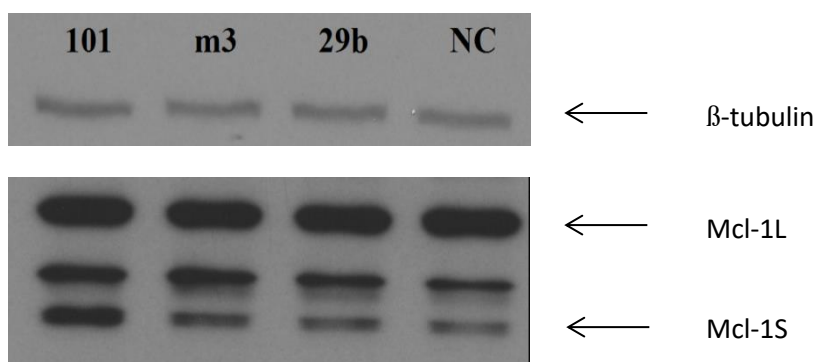
Tab. 7: Parametry RT-PCR.

5 Výsledky a diskuze

Při mé práci jsem pracovala s miRNA 101 a jejími mutanty, které se liší v posledních šesti nukleotidech. Sekvence šesti nukleotidů miR-101-29b na 3' konci je shodná s miR-29b. V případě miR-101-m3 je sekvence šesti nukleotidů na 3' konci shodná se stejně pojmenovaným mutantem. Jednotlivé miRNA byly získány komerčně.

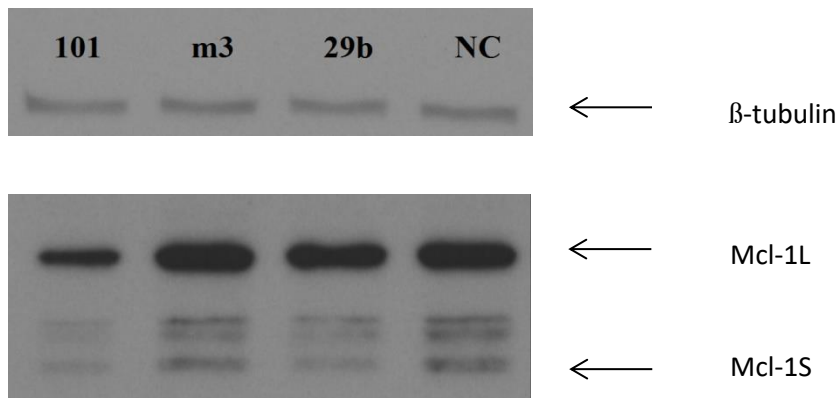
miRNA 101	5'-uacaguacugugauaacugaa-3'
miRNA 101-29b	5'-uacaguacugugauaagaguu-3'
miRNA 101-m3	5'-uacaguacugugauaaguguu-3'

Protein Mcl-1 je zásadní v mé práci, jelikož jeho exprese souvisí s řadou maligních nádorů. Při práci jsem testovala, zda exprese Mcl-1 může být způsobena jednotlivými miRNA.



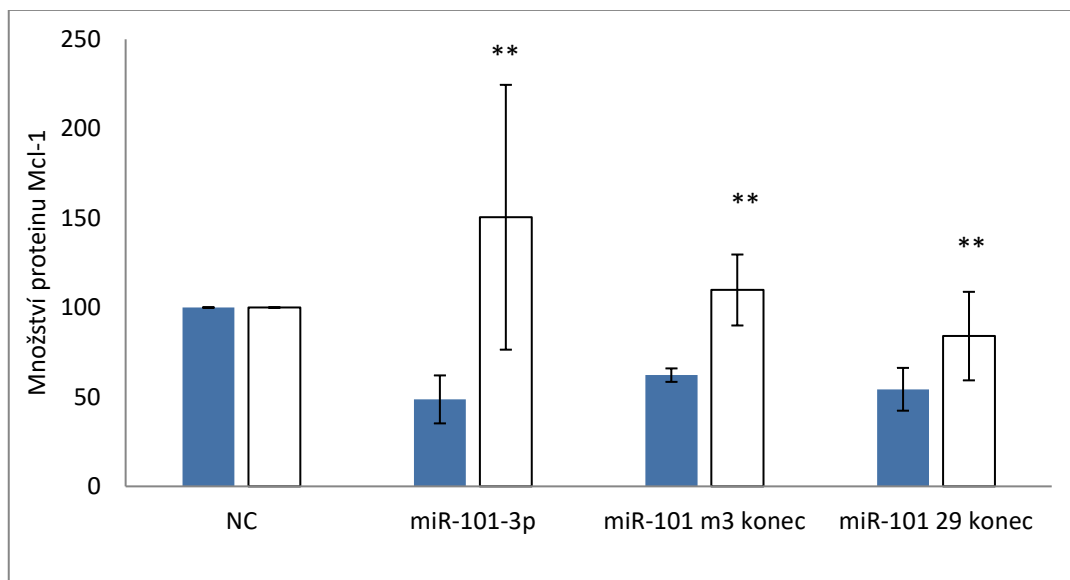
Obr. 12: Imunodetekce Mcl-1 1. den

Na obrázku vidíme bandy z imunodetekce proteinu Mcl-1 po prvním dnu ošetření etoposidem (60 μ M). Vzorky zleva doprava jsou miR-101, miR-101-m3, miR-101-29b a NC (negativní kontrola).



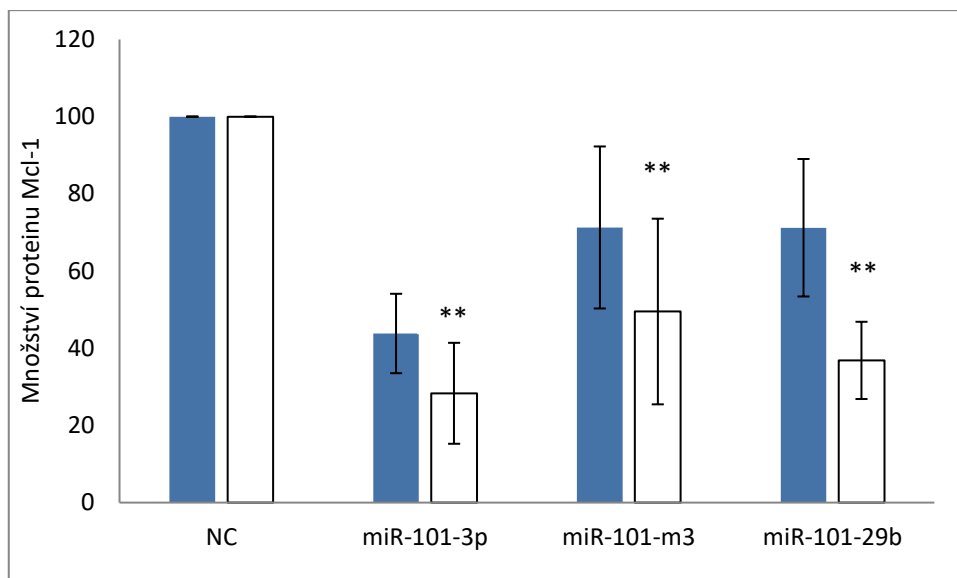
Obr. 13: Imunodetekce Mcl-1 2. den.

Imunodetekci jsem provedla u vzorků po dvou dnech, kdy byly ošetřeny etoposidem (60 μ M). Označení na obrázku je totožné s obr. 10, tedy zleva doprava miR-101, miR-101-m3, miR-101-29b a negativní kontrola.



Obr. 14: Výsledky imunodetekce po prvním dni.

Tmavé sloupce označují relativní úroveň exprese Mcl-1L, bílé sloupce relativní expresi Mcl-1S. Každý sloupec představuje 3 nezávislé experimenty ve 2 měřeních. Mcl-1S jsou statisticky signifikantně odlišné na úrovni 0,01 vůči negativní kontrole. * $p < 0,05$ vůči kontrole (** $p < 0,01$).



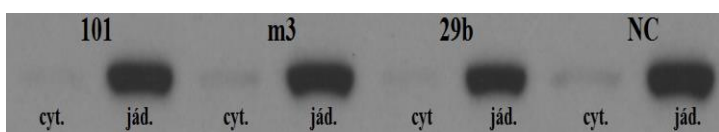
Obr. 15: Výsledky imunodetekce po druhém dni.

Tmavé sloupce označují relativní úroveň exprese Mcl-1L, bílé sloupce relativní expresi Mcl-1S. Každý sloupec představuje 3 nezávislé experimenty ve 2 měřeních. Mcl-1S jsou statisticky signifikantně odlišné na úrovni 0,01 od negativní kontroly. * $p < 0,05$ vůči kontrole (** $p < 0,01$).

Po imunodetekci jsem došla k závěru, že pomocí jednotlivých miRNA dochází k snížení exprese Mcl-1L a zvýšení exprese Mcl-1S.

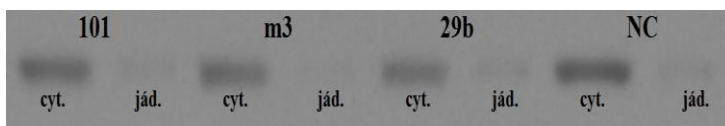
	L (%)	S (%)	Mcl-1L/Mcl-1S
NC	100	100	1
miR-101-3p	48,6295	150,4799	0,3232
miR-101 m3 konec	62,2033	109,8088	0,5665
miR-101 29 konec	54,2865	84,0294	0,6460

Tab. 8: Poměr dlouhé a krátké formy proteinu Mcl-1 po prvním dni.



Obr. 16: Imunodetekce laminy v cytozolické/jáderné frakci.

Označení obrázku zleva doprava je miR-101, miR-101-m3, miR-101-29b a negativní kontrola.



Obr. 17: Imunodetekce β -tubulinu v cytozolické/jáderné frakci.

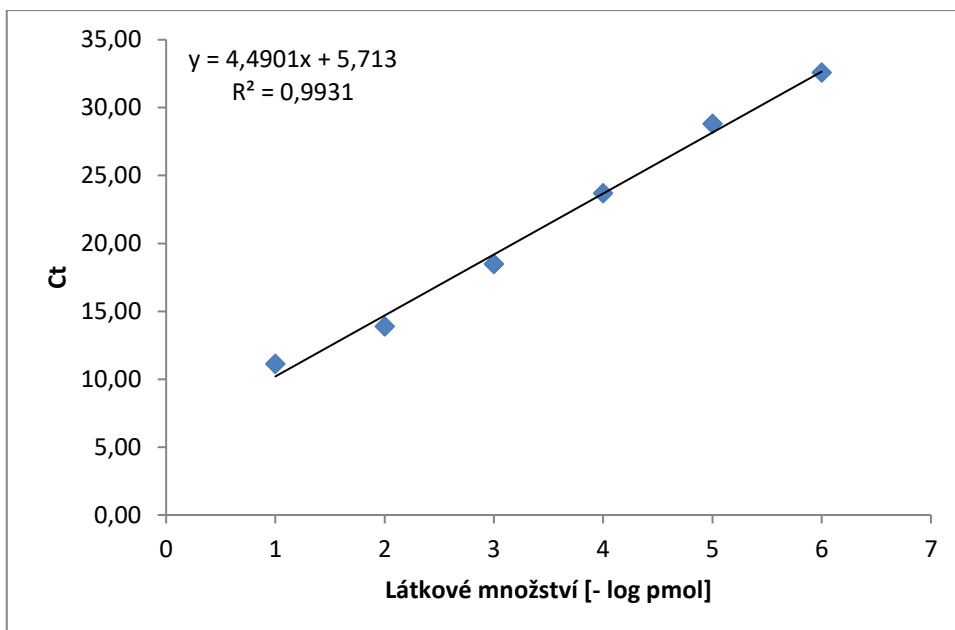
Označení obrázku zleva doprava je miR-101, miR-101-m3, miR-101-29b a negativní kontrola.

zastoupení	cytozol v %	jádru v %
101	2,5068	97,4932
m3	3,3278	96,6722
29b	1,8087	98,1913
NC	5,2776	94,7224

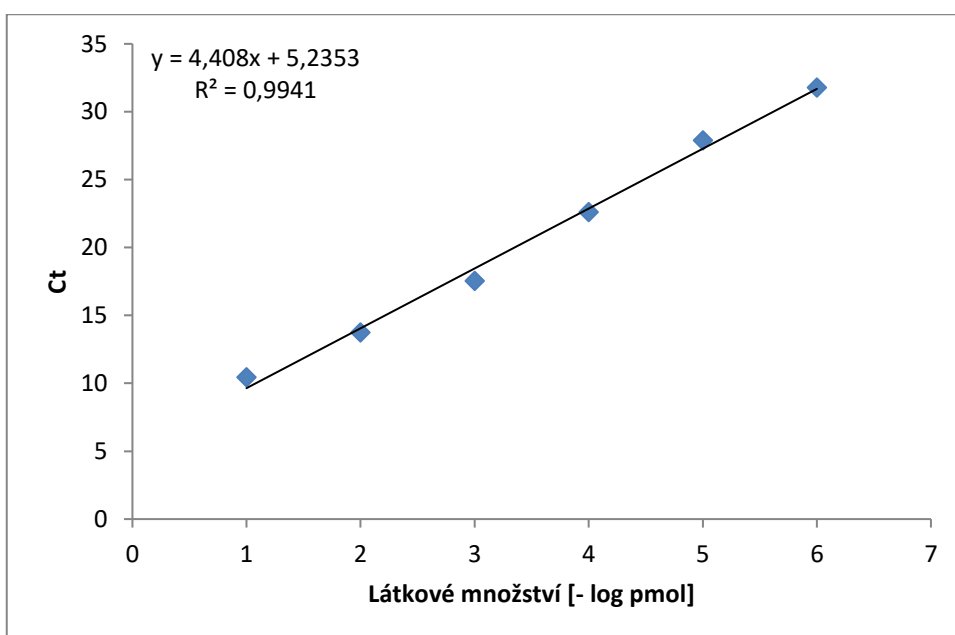
Tab. 9: Jednotlivé zastoupení cytozol/jádru laminy.

zastoupení	cytozol v %	jádru v %
101	90,7329	9,2671
m3	94,9460	5,0540
29b	86,5124	13,4876
NC	94,1243	5,8757

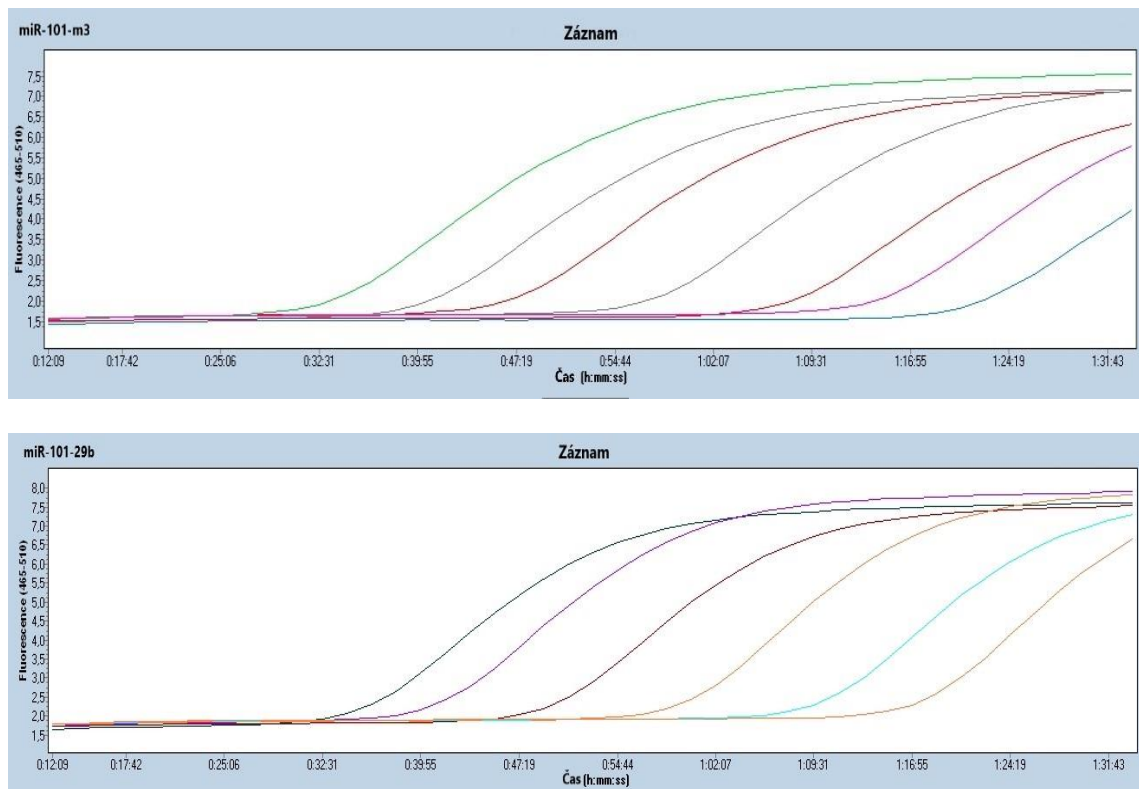
Tab. 10: Jednotlivé zastoupení cytozol/jádru β -tubulinu.



Obr. 18: Závislost látkového množství miRNA-101-29b na prahu detekce.



Obr. 19: Závislost látkového množství miRNA-101-m3 na prahu detekce.



Obr. 20: Záznam z RT-PCR pro jednotlivé mutanty miR-101.

V grafu je vidět závislost času na fluorescenci při 465-510 nm. Každá sigmoida představuje jednotlivé koncentrace oligonukleotidů miRNA. Pro každou koncentraci oligonukleotidu byl naměřen triplet vzorků, v obrázku je pro přehlednost uveden pouze jeden vzorek.

6 Závěr

MikroRNA jsou krátké nekódující sekvence, které obsahují kolem 19-23 nukleotidů. Jejich základní funkcí je ovlivnění exprese proteinů v post-transkripční fázi syntézy. Takto mohou ovlivňovat důležité pochody v buňce například programovanou buněčnou smrt – apoptózu. Jeden z důležitých proteinů v regulaci apoptózy je Mcl-1, skládající se z dlouhé anti-apoptotické a krátké pro-apoptotické formy. Pomocí mikroRNA jsme schopni změnit poměr těchto dvou forem a zvýšit tak účinky chemoterapeutika, vůči kterému mohou být rychle proliferující buňky rezistentní. Toto zjištění by mohlo v budoucnu pomoci zvýšit účinky etoposidu při nižších koncentracích, a tím snížit nežádoucí faktory. V moderní medicíně se stále více dostávají do podvědomí krátké nekódující sekvence – mikroRNA, které ovlivněním exprese proteinu mohou sloužit jako potencionální markery. Tyto markery by identifikovaly maligní onemocnění v brzkém stádiu. Další výhodou těchto mikroRNA by byla šetrnější vyšetření, které těmto onemocněním předcházejí^{77,78}.

Protein Mcl-1 je v maligních onemocněních klíčovým, jelikož je vysoce exprimován. Použitím specifických mikroRNA, se kterými byly buňky inkubovány 24 hodin, došlo ve vzorcích miRNA-101 a jejich mutantů ke změně poměru Mcl-1 dlouhé a krátké formy (obr. 14). Díky této změně došlo k převratu z anti-apoptotických vlastností na pro-apoptotické, které jsou při maligním onemocnění klíčové (tab. 8). Při inkubaci 48 hodin už tento poměr není tak patrný z důvodu snížené funkce proteinu Mcl-1 (obr. 15). V přítomnosti etoposidu se rychle proliferující buňka přestává nekontrolovatelně dělit a nastává apoptóza.

Určením lokalizace mutantů mikroRNA v buňce je možné zjistit mechanismus působení, protože mikroRNA v jádře by mohla způsobovat alternativní sestřih Mcl-1 proteinu a takto ovlivnit expresi Mcl-1S oproti Mcl-1L. Obr. 16 a 17 ukazuje lokalizaci jednotlivých mikroRNA a mutantů po rozdělení jaderné a cytozolické frakce buněk. Tabulky 9 a 10 pak ukazují tuto skutečnost v procentuálním zastoupení, tedy jak správně jsme postupovali při extrakci, a ukazují kvalitu rozdělení. Z výsledků RT-PCR se vyhodnotilo látkové množství jednotlivých oligonukleotidů ve vzorcích cytozol/jádro v závislosti na hodnotě prahového cyklu (obr. 18 a 19). Čím je látkové množství jednotlivých

oligonukleotidů nižší, tím je vyšší hodnota prahového cyklu. Takto připravenou kalibraci použijeme ke zjištění množství určité mikroRNA v dané buněčné frakci přímo, tedy přepočtem prahového cyklu na množství.

7 Literatura

- (1) Ondroušková, E.; Vojtěšek, B. Programovaná Buněčná Smrt v Nádorových Buňkách. *Klin. Onkol.* **2014**, 27 (SUPPL. 1), 7–14.
- (2) Soediono, B. Alberts - Molecular Biology Of The Cell 4th Ed. *J. Chem. Inf. Model.* **1989**, 53, 160.
- (3) Voet, D.; Voetová, J. G. Biochemie. 1995.
- (4) Koolman Jan, R. K.-H. *Barevný Atlas Biochemie*, 4.; Grada, 2012.
- (5) Šána, J.; Faltejsková, P.; Svoboda, M.; Slabý, O. Dlouhé Nekódující RNA a Jejich Význam u Nádorových Onemocnění. *Klin. Onkol.* **2012**, 25 (4), 246–254.
- (6) Brenner S.; Miller J. H. *Encyklopedia of Genetics*, 1st ed.; Academic Press, 2001.
- (7) Mattick, J. S.; Amaral, P. P.; Dinger, M. E.; Mercer, T. R.; Mehler, M. F. RNA Regulation of Epigenetic Processes. *BioEssays* **2009**, 31 (1), 51–59.
- (8) Huang, Y.; Liu, N.; Wang, J. P.; Wang, Y. Q.; Yu, X. L.; Wang, Z. Bin; Cheng, X. C.; Zou, Q. Regulatory Long Non-Coding RNA and Its Functions. *J. Physiol. Biochem.* **2012**, 68 (4), 611–618.
- (9) Bhagavan, N. V.; Ha, C.-E. RNA and Protein Synthesis. *Essentials Med. Biochem.* **2011**, 301–320.
- (10) Fang, Y.; Fullwood, M. J. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. Elsevier February 1, 2016, pp 42–54.
- (11) Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V. The C. Elegans\rheterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense\rcomplementarity to Lin-14. *Cell* **1993**, 75: 843–85, 843–854.
- (12) Saumet, A.; Mathelier, A.; Lecellier, C. H. The Potential of MicroRNAs in Personalized Medicine against Cancers. *Biomed Res. Int.* **2014**, 2014.
- (13) Mishra, P. J. The MiRNA-Drug Resistance Connection: A New Era of Personalized Medicine Using Noncoding RNA Begins. *Pharmacogenomics* **2012**, 13 (12), 1321–1324.

- (14) Lee, Y.; Kim, M.; Han, J.; Yeom, K.-H.; Lee, S.; Baek, S. H.; Kim, V. N. MicroRNA Genes Are Transcribed by RNA Polymerase II. *EMBO J.* **2004**, *23* (20), 4051–4060.
- (15) Lee, Y.; Ahn, C.; Han, J.; Choi, H.; Kim, J.; Yim, J.; Lee, J.; Provost, P.; Rådmark, O.; Kim, S.; et al. The Nuclear RNase III Drosha Initiates MicroRNA Processing. *Nature* **2003**, *425* (6956), 415–419.
- (16) Gregory, R. I. .; Yan, K. P.; Amuthan, G.; Chendrimada, T.; Doratotaj, B.; Cooch, Neil; Shiekhattar, R. The Microprocessor Complex Mediates the Genesis of MicroRNAs. *Nature* **2004**, *432* (7014), 235–240.
- (17) Denli, A. M.; Tops, B. B. J.; Plasterk, R. H. A.; Ketting, R. F.; Hannon, G. J. Processing of Pri- Mary MicroRNAs by the Microprocessor Complex. *Nature* **2004**, *432* (7014), 231–235.
- (18) Bohnsack, M. T.; Czaplinski, K.; Görlich, D. Exportin 5 Is a RanGTP-Dependent DsRNA-Binding Protein That Mediates Nuclear Export of Pre-MiRNAs. *Rna* **2004**, *10* (2), 185–191.
- (19) Bartel, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **2004**, *116* (2), 281–297.
- (20) Vlahová, Veronika; Šmerková, Kristýna; Vaculovičová, Markéta; Kizek, R. MiRNA : Od Biogeneze Po Využití v Lékařství. **2014**, 18–22.
- (21) Garofalo, Michela; Croce, C. M. MicroRNAs as Therapeutic Targets in Chemoresistance. *Drug Resist. Updat.* **2013**, *16* (3–5), 47–59.
- (22) Ficková, M.; Nagy, M. Apoptóza - Programovaná Bunková Smrt' a Rastlinné Metabolity. *Chem. List.* **2007**, *101* (2), 131–137.
- (23) Majno, G.; Joris, I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death. *Am. J. Pathol.* **1995**, *146* (1), 3–15.
- (24) Formigli, L.; Papucci, L.; Tani, A.; Schiavone, N.; Tempestini, A.; Orlandini, G. E.; Capaccioli, S.; Orlandini, S. Z. Aponecrosis: Morphological and Biochemical Exploration of a Syncretic Process of Cell Death Sharing Apoptosis and Necrosis. *J. Cell. Physiol.* **2000**, *182* (1), 41–49.
- (25) Kerr, J. F. R.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide- Ranging Implications in Tissue

- Kinetics. *J. Intern. Med.* **1972**, 258 (6), 479–517.
- (26) Rai, N. K.; Tripathi, K.; Sharma, D.; Shukla, V. K. Apoptosis: A Basic Physiologic Process in Wound Healing. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* **2005**, 4 (3), 138–144.
- (27) Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Vandenabeele, P.; Abrams, J.; Alnemri, E. S.; Baehrecke, E. H.; Blagosklonny, M. V.; El-Deiry, W. S.; Golstein, P.; Green, D. R.; et al. Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **2009**, 16 (1), 3–11.
- (28) Chico, J. F.; Saggau, C.; Adam, D. *Proteolytic Control of Regulated Necrosis*; Elsevier B.V., 2017; Vol. 1864.
- (29) Hongmei, Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review. *Apoptosis Med.* **2012**, 3–22.
- (30) Festjens, N.; Vanden Berghe, T.; Vandenabeele, P. Necrosis, a Well-Orchestrated Form of Cell Demise: Signalling Cascades, Important Mediators and Concomitant Immune Response. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2006**, 1757 (9–10), 1371–1387.
- (31) Cohen, J. J. Programmed Cell Death in the Immune System; 1991; Vol. 50, pp 55–85.
- (32) Locksley, R. M.; Killeen, N.; Lenardo, M. J. The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* **2001**, 104 (4), 487–501.
- (33) Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, 35 (4), 495–516.
- (34) Wu, H.; Jeffrey Medeiros, L.; Young, K. H. Apoptosis Signaling and BCL-2 Pathways Provide Opportunities for Novel Targeted Therapeutic Strategies in Hematologic Malignances. *Blood Rev.* **2017**, No. xxxx.
- (35) Shi, Y. Caspase Activation, Inhibition, and Reactivation: A Mechanistic View. *Protein Sci.* **2004**, 13 (8), 1979–1987.
- (36) Thornberry, N. A. Caspases: Enemies Within. *Science (80-.)*. **1998**, 281 (5381), 1312–1316.
- (37) Irmeler, M.; Thome, M.; Hahne, M.; Schneider, P.; Hofmann, K.; Steiner, V.; Bodmer, J. L.; Schröter, M.; Burns, K.; Mattmann, C.; et

- al. Inhibition of Death Receptor Signals by Cellular FLIP. *Nature* **1997**, 388 (6638), 190–195.
- (38) Pietenpol, J. .; Stewart, Z. . Cell Cycle Checkpoint Signaling: Cell Cycle Arrest versus Apoptosis. *Toxicology* **2002**, 181–182, 475–481.
- (39) Hartwell, L.; Weinert, T. Checkpoints: Controls That Ensure the Order of Cell Cycle Events. *Science (80-.)*. **1989**, 246 (4930), 629–634.
- (40) Goh, A. M.; Coffill, C. R.; Lane, D. P. The Role of Mutant P53 in Human Cancer. *J. Pathol.* **2011**, 223 (2), 116–126.
- (41) Blagosklonny, M. V. P53: An Ubiquitous Target of Anticancer Drugs. *Int. J. Cancer* **2002**, 98 (2), 161–166.
- (42) Shvarts, A.; Steegenga, W. T.; Riteco, N.; van Laar, T.; Dekker, P.; Bazuine, M.; van Ham, R. C.; van der Houven van Oordt, W.; Hateboer, G.; van der Eb, A. J.; et al. MDMX: A Novel P53-Binding Protein with Some Functional Properties of MDM2. *EMBO J.* **1996**, 15 (19), 5349–5357.
- (43) Ortiz-Maldonado, V.; Mozas, P.; Delgado, J. The Biology behind B-Cell Lymphoma 2 as a Target in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Ther. Adv. Hematol.* **2016**, 7 (6), 321–329.
- (44) Davids, M. S.; Letai, A. Targeting the B-Cell Lymphoma/Leukemia 2 Family in Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2012**, 30 (25), 3127–3135.
- (45) Soriano, M. E.; Scorrano, L. Traveling Bax and Forth from Mitochondria to Control Apoptosis. *Cell* **2011**, 145 (1), 15–17.
- (46) Lindsten, T.; Aj, R.; King, a; Wx, Z.; Jc, R.; Ha, S. The Combined Functions of Proapoptotic Bcl-2 Family Members Bax and Bak Are Essential for Normal Development of Multiple Tissues. *Mol Cell* **2000**, 6, 1389–1399.
- (47) Kozopas, K. M.; Yang, T.; Buchan, H. L.; Zhou, P.; Craig, R. W. MCLI, a Gene Expressed in Programmed Myeloid Cell Differentiation, Has Sequence Similarity to BCL2. *Genetics* **1993**, 90 (April), 3516–3520.
- (48) Bae, J.; Leo, C. P.; Sheau Yu Hsu; Hsueh, A. J. W. MCL-1S, a Splicing Variant of the Antiapoptotic BCL-2 Family Member MCL-1, Encodes a Proapoptotic Protein Possessing Only the BH3 Domain.

- J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (33), 25255–25261.
- (49) Michels, J.; Johnson, P. W. M.; Packham, G. Mcl-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, 37 (2), 267–271.
- (50) Pommier, Y.; Leo, E.; Zhang, H.; Marchand, C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chem. Biol.* **2010**, 17 (5), 421–433.
- (51) Tse-Dinh, Y.-C. Targeting Bacterial Topoisomerase I to Meet the Challenge of Finding New Antibiotics. *Futur. Med. Chem.* **2015**, 7, 35–53.
- (52) Topcu, Z. DNA Topoisomerases as Targets for Anticancer Drugs. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2001**, 26 (6), 405–416.
- (53) Kathiravan, M. K.; Khilare, M. M.; Nikoomanesh, K.; Chothe, A. S.; Jain, K. S. Topoisomerase as Target for Antibacterial and Anticancer Drug Discovery. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, 28 (3), 419–435.
- (54) Hande, K. R. Topoisomerase II Inhibitors. *Update Cancer Ther.* **2008**, 3 (1), 13–26.
- (55) Pommier, Y. DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology and Interfacial Inhibition. *Chem. Rev.* **2009**, 109 (7), 2894–2902.
- (56) Fortune, J. M.; Osheroff, N. Topoisomerase II as a Target for Anticancer Drugs: When Enzymes Stop Being Nice. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2000**, 64, 221–253.
- (57) Pendleton, MAayJean; Lindsey, R. H. Jr.; Felix, C. A.; Osheroff, O. Topoisomerase II and Leukemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2014**, 40 (6), 1301–1315.
- (58) Rothenberg, M. L. Topoisomerase I Inhibitors: Review and Update. *Ann. Oncol.* **1997**, 8 (9), 837–855.
- (59) Alves, A. C.; Nunes, C.; Lima, J.; Reis, S. Daunorubicin and Doxorubicin Molecular Interplay with 2D Membrane Models. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, 160, 610–618.
- (60) Minotti, G. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **2004**, 56 (2), 185–229.

- (61) Misra, R.; Sahoo, S. K. Co-Formulation of Doxorubicin and Curcumin in Poly (D, L-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles Suppress the Development of Multi Drug Resistance in K562 Cells. *Mol.Pharm.* **2011**.
- (62) Peters, C.; Brown, S. Antibody-Drug Conjugates as Novel Anti-Cancer Chemotherapeutics. *Biosci. Rep.* **2015**, *35* (4), e00225–e00225.
- (63) He, H.; Tian, W.; Chen, H.; Deng, Y. MicroRNA-101 Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Doxorubicin-Induced Apoptosis via Targeting Mcl-1. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *13* (2), 1923–1929.
- (64) Doroshow, J. H. Role of Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Radical Formation in the Killing of Ehrlich Tumor Cells by Anticancer Quinones. *Med. Sci.* **1986**, *83* (June), 4514–4518.
- (65) Ray, P. D.; Huang, B. W.; Tsuji, Y. Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling. *Cell. Signal.* **2012**, *24* (5), 981–990.
- (66) Thorn, Caroline; Oshiro, Connie; Marsh, Sharon; Hernandez-Boussard, Tina; McLeod, Howard; Klein, Teri; Altman, R. Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects. *Pharmacogenet Genomics* **2012**, *21* (7), 440–446.
- (67) Yang, F.; Teves, S. S.; Kemp, C. J.; Henikoff, S. Doxorubicin, DNA Torsion, and Chromatin Dynamics. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2014**, *1845* (1), 84–89.
- (68) Kollinerová, S.; Dostál, Z.; Modrianský, M. MicroRNA Hsa-MiR-29b Potentiates Etoposide Toxicity in HeLa Cells via down-Regulation of Mcl-1. *Toxicol. Vitr.* **2017**, *40*, 289–296.
- (69) Lucey, B. P.; Nelson-Rees, W. A.; Hutchins, G. M. Historical Perspective Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Arch Pathol Lab Med* **2009**, *133* (9), 1463–1467.
- (70) Thermo Fisher Scientific. TRIzol Reagent User Guide - Pub. No. MAN0001271 - Rev. A.0. *User Guid.* **2016**, *15596018* (15596026), 1–6.
- (71) Chomczynski, P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. **1987**, *159*, 156–159.

- (72) Smith, P. K. .; Krohn, R. I. .; Hermanson, G. T. .; Mallia, A. K. .; Gartner, F. H. .; Provenzano, M. D. .; Fujimoto, E. K. .; Goeke, N. M. .; Olson, B. J. .; Klenk, D. C. . Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150* (1), 76–85.
- (73) Kurien, B. T.; Scofield, R. H. Western Blotting. *Methods* **2006**, *38* (4), 283–293.
- (74) Motif, A.; America, N.; Europe, A. M.; Bldg, A. Nuclear Extract Kit. *Protocols* **2011**, No. 86.
- (75) Schmittgen, T. D.; Livak, K. J. Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method. *Nat. Protoc.* **2008**, *3* (6), 1101–1108.
- (76) Biosystems, A. TaqMan MicroRNA Assays Protocol. *Design* **2006**, 1–36.
- (77) Rosenfeld, N.; Aharonov, R.; Meiri, E.; Rosenwald, S.; Spector, Y.; Zepeniuk, M.; Benjamin, H.; Shabes, N.; Tabak, S.; Levy, A.; et al. Numb Er 25 a Gene-Expression Signature As a Predictor of Survival in Breast Cancer. *English J.* **2008**, *347* (23), 3726–3734.
- (78) Boeri, M.; Verri, C.; Conte, D.; Roz, L.; Modena, P.; Facchinetti, F.; Calabro, E.; Croce, C. M.; Pastorino, U.; Sozzi, G. MicroRNA Signatures in Tissues and Plasma Predict Development and Prognosis of Computed Tomography Detected Lung Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (9), 3713–3718.