

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



Biologická aktivita mikroRNA-29b

Bakalářská práce

Autor:	Jana Buchtíková
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, Ph.D.

Olomouc 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití pramenů, které cituji v seznamu literatury.

V Olomouci dne

.....

Jana Buchtíková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu Prof. Mgr. Martinu Modrianskému, Ph.D. za cenné rady, ochotu, vstřícnost a především trpělivost při vypracování této bakalářské práce. Poděkování patří také Mgr. Zdeňku Dostálovi, Ph.D., který mi vysvětlil veškerou metodiku využívanou v rámci laboratorní praxe a byl ochoten mi při vyskytnutí se jakýchkoliv problémů vždy pomoci. Dále bych chtěla poděkovat Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP v Olomouci za možnost svou bakalářskou práci vypracovat zde. Velký dík patří také především mé rodině a přátelům, kteří mi byli během celého studia velikou oporou.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Jana Buchtíková
Název práce:	Biologická aktivita miRNA-29b
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, Ph.D.
Rok obhajoby:	2020
Abstrakt:	Etoposid je lék využívaný k léčbě rakoviny varlat, plic či leukémie. Efektivitu léčiva je však možné ovlivnit, například působením mikroRNA, což jsou krátké nekódující RNA, které ovlivňují širokou škálu buněčných aktivit. Cílem práce bylo posoudit, je-li navýšení efektivity Etoposidu vlivem mikroRNA-29b obecně platné pro tři různé typy malignit. Zásadními metodami pro experimentální práci byly transfekce buněk, real-time PCR, posouzení viability a imunodetekce.
Klíčová slova:	Etoposid, mikroRNA, viabilita
Počet stran:	65
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Jana Buchtíková
Title:	Biological activity of microRNA-29b
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacky University, Olomouc
Advisor:	Prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.
Consultant:	Mgr. Zdeněk Dostál, Ph.D.
The year of presentation:	2020
Abstract:	Etoposide is used to treat different types of cancer: testicles, lungs or leukemias. Effectiveness of treatment could be influenced e.g. by microRNA activity, where miRNA is a short non-coding RNA that affects a broad range of cellular activities. Aim of this work was to evaluate whether enhancement of Etoposide effectiveness by miRNA-29b is a generally applicable for three different malignancies. Crucial methods used in the evaluation were real-time PCR, viability evaluation and immunodetection.
Keywords:	Etoposide, microRNA, viability
Number of pages:	65
Number of appendixes:	0
Language:	Czech

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část	9
2.1	<i>Etoposid</i>	9
2.2	<i>MikroRNA (miRNA, miR)</i>	21
2.3	<i>Rodina miRNA-29</i>	24
2.4	<i>Mcl-1</i>	26
3	Cíl práce	28
4	Experimentální část.....	29
4.1	<i>Materiál</i>	29
4.2	<i>Metody</i>	36
5	Výsledky	49
5.1	<i>Stanovení cytotoxicity Etoposidu</i>	49
5.2	<i>xCELLigence</i>	51
5.3	<i>Imunodetekce</i>	52
5.4	<i>RT-PCR</i>	55
6	Diskuze	58
7	Závěr	60
8	Literatura.....	61

SEZNAM ZKTRATEK

		H9c2	buněčná linie představující potkaní kardiomyoblasty
AA	akrylamid	HOAc	kyselina octová
APS	amonium persulfát	i.v.	intravenózní podání
BAFF	aktivační faktor B-lymfocytů	j.d.	jamková deska
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	Mcl-1	myeloid cell leukemia-1
CACO-2	buněčná linie odvozená od karcinomu tlustého střeva	mRNA	messenger RNA
		miRNA	mikroRNA
c-Myc	Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog	MDR	fenotyp multidrogové rezistence
		MeOH	methanol
CDC42	Cell division control protein 42	MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
DMAP	4-dimethylaminopyridin	NC	negativní kontrola
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	NČ	neutrální červeň
		pre-miRNA	prekurzorová miRNA
DMSO	dimethylsulfoxid	PBS	fyzilogický roztok uprav. fosfátem na pH 7,4
DNA	deoxyribonukleová kyselina	Ph	fenyl
		P/S	Penicilin/Streptomycin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová	PVDF	polyviniliden fluorid
		P53	nádorový protein o velikosti 53 kDa
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová	SDS	dodecylsulfát sodný
		RNA	ribonukleová kyselina
EtOH	ethanol	TEMED	tetramethylethylendiamin
FBS	fetální bovinní sérum	THF	tetrahydrofuran
FDA	Food and Drug Administration	Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza	TsOH	kyselina p-toluensulfonová
		WB	western blotting
Hep G2	buněčná linie odvozená od karcinomu jater		

1 Úvod

Léčba maligních onemocnění je v poslední době velmi diskutovaným tématem. Mnoho výzkumných skupin se snaží objevit takový způsob léčby, který by byl velice šetrný vůči nepoškozeným buňkám a zároveň co nejvíce toxický vůči buňkám maligním.

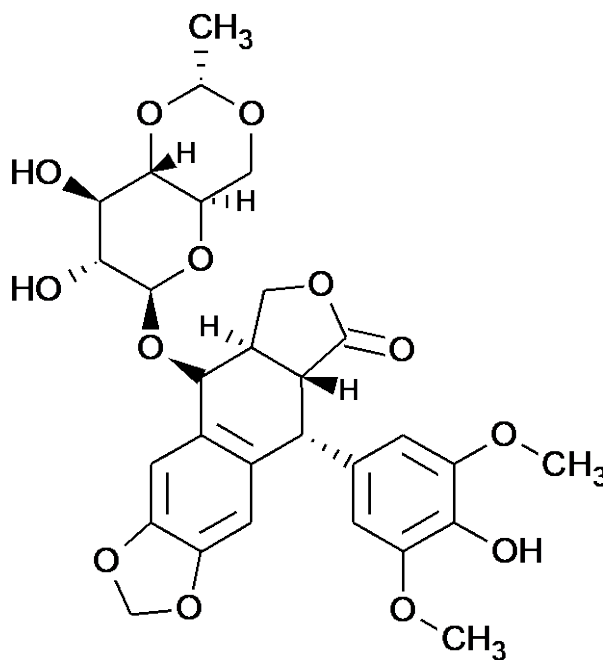
Jedním z léčivých přípravků využívaných k léčbě rakoviny, a to konkrétně rakoviny plic, varlat či leukémie je Etoposid. Etoposid je semisyntetickým derivátem podofylotoxinu a aktivní komponentou farmaceutických přípravků jako jsou např. Etopophos nebo Toposar. Existuje několik syntetických cest, jak Etoposid upravit, aby byl biodostupnějším. Jeho biologickou aktivitu však mohou také modulovat mikroRNA.

MikroRNA jsou krátké nekódující RNA o délce 19-25 nukleotidů, které ovlivňují širokou škálu buněčných aktivit. Ovlivněním exprese určitých cílových proteinů pak mohou mikroRNA mít vliv na apoptózu, a tím tak navyšovat efektivitu cytostatik. Tato práce se zabývá konkrétně mikroRNA-29b a proteinem Mcl-1, což je jeden z potvrzených cílů mikroRNA-29b.

2 Teoretická část

2.1 Etoposid

Etoposid je semisyntetický derivát podofylotoxinu, který se vyskytuje např. v noholistu štítnatém (*Podophyllum peltatum*. Linn.), a je aktivní komponentou farmaceutických přípravků známých např. pod obchodními názvy Toposar a Etopophos. Alternativní označení užívané v odborné literatuře je VP-16. Existuje i další derivát podofylotoxinu, kterým je Teniposid. Oba tyto deriváty vykazují cytostatické účinky a mohou být dále modifikovány za účelem dosažení co nejmenší toxicity vůči zdravým buňkám. V současné době je Etoposid vyráběn zcela synteticky¹. První syntéza Etoposidu se uskutečnila v roce 1966 a o téměř dvacet let později, roku 1983, udělil americký Úřad pro kontrolu léčiv a potravin (US FDA) schválení pro klinické použití².



Obr. 1: Struktura Etoposidu. Nakresleno v programu Chems sketch.

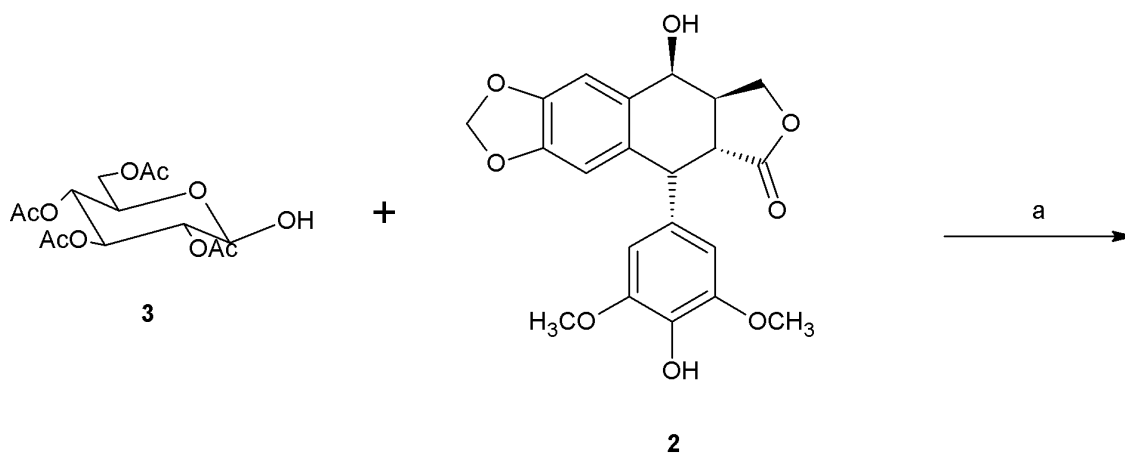
Jedná se o chemoterapeutikum využívané k léčbě mnoha typů rakoviny, a to konkrétně rakoviny varlat, lymfomu, plic, leukémie a vaječnicků. Často se podává v kombinaci s jinými léky, např. s bleomycinem v rámci léčby rakoviny varlat. Aplikuje

se perorálně ve formě tablet či tobolek nebo intravenózně, přičemž během intravenózní aplikace je nutno tento lék podávat pomalu, a to po dobu třiceti až šedesáti minut z důvodu minimalizace nežádoucích účinků jako je např. pokles krevního tlaku¹. S ohledem na desítky let využití Etoposidu jsou dobře známy nežádoucí účinky. Mezi ty běžné se řadí zejména nízký krevní tlak, ztráta vlasů, zácpa nebo průjem, nízký počet červených krvinek vedoucích ke snadné tvorbě modřin a krvácení. Dalšími nežádoucími účinky jsou pak nevolnost a zvracení, alergická reakce, horečka, dušnost, tachykardie, pachuť v ústech a další^{1,3}.

2.1.1 Syntéza Etoposidu

Existuje mnoho způsobů syntézy Etoposidu zahrnujících reakci derivátu glukopyranózy, často aktivovaného na anomerické hydroxylové skupině, se 4'-chráněným 4'-demethylepipodofylotoxinem. Následně dochází k odstranění chránicí skupiny v poloze 4'. Obecně se liší v aktivaci anomerní OH skupiny donorů glukosylu a (nebo) povaze ochrany 4'-hydroxyskupiny 4'-demethylepipodofylotoxinu **2**⁴.

Syntetická strategie Alleviho et al. pro získání Etoposidu se snažila vyhnout použití jakékoliv chránicí skupiny provedením chemoselektivní O-glukosidace. Zde uvádím syntézu Etoposidu cestou, která zahrnuje jako klíčový krok přímou O-glukosidaci nechráněné látky **2**. (Schéma 1).



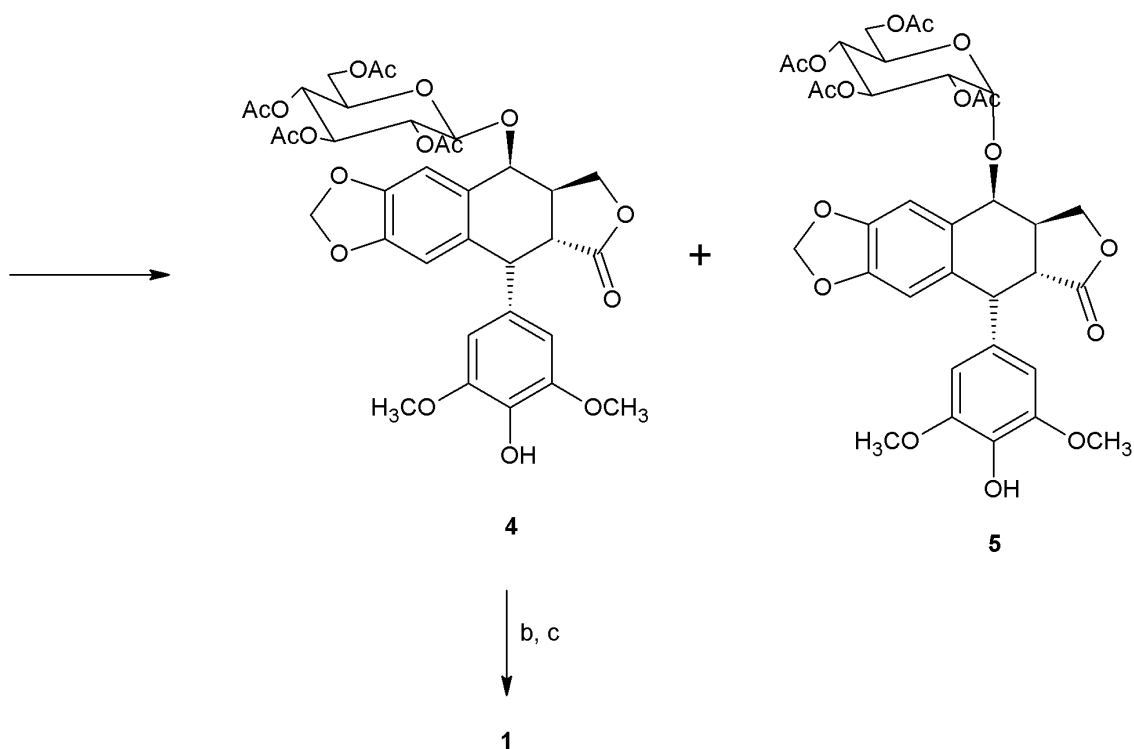


Schéma 1: Syntéza Etoposidu. (a) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min. (b) 2 ekv. $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, MeOH , reflux, 40 hod. (c) 21 ekv. $\text{MeCH}(\text{OMe})_2$, 0,3 ekv. TsOH , MeNO_2 , $25\text{ }^\circ\text{C}$, 2 hod. Nakresleno v programu Chemscketch dle Alleviho et al.⁴.

Glukosidace se v rámci této syntézy provádí jednoduše reakcí jednoho ekvivalentu aglykonu (**2**) rozpuštěného v 80 ml dichlormethanu s 1,5 ekvivalentem 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D glukopyranózy (**3**) v přítomnosti $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (3 ekv.) při $-20\text{ }^\circ\text{C}$. K reakci dochází po krátké době (30 minut). Glukosidace poskytuje O-glukosid jak regioselektivním, tak i stereoselektivním způsobem. Výtěžky reakce jsou 75%. Zpracování reakce musí být provedeno jednoduše nalitím reakční směsi do ledové vody za intenzivního míchání bez předchozího holého ošetření pro neutralizaci Lewisovy kyseliny. Za těchto podmínek byla získána látka č. **4**, doprovázená pouze stopovým množstvím (3%) α-epimeru (**5**). Pokusy prováděné za účelem stanovení nejlepších reakčních podmínek ukázaly, že správná β-stereochemie anomerního uhlíku sloučeniny **4** silně závisí na teplotě O-glukosidační reakce, jakož i na anomerické konfiguraci výchozího tetraacetátu glukózy. Pokud totiž reakce probíhala počínaje sloučeninou **3** při $0\text{ }^\circ\text{C}$ nebo při $20\text{ }^\circ\text{C}$, O-glukosidy (**4** a **5**) byly získány v poměru 84:16 respektive 27:73. Pokud se reakce prováděla při $-30\text{ }^\circ\text{C}$ na směsi **3** a jejího α-anomeru (30:70), O-

glukosidy **4** a **5** byly získány v poměru 50:50, což ukazuje na nepřítomnost anomerizace při této teplotě. Stereochemie sloučenin **4** a **5** byla potvrzena zkoumáním jejich ¹H-NMR spekter (500 MHz)⁴.

Dalším způsobem, jak syntetizovat Etoposid **1** je stereoselektivní glykosidační reakce dle Silverberga et al., kdy výchozími sloučeninami jsou snadno dostupný 4'-demethyl-4-epipodofylotoxin (**3**), a 4,6-ethyliden-2,3-O-dibenzyl-D-glukózy (**4**). Tato reakce je indukovaná krystalizací, po které následuje katalytická hydrogenace. Výtěžek reakce je 79,2%.

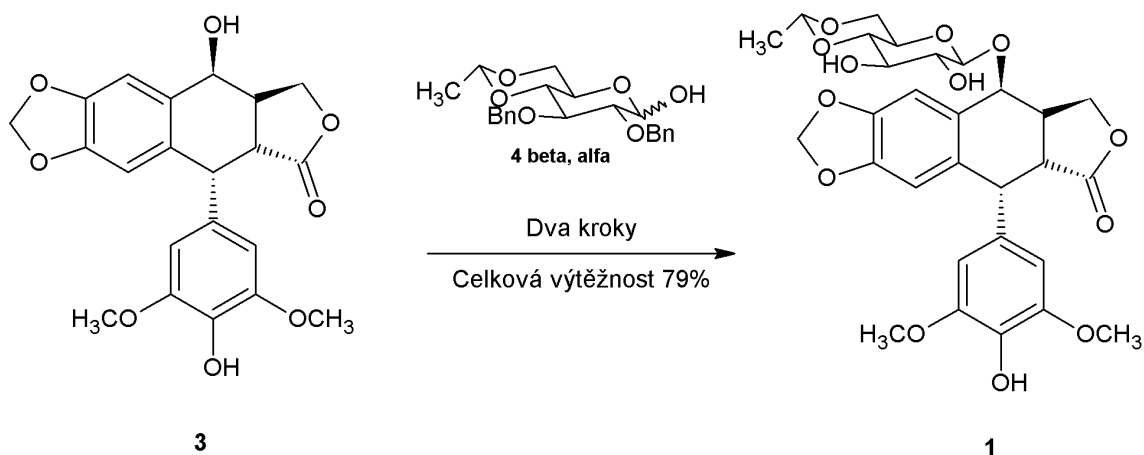
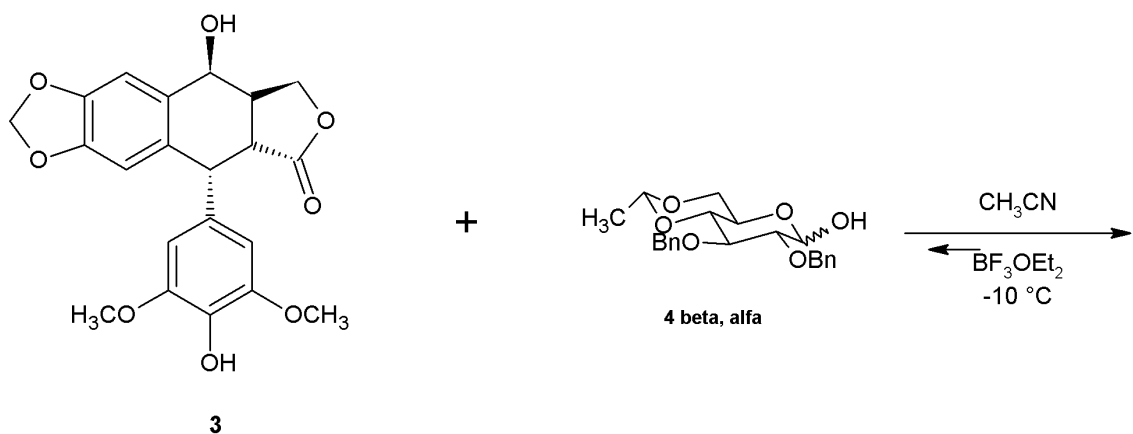


Schéma 2: Shrnutí stereoselektivní glykosidační reakce Etoposidu. Nakresleno v programu Chemscketch dle Silverberga et al.⁵.

Při navrhování syntetické cesty k získání Etoposidu je velice důležitý výběr chránicích skupin pro monosacharid. Podmínky pro odstranění chránicích skupin musí být mírné. Důvodem je dosažení vysokého výtěžku a zabránění štěpení ethylidenové vazby katalyzované kyselinou. V rámci tohoto článku⁵ zkoumali autoři použití benzylové skupiny pro ochranu pozic 2- a 3- u 4,6-O-ethyliden-glukózy. K jejímu odstranění se totiž využívá katalytické hydrogenace, díky které se za neutrálních podmínek dosahuje vysokých výtěžků. Dřívější studie syntézy Etoposid fosfátu prokázaly, že hydrolytické podmínky potřebné pro odstranění C-1 kyslíkové chránicí skupiny ze **4** vedly k vytvoření anomerní směsi. Přestože se zahřátím pod teplotu tání sloučenina č. **4** mohla přeměnit primárně na β -anomer, bylo zjištěno, že za reakčních podmínek (Lewisova kyselina) potřebných k navázání cukru na aglykon došlo k částečné anomerizaci. Reakce **3**

s etherátem fluoridu boritého (1,5 ekvivalent.) v přítomnosti dibenzyl-cukru (**4**) (>90% β) v acetonitrilu při $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ vedla během 10 minut k vytvoření krystalické kaše (Schéma 3). HPLC analýza směsi po 20 minutách ukázala, že reakce byla v podstatě kompletní a že přítomnost požadovaného kondenzovaného produktu **2 β** spolu s **2 α** je v poměru 2,4:1. Analýza pevné látky odhalila přítomnost **2 β** a **2 α** v poměru 95:5. Po dokončení krystalizace (5 hodin) byl pro potlačení Lewisovy kyseliny přidán pyridin. Extrakčním zpracováním se po krystalizaci z acetonitrilu získal spojený produkt. Pomocí HPLC analýzy bylo zjištěno, že izolovaná pevná sloučenina **2 β** obsahovala pouze stopu **2 α** . Zdá se, že jakmile je krystalizace zahájena, rovnováha je vedena směrem k **2 β** , což vede ke krystalizaci indukované stereoselektivní glykosidační reakci. Rekrystalizace z methylenchlorid-methanolu pak vedla k **2 β** v 81,8% celkového výtěžku ze sloučeniny č. **3** s mimořádně vysokou HPLC čistotou 99,7% bez detekovaných hladin **2 α** . Katalytickou hydrogenací **2 β** za použití Pd na uhlíku v THF při 344,7 kPa po dobu 4 hodin se po zpracování a krystalizaci z THF-voda Etoposid (**1**) získal v 96,8% výtěžku s čistotou 100%. Celkový výtěžek vztažený na sloučeninu č. **3** je 79,2%⁵.



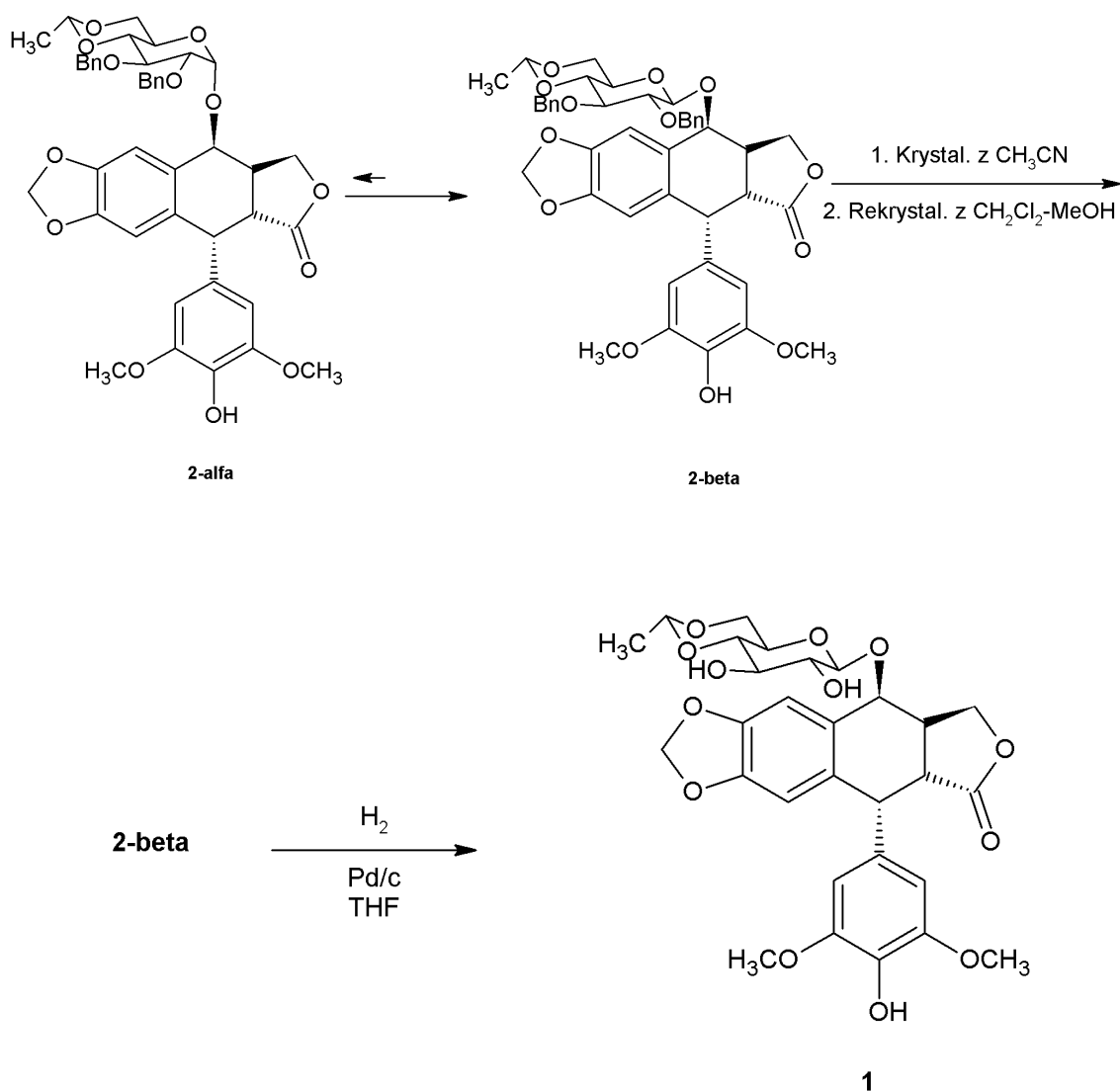


Schéma 3: Syntéza Etoposidu zobrazena v jednotlivých krocích. Nakresleno v programu Chems sketch dle Silverberga et al.⁵.

2.1.2 Syntéza Etoposid fosfátu

Výše popsané syntézy se týkaly Etoposidu jako takového. Vzhledem k širokému použití Etoposid fosfátu v klinických aplikacích je v této kapitole popsána syntéza ve vodě rozpustného Etoposid fosfátu, o kterém píší v podkapitole 2.1.4.

Etoposid fosfát (BMY-40481) je syntetizován semisynteticky z klinicky schváleného léčiva Etoposidu a / nebo z přírodního (-) - epipodofylotoxinu.

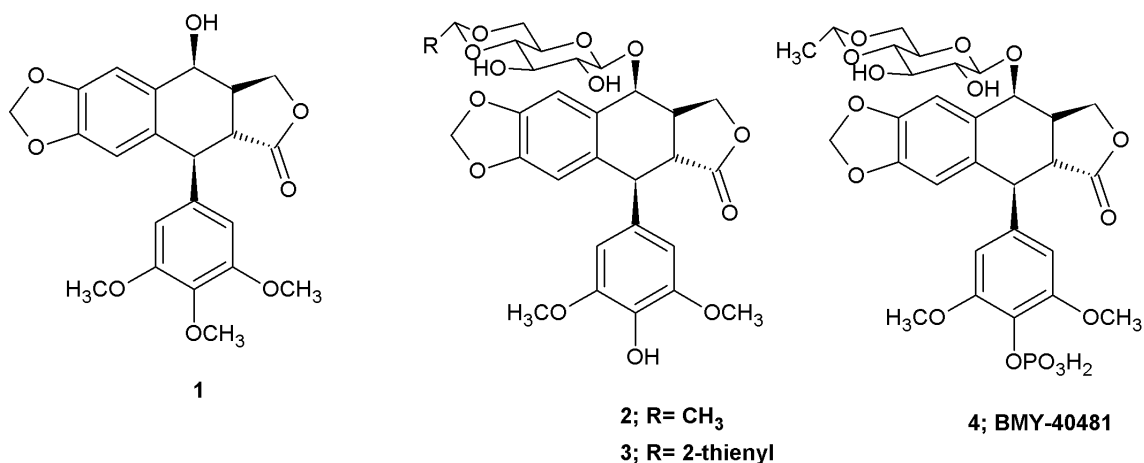


Schéma 4: Struktury (-)-podofylotoxinu (**1**), Etoposidu (**2**), Teniposidu (**3**), Etoposid fosfátu (**4**). Nakresleno v programu Chemscketch podle Saulniera et al.⁶

Za použití N, N-diisopropylethylaminu (4 ekviv.) a čistého POCl₃ (1,1 ekviv.) v acetonitrilu při 0 °C se Etoposid **2** regioselektivně převede na jeho 4'-dichlorfosfátový meziprodukt **5** (Schéma 5). Po hydrolyze za použití vodného hydrogenuhličitanu sodného a chromatografii s reverzními fázemi přes oktadecylsilan navázaný na silikagel, eluuje H₂O:CH₃OH (4:1) disodnou sůl Etoposid fosfátu (BMY-40481-30; **6**) v 36% výtěžku, kterého je dosaženo po lyofilizaci.

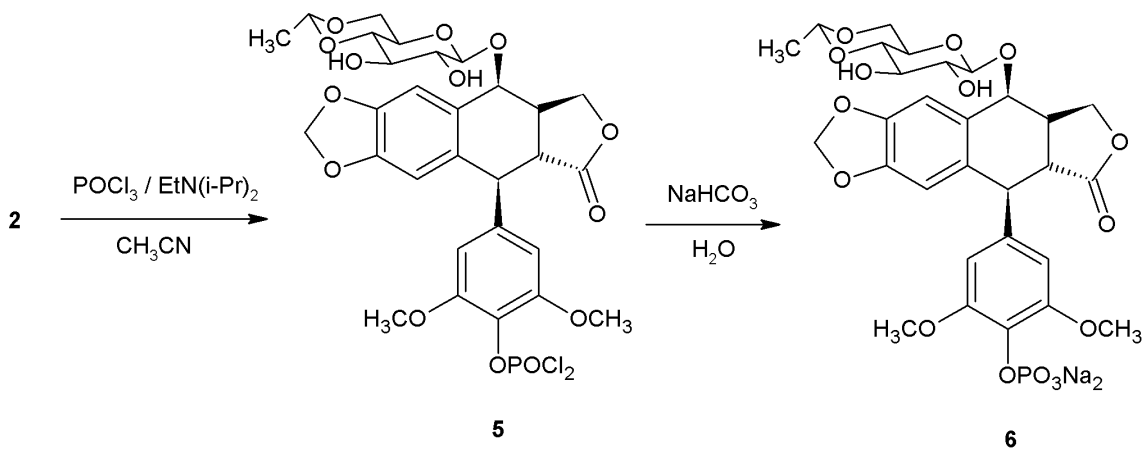


Schéma 5: Syntéza disodné soli Etoposid fosfátu připravená z Etoposidu. Nakresleno v programu Chemscketch podle Saulniera et al.⁶

Účinnější a přímější metodou pro syntézu Etoposid fosfátu **4** je přímá fosforylace Etoposidu **2** pomocí difenylchlorfosfátu (EtN(i-Pr)₂, CH₃CN), čímž se po rychlé chromatografii na silikagelu získá 4'-difenylfosfát **7** v 85% výtěžku. Hydrogenace **7**

(EtOH, 310,2 – 344,7 kPa H₂) katalyzovaná oxidem platičtým poskytlá BMY-40481 v 94% výtěžku (Schéma 6).

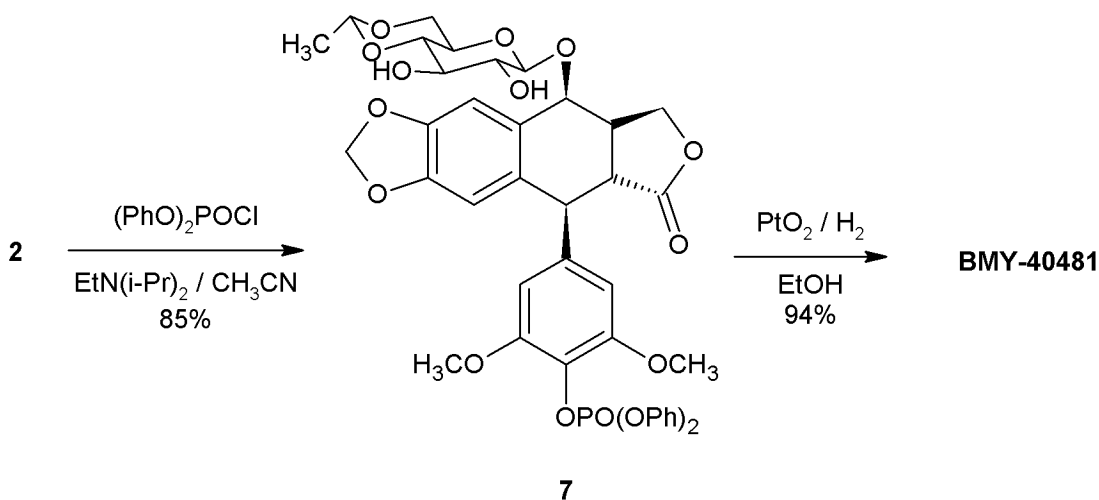


Schéma 6: Syntéza Etoposid fosfátu z Etoposidu. Nakresleno v programu Chems sketch dle Saulniera et al.⁶.

Již dříve byla popsána syntéza analogu 3', 5'-didesmethoxyetoposidu s využitím glykosylace 4'-fenol chráněného meziproductu epipodofylotoxinu (Saulnier et al.⁶). Ve skutečnosti několik patentovaných syntéz Etoposidu vychází z přírodního (-)-podofylotoxinu **1**. Zpočátku je **1** demetylovaný a poté převeden na 4'-chráněný epipodofylotoxinový meziproduct. Tento meziproduct kondenzuje s chráněnou β-D-glukopyranózou, čímž je po případné deprotekcii všech hydroxylových skupin získán Etoposid. Saulnier et al. usoudili, že jednodušší syntéza Etoposid fosfátu by mohla být provedena prostřednictvím 4'-fosfátem chráněného epipodofylotoxinu, kde by difenylová nebo dibenzylfosfátová skupina sloužila jako chránící skupina.

4'-demethylepipodofylotoxin **8**, připravený z (-)-podofylotoxinu, je tedy fosforylován za použití difenylchlorfosfátu a dibenzylchlorfosfátu (EtN(i-Pr)₂, 4-DMAP, CH₃CN, pokojová teplota, 16 hodin), čímž jsou připraveny odpovídající 4'-demethylepipodofylotoxin-4'-fosfáty **9a** (30%) a **9b** (38%) (Schéma 7).

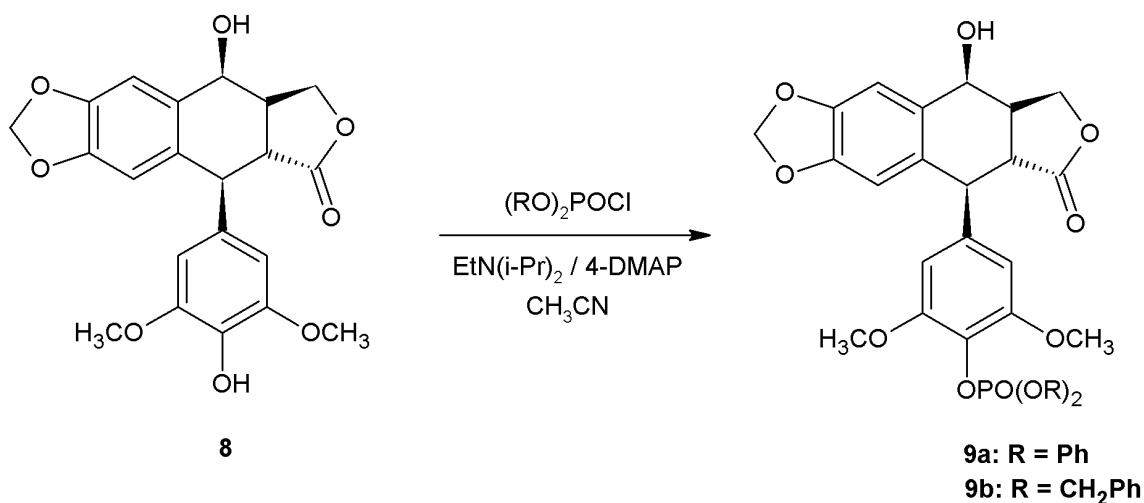


Schéma 7: Fosforylace 4'-demethylenpipodofylotoxinu. Nakresleno v programu Chemscketch dle Saulniera et al.⁶

Glykosylací **9a** a **9b** pomocí 4,6-O-ethyliden-2,3-O-[(β , β , β -trichlorethoxy)-karbonyl]- β -D-glukopyranózy ($BF_3 \cdot Et_2O$ / $ClCH_2CH_2Cl$ / -20 °C) jsou získány **10a** (80%) a **10b** (85%) (Schéma 8). Deprotekce 2" a 3" sacharidových hydroxylových skupin **10a** a **10b** za použití zinkového prachu ve směsi 2:1 THF: HOAc poskytuje **7** (83%) a **11** (66%). Etoposid 4'-difenylfosfát **7** se snadno převádí na Etoposid fosfát **4**. Etoposid 4'dibenzylfosfát **11** podléhá transferové hydrogenolýze (10% Pd/C, 1-methyl-1,4-cyklohexadien, CH_3OH , 40-45 °C) a po krystalizaci z absolutního ethanolu je získán Etoposid fosfát **4** (60 až 90%)⁶.

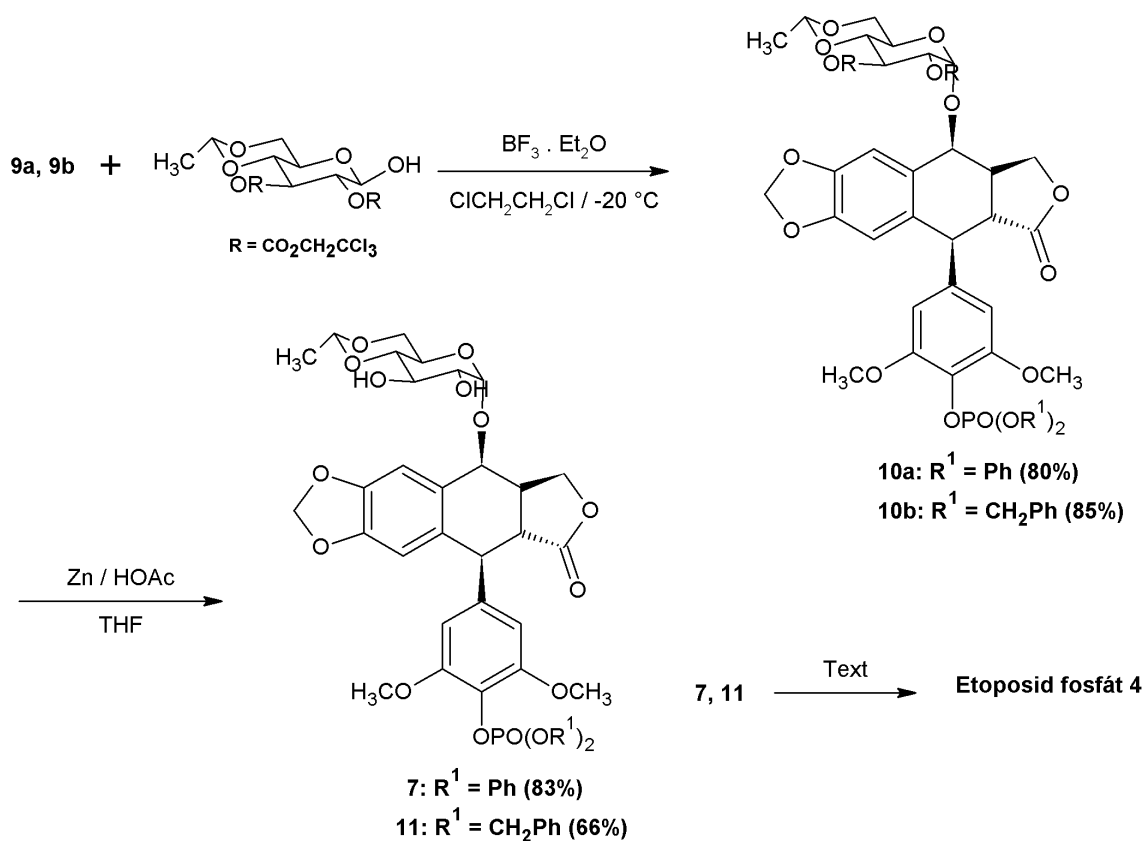


Schéma 8: Syntéza Etoposid fosfátu z 9a a 9b. Nakresleno v programu Chems sketch dle Saulnier a al.⁶.

2.1.3 Metabolismus Etoposidu

Orální biologická dostupnost Etoposidu je přibližně 50%. Neexistuje důkaz, že by docházelo k pozdní akumulaci Etoposidu jak v případě intravenózní, tak perorální aplikace⁷. Creaven a Allen aplikovali pacientům ve svých klinických studiích intravenózní Etoposid značený tritiem (³H)⁸. Následně byla za účelem rozlišení nezměněného léčiva od metabolitů provedena tenkovrstvá chromatografie vzorků krve a moči. Přibližně 50% z celkové radioaktivně značené podané dávky bylo detekováno v moči, přičemž dvě třetiny radioaktivity byly přítomny jako nezměněné léčivo. Tyto experimenty dokumentovaly několik klíčových bodů o farmakologii Etoposidu. Za prvé, přibližně jedna třetina podaného Etoposidu se vyloučí moči. Za druhé, do žluči je vylučováno méně než 2% léku, a to v podobě neporušeného léčiva. Za třetí, jaterní metabolismus představuje 25% Etoposidové clearance. Etoposid je primárně přeměňován pomocí UGT1A1 (UDP-glukuronyltransferáza 1A1) na fenolický glukuronidový

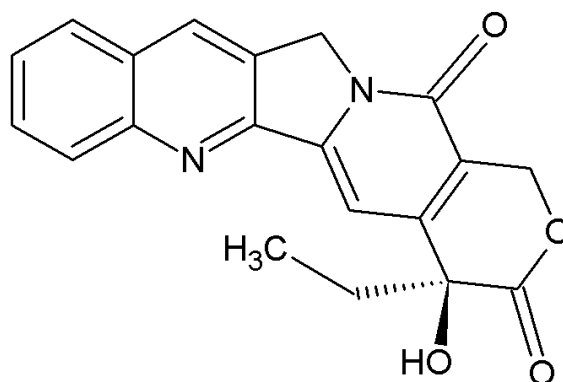
metabolit. Také je metabolizován na reaktivní metabolit katecholu pomocí cytochromu P450 3A4. Metabolit katecholu je však stejně jako Etoposid cytotoxický. V případě, kdy se u pacienta vyskytne mírná až střední jaterní dysfunkce, není vyžadováno snížení dávky Etoposidu a také se ani nezvyšuje jeho toxicita^{2, 9}.

2.1.4 Formy Etoposidu využívané v rámci terapie

Etoposid je sám o sobě bílý až žlutohnědý krystalický prášek, který je téměř nerozpustný ve vodě¹. Aby mohl být aplikován formou intravenózního podání, byl proto rozpuštěn v solubilizátoru složeném z polysorbátu 80, polyethylenglykolu, označovaný jako Tween 80, a alkoholu a zředěn na koncentraci menší než 0,4 mg/ml, aby nedocházelo k precipitaci. Využití takto připraveného léčiva však ukázalo, že Tween 80 může vyvolávat hypersenzitivní reakce. Aby se minimalizovalo riziko hypersenzitivní reakce a zároveň byly překonány problémy s rozpustností, byly provedeny pokusy molekulu modifikovat. Výsledkem modifikace je Etoposid fosfát. Etoposid fosfát byl schválen FDA jako Etoposidové proléčivo pro intravenózní použití v roce 1996. Je rozpustný ve vodě, riziko reakce přecitlivělosti tedy může být sníženo, protože zde pro rozpuštění není požadován solubilizátor. Několik studií ukázalo, že Etoposid fosfát je rychle (do 15 minut) a kompletně přeměněn na Etoposid působením endogenních fosfatáz, je farmakokineticky ekvivalentní Etoposidu a jeho toxické účinky jsou taktéž stejné jako u Etoposidu^{2, 9}.

2.1.5 Mechanismus působení

Etoposid byl prvním přípravkem uznávaným jako protinádorové léčivo inhibující topoizomerázu II. Topoizomerázy jsou jaderné enzymy způsobující přerušování vláken DNA, které umožňují buňce manipulovat s její topologií a také jsou nezbytné pro replikaci, transkripci, chromozomální rozdělení a DNA rekombinaci. Ve všech buňkách jsou přítomny dvě hlavní formy topoizomerázy. Enzym typu I, který byl poprvé popsán v roce 1971 a enzym typu II, který byl popsán o pár let později, v roce 1976. Topoizomeráza I umožňuje jednovláknové štěpení DNA. Je známo několik antineoplastických léčiv, které jsou jejími inhibitory, např. Camptothecin, jehož struktura obsahuje jako základní motiv pyrrolo chinolin konjugovaný s pyridonem.



Obr. 2: Struktura Camptothecinu. Nakresleno v programu Chemscketch.

Topoizomeráza II umožňuje dvouvláknové štěpení DNA. Mezi inhibitory této topoizomerázy patří také několik v současnosti používaných antineoplastických léčiv, kterými jsou např. Etoposid, Teniposid, ale také Doxorubicin či Mitoxantron. Oba typy topoizomeráz umožňují prostřednictvím štěpení vláken DNA vzájemné propletení těchto vláken do uvolněnější konfigurace.

Topoizomeráza II existuje ve dvou izoformách. Jsou to izoformy alfa a beta, které se během buněčného cyklu liší svou úrovní exprese. Koncentrace alfa izoformy se během G2/M fáze buněčného cyklu zvyšuje dvakrát až třikrát. V rychle proliferujících buňkách je pak řádově vyšší než v klidové buněčné populaci. Experimentální data naznačují, že cílem Etoposidu je právě alfa izoforma, protože izoforma beta se během buněčného cyklu nijak významně nemění a má potenciál pro cílení na pomalu rostoucí nádory^{2, 8}.

Topoizomerázy II jsou maximálně aktivní během fází S a G2 buněčného cyklu¹⁰. Využívají ATP k modulaci topologie DNA průchodem neporušené šroubovice přechodným dvouvláknovým zlomem v DNA. Po průchodu řetězcem se páteř DNA znovu sestříhne a obnoví se její struktura. Etoposid brání topoizomeráze II v opětovném napojení štěpené DNA^{2, 11}. Při štěpení topoizomerázou vzniká tzv. štěpný komplex, který je v rámci této reakce krátkodobým meziproduktem. Etoposid ho však značně stabilizuje a z tohoto důvodu dochází ke kolizi letálních dvouvláknových zlomů s replikační vidlicí, což má za následek cytotoxickou aktivitu^{12, 13}.

Buněčné signální dráhy DNA, která je poškozená důsledkem topoizomerázy, vedoucí k apoptóze dodnes ještě stále nejsou zcela pochopeny. Mechanismy účastníci se těchto signálních drah se snažil objasnit nedávný výzkum, který studoval kaspázy.

Kaspázy jsou skupinou cysteinových proteáz organizující apoptózu. Robertson et al. identifikovali kaspázu 2 jako důležitý bod, který má jisté spojení mezi poškozením DNA, indukované Etoposidem, a zapojením mitochondriální apoptotické dráhy. Kaspáza 2 aktivuje kaspázu 8, což má za následek mitochondriální poškození a následnou aktivaci kaspáz 9 a 3. Kaspáza 3 se jeví jako kritická pro marginalizaci chromatinu asociovanou s apoptózou, fragmentací DNA a jaderným kolapsem. Marginalizace je charakteristika distribuce chromatinu, kde je zbarvený materiál viděn na dvourozměrném obrázku „nashromážděn“ na jaderné membráně. Buňky, které kaspázu 3 postrádají, jsou vůči Etoposidu rezistentní. Expresi kaspáz indukovaných Etoposidem zvyšuje ligand, který indukuje apoptózu, jenž souvisí s odumřením části tkáně nádoru. V apoptóze indukované Etoposidem jsou důležitými mediátory také i jiné proteiny, které regulují buněčný cyklus. Patří mezi ně P53, c-Myc a BAFF. Tyto proteiny byly identifikovány jako klíčové k zastavení progresu buněčného cyklu a navození apoptózy v určitých buněčných liniích, vystavených Etoposidu.

Mohou také nastat situace, kdy maligní buňky vystavené působení Etoposidu nevykazují očekávaný účinek. Tzv. rezistence na Etoposid je zaznamenána např. v buňkách, které mají fenotyp multidrogové rezistence (MDR). Modifikací struktury Etoposidu na proléčivo se však podařilo vyvinout i takové analogy Etoposidu, které jsou in vitro aktivní právě také proti nádorům, které vykazují rezistentní fenotyp MDR. K rezistenci na léčiva může taktéž vést rychlá oprava zlomů DNA způsobených Etoposidem¹¹.

2.2 MikroRNA (miRNA, miR)

Geny jsou základními stavebními a funkčními jednotkami lidského genomu. Prakticky denně jsou přepisovány do molekul RNA, kdy v rámci proteosyntézy slouží jako matrice pro vznik proteinů. Takto jsou však přepisovány pouze 1-3% genů. Ty jsou označovány jako protein kódující. Novodobé metody molekulární biologie prokazují, že až 75% genomu je aktivně přepisováno a většina těchto RNA neslouží jako matrice pro syntézu bílkovin, ale má regulační funkci. Tyto RNA jsou tedy označovány jako nekódující. Podle délky se rozdělují na dlouhé nekódující RNA (lncRNA) a krátké nekódující RNA (sncRNA). SncRNA zahrnují kromě např. malých jaderných RNA (snRNA) také mikroRNA¹⁴.

MikroRNA (též miR, miRNA) byla poprvé objevena v roce 1993 Lee et al. v hlístici *Caenorhabditis elegans*¹⁵. Jedná se o nekódující RNA dlouhé 19-25 nukleotidů, jež jsou exprimované v široké škále eukaryotických organismů^{16,17}. Tyto malé RNA se podílí na regulaci genové exprese, kterou snižují párováním bází se 3' nepřekládanými oblastmi (3' UTR) cílových mRNA^{17,18}. Jejich úroveň je ovlivňována vnějšími stimuly nebo přítomností nemoci, a to nejen ve tkáních, ale také i v tělních tekutinách, kde jsou velmi stabilní^{14,19}. Jedna miRNA bývá často zapojena do regulace mnoha signálních drah, ať již vzájemně propojených nebo zcela nezávislých.

V roce 2002 byl zřízen registr miRNA pod názvem miRBase, který slouží jako primární online úložiště pro všechny potenciální sekvence miRNA, anotace, nomenklatury a informace o predikci cílové mRNA¹⁵.

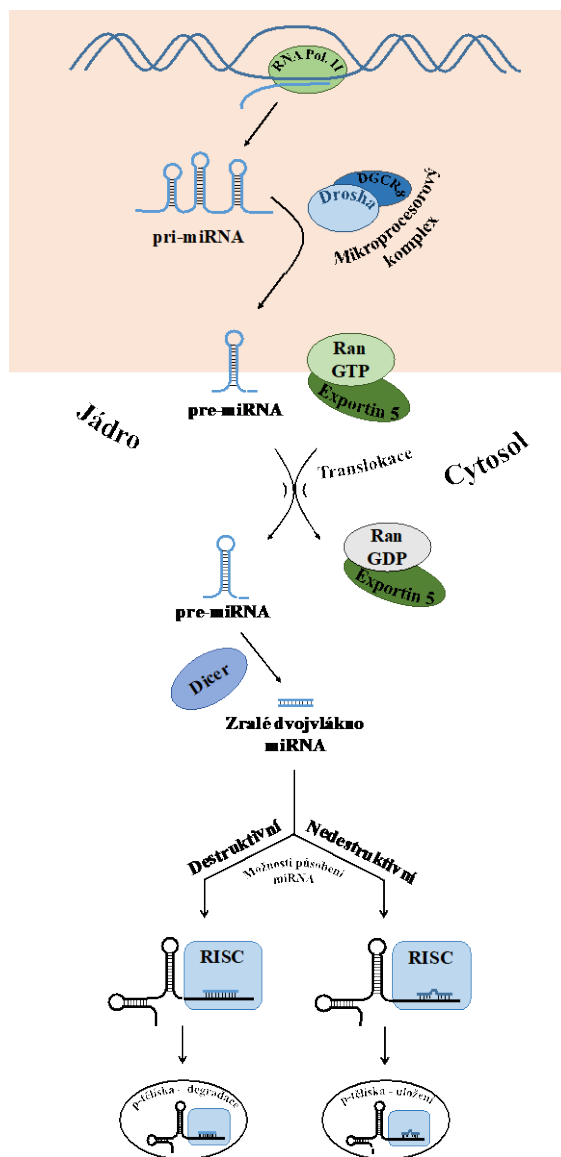
2.2.1 Biogeneze miRNA

Geny miRNA se mohou ve svém umístění v genomu značně lišit. Buď pochází z intronů transkriptů kódujících proteiny anebo z exonů nekódujících transkriptů. Byly také objeveny shluky genů miRNA, které koexprimují polycistronicky, tj. jsou exprimovány společně s jiným genem za vzniku mRNA, která může kódovat více než jeden polypeptid samostatně v rámci stejné molekuly RNA, a takto mají potenciál být přepsány jako jedna jednotka.

Biosyntéza miRNA probíhá v několikastupňových procesech. Vše začíná v jádře buňky, kde RNA polymeráza II vytváří primární transkript, tzv. pri-miRNA dlouhou několik stovek nukleotidů. Na 3'konci nese polyadenylový zbytek (poly(A) sekvence) a na 5'konci je zaopatřena čepičkou. Pri-miRNA díky své částečně komplementární struktuře vytváří vnitřní vlásenkové struktury, které rozeznává tzv. mikroprocesorový komplex. Tento komplex je tvořen nukleázou Drosha (RNáza III) a proteinem DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8), který je znám také pod názvem Pasha. Drosha rozeznává pri-miRNA od ostatních prekurzorů nesoucích vlásenky. Pasha rozpoznává oblast dsRNA a určuje místo, kde proběhne štěpení nukleázou Drosha. Touto úpravou vzniká prekurzorová miRNA (pre-miRNA), která je dlouhá zhruba 70 nukleotidů a má strukturu úplné vlásenky s 2-3 nukleotidovým přesahem na 3'konci. Pre-miRNA je následně transportována z jádra do cytoplazmy. Tento přenos zprostředkovává komplex Exportin 5, který za přítomnosti Ran kofaktoru rozpoznává její nukleotidový přesah na 3'konci, na který se následně váže. Na kofaktor Ran se váže GTP, po jehož

hydrolyze na GDP dochází k aktivaci Exportinu 5 a poté k transportu pre-miRNA do cytoplazmy. V cytoplazmě je pre-miRNA rozpoznávána ATP-dependentním multidoménovým enzymem Dicer (řadí se do skupiny RNáz III), který odstraňuje vlásenkovou smyčku. Vzniká tak duplex miRNA:miRNA o velikosti přibližně 22 nukleotidů který se rozděluje na dva řetězce – vedoucí „guide“ a „passenger“. Jedno z vláken je začleněno do komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), který utlumuje expresi genů, zatímco druhé vlákno bývá obvykle degradováno. To, jaký řetězec bude preferován jako vedoucí rozhoduje jejich termodynamická stabilita. Může se však také stát, že ke vzniku miRNA dojde i z obou vláken. Pro jejich odlišení je proto jeden z řetězců značen 3p a druhý 5p.

Aktivní miRNA vázaná v komplexu RISC se podle komplementarity bází váže obvykle na 3'UTR konec mRNA. Bhaskaran et al. však ve svém článku ¹⁵ uvádí, že vazebná místa pro miRNA mohou být přítomna také na 5'UTR konci nebo uvnitř kódující sekvence. Hlavní složkou RISC komplexu jsou proteiny z argonautové rodiny (Ago 1 – Ago 4). Vazebná oblast miRNA, tvořena až 8 páry bází, se váže na cílovou mRNA na základě komplementarity bází. Může dojít buď k úplné komplementaritě, kdy mRNA degraduje, anebo k částečné, kdy se translace mRNA pouze zablokuje^{15, 20, 21, 22}.



Obr. 3: Biogeneze miRNA. Autor: Zdeněk Dostál.

2.3 Rodina miRNA-29

MiRNA-29, jedna z dosud nejzajímavějších miRNA rodin vyskytující se u lidí, sestává ze členů miR-29a, miR-29b, který dále zahrnuje dva členy (miR-29b-1 a miR-29b-2), a miR-29c. Tito členové jsou kódováni ve dvou genetických klastrech. Geny kódující prekurzory miR-29a a miR-29b-1 jsou umístěny na chromozomu 7q32 známém jako klastri miR-29a/b-1. Geny kódující miR-29b-2 a miR-29c na chromozomu 1q32 označeném jako miR-29b-2/c.

Zralé miRNA-29 sdílejí identické sekvence v nukleotidových pozicích 2-7, což je tzv. zárodečná oblast. Zárodečná oblast hraje klíčovou roli při určování toho, s jakou sekvencí mRNA bude miRNA interagovat a potažmo na které proteiny kódující geny by mohla cílit.

Zralé sekvence miR-29b-1 a miR-29b-2 jsou identické, zatímco miR-29a a miR-29c se liší od miR-29b, a to rozdílem v jediném nukleotidu mimo zárodečnou sekvenci. Navzdory podobným sekvencím mají členové rodiny miR-29 různý subcelulární výskyt. MiR-29a je primárně lokalizovaná v cytoplazmě, kdežto miR-29b především v jádře^{23, 24, 25, 26}.

U mnoha druhů rakovinných onemocnění, včetně leukémie, melanomu, rakoviny jater, tlustého střeva či děložního čípku, bylo pozorováno, že dochází ke snížení exprese členů rodiny miRNA-29. V mnoha studiích snížená exprese miR-29 korelovala s agresivnějšími formami rakoviny nebo relapsu, což naznačuje, že terapeutická obnova miR-29 by mohla zlepšit prognózu onemocnění. Příznivý účinek exogenní léčby miR-29a a miR-29b byl experimentálně prokázán u akutní myeloidní leukémie. Indukovaná exprese miR-29a a miR-29b zpomalila růst buněk a indukovala apoptózu leukemických buněk *in vitro*²⁵.

MiRNA-29 hraje důležitou roli v regulaci buněčné proliferace (buňky se rychle množí), diferenciace a apoptózy, což z ní činí účinný regulátor v rámci výskytu a progresu rakoviny²⁷.

Mechanismy působení miRNA-29:

Buněčná apoptóza

Jedním z mechanismů, kterým miRNA-29 potlačují růst nádoru, je zmírnění potlačení transkripčního faktoru p53. P53 je důležitý při kontrole exprese genů, které regulují růst buněk, stárnutí a apoptózu. Potlačení nebo inaktivace p53 je běžnou charakteristikou mnoha typů rakoviny. Všichni tři členové rodiny miR-29 mohou cílit na geny p85 a CDC42, které expresi p53 potlačují²⁵.

Buněčná proliferace a buněčný cyklus

Nekontrolovaná proliferace je charakteristickým znakem rakovinných buněk.

Mezi hlavní regulační proteiny, které hrají klíčovou roli v řízení progresu buněčného cyklu, patří cykliny, cyklin-dependentní kinázy (CDK) a různé cyklinové substráty. CDK6 hraje důležitou roli při přechodu cyklujících buněk do fáze S. Studie uvádějí, že komplexy cyklin-CDK6 indukují přechod rakovinných buněk z fáze G1 do fáze S fosforylací retinoblastomu (Rb), zatímco inhibice CDK6 blokuje buněčný cyklus a potlačuje růst nádoru. Ukázalo se, že CDK6 je přímým cílem miR-29 u několika malignit, včetně akutní myeloidní leukémie (AML) a rakoviny děložního čípku²⁶.

Mezi další cíle rodiny miRNA-29 patří proteiny DNMT3A, DNMT3B (DNA-methyltransferáza 3a a 3b) a Mcl-1²⁵.

MiRNA-29 slouží obvykle jako supresor nádorů. V některých případech však může být také i onkogenní²⁵.

2.4 Mcl-1

Protein Mcl-1 je členem rodiny Bcl-2. Tato rodina zahrnuje klíčové regulátory, jež mohou podporovat anebo potlačovat apoptózu. Mcl-1 je antiapoptotickým členem rodiny Bcl-2 umístěný na chromozomu 1q21. Původně byl identifikován v roce 1993 během diferenciaci buněk myeloblastické leukémie²⁸.

Prototypní Mcl-1 protein (označován jako Mcl-1L) obsahuje oblasti podobné jiným proteinům rodiny Bcl-2, nazývané BH. Domény BH jsou krátké motivy, které zprostředkovávají interakce protein: protein mezi rodinnými proteiny a jsou důležité pro regulaci apoptózy. Mcl-1L působí tedy protiapoptoticky a obsahuje domény BH 1-3. Stejně jako mnoho jiných proteinů rodiny Bcl-2 také obsahuje i C-terminální transmembránovou (TM) doménu²⁹.

Sestřizněním Mcl-1L proteinu mohou vznikat jeho dvě kratší izoformy Mcl-1S a Mcl-1ES.

Vystřizněním druhého exonu z Mcl-1L se získá proapoptotická izoforma Mcl-1S, která v důsledku vystřiznění postrádá BH1, 2 a C-terminální transmembránovou doménu^{29, 30}. Další, ještě kratší, sestřizněná varianta nesoucí název Mcl-1ES postrádá část exonu 1. Obsahuje však všechny tři BH domény, a to i včetně C-terminální transmembránové. Tak stejně jako Mcl-1S i tato izoforma působí proapoptoticky³¹.

Z důvodu nadměrné exprese u několika maligních onemocnění (hematologických rakovin a solidních nádorů, včetně chronické myeloidní leukémie a hepatocelulárního karcinomu) se tento protein stal atraktivním a potenciálním terapeutickým cílem a středem řady studií³².

3 Cíl práce

Vlivem mikroRNA-29b dochází k navýšení toxicity chemoterapeutika Etoposidu v buněčné linii HeLa³³. Cílem této práce je posoudit, zda je tato hypotéza obecně platná pro různé typy malignit.

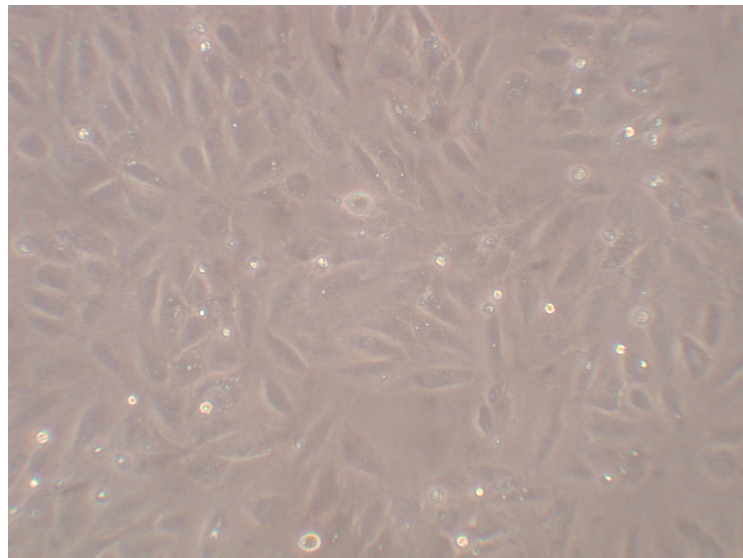
4 Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Buněčný materiál

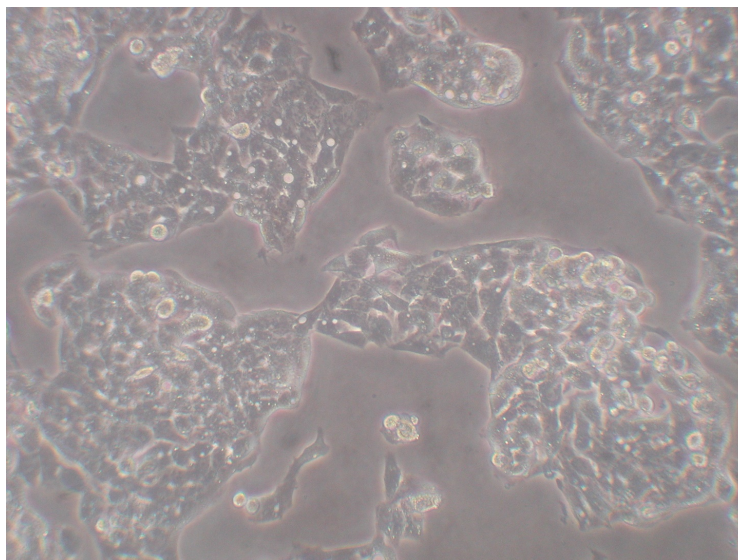
V rámci experimentální části jsem pracovala se třemi buněčnými liniemi H9c2, Hep G2 a CACO-2.

Buněčná linie H9c2 představuje potkaní kardiomyoblasty BDIX. Byla zakoupena od ECACC (katalogové číslo 88092904).



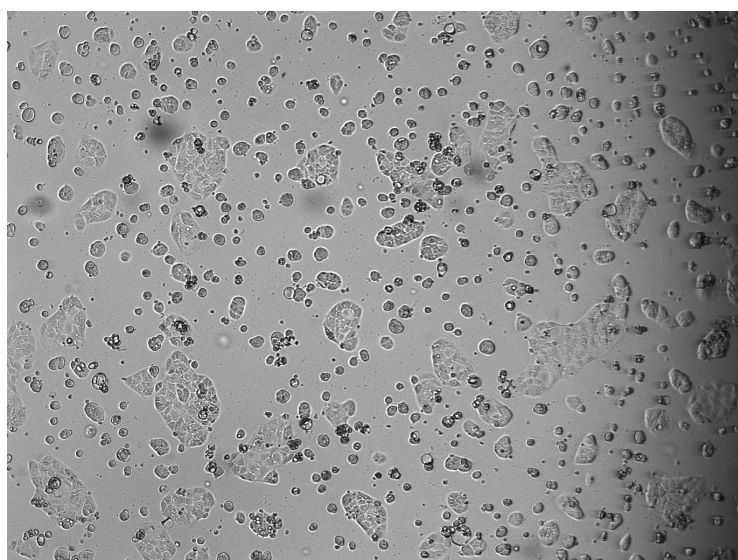
Obr. 4: Buněčná linie H9c2. Fotografie byla pořízena na Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP.

Buněčná linie Hep G2 pochází z lidského hepatoblastomu. Byla zakoupena od ECACC (katalogové číslo 85011430).



Obr. 5: Buněčná linie Hep G2. Fotografie byla pořízena na Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP.

Buněčná linie CACO-2 je získaná z adenokarcinomu tlustého střeva. Byla taktéž zakoupena od ECACC (katalogové číslo 86010202).



Obr. 6: Buněčná linie CACO-2. Fotografie byla pořízena na Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP.

4.1.2 Chemikálie

Eaglovo médium modifikované Dulbeccoem (DMEM), Neesenciální aminokyseliny, Penicilin/Streptomycin (P/S), Fetální bovinní sérum (FBS), Destilovaná voda, Trypsin-EDTA (0,25% roztok), Trypsin-EDTA (0,1% roztok), Trypanová modř (0,4% roztok), Dimethylsulfoxid (DMSO), MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (10% roztok), Amoniak (25% roztok), Roztok pro NČ (0,1% roztok), Albumin, BCA reagenty pro stanovení proteinů, Opti-MEM, Lipofectamine 2 000, Dithiothreitol, Ethanol, Dodecylsulfát sodný (SDS), Amonium persulfát (APS), Akrylamid/N,N' - methylenbisakrylamid (29:1, 40% roztok), N,N,N',N' - tetramethylethyldiamin (TEMED), Migrační pufr 10×, Molecular weight standard, Towbin transfer buffer 10× koncentrovaný, Tween 20 (0,1% roztok), Ponceau S, Treatment pufr 5× koncentrovaný, Sušené mléko, Isopropanol, Fotografická vývojka, Fotografický ustalovač, Detekční činidlo Immuno cruz, Zesilovací detekční činidlo ECLTM Prime Western Blotting, Signal BoostTM Immunoreaction enhancer kit, TRIzol reagent, Chloroform, Triton X-100, Etoposid, Roztok inhibující RNaseZAP[®], Voda pro molekulární biologii.

Téměř všechny chemikálie zakoupeny ve firmě ThermoFisher.

4.1.3 Protilátky

Primární a sekundární protilátky použité pro imunodetekci jsou shrnuty v následující tabulce (Tab.1).

Tab. 1: Seznam primárních a sekundárních protilátek.

Primární protilátky	Cat. No.	Dodavatel
rabbit polyclonal Ab to Mcl-1	sc-819	Santa Cruz, USA
rabbit polyclonal Ab to GAPDH	5174	Cell Signaling, Japonsko
rabbit polyclonal Ab to β -tubulin	2146	Cell Signaling, Japonsko
Sekundární protilátky	Cat. No.	Dodavatel
goat-anti-rabbit IgG peroxidase (HRP)	7074	Cell Signaling, Japonsko
goat-anti-rabbit IgG peroxidase (HRP)	sc-2004	Santa Cruz, USA

4.1.4 Primery

Pre-miRNA:

hsa-miR-29b (kat. č. 17100, PM10103, ThermoFisher)

Pre-miRTM miRNA Precursor Negative Control #1 (kat. č. 17110, ThermoFisher)

4.1.5 Komerční kity

TaqMan[®] MicroRNA assays:

hsa-miR-29b (kat. č. 4427975, assay ID 000413, ThermoFisher)

RNU6B (kat. č. 4427975, assay ID 001093, ThermoFisher)

TaqManTM MicroRNA Reverse Transcription Kit (kat. č. 4366597, ThermoFisher)

TaqManTM Universal PCR Master Mix (kat. č. 4324018, ThermoFisher)

4.1.6 Roztoky

Roztok fosfátového pufru (PBS):

NaCl (137 mmol·l⁻¹), KCl (2,68 mmol·l⁻¹), Na₂HPO₄ (8,96 mmol·l⁻¹), KH₂PO₄ (1,45 mmol·l⁻¹), pH 7,4. Pro experimenty byl tento zásobní roztok 10× zředěn.

Roztoky pro kultivaci buněk:

Buněčné linie H9c2, Hep G2 a CACO-2: DMEM obohacen o 10% FBS obsahující růstové faktory, P/S sloužící k likvidaci potenciální infekce (Penicilin 100 U·ml⁻¹, Streptomycin 100 mg·l⁻¹) a neesenciální aminokyseliny sloužící pro lepší růst buněk (1%, v/v).

Roztoky Etoposidu:

Etoposid, DMSO. Přípravovala jsem roztoky Etoposidu o koncentracích 60 mM, 40 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM, 2 mM a 1 mM.

Roztoky pro NČ:

Roztok č. 1: 0,5% formaldehyd:1% CaCl₂ (1:1).

Roztok č. 2: 1% CH₃COOH v 50% MeOH.

NČ zásobní roztok: 0,1% roztok neutrální červeně v destilované vodě okyselený kyselinou octovou smíchan s PBS v poměru 3:8.

HUVEC pufr: Tris ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), EGTA ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaCl ($150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), glycerolfosfát ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), Na_3VO_4 ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaF ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), Triton X-100 (1% v/v), Tween 20 (0,1%, v/v), inhibitor proteáz Complete™ (1 tableta v 50 ml pufru), pH 7,5.

Roztoky pro stanovení proteinů:

Roztoky na kalibrační křivku: čisté PBS, roztoky Albuminu v PBS o koncentraci 0,500 M, 0,250 M, 0,125 M.

Roztok pro BCA metodu: Roztok A (sodná sůl BCA v alk. prostředí): roztok B (CuSO_4) v poměru 50:1.

Ethanol 75% roztok: Ethanol 96% roztok, destilovaná voda.

Roztoky pro SDS-PAGE a Western blot:

Running gel pufr 4× zřed.: Tris ($1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 8,8.

Stacking gel pufr 4× zřed.: Tris ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 6,8.

10% a 12% SDS: SDS, destilovaná voda.

10% Amonium persulfát: Amonium persulfát, destilovaná voda.

Migrační pufr 1×: Tris ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), glycin ($192 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), 0,1% SDS, pH 8,3.

Transferový blotovací pufr: Tris ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), glycin ($192 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), 20% MeOH, 0,1% SDS, pH 8,3.

10× Tris- buffered saline (TBS): Tris ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaCl ($154 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), destilovaná voda, pH upravit na 7,5 pomocí koncentrované HCl.

5× Treatment pufr: Tris ($312,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), 10% SDS, 50% glycerol, dithiothreitol ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 0,05% bromfenolová modř, pH 6,8.

Ponceau S: 0,1% Ponceau S, 5% CH_3COOH .

Migrační gel: Pracovala jsem s migračními gely obsahujícími podíl akrylamidu/bisakrylamidu 10% a 12,5%. Při přípravě gelů s odlišným podílem akrylamidu/bisakrylamidu se mění pouze objemy 40% akrylamidu a destilované vody. Ostatní chemikálie zůstávají ve stejném objemu.

Tab. 2: Složení a objemy jednotlivých látek pro přípravu dvou 10% a dvou 12,5% running gelů o tloušťce 1,5 mm.

Látka	Objem (μl)
40% akrylamid	5 000 (10% gel), 6 250 (12,5% gel)
Destilovaná voda	9 800 (10% gel), 8 550 (12,5% gel)
4× running pufr	5 000
10% SDS	200
10% APS	200
TEMED	20

Tab. 3: Složení a objemy jednotlivých chemikálií pro přípravu dvou stacking gelů o tloušťce 1,5 mm.

Látka	Objem (μl)
40% akrylamid	800
Destilovaná voda	5120
4× stacking pufr	2 000
10% SDS	80
10% APS	60
TEMED	8

0,1% Tris – buffered saline/Tween (TBS/T): 10× TBS, destilovaná voda, 0,1% Tween 20.

5% roztok sušeného mléka: Sušené mléko, TBS/T.

Detekce:

Detekční činidlo Immuno cruz: roztok A:B (1:1).

Zesilovací detekční činidlo ECLTM Prime Western Blotting: roztok A:B (1:1).

4.1.7 Přístroje

Centrifugy MiniSpin[®] (Eppendorf, Německo).

Chlazená centrifuga Mikro 22R (Hettich Zentrifugen, Německo).

Chlazená centrifuga Rotina 380R (Hettich Zentrifugen, Německo).

CO₂ inkubátor MCO-17AIC (Sanyo Electric Biomedical, Japonsko).
Laminární box pro RT-PCR Topsafe 1.8 (BioAir Instruments, ČR).
Laminární box Clean Air (Schoeller Instruments, ČR).
Laminární box CLF (Schoeller Instruments, ČR).
Nanofotometr Pearl (Implen, Německo).
Fotometr pro měření absorbance/fluorescence v 96-jamkových deskách Infinite M200 pro (Tecan, Švýcarsko).
Hlubokomrazicí box Inova U535 (Eppendorf, Německo).
Hlubokomrazicí box VX 380 (Jouan, Francie).
Termomixer Comfort (Eppendorf, Německo).
Inverzní fluorescenční mikroskop Olympus IX 70 S8F (Olympus, Japonsko) s kamerou.
Mikroskop CK40 (Olympus, Japonsko).
pH-metr inoLab Level 1 (Schoeller Instruments, ČR) s elektrodou SenTix41 (WTW, Německo).
Třepačka OLS Aqua pro (Grant Instruments, Velká Británie).
Třepačka Reax top (Heidolph, Německo).
Třepačka Duomax 1030 (Heidolph, Německo).
Odsávačka Gilson Safe Aspiration Station (Gilson, USA).
Magnetická míchačka IKA[®] RH digital (Ilabo, ČR) .
Systém pro elektroforézu Mini-Protean[®] 3 Cell se zdrojem PowerPac 3000 (Bio-Rad Laboratories, USA).
Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer Systém (Bio-Rad, USA).
Váhy AX105 DeltaRange[®] (Mettler Toledo, Švýcarsko).
Zařízení pro přípravu deionizované vody Ultrapur (Watrex, ČR).
Systém xCELLigence (ACEA Biosciences, USA).
LightCycler[®] 480 Instrument (Roche, Švýcarsko).

4.1.8 Ostatní materiál

Kultivační láhve Nunclon[™], kultivační desky, filtry a centrifugační zkumavky (Nunc, Dánsko).
Sterilizační filtry 0,22 µm Millex[®]-GS (Millipore, USA).
Plastové injekční stříkačky (B. Braun, Německo).
Plastové mikrozkušavky (Eppendorf, Německo).

PVDF membrána Immun-Blot™ (0,2 µm; Bio-Rad Laboratories, USA).

Filtrační papír Whatman (Whatman, USA) .

Fotografický film Carestream Kodak BioMax light, fotografická vývojka a ustalovač Kodak GBX (Eastman Kodak, USA).

Fotografický film Fuji medical x-ray (FujiFilm, Japan).

4.2 Metody

4.2.1 Pasážování buněk

Při pasážování dochází k rozdělení buněk do nových kultivačních lahví. Hlavním důvodem pasážování je, aby nedošlo k přerůstání buněk, v jehož důsledku by mohly měnit své chování.

Postup: Před samotným pasážováním je velice důležité si včas rozehrát veškeré roztoky, se kterými se bude pracovat, na teplotu 37 °C. Po jejich přichystání a vytemperování byly z inkubátoru vytáhnutы kultivační lahve a buňky zkontrolovány pod mikroskopem. Zajímá nás, jak vypadají, zda nedosáhly plné konfluence nebo zda jich naopak není málo. Od toho se odvíjí, zda se bude pasážovat, popřípadě kolik ml buněk se přeneso do nové lahve. Ideální je pasážovat při dosažení 80% konfluence.

Obsah lahve byl vylit do odpadu a buňky byly 2× propláchnuty cca 10 ml roztoku PBS, který slouží k odstranění metabolitů a především zbytků séra, které inhibuje trypsinizaci. Poté byl přidán 1 ml roztoku trypsinu, který je vhodné rozprostřít po ploše lahve, kde jsou buňky zachyceny a nechat působit v inkubátoru přibližně dvě minuty. Jakmile buňky ztratily schopnost adherence a volně se s roztokem pohybovaly, což lze vidět i pouhým okem jako zahuštění roztoku, bylo přidáno 9 ml média, promícháno a přepipetováno do falkony. Následně byl obsah centrifugován po dobu 3 minut při 178×g a supernatant opatrně slit do odpadu. K usazeným buňkám se přidalo 9 ml média, obsah falkony byl promíchán a přidán k trypanové modři (ředění záleží na typu buněk). Následně bylo v Bürkerově komůrce spočítáno počet buněk na ml média a také vypočítáno, kolik ml média s buňkami napipetovat do nové kultivační lahve. Poté, co byl vypočítaný objem buněk napipetován, byla lahev doplněna do 30 ml kultivačním médiem a byla vložena zpět do inkubátoru. Pasážování se provádělo jednou za 2-4 dny.

Veškerá práce s buněčným materiálem probíhá ve sterilním prostředí v laminárním boxu. Je třeba dbát zvýšené opatrnosti, aby nedošlo ke kontaminaci.

4.2.2 Kultivace buněk

Buňky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C, směs plynů tvoří z 95% vzduch a z 5% je obsažen CO₂. Inkubátor je vlhčený.

4.2.3 Vysévání buněk

Postup: Buňky byly vysévány na 6 jamkovou desku, určenou k transfekci a 96 jamkovou desku určenou ke zjištění cytotoxicity Etoposidu. Na 6 jamkovou desku bylo vyséváno 1×10^6 buněk Hep G2/jamka, $0,4 \times 10^6$ buněk H9c2/jamka a 1×10^6 buněk CACO-2/jamka. Na 96 jamkovou desku bylo vyséváno 1×10^4 buněk H9c2 a 3×10^4 buněk Hep G2/jamka. Při pasážování se počítalo množství buněk nacházejících se v 1 ml média a pomocí trojčlenky bylo vypočítáno, kolik ml tohoto roztoku média s buňkami je potřeba na vysetí. Následně byl tento roztok (média s buňkami) určený k vysetí doplněn do 14 ml, popřípadě 20 ml kultivačním médiem (ve výpočtu byly zahrnuty i rezervy navíc). Takto připravené roztoky byly homogenizovány a napipetovány do jednotlivých jamek.

4.2.4 Intoxikace buněk Etoposidem

Postup: Buňky byly, dle jejich požadovaného počtu na jamku, vysety na 96 jamkovou desku a takto inkubovány po dobu 24 hodin. Dále byly rozpuštěním Etoposidu v DMSO připraveny zásobní roztoky o koncentraci 60 mM, 40 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM, 2 mM a 1 mM. Takto připravené roztoky se uchovávaly při teplotě -20 °C.

Druhý den po rozmražení (při pokojové teplotě) byly zásobní roztoky Etoposidu 1000× zředěny v kultivačním médiu. Z jamek bylo odsáto médium z předešlého dne a následně do nich byly aplikovány zředěné zásobní roztoky Etoposidu. Po 24 hodinách byla změřena cytotoxicita xenobiotika pomocí neutrální červeně a MTT testu.

4.2.5 Stanovení cytotoxicity pomocí MTT testu

Principem této metody je redukce MTT, též tetrazoliové modři, funkčními dehydrogenázami živých buněk na nerozpustný formazan, který je v roztoku přítomen ve formě krystalků. Množství zredukovaného MTT je stanoveno spektrofotometricky při absorpenci 540 nm a je přímo úměrné počtu živých buněk.

Postup: Po 24 hodinách, kdy byly na desku aplikovány zředěné zásobní roztoky Etoposidu, byl obsah jamek vylit a deska byla oklepána o buničinu. Každá jamka byla propláchnuta roztokem PBS a následně se do ní přidal připravený 10% roztok MTT. Deska byla po dobu 3 hodin ponechána v inkubátoru při teplotě 37 °C a následně byl obsah jamek odsát. Poté byl do jamek napipetován 1% roztok NH₃ v DMSO, který se nechal cca 5 minut stát. Tento roztok rozpouští vzniklé krystalky formazanu. Nakonec byla změřena absorbance při 540 nm.

4.2.6 Stanovení cytotoxicity pomocí neutrální červeně (NČ)

Neutrální červeně je barvivo, které je pohlceno a zadržováno pouze živými buňkami. Množství barviva zadrženého v buňkách je stanovováno spektrofotometricky při 540 nm.

Postup: Po expozici buněčné kultury byly z jamek odsáty zředěné zásobní roztoky Etoposidu a deska byla ponechána krátce na vzduchu za účelem mírného oschnutí. Následně bylo na každou jamku napipetováno 50 µl roztoku NČ. Deska byla inkubována 2-3 hodiny při teplotě 37 °C a poté byl roztok z jamek odsát. Každá jamka byla promyta 150-200 µl roztoku č. 1, poté bylo přidáno 150-200 µl roztoku č. 2 (složení viz. Roztoky) a nechalo se 20 minut třepat. Na závěr byla změřena absorbance při 540 nm.

4.2.7 Transfekce

Při transfekci vnášíme syntetickou pre-miRNA do buněčné linie ve formě oligonukleotidů, které buňka ochotně přijímá a metabolizuje na zralou miRNA. Následně dochází k nárůstu exprese dané miRNA.

Postup: Jako první bylo smícháno 125/250 μl (96 jamk./6 jamk. deska) Opti-MEM s 1,25/5 μl (96 j. d./6 j. d.) lipofectaminu 2 000, který bylo nutné do média přidávat po kapkách, nikoliv po stěně zkumavky. Tento roztok byl 5 minut inkubován při pokojové teplotě. Mezi tím bylo na dno další zkumavky napipetováno 0,5/2 μl (96 j. d./6 j. d.) pre-miRNA a k ní přidáno 125/250 μl (96 j. d./6 j. d.) Opti-MEM. Směs Opti-MEM s lipofectaminem 2 000 byla opatrně nakapána na pre-miRNA, jemně poklepáním zkumavky protřepána a následně při pokojové teplotě 15 minut inkubována. Ke směsi bylo poté přimícháno 748/2 000 μl (96 j. d./6j. d.) holého média, tj. bez séra a antibiotik. Takto připravená směs byla promíchána propipetováním a nanesena na jednotlivé jamky [200/2 000 μl (96 j. d./6 j. d.)]. Po 6 hodinách byl obsah jamek odsát a zpět do nich napipetováno kultivační médium [200/2 000 μl (96 j. d./6 j. d.)]. Po 24 hodinách byl do jamek napipetován 60 μM Etoposid a po dalších 24 hodinách byly buňky zlyzovány.

Při práci s buňkami H9c2 bylo použito místo Opti-MEM holé médium, protože Opti-MEM je vůči této buněčné linii toxický.

Transfekce byla prováděna s pre-miRNA-29b, pre-miRNA NC a vodou, která sloužila pro kontrolu.

4.2.8 xCELLigence

xCELLigence je metoda detekující změny týkající se adheze buněk, která je ovlivněna nárůstem a zvětšováním nebo naopak zmenšováním a smrtí buněk v reálném čase v závislosti na měnící se impedanci. Při této metodě se buňky vysévají do 16 jamek na speciální desku která je zespod pokryta zlatými elektrodami. Plocha každé jamky je totožná s plochou jamky na 96 jamkové desce.

Postup: Buňky byly vysety na 16 jamkovou desku určenou pro xCELLigence. Po 24 hodinách byla provedena transfekce a za dalších 24 hodin byl do jamek napipetován 60 μM roztok Etoposidu. Po celou dobu, kdy se s deskou nepracovalo byly prostřednictvím systému xCELLigence sledovány změny impedance.

Při práci s deskami je důležité pracovat opatrně, aby nedošlo k poškození elektrod. Po skončení experimentu je možné desky vyčistit a použít znovu, většinou jsou však použity jako jednorázové.

Postup čištění: Všechny jamky byly 2× promyty 200 µl PBS. Následně do nich bylo přidáno 100 µl trypsin-EDTA (0,1%) a takto byly desky přes noc inkubovány. Druhý den byl tento postup zopakován. Třetí den byly jamky na desce znovu promyty 200 µl PBS. Poté do nich bylo přidáno 200 µl 96% ethanolu. Následovalo jejich promytí 2× 200 µl PBS, 2× 200 µl vody a hodinu se na desku nechalo svítit UV záření.

4.2.9 Lýza buněk

Při lýze buněk dochází k jejich kompletnímu rozpuštění na jednotlivé komponenty, tj. proteiny, lipidy, DNA, RNA a jednotlivé metabolity.

Postup: Při zlyzování buněk se pracovalo na ledu a s chladnými chemikáliemi.

V jamce s médiem byly buňky seškrábány, přeneseny do eppendorfký a stočeny ve vychlazené centrifuze na 4 °C při 1960×g po dobu 5 minut. Následně po odebrání supernatantu bylo přidáno 500 µl PBS a opět stočeno za stejných podmínek (tj. 4 °C, 1960×g, 5 minut). Po odebrání supernatantu bylo k peletu přidáno 75 µl HUVEC pufru. Po přidání pufru se eppendorfký nechaly 30 minut stát. V průběhu této půl hodiny byly 3× průběžně vortexovány. Poté byly propipetovány 200 µl pipetou (nutný malý průřez pro rozbití buněk), centrifugovány na 13 minut při 20 780×g a nakonec byl do čistých eppendorfek odebrán supernatant, který byl následně uchováván při -80 °C.

4.2.10 Stanovení proteinu metodou BCA

Principem této metody je redukce měďnatého iontu na měďný proteinem a následná chelatace měďného iontu kyselinou bicinchoninovou, kdy dojde ke vzniku červeného zbarvení.

Postup: Rozpuštěním Albuminu v PBS byla připravena řada kalibračních roztoků o koncentraci 0,500 M, 0,250 M, 0,125 M. Mimo tyto roztoky bylo pro kalibraci použito také i čisté PBS. Lyzáty buněk bylo nutno zředit. Vzorky buněk H9c2 byly naředěny 5×, Hep G2 a CACO-2 10×. Bylo tedy smícháno 10 µl lyzátu H9c2 se 40 µl PBS. V případě buněk Hep G2 a CACO-2 5 µl lyzátu se 45 µl PBS. Každý zředěný vzorek (každá buněčná linie byla transfekovaná miR-29b, NC a vodou) včetně kalibračních roztoků byly

proměřeny 4×. Podle celkového počtu vzorků bylo napočítáno množství reagentu BCA – roztok A:B (50:1) včetně rezervy. Do jednotlivých jamek 96 jamkové desky bylo napipetováno 10 µl vzorku a následně bylo doplněno 200 µl směsi ze smíchaných reagentů A a B. Po 10 minutách třepání na třepačce byla následně změřena absorbance při 562 nm.

4.2.11 Příprava vzorků na elektroforézu

Postup: Podle objemu (v µl) zbylého zlyzovaného vzorku bylo vypočítáno, kolik µl 5× koncentrovaného treatment pufru použít. (Např.: K dispozici jsem měla 40 µl zlyzovaného vzorku, k němuž jsem přidala 10 µl 5× koncentrovaného treatment pufru). Smícháním lyzátů s vypočítanými objemy pufru byly připraveny vzorky určené na elektroforézu, které byly při 95 °C po dobu 5 minut povařeny, následně zchlazeny, krátce stočeny v centrifuze a takto připravené zamrazeny na –20 °C.

4.2.12 SDS-PAGE Elektroforéza

Elektroforéza je metoda sloužící k separaci částic na základně rozdílné molekulové hmotnosti. Působením SDS dochází k denaturaci proteinů, které získávají záporný náboj navázáním na anionty SDS a pohybují se tak v elektrickém poli, které je vytvořeno vložением konstantního stejnosměrného proudu, od záporného pólu ke kladnému.

Před samotnou elektroforézou je třeba si nejdříve připravit gely, které jsou nerozpustné ve vodě, porézní, s co nejmenší absorpční schopností.

Postup: Čisté sklo o zvolené tloušťce 1,5 mm bylo překryto čistým krycím sklem a vsunuto do zelených vrátek, ve kterých byly skla srovnány. Vrátka se skly byly připnuty do stojanu v digestoři a mezi skla byla nalita destilovaná voda pro zjištění, zda těsní. Voda byla vylita a prostor mezi skly byl vysušen filtračním papírem. Následně byla připravena směs running gelu. Nejdříve byl smíchán 40% AA s vodou, running puftrem a 10% SDS, naposled bylo přidáno 10% APS a TEMED. Takto připravená směs byla rychle zvortexována a pipetou nadávkována mezi skla. Nadávkovaný running gel byl na závěr převrstven trochou isopropanolu. Objemy jednotlivých látek jsou uvedeny v Tab. 2. Gel

se nechal cca 30 minut polymerovat. Po jeho ztuhnutí byl isopropanol vylit do odpadu a prostor nad running gelem byl promyt destilovanou vodou. Následně byl připraven stacking gel. Po smíchání jednotlivých látek bylo jako poslední přidáno 10% APS a TEMED. Připravená směs byla zvortexována a nadávkována mezi skla na vrstvu running gelu. Nakonec byly zasazeny hřebínky, které po ztuhnutí gelu vytvořily jamky. Objemy jednotlivých látek použitých na přípravu stacking gelu jsou uvedeny v Tab. 3. Připravené gely se mohou použít ihned, anebo je možno je uschovat. V takovém případě je třeba, aby byly obaleny buničinou, která je navlhčena destilovanou vodou, a vloženy do sáčku, aby nevyschly.

Po přípravě gelů probíhala vlastní elektroforéza.

Jako první byly vytaženy připravené vzorky na elektroforézu, které byly po dobu 5 minut rozehráty při 40 °C a následně zchlazeny. Mezi tím byly navlhčeny zelené části aparatury, do které pak byly vsunuty skla s gely, krycím sklem dovnitř. Vana určená pro elektroforézu byla naplněna migračním pufrem. Prostor mezi skly s gely byl naplněn nově připraveným migračním pufrem, zatímco zbytek vany byl doplněn již použitým. Z gelu byl opatrně vyjmut hřebínek a nasazen pomocný nástavec na dávkování vzorků. Vždy byly dávkovány 3 μ l molecular weight standardu a předem spočítané množství vzorků tak, aby v každé jamce bylo 5 nebo 10 μ g proteinů v závislosti na typu buněčné linie. Po nadávkování byl gel přiklopen víkem a zapojen ke zdroji. Pokud byl ve vaně jeden gel, nastavil se počáteční proud na 15 mA a po chvíli se zvýšil na 30 mA. V případě, kdy ve vaně byly gely dva se začínalo na 30 mA a poté byl proud navýšen na 60 mA. Po dojetí první zóny k dolnímu okraji gelu byl proud odpojen. Následně byla skla s gely vytažena, špachtlí od sebe oddělena a odříznuty jamky. Gel byl přenesen do vaničky s Towbin transfer bufferem, ve kterém se nechal 5 minut na třepačce.

4.2.13 Western blotting

Western blotting je metoda, kdy dochází k přenosu odseparovaných proteinů z gelu na membránu působením elektrického proudu. Po přenosu na membránu (používala jsem PVDF membránu) je nutné ověřit přenos proteinů barvením. K vizualizaci proteinů jsem ve své práci používala Ponceau S.

Postup: Během elektroforézy byla připravena PVDF membrána, nastříhnutá na velikost 6,5 x 8,5 cm a byl vystřižen rožek. Následně byla membrána rehydratována v methanolu,

promyta v destilované vodě, a poté ponořena na 5 minut do TBS/T. Do misky byl nalit Towbin transfer buffer určen pro WB, ve kterém byly namočeny molitany, filtrační papíry a poté byl poskládán tzv. sandwich. Na desku bylo postupně pokládáno: molitan, filtrační papír, membrána, gel, opět filtrační papír, molitan a vrch kazety. Postupně při pokládání jednotlivých vrstev byly pomocí válečku odstraňovány bublinky. V rámci této práce se využívala technika polosuchého blotování, kdy byl na sestavu spuštěn konstantní proud 1 A po dobu 30 minut, a to podle výrobcem předdefinovaného protokolu.

Po skončení přenosu byly membrány promývány 2× po 5 minutách v TBS/T, poté 5 minut v Ponceau S pro vybarvení bílkovin a následně nastřiženy podle detekovaného proteinu v rozmezí 72-26 kDa.

Po nastřížení membrány ji bylo třeba opět zregenerovat v MeOH, neboť začala schnout a promýt znovu 2× po 5 minutách v TBS/T.

4.2.14 Imunodetekce

Membrány, které se pro western blotting používají, mají vysokou afinitu k proteinům i protilátkám. Z tohoto důvodu je nutné zajistit, aby se protilátky při inkubaci s membránou specificky navazovaly ke svým antigenům na vzorcích, nikoliv k povrchu membrány. Proto se provádí tzv. blokování membrány v blokovacích roztocích, které volná místa na membráně zaplní a protilátka se tak váže pouze na svůj specifický antigen. Přítomnost určitého proteinu na membráně je detekována primární protilátkou, která může být s membránou inkubována i přes noc. Čím déle působí, tím je specifitější interakce s příslušným antigenem. Primární protilátka je rozpoznávaná sekundární protilátkou, kterou na membránu nanášíme následovně po jejím promytí. Sekundární protilátka je detekovaná fluorescenčně nebo chemiluminiscenčně, což záleží na typu značení, které sekundární protilátka nese. Sekundární protilátky, které jsem v rámci svých experimentů používala, byly konjugovány s křenovou peroxidasou. Po nanesení chemiluminiscenčního detekčního činidla dochází k reakci, která detekční činidlo mění na nestabilní produkt, jenž se stabilizuje vyzářením světla. Množství světla, které je vyzářováno je přímo úměrné peroxidase, která je přímo úměrná množství proteinu na membráně. Uvolněné světlo je detekováno přiložením filmu na membránu.

Postup: Po zregenerování a promytí v TBS/T byla membrána po dobu minimálně 1 hodiny blokována v 5% roztoku sušeného mléka. Následně byla připravena primární protilátka na protein Mcl-1, která byla zředěna s 5% roztokem sušeného mléka (1:1 000 – protilátka:roztok suš. mléka). Přichystaná primární protilátka byla po skončení blokace aplikována na membránu a inkubace probíhala přes noc.

Následující den byla membrána promyta 3× 5 minut v TBS/T a poté na ni byla po dobu 1 hodiny nanесena sekundární protilátka, která byla zředěna v poměru 1:10 000 (protilátka:5% roztok suš. mléka). Na závěr byla membrána promyta 3× 10 minut v TBS/T.

Na vyvážený stojánek byla umístěna čistá folie, na kterou byla položena membrána a na ni napipetováno detekční činidlo Immuno Cruz (směs roztoků A:B v poměru 1:1). Po minutě působení bylo detekční činidlo z membrány slito. Membrána pak byla vložena mezi další 2 folie, vytlačily se vzduchové bublinky a takto byla vložena do kazety. Na folii s membránou byl dovnitř kazety vložen fotografický film a proběhla expozice. Ta většinou trvala okolo 5 minut, které byly dostačující. Následně byl film vložen do vývojky, po vyvinutí obrazu membrány namočen do destilované vody a následně vložen do ustalovače. Filmy byly na závěr opláchnuty destilovanou vodou. V závislosti na velikosti a viditelnosti detekovaných stop („bandů“) byla expozice provedena znovu s jiným časem expozice. Membrány se po skončení detekce promývaly klidně i několik hodin v TBS/T a následně byl proveden tzv. „stripping“ neboli očištění pro další detekci.

Stripování probíhalo následovně. Pokud membrána uschla, byla zregenerována v MeOH a promyta 1× po dobu 5 minut v TBS/T. Poté se hodinu houpala ve 12% SDS, 4× promyla destilovanou vodou, následně se houpala 4× 5 minut na třepačce opět v destilované vodě a poté 2× po 5 minutách v TBS/T. Po stripování byla membrána opět blokována v 5% roztoku sušeného mléka a pokračovalo se v detekci dalšího proteinu, kterým byl GAPDH nebo β -tubulin (pro oba dva platí ředění primární protilátky 1:1 000 a sekundární protilátky anti rabbit 1:5 000, a to opět s 5% roztokem suš. mléka v obou případech).

Při neúspěšné detekci se při přípravě primární a sekundární protilátky nahradil 5% roztok sušeného mléka zesilovačem Signal BoostTM Immunoreaction enhancer kit. Při detekci pak bylo použito také i zesilovací detekční činidlo ECLTM Prime Western Blotting, které na membráně působilo 5 minut a dále se pokračovalo dle výše zmíněného postupu v expozici.

4.2.15 Izolace RNA TRIzolovou metodou

Extrakce a izolace RNA byla provedena klasickou metodou Chomczynského fenol/chloroformovou extrakcí³⁴. V rámci této metody se používá chloroform, guanidin thiokynát a fenol. Po centrifugaci dojde k fázové separaci směsi. RNA je přítomná ve vodné fázi a DNA s proteiny mezi horní vodnou a dolní organickou fází (v tzv. interfázi). Aby se zabránilo degradaci RNA, je před její izolací velice důležité laminární box ošetřit inhibitorem RNáz a po celou dobu pracovat v rukavicích.

Postup: Buňky byly nejdříve vysety na 6 jamkovou destičku. Po 24 hodinách byla provedena transfekce, po dalších 6 hodinách proběhla výměna média za čerstvé kultivační médium a za dalších 24 hodin byly buňky 2× promyty PBS. Následně byl přidán 1 ml TRIzolu, ve kterém došlo k jejich rozpuštění. Buňky byly přepipetovány do eppendorfky a zamrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před začátkem samotné extrakce RNA byl laminární box ošetřen inhibitorem RNAs. Extrakce RNA pokračovala rozmrazením vzorku na ledu a 15 minutovou inkubací při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 200 μl chloroformu. Vzorek byl vortexován po dobu 30 s a pak inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Následně byl centrifugován v centrifuze vychlazené na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut při $12\ 000\times\text{g}$. Poté byla do čisté eppendorfky odebrána horní vodná fáze obsahující RNA, ke které byl pro její vysrážení přidán isopropanol (1 díl vodné fáze:1 dílu isopropanolu). Obsah eppendorfky byl obrácením promíchán. Dále byl inkubován 10 minut při pokojové teplotě a následně byl opět podroben centrifugaci na $12\ 000\times\text{g}$ při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byl odebrán roztok nad peletem, pelet následně přečištěn 1 ml 75% ethanolu a překlopením protřepán. Takto upravený vzorek byl po dobu 5 minut centrifugován při $6\ 182\times\text{g}$. Následovalo odstranění roztoku nad peletem, který byl podroben krátké centrifugaci, po níž byl odstraněn zbylý ethanol. Po odstranění ethanolu byl do eppendorfky přidán vhodný objem vody určené pro molekulární biologii. Nakonec byla pomocí nanofotometru proměřena absorbance při vlnových délkách 260 a 280 nm. Ideální poměr absorbancí (260/280) z pohledu kontaminace bílkovinou je větší než 1,8. Poměr absorbancí udává čistotu vyizolované RNA.

Koncentrace a čistota byly stanoveny pomocí nanofotometru Pearl.

4.2.16 Reverzní transkripce

Při reverzní transkripci dochází k přepisu genetické informace z RNA do DNA. Je tedy opakem transkripce.

Postup: Jako první byl připraven roztok „Master Mix“. Jeho složení a množství jednotlivých látek, odpovídající jednomu vzorku, jsou uvedeny níže v tabulce 4. Do připravené směsi byly napipetovány 3 μl specifických primerů a 5 μl vzorku celkové RNA obsahující 20 ng celkové RNA. Vzorky byly promíchány, podrobeny centrifugaci a 5 minut inkubovány na ledu. Následně byly vloženy do thermocykleru, na kterém byl nastaven program podle tabulky 5. Po skončení protokolu byly vzorky buď dále zpracovávány nebo zamraženy na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tab. 4: Složení roztoku „Master Mix“ pro jeden vzorek.

Látka	Objem (μl)
100 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dNTPs	0,15
Multiscribe TM reverzní transkriptáza	1,00
Pufr pro reverzní transkripci	1,50
Inhibitor RNáz	0,19
Voda pro molekulární biologii	4,16
Celkový objem	7,00

Tab. 5: Časové a teplotní nastavení thermocykleru.

Krok	Teplota ($^{\circ}\text{C}$)	Čas (min)
1	16	30
2	42	30
3	85	5
4	4	∞

4.2.17 Real-time PCR

Při real-time PCR dochází k amplifikaci sledovaného úseku DNA v reálném čase. Záznam amplifikace je založen na principu fluorescence, kdy se využívají sondy, které se specificky nebo nespecificky vážou (interkalují) do amplifikované DNA.

Postup: Bylo smícháno 10 μ l 2 \times TaqMan Universal PCR Master Mixu se 7,67 μ l vody určené pro molekulární biologii a 1 μ l primeru se sondou. Tato směs byla rozpitetována na 96 jamkovou desku určenou pro RT-PCR a následně byl do jamek napipetován cDNA produkt. Objemy jednotlivých používaných látek jsou uvedeny v tabulce 6 a vztahují se k jednomu vzorku. Já jsem pracovala v tripletech. Poté, co byly vzorky promíchány a zcentrifugovány, byly vloženy do thermocykleru s nastaveným programem podle tabulky 7. Pro výpočet relativního množství transkriptu byla použita delta delta komparativní metoda. Jako kontrolní RNA byla použita RNU6B.

Tab. 6: Složení a množství látek směsi pro RT-PCR pro jeden vzorek.

Látka	Objem (μ l)
TaqMan TM MicroRNA assay (20 \times)	1,00
cDNA produkt	1,33
TaqMan TM 2 \times Universal PCR MasterMix, No AmpErase TM UNG	10,00
Voda pro molekulární biologii	7,67
Celkový objem	20,00

Tab. 7: Teplotní a časové nastavení thermocykleru.

Krok	Aktivace AmpliTaQGold [®] enzymu	PCR	
		Cyklus (40 cyklů)	
		denaturace	nasednutí/amplifikace
Teplota	95 °C	95 °C	60 °C
Čas	10 min	15 s	60 s

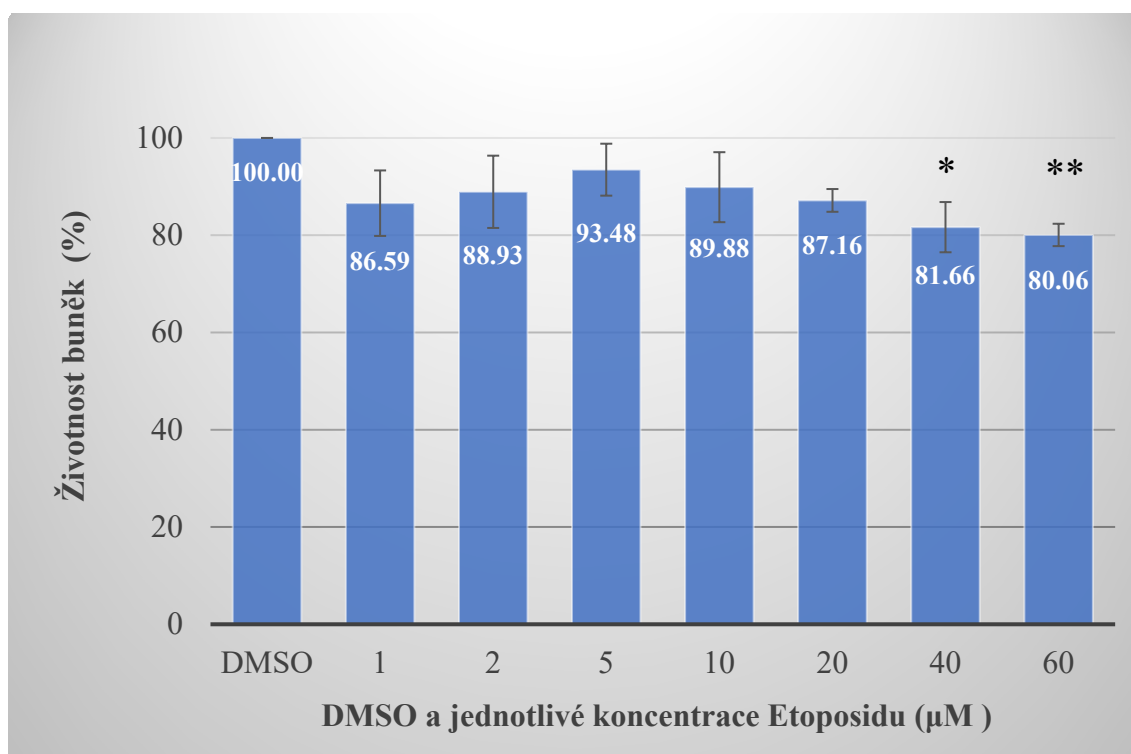
$$\Delta Ct = Ct_{\text{cílová miRNA}} - Ct_{\text{RNU6B}}$$
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{vzorek}} - \Delta Ct_{\text{kontrola}}$$
$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Obr. 7: Rovnice použitá pro výpočet relativní exprese dle Pfaffl³⁵.

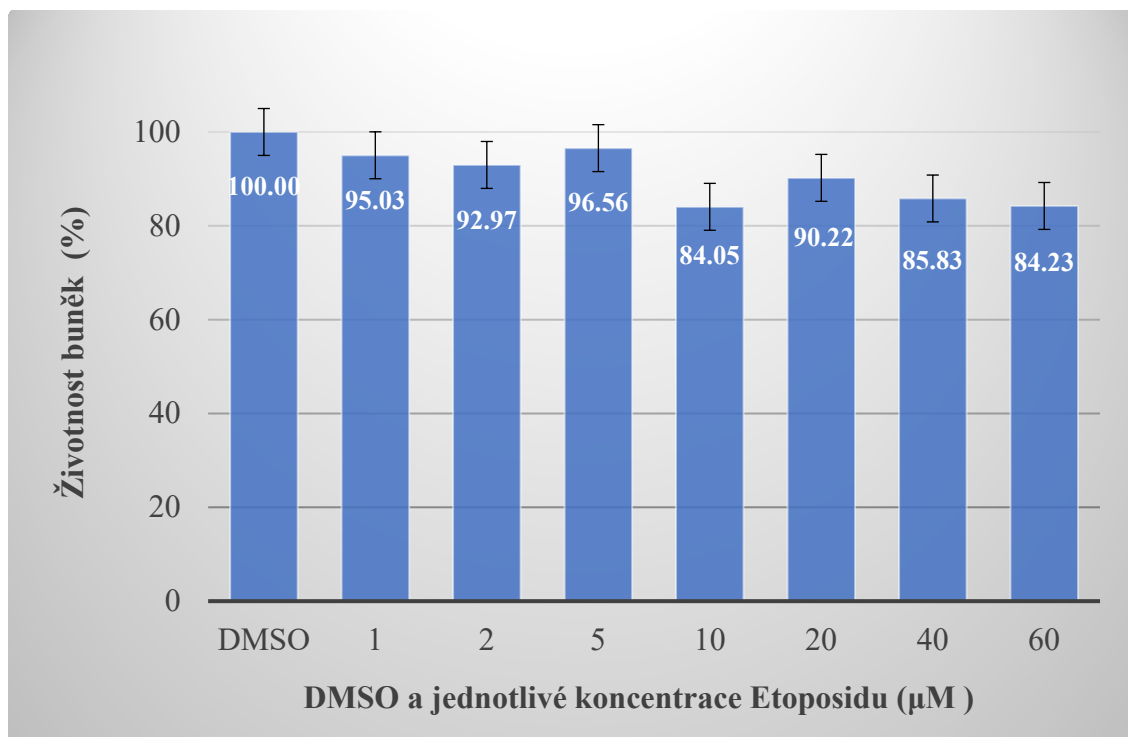
5 Výsledky

5.1 Stanovení cytotoxicity Etoposidu

Jako první byla stanovena cytotoxicita jednotlivých koncentrací Etoposidu (1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM a 60 μM) vůči buňkám H9c2. Jednotlivé koncentrace chemoterapeutika byly testovány za účelem zjištění, která z nich bude vůči této buněčné linii nejvíce toxická.



Obr. 8: Životnost buněk H9c2 vystavených uvedeným koncentracím Etoposidu. Každý sloupec představuje průměr \pm SD ze tří nezávislých měření metodou NČ. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



Obr. 9: Životnosti buněk H9c2 vystavených uvedeným koncentracím Etoposidu. Každý sloupec představuje průměr ± SD ze tří nezávislých měření metodou MTT.

Cytotoxicita Etoposidu vůči buněčné linii Hep G2 byla stanovena v diplomové práci Dr. Soni Kollinerové. Jako nejúčinnější koncentrace Etoposidu, která poškozovala 50% buněk, byla vyhodnocena koncentrace 60 μM³⁶.

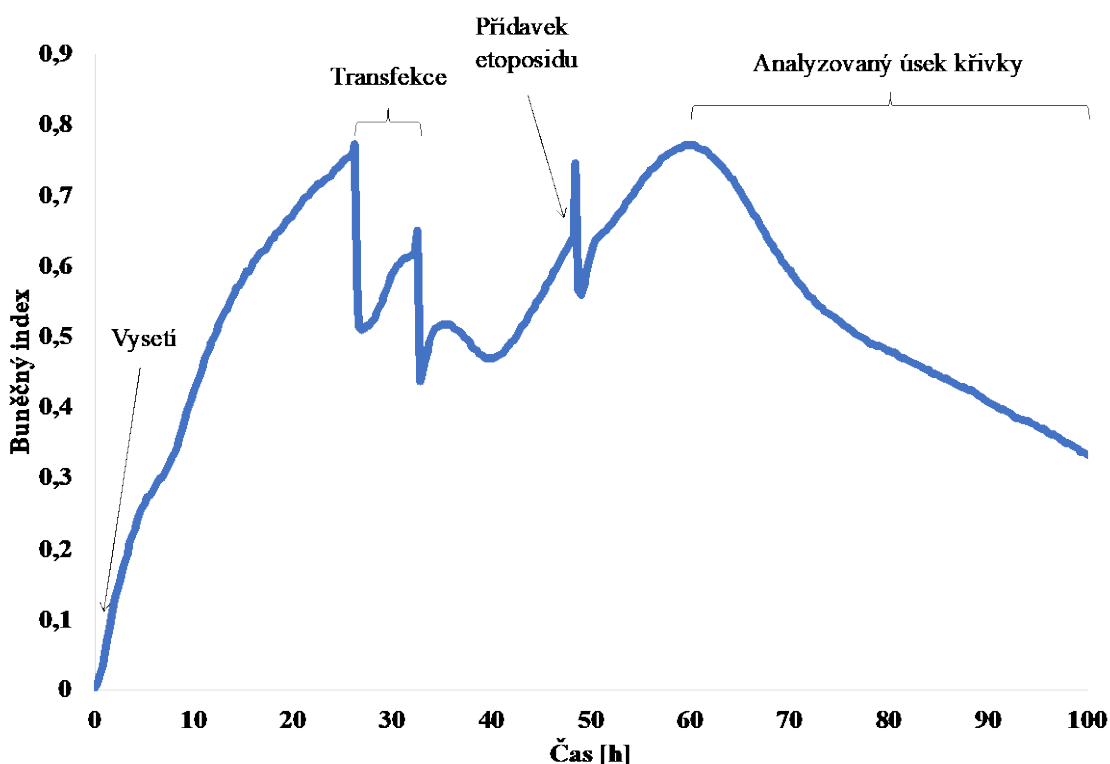
Z výsledků NČ lze vyhodnotit, že nejtoxičtější vůči buněčné linii H9c2 působil Etoposid o koncentraci 60 μM. Výsledná procenta životnosti buněk z měření metodou MTT jsou mírně vyšší než výsledky dosažené metodou NČ. Normálně bychom očekávali, že životaschopnost buněk bude klesat v závislosti na rostoucí koncentraci chemoterapeutika sigmoidální funkcí v rozsahu 100% - 0%. Proč tomu tak není můžeme přisoudit především rozpustnosti použitého chemoterapeutika, kdy při koncentracích vyšších než 60 μM již nelze cytotoxický efekt jednoznačně přisoudit pouze biologické aktivitě použité sloučeniny. Protože metoda NČ je oproti MTT citlivější³⁷, za nejtoxičtější koncentraci lze tedy považovat 60 μM. Přestože Dr. Kollinerová cytotoxicitu Etoposidu měřila na jiné buněčné linii, můžeme i přesto přihlížet k výsledku její práce, ze kterého taktéž vyplývá, že nejtoxičtější působí Etoposid 60 μM. Z těchto důvodů se proto pro další experimenty používal pouze Etoposid o této koncentraci.

5.2 xCELLigence

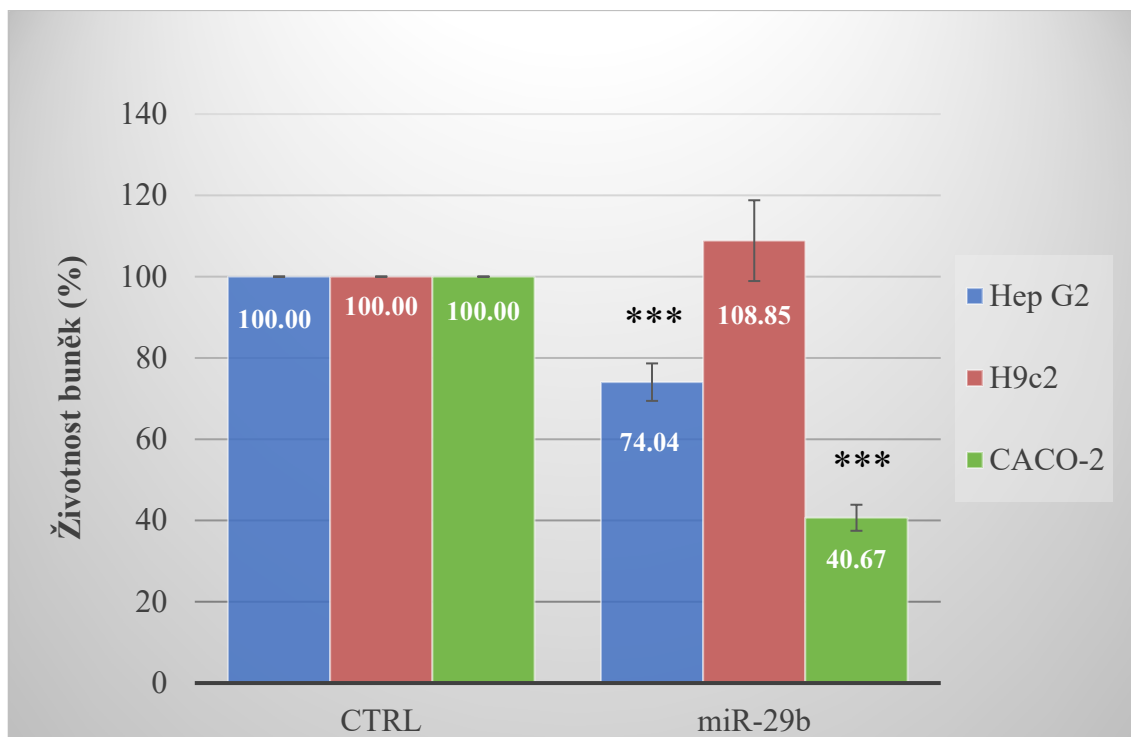
Systémem xCELLigence byly získány jednotlivé růstové křivky, které byly analyzovány programem RTCA Software 1.2.1. Tento program je schopen vypočítat dobu, během které dojde k 50% poklesu počtu buněk ve sledované jamce (doubling time). Pro vyhodnocení vlivu transfekce na cytotoxicitu Etoposidu stačí, aby byla označena vhodná oblast získané růstové křivky.

Po ošetření buněk Etoposidem dochází k jejich zablokování v S fázi buněčného cyklu. Výsledkem toho je nabobtnání buněk, které je spojeno s prvotním nárůstem tzv. buněčného indexu (cell index). Jakmile začnou buňky vlivem toxicity Etoposidu umírat, dochází k patrnému postupnému poklesu hodnoty cell indexu a vytvoří se tak charakteristický „peak“. Pro výpočet hodnoty „doubling time“ byl zvolen úsek křivky mezi maximem peaku a poslední naměřenou hodnotou experimentu.

Jakákoli výměna média v průběhu experimentu je spojena se vznikem artefaktu v záznamu viz. Obr. 10.



Obr. 10: Ilustrativní příklad křivky získané systémem xCELLigence.

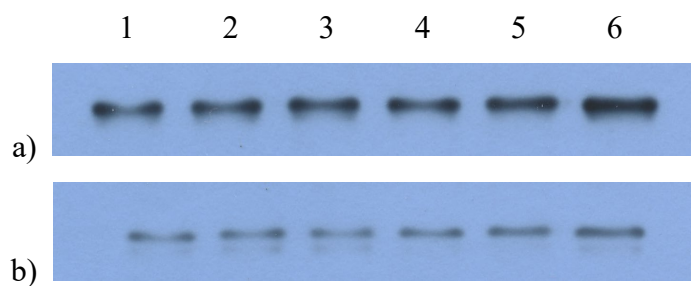


Obr. 11: Životnost buněk Hep G2, H9c2 a CACO-2 po vystavení 60 μ M Etoposidu. Každý sloupec představuje průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů. CTRL – buňky byly transfekovány kontrolní miRNA s náhodnou sekvencí; miR-29b – buňky byly transfekovány příslušnou miRNA. *** $p < 0,001$.

Na základě výsledků z xCELLigence lze říci, že vlivem miRNA-29b došlo ke zvýšení toxicity Etoposidu u buněčných linií Hep G2 a CACO-2. V případě buněk H9c2 miRNA-29b žádný efekt neměla.

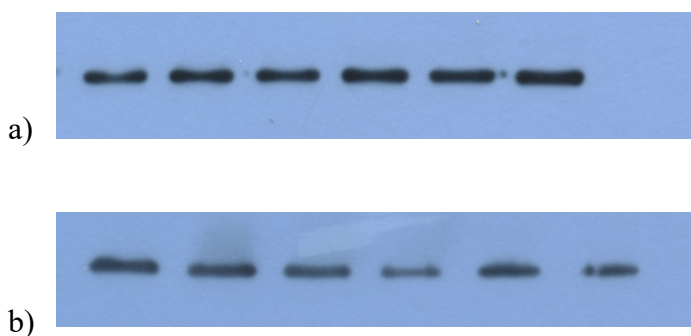
5.3 Imunodetekce

Protože publikace Kollinerová et al.³³ prokázala souvislost mezi účinkem miR-29b a proteinem Mcl-1, byla provedena imunodetekce izoforem Mcl-1L a Mcl-1S. Po imunodetekci dvou izoforem proteinu Mcl-1 bylo provedeno tzv. stripování membrány a následně byla provedena imunodetekce β -tubulinu nebo GAPDH. Filmy se záznamem detekovaných proteinů byly následně naskenovány ve formátu TIFF. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí denzitometrie za použití programu Image J.



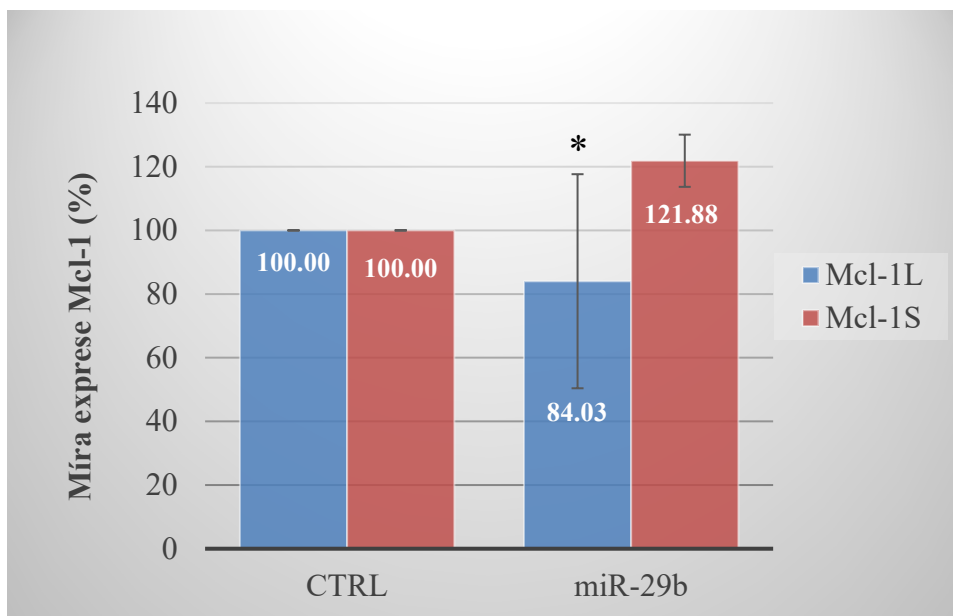
Obr. 12: Imunodetekce proteinu Mcl-1L (a) a Mcl-1S (b).

Na Obrázku 12 je uveden záznam imunodetekce provedené ve vzorcích buněčné linie H9c2 (1-3) a Hep G2 (4-6). Konkrétně se jedná o buňky transfekované miR-29b (1, 4), NC (2, 5) a buňky netransfekované (3, 6). Záznam imunodetekce proteinu Mcl-1 pocházející z buněčné linie CACO-2 vypadal po detekci téměř stejně.

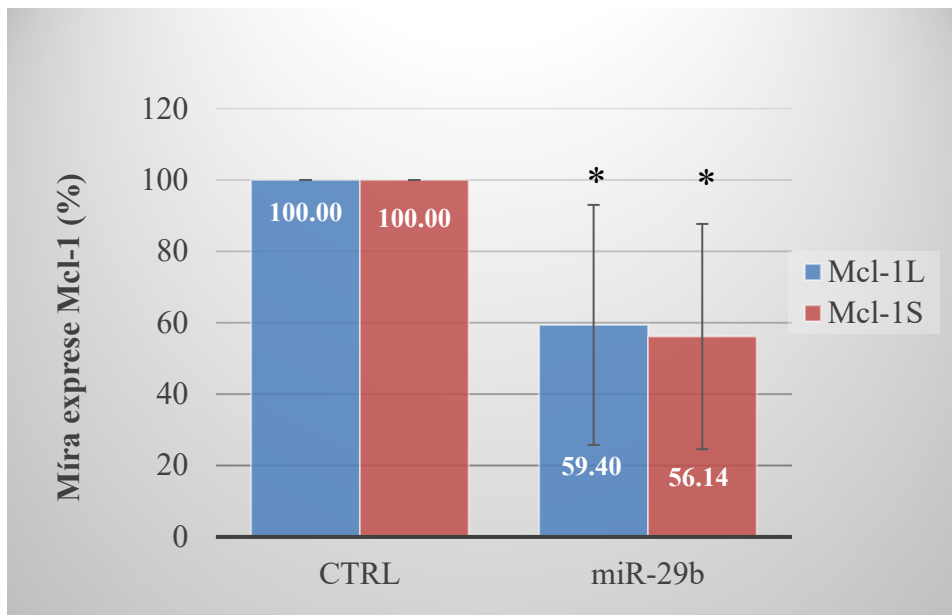


Obr. 13: Imunodetekce β -tubulinu (a) a GAPDH (b).

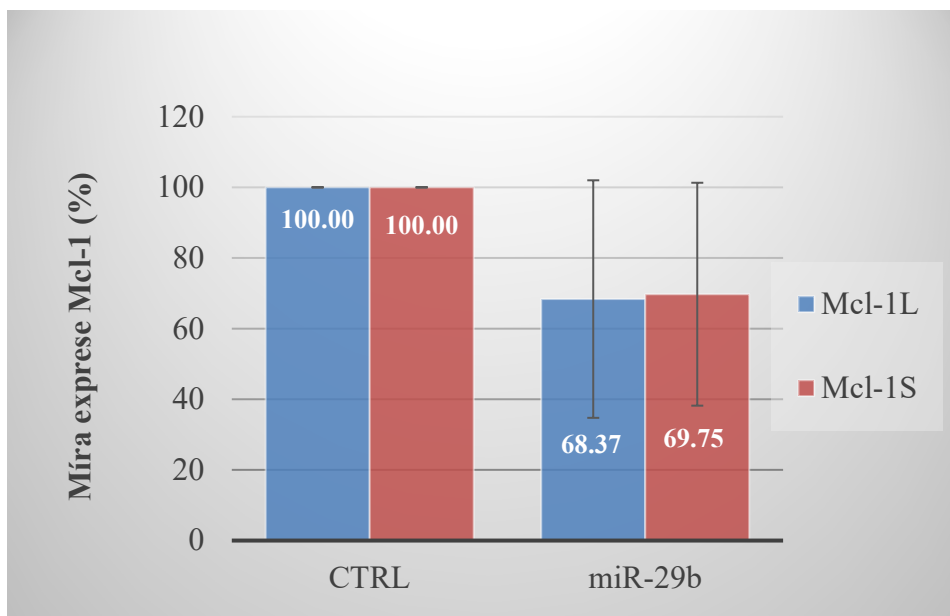
β -tubulin byl imunodetekován pouze na jedné membráně. Na ostatních membránách se daleko více osvědčila detekce GAPDH. Důvodem byla obtížná detekce β -tubulinu, zatímco GAPDH byla detekována vždy a v daleko lepší kvalitě.



Obr. 14: Expresa proteinů Mcl-1L a Mcl-1S v buněčné linii H9c2. CTRL – buňky byly transfekovány kontrolní miRNA; miR-29b – buňky byly transfekovány příslušnou miRNA. Každý sloupec představuje průměr ± SD ze tří nezávislých měření. * $p < 0,05$.



Obr. 15: Expresa proteinů Mcl-1L a Mcl-1S v buněčné linii HepG2. CTRL – buňky byly transfekovány kontrolní miRNA; miR-29b – buňky byly transfekovány příslušnou miRNA. Každý sloupec představuje průměr ± SD ze tří nezávislých měření. * $p < 0,05$.

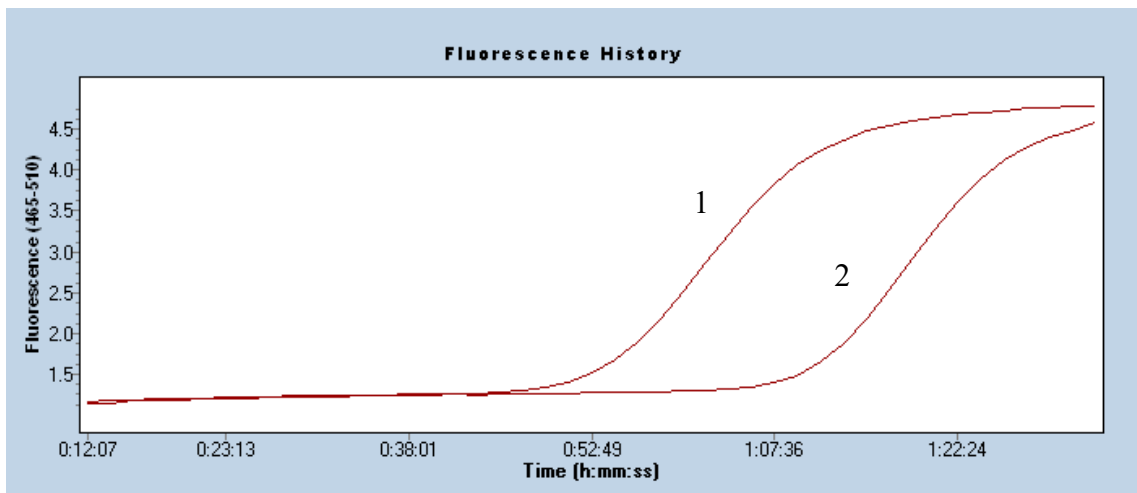


Obr. 16: Expresa proteinů Mcl-1L a Mcl-1S v buněčné linii CACO-2. CTRL – buňky byly transfekovány kontrolní miRNA; miR-29b – buňky byly transfekovány příslušnou miRNA. Každý sloupec představuje průměr ± SD ze tří nezávislých měření.

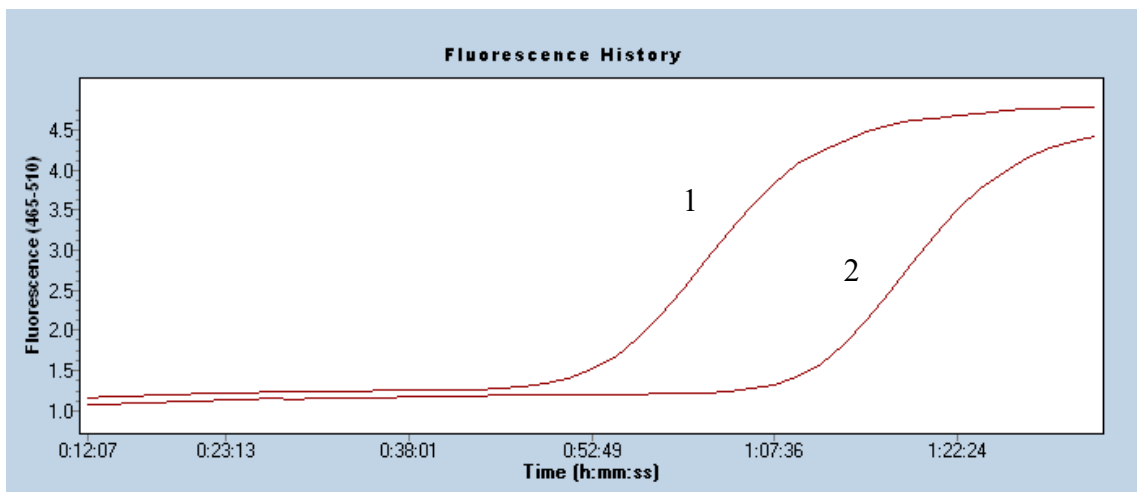
Po imunodetekci buněčné linie H9c2 jsem došla k závěru, že po transfekci miRNA-29b došlo ke snížení exprese Mcl-1L a navýšení exprese Mcl-1S. To znamená, že převažuje proapoptická izoforma tohoto proteinu, respektive dochází ke změně poměru Mcl-1S/Mcl-1L. U buněčné linie Hep G2 a buněk CACO-2 je patrný pokles exprese obou izoform a navíc nedochází ke změně poměru přítomnosti obou izoform Mcl-1.

5.4 RT-PCR

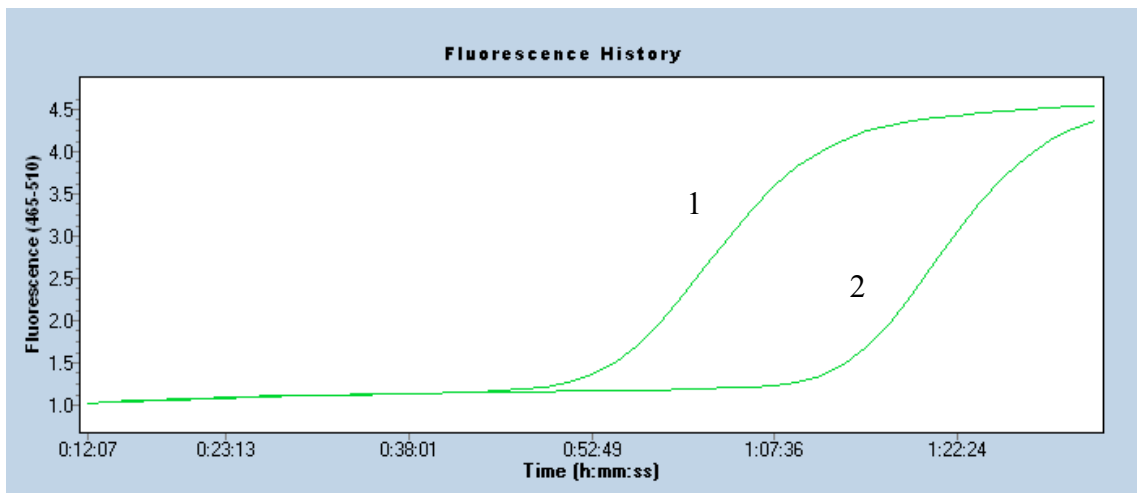
RT-PCR bylo využito pro stanovení efektivity transfekce použitých buněčných linií miRNA-29b. Toto stanovení bylo pro každou buněčnou linii provedeno celkem třikrát. Níže jsou uvedeny ilustrativní záznamy, které prokazují cca 100-násobné navýšení miR-29b. Proměření dalších dvou vzorků vypadalo podobně.



Obr. 17: Záznam z RT-PCR buněčné linie H9c2. První sigmoida (1) značí vzorky transfekované miR-29b, druhá (2) vzorky transfekované NC.



Obr. 18: Záznam z RT-PCR buněčné linie Hep G2. První sigmoida (1) značí vzorky transfekované miR-29b, druhá (2) vzorky transfekované NC.



Obr. 19: Záznam z RT-PCR buněčné linie CACO-2. První sigmoida (1) značí vzorky transfekované miR-29b, druhá (2) vzorky transfekované NC.

Pomocí metody RT-PCR bylo ověřeno, že transfekce proběhla úspěšně a došlo tak k navýšení exprese miRNA-29b.

6 Diskuze

Jak některé publikace uvádějí, u maligních onemocnění bývá exprese rodiny miR-29 často snižena^{25, 38}. Naopak je tomu u proteinu Mcl-1, který je v některých typech rakoviny exprimován nadměrně^{39, 40}. Velice důležitou roli hraje regulace hladin Mcl-1 proteinu, protože na jedné straně může nedostatečná exprese Mcl-1 vést k buněčné smrti, zatímco na straně druhé nadměrná exprese představuje riziko buněčné transformace⁴¹.

Zjistilo se, že jedním z cílů miR-29 je protein Mcl-1²⁵, kdy při navýšení hladiny miR-29 dochází ke snížení exprese tohoto proteinu. Protože je rodina miR-29 tvořena třemi členy (a, b, c), několik skupin se snažilo objasnit, který z těchto členů má na snížení exprese proteinu největší vliv.

V publikaci Kollinerové et al.²⁴ autoři provedli literární rešerši, ve které zmiňují, že došlo ke sledování exprese členů rodiny miR-29 ve třech buněčných liniích lidského myelomu (HMCL). Toto sledování odhalilo, že miR-29b byl ve všech třech buněčných liniích ve srovnání s miR-29a a miR-29c významně snížen. Adenovirem zprostředkovaná nadměrná exprese miR-29b způsobila významné zvýšení miR-29b a western blot analýza následně prokázala, že nadměrná exprese miR-29b dramaticky snižovala hladiny Mcl-1 proteinů. „Vynucená“ exprese miR-29b snížila expresi Mcl-1 proteinu také v buňkách KMCH (maligní cholangiocyty)⁴¹.

Souvislost mezi miR-29b a Mcl-1 vedla Kollinerovou et al. k experimentům hodnotícím vliv prekurzorů této rodiny miRNA, a to na buněčné linii HeLa ošetřené Etoposidem. Pomocí xCELLigence vyhodnotili, že miR-29a a miR-29c způsobily pouze nevýznamné změny v životaschopnosti buněk HeLa. Člen miR-29b však způsobil významné zvýšení toxicity Etoposidu. Z tohoto důvodu se rozhodli dále prozkoumat mechanismus, kterým miR-29b ovlivňuje toxicitu Etoposidu. Vyhodnotili, že miR-29b neovlivňuje buněčný cyklus, ale expresi Mcl-1 proteinu, který se podílí na regulaci apoptózy. Existují tři známé sestřihové varianty tohoto proteinu: Mcl-1L (protiapoptotický), Mcl-1S (proapoptotický) a Mcl-1ES (proapoptotický). Testovali, zda je exprese Mcl-1L nebo Mcl-1S ovlivněna členy rodiny miR-29. Provedli transfekci buněk HeLa všemi třemi prekurzory rodiny miR-29 a buňky následně kultivovali v přítomnosti Etoposidu. Výsledky ukázaly, že došlo ke statisticky významnému snížení exprese Mcl-1L, a to všemi třemi členy. Co se týče exprese Mcl-1S, na tu měl zanedbatelný účinek pouze člen miR-29b. Poměr mezi Mcl-1L/Mcl-1S byl tedy

ve srovnání s negativní kontrolou významně měněn pouze členem miR-29b. Dále se zabývali tím, proč pouze jeden ze členů rodiny miR-29 způsobuje navýšení toxicity. Došli k závěru, že by to mohlo být spojeno s jaderným transportem zralé miR-29b³³.

Cílem mé práce bylo zjistit, zda dochází vlivem mikroRNA-29b ke změně poměru Mcl-1L / Mcl-1S a v důsledku toho k navýšení toxicity chemoterapeutika Etoposidu také u dalších tří jiných buněčných linií.

Z mých výsledků imunodetekce lze vidět, že u buněk H9c2 došlo ke snížení exprese Mcl-1L a navýšení exprese proapoptotické formy Mcl-1S. U této buněčné linie tedy dochází ke změně poměru Mcl-1S/Mcl-1L a v souladu s hypotézou by mělo dojít také k navýšení toxicity Etoposidu vůči této buněčné linii. Z výsledků xCELLigence je ovšem vidět, že životaschopnost buněk po transfekci miR-29b a následnému vystavení Etoposidu nebyla změněna. Může to tedy znamenat, že apoptóza spuštěná vlivem Mcl-1S neprobíhá nebo může být ovlivněna jinou signální dráhou, která už nebyla středem našeho zájmu. U buněčných linií Hep G2 a CACO-2 došlo ke snížení exprese Mcl-1, ale nebyl změněn poměr obou isoform Mcl-1. Dle xCELLigence transfekce miR-29b navýšila toxicitu Etoposidu, protože životnost u obou buněčných linií klesla, ale nedošlo ke změně poměrů jeho dvou izoform Mcl-1L a Mcl-1S. Je tedy zřejmé, že hypotéza o obecné platnosti principu, že změna poměru Mcl-1S/Mcl-1L vlivem miR-29b zesílí toxický účinek Etoposidu, není platná.

Experimenty tedy naznačují, že zřejmě existuje kontrolní bod nebo signální dráha, která je schopná eliminovat proapoptotické účinky Mcl-1S v případě buněčné linie H9c2. H9c2 je buněčná linie odvozená od kardiomyoblastů, buněk schopných diferencovat do kardiomyocytů, a vykazuje aktivitu iontových přenašečů, především vápníkových kanálů, podobných kardiomyocytům. Je tedy možné, že tato odlišnost od HeLa buněk použitých v publikaci Kollinerové et al. představuje jedno z možných vysvětlení.

Na druhou stranu výsledky experimentů s buněčnými liniemi CACO-2 a HepG2 naznačují, že miR-29b může navyšovat toxicitu Etoposidu pouhým potlačením exprese obou forem Mcl-1. Dalším možným vysvětlením je, že miR-29b ovlivňuje expresi jiného cílového genu, který hraje roli v navýšení toxicity Etoposidu, například některý z ABC transportérů.

7 Závěr

Podle publikace Kollinerové et al.³³ dochází vlivem mikroRNA-29b ke změně poměru Mcl-1L / Mcl-1S a v důsledku toho k navýšení toxicity chemoterapeutika Etoposidu v buněčné linii HeLa. Cílem této práce bylo posoudit, zda je tato hypotéza obecně platná pro tři různé typy malignit.

Experimenty byly prováděny s buněčnými liniemi H9c2 (potkaní kardiomyoblasty), Hep G2 (lidský hepatoblastom) a CACO-2 (adenokarcinom tlustého střeva).

Jako první se metodou NČ a MTT měřila cytotoxicita jednotlivých koncentrací Etoposidu vůči buněčné linii H9c2. Došla jsem k závěru, že nejvíce toxická koncentrace Etoposidu je 60 μ M. Při vystavení této koncentraci došlo k usmrcení až 20% buněk. U buněčné linie Hep G2 cytotoxicitu stanovovala Dr. Kollinerová, která taktéž vyhodnotila jako nejtoxičtější koncentraci 60 μ M. Při dalších experimentech se tedy dále pracovalo pouze s touto koncentrací Etoposidu.

Následně byla stanovena životnost buněk metodou xCELLigence, kdy byly všechny buněčné linie transfekovány miR-29b a vystaveny 60 μ M Etoposidu. Zda transfekce proběhla úspěšně jsem si ověřila metodou RT-PCR. Z výsledků je vidět, že vlivem miR-29b došlo ke zvýšení toxicity Etoposidu u buněčných linií Hep G2 a CACO-2, zatímco v případě buněk H9c2 miR-29b žádný efekt neměla, což je také žádoucí.

Imunodetekcí jednotlivých izoform Mcl-1L a Mcl-1S jsem zjistila, že v buňkách H9c2 došlo ke snížení exprese protiapoptotické izoformy Mcl-1L a ke zvýšení exprese proapoptotické izoformy Mcl-1S. V této buněčné linii tedy došlo ke změně poměru obou izoform. Protože ale výsledky xCELLigence po transfekci miR-29b a následnému vystavení buněk Etoposidu nepotvrdili sníženou životnost této buněčné linie, může to tedy znamenat, že apoptóza spuštěná vlivem Mcl-1S neprobíhá nebo může být ovlivněna jinou signální dráhou.

V buňkách Hep G2 a CACO-2 došlo ke snížení exprese proteinu Mcl-1, ale nikoliv ke změně poměru Mcl-1L a Mcl-1S.

Mé výsledky tedy vyvrací fakt, že by hypotéza Dr. Kollinerové et al. platila pro různé typy malignit.

8 Literatura

1. Etoposide. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2020 [cit. 2020-04-01]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Etoposide>.
2. Hande, K. R. Etoposide: Four Decades Of Development Of A Topoisomerase Ii Inhibitor. *European Journal of Cancer* **1998**, 34 (10), 1514-1521.
3. Souhrn údajů o přípravku Etoposid. *SUKL* [online]. 2010 [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/download/spc/SPC10294.pdf>.
4. Allevi, P.; Anastasia, M.; Ciuffreda, P.; Sanvito, A. M.; Macdonald, P. A Short And Simple Synthesis Of The Antitumor Agent Etoposide. *Tetrahedron Letters* **1992**, 33 (33), 4831-4834.
5. Silverberg, L. J.; Kelly, S.; Vemishetti, P.; Vipond, D. H.; Gibson, F. S.; Harrison, B.; Spector, R.; Dillon, J. L. A Crystallization-Induced Stereoselective Glycosidation Reaction In The Synthesis Of The Anticancer Drug Etoposide †. *Organic Letters* **2000**, 2 (21), 3281-3283.
6. Saulnier, M. G.; Langley, D. R.; Kadow, J. F.; Senter, P. D.; Knipe, J. O.; Tun, M. M.; Vyas, D. M.; Doyle, T. W. Synthesis Of Etoposide Phosphate, Bmy-40481: A Water-Soluble Clinically Active Prodrug Of Etoposide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1994**, 4 (21), 2567-2572.
7. Slevin, M. L. The Clinical Pharmacology Of Etoposide. *Cancer* **1991**, 67 (1), 319-29.
8. Creaven, P. J.; Allen, L. M. Epeg, A New Antineoplastic Epipodophyllotoxin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **1975**, 18 (2), 221-226.

9. Hande, K. R. Topoisomerase II Inhibitors. *Update on Cancer Therapeutics* **2008**, 3 (1), 13-26.
10. Joel, S. The Clinical Pharmacology Of Etoposide: An Update. *Cancer Treatment Reviews* **1996**, 22(3), 179-221.
11. Kang, Z. -J.; Liu, Y. -F.; Xu, L. -Z.; Long, Z. -J.; Huang, D.; Yang, Y.; Liu, B.; Feng, J. -X.; Pan, Y. -J.; Yan, J. -S.; et al. The Philadelphia Chromosome In Leukemogenesis. *Chinese Journal of Cancer* **2016**, 35(48).
12. Montecucco, A.; Zanetta, F.; Biamonti, G. Molecular Mechanisms Of Etoposide. *EXCLI Journal* **2015**, 14 (19), 95–108.
13. Meresse, P.; Dechaux, E.; Monneret, C.; Bertounesque, E. Etoposide: Discovery And Medicinal Chemistry. *Current Medicinal Chemistry* **2004**, 11 (18), 2443-2466.
14. Novák, J. MikroRNA v kardiologii - Přehled pro klinickou praxi. *Kardiologická revue - Interní medicína* **2016**, 18 (4), 258-267.
15. Bhaskaran, M.; Mohan, M. MicroRNAs: History, Biogenesis, And Their Evolving Role In Animal Development And Disease. *Vet Pathol.* **2014**, 51 (4), 759–774.
16. CAI, X. Human MicroRNAs Are Processed From Capped, Polyadenylated Transcripts That Can Also Function As mRNAs. *RNA* **2004**, 10 (12), 1957-1966.
17. Park, W.; Li, J.; Song, R., et al. Carpel Factory, A Dicer Homolog, And Hen1, A Novel Protein, Act In MicroRNA Metabolism In Arabidopsis Thaliana. *Current Biology* **2002**, 12 (17), 1484–1495.
18. Bushati, N.; Cohen, S. M. MicroRNA Functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2007**, 23 (1), 175-205.

19. Chen, X.; Ba, Y.; Ma, L., et al. Characterization Of MicroRNAs In Serum: A Novel Class Of Biomarkers For Diagnosis Of Cancer And Other Diseases. *Cell Research* **2008**, *18* (10), 997-1006.
20. Prajzlerová, K.; Filková, M. Extracelulární miRNA – Biogeneze, Funkce A Využití Jako Biomarkerů U Revmatických Onemocnění. *Čes. Revmatol.* **2018**, *26* (4), 171-179.
21. Musilova, K.; Mraz, M. Micrnas In B-Cell Lymphomas: How A Complex Biology Gets More Complex. *Leukemia* **2015**, *29* (5), 1004-1017.
22. Vlahová, V.; Šmerkova, K.; Vaculovičová, M.; Kizek, R. Mirna: Od Biogeneze Po Využití V Lékařství. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* **2014**, 18-22.
23. Schmitt, M. J.; Margue, C.; Behrmann, I.; Kreis, S. Mirna-29: A MicroRNA Family With Tumor-Suppressing And Immune-Modulating Properties. *Current Molecular Medicine* **2013**, *13* (4), 572-585.
24. Kollinerova, S.; Vassanelli, S.; Modriansky, M. The Role Of Mir-29 Family Members In Malignant Hematopoiesis. *Biomedical Papers* **2014**, *158* (4), 489-501.
25. Kriegel, A. J.; Liu, Y.; Fang, Y.; Ding, X.; Liang, M. The miR-29 Family: Genomics, Cell Biology, And Relevance To Renal And Cardiovascular Injury. *Physiological Genomics* **2012**, *44* (4), 237-244.
26. Kwon, J. J.; Factora, T. D.; Dey, S.; Kota, J. A Systematic Review Of miR-29 In Cancer. *Molecular Therapy - Oncolytics* **2019**, *12*, 173-194.
27. Wang, Y.; Zhang, X.; Li, H.; Yu, J.; Ren, X. The Role Of miRNA-29 Family In Cancer. *European Journal of Cell Biology* **2013**, *92* (3), 123-128.

28. Kozopas, K. M.; Yang, T.; Buchan, H. L.; Zhou, P.; Craig, R. W. Mcl1, A Gene Expressed In Programmed Myeloid Cell Differentiation, Has Sequence Similarity To Bcl2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1993**, *90* (8), 3516-3520.
29. Michels, J.; Johnson, P. W. M.; Packham, G. Mcl-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2005**, *37* (2), 267-271.
30. Bae, J.; Leo, C. P.; Hsu, S. Y.; 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. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (33), 25255-25261.
31. Kim, J. -H.; Bae, J.; Takehara, T. Mcl-1Es Induces Mcl-1L-Dependent Bax- And Bak-Independent Mitochondrial Apoptosis. *PLoS ONE* **2013**, *8* (11).
32. Thomas, L. W.; Lam, C.; Edwards, S. W. Mcl-1; The Molecular Regulation Of Protein Function. *FEBS Letters* **2010**, *584* (14), 2981-2989.
33. Kollinerová, S.; Dostál, Z.; Modrianský, M. MicroRNA hsa-miR-29b Potentiates Etoposide Toxicity In Hela Cells Via Down-Regulation Of Mcl-1. *Toxicology in Vitro* **2017**, *40*, 289-296.
34. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-Step Method Of Rna Isolation By Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem.* **1987**, *162* (1), 156-9.
35. Pfaffl, M. W. A New Mathematical Model For Relative Quantification In Real-Time Rt-Pcr. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29* (9).
36. Kollinerová, S. Změna exprese mikroRNA u pacientů s B-CLL. Diplomová práce, Olomouc, 2011.

37. Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J. L. Neutral Red Uptake Assay For The Estimation Of Cell Viability/Cytotoxicity. *Nature Protocols* **2008**, *3* (7), 1125-11.
38. Jiang, H.; Zhang, G.; Wu, J. -H.; Jiang, C. -P. Diverse Roles Of Mir-29 In Cancer. *Oncology Reports* **2014**, *31* (4), 1509-1516.
39. Li, C.; Song, Y.; Li, P. Mcl1 Regulates Cell Death, Tumor Growth And Chemosensitivity To Sabutoclax In Ovarian Adenocarcinoma. *Cell and Tissue Research* **2020**, *379* (3), 625-633.
40. Shuang, W.; Hou, L.; Zhu, Y.; Li, Q.; Hu, W. Mcl-1 Stabilization Confers Resistance To Taxol In Human Gastric Cancer. *Oncotarget* **2017**, *8* (47), 82981-82990.
41. Mott, J. L.; Kobayashi, S.; Bronk, S. F.; Gores, G. J. Mir-29 Regulates Mcl-1 Protein Expression And Apoptosis. *Oncogene* **2007**, *26* (42), 6133-6140.