



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Mechanismus účinku fenretinidu a vliv na expresi miRNA
v modelech cystické fibrózy**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Markéta Juřicová**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 2021

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, ochotu a čas, který mi během zpracování této práce věnoval. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Hanuši Slavíkovi za trpělivou pomoc při práci v laboratoři a Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D. za statistické zpracování dat k experimentální části.

Diplomová práce byla vypracována za finanční podpory grantu IGA LF UP 2021_19.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Markéta Juřicová
Název práce	Mechanismus účinku fenretinidu a vliv na expresi miRNA v modelech cystické fibrózy
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	<p>Cystická fibróza (CF) je nejčastější autozomálně recesivně dědičné onemocnění v kavkazské populaci. Fenretinid je potenciálně využitelným léčivem pro terapii CF. Cílem předkládané diplomové práce bylo popsat vliv fenretinidu na dráhy miRNA, které se podílejí na patofyziologii CF. Působení fenretinidu na hladiny miRNA dosud u tohoto onemocnění zkoumáno nebylo. S využitím microarray analýzy bylo ve vzorcích plasmy a moče pacientů s CF a ve vzorcích buněčných linií CFBE41o- s homozygotní mutací <i>CFTR</i> F508del a s wild-type <i>CFTR</i> identifikováno 20 kandidátních miRNA, které byly následně validovány pomocí kvantitativní RT-PCR analýzy s TaqMan sondami. Dvě miRNA, miR-22-3p a miR-1281, vykazovaly pokles exprese v plasmě pacientů s CF léčených fenretinidem. Popsané miRNA jsou potenciálním biomarkerem protizánětlivého efektu fenretinidu v léčbě CF.</p>
Klíčová slova	Cystická fibróza, fenretinid, miRNA, microarray, qRT-PCR, TaqMan sondy
Počet stran	69
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Markéta Juřicová
Title of thesis	Mechanism of action of fenretinide and its effect on miRNA expression in cystic fibrosis model
Type of thesis	Diploma
Department	Institute of molecular and translational medicine
Supervisor	Josef Srovnal M.D., Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	<p>Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive inherited disease in the Caucasian population. Fenretinide is a potential drug for cystic fibrosis treatment. The aim of this diploma thesis was to describe an effect of fenretinide on miRNA pathways involved in CF pathophysiology. The effect of fenretinide on miRNA expression in patients with CF has not yet been described in the literature. In total, 20 miRNAs were identified in the plasma and urine samples of patients with CF and in CFBE41o- cell lines with homozygous <i>CFTR</i> mutation F508del and wild-type <i>CFTR</i>, using microarray analysis. These miRNAs were further validated using TaqMan PCR assay. Two miRNAs, miR-22-3p and miR-1281, showed a decreased expression in the plasma of CF patients treated with fenretinide, and thus could serve as a potential biomarker of fenretinide anti-inflammatory effect in CF treatment.</p>
Keywords	Cystic fibrosis, fenretinide, miRNA, microarray, qRT-PCR, TaqMan probes
Number of pages	69
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Obsah

Seznam zkratk	7
1 Úvod a cíle práce	9
2 Teoretická část	10
2.1 Cystická fibróza (CF)	10
2.1.1 Příčina vzniku cystické fibrózy	10
2.1.2 Příznaky cystické fibrózy	14
2.1.3 Léčba a prognóza	15
2.1.3.1 CFTR modulátory	16
2.2 Fenretinid	17
2.2.1 Ceramidy	17
2.2.2 Polynenasycené mastné kyseliny	19
2.2.3 Extracelulární signálně regulovaná kináza (ERK)	19
2.3 Nekódující RNA	20
2.3.1 MikroRNA (miRNA)	21
2.3.1.1 miRNA a cystická fibróza	22
2.4 Microarray	24
2.5 Kvantitativní RT-PCR (qRT-PCR)	24
3 Materiál a metody	28
3.1 Biologický materiál	28
3.2 Chemikálie, soupravy, roztoky	29
3.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	31
3.4 Použité experimentální postupy	31
3.4.1 Izolace RNA	31
3.4.2 Microarray	33
3.4.3 qRT-PCR s TaqMan sondami	34
3.4.4 Zpracování dat	36
4 Výsledky	38
4.1 Microarray analýza	38
4.2 qRT-PCR analýza	46
5 Diskuze	50
6 Závěr	53
7 Literatura	54

Seznam zkratek

AA	kyselina arachidonová
ABC transportéry	ATP vázající kazetové transportéry
BMP	kostní morfogenetický protein
BSL	odběr před podáním léčby (base-line)
Buněčná linie P	buněčná linie CFBE41o- nesoucí homozygotní mutaci F508del
Buněčná linie WT	buněčná linie CFBE41o- nesoucí wild-type CFTR
c-AMP	cyklický adenosinmonofostát
CAV1	kaveolin-1
CF	cystická fibróza
CFBE41o-	lidská buněčná linie bronchiálního epitelu
CFTR	regulátor transmembránové vodivosti cystické fibrózy
CRP	C-reaktivní protein
Ct	prahový cyklus (cycle of threshold)
CTSS	katepsin S
D21	den 21
DHA	kyselina dokosahexaenová
ECM	extracelulární matrix
ER	endoplasmatické retikulum
ERK	extracelulární signálně regulovaná kináza
FDR	fenretinid
FoxO	forkhead box O
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GnRH	gonadotropin uvolňující hormon
GPI	glykofosfatidylinositol
HUVEC	buněčná linie lidských endoteliálních buněk odvozených z pupečnickové žíly
IKK β	podjednotka beta inhibitoru NF- κ B kinázy
IL	interleukin
IRF-1	interferonový regulační faktor 1
kb	tisíc párů bází
LCCs	ceramidy s dlouhým řetězcem
lncRNA	dlouhé nekódující RNA
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza

MGB	oblast vážící se do malého žlábků (minor groove binder)
miRNA	mikroRNA
MSD	membránu překlenující doména
mTOR	kináza (mammalian target of rapamycin)
NA	neanalyzováno z důvodu malého počtu měření
NBD	doména vázající nukleotidy
ncRNA	nekódující RNA
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NHERF1	Na ⁺ /H ⁺ Exchanger Regulatory Factor
PCR	polymerázová řetězová reakce
PI3K/AKT	fosfatidylinositol-3-kináza/protein kináza B
PNA	peptidová nukleová kyselina
pre-miRNA	prekurzor-miRNA
PTC	předčasný terminační kodon
qRT-PCR	kvantitativní PCR s reverzní transkripcí
Rap1	Ras-related protein 1
MEK	MAP a ERK kináza
RISC	RNA-indukovaný umlčovací komplex
RPE	retinální pigmentový epitel
SIRT1	sirtuin 1
snoRNA	malé nukleolární RNA
TGF β	transformující růstový faktor β
TLR	toll-like receptor
UTR	nepřekládaná oblast
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VLCCs	ceramidy s velmi dlouhým řetězcem
Wnt	wingless-related integration site
WT	wild-type
Δ F508, F508del	delece fenylalaninu v pozici 508 sekvence CFTR proteinu

1 Úvod a cíle práce

Cystická fibróza (CF) je nejčastější onemocnění s autozomálně recesivní dědičností v kavkazské populaci. Příčinou vzniku CF je mutace genu *CFTR*, který kóduje chloridový kanál na povrchu epiteliálních buněk (Davies *et al.*, 2007; Ratjen, 2015). Onemocnění zasahuje plíce, játra, gastrointestinální trakt, pankreas a způsobuje poruchy reprodukce (Peterson *et al.*, 2003; Ratjen *et al.*, 2003; De Boeck *et al.*, 2011; Kerem *et al.*, 2017).

Bylo zjištěno, že se na patofyziologii CF podílejí také miRNA. Tyto krátké ncRNA o délce ~22 nukleotidů regulují genovou expresi, čímž se uplatňují v široké škále biologických a patologických procesů (Bartel, 2004; O'Brien *et al.*, 2018). Dysregulace exprese miRNA se podílí na mnoha onemocněních včetně cystické fibrózy, u které miRNA regulují expresi proteinu CFTR – změnu iontové vodivosti, vrozenou imunitu a zánětlivé reakce (De Palma *et al.*, 2020).

Fenretinid, syntetický analog retinolu, který má potenciální antineoplastické a chemopreventivní účinky je v posledních letech také předmětem výzkumu pro vývoj nových léčiv cystické fibrózy. (Guilbault *et al.*, 2008; NCI Thesaurus, 2021). Bylo prokázáno, že fenretinid v modelech cystické fibrózy normalizuje hladinu ceramidů (Guilbault *et al.*, 2008), stabilizuje poměr kyseliny arachidonové a dokosahexaenové (Guilbault *et al.*, 2009) a ovlivňuje hladiny zánětlivých molekul (Lachance *et al.*, 2013). Jeho působení na hladiny miRNA u CF dosud nebylo popsáno.

Cílem této diplomové práce je provést literární rešerši na dané téma, popsat mechanismy účinku fenretinidu a objasnit jeho vliv na miRNA dráhy u modelů cystické fibrózy. Za využití microarray analýzy nalézt kandidátní miRNA pro monitoring terapie cystické fibrózy fenretinidem. Následně kandidátní miRNA molekuly validovat pomocí kvantitativní RT-PCR analýzy s TaqMan sondami.

2 Teoretická část

2.1 Cystická fibróza (CF)

Cystická fibróza (CF) je monogenní onemocnění, které je podmíněno autozomálně recesivně. Jedná se o nejčastější dědičné onemocnění v kavkazské populaci s incidencí 1:2500-4000. Příčinou vzniku cystické fibrózy je mutace genu *CFTR*, který kóduje chloridový kanál na povrchu epiteliálních buněk. Nejčastěji zasaženými orgány jsou plíce, pankreas, játra a střeva (Davies *et al.*, 2007; Ratjen *et al.*, 2015).

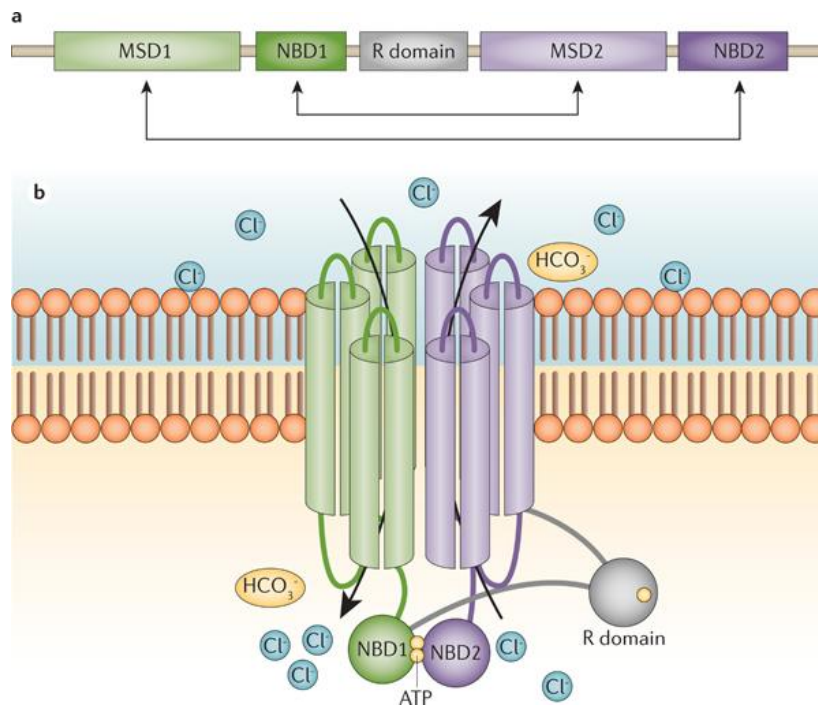
V České republice je cystická fibróza jednou z 18 nemocí, které jsou součástí novorozeneckého screeningu. Pozitivní nález screeningu je nutné ověřit pomocí potního testu. Zdravý člověk má koncentraci sodíku a chloridů v potu nižší než 40 mmol/l. Pacienti s cystickou fibrózou mají hodnoty vyšší než 60 mmol/l. Konečná diagnóza je potvrzena molekulárně genetickým vyšetřením genu *CFTR* (Davies *et al.*, 2007; Novorozenecký screening, 2020).

2.1.1 Příčina vzniku cystické fibrózy

Příčinou vzniku cystické fibrózy je mutace genu *CFTR*. Defektní gen byl identifikován a klonován před 25 lety týmem vedeným Collinsem, Riordanem a Tsui a jeho proteinový produkt byl nazván regulátor transmembránové vodivosti cystické fibrózy (CFTR) (Riordan *et al.*, 1989). Gen *CFTR* se nachází na dlouhém raménku 7. chromozomu v pozici 31.2 (NCBI, 2020). Samotný gen *CFTR* se skládá z 189,36 kb, ovšem velikost jeho transkripční jednotky je přibližně 216,7 kb. Gen je tvořen 27 exony (Tsui *et Dorfman*, 2013).

CFTR protein řadíme k ABC transportérům, je tvořen dvěma doménami vázající nukleotidy (NBD1, NBD2) kódující místa schopná vázat a hydrolyzovat ATP a dvěma membránu překlenujícími doménami (MSD1, MSD2), které tvoří šest membránu překlenujících α -helixů a které slouží jako póry iontového kanálu v plasmatické membráně. Stavba proteinu CFTR je znázorněna na Obr. 1. NBD využívají energii z hydrolyzy ATP k čerpání širokého spektra substrátů přes buněčné membrány transmembránovými cestami vytvořenými MSD. CFTR je jedinečný transportér ABC, jelikož je přísně regulován regulační doménou (R domain) a funguje jako chlor-selektivní kanál s nízkou vodivostí, který je řízen cykly vazby ATP a jeho hydrolyzy na NBD. Pro otevření kanálu, které je iniciováno řadou konformačních změn vedoucích k dimerizaci NBD, je nutná fosforylace regulační domény cAMP-dependentní proteinkinázou, vazba intracelulárního ATP na NBD a následná hydrolyza ATP. (Ma *et al.*, 1997; Sheppard

et Welsh, 1999; Holland *et al.*, 2003; Gadsby *et al.*, 2006; Bozoky *et al.*, 2013; Corradi *et al.* 2015; Ratjen *et al.*, 2015;).



Obrázek 1: Stavba proteinu CFTR, a – lineární schéma proteinu, b – schéma proteinu umístěného v plasmatické membráně. Protein CFTR se skládá ze dvou domén překlenujících membránu (MSD1 a MSD2) tvořených šesti α -helixy, dvou domén vázajících nukleotidy (NBD1 a NBD2) a z jedné regulační domény (R domain). Každý α -helix je spojen s NBD. NBD váží regulační doménu a ATP (převzato z Ratjen *et al.*, 2015).

Bylo identifikováno více než 1800 různých mutací genu *CFTR*, přičemž nejběžnější mutací na světě je delece fenylalaninu v pozici 508 sekvence *CFTR* proteinu ($\Delta F508$, F508del). Různé typy mutací jsou spojeny s rozdílnou závažností onemocnění v závislosti na celkové schopnosti proteinu správně fungovat na apikální membráně. Na výsledný fenotyp však mají vliv také genetické modifikátory a faktory prostředí. (Drumm *et al.*, 2005; O'Sullivan *et al.* Freedman, 2009; Glasgow *et al.*, 2018). Přítomnost alespoň jedné částečně aktivní alely genu *CFTR* může výrazně zlepšit klinické následky. To je patrné např. nižšími koncentracemi chloridu sodného v potu nebo vyšší pravděpodobností pankreatické dostatečnosti ve srovnání s těmi, kteří nemají funkční *CFTR*. Pokud jsou přítomny dvě mírné nebo „variabilní“ mutace nebo jedna mutace, kdy gen vykazuje dostatečnou funkci, může dojít ke vzniku atypických forem cystické fibrózy, při kterých se vyskytuje např. vrozená absence chánovodu, idiopatická pankreatitida nebo velmi pozdní

nástup respiračních onemocnění bez dalších charakteristických rysů cystické fibrózy (Chillón *et al.*, 1995; Cohn *et al.*, 1998; Sharer *et al.*, 1998).

V roce 1993 Welsh a Smith navrhli soustavu čtyř hlavních tříd defektů pro přehled důsledků funkčních mutací genu *CFTR*. Ty byly dále rozšířeny o další dvě třídy. Třída I zahrnuje nonsense, frameshift mutace a mutace sestřihu zabraňující biosyntéze proteinu CFTR tvorbou tzv. předčasných terminačních kodonů (PTC), které vyvolají mechanismus mRNA sledování – nonsense zprostředkovaný rozpad. To vede k předčasnému zastavení translace a zrychlenému rozpadu mRNA, čímž se sníží nebo zastaví produkce proteinu CFTR. Nejběžnější mutace třídy I jsou G542X (ve středomořských zemích), R1162X a W1282X (u aškenázských Židů) (Welsh *et al.*, 1993; Zielenski *et al.*, 1995; Rowe *et al.*, 2005).

Mutace třídy II jsou charakteristické defektním zpracováním proteinu, což vede k nepřítomnosti funkčního proteinu na plasmatické membráně (Welsh *et al.*, 1993; Zielenski *et al.*, 1995; Rowe *et al.*, 2005). Do této třídy řadíme nejčastější mutaci genu *CFTR* – F508del, která je umístěná v NBD1. V důsledku mutace dochází k tvorbě nesprávně složeného polypeptidu, který je rozpoznán mechanismem kontroly kvality endoplasmatického retikula (ER), je označen ubikvitinem a následně degradován proteazomem (Farinha *et al.*, 2013). Malé množství mutantního proteinu CFTR může dosáhnout plasmatické membrány, ale vykazuje špatnou stabilitu a defektní funkci (Dalemans *et al.*, 1991; Lukacs *et al.*, 1993).

Mutantní proteiny, které řadíme do třídy III, se zdají být správně syntetizovány a správně umístěny v apikální membráně, ale nejsou schopné fungovat jako chloridové kanály v důsledku defektní regulace kanálu. Analýzou některých mutantních proteinů CFTR, které jsou přítomny v plasmatické membráně, byly odhaleny mutace v oblasti NBD. Vazba ATP na tyto domény reguluje otevření chloridových kanálů, je tedy zřejmé, že mutace v NBD mohou změnit funkci kanálu. Bylo pozorováno několik abnormalit NBD jako např. G551D, která je 3. nejčastější mutací způsobující CF a která způsobuje snížení funkce NBD; S1255P, při které je méně účinná stimulační aktivita nebo mírné snížení absolutní aktivity (G551S, G1244E a G1349D) (Drumm *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1992; Welsh *et al.*, 1993; Zielenski *et al.*, 1995). G551D mutace tvoří 4–5 % mutací CFTR. Nachází se na NBD1 na vazebném místě ATP 2, ovlivňuje tedy vazbu ATP a hydrolýzu, a především konformační změny navazující na vazbu ATP sloužící k otevření kanálu (Wang *et al.*, 2014). Vadná regulace těchto kanálů a výsledný pokles aktivity chloridového kanálu pravděpodobně nese odpovědnost za defektní propustnost chloridů epitelem u pacientů nesoucích tyto mutace (Welsh *et al.*, 1993).

Mutace třídy IV, které jsou většinou lokalizované v MSD, narušují tok aniontů póry CFTR. Patří zde mutace lokalizované v MSD1: R117H a R334W nebo R347P lokalizované v MSD1. Když jsou exprimovány v heterologních epiteliálních buňkách, jsou tyto mutantní proteiny správně zpracovány a generují cAMP stimulovaný tok chloridů. Navíc regulace pomocí cAMP-dependentní fosforylace a intracelulárního ATP se zdá podobná wild-type CFTR. Přesto je tok iontů ve srovnání s wild-type CFTR snížen. Studie zabývající se vodivostí jednotlivých CFTR kanálů odhalily, že mutace R117H snížila vodivost kanálu CFTR o 15 %, mutace R347P o 70 % a mutace R334W redukovala průtok o 60 % tím, že znemožnila interakce iontů s ionty v pórech (Sheppard *et al.*, 1993; Welsh *et Smith*, 1993; Gong *et. Linsdell*, 2004).

Zielenski *et Tsui* (1995) revidovali klasifikaci mutací CF navrženou Welshem a Smithem (1993) pro zahrnutí další třídy mutací CF, která snižuje syntézu proteinů. Mutace třídy V zahrnují promotorové mutace, které snižují transkripci, nukleotidové změny, které podporují alternativní sestřih CFTR transkriptů a aminokyselinové substituce, které způsobují neúčinnou maturaci proteinů (Highsmith *et al.*, 1994; Zielenski *et al.*, 1995).

Haardt M. *et al.* (1999) na základě studií nonsense a frameshift mutací, které zkracují C-konec CFTR, předložili, že některé mutace CF způsobují snížení stability CFTR na plasmatické membráně tím, že snižují jeho poločas, buď upřednostňováním degradace CFTR endocytózou nebo snížením jeho recyklace na plasmatické membráně. Příkladem takové mutace je Q1412X, která zkracuje protein o posledních 70 aminokyselin CFTR a generuje cAMP-stimulovaný tok chloridů s podobnými biofyzikálními vlastnostmi, ale ve srovnání s wild-type CFTR je tok nižší. Biochemické studie prokázaly, že mutace Q1412X neměla účinek na zpracování CFTR a na jeho intracelulární transport, ale výrazně snížila stabilitu maturovaného proteinu CFTR (Haardt *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2014).

Klasifikace mutací CFTR podnítila hledání léků, které by opravily defektní funkci specifických CFTR mutací. Nicméně se ukázalo, že většina mutantních proteinů vykazuje více molekulárních defektů, a proto by měla být zahrnuta do více než jedné třídy mutací. Příkladem je mutace F508del, která se řadí do třídy II, ale vykazuje také charakteristické rysy mutací třídy III (defekt otevírání kanálu) a mutací třídy IV (defektní recyklace a snížená stabilita na plasmatické membráně). Další omezení této klasifikace vyplývá ze skutečnosti, že většina mutací nebyla zařazena do tříd kvůli absenci funkčních studií (Okuyoneda *et al.*, 2010; Thibodeau *et al.*, 2010; Amaral, 2015; Farinha *et Canato*, 2017).

2.1.2 Příznaky cystické fibrózy

Cystická fibróza je monogenním onemocněním, přesto je její fenotypová variabilita značná. Svědčí o tom široké spektrum závažnosti onemocnění pozorované u pacientů se stejným genotypem (Weiler *et* Drumm, 2013). Pro cystickou fibrózu je charakteristická produkce abnormálně hustého hlenu epiteliálními buňkami. CF je multiorgánovým onemocněním zahrnujícím onemocnění plic, jater, gastrointestinálního traktu, pankreatu a reprodukční poruchy (Peterson *et al.*, 2003; Ratjen *et* Döring, 2003; De Boeck *et al.*, 2011; Kerem *et* Kerem, 2017).

V klinickém fenotypu dominuje onemocnění dýchacích cest. Primární absence nebo snížení propustnosti aniontů v důsledku defektů genu *CFTR* spouští kaskádu patogeneze CF, kterou charakterizuje respirační onemocnění CF. Mutace genu *CFTR* vede ke vzniku defektního CFTR proteinu, který je hlavním regulátorem iontů epitelu. Dojde ke snížení sekrece chloridů a změní se také transport jiných iontů, např. sodíku. Tato iontová dysregulace vede ke zvýšené absorpci vody a tedy k tvorbě hustého hlenu, který způsobuje bronchiální obstrukci. Zároveň se zhoršuje mukociliární clearance, která je důležitým obranným mechanismem proti patogenům a cizím částicím. To vede k bakteriálním infekcím a chronickému zánětu způsobeného především *Pseudomonas aeruginosa*. Touto bakterií je infikováno 54,4 % pacientů s CF a převládá u většiny dospělých pacientů. U dětí jsou hlavními patogeny *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae*. K morbiditě a mortalitě přispívají také jiné patogeny, jako *Burkholderia spp.*, *Achromobacter spp.* a *Stenotrophomonas maltophilia*. Chronické infekce vedou až k respirační insuficienci (Amaral *et* Kunzelmann, 2007; Gaspar *et al.*, 2013; Amaral, 2015).

Po respiračním traktu je dalším nejčastěji postiženým orgánem u CF pankreas, exokrinní pankreatická nedostatečnost je přítomna asi u 90 % pacientů (Kopelman *et al.*, 1985). Pankreatická nedostatečnost vede k malabsorpci a špatnému trávení živin a vitamínů rozpustných v tucích. Název cystická fibróza je ve skutečnosti odvozen od cyst a fibrózy zaznamenaných v pankreatu u pacientů s tímto onemocněním (Sabharwal, 2016). Předpokládá se, že onemocnění pankreatu je výsledkem sníženého objemu sekrece pankreatu s nízkými koncentracemi HCO_3^- (Kopelman *et al.*, 1985). Bez dostatečného množství tekutiny a HCO_3^- jsou trávicí proenzymy zadržovány v pankreatických vývodech a předčasně aktivovány, což vede k destrukci tkáně, k fibróze a k malabsorpci. Jelikož plicní infekce mohou vést ke snížení chuti k jídlu a zvracení, malnutrice se prohlubuje. To může vést ke zhoršení plicní infekce a k opakujícím se cyklům malnutrice a infekce (Fried *et al.*, 1991; Ratjen *et* Döring, 2003). V případě, že se fibrotické poškození rozšíří na beta buňky pankreatu, vyvine se *diabetes mellitus* (Kelly *et* Buxbaum, 2015). S pankreatickou

nedostatečností jsou spojovány především mutace třídy I až III. Pacienti se vzácnějšími mutacemi třídy IV–VI pankreatickou nedostatečností obvykle netrpí (The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium, 1993).

CFTR je exprimován také v buňkách žlučových cest a nejméně třetina pacientů vykazuje poruchu jaterních funkcí. Screening spočívá v každoročním měření jaterních transamináz. Malý, špatně fungující žlučník je přítomen až u 30 % pacientů s cystickou fibrózou a žlučové kameny až u 10 % (Ratjen *et* Döring, 2003; Sabharwal, 2016).

Cystická fibróza se projevuje také v gastrointestinálním traktu. Nutriční selhání je multifaktoriální. Malabsorpce tuků, bílkovin a vitamínů rozpustných v tucích je důsledkem nedostatečné produkce pankreatických enzymů, což může být zhoršeno abnormalitami žlučových solí v přítomnosti souběžného onemocnění jater. Jak bylo řečeno výše, progresivní plicní infekce může vést ke zvýšené dechové práci, snížené chuti k jídlu a zvýšené kalorické potřebě zánětlivého katabolismu. Mezi další faktory, které ovlivňují výživu, patří *diabetes mellitus*, změněná motilita gastrointestinálního traktu a nadměrný růst bakterií tenkého střeva. CF se může projevit také gastroezofageálním refluxem, mekoniovým ileem, zácpou a distálním intestinálním obstrukčním syndromem (Kelly *et* Buxbaum, 2015; Sabharwal, 2016).

Co se plodnosti týče, až 98 % mužů je neplodných v důsledku vrozené bilaterální absence nebo atrofie *vas deferens*. Analýza spermatu odhaluje azoospermii téměř u všech dospělých mužů s CF (Dodge, 1995). Sexuální potence a spermatogeneze jsou však normální. U žen může být reprodukční funkce narušena dehydratací cervikálního hlenu, který pravděpodobně působí jako bariéra pro migrace spermií. Lékaři u žen s CF zaznamenali přítomnost chronicky zaníceného děložního čípku (Kopito *et al.*, 1973; Ratjen *et* Döring, 2003).

2.1.3 Léčba a prognóza

Klinický pokrok v léčbě příznaků a zpomalení progresu onemocnění významně zlepšil přežití od 5 let na počátku 60. let až za hranici 30 let (Cohen-Cymbarknoh *et al.*, 2011). Velká část pokroku v prodloužení délky života pacientů s CF je následkem standardizované multisystémové léčby, která zahrnuje antibiotika k eradikaci hlavní bakteriální plicní infekce (zejména *Pseudomonas aeruginosa*) jako např. inhalovaný tobramycin (Ramsey *et al.*, 1999) a inhalovaný aztreonam (Oermann *et al.* 2010), dále mukolytika k uvolnění a odstranění hustého hlenu charakteristického pro CF, např. dornázu alfa, stejně jako vysoce kalorickou výživu a fyzioterapii hrudníku (O'Sullivan *et* Freedman, 2009; Stern *et al.*, 2014). Výsledkem těchto přístupů je spolu

s rozšířenými programy transplantace plic nyní téměř 50 % pacientů s CF v dospělém věku (McIntyre, 2013).

Hlavním cílem identifikace genu zodpovědného za vznik CF bylo dokázat rychle přejít na genovou terapii (Amaral, 2015). Objev genu *CFTR* v roce 1989 byl proto velkým průlomem (Riordan *et al.*, 1989). Vzhledem k tomu, že CF je recesivní genetická porucha, je přidání jediné kopie správně fungujícího genu *CFTR* do postižených buněk dýchacích cest CF považováno za jediný racionální a proveditelný způsob prevence nebo léčby onemocnění dýchacích cest CF (Griesenbach *et al.*, 2016). Genová terapie by zajistila správnou buněčnou funkci bez ohledu na třídu mutací *CFTR* dané osoby. Přestože by bylo stále zapotřebí léčby pankreatické nedostatečnosti, cukrovky související s CF a dalších patologických stavů souvisejících s CF, při řešení základního defektu genu u jeho zdroje v buňkách dýchacích cest lze očekávat, že genová terapie dýchacích cest by změnila možnosti léčby CF plicního onemocnění (Donnelley *et Parsons*, 2018). Koncept poskytnout pacientům správnou kopii genu CF, aby mohli produkovat funkční protein, byl jednoduchý a elegantní. Studie genové terapie však brzy ukázaly, jak obtížné je exprimovat cizí geny v plicích (Crystal, 2012). Dostupné vektory pro transport genů se ukázaly jako neúčinné a klinické studie nebyly úspěšné (Griesenbach *et Alton*, 2013). Ačkoliv je genová terapie nyní terapeutickou realitou pro některá genetická onemocnění (Donnelley *et Parsons*, 2018), v současné době se studie genové terapie pro CF zastavily (Amaral, 2015). Do roku 2017 proběhlo téměř 2600 studií genové terapie, z toho 36 pro CF (Ginn *et al.*, 2018).

2.1.3.1 CFTR modulátory

Teprve v nedávné době byly v klinických studiích testovány CFTR modulátory – léky, které přímo cílí na základní defekt cystické fibrózy (Kuk *et Taylor-Cousar*, 2015). Ivacaftor, lumacaftor, tezacaftor a jejich kombinace (lumacaftor/ivacaftor a tezacaftor/ivacaftor) přinesly pacientům s CF nesoucím specifickou mutaci výraznou výhodu. Tyto personalizované léky mohou zvýšit přítomnost a/nebo funkci proteinu CFTR v buňce, zlepšit funkci plic a zpomalit progresi onemocnění plic. Nepříznivým faktorem je však to, že náklady na tyto léky jsou neúnosné a pravděpodobně neudržitelné, protože zdravotní systémy v několika zemích odmítají doporučit např. kombinaci lumacaftor/ivacaftor pro vládní finanční podporu kvůli nízkému poměru přínosu k nákladům (Donnelley *et Parsons*, 2018).

Ivacaftor, modulátor CFTR označovaný jako potenciátor, se váže na defektní protein na povrchu buňky a zvyšuje pravděpodobnost otevření defektních CFTR kanálů přítomných na povrchu epitelálních buněk, umožňuje průtok chloridů a reguluje tak množství tekutin na povrchu buňky.

V roce 2012 se stal ivacaftor prvním schváleným lékem, který řeší základní defekt CF. Je schválen pouze pro 10 mutací, mezi nimiž je např. mutace G551D, kterou nese přibližně 7 % populace pacientů s CF. Použití samotného CFTR potenciátoru, ivakaftoru, však nebylo dostatečné k léčbě pacientů homozygotních pro mutaci F508del (Kuk *et Taylor-Cousar*, 2015; CFF, 2021).

Tento problém vyřešilo nalezení korektorů CFTR, nejúčinnější sloučeninou v testování byl lumacaftor. Ten pomáhá CFTR proteinu vytvořit správnou konformaci, aby mohl opustit ER a být transportován na povrch buňky. Při spojení účinku obou sloučenin vzniká lék lumacaftor/ivacaftor, který umožňuje léčbu nejčastější mutace (v homozygotním stavu) způsobující cystickou fibrózu, F508del. (Van Goor *et al.*, 2011; Kuk *et Taylor-Cousar*, 2015; CFF, 2021).

Jiným známým CFTR modulátorem je kombinace tezacaftoru a ivacaftoru. Tezacaftor je také korektorem a má stejnou roli jako lumacaftor. Rozdíl mezi léčivy spočívá v tom, že kombinace tezacaftor/ivacaftor má méně nežádoucích účinků a lékových interakcí než lumacaftor/ivacaftor (CFF, 2021).

Nejnovějším modulátorem je kombinace elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor. Toto léčivo bylo schváleno pro lidi s CF ve věku 12 let a starší, kteří mají alespoň jednu kopii mutace F508del nebo alespoň jednu kopii 177 specifikovaných mutací (CFF, 2021).

Dalším potenciálně využitelným lékem pro cystickou fibrózu je fenretinid.

2.2 Fenretinid

Fenretinid neboli N-(4-hydroxyfenyl)-retinamid je perorálně aktivní syntetický analog retinolu (vitaminu A) s potenciálními antineoplastickými a chemopreventivními účinky. Váže se na receptory kyseliny retinové (RAR) a aktivuje je, čímž indukuje buněčnou diferenciaci a apoptózu u některých typů nádorových buněk. Fenretinid také inhibuje růst nádoru modulací růstových faktorů asociovaných s angiogenezí a jejich receptorů a vykazuje apoptotické vlastnosti nezávislé na receptoru retinoidu. Kromě zkoumání potenciálního využití fenretinidu při léčbě rakoviny je na jeho působení zaměřen také výzkum pro léčbu cystické fibrózy (Guilbault *et al.*, 2008; NCI Thesaurus, 2021).

2.2.1 Ceramidy

Ceramidy hrají klíčovou roli při různých onemocněních, jako jsou např. neurodegenerativní poruchy (Alzheimerova choroba), ale také při selhání ledvin a jater, v průběhu tumorigeneze

a podílejí se také na zánětlivé etiologii cystické fibrózy (Grösch *et al.*, 2012). Jsou to sfingolipidy, které tvoří základ složitějších molekul, jako jsou sfingomyeliny a glykosylceramidy. Jsou složkami lipidových raftů buněčné membrány, tvoří tedy její důležitou strukturální část a zároveň jsou druhými posly signálních drah. Účastní se procesu regulace buněčného růstu, diferenciaci, apoptózy a stárnutí. Řadíme je proto k bioaktivním lipidům (Simons *et al.*, 2000; Hannun *et al.*, 2008; Bartke *et al.*, 2009; Grösch *et al.*, 2012).

Ceramidy se skládají ze sfingosinu, na jehož aminoskupinu je vázána mastná kyselina s různou délkou acylového řetězce (Fahy *et al.*, 2005). V závislosti na této délce dělíme ceramidy do tří skupin: ceramidy s dlouhým řetězcem (LCCs), které jsou tvořeny 14–20 uhlíky (C14:0–C20:0), ceramidy s velmi dlouhým řetězcem (VLCCs) tvořené 22–26 uhlíky (C22:0–C26:0) a ceramidy s ultra dlouhým řetězcem o více než 26 uhlících. Ceramidy a dihydroceramidy byly až donedávna považovány za jedinou funkční třídu lipidů a nerozlišovaly se molekuly o různých délkách řetězce. V současné době je však zřejmé, že právě délka acylového řetězce mastných kyselin je zodpovědná za specifické a odlišné biofyzikální a biochemické vlastnosti různých ceramidů (Grösch *et al.*, 2012).

Jednou z hlavních příčin úmrtnosti na CF jsou chronické plicní bakteriální infekce, které jsou způsobeny především *Pseudomonas aeruginosa* (Wojewodka *et al.*, 2011). Studie Kowalski *et al.* upozornila na roli lipidových raftů při signalizaci, která je nutná pro koordinaci vrozené imunity proti plicní infekci způsobené *P. aeruginosa*. Grassme *et al.* (2003) hovoří o důležité roli membránových raftů obohacených o ceramidy, bez nichž se zánětlivá reakce na bakteriální infekci stává trvalou a vede až ke smrti infikovaných myší. Léčba galaktosylceramidem vede k efektivnímu odstranění *P. aeruginosa* z infikovaných plic (Nieuwenhuis *et al.*, 2002). Regulace hladiny ceramidů se tedy ukazuje jako nezbytná pro udržení homeostázy v buňkách a při protizánětlivé odpovědi (Guilbault *et al.*, 2008).

V poslední době se ukazuje, že LCCs mají opačný biologický efekt na životaschopnost buněk než VLCCs. Nicméně, proč tomu tak je, zůstává nejasné (Garić *et al.*, 2017). Guilbault *et al.* (2008) poprvé ukázali, že pacienti s CF a CF knockout (CF-KO) myši mají nižší celkovou hladinu určitých typů ceramidů oproti kontrolám. Následně Garić *et al.* (2017) odhalili, že u pacientů s CF, v buněčných liniích a v myších modelech jsou vyšší hladiny LCCs oproti VLCCs, jejichž hladiny jsou naopak nižší. Léčba fenretinidem u CF-KO myší normalizovala hladiny ceramidů v plicích a snížila bakteriální zátěž po infekci *P. aeruginosa* (Guilbault *et al.*, 2008).

2.2.2 Polynenasycené mastné kyseliny

Pacienti s cystickou fibrózou mají nerovnováhu v polynenasycených mastných kyselinách, vykazují nízké koncentrace kyseliny dokosaheptaenové (DHA) a vysoké koncentrace kyseliny arachidonové (AA). DHA, omega-3 mastná kyselina, je produktem desaturace kyseliny α -linolenové. DHA se metabolizuje na protizánětlivé resolviny a protektiny (Serhan *et al.*, 2008; Guilbault *et al.*, 2009). AA, omega-6 mastná kyselina, vzniká z kyseliny linolové. Metabolity AA jsou naopak prozánětlivé eikosanoidy: protaglandiny série 2 (dvě dvojně vazby na molekule) a leukotrieny série 4. AA a DHA jsou metabolizovány stejnými oxidačními enzymy, cyklooxygenázami a lipooxygenázami. Kyselina arachidonová je antagonistou kyseliny dokosaheptaenové a změna koncentrace jedné z nich bude inverzně ovlivňovat druhou (Moyad, 2005). Zvýšené hladiny AA u pacientů s CF jsou pravděpodobně faktorem přispívajícím k zánětu a patofyziologii onemocnění (Freedman *et al.*, 2004).

Studie Guilbault *et al.* (2009) odhalila spojení mezi hladinou ceramidů a mastných kyselin ve vzorcích lidské krevní plasmy pacientů s CF. V případě nízkých hladin ceramidů je v plasmě přítomna zvýšená koncentrace kyseliny arachidonové a naopak snížené množství kyseliny dokosaheptaenové. Poměr AA/DHA také odpovídá hladině ceramidů u pacientů s CF. Ve vzorcích kontrol žádná korelace mezi ceramidy a mastnými kyselinami nalezena nebyla. Stejná studie se zabývala působením fenretinidu na hladiny AA a DHA. Výsledky studie prokázaly, že 28 denní léčba fenretinidem byla schopna normalizovat hladiny AA v plasmě, plicích a játrech CF myši na hladiny AA u wild-type (WT) myši. Hladiny DHA se po léčbě u myši CF zvýšila v plasmě, plicích i v játrech, nicméně koncentrace nedosahovaly na stejnou hodnotu jako u WT myši. Poměr AA/DHA byl u myši s CF snížen v plasmě a ve všech orgánech souvisejících s CF. Ze studovaných mastných kyselin měla léčba fenretinidem největší vliv na koncentrace AA, vedla k úplné normalizaci AA u CF myši. Korelace mezi hladinou ceramidů, AA a DHA nalezené u myši a u pacientů s CF potvrzují důležité spojení mezi ceramidy a nerovnováhou mastných kyselin a výsledky studie svědčí o tom, že fenretinid slouží k nápravě lipidové nerovnováhy u pacientů s CF (Guilbault *et al.*, 2009).

2.2.3 Extracelulární signálně regulovaná kináza (ERK)

Extracelulární signálně regulovaná kináza 1 a 2 (ERK1 a ERK2) jsou příbuzné protein-serin/threonin kinázy, které jsou součástí signální transdukční kaskády Ras-Raf-MEK-ERK. Tato kaskáda se podílí na regulaci široké škály procesů, včetně adheze buněk, progresu buněčného cyklu, migrace buněk, přežití buněk, diferenciaci, metabolismu,

proliferace a transkripce (Roskoski, 2012). Lidské ERK1 a ERK2 mají z 84 % identickou sekvenci a sdílejí většinu funkcí, proto jsou označovány jako ERK ½ (Lloyd, 2006).

Aktivace ERK hraje důležitou roli při expresi zánětlivých cytokinů, jako např. interleukinů 1β a 6 (IL-1β a IL-6) (Verhaeghe *et al.*, 2007). Pro regulaci exprese cytokinového genu v makrofázích jsou důležití především dva členové MAPK rodiny, a to p38 MAPK a ERK (Carter *et al.*, 1999). Z dřívějších studií lze odvodit, že by mastné kyseliny mohly vykonávat určitou úroveň kontroly genové exprese cytokinů u makrofágů cestou MAPK (Lo *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2004). Ve tkáních, které byly zasaženy zánětem, je pro makrofágy charakteristický zvýšený poměr kyseliny arachidonové ke kyselině dokosahexaenové v porovnání se zdravou tkání. Studie Lachance *et al.* (2013) poprvé ukazuje, že fenretinid korekcí nerovnováhy těchto mastných kyselin vázaných na fosfolipidy inhibuje fosforylaci ERK ½ a tím snižuje expresi zánětlivých cytokinů v makrofázích.

Bylo prokázáno, že fenretinid v modelech cystické fibrózy normalizuje hladinu ceramidů, stabilizuje poměr kyseliny arachidonové a dokosahexaenové a ovlivňuje hladiny zánětlivých molekul. Jedním z cílů diplomové práce je popsat vliv fenretinidu na dráhy miRNA u cystické fibrózy.

2.3 Nekódující RNA

Nekódující RNA (ncRNA) jsou početnou třídou RNA, která zahrnuje malé ncRNA, dlouhé nekódující RNA (lncRNA) a pseudogeny. Tyto molekuly jsou dále řazeny do kategorií na základě jejich velikosti nebo funkce (Glasgow *et al.*, 2018). NcRNA tvoří asi 98% veškerého transkripčního výstupu u lidí (Mattick, 2001).

Nekódující RNA molekuly regulují geny a genomy. K této regulaci může dojít na nejdůležitějších úrovních funkce genomu, včetně struktury chromatinu, segregace chromozomů, transkripce, zpracování RNA, stability RNA a translace (Mattick *et Makunin*, 2006; Carthew *et Sontheimer*, 2009). Účinky malých RNA na genovou expresi a kontrolu jsou obecně inhibiční a odpovídající regulační mechanismy jsou proto kolektivně nazývány RNA umlčování (RNA-silencing). Malé RNA slouží jako faktory specificity, které směřují navázané efektorové proteiny k cílení molekul nukleových kyselin prostřednictvím párování bází. Dráhy malých RNA lze předvídat a v některých případech kontrolovat, čehož je využíváno v praktických a aplikovaných sférách, např. změny exprese a/nebo funkce ncRNA u nemocí mohou být cíleny v rámci jejich léčby (Carthew *et Sontheimer*, 2009; Esteller, 2011).

2.3.1 MikroRNA (miRNA)

V posledních letech byla největší pozornost ze tříd ncRNA věnována mikroRNA (miRNA) (Diederichs, 2014). První miRNA, *lin-4*, byla objevena v roce 1993 skupinami Ambros a Ruvkun v *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993). Od té doby bylo identifikováno tisíce genů miRNA v různých organismech (Li *et al.*, 2010).

MiRNA jsou krátké ncRNA o délce ~22 nukleotidů (Bartel, 2004), které hrají důležitou roli v regulaci genové exprese (O'Brien *et al.*, 2018), čímž se uplatňují v široké škále biologických procesů, včetně vývoje a diferenciaci (Shenoy *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015), imunity (Mehta *et al.*, 2016), reprodukce (Hasuwa *et al.*, 2013) a dlouhověkosti (Sun *et al.*, 2013). Dysregulace exprese miRNA se podílí na mnoha onemocněních, jako je rakovina (Jones *et al.*, 2012; Mendell *et al.*, 2012), *diabetes mellitus* a další metabolická onemocnění (Kim *et al.*, 2012; Lorenzen *et al.*, 2012), neurodegenerativní onemocnění (Palm *et al.*, 2012; Roshan *et al.*, 2012) nebo regulují vrozenou imunitní odpověď po infekci nebo při tumorigenezi (Elias *et al.*, 2012; Mandelboim, 2012; Eulalio *et al.*, 2012). Podrobná charakteristika profilu exprese miRNA napříč různými typy buněk a tkání je základním požadavkem pro pochopení funkce miRNA a jejich potenciální role ve zdraví a nemoci (De Rie *et al.*, 2017).

Biosyntéza miRNA je evolučně konzervovaný proces, ve kterém se uplatňují dva enzymy třídy RNasy III, *Drosha* a *Dicer*. RNA polymeráza II tvoří v jádře primární transkript miRNA, který je zpracován *Drosha*. Vzniká vlásenková struktura o velikosti asi 70 nukleotidů, kterou nazýváme prekurzor-miRNA (pre-miRNA) (Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Kim, 2005). Pre-miRNA se váže na exportin-5 a Ran-GTP a je transportována do cytoplasmy, kde je štěpena *Dicerem* za vzniku duplexu tvořeného zralou miRNA a miRNA* (fragment podobné velikosti odvozený z opačného ramene pre-miRNA). Tento produkt má délku asi 22 nukleotidů (Bartel, 2004; Bohnsack, 2004). Zralá miRNA poté podněcuje vznik RNA-indukovaného umlčovacího komplexu (RISC), který se váže na komplementární mRNA (Wang *et al.*, 2011). Ve většině případů miRNA interagují s 3' nepřekládanou oblastí (3' UTR) cílových mRNA, u nichž indukují degradaci a translační represi. Nicméně je možná také interakce miRNA s jinými oblastmi, včetně 5' UTR, kódujícími sekvencemi a promotory genů. Za určitých podmínek tedy mohou miRNA aktivovat translaci nebo regulovat transkripci. Interakce miRNA a cílových genů je dynamická a závisí na mnoha faktorech, jako je subcelulární umístění miRNA, množství miRNA a cílových mRNA a afinitě interakcí miRNA-mRNA. MiRNA mohou být také vylučovány do extracelulárních tekutin, kde fungují jako chemičtí poslové (O'Brien *et al.*, 2018).

Nomenklatura miRNA byla ustanovena v roce 2003 Ambrosem *et al.* Jako příklad bude uvedena hsa-miR-121. První tři písmena v názvu odpovídají organismu, v tomto případě hsa - *homo sapiens*. miR odkazuje na zralou miRNA, v případě, že je R psáno velkým písmenem. V případě malého písmene se jedná o označení genu příslušné miRNA. Číslo, které následuje, odpovídá pořadí, v jakém byla miRNA objevena (kdyby toto byla poslední objevená miRNA, další v pořadí bude hsa-miR-122), případně podobnosti s miRNA jiného organismu. Identické zralé sekvence z odlišných prekurzorů získají názvy v podobě číselných přípon, hsa-miR-121-1 a hsa-miR-121-2, zatímco velmi podobné sekvence se označují malými písmeny - hsa-miR-121a a hsa-miR-121b. miRNA klonovací studie někdy identifikují dvě sekvence miRNA, pocházející ze stejného prekurzoru. Pokud je na základě relativní četnosti zřejmé, která miRNA je převážně exprimována, je tato označena jako hsa-miR-56 a druhá sekvence z opačného konce prekurzoru je označena hvězdičkou – hsa-miR-56*. V případě, že data k určení četnosti nestačí, využívají se přípony -5p a -3p (hsa-miR-142-5p, hsa-miR-142-3p), které odkazují na 5' či 3' konec prekurzoru, ze kterého daná molekula vznikla (Ambros *et al.*, 2003; miRBase, 2021). Jelikož je v diplomové práci používán biologický materiál a buněčné linie pouze humánního původu, není u ncRNA v textu uváděna předpona hsa-(*homo sapiens*).

2.3.1.1 miRNA a cystická fibróza

V posledních letech byly identifikovány desítky miRNA podílející se na patofyziologii cystické fibrózy. MiRNA hrají roli v regulaci exprese proteinu CFTR a tedy ve změně iontové vodivosti, podílejí se na regulaci vrozené imunity, zánětlivé reakce v plicích a stresu endoplasmatického retikula (De Palma *et al.*, 2020).

Studie Oglesby *et al.* (2010) poprvé poskytuje důkazy o změně exprese miRNA u CF, konkrétně popisuje sníženou expresi miR-126 ve vzorcích bronchiálního kartáčkového lemu u pacientů s CF ve srovnání se zdravými kontrolami a také v CF bronchiální epiteliální buněčné linii, CFBE41o- ve srovnání se zdravou bronchiální epiteliální buněčnou linií, 16HBE14o-. Snížená exprese miR-126 koreluje se zvýšením exprese její cílové mRNA, TOM1. TOM1 funguje jako negativní regulátor signálních drah TLR2, TLR4 a IL-1RI uplatňujících se v zánětlivém procesu, který je charakteristickým rysem CF. Změněná exprese miR-126 tedy ovlivňuje vrozenou imunitní odpověď (Oglesby *et al.*, 2010; Glasgow *et al.*, 2018).

Řada miRNA je schopna regulovat expresi prozánětlivých posílů, včetně IL-6 a IL-8. Patří mezi ně například miR-146a, jejíž zvýšená exprese vede k tomu, že makrofágy pacientů s CF nadprodukuji IL-6 v reakci na stimulaci lipopolysacharidem (Luly *et al.*, 2019). Úloha miR-146a při zánětu CF

je spojena také s jeho negativním dopadem na produkci mucinu 5AC, který je hlavní složkou hlenu dýchacích cest (Zhong *et al.*, 2011; De Palma *et al.*, 2020). IL-8 byl identifikován jako přímý cíl miR-17 a miR-93 (Fabbri *et al.*, 2014; Oglesby *et al.*, 2015). IL-8 je produkován makrofágy a bronchiálními epiteliálními buňkami v plicích CF v reakci na infekční (tj. *P. aeruginosa* a *S. aureus*) a zánětlivé (tj. IL-1 β nebo TNF- α) podněty. Hlavní funkcí IL-8 je přilákat a aktivovat neutrofile, které dominují v zánětlivé odpovědi v dýchacích cestách CF (De Palma *et al.*, 2020).

Bylo prokázáno, že na expresi IL-8 má vliv také miR-155, která vykazuje zvýšenou expresi v CF bronchiální epiteliální buněčné linii IB3-1 ve srovnání s kontrolní buněčnou linií IB3-1/S9. Klinicky byla miR-155 vysoce exprimována také v buňkách plicního epitelu CF a v cirkulujících CF neutrofilech biopsií od pacientů s CF. Zvýšené hladiny exprese miR-155 přispívají k prozánětlivé expresi IL-8 v buňkách plicního epitelu CF snížením exprese SHIP1 a tím aktivací signální dráhy PI3K/AKT (fosfatidylinositol-3-kináza/protein kináza B) (Bhattacharyya *et al.*, 2011).

Studie Bardin *et al.* (2018) prokázala roli miR-199a-3p jako negativního regulátoru v signální dráze nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B). Pomocí bronchiálních explantátů od pacientů s CF zjistili, že exprese miR-199a-3p je nižší ve srovnání s kontrolami a nepřímo koreluje se zvýšením exprese IKK β a IL-8 a tím přispívá k chronickému plicnímu zánětu.

Na patogenezi cystické fibrózy se podílejí také makrofágy, jejichž zvýšená hladina je pozorována v plicích pacientů s CF a CF myši s důsledky pro signalizaci v rámci vrozené imunity (Glasgow, 2018). Zhang *et al.* (2015) identifikují dráhu AKT/miR-199a-5p/CAV1 jako regulátor vrozené imunity, který je nefunkční v CF makrofázích, což přispívá k zánětu plic. Vysoké hladiny miRNA-199a-5p, které jsou závislé na PI3K/AKT vedou ke snížení CAV1 (caveolin-1) a následně zvýšení signalizace TLR4 u lidských a myších CF makrofágů a myších CF plic. Snížená exprese miRNA-199a-5p nebo zvýšená AKT signalizace obnovuje expresi CAV1 a snižuje zánět v CF makrofázích. Celecoxib, lék schválený Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv, obnovuje dráhu AKT/miR-199a-5p/CAV1 u CF makrofágů a zmírňuje zánět plic u myši s deficitem CFTR.

Zánětlivá reakce v plicích pacientů s CF je také charakteristická vysokými hladinami proteáz, které se uvolňují z aktivovaných imunitních buněk. Roli hraje např. katepsin S (CTSS). Weldon *et al.* (2014) prokázali roli miR-31 v regulaci exprese CTSS prostřednictvím cílení na transkripční faktor IRF-1 (interferonový regulační faktor 1) v epiteliálních buňkách CF. Zvýšené hodnoty CTSS z bronchoalveolární laváže pacientů s CF korelují se špatnou funkcí plic, kdy CTSS přispívá

k zánětu plic degradací antimikrobiálních proteinů. Hladiny miR-31 byly významně nižší ve vzorcích z bronchiálního kartáčování u pacientů s CF oproti pacientům bez CF.

MiRNA hrají roli také v regulaci exprese proteinu CFTR. V průběhu let bylo prokázáno, že některé miRNA potlačují jeho expresi přímo, např. miR-101 (Megiorni *et al.*, 2011; Hassan *et al.*, 2012; Viart *et al.*, 2015), miR-144 (Hassan *et al.*, 2012), miR-145 (Gillen *et al.*, 2011; Oglesby *et al.*, 2013; Viart *et al.*, 2015), miR-223 (Oglesby *et al.*, 2013), miR-494 (Gillen *et al.*, 2011; Megiorni *et al.*, 2011; Oglesby *et al.*, 2013; Ramachandran *et al.*, 2013), miR-509-3p (Ramachandran *et al.*, 2013) a miR-1246 (Gillen *et al.*, 2011), a jiné ji potlačují nepřímo – miR-9 (Sonneville *et al.*, 2017) a miR-138 (Ramachandran *et al.*, 2013).

V současné době jsou pro profilování miRNA využívány především tři přístupy: kvantitativní reverzně transkripční PCR (qRT-PCR), metody založené na hybridizaci (např. DNA microarray) a RNA sequencing (Pritchard *et al.*, 2012). V rámci této práce byly použité první dvě zmíněné metody a ty budou blíže popsány.

2.4 Microarray

Microarray byla jednou z prvních metod využívaných pro paralelní analýzu velkého počtu miRNA. Jedná se o metodu využívající hybridizace vzorku nukleové kyseliny s velkým počtem oligonukleotidových sond, které jsou imobilizovány k pevnému nosiči – DNA čipu. Bylo vyvinuto několik variant přístupu, včetně fluorescenčního značení miRNA v biologickém vzorku (Pritchard *et al.*, 2012; NCBI, 2021).

miRNA-profilovací experimenty obvykle zahrnují srovnání dvou nebo více skupin, a proto další fází analýzy je obvykle výpočet diferenciální exprese miRNA mezi skupinami. Při provádění těchto výpočtů je důležité vzít v úvahu dynamický rozsah a přesnost kvantifikace platformy. Microarrays miRNA mají obvykle nižší citlivost a dynamický rozsah, a proto se nevyužívají jako platformy kvantitativního rozboru. qRT-PCR má obecně nejširší dynamický rozsah, nejvyšší přesnost a je jedinou metodou, která umožňuje snadnou absolutní kvantifikaci miRNA (Pritchard *et al.*, 2012).

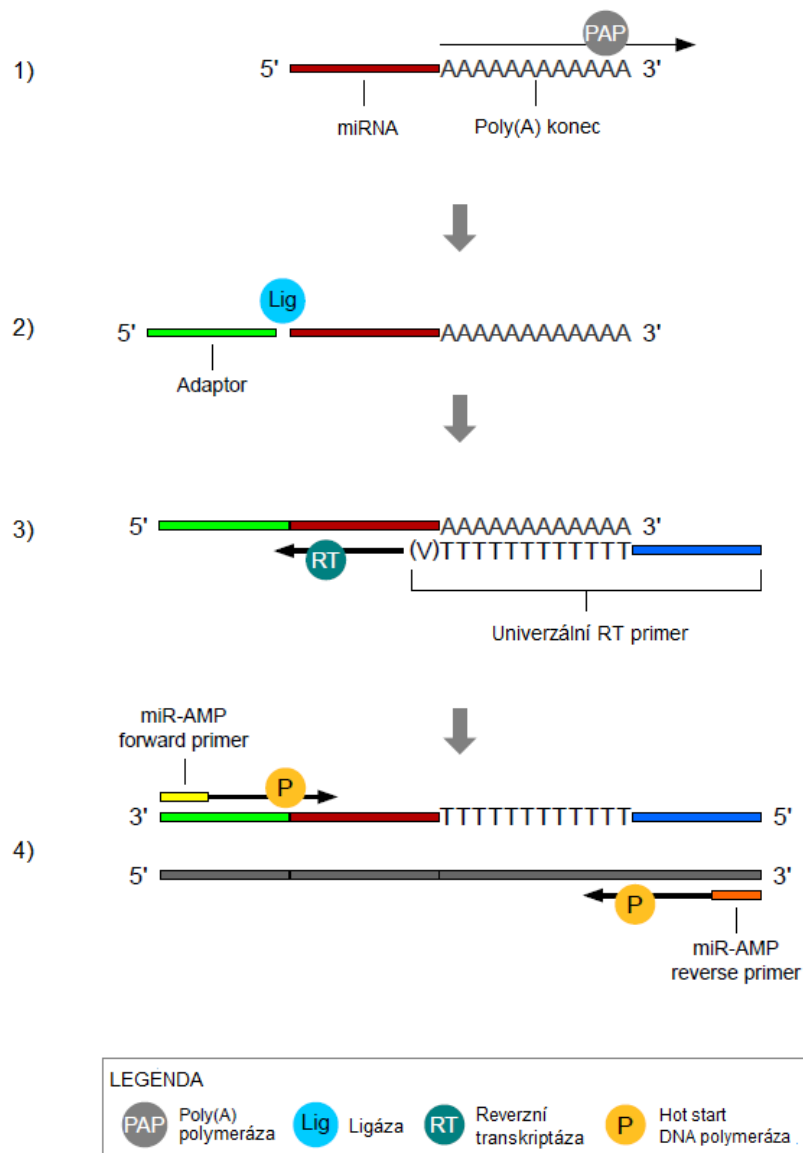
2.5 Kvantitativní RT-PCR (qRT-PCR)

Kvantitativní PCR s reverzní transkripcí (qRT-PCR) je technika, která umožňuje spolehlivou detekci a měření produktů generovaných během každého cyklu PCR reakce. To je umožněno zavedením značené oligonukleotidové sondy navržené k hybridizaci v cílové sekvenci. K detekci

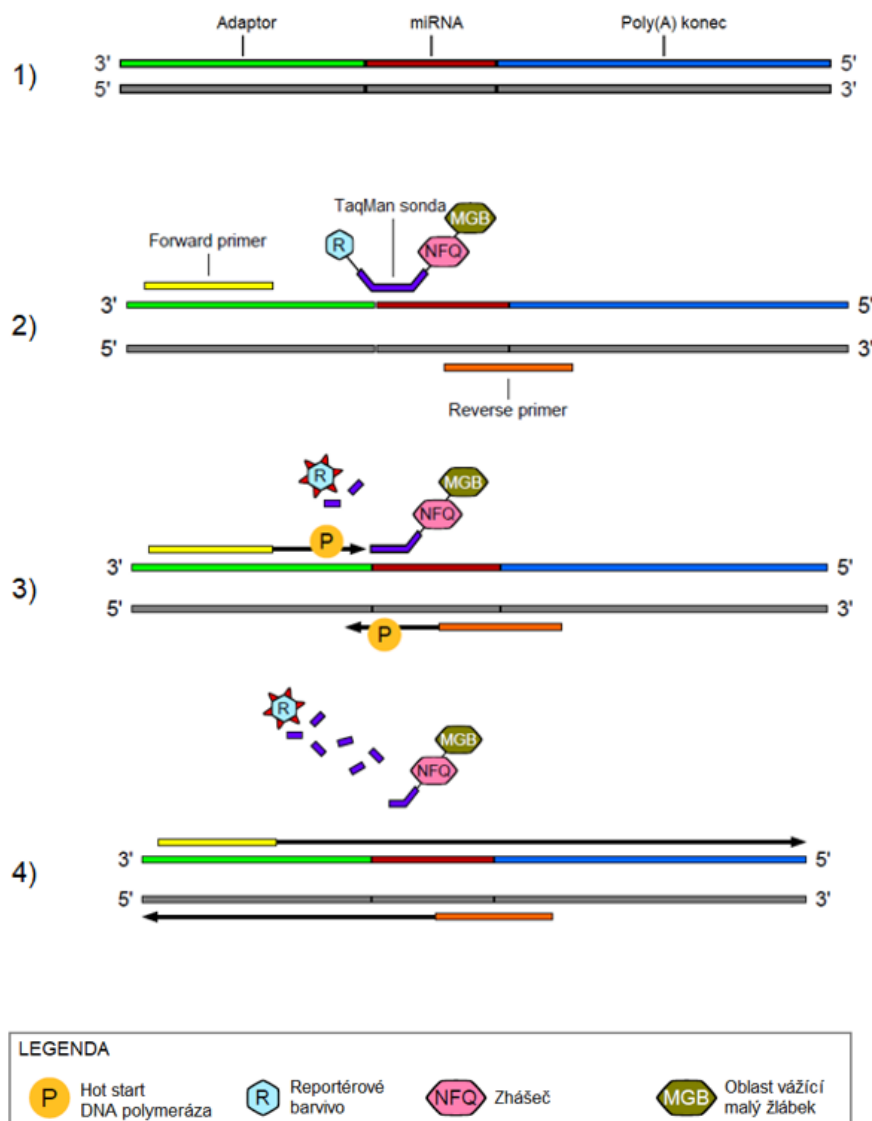
amplifikace produktu se využívá štěpení značené sondy, což je umožněno 5' exonukleázovou aktivitou *TaqDNA* polymerázy. Kvantitativní RT-PCR se využívá k validaci výsledků DNA microarray, dále pro relativní a absolutní kvantifikaci genové exprese, variační analýzu včetně zjišťování a ověřování SNP a také pro zjišťování bakteriální, virové nebo houbové zátěže (Applied BiosystemsTM, 2016; NCBI, 2021).

V našem případě byla pro validaci výsledků DNA microarray využita TaqMan® Advanced miRNA Assays, která se skládá z několika reakcí. Nejprve jsou maturované miRNA z celkové RNA modifikovány polyadenylací na 3' konci a ligací adaptoru na 5' konec, poté procházejí univerzální reverzní transkripcí, čímž jsou převedeny na cDNA. Následuje amplifikace pro rovnoměrné zvýšení množství cDNA odvozených od všech miRNA (reakce miR-Amp). Schéma reakcí je zobrazeno na Obr. 2.

Konečnou reakcí je kvantitativní PCR reakce s využitím TaqMan® MGB sond ke kvantifikaci úrovně exprese vybraných miRNA, schéma viz Obr. 3. TaqMan® MGB sondy se skládají z komplementární sekvence k dané miRNA, z reportérového fluorescenčního barviva na 5' konci a zhášecí na 3' konci, který je tvořen nefluorescenčním barvivem (NFQ), což umožňuje v reálném čase přesnější měření fluorescence reportérového barviva. Sonda je na 3' konci dále tvořena oblastí vážící se do malého žlábků (MGB). Ta zvyšuje teplotu tání bez prodloužení délky sondy a umožňuje tvorbu kratších sond. Pokud je sonda neporušená, zhášecí blokuje emisi fluorescence reportéru. Během polymerace dochází ke štěpení nahybridizovaných sond. Štěpení odděluje reportér od sondy a oddálením reportéru od zhášecí dochází k emisi fluorescence reportérového barviva. Tento proces se opakuje a fluorescence je zaznamenávána v každém cyklu (Applied BiosystemsTM, 2016; NCBI, 2021).



Obrázek 2: Schéma reakcí předcházející kvantitativní PCR. 1) Polyadenylační reakce. Poly(A) polymeráza se používá k přidání 3' adenosinového konce. 2) Ligace adaptoru. K 5' konci molekuly miRNA je ligázou připojen adaptor. 3) Reverzní transkripce. Za využití univerzálního primeru a reverzní transkriptázy dochází k přepsání molekuly miRNA do molekuly cDNA. 4) Amplifikační reakce. Univerzální primery a DNA polymeráza jsou využity pro zvýšení počtu molekul cDNA. (Převzato a upraveno z uživatelské příručky TaqMan® Advanced miRNA Assays, 2016).



Obrázek 3: Schéma kvantitativní PCR reakce. 1) Nasyntetizovaná cDNA skládající se z adaptoru, miRNA a poly(A) konce. 2) Nasednutí forward a reverse primeru, mezi něž nasedá TaqMan sonda na základě komplementarity. 3) Polymeráza svou 5' exonukleázovou aktivitou štěpí 5' konec sondy s navázaným fluoroforem, který emituje fluorescenční záření díky oddálení od zhášeče. 4) Uvolnění sondy a dokončení polymerace. (Převzato a upraveno z uživatelské příručky TaqMan® Advanced miRNA Assays, 2016).

3 Materiál a metody

3.1 Biologický materiál

V praktické části diplomové práce byly využity dva typy biologického materiálu, vzorky plasmy a moči z klinické studie bezpečnosti fenretinidu u 15 dospělých pacientů s cystickou fibrózou. Pacientům byl jednou denně orálně podáván fenretinid (FDR) či placebo po dobu 21 dnů, což představovalo jeden cyklus léčby. Studie zahrnuje tři léčebné cykly s minimálně sedmidenními přestávkami mezi nimi. Vzorky plasmy a moči, které máme k dispozici, byly odebrány během prvního cyklu léčby. Výjimku představují vzorky moči označené “special”, které byly odebrány pacientům 11, 13, 14 a 15 ve druhém nebo třetím cyklu léčby, která navíc nebyla ve všech cyklech stejná. Odběry plasmy proběhly ve čtyřech časových intervalech, před podáním léčby (BSL) po 8 a 24 hodinách a po 21 dnech, odběry moči ve dvou intervalech, před podáním léčby a po 21 dnech. Přehled pacientů a jim odebraných vzorků je zobrazen v Tab. 1.

Tabulka 1: Přehled pacientů s cystickou fibrózou a jim odebraných vzorků plasmy a moči po podání fenretinidu/placeba

Pacienti	Plasma	BSL	Odběry			Moč	Odběry	
			8 hodin	24 hodin	21 dní		BSL	21 dní
1	FDR	PL-1	PL-13	PL-24	PL-36	FDR	1	15
2	FDR	PL-2	PL-14	PL-25	-	FDR	2	-
3	FDR	PL-3	PL-15	PL-26	PL-37	FDR	3	16
4	Placebo	PL-4	PL-16	PL-27	PL-38	Placebo	4	17
5	FDR	PL-5	PL-17	PL-28	PL-39	FDR	5	18
6	FDR	PL-6	-	PL-29	PL-40	FDR	6	19
7	FDR	PL-7	PL-18	PL-30	PL-41	FDR	7	20
8	Placebo	PL-8	PL-19	PL-31	PL-42	Placebo	8	21
9	FDR	PL-9	PL-20	PL-32	PL-43	FDR	9	22
10	FDR	PL-10	PL-21	PL-33	PL-44	FDR	10	23
11	Placebo	PL-11	PL-22	PL-34	PL-45	Special	11	24
12	FDR	PL-12	PL-23	PL-35	PL-46	FDR	12	25
13						Special	13	26
14						Special	14	27
15						Special	-	28

FDR – fenretinid; BSL - base line (odběr před podáním FDR/placeba)

V experimentu byly použity lidské buněčné linie bronchiálního epitelu CFBE41o-, a to jak s CFTR s homozygotní mutací F508del (linie P), tak s wild-type CFTR (linie WT) (Sigma-Aldrich, SCC151). Tyto buněčné linie byly inkubovány s fenretinidem (1,25 μ M) ve čtyřech časových intervalech (6, 24, 48 a 72 hodin). Ve stejných časových intervalech byla ukončena inkubace vzorků kontrolních (bez přidání fenretinidu). Pro každý časový interval a léčbu byly vytvořeny biologické triplikáty (A, B, C). Všechny vzorky byly uchovány ve 250 μ l RNA lateru. Přehled vzorků je uveden v Tab. 2.

Tabulka 2: Přehled vzorků získaných z buněčných linií CFBE41o- inkubovaných s fenretinidem po dobu 6, 24, 48 a 72 hodin

Buněčná linie P							
6 h		24 h		48 h		72 h	
1	-FDR, A	7	-FDR, A	13	-FDR, A	19	-FDR, A
2	-FDR, B	8	-FDR, B	14	-FDR, B	20	-FDR, B
3	-FDR, C	9	-FDR, C	15	-FDR, C	21	-FDR, C
4	+FDR, A	10	+FDR, A	16	+FDR, A	22	+FDR, A
5	+FDR, B	11	+FDR, B	17	+FDR, B	23	+FDR, B
6	+FDR, C	12	+FDR, C	18	+FDR, C	24	+FDR, C
Buněčná linie WT							
6 h		24 h		48 h		72 h	
25	-FDR, A	31	-FDR, A	37	-FDR, A	43	-FDR, A
26	-FDR, B	32	-FDR, B	38	-FDR, B	44	-FDR, B
27	-FDR, C	33	-FDR, C	39	-FDR, C	45	-FDR, C
28	+FDR, A	34	+FDR, A	40	+FDR, A	46	+FDR, A
29	+FDR, B	35	+FDR, B	41	+FDR, B	47	+FDR, B
30	+FDR, C	36	+FDR, C	42	+FDR, C	48	+FDR, C

Buněčná linie P – buněčná linie CFBE41o- s homozygotní mutací F508del

Buněčná linie WT – buněčná linie CFBE41o- s wild-type CFTR

-FDR – kontrola

+FDR – inkubováno s fenretinidem

3.2 Chemikálie, soupravy, roztoky

- Urine microRNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp.)
- miRNase Mini Kit (Qiagen)
- TRIzol™ Reagent (Invitrogen™)

- Chloroform (Serva)
- Ethanol (Serva)
- FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific)
- GeneChip miRNA 4.0 Array (Thermo Fisher Scientific)
- Tris 1 mmol/l o pH 7,4 (Canvax Biotech)
- DEPC-Treated Water (Invitrogen™)
- TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems™)
- Recombinant RNasin ® Ribonuclease Inhibitor (Promega)
- TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems™)
- Buffer TE (Qiagen)
- TaqMan™ Advanced MicroRNA Assays (Applied Biosystems™)
 - hsa-let-7e-5p (Assay ID: 478579_mir)
 - hsa-miR-19b-3p (Assay ID: 478264_mir)
 - hsa-miR-22-3p (Assay ID: 477985_mir)
 - hsa-miR-107 (Assay ID: 478254_mir)
 - hsa-miR-145-3p (Assay ID: 477915_mir)
 - hsa-miR-324-5p (Assay ID: 483066_mir)
 - hsa-miR-376c-5p (Assay ID: 478862_mir)
 - hsa-miR-335-3p (Assay ID: 478033_mir)
 - hsa-miR-518c-3p (Assay ID: 478982_mir)
 - hsa-miR-676-3p (Assay ID: 479470_mir)
 - hsa-miR-939-5p (Assay ID: 478245_mir)
 - hsa-miR-1252-5p (Assay ID: 478658_mir)
 - hsa-miR-1276 (Assay ID: 478680_mir)
 - hsa-miR-1281 (Assay ID: 478543_mir)
 - hsa-miR-1285-5p (Assay ID: 479565_mir)
 - hsa-miR-3175 (Assay ID: 478816_mir)
 - hsa-miR-6755-3p (Assay ID: 480281_mir)
 - hsa-miR-6794-3p (Assay ID: 480356_mir)
 - hsa-miR-6752-3p (Assay ID: 480276_mir)
 - hsa-miR-6834-5p (Assay ID: 480431_mir)
 - hsa-miR-4738-5p (Assay ID: 479989_mir)
 - hsa-miR-6750-5p (Assay ID: 480274_mir)
 - hsa-miR-6880-3p (Assay ID: 480510_mir)

3.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Laminární box Aura 2000 M.A.C. (BioAir)
- Centrifuga 5804 R (Eppendorf)
- Vortex Genie (Sigma-Aldrich)
- Promývací stanice GeneChip Fluidics Station 450 (Applied Biosystems™)
- Hybridizační pec Affymetrix GeneChip Hybridization Oven 645 (Applied Biosystems™)
- Sken na microarray čipy Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G (Applied Biosystems™)
- Laminární box Herasafe KS (Thermo Scientific)
- Centrifuga miniSpin (Eppendorf)
- Mixer Vortex VX-200CombiC (Labnet)
- Minicentrifuga Gilson (Gilson)
- Mastercycler Nexus (Eppendorf)
- LightCycler® 480 II Instrument II-I (Roche)
- Chladnička (Liebherr)
- Mrazák (Liebherr)

3.4 Použité experimentální postupy

3.4.1 Izolace RNA

Izolace RNA z plasmy

Ze vzorků plasmy byla izolována celková RNA včetně miRNA za využití miRNase Mini Kitu (Qiagen). Postup byl optimalizován.

1. K rozmrazené a promíchané plasmě (500 µl) přidat 5 ml Trizolu.
2. Inkubovat 5 min při pokojové teplotě. Poté vzorky promíchat na vortexu na maximální výkon po dobu 1 min a opět inkubovat 5 min při pokojové teplotě.
3. Vytvořit alikvoty po 1,1 ml. Ke každému alikvotu přidat 220 µl chloroformu a po dobu 15 s vzorky promíchat na vortexu na maximální výkon. Následně 3 min inkubovat při pokojové teplotě a poté centrifugovat 15 min při 12000 g a 4 °C.
4. Vodnou fázi odebrat do 15ml falkony. Přidat 1,5 ml absolutního ethanolu a promíchat.
5. Přenést 700 µl směsi na kolonku se zkumavkou a centrifugovat 15 s při 8100 g. Poté vylít filtrát a zopakovat tento krok do vyčerpání směsi (za využití stejné kolonky).
6. Přidat 700 µl pufru RWT na kolonku a centrifugovat 15 s při 8100 g. Filtrát vylít.

7. Přidat 500 μ l pufru RPE na kolonku a centrifugovat 15 s při 8100 g. Filtrát vylít. Dále přidat dalších 500 μ l pufru RPE a stočit po dobu 2 min při 8100 g. Vylít filtrát.
8. Přenést kolonku na novou 2ml sběrnou zkumavku a centrifugovat na max. rychlost po dobu 1 min.
9. Přenést kolonku na novou 1,5ml sběrnou zkumavku a přidat 30 μ l RNase-free vody. Centrifugovat 1 min při 8100 g. Kolonku vyhodit a filtrát s RNA uschovat v dané zkumavce.

Izolace miRNA z moči

miRNA ze vzorků moči byla izolována za využití Urine microRNA Purification Kitu (Norgen Biotek Corp.)

1. Přenést 1 ml moči do 15ml konické zkumavky. Přidat 1,5 ml lyzačního pufru přímo na moč. Buňky lyzovat na vortexu po dobu 15 s.
2. K lyzátu přidat 1,5 ml absolutního ethanolu. Promíchat na vortexu po dobu 10 s.
3. Sestavit kolonu s jednou z poskytovaných sběrných zkumavek. Na kolonu nanést 650 μ l lyzátu s ethanolem a centrifugovat 1 min při 8000 RPM. Vylít filtrát.
4. Znovu sestavit kolonu a opakovat krok 3, dokud nebude všechen lyzátní nanesen na koloně.
5. Poté na kolonu nanést 400 μ l promývacího roztoku A a centrifugovat 1 min při 14000 RMP. Vylít filtrát, znovu sestavit kolonu a tento krok zopakovat.
6. Centrifugovat prázdnou kolonu po dobu 2 min při 14000 RPM. Vyhodit sběrnou zkumavku.
7. Kolonu přenést na novou 1,7ml eluční zkumavku. Na kolonu nanést 30 μ l elučního roztoku A a centrifugovat 2 min při 2000 RPM. Eluát přenést znova na kolonu a opět centrifugovat 2 min při 2000 RPM. Následně centrifugovat 2 min při 14000 RPM. Kolonu vyhodit.
8. Purifikovaný vzorek RNA může být dlouhodobě skladován při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Izolace RNA z buněčných linií

Z buněčných linií byla izolována celková RNA včetně miRNA za využití miRNase Mini Kitu (Qiagen).

1. Buňky s RNAlaterem stočit 4 min při 5000 RPM a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odstranit supernatant.
2. Přidat 500 μ l 1x PBS a centrifugovat za stejných podmínek jako v kroku 1.
3. Odstranit supernatant a lyzovat buňky v 700 μ l Trizolu. Dále provést izolaci miRNA za využití miRNase Mini Kitu (Qiagen).

4. Inkubovat 5 min při pokojové teplotě. Poté vzorky promíchat na vortexu na maximální výkon po dobu 1 min a opět inkubovat 5 min při pokojové teplotě.
5. Centrifugovat 15 min při 12000 g a 4 °C. Odebrat svrchní vodnou fázi do 2ml sběrných zkumavek v množství okolo 350 µl. Následně přidat 520 µl absolutního EtOH a směs několikrát propipetovat.
6. Poté provést kroky 5. – 9. z podkapitoly Izolace miRNA z plasmy.

3.4.2 Microarray

Vzorky miRNA z plasmy, moči a buněčných linií byly nejdříve podrobeny microarray analýze, která byla provedena na čípech GeneChip miRNA 4.0 Array (Thermo Fisher Scientific). Pro značení RNA ve vzorcích před aplikací na čipy byl použit FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific). Postup dle instrukcí výrobce popsán níže.

1. Předehřát pec na 48 °C. Rozpustit izolované vzorky na ledu.
2. Upravit koncentraci izolovaných vzorků RNA pomocí Nuclease-free vody na 130 ng/8 µl v 0,2ml mikrozskumavkách.
3. Přidat 2 µl RNA Spike Control Oligos.
4. Naředit ATP mixu pomocí roztoku Tris o 1 mmol/l v poměru ATP mix:Tris 1:38,5.
5. Připravit polyadenylační reakci dle pokynů výrobce. Inkubovat směs 15 minut při teplotě 37 °C.
6. Připravit ligační reakci podle pokynů výrobce. Inkubovat 30 minut při pokojové teplotě.
7. Připravit hybridizační reakci na čipy GeneChip miRNA 4.0 Array dle pokynů výrobce.
8. Inkubovat čipy v peci po dobu 16–18 hodin při 48 °C a 60 rpm.
9. Vyjmout čipy z pece a odstranit hybridizační směs z čipu pomocí pipety do nových mikrozskumavek. Uchovat hybridizační směsi.
10. Připravit promývací stanici. Naskenovat ID čipů do software Affymetrix GeneChip Command Console.
11. Promýt čipy na promývací stanici dle pokynů výrobce.
12. Vyjmout čipy z promývací stanice a vložit je do skeneru. Naskenování čipů.
13. Upravit skeny čipů pomocí Thermo Fisher Scientific GeneChip CommandConsole software. Export souborů CEL.

Text byl převzat a upraven z Bakalářské práce na téma MiRNA profilování meningiomů (Lausová, 2018).

3.4.3 qRT-PCR s TaqMan sondami

Na základě výsledků z microarray analýzy bylo vybráno 20 miRNA, které byly podrobeny kvantitativní analýze za využití qRT-PCR s TaqMan sondami. Postup dle instrukcí výrobce popsán níže.

Příprava cDNA

Postup přípravy cDNA zahrnuje polyadenylační reakci, ligaci adaptoru a následnou univerzální reverzní transkripci. Poté jsou vzorky podrobeny preamplifikační reakci.

1. Vzorky miRNA převést do cDNA za využití TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit.
2. Připravit Poly(A) reakční mix pro odpovídající počet vzorků dle Tab. 3. Oproti složení směsi uvedené výrobcem se použítá směs liší přidavkem RNasinu.

Tabulka 3: Příprava Poly(A) reakční směsi

Reagencie	Objem na 1 reakci [μl]
10x Poly(A) Pufir	0,50
ATP	0,50
Poly(A) Enzym	0,30
RNase-free water	1,36
RNasin	0,34

3. Do 0,2ml zkumavek přenést 2 μl vzorku a poté 3 μl Poly(A) reakčního mixu. Zkumavky vložit do termocycleru a nastavit program dle výrobce.
4. Okamžitě provést následující reakci – Ligace adaptéru.
5. Připravit odpovídající množství Ligačního reakčního mixu podle pokynů výrobce.
6. Do každé zkumavky obsahující produkt polyadenylační reakce přenést 10 μl ligačního reakčního mixu.
7. Zkumavky vložit do termocycleru a nastavit program dle výrobce.
8. Okamžitě provést reverzní transkripci.
9. Připravit dostatečné množství reakčního mixu pro reverzní transkripci dle pokynů výrobce.
10. Do každé zkumavky obsahující produkt ligační reakce přenést 15 μl reakčního mixu pro reverzní transkripci a zkumavky vložit do termocycleru a nastavit program dle pokynů

výrobce. Následně provést preamplifikační reakci (miR-Amp). (Produkt reverzní transkripce může být skladován při teplotě -20 ° C až po dobu dvou měsíců).

11. Připravit preamplifikační reakční mix pro odpovídající počet reakcí dle Tab. 4.

Tabulka 4: Příprava reakčního mixu pro preamplifikační reakci

Chemikálie	Objem na jednu reakci [μl]
2X miR-Amp Master Mix	25
20X miR-Amp Primer Mix	2,5
RNase-free water	17,5

12. Přenést 45 μl reakčního mixu do nových zkumavek a do každé zkumavky přidat 5 μl produktu reverzní transkripce.
13. Zkumavky vložit do termocycleru a nastavit program dle pokynů výrobce.
14. Pokračovat provedením kvantitativní PCR reakce. Neředěný reakční produkt miR-Amp lze skladovat při teplotě -20 ° C po dobu až 2 měsíců.

Kvantitativní PCR reakce

Kvantitativní PCR reakce byla provedena za využití sond TaqMan Advanced miRNA Assay a PCR směsi TaqMan Fast Advanced Master Mix. Postup dle pokynů výrobce je uveden níže.

1. Postup byl optimalizován, vzorky cDNA byly pro potřeby kvantitativní PCR reakce ředěny v různém poměru s TE pufrem na základě použité sondy (Tab. 5).

Tabulka 5: Ředění vzorků cDNA s TE pufrem v závislosti na použité sondě

Ředění	miRNA sonda
1:1	hsa-let-7e-5p, hsa-miR-145-3p, hsa-miR-335-3p, hsa-miR-518c-3p, hsa-miR-939-5p, hsa-miR-1285-5p
1:4	hsa-miR-19b-3p
1:9	hsa-miR-22-3p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-676-3p, hsa-miR-1252-5p, hsa-miR-1276, hsa-miR-1281, hsa-miR-3175, hsa-miR-4738-5p, hsa-miR-6755-3p, hsa-miR-6794-3p, hsa-miR-6752-3p, hsa-miR-6834-5p, hsa-miR-6750-5p, hsa-miR-6880-3p hsa-miR-107, hsa-miR-324-5p

2. Připravit PCR reakční mix pro odpovídající počet reakcí dle Tab. 6. Oproti složení směsi uvedené výrobcem použít poloviční množství.

Tabulka 6: Příprava PCR reakčního mixu

Chemikálie	Objem na jednu reakci [μl]
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)	5,0
TaqMan® Advanced miRNA Assay (20X)	0,5
RNase-free water	2,0

- Do jednotlivých jamek 96 jamkové desky přenést 7,5 μl PCR reakční směsi. Do každé jamky přidat 2,5 μl zředěného cDNA templátu, propipetovat pro promíchání obsahu a krátce stočit.
- 96 jamkovou desku vložit do termocycleru a nastavit program dle Tab 7.

Tabulka 7: Program termocycleru pro kvantitativní PCR reakci

	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Aktivace enzymu	95	20 s	1
Denaturace	95	10 s	50
Annealing	60	40 s	50
Ukončení	37	1 s	1

3.4.4 Zpracování dat

Data získaná z microarray analýzy byla vyhodnocena za využití softwaru R a softwaru Bioconductor. Nejdříve byly hodnoceny parametry kvality vzorků za využití funkce arrayQualityMetrics softwaru Bioconductor. Data získaná ze vzorků plasem a moči pacientů s CF byla následně zpracována za využití Wilcoxonova exaktního jednovýběrového a dvouvýběrového testu. Data získaná z buněčných linií byla zpracována dvouvýběrovým t-testem.

Ct hodnoty jednotlivých vzorků generované PCR analýzou (LightCycler 480®, Roche) byly normalizovány na expresi miR-107, miR-324-5p a miR-19b-3p. Data získaná ze vzorků plasem byla zpracována za využití Wilcoxonova exaktního jednovýběrového a dvouvýběrového testu. Na zpracování dat z buněčných linií byl využit statistický model mixed-effect. Statistické zpracování dat bylo provedeno v softwaru R. Podrobnější informace jsou uvedeny v kapitole Výsledky.

Dynamické změny v expresi miRNA byly hodnoceny metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Nejdříve byla od hodnot Ct vzorků odečtena hodnota Ct příslušné normy, čímž byla získána hodnota ΔCt . Následně byla dle níže uvedeného vzorce porovnána exprese mezi dvěma intervaly léčby/inkubace fenretinidem.

V případě, že je hodnota $\Delta\Delta Ct$ kladná, je exprese dané miRNA v čase 2 nižší než v čase 1.

V případě, že je hodnota $\Delta\Delta Ct$ záporná, je exprese dané miRNA v čase 2 vyšší než v čase 1.

$\Delta Ct (n)$... normalizovaná hodnota Ct v čase 1

$\Delta Ct (t)$... normalizovaná hodnota Ct v čase 2

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (t) - \Delta Ct (n)$

$FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$... převod $\Delta\Delta Ct$ hodnoty na relativní změnu exprese (fold-change)

4 Výsledky

Vzorky miRNA izolované z buněčných linií CFBE41o- a ze vzorků plasmy a moči pacientů s CF byly podrobeny molekulárně biologické analýze exprese miRNA za využití metod microarray a qRT-PCR.

4.1 Microarray analýza

Nejprve proběhla microarray analýza vzorků miRNA izolovaných z plasmy, moči a z buněčných linií CFBE41o-.

Microarray analýza byla provedena na 32 vzorcích miRNA izolovaných z plasmy osmi pacientů s CF. Do analýzy byly zařazeny vzorky plasem pacientů, od nichž máme k dispozici vzorky z prvního a z posledního odběru. Tomuto kritériu odpovídá pět pacientů léčených fenretinidem (1, 5, 6, 7 a 12) a tři pacienti, kterým bylo podáno placebo (4, 8 a 11). Vzorky PL-9, 10, 22, 32, 37 a 43 byly z microarray analýzy vyřazeny, protože nesplnily parametry kvality provedené softwarem Bioconductor za využití funkce arrayQualityMetrics. Tato funkce vyhodnotí pro každý vzorek tři míry kvality: vzdálenost mezi arrayemi, porovnání distribuce intenzit dané arraye vůči distribuci poolované za využití Kolmogorov-Smirnovovy statistiky a odchylku od mediánů intenzit všech arrayí za využití Hoeffdingovy statistiky. V případě, že byl vzorek označen za odlehlou hodnotu v alespoň dvou ze tří uvedených testů, byl z analýzy vyřazen.

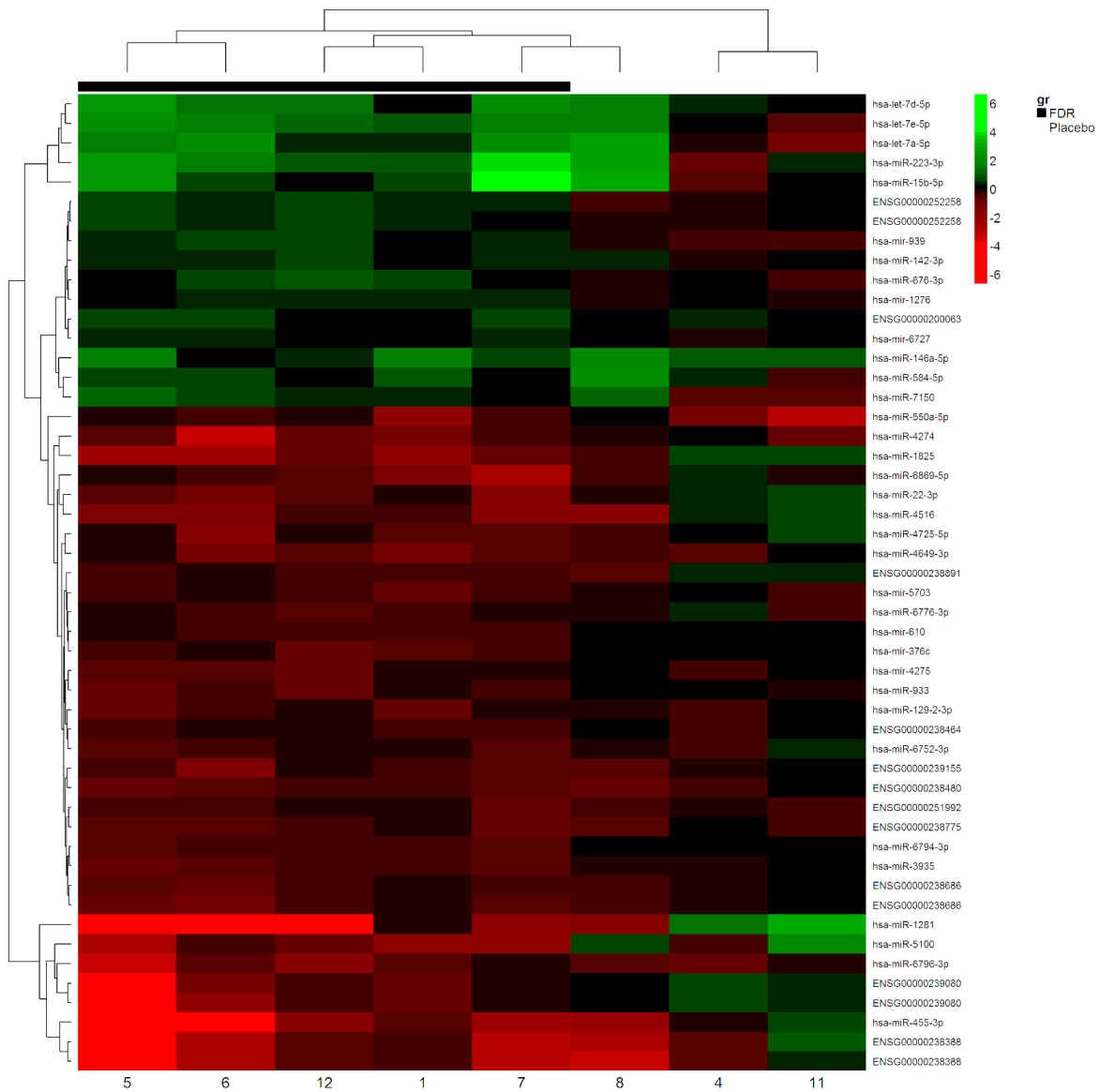
Pro zpracování dat z microarray analýzy byl pro vzorky skupiny FDR (fenretinid) využit Wilcoxonův jednovýběrový exaktní test. Bylo vybráno prvních 50 ncRNA na základě hodnot p-value mezi posledním (D21-den 21) a prvním odběrem (BSL-base-line), které byly seřazeny vzestupně, a na základě absolutní hodnoty mediánu rozdílu exprese mezi D21 a BSL, které byly řazeny sestupně. Na Obr. 4 je zobrazena heat mapa vytvořená na základě uvedených kritérií.

Následně byla data zpracována za využití Wilcoxonova exaktního jednovýběrového testu pro skupinu placebo vzorků a Wilcoxonova exaktního dvouvýběrového testu v případě porovnání významnosti diferencí v čase mezi vzorky FDR a placebo. Heat mapa na Obr. 5 je vytvořena na základě rozdílu v expresi mezi posledním odběrem (D21) a prvním odběrem (BSL) tak, že je vybráno prvních 20 ncRNA seřazených dle nejvyšších p-value jednovýběrového testu pro skupinu placebo. Vybrány jsou jen ty ncRNA, pro které platí:

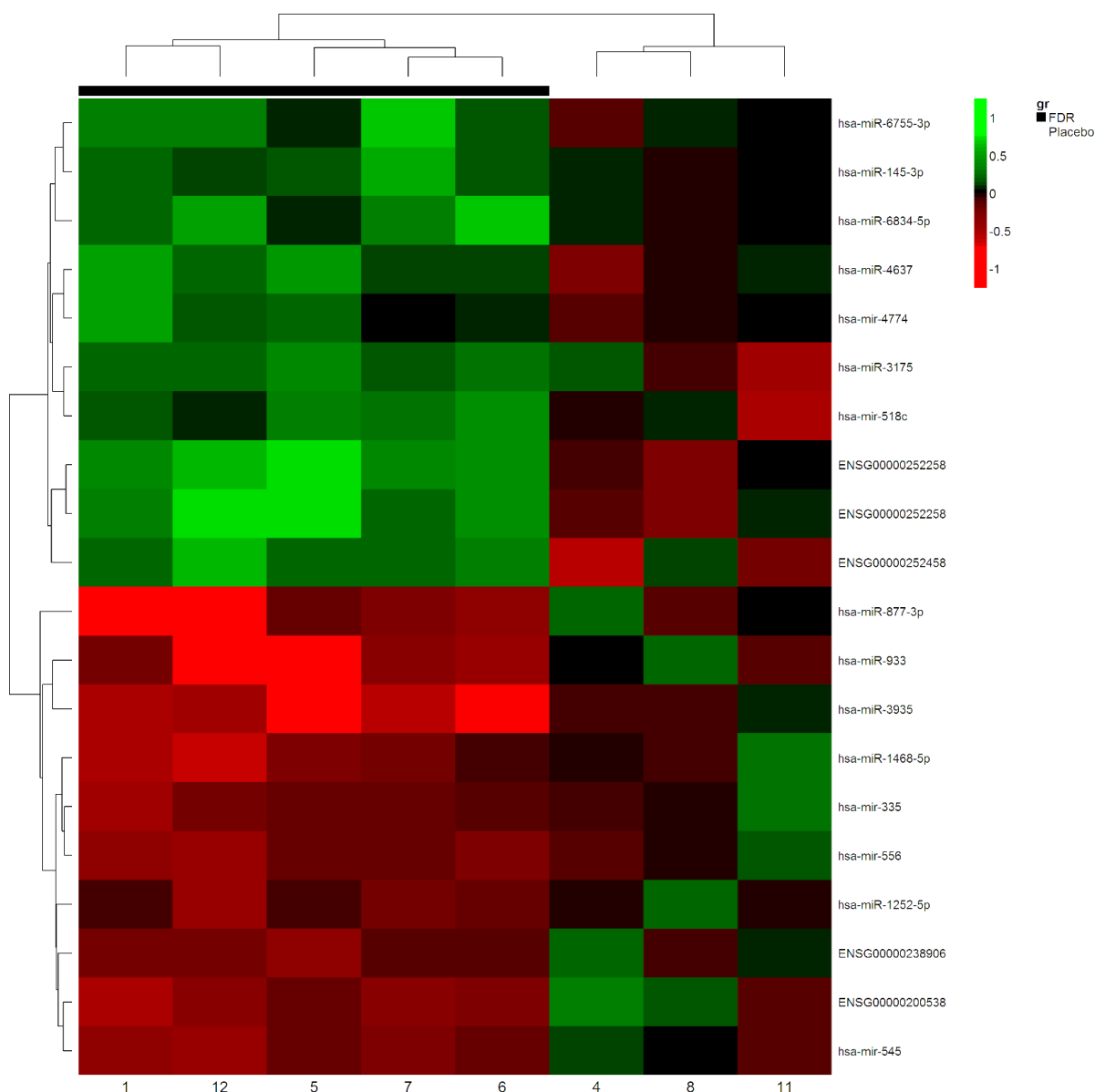
1. Rozdíl exprese mezi posledním dnem a prvním odběrem ve skupině FDR je na hladině významnosti 10 %; p-value (FDR: D21-BSL=0) < 0,1 a současně

2. Rozdíl exprese D21-BSL mezi skupinami FDR a placebo je na hladině významnosti 5 %; p-value (FDR vs. placebo) <0,05

Mezi těmito ncRNA bylo 15 miRNA molekul a 5 molekul malých nukleolárních RNA (snoRNA) (Obr. 5).



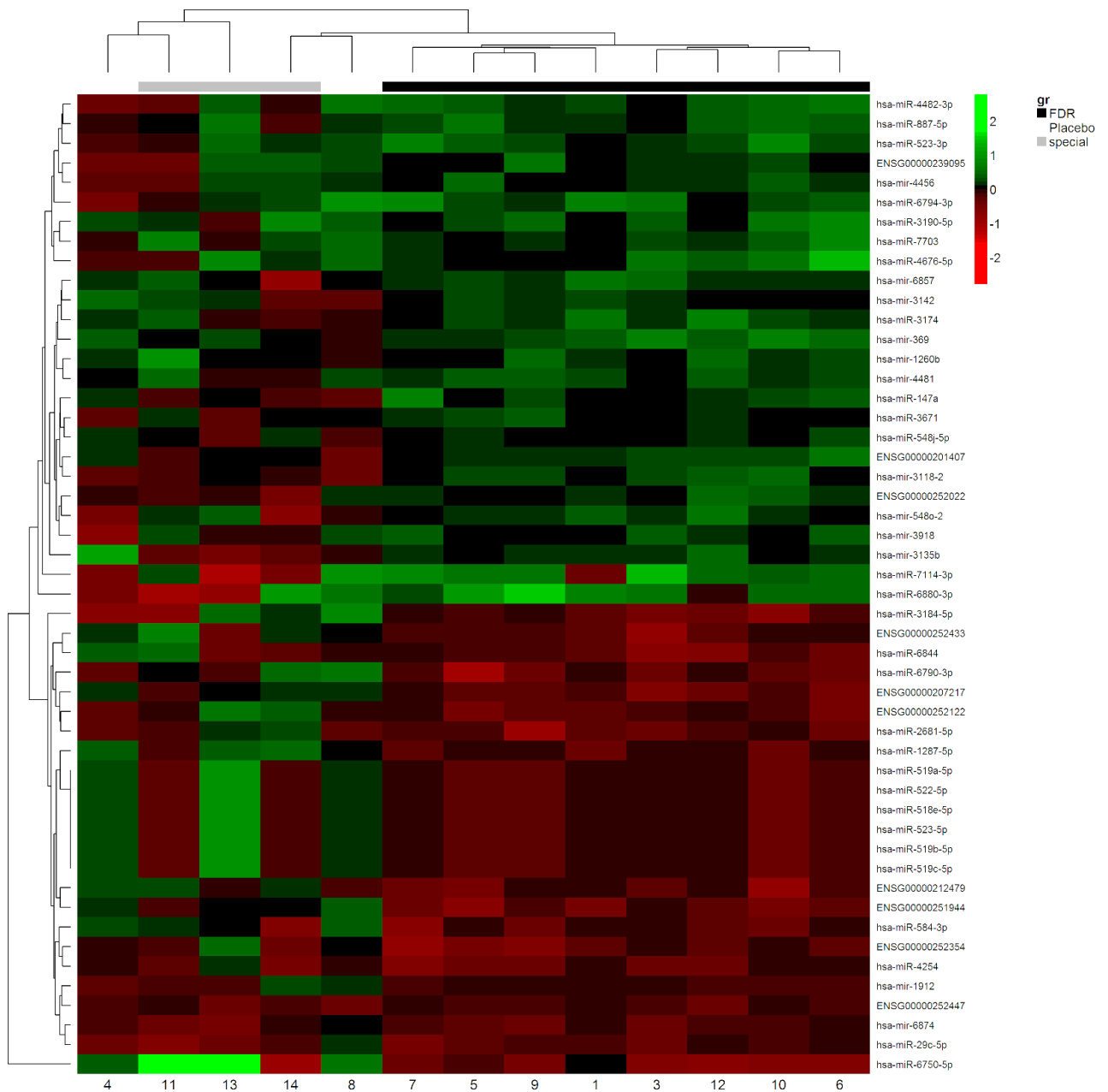
Obrázek 4: Heat mapa znázorňující změnu exprese 35 miRNA a 15 snoRNA získaných z plasem osmi pacientů s CF po podání fenretinidu/placeba. Řádky odpovídají jednotlivým molekulám ncRNA. Sloupce představují pacienty, kterým byl podán fenretinid (černě) a placebo (bez barevného vyznačení). Zelená barva (kladné hodnoty) vypovídá o zvýšené expresi v čase D21 oproti BSL, červená barva (záporné hodnoty) odpovídá snížené expresi v čase D21 oproti BSL



Obrázek 5: Heat mapa znázorňující změnu exprese mezi vzorky před podáním FDR/placeba (BSL–base line) a 21. dnem po podání (D21) u 15 miRNA a 5 snoRNA získaných z plasem osmi pacientů s CF po podání fenretinidu/placeba. Řádky odpovídají jednotlivým molekulám ncRNA. Sloupce představují pacienty, kterým byl podán fenretinid (černě) a kterým bylo podáno placebo (bez barevného vyznačení). Zelená barva (kladné hodnoty) vypovídá o zvýšené expresi v čase D21 oproti BSL, červená barva (záporné hodnoty) odpovídá snížené expresi v čase D21 oproti BSL.

Následně proběhla microarray analýza vzorků miRNA izolovaných z moči pacientů s CF. Pro analýzu byly využity vzorky pacientů, u nichž máme k dispozici oba dva odběry, pacienti 2 a 15 tedy nebyli do microarray analýzy zahrnuti. Celkově bylo microarray analýze podrobena 13 pacientů, z nichž osmi byl podán fenretinid, dvěma placebo a tři patřili do kategorie “special”. Data byla zpracována za využití jednovýběrového exaktního Wilcoxonova testu nulové

diference. Bylo vybráno prvních 50 ncRNA na základě hodnot p-value mezi posledním a prvním odběrem (D21-BSL) ve skupině FDR, které byly seřazeny vzestupně a absolutní hodnoty mediánu rozdílu exprese mezi D21 a BSL ve skupině FDR, které byly řazeny sestupně. Na Obr. 6 je zobrazena heat mapa vytvořená na základě výše uvedených kritérií.



Obrázek 6: Heat mapa znázorňující změnu exprese 40 miRNA a 10 snoRNA získaných z moči 13 pacientů s CF po podání fenretinidu/placeba. Řádky odpovídají jednotlivým molekulám ncRNA. Sloupce představují pacienty, kterým byl podán fenretinid (černě) a placebo (bez barevného vyznačení). Kategorie „special“ je označena šedě. Zelená barva (kladné hodnoty) vypovídá o zvýšené expresi v čase D21 oproti BSL, červená barva (záporné hodnoty) odpovídá snížené expresi v čase D21 oproti BSL.

Jak bylo zmíněno výše, v rámci microarray analýzy vzorků z klinické studie byly zjištěno, že kromě deregulace miRNA došlo také k deregulaci některých malých nukleolárních RNA, jejichž exprese může být ovlivněna transkripčními faktory. Byly proto zkoumány interakce s potenciálními transkripčními faktory, nicméně se nepodařilo najít spojení přímo se snoRNA. Zkoumaly se proto interakce transkripčních faktorů s miRNA. U některých miRNA (miR-22-3p, miR-223-3p, miR-335, miR-646, miR-877-3p, miR-939-5p, miR-3175 a miR-3689a-3p) se podařilo nalézt souvislost s transkripčními faktory: ATF6, E2F1, E2F2, STAT6 a IRF8. Tato data nejsou součástí diplomové práce.

Dále data z microarray analýzy patientských vzorků vypovídají o korelaci změny exprese miRNA s určitými klinickými znaky jako např. s hladinami kyseliny arachidonové a dokosaheptaenové, s množstvím interleukinů a neutrofilů a s hodnotou CRP. Tato data nejsou součástí diplomové práce.

Microarray analýze byly kromě vzorků z klinické studie podrobeny také vzorky miRNA získané z buněčných linií CFBE41o- s homozygotní mutací F508del (buněčná linie P) a bez této mutace (buněčná linie WT). Celkově proběhla microarray analýza 48 vzorků. Nebylo možné vytvořit reprezentativní heat mapu znázorňující rozdílnou expresi molekul miRNA izolovanou z buněčných linií CFBE41o- z důvodu malého množství signifikantních rozdílů v expresi mezi jednotlivými skupinami vzorků. Data byla zpracována za využití dvouvýběrových t-testů pro porovnání skupiny inkubované s fenretinidem vzhledem ke kontrole. Byly vybrány jen miRNA, pro které je adjustovaná hodnota p-value příslušného t-testu na hladině významnosti 10 % ($p\text{-value} < 0,1$). Adjustace hodnot p-value byla provedena metodou Benjamini-Hochberg. Změny exprese miRNA se projeví pouze ve vzorcích získaných z buněčné linie P, na kterou působil fenretinid. Seznam miRNA vybraných na základě výše uvedených kritérií je uveden v Tab. 8.

Data získaná z microarray analýzy vzorků z buněčných linií se překrývají s nálezem v plasmě či moči jen ve dvou případech. Jedná se o miR-7e-5p a miR-6880-5p, které byly deregulovány ve vzorcích z buněčné linie P, která byla vystavena 48 hodinovému působení fenretinidu (FDR). Deregulace první zmíněné miRNA byla zaznamenána při microarray analýze vzorků z plasmy mezi 50 nejvýznamněji deregulovanými miRNA. O částečný překryv se jedná v případě miR-6880-5p. Ve vzorcích získaných z moči pacientů s CF byla zaznamenána deregulace miR-6880-3p mezi 50 nejvýznamněji ovlivněnými miRNA. Jedná se o molekuly, které vznikly z opačného konce stejného prekurzoru.

Tabulka 8: Přehled deregulovaných miRNA izolovaných z buněčných linií P po inkubaci s fenretinidem

miRNA	Působení FDR po dobu [h]
miR-4723-3p	6
miR-25-3p	24
let-7e-5p	48
miR-101-5p	48
miR-132-3p	48
miR-155-5p	48
miR-365b-5p	48
miR-586	48
miR-1251-5p	48
miR-2115-5p	48
miR-3621	48
miR-5189-3p	48
miR-6880-5p	48
miR-8075	48
miR-301b	72

FDR - fenretinid

Na základě dat získaných z microarray analýzy vzorků miRNA a na základě biologické funkce daných miRNA bylo vybráno 20 miRNA pro kvantifikaci pomocí qRT-PCR s TaqMan sondami. Let-7e-5p, miR-335-3p, miR-676-3p, miR-6752-3p a miR-6750-5p byly vybrány z důvodu jejich účasti na biosyntéze mucinu, který je složkou hlenu dýchacích cest, a byly významně deregulovány ve vzorcích pacientů s CF.

MiR-22-3p, miR-3175 a miR-6794-3p se účastní adheze buněk a byly deregulovány v plasmě a moči pacientů s CF. MiR-1252-5p, miR-1276 a miR-6755-3p byly vybrány pro účast na metabolismu lysinu a pro jejich změnu exprese ve vzorcích plasmy pacientů s CF. MiR-145-3p byla vybrána z důvodu interakce s ECM (extracelulární matrix) receptorem a vlivu na chloridový kanál 3. MiR-6834-5p hraje roli v metabolismu glutaminu/glutamátu a reguluje synapse. Obě zmíněné molekuly miRNA byly výrazně deregulovány v plasmě pacientů s CF. Z důvodu změny exprese prekurzorů ve vzorcích plasmy od pacientů s CF byly pro kvantitativní analýzu vybrány miR-376c-5p, miR-518c-3p a miR-939-5p. První zmíněná je spojována s plicní fibrózou,

poslední zmíněná se podílí na vápníkové a hedgehog signalizaci a miR-518c-3p se účastní biosyntézy GPI (glykofosfatidylinositolové) kotvy. MiR-1281 byla do kvantitativní analýzy zařazena na základě změny její exprese ve vzorcích plasmy od pacientů s CF. Tato miRNA je zapojena do biosyntézy folátu a zpracování proteinu v ER. Pro deregulaci ve vzorcích moči pacientů s CF, korelaci s CRP a interakci s receptorem ECM byla vybrána miR-1285-5p. MiR-4738-5p a miR-6880-3p byly vybrány z důvodu změny jejich exprese ve vzorcích moči. Obě dvě se účastní metabolických procesů, první z nich metabolismus glycerofosfolipidů a druhá metabolismu aminokyselin. Přehled vybraných miRNA je uveden v Tab. 9.

Tabulka 9: Seznam miRNA vybraných pro validaci za využití metody qRT-PCR s TaqMan sondami

miRNA	Biologický materiál, ve kterém byla miRNA deregulována:	Biologická role
let-7e-5p	Buněčná linie CFBE41o-; plasma	Biosyntéza mastných kyselin a mucinu; FoxO signální dráha
miR-22-3p	Plasma	Biosyntéza lipidů a glykolipidů; adheze; součást mnoha signálních drah
miR-145-3p	Plasma	Interakce s ECM-receptorem; vliv na chloridový kanál 3
miR-376c-5p	Plasma (deregulovaný prekurzor)	Bázová excisní oprava; spojováno s plicní fibrózou
miR-335-3p	Plasma (deregulovaný prekurzor)	Součást signálních drah- PI3K-Akt, Hippo, ErbB, TGF- β
miR-518c-3p	Plasma (deregulovaný prekurzor)	Biosyntéza GPI kotvy
miR-676-3p	Plasma	Biosyntéza mucinu; adheze; GPI signalizace
miR-939-5p	Plasma (deregulovaný prekurzor)	Vápníková a hedgehog signalizace; glykolýza; cytoskelet
miR-1252-5p	Plasma	Degradace lysinu; metabolismus závislý na CYP P450

Tabulka 9: Pokračování

miRNA	Biologický materiál, ve kterém byla miRNA deregulována:	Biologická role
miR-1276	Plasma	Metabolismus lysinu; mTOR signalizace; GABA synapse
miR-1281	Plasma	Biosyntéza folátu; zpracování proteinů v ER; epiteliální signály
miR-1285-5p	Moč	Koreluje s CRP; interakce receptoru ECM; účast v metabolických dráhách
miR-3175	Plasma	Wnt, Hedgehog a GnRH signalizace; adheze
miR-6755-3p	Plasma	Degradace lysinu; biosyntéza glykosaminoglykanu
miR-6794-3p	Plasma a moč	Různé metabolické dráhy; adheze
miR-6752-3p	Plasma	Interakce receptoru ECM; biosyntéza mucinu; metabolismus glutaminu/glutamátu
miR-6834-5p	Plasma	Metabolismus glutaminu/glutamátu; synapse
miR-4738-5p	Moč	Metabolismus glycerofosfolipidů; signalizace tyroidních hormonů
miR-6750-5p	Moč	Biosyntéza mucinu; signalizace Rap1; adheze; degradace lysinu
miR-6880-3p	Moč	Metabolismus arginine; ornithinu a prolinu; infekce

FoxO – forkhead box O

ECM – extracelulární matrix

PI3K-Akt – fosfatidylinositol-3-kináza/protein kináza B

Hippo signální dráha – regulace buněčné proliferace, řízení růstu a regenerace orgánů (Misra *et* Irvine, 2018)

ErbB – rodina tyrozinkinázových receptorů (Arteaga *et* Engelman, 2014)

TGF- β – transformující růstový faktor β

GPI – glykofosfatidylinositol

Hedgehog signální dráha - vývoj živočichů a homeostázy tkání (Briscoe *et* Thérond, 2013)

mTOR – kináza (mammalian target of rapamycin)

GABA – kyselina γ -aminomáselná

ER – endoplasmatické retikulum

CRP – C-reaktivní protein

Wnt – Wingless-related integration site

GnRH – gonadotropin uvolňující hormon

Rap1 – Ras-related protein 1

4.2 qRT-PCR analýza

Vzorky miRNA izolované z plasem a buněčných linií CFBE41o- byly využity pro kvantitativní stanovení 20 miRNA vybraných na základě výsledků microarray a biologické funkce. Z důvodu nedostatku biologického materiálu nebyly do qRT-PCR analýzy zařazeny tyto vzorky plasem: PL-8, 9, 12, 13, 24, 27, 29, 30, 33, 34, 35 a vzorek 42 získaný z buněčných linií. Analýza byla provedena za využití sond TaqManTM Advanced MicroRNA Assays. Výsledky byly normalizovány na miR-107, miR-324-5p a miR-19b-3p.

Z vybraných 20 miRNA poskytovalo hodnotitelná data devět miRNA: let-7e-5p, miR-22-3p, miR-145-3p, miR-335-3p, miR-518c-3p, miR-676-3p, miR-939-5p, miR-1281 a miR-1285-5p. U ostatních miRNA byla exprese zcela minimální nebo nulová, proto byly z další analýzy vyřazeny.

Každý vzorek získaný z plasem byl testován v dubletu. Nejprve byla data dubletů zprůměrována a následně normalizována na miR-107, která se v analýze vzorků plasem ukázala jako nejstabilnější. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány za využití jednovýběrového Wilcoxonova testu diferencí mezi jednotlivými časy odběru. Testovali jsme, zda se ΔC_t hodnoty v odběrových časech významně liší mezi vzorky pacientů léčených FDR nebo placebem. Následně byl proveden dvouvýběrový Wilcoxonův test rozdílů ΔC_t hodnot v příslušných časových intervalech mezi skupinou placebo a FDR.

Statisticky významné rozdíly byly pozorovány v expresi dvou miRNA, miR-22-3p a miR-1281 (Tab. 10). U obou byly zjištěny signifikantní rozdíly v expresi mezi druhým a posledním odběrem ve skupině vzorků pacientů léčených fenretinidem. V případě miR-22-3p byl pozorován stejný trend také v expresi mezi prvním (BSL) a posledním odběrem (D21). Ve všech třech případech byla exprese miRNA v posledním odběru nižší než v odběrech dřívějších. Při porovnání exprese těchto miRNA mezi skupinami léčenými placebem a FDR však nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly. Další výsledky nebyly hodnotitelné z důvodu malého počtu měření.

Tabulka 10: Výsledky Wilcoxonova testu diferencí mezi jednotlivými časy odběru pro skupinu placebo/FDR a jejich porovnání za využití normy miR-107

miRNA	Skupina vzorků	8h_BSL	24h_BSL	D21_BSL	24h_8h	D21_8h	D21_24h
miR-22-3p	Placebo (n)	2	0	2	1	3	1
	FDR (n)	5	3	6	4	6	3
	Placebo (pV)	0,500	NA	0,500	NA	0,250	NA
	FDR (pV)	0,063	0,500	0,031	0,625	0,031	0,250
	pV	0,095	NA	0,429	NA	0,262	NA
miR-1281	Placebo n	2	0	2	1	3	1
	FDR n	5	3	6	4	6	3
	Placebo (pV)	1,000	NA	0,500	NA	0,250	NA
	FDR (pV)	0,813	1,000	0,156	0,625	0,031	0,500
	pV	0,857	NA	0,429	NA	0,262	NA

Tučně jsou zvýrazněny statisticky významné hodnoty p-value (nižší než 0,05)

BSL – base-line

FDR – fenretinid

Placebo (n)/FDR (n) – počet pacientů, od kterých máme k dispozici vzorky po/před podáním fenretinidu/placeba

Placebo (pV)/FDR (pV) – hodnota p-value jednovýběrového Wilcoxonova testu pro placebo/FDR skupinu v daných časech

pV – hodnota p-value dvouvýběrového Wilcoxonova testu porovnání mezi skupinou placebo a fenretinidu v daných časech

NA – neanalyzováno z důvodu malého počtu měření

Na zpracování dat z buněčných linií byl využit mixed-effect statistický model. Pro oba typy buněčných linií (zvlášť P a zvlášť WT) a každý časový interval (6, 24, 48 a 72 h) se fitoval model se smíšenými efekty, kde je fixovaným efektem léčba (tedy zda na linii působil fenretinid či nikoliv) a náhodným efektem je vzorek. I v tomto případě byl každý vzorek testován v dubletu (jednotlivé vzorky byly na začátku celé analýzy připraveny v triplikátech a každý z těchto vzorků byl v rámci kvantitativní PCR analýzy testován dvakrát).

Data z buněčných linií byla normalizována k miR-19b-3p, která vykazovala stabilní expresi v rámci celého experimentu. Hodnotitelná data poskytlo pět miRNA z vybraných devíti a to let-7e-5p, miR-22-3p, miR-335-3p, miR-1281 a miR-1285-5p. V rámci každé buněčné linie (zvlášť P a WT) byly porovnávány vzorky po působení fenretinidu a kontrolní vzorky ve čtyřech časových intervalech (Tab. 11). U všech miRNA byla u linií P zaznamenána statisticky významná

změna exprese po 72hodinovém působení fenretinidu. Pro miR-335-3p byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v expresi také v kratších časových intervalech (24 a 48 hodin). Níže jsou uvedeny výsledky statistické analýzy změny exprese tří miRNA. MiR-22-3p a miR-1281 vykazovaly změnu exprese také ve vzorcích patientské plasmy a miR-335-3p vykazovala signifikantní změny exprese v buněčné linii P.

Tabulka 11: Rozdíl exprese vybraných miRNA mezi vzorky inkubovanými s fenretinidem a kontrolními vzorky v buněčných liniích CFBE41o-

miRNA	Doba inkubace	P	WT
miR-22-3p	6	0,797	0,586
	24	0,082	0,432
	48	0,483	0,335
	72	0,005	0,243
miR-335-3p	6	0,912	0,184
	24	0,046	0,004
	48	0,042	0,109
	72	4,13 · 10⁻⁵	0,183
miR-1281	6	0,770	0,018
	24	0,471	0,072
	48	0,688	0,124
	72	5,88 · 10⁻⁶	0,219

Tučně jsou zvýrazněny statisticky významné hodnoty p-value (nižší než 0,05)

P – buněčná linie CFBE41o- s CFTR s homozygotní mutací F508del

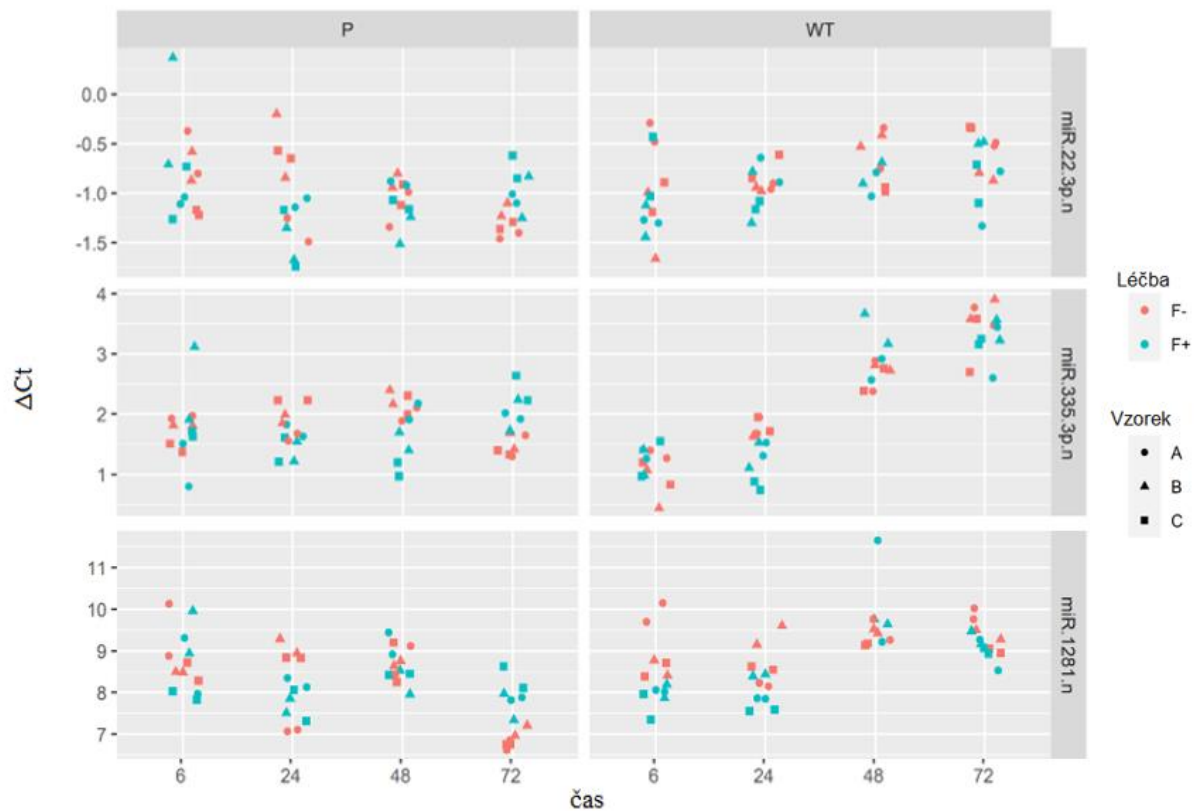
WT – buněčná linie CFBE41o- s wild-type CFTR

Expres miR-22-3p byla v buněčné linii P a WT zvýšená (Obr. 7). Rozdíl v expresi miR-22-3p v buněčné linii P mezi vzorky po působení fenretinidu a kontrolními vzorky kolísal v závislosti na čase. Nejvýznamnější rozdíl byl pozorován v čase 72 h. V buněčné linii WT se změna exprese miRNA mezi vzorky, které byly vystaveny působení fenretinidu, a vzorky kontrolními neprojevila.

MiR-335-3p byla v obou buněčných liniích snížena exprimována. Dále byl pozorován narůstající rozdíl v expresi miRNA-335-3p v buněčné linii P mezi vzorky inkubovanými s fenretinidem a bez fenretinidu v závislosti na čase. V buněčné linii WT je změna exprese miRNA v čase větší, nicméně vždy klesá exprese (narůstá ΔCt) obou typů vzorků, kontrolních i těch po působení

fenretinidu. Při analýze vzorků plasmy pacientů s CF nebyly změny exprese této miRNA statisticky významné.

Expese miR-1281 je ve vzorcích z obou buněčných linií snížena. V buněčné linii P expese této miRNA roste v čase nezávisle na inkubaci s fenretinidem. Statisticky významný rozdíl v expresi mezi vzorky inkubovanými s fenretinidem a bez fenretinidu se projevil v čase 72 h. V buněčné linii WT je trend změny exprese miR-1281 opačný, v závislosti na čase klesá.



Obrázek 7: Hodnoty exprese vybraných miRNA (ΔCt) vzorků buněčných linií P (nesoucí homozygotní mutaci F508del) a WT (wild-type) v časových intervalech inkubace s fenretinidem a bez fenretinidu. Modře jsou znázorněny vzorky, které byly inkubovány s fenretinidem a oranžově vzorky kontrolní. Jednotlivé triplikáty znázorněny geometricky.

5 Diskuze

Cystická fibróza (CF) je nejčastější autozomálně recesivně dědičné onemocnění v kavkazské populaci. Příčinou vzniku onemocnění je mutace genu *CFTR*, který kóduje chloridový kanál na povrchu epitelálních buněk (Davies *et al.*, 2007; Ratjen *et al.*, 2015). CF je multiorgánovým onemocněním postihujícím plíce, játra, pankreas, gastrointestinální a reprodukční trakt (De Boeck *et al.*, 2011; Kerem *et Kerem*, 2017; Peterson *et al.*, 2003; Ratjen *et Döring*, 2003). Bylo zjištěno, že na patofyziologii CF se podílejí také miRNA, které hrají roli v regulaci exprese proteinu CFTR a tedy ve změně iontové vodivosti, regulují vrozenou imunitu a zánětlivé reakce (De Palma *et al.*, 2020). Předmětem výzkumu vývoje nových léčiv cystické fibrózy je v posledních letech také syntetický analog vitamínu A – fenretinid (FDR). V modelech CF byla prokázána jeho role v normalizaci hladiny ceramidů, ve stabilizaci poměru kyseliny dokosahexaenové a kyseliny arachidonové a v ovlivnění hladin zánětlivých molekul (Guilbault *et al.*, 2008; Guilbault *et al.*, 2009; Lachance *et al.*, 2013). Cílem diplomové práce bylo objasnit vliv fenretinidu na dráhy miRNA v modelech cystické fibrózy.

Působením fenretinidu na hladiny miRNA se již zabývali např. Kutty *et. al.* (2010), kteří detekovali zvýšenou expresi miRNA-9 v buňkách lidského retinálního pigmentového epitelu (ARPE-19) po podání fenretinidu. Dále Yücel *et Sahin* (2020) popsali roli fenretinidu při potlačení miR-10b, která se podílí na snížení angiogeneze v buněčné linii lidských endoteliálních buněk odvozených z pupečnickové žíly (HUVEC). Působení fenretinidu na hladiny miRNA v buněčných modelech cystické fibrózy dosud nebylo zkoumáno.

V předkládané diplomové práci byla nejprve provedena microarray analýza vzorků plasmy a moči pacientů s CF a vzorků buněčných linií CFBE41o- s CFTR s homozygotní mutací F508del a s wild-type CFTR. Na základě dat získaných z microarray analýzy a jejich biologické role bylo vybráno 20 miRNA pro validaci za využití kvantitativní RT-PCR. Bylo pozorováno statisticky významné snížení exprese miR-22-3p a miR-1281 v plasmě pacientů s CF léčených fenretinidem. U pacientů, kterým bylo podáno placebo, statisticky významné změny pozorovány nebyly. Vzorky moči pacientů s CF nebyly z důvodu nedostatečného množství materiálu podrobeny kvantitativní RT-PCR analýze.

V další části diplomové práce byla pozorována statisticky významná změna exprese let-7e-5p, miR-22-3p, miR-335-3p, miR-1281 a miR-1285-5p ve vzorcích buněčné linie nesoucích homozygotní mutaci F508del inkubovaných s fenretinidem. Při podrobné analýze však

vykazovaly miR-22-3p, miR-335-3p a miR-1281 rozdílné trendy v expresi mezi vzorky inkubovanými s fenretinidem a vzorky kontrolními, stejně jako mezi vzorky linie P a WT. Ze získaných dat nelze vyhodnotit jednoznačný závěr.

Žádná z tří uvedených miRNA, miR-22-3p, miR-335-3p a miR-1281, dosud nebyla v literatuře popsána v souvislosti s cystickou fibrózou. Studie Gu W. *et al.* odhalila, že nadměrná exprese miR-22 v endoteliálních buňkách zvyšuje syntézu prozánětlivých cytokinů. Tento nálezn byl potvrzen za využití buněčné linie HUVEC a ověřen *in vivo* v C57BL/6 myších. Zhang *et al.* (2020) popsali v lidských ektopických endometriálních stromálních buňkách zvýšenou expresi miR-22-3p, která vedla k nárůstu buněčné proliferace a migrace. Studie ukázala, že se miR-22-3p váže na SIRT1 mRNA, čímž snižuje expresi genu *SIRT1*. Dle studie Kauppinen *et al.* (2013) SIRT1 stimuluje produkci oxidační energie a současně inhibuje signalizaci NF- κ B a potlačuje tak zánět. Signální dráha NF- κ B je hlavním mediátorem vrozené imunity, zatímco *SIRT1* je důležitým regulátorem energetického metabolismu a buněčného přežití. Inhibice SIRT1 tedy vede k narušení metabolismu oxidační energie a stimuluje zánětlivé reakce vyvolané NF- κ B přítomné v mnoha chronických, metabolických a s věkem souvisejících onemocněních. V naší práci jsme u pacientů s CF léčených fenretinidem pozorovali snížení exprese miR-22-3p, což by dle uvedených studií mohlo přispívat k potlačení zánětu přítomného u nemocných s CF.

Studie Muralidharan *et al.* (2017) zaznamenala zvýšenou expresi miR-1281 v moči a v plasmě pacientů s chronickým onemocněním ledvin se sníženou odhadovanou glomerulární filtrací a zmínila její roli v signálních drahách BMP (kostní morfogenetický protein) a TGF β (transformující růstový faktor β). TGF- β je pleiotropní cytokin se silnou regulační a zánětlivou aktivitou a BMP se podílí na zánětlivých procesech mnoha onemocnění jako např. aterosklerózy či revmatoidní artritidy (Sanjabi *et al.*, 2009, Wu *et Hatzopoulos*, 2019). Studie Greco *et al.* (2020) prokázala pozitivní regulaci exprese proteinu VEGFA (vaskulární endoteliální růstový faktor A) aktivací transkripce genu *VEGFA* prostřednictvím miR-1281 v buněčné linii HUVEC. VEGF je mediátorem angiogeneze a zánětu, což jsou úzce integrované procesy v řadě fyziologických stavů a onemocnění, včetně revmatoidní artritidy, obezity, aterosklerózy, psoriázy a nádorů (Shaik-Dasthagirisahab *et al.*, 2013). Je tedy možné, že se miR-1281 podílí na zánětlivé etiologii CF. Naše výsledky popisují snížení hladin miR-1281 u pacientů s CF po léčbě fenretinidem, což by opět mohlo naznačovat jeho protizánětlivý účinek.

Studie Tamanini *et al.* (2021) popsala zvýšení exprese CFTR scaffoldového proteinu NHERF1 prostřednictvím peptidové nukleové kyseliny (PNA), která inhibuje miR-335-5p v bronchiálních epitelálních buňkách Calu-3. Současně působením PNA na buňky Calu-3 došlo ke zvýšení exprese proteinu CFTR. Autoři studie navrhnou cílení na miR-335-5p jako strategii ke zvýšení hladin proteinu CFTR. Na druhou stranu studie Gao *et al.* (2018) potvrzuje schopnost miR-335-5p potlačovat zánětlivou odpověď negativní regulací syntázy mastných kyselin v myším modelu sepse. V naší práci jsme v buněčných liniích pozorovali změny exprese miR-335-3p, tedy miRNA, která vznikla z opačného konce stejného prekurzoru. Nicméně změna exprese nevykazovala v čase stejný trend. Navíc exprese této miRNA nebyla významně změněna ve vzorcích plasmy pacientů s CF.

Vliv fenretinidu na expresi miRNA u pacientů s CF dosud nebyl v literatuře popsán. Dle studie Shishodia *et al.* (2005) fenretinid potlačuje aktivaci NF- κ B indukovanou mnoha látkami jako např. tumor nekrotizujícím faktorem nebo peroxidem vodíku. Námí popsané snížení exprese miR-22-3p by mohlo být dalším mechanismem inhibice signální dráhy NF- κ B, které vede k potlačení zánětlivé odpovědi.

Studie Eaton (2010) popsala snížení exprese VEGF v lidské buněčné kultuře RPE (retinální pigmentový epitel) v reakci na oxidační stres po předběžné léčbě fenretinidem a snížení exprese VEGF bylo popsáno také v modelu hyperglykemických myší po 30denním podávání fenretinidu. V naší práci jsme v plasmě pacientů s CF léčených fenretinidem detekovali snížené hladiny miR-1281, která pozitivně reguluje expresi proteinu VEGFA. Je tedy možné, že protizánětlivé působení fenretinidu je dáno také ovlivněním signální dráhy VEGF prostřednictvím miR-1281.

6 Závěr

Cílem předkládané diplomové práce bylo popsat vliv fenretinidu na dráhy miRNA, které se podílejí na patofyziologii cystické fibrózy. S využitím microarray analýzy bylo identifikováno 20 kandidátních miRNA, které byly následně validovány pomocí kvantitativní RT-PCR analýzy s TaqMan sondami. Dvě miRNA, miR-22-3p a miR-1281, jsou potenciálním biomarkerem protizánětlivého efektu fenretinidu v léčbě cystické fibrózy.

7 Literatura

Amaral M. D. (2015): Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *Journal of Internal Medicine*. 277(2), 155–166

Amaral M. D., Kunzelmann K. (2007): Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends in Pharmacological Sciences*. 28(7), 334–341

Ambros V., Bartel B., Bartel D. P., Burge C. B., Carrington J. C., Chen X., Dreyfuss G., Eddy S. R., Griffiths-Jones S., Marshall M., Matzke M., Ruvkun G., Tuschl T. (2003): A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 9(3), 277–279

Anderson M., Welsh M. (1992): Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains. *Science*. 257(5077), 1701–1704

Applied Biosystems™ (2016): Uživatelská příručka: TaqMan® Advanced miRNA Assays. kat. č.: A25576, č. publikace: 100027897, revize C

Arteaga C. L., Engelman J. A. (2014): ERBB Receptors: From Oncogene Discovery to Basic Science to Mechanism-Based Cancer Therapeutics. *Cancer Cell*. 25(3), 282–303

Bardin P., Marchal-Duval E., Sonnevile F., Blouquit-Laye S., Rousselet N., Le Rouzic P., Corvol H., Tabary O. (2018): Small RNA and transcriptome sequencing reveal the role of miR-199a-3p in inflammatory processes in cystic fibrosis airways. *The Journal of Pathology*. 245(4), 410–420

Bartel D. P. (2004): MicroRNAs. *Cell*. 116(2), 281–29

Bartke N., Hannun Y. A. (2009): Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of Lipid Research*. 50(Supplement), S91–S96

Bhattacharyya S., Balakathiresan N. S., Dalgard C., Gutti U., Armistead D., Jozwik C., Srivastava M., Pollard H. B., Biswas R. (2011): Elevated miR-155 Promotes Inflammation in Cystic Fibrosis by Driving Hyperexpression of Interleukin-8. *Journal of Biological Chemistry*. 286(13), 11604–11615

Bohnsack M. T. (2004): Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 10(2), 185–191

- Bozoky Z., Krzeminski M., Chong P. A., Forman-Kay J. D. (2013): Structural changes of CFTR R region upon phosphorylation: a plastic platform for intramolecular and intermolecular interactions. *The FEBS Journal*. 280(18), 4407–4416
- Briscoe J., Théron, P. (2013): The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 14, 416–429
- Carter A. B., Monick M. M., Hunninghake G. W. (1999): Both Erk and p38 Kinases Are Necessary for Cytokine Gene Transcription. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 20(4), 751–758
- Carthew R. W., Sontheimer E. J. (2009): Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 36(4), 642–655
- Cohen-Cymbberknoh M., Shoseyov D., Kerem E. (2011): Managing Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 183(11), 1463–1471
- Cohn J. A., Friedman K. J., Noone P. G., Knowles M. R., Silverman L. M., Jowell P. S. (1998): Relation between Mutations of the Cystic Fibrosis Gene and Idiopathic Pancreatitis. *New England Journal of Medicine*. 339(10), 653–658
- Corradi V., Vergani P., Tieleman D. P. (2015): Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). *Journal of Biological Chemistry*. 290(38), 22891–22906
- Crystal R. G. (2012): The challenge of using gene- or cell-based therapies to treat lung disease. *Molecular Therapy*. 20(6), 1077–1078
- Cystic fibrosis foundation (CFF) [online] [navštíveno 14. 2. 2021] Dostupné z: <https://www.cff.org/Life-With-CF/Treatments-and-Therapies/Medications/CFTR-Modulator-Therapies/>
- Dalemans W., Barbry P., Champigny G., Jallat S., Dott K., Dreyer D., Crystal R. G., Pavirani A., Lecocq J.-P., Lazdunski M. (1991): Altered chloride ion channel kinetics associated with the $\Delta F508$ cystic fibrosis mutation. *Nature*. 354(6354), 526–528
- Davies J. C., Alton E. W. F. W., Bush A. (2007): Cystic fibrosis. *British Medical Journal*. 335(7632), 1255-1259

De Boeck K., Derichs N., Fajac I., de Jonge H. R., Bronsveld I., Sermet I., Vermeulen F., Sheppard D.N., Cuppens H., Hug M., Melotti P., Middleton P.G., Wilschanski M. (2011): New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *Journal of Cystic Fibrosis*. 10, S53–S66

De Palma F. D. E., Raia V., Kroemer G., Maiuri M. C. (2020): The Multifaceted Roles of MicroRNAs in Cystic Fibrosis. *Diagnostics*. 10(12), 1102

De Rie D., Abugessaisa I., Alam T., Arner E., Arner P., Ashoor H., Åström G., Babina M., Bertin N., Burroughs A. M., Carlisle A. J., Daub C. O., Detmar M., Deviatiiarov R., Fort A., Gebhard C., Goldowitz D., Guhl S., Ha T. J., Harshbarger J., Hasegawa A., Hashimoto K., Herlyn M., Heutink P., Hitchens K. J., Hon C. C., Huang E., Ishizu Y., Kai C., Kasukawa T., Klinken P., Lassmann T., Lecellier C.-H., Lee W., Lizio M., Makeev V., Mathelier A., Medvedeva Y. A., Mejhert N., Mungall C. J., Noma S., Ohshima M., Okada-Hatakeyama M., Persson H., Rizzu P., Roudnický F., Sætrom P., Sato H., Severin J., Shin J. W., Swoboda R. K., Tarui H., Toyoda H., Vitting-Seerup K., Winteringham L., Yamaguchi Y., Yasuzawa K., Yoneda M., Yumoto N., Zabierowski S., Zhang P. G., Wells C. A., Summers K. M., Kawaji H., Sandelin A., Rehli M., Hayashizaki Y., Carninci P., Forrest A. R. R., De Hoon M. J. L. (2017): An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*. 35(9), 872–8

Diederichs S. (2014): Non-coding RNA and disease. *RNA Biology*. 9(6), 701–702

Dodge J. A. (1995): Male fertility in cystic fibrosis. *The Lancet*. 346(8975), 587–588

Donnelley M., Parsons D. W. (2018): Gene Therapy for Cystic Fibrosis Lung Disease: Overcoming the Barriers to Translation to the Clinic. *Frontiers in Pharmacology*. 9, 1381

Drumm M. L., Konstan M. W., Schluchter M. D., Handler A., Pace R., Zou F., Zariwala M., Fargo D., Xu A., Dunn J. M., Darrah R. J., Dorfman R., Sandford A. J., Corey M., Zielenski J., Durie P., Goddard K., Yankaskas J. R., Wright F. A., Knowles M. R. (2005): Genetic Modifiers of Lung Disease in Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 353(14), 1443–1453

Drumm M. L., Wilkinson D. J., Smit L. S., Worrell R. T., Strong T. V., Frizzell R. A., Dawson D. C., Collins F. S. (1991): Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science*. 254:1797–1799

Eaton M. A. (2010): Fenretinide Treatment of Geographic Atrophy in Dry AMD: Preliminary Results. *Retina Today*. 57–58

- Elias S., Mandelboim O. (2012): Battle of the midglets: Innate microRNA Networking. *RNA Biology*. 9(6), 792–8
- Esteller M. (2011): Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*. 12, 861–874
- Eulalio A., Schulte L., Vogel J. (2012): The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA Biology*. 9(6), 742–50
- Fabbri E., Borgatti M., Montagner G., Bianchi N., Finotti A., Lampronti I., Bezzetti V., Dececchi M. C., Cabrini G., Gambari R. (2014): Expression of microRNA-93 and Interleukin-8 during *Pseudomonas aeruginosa* –Mediated Induction of Proinflammatory Responses. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 50(6), 1144–1155
- Fahy E., Subramaniam S., Brown H. A., Glass C. K., Merrill A. H., Murphy R. C., Raetz C. R. H., Russell D. W., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spener F., van Meer G., VanNieuwenhze M. S., White S. H., Witztum J. L., Dennis E. A. (2005): A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*. 46(5), 839–862
- Farinha C. M., Canato S. (2017): From the endoplasmic reticulum to the plasma membrane: mechanisms of CFTR folding and trafficking. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 74(1), 39–55
- Farinha C. M., Matos P., Amaral M. D. (2013): Control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane trafficking: not just from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *FEBS Journal*. 280(18), 4396–4406
- Freedman S. D., Blanco P. G., Zaman M. M., Shea J. C., Ollero M., Hopper I. K., Weed D. A., Gelrud A., Regan M. M., Laposata M., Alvarez J. G., O'Sullivan B. P. (2004): Association of Cystic Fibrosis with Abnormalities in Fatty Acid Metabolism. *New England Journal of Medicine*. 350(6), 560–569
- Fried M. D., Durie P. R., Tsui L. C., Corey M., Levison H., Pencharz P. B. (1991): The cystic fibrosis gene and resting energy expenditure. *The Journal of Pediatrics*. 119 (6), 913–916
- Gadsby D. C., Vergani P., Csanády L. (2006): The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*. 440(7083), 477–483
- Gao X.-L., Li J.-Q., Dong Y.-T., Cheng E.-J., Gong J.-N., Qin Y.-L., Huang Y.-Q., Yang J.-J., Wang S.-J., An D.-D. (2018): Upregulation of microRNA-335-5p reduces inflammatory responses

by inhibiting FASN through the activation of AMPK/ULK1 signaling pathway in a septic mouse model. *Cytokine*. 110, 466–478

Garić D., De Sanctis J. B., Wojewodka G., Houle D., Cupri S., Abu-Arish A., Hanrahan J. W., Hajduch M., Matouk E., Radzioch D. (2017): Fenretinide differentially modulates the levels of long- and very long-chain ceramides by downregulating Cers5 enzyme: evidence from bench to bedside. *Journal of Molecular Medicine*. 95(10), 1053–1064

Gaspar M. C., Couet W., Olivier J.-C., Pais A. A. C. C., Sousa J. J. S. (2013): Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: a review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 32(10), 1231–1252

Gillen A. E., Gosalia N., Leir S.-H., Harris A. (2011): MicroRNA regulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Biochemical Journal*. 438(1), 25–32

Ginn S. L., Amaya A. K., Alexander I. E., Edelstein M., Abedi M. R. (2018): Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *The Journal of Gene Medicine*. 20(5), e3015

Glasgow A. M. A., De Santi C., Greene C. M. (2018): Non-coding RNA in cystic fibrosis. *Biochemical Society Transactions*. 46(3), 619–630

Gong X., Linsdell P. (2004): Maximization of the rate of chloride conduction in the CFTR channel pore by ion–ion interactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 426(1), 78–82

Grassme H., Jendrossek V., Riehle A., von Kurthy G., Berger J., Schwarz H., Weller M., Kolesnick R., Gulbins E. (2003): Host defense against Pseudomonas aeruginosa requires ceramide-rich membrane rafts. *Nature Medicine*. 9, 322–330

Greco M., Chiefari E., Accattato F., Corigliano D. M., Arcidiacono B., Mirabelli M., Liguori R., Brunetti F. S., Pullano S. A., Scorcìa V., Fiorillo A. S., Foti D. P., Brunetti A. (2020): MicroRNA-1281 as a Novel Circulating Biomarker in Patients With Diabetic Retinopathy. *Frontiers in Endocrinology*. 11, 528

Griesenbach U., Alton E. (2013): Moving forward: cystic fibrosis gene therapy. *Human Molecular Genetics*. 22, R52–R58

Griesenbach U., Davies J. C., Alton E. (2016): Cystic fibrosis gene therapy. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 22(6), 602–609

- Grösch S., Schiffmann S., Geisslinger G. (2012): Chain length-specific properties of ceramides. *Progress in Lipid Research*. 51(1), 50–62
- Gu W., Zhan H., Zhou X.-Y., Yao L., Yan M., Chen A., Liu J., Ren X., Zhang X., Liu J.-X., Liu G. (2017): MicroRNA-22 regulates inflammation and angiogenesis via targeting VE-cadherin. *FEBS Letters*. 591(3), 513–526
- Guilbault C., De Sanctis J. B., Wojewodka G., Saeed Z., Lachance C., Skinner T. A. A., Vilela R. M., Kubow S., Lands L. C., Hajduch M., Matouk E., Radzioch D. (2008): Fenretinide Corrects Newly Found Ceramide Deficiency in Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 38(1), 47–56
- Guilbault C., Wojewodka G., Saeed Z., Hajduch M., Matouk E., De Sanctis JB, Radzioch D. (2009): Cystic fibrosis fatty acid imbalance is linked to ceramide deficiency and corrected by fenretinide. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 41:100–106
- Haardt M., Benharouga M., Lechardeur D., Kartner N., Lukacs G. L. (1999): C-terminal Truncations Destabilize the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator without Impairing Its Biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 274(31), 21873–21877
- Hannun Y. A., Obeid L. M. (2008): Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology volume*. 9, 139–150
- Hassan F., Nuovo G. J., Crawford M., Boyaka P. N., Kirkby S., Nana-Sinkam S. P., Cormet-Boyaka E. (2012): MiR-101 and miR-144 Regulate the Expression of the CFTR Chloride Channel in the Lung. *PLoS ONE*. 7(11), e50837
- Hasuwa H., Ueda J., Ikawa M., Okabe M. (2013): miR-200b and miR-429 function in mouse ovulation and are essential for female fertility. *Science*. 341(6141),71–73
- Highsmith E. W., Burch L. H., Ahou Z., Olsen J. C., Boat T. E., Spock A., Gorvoy J. D., Quittell L., Friedman K. J., Silverman L. M., Boucher R. C., Knowles M. R. (1994): A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *New England Journal of Medicine*. 331, 974–80
- Holland I. B., Cole S. P. C., Kuchler K., Higgins C. F. (2003): ABC Proteins: From Bacteria to Man. *Academic Press*. London. ISBN 978-0-12-352551-2

- Chillón M., Casals T., Mercier B., Bassas L., Lissens W., Silber S., Romey M.-C., Ruiz-Romero J., Verlingue C., Claustres M., Nunes V., Férec C., Estivill X. (1995): Mutations in the Cystic Fibrosis Gene in Patients with Congenital Absence of the Vas Deferens. *New England Journal of Medicine*. 332(22), 1475–1480
- Jones M., Lal A. (2012): MicroRNAs, wild-type and mutant p53: more questions than answers. *RNA Biology*. 9(6), 781–91
- Kauppinen A., Suuronen T., Ojala J., Kaarniranta K., Salminen A. (2013): Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cellular Signalling*. 25(10), 1939–1948
- Kelly T., Buxbaum J. (2015): Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. *Digestive Diseases and Sciences*. 60(7), 1903–1913
- Kerem B. et Kerem E. (2017): The Molecular Basis for Disease Variability in Cystic Fibrosis. *European Journal of Human Genetics*. 4(2), 65–73
- Kim V. N. (2005): MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6(5), 376–85
- Kim W., Kyung L. E. (2012): Post-transcriptional regulation in metabolic diseases. *RNA Biology*. 9(6), 772–80
- Kopelman H., Durie P., Gaskin K., Weizman Z., Forstner G. (1985): Pancreatic Fluid Secretion and Protein Hyperconcentration in Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 312(6), 329–334
- Kopito L. E., Kosasky H. J., Shwachman H. (1973): Water and Electrolytes in Cervical Mucus from Patients with Cystic Fibrosis. *Fertility and Sterility*. 24(7), 512–516
- Kowalski M. P., Pier G. B. (2004): Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation. *The Journal of Immunology*. 172, 418–425
- Kuk K., Taylor-Cousar J. L. (2015): Lumacaftor and ivacaftor in the management of patients with cystic fibrosis: current evidence and future prospects. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 9(6), 313–326

- Kutty R. K., Samuel W., Jaworski C., Duncan T., Nagineni C. N., Raghavachari N., Wiggert B., Redmond T. M. (2010): MicroRNA expression in human retinal pigment epithelial (ARPE-19) cells: increased expression of microRNA-9 by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *Molecular Vision*. 16, 1475–86.
- Lachance C., Wojewodka G., Skinner T. A. A., Guilbault C., De Sanctis J. B., Radzioch D., Satoskar A. R. (2013): Fenretinide Corrects the Imbalance between Omega-6 to Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Inhibits Macrophage Inflammatory Mediators via the ERK Pathway. *Plos One*. 8(9), e74875
- Lausová T. (2018): MiRNA profilování meningiomů. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75(5), 843–54
- Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V. N. (2003): The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 425 (6956), 415–419
- Lee Y., Jeon K., Lee J. T., Kim S., Kim V. N. (2002): MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*. 21(17), 4663–870.
- Li M., Belmonte J. C. I. (2015): Roles for noncoding RNAs in cell-fate determination and regeneration. *Nature Structural & Molecular Biology*. 22(1), 2–4
- Li S.-C., Chan W.-C., Hu L.-Y., Lai C.-H., Hsu C.-N., Lin W.-C. (2010): Identification of homologous microRNAs in 56 animal genomes. *Genomics*. 96(1), 1–9
- Lloyd A. C. (2006): Distinct functions for ERKs? *Journal of Biology*. 5(5), 13
- Lo C. J., Chiu K. C., Fu M., Chu A., Helton S. (2000): Fish oil modulates macrophage P44/P42 mitogen-activated protein kinase activity induced by lipopolysaccharide. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 24(3), 159–63.
- Lorenzen J., Kumarswamy R., Dangwal S., Thum T. (2012): MicroRNAs in diabetes and diabetes-associated complications. *RNA Biology*. 9(6), 820–7

Lukacs G. L., Chang X. B., Bear C., Kartner N., Mohamed A., Riordan J. R., Grinstein S. (1993): The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *Journal of Biological Chemistry*. 268(29), 21592–21598

Luly F. R., Lévêque M., Licursi V., Cimino G., Martin-Chouly C., Théret N., Negri R., Cavinato L., Ascenzioni F., Del Porto P. (2019): MiR-146a is over-expressed and controls IL-6 production in cystic fibrosis macrophages. *Scientific Reports*. 9(1), 16259

Ma J., Zhao J., Drumm M. L., Xie J., Davis P. B. (1997): Function of the R Domain in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Chloride Channel. *Journal of Biological Chemistry*. 272(44), 28133–28141

Ma Z., Li J., Yang L., Mu Y., Xie W., Pitt B., Li S. (2004): Inhibition of LPS- and CpG DNA-induced TNF-alpha response by oxidized phospholipids. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 286(4), L808–16

Mattick J. S. (2001): Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO reports*. 2(11), 986–991

Mattick J. S., Makunin I. V. (2006): Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*. 15(suppl_1), R17–R29

McIntyre K. (2013): Gender and survival in cystic fibrosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 19(6), 692–697

Megiorni F., Cialfi S., Dominici C., Quattrucci S., Pizzuti A. (2011): Synergistic post-transcriptional regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) by miR-101 and miR-494 specific binding. *PLoS ONE*. 6(10), e26601

Mehta A., Baltimore D. (2016): MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nature Reviews Immunology*. 16(5), 279–294

Mendell J. T., Olson E. N. (2012): MicroRNAs in Stress Signaling and Human Disease. *Cell* 148(6), 1172–1187

miRBase [online] [navštíveno 25. 2. 2021] Dostupné z <http://www.mirbase.org/help/nomenclature.shtml>, <http://www.mirbase.org/help/submit.shtml>

Misra J. R., Irvine K. D. (2018): The Hippo Signaling Network and Its Biological Functions. *Annual Review of Genetics*. 52(1), 65–87

Moyad M. A. (2005): An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acids for general health and prevention: Part I. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 23(1), 28–35

Muralidharan J., Ramezani A., Hubal M., Knoblach S., Shrivastav S., Karandish S., Scott R., Maxwell N., Ozturk S., Beddhu S., Kopp J. B., Raj D.S. (2017): Extracellular microRNA signature in chronic kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 312(6), F982–F991.

National cancer institute Thesaurus (NCI Thesaurus) [online] [navštíveno 21. 1. 2020] Dostupné z: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=ncit&code=C1098

National Center for Biotechnology Information (NCBI): Microarrays. [online] [navštíveno 5. 3. 2021] Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techmicroarray/>

National Center for Biotechnology Information (NCBI): Real-Time qRT-PCR [online] [navštíveno 5. 3. 2021] Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/>

National Center for Biotechnology Information (NCBI): CFTR [online] [navštíveno 29. 9. 2020] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1080>

Nieuwenhuis E. E., Matsumoto T., Exley M., Schleipman R. A., Glickman J., Bailey D. T., Corazza N., Colgan S. P., Onderdonk A. B., Blumberg R. S. (2002): CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nature Medicine*. 8, 588–593

Novorozenecký screening [online] [navštíveno 29. 9. 2020] Dostupné z <https://www.novorozeneckyscreening.cz/cysticka-fibroza>

O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. (2018): Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*. 9

Oermann C. M., Retsch-Bogart G. Z., Quittner A. L., Gibson R. L., McCoy K. S., Montgomery A. B., Cooper P. J. (2010): An 18-month study of the safety and efficacy of repeated courses of inhaled aztreonam lysine in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*. 45(11), 1121–1134

- Oglesby I. K., Bray I. M., Chotirmall S. H., Stallings R. L., O'Neill S. J., McElvaney N. G., Greene C. M. (2010): MiR-126 Is Downregulated in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells and Regulates TOM1 Expression. *The Journal of Immunology*. 184(4), 1702–1709
- Oglesby I. K., Chotirmall S. H., McElvaney N. G., Greene C. M. (2013): Regulation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator by MicroRNA-145, -223, and -494 Is Altered in $\Delta F508$ Cystic Fibrosis Airway Epithelium. *The Journal of Immunology*. 190(7), 3354–3362
- Oglesby I. K., Vencken S. F., Agrawal R., Gaughan K., Molloy K., Higgins G., McNally P., McElvaney N. G., Mall M. A., Greene C. M. (2015): MiR-17 overexpression in cystic fibrosis airway epithelial cells decreases interleukin-8 production. *European Respiratory Journal*. 46(5), 1350–1360
- Okiyoneda T., Barriere H., Bagdany M., Rabeh W. M., Du K., Hohfeld J., Young J. C., Lukacs G. L. (2010): Peripheral Protein Quality Control Removes Unfolded CFTR from the Plasma Membrane. *Science*. 329(5993), 805–810
- O'Sullivan B. P., Freedman S. D. (2009): Cystic fibrosis. *The Lancet*. 373(9678), 1891–1904
- Palm T., Bahnassawy L., Schwamborn J. (2012): miRNAs and neural stem cells: A team to treat Parkinson's disease? *RNA Biology*. 9(6), 720–3
- Peterson M. L., Jacobs D. R. Jr., Milla C. E. (2003): Longitudinal changes in growth parameters are correlated with changes in pulmonary function in children with cystic fibrosis. *Pediatrics*. 112(3), 588–592
- Pritchard C., Cheng H., Tewari M. (2012): MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews Genetics*. 13(5), 358–369
- Ramachandran S., Karp P. H., Osterhaus S. R., Jiang P., Wohlford-Lenane C., Lennox K. A., Jacobi A. M., Praek K., Rose S. D., Behlke M. A., Xing Yi, Welsh M. J., McCray P. B. (2013): Post-transcriptional regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and function by microRNAs. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 49(4), 544–551
- Ramsey B. W., Pepe M. S., Quan J. M., Otto K. L., Montgomery A. B., Williams-Warren J., Vasiljev-K M., Borowitz D., Bowman C. M., Marshall B. C., Marshall S., Smith A. L. (1999):

- Intermittent Administration of Inhaled Tobramycin in Patients with Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 340(1), 23–30
- Ratjen F., Döring G. (2003): Cystic fibrosis. *The Lancet*. 361(9358), 681–689
- Ratjen F., Bell S. C, Rowe S. M., Goss C. H., Quittner A. L., Bush A. (2015): Cystic fibrosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 1(1)
- Riordan R. J., Rommens J., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J. et al. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 245(4922), 1066–1073
- Roshan R., Ghosh T., Gadgil M., Pillai B. (2012): Regulation of BACE1 by miR-29a/b in a cellular model of Spinocerebellar ataxia 17. *RNA Biology*. 9(6), 891–9
- Roskoski R. (2012): ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*. 66(2), 105–143
- Rowe S. M., Miller S., Sorscher E. J. (2005): Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 352(19), 1992–2001
- Sabharwal S. (2016): Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. *Gastroenterology Hepatology*. 12(1), 43–47
- Sanjabi S., Zenewicz L. A., Kamanaka M., Flavell R. A. (2009). Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Current opinion in pharmacology*. 9(4), 447–453.
- Serhan C. N., Yacoubian S., Yang R. (2008): Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 3(1), 279–312
- Shaik-Dasthagirisahab Y. B., Varvara G., Murmura G., Saggini A., Potalivo G., Caraffa A., Antinolfi P., Tetè S., Tripodi D., Conti F., Cianchetti E., Toniato E., Rosati M., Conti P., Speranza L., Pantalone A., Saggini R., Theoharides T. C., Pandolfi F. (2013): Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Mast Cells and Inflammation. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 26(2), 327–335

- Sharer N., Schwarz M., Malone G., Howarth A., Painter J., Super M., Braganza J. (1998): Mutations of the Cystic Fibrosis Gene in Patients with Chronic Pancreatitis. *New England Journal of Medicine*. 339(10), 645–652
- Shenoy A., Blelloch R. H. (2014): Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 15(9), 565–576
- Sheppard D. N., Rich D. P., Ostedgaard L. S., Gregory R. J., Smith A. E., Welsh M. J. (1993): Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature*. 362(6416), 160–164
- Sheppard D. N., Welsh M. J. (1999): Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiological Reviews*. 79(1), S23–S45
- Shishodia S., Gutierrez A. M., Lotan R., Aggarwal B. B. (2005): N-(4-hydroxyphenyl)retinamide inhibits invasion, suppresses osteoclastogenesis, and potentiates apoptosis through down-regulation of I(kappa)B(alpha) kinase and nuclear factor-kappaB-regulated gene products. *Cancer Research*. 65(20), 9555–65.
- Simons K., Toomre D. (2000): Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 1(1), 31–39
- Sonneville F., Ruffin M., Coraux C., Rousselet N., Le Rouzic P., Blouquit-Laye S., Corvol H., Tabary O. (2017): MicroRNA-9 downregulates the ANO1 chloride channel and contributes to cystic fibrosis lung pathology. *Nature Communications*. 8(1), 710
- Stern M., Bertrand D. P., Bignamini E., Corey M., Dembski B., Goss C. H., Pressler T., Rault G., Viviani L., Elborn J. S., Castellani C. (2014): European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Quality Management in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 13, S43–S59
- Sun K., Lai E. C. (2013): Adult-specific functions of animal microRNAs. *Nature Reviews Genetics*. 14(8), 535–548
- Tamanini A., Fabbri E., Jakova T., Gasparello J., Manicardi A., Corradini R., Finotti A., Borgatti M., Lampronti I., Munari S., Dechecchi M. C., Cabrini G., Gambari R. (2021). A Peptide-Nucleic Acid Targeting miR-335-5p Enhances Expression of Cystic Fibrosis Transmembrane

Conductance Regulator (CFTR) Gene with the Possible Involvement of the CFTR Scaffolding Protein NHERF1. *Biomedicines*. 9(2), 117

The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium (1993): Correlation between Genotype and Phenotype in Patients with Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 329(18), 1308–1313

Thibodeau P. H., Richardson J. M., Wang W., Millen L., Watson J., Mendoza J. L., Du K., Fischman S., Senderowitz H., Lukacs G. L., Kirk K., Thomas P. J. (2010): The Cystic Fibrosis-causing Mutation $\Delta F508$ Affects Multiple Steps in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 285(46), 35825–35835

Tsui L.-C. et Dorfman R. (2013): The Cystic Fibrosis Gene: A Molecular Genetic Perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 3(2): a009472

Uživatelská příručka: TaqMan® Advanced miRNA Assays, Applied Biosystem™, 2016, (kat. č.: A25576)

Van Goor F., Hadida S., Grootenhuis P. D. J., Burton B., Stack J. H., Straley K. S., Decker C. J., Miller M., McCartney J., Olson E. R., Wine J. J., Frizzell R. A., Ashlock M., Negulescu P. A. (2011): Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(46), 18843–18848

Verhaeghe C., Remouchamps C., Hennuy B., Vanderplasschen A., Chariot A., Tabruyn S. P., Oury C., Bours V. (2007): Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways. *Biochemical Pharmacology*. 73(12), 1982–1994

Viart V., Bergougnoux A., Bonini J., Varilh J., Chiron R., Tabary O., Molinari N., Claustres M., Taulan-Cadars M. (2015): Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*. 45(1), 116–128

Wang X., Xu X., Ma Z., Huo Y., Xiao Z., Li Y., Wang Y. (2011): Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by Exportin-5. *RNA*. 17(8), 1511–1528

- Wang Y., Wrennall J. A., Cai Z., Li H., Sheppard D. N. (2014): Understanding how cystic fibrosis mutations disrupt CFTR function: From single molecules to animal models. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 52, 47–57
- Weiler C. A., Drumm M. L. (2013): Genetic Influences on Cystic Fibrosis Lung Disease Severity. *Frontiers in Pharmacology*. 4, 40
- Weldon S., McNally P., McAuley D. F., Oglesby I. K., Wohlford-Lenane C. L., Bartlett J. A., Scott C. J., McElvaney N. G., Greene C. M., McCray P. B., Taggart C. C. (2014): miR-31 Dysregulation in Cystic Fibrosis Airways Contributes to Increased Pulmonary Cathepsin S Production. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 190(2), 165–174
- Welsh M. J., Smith A. E. (1993): Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*. 1993, 73(7), 1251–1254
- Wightman B., Ha I., Ruvkun G. (1993): Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 75, 855–62
- Wojewodka G., De Sanctis J. B., Radzioch D. (2011): Ceramide in Cystic Fibrosis: A Potential New Target for Therapeutic Intervention. *Journal of Lipids*. 2011, 674968
- Wu D. H., Hatzopoulos A. K. (2019): Bone morphogenetic protein signaling in inflammation. *Experimental Biology and Medicine*. 244(2), 147–156
- Yücel E. I., Sahin M. (2020): Fenretinide reduces angiogenesis by downregulating CDH5, FOXM1 and eNOS genes and suppressing microRNA-10b. *Molecular Biology Reports*. 47(3), 1649–1658
- Zhang L., Li H. H., Yuan M., Li D., Wang G. Y. (2020): Exosomal miR-22-3p derived from peritoneal macrophages enhances proliferation, migration, and invasion of ectopic endometrial stromal cells through regulation of the SIRT1/NF- κ B signaling pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 24(2):571–580
- Zhang P.-x., Cheng J., Zou S., D'Souza A. D., Koff J. L., Lu J., Lee P. J., Krause D. S., Egan M. E., Bruscia E. M. (2015): Pharmacological modulation of the AKT/microRNA-199a-5p/CAV1 pathway ameliorates cystic fibrosis lung hyper-inflammation. *Nature Communications*. 6(1)

Zhong T., Perelman J. M., Kolosov V. P., Zhou X.-d. (2011): MiR-146a negatively regulates neutrophil elastase-induced MUC5AC secretion from 16HBE human bronchial epithelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 358(1–2), 249–255

Zielenski J., Markiewicz D., Lin S.-P., Huang F.-Y., Yang-Feng T. L., Tsui L.-C. (1995): Skipping of exon 12 as a consequence of a point mutation (1898 + 5G → T) in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene found in a consanguineous Chinese family. *Clinical Genetics*. 47(3), 125–132

Zielenski J., Tsui L.-C. (1995): Cystic Fibrosis: Genotypic and Phenotypic Variations. *Annual Review of Genetics*. 29(1), 777–807