

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

---



***OVLIVNĚNÍ CYTOTOXICITY XENOBIOTIK***

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2019

Zdeněk Dostál

---

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

---



Zdeněk Dostál

***OVLIVNĚNÍ CYTOTOXICITY XENOBIOTIK***

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

Školitel: Prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.

Obor: Lékařská chemie a klinická biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2013–červen 2019.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury, kterou cituji. Spoluautoři souhlasí s použitím publikovaných výsledků.

V Olomouci dne 26. 6. 2019

.....  
Mgr. Zdeněk Dostál

Děkuji pracovníkům Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP za vytvoření dobrého pracovního prostředí a pomoc při řešení odborných problémů. Zvláště děkuji svému školiteli Prof. Mgr. Martinovi Modrianskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky, rady a předané zkušenosti během mého doktorského studia, při výzkumné části i při vlastním sepisování disertační práce. Ing. Evě Gabrielové, Ph.D., Alekseji Zholobenkovi, Ph.D. a Mgr. Pavlovi Kosinovi, Ph.D. děkuji za cennou spolupráci a rady.

Prof. Ing. Vladimírovi Křenovi, DrSc. (Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha) děkuji za spolupráci při přípravě polyfenolových látek.

MUDr. Josefovi Srovnalovi, Ph.D. a jeho týmu (Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP) děkuji za stanovení expresních profilů primárních kultur lidských hepatocytů čipovou technologií Affymetrix, Mgr. Lence Radové, Ph.D. (CEITEC, MUNI) za extrakci dat ze souborů generovaných při analýze čipů Affymetrix a Mgr. Martinovi Seberovi, Ph.D. (Fakulta sportovních studií, MUNI) za spolupráci při statistickém vyhodnocení výsledků z čipové technologie Affymetrix.

Doc. RNDr. Petrovi Mlejnkovi, Ph.D. a jeho týmu (Ústav normální anatomie, LF UP) děkuji za stanovení inhibiční aktivity mifepristonu vůči ABC transportérům.

Prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc., přednostce Ústavu lékařské chemie a biochemie, LF UP, děkuji za cenné rady a připomínky předané v průběhu celého mého působení na tomto pracovišti.

Práce byla vypracována v rámci řešení projektů LO1304, IGA\_LF\_2013\_008, IGA\_LF\_2014\_014, IGA\_LF\_2015\_007, IGA\_LF\_2016\_012, IGA\_LF\_2017\_011, IGA\_LF\_2018\_012, IGA\_LF\_2019\_015.

Děkuji také rodině za pochopení, trpělivost a podporu při studiu.

### SOUHRN

Předkládaná disertační práce se zabývá různými možnostmi ovlivnění cytotoxicity xenobiotik, mezi které patří i protinádorová léčiva. Jejich aplikace v léčebné terapii vyvolává selekční tlak na nádorové buňky, který může končit vznikem rezistence. Proto je důležité zkoumat možnosti, které dovolí tuto rezistenci překonat. Mechanizmů vzniku rezistence existuje mnoho, jedním z nich je aberantní exprese proteinů rodiny Bcl-2, které mají ústřední roli v udržování homeostázy mezi apoptózou a přežíváním. Jiný mechanismus souvisí s funkcí ABC transportérů.

První studovanou možností byla transfekce buněk HeLa prekursorů rodiny miR-29, kdy naše studie odhalila významné navýšení cytotoxicity etoposidu v důsledku transfekce miR-29b. Následně jsme se zaměřili na mechanismus, pro který je miR-29b v naší studii unikátní. Výsledky experimentů ukázaly důležitost regulace proteinu Mcl-1, který je validovaným cílem rodiny miR-29. miR-29b, na rozdíl od ostatních členů, vyvolala nejen pokles tzv. dlouhé formy Mcl-1L, ale i změnu poměru dlouhé a krátké formy, což ukazuje na zesílení proapoptotické signalizace. Nakonec jsme prokázali spojitost jaderné lokalizace miR-29b s navýšením cytotoxicity etoposidu.

Druhým zkoumaným přístupem bylo farmakologické navýšení účinku etoposidu v buněčné linii Hep G2. V rámci tohoto projektu jsme prokázali synergický účinek koinkubace mifepristonu a etoposidu závislý na dávce. Dalším cílem bylo nalezení mechanismu účinku mifepristonu. Hlavním důvodem synergie je mifepristonem způsobené navýšení intracelulární koncentrace etoposidu díky nespecifické inhibici ABC transportérů. Pozorovaný trend v navýšení exprese proteinu Bax pravděpodobně napomáhá vstupu buněk Hep G2 do apoptózy.

Současný výzkum odhaluje schopnost přírodních látek hojně zastoupených v potravě regulovat expresi významných miRNA spojovaných s onkogenezí. V našem případě jsme se zaměřili na ovlivnění expresních profilů buněčné linie Hep G2 a primárních kultur lidských hepatocytů jako modelů jaterní tkáně pomocí kvercetinu a taxifolinu. Zjistili jsme, že fyziologicky dosažitelná koncentrace vybraných polyfenolů moduluje expresní profil miRNA u obou použitých modelů. Jedním z výsledných účinků taxifolinu je navýšení exprese proteinu ZEB2, který je zapojen v epiteliálně-mezenchymální tranzici. Nicméně exprese vimentinu byla oproti očekávání snížena, což naznačuje existenci dalšího vlivu taxifolinu. Předběžné výsledky naznačují možné zapojení taxifolinu do

## SOUHRN

---

regulace  $\beta$ -catenin, které by vysvětlovalo na první pohled nesourodá data mezi expresí proteinu ZEB2 a vimentinu.

Výsledky disertační práce ukazují potenciální směry v modulaci cytotoxicity xenobiotik s cílem zlepšení odezvy modelových nádorových buněčných linií na terapii.

Klíčové slova: mikroRNA, miR-29, etoposid, mifepriston, polyfenoly, Mcl-1, Bax, ZEB2

## SUMMARY

---

### SUMMARY

The dissertation thesis is focused on possibilities of enhancing cytotoxicity of xenobiotics, including anticancer drugs. Their application during therapies applies selection pressure on tumor cells, which may result in development of resistance. Therefore, it is important to explore the possibilities that will allow the resistance to be overcome. There are many mechanisms of resistance, one of which is the aberrant expression of Bcl-2 family proteins that play a central role in maintaining homeostasis between cell apoptosis and survival. Another mechanism is related to the function of ABC transporters.

The first study focused on transfection of HeLa cells with the miR-29 family precursors. The study revealed an increase in etoposide cytotoxicity only during miR-29b transfection. Subsequently, we focused on the mechanism for which miR-29b is unique in our study. Our results demonstrate the importance of regulation of the Mcl-1 protein, which is recognized as a validated target for miR-29 family. miR-29b, in contrast to other members, induced a decrease of Mcl-1L expression as well as a change in Mcl-1L/Mcl-1S ratio, which means an increase in proapoptotic signalling. Finally, we have shown the association of nuclear localisation of miR-29b with the increased cytotoxicity of etoposide.

The second investigated approach was a pharmacological enhancement of the effect of etoposide in Hep G2 cells. In this project, we have demonstrated a synergistic and dose dependent effect of co-incubation of mifepristone and etoposide. Another aim was to find the mechanism of action of mifepristone. The synergy is caused by increase in the intracellular concentration of etoposide due to non-specific inhibition of ABC transporters by mifepristone. The observed trend in Bax protein expression is likely to facilitate entry of Hep G2 cells into apoptosis.

Recent research reveals the ability of natural compounds abundant in the diet to regulate expression of significant tumor-related miRNAs. We focused on modulation of expression profiles induced by quercetin and taxifolin in Hep G2 cell line and primary cultures of human hepatocytes as models of liver tissue. We have found that the physiological concentration of both selected polyphenols modulates miRNA expression profiles in both models. We discovered that in Hep G2 cell line taxifolin increased ZEB2 protein, which is involved in epithelial-mesenchymal transition. Surprisingly, vimentin

## SUMMARY

---

expression was reduced, indicating existence of further regulation by taxifolin. Preliminary results suggest possible involvement of taxifolin in  $\beta$ -catenin regulation, that can explain disparate results of ZEB2 and vimentin expression.

The results of the dissertation thesis show potential directions in the modulation of xenobiotics cytotoxicity with the aim of improving the response of model tumor cell lines to therapy.

Key words: microRNA, miR-29, etoposide, mifepristone, polyphenols, Mcl-1, Bax, ZEB2



**Obsah**

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>3</b>
2.1	Etoposid.....	3
2.1.1	Základní metabolismus etoposidu .....	5
2.1.2	Formy etoposidu používané během terapie .....	6
2.2	Mifepriston.....	7
2.3	Polyfenoly .....	9
2.3.1	Kvercetin.....	10
2.3.2	Taxifolin.....	12
2.4	mikroRNA.....	13
2.5	Biogeneze miRNA .....	14
2.6	Rodina miR-29 .....	17
2.6.1	Základní regulace exprese rodiny miR-29 .....	18
2.6.2	Specifická odlišnost miR-29b od ostatních členů rodiny .....	20
2.6.3	Vliv rodiny miR-29 na regulaci buněčných dějů.....	21
2.7	Působení kvercetinu na expresi miRNA .....	22
2.7.1	Studie zaměřené na <i>in vitro</i> experimenty .....	22
2.7.2	Studie zaměřené pouze na <i>in vivo</i> experimenty .....	31
2.7.3	Studie zaměřená na pacientské vzorky .....	33
2.8	Působení taxifolinu na expresi miRNA.....	34
2.9	Proteiny rodiny Bcl-2 .....	35
2.9.1	Mcl-1.....	35
2.9.2	Bax a Bak.....	37
2.9.2.1	Bax .....	38
2.9.2.2	Bak .....	39
2.10	ZEB2 .....	39
<b>3</b>	<b>CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>42</b>
4.1	Biologický materiál .....	42
4.1.1	Buněčný materiál .....	42

## OBSAH

---

4.2	Chemikálie .....	43
4.3	Roztoky .....	46
4.4	Přístroje .....	50
4.5	Použité metody .....	52
4.5.1	Izolace a příprava primárních kultur lidských hepatocytů.....	52
4.5.2	Kultivace primárních kultur lidských hepatocytů.....	52
4.5.3	Kultivace buněčných linií HeLa, Hep G2 a K562 .....	53
4.5.4	System xCELLigence .....	54
4.5.5	Vyhodnocení cytotoxicity z křivek vygenerovaných systémem xCELLigence.....	55
4.5.6	Stanovení aktivity kaspázy-3 .....	57
4.5.7	Stanovení akumulace etoposidu v intracelulárním prostoru buněčné linie Hep G2 .....	58
4.5.8	Vyhodnocení intracelulární koncentrace etoposidu v buňkách Hep G2.....	59
4.5.9	Příprava celkových lyzátů.....	59
4.5.10	Extrakce cytosolické a jaderné frakce buněk.....	60
4.5.11	Elektroforéza.....	61
4.5.12	Western blot.....	61
4.5.13	Detekce .....	62
4.5.14	Izolace RNA .....	63
4.5.15	Reverzní transkripce .....	64
4.5.16	Real-time PCR .....	64
4.5.17	Stanovení proteinů .....	66
4.5.18	Transfekce buněk.....	67
4.5.19	Kometová analýza.....	68
4.5.20	Fluorescenční mikroskopie .....	69
4.5.21	Průtoková cytometrie .....	69
4.5.22	mikroRNA arrays.....	69
4.5.23	Počítání buněk a měření jejich viability na systému MUSE cell analyser ..	70
4.5.24	Statistická analýza.....	71
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>72</b>
5.1	Vliv rodiny miR-29 na cytotoxicitu protinádorového léčiva etoposidu se zaměřením na studium mechanismu účinku .....	72
5.1.1	Vliv rodiny miR-29 na aktivitu kaspázy-3 .....	73

5.1.2	Testování účinnosti použitých siRNA proti proteinům Mcl-1 a Bak .....	75
5.1.3	Vliv proteinů Mcl-1 a Bak na cytotoxicitu etoposidu.....	76
5.1.4	Vliv upravených sekvencí miR-29b na expresi proteinu Mcl-1 .....	77
5.1.5	Vliv upravených syntetických sekvencí miR-29b na cytotoxicitu etoposidu.. .....	79
5.2	Farmakologický přístup k ovlivňování exprese miRNA .....	79
5.2.1	Efekt jednotlivých testovaných látek na viabilitu buněčné linie Hep G2....	82
5.2.2	Efekt různých kombinací etoposidu a mifepristonu na viabilitu buněčné linie Hep G2 .....	84
5.2.3	Efekt různých kombinací etoposidu a mifepristonu na aktivaci kaspázy-3 v buněčné linii Hep G2.....	86
5.2.4	Efekt kombinace etoposidu a mifepristonu na expresi vybraných proteinů	88
5.2.5	Efekt mifepristonu na intracelulární akumulaci etoposidu v buněčné linii Hep G2 .....	89
5.2.6	Vliv specifických inhibitorů ABC transportérů na cytotoxicitu etoposidu v buněčné linii Hep G2.....	91
5.2.7	Sledování přítomnosti ABC transportérů ABCB1, ABCC1 a ABCG2 v buněčné linii Hep G2, pomocí metody western blot .....	92
5.2.8	Testování efektivity inhibice specifických ABC transportérů mifepristonem v buněčné linii K562 s různou intenzitou jejich exprese.....	92
5.3	Ovlivnění miRNA za pomoci látek běžně se vyskytujících ve stravě člověka...	94
5.3.1	Statistické vyhodnocení expresního profilu výsledků z Affymetrix miRNA array analýzy .....	94
5.3.2	Protein ZEB2 jako možný cíl miRNA ovlivněných pomoci kvercetinu a taxifolinu.....	95
5.3.3	Vliv kvercetinu a taxifolinu na expresi proteinu ZEB2 a související působení na protein vimentin .....	96
5.3.4	miR-375 jako potenciální regulátor vimentinu.....	98
<b>6</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>100</b>
6.1	Vliv rodiny miR-29 na cytotoxicitu etoposidu.....	100
6.2	Farmakologický přístup k ovlivňování exprese miRNA .....	101
6.3	Ovlivnění miRNA za pomoci látek běžně se vyskytujících ve stravě člověka.	103
<b>7</b>	<b>ZÁVĚRY .....</b>	<b>106</b>
7.1	Ovlivnění cytotoxicity etoposidu rodinou miR-29 v buněčné linii HeLa.....	106
7.2	Vliv mifepristonu na cytotoxicitu etoposidu v buněčné linii Hep G2 .....	106

## OBSAH

---

7.3	Efekt kvercetinu a taxifolinu na miRNA profil a jeho důsledky .....	107
<b>8</b>	<b>SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI.....</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>OSTATNÍ PRÁCE .....</b>	<b>110</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>111</b>

## SEZNAM ZKRATEK

---

### SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP binding cassette	CKI	kaseinkináza 1
AGO2	argonaut 2	CYP	cytochrom P450
AJ	arbitrární jednotka	DAD	detektor diodového pole
AMK	aminokyselina	DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
AML	akutní myeloidní leukémie	DHSB	2,3-dehydrosilybin
AR	androgenní receptor	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ARE	adenylate-uridylate -rich element	DMSO	dimethylsulfoxid
ATP	adenosintrifosfát	DNMT	DNA-methyltransferáza
ATRA	kyselina all-trans-retinová	DPI	počet pixelů/palec
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death	DTT	DL-dithiothreitol
BAG	Bcl-2 associated athanogene	EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer	EGF	epidermální růstový faktor
Bax	Bcl-2 associated X protein	EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large	EMT	epiteliálně-mezenchymální tranzice
Bcl-w	Bcl-2 like protein 2	ER $\alpha$	estrogenový receptor $\alpha$
BH	Bcl-2 homology	EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
Bid	BH3 interacting domain death agonist	FBS	fetální bovinní sérum
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death	FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
Bik	Bcl-2 interacting killer	FXR1	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1
Bok	Bcl-2 related ovarian killer	GABARAPL1	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein like 1
BRCA1	Breast cancer 1	GAE·l <sup>-1</sup>	ekvivalenty kyseliny gallové na litr
BRCA2	Breast cancer 2	GATA3	GATA Binding Protein 3
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)	GR	glukokortikoidní receptor
Calcein AM	calcein acetoxymethyl ester		
CEBPA	CCAAT/enhancer vazebný protein $\alpha$		

## SEZNAM ZKRATEK

---

GSK3	glykogensyntáza kináza 3	MS	hmotnostní spektrometrie
GSTP	glutathion-S-transferáza pi	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-difenyltetrazolium
GSTT	glutathion-S-transferáza theta		bromid
GTP	guanosintrifosfát		
HDAC	histon deacetyláza	NEAA	neesenciální aminokyseliny
HeLa	buněčná linie odvozená od rakoviny děložního hrdla	NF-κB	jaderný faktor kappa B
HEPES	kyselina N-(2- hydroxyethyl)piperazin-N'- etansulfonová	NR1I2	pregnanový X receptor
		PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
HMGA2	High-mobility group A2	PARP-1	poly(ADP ribóza) polymeráza
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie	PBS	fyzilogický roztok upravený fosfátem na pH 7,4
HRP	křenová peroxidáza	PDCD4	Programmed cell death 4
Hsp70	protein teplotního šoku o velikosti 70 kDa (heat shock protein 70)	PDGF	růstový faktor z destiček
IC <sub>50</sub>	koncentrace způsobující 50% inhibici sledované aktivity	PEST	peptidová sekvence bohatá na prolin (P), glutamovou kyselinu (E), serin (S), a threonin (T)
IRAK1	Interleukin-1 receptor- associated kinase 1	PTEN	Phosphatase and tensin homolog
JNK	c-Jun-N-terminální kinázy	P-gp	P-glykoprotein
KLF5	Kruppel-like faktor 5	PMSF	fenylmetansulfonyl fluorid
LDL	nízkodenzitní lipoprotein	PR	progesteronový receptor
lnc-RNA	dlouhá nekódující RNA (long non-coding RNA)	PTGS	prostaglandinsyntetáza
LPH	laktáza-floridzin hydroláza	PVDF	polyviniliden fluorid
miRNA	mikroRNA	pre-miRNA	prekurzorová miRNA
Mcl-1	myeloid cell leukemia-1	pri-miRNA	primární transkript miRNA
MEM	Minimum Essential Medium	RISC	RNA induced silencing complex
MLL	Myeloid/lymphoid or mixed- lineage leukemia 1	RIPA	pufr pro radioimunoprecipitační analýzu
MMP	matrixová metaloproteináza		
MPO	myeloperoxidáza		

## SEZNAM ZKRATEK

---

RNAi	RNA interference	Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminometan
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	TRQ	Tarquidar
SB	silybin	UGT1A1	UDP-glukuronyltransferáza 1A1
SDS	dodecylsulfát sodný	VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2
SIP	SMAD interacting protein 1	VDR	receptor pro vitamin D
SP	Specificity protein	VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	WIF-1	Wnt inhibiční faktor 1
SUZ12	Suppressor of zeste 12 protein homolog	YY1	Yin Yang 1
TBS/T	isotonický Tris pufr s přídávkem 0,1 % Tween-20	USP9X	Ubiquitin specific peptidase 9 x-linked
TEMED	tetramethylethylendiamin	3'UTR	3' nepřepisovaná oblast (3' untranslated region)
TFIIH	transkripční faktor II H	ZBTB10	Zinc finger and BTB domain containing protein 10
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$	ZEB	Zinc finger E-box-binding homeobox 2
TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinases 3	ZSQ	Zosuquidar
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$		
TOPII	topoizomeráza II		
TRAF6	Tumor necrosis factor receptor associated factor 6		
TRBP	TAR (HIV-1) RNA binding protein		

## 1 ÚVOD

V průběhu života jsou buňky v našich tělech ovlivňovány nejen endogenními stimuly, ale i nejrůznějšími xenobiotiky z potravy, životního prostředí nebo ve formě léčiv. Za xenobiotika jsou obecně považovány látky, které si tělo nedokáže vyrobit a nemají v něm žádnou fyziologickou funkci. Z pohledu původu se tyto látky dělí na přírodní nebo syntetické. Pokud se xenobiotika dostanou do lidského organismu, mohou vyvolat spoustu pozitivních, ale i negativních účinků. Do skupiny látek s pozitivním účinkem patří hlavně léčiva, ale i přírodní látky, které buďto pomáhají řešit již nastalé problémy nebo dokážou ve formě profylaxe problémům předcházet. Mezi látky s negativním účinkem, které nemají žádné pozitivní využití, patří například polychlorované bifenyly, dioxiny nebo jiné organické deriváty.

Zajímavým příkladem xenobiotika ze skupiny léčiv je etoposid. Jedná se o relativně staré léčivo, často využívané pro léčbu různých nádorových onemocnění. Účinky etoposidu je možné ovlivňovat dalšími xenobiotiky, což je důvod, proč se často používá v kombinaci s dalšími protinádorovými léčivy. Neméně zajímavou možností tvoří kombinace etoposidu se zásahem na úrovni regulace exprese. Zde můžeme zkoumat dopad různých přístupů, od posttranskripční modulace pomocí miRNA počínaje, po buněčnou signalizaci konče. V neposlední řadě se nesmí zapomínat na vliv přírodních látek, obzvláště hojně zastoupených v dietě člověka.

MikroRNA (miRNA) hrají v lidském organismu důležitou úlohu, protože zcela zásadně ovlivňují klíčové buněčné děje a také reakce buňky na různé stimuly pocházející z vnějšího i vnitřního prostředí. miRNA se podílí významným způsobem na regulaci vývoje jednotlivých organismů. Příkladem může být první objevená miRNA *lin-4*, která řídí průchod mezi jednotlivými stádii larválního vývoje hlísty *Caenorhabditis elegans* [1]. Pokud dojde k deregulaci této miRNA, dochází k narušení larválního vývoje. miRNA jsou velmi precizní nástroj pro regulaci expresního profilu buněk za pomoci cíleného vypínání a zapínání genů. Výsledkem je správný vývoj a diferenciace buněk jednotlivých tkání. Kromě fyziologických procesů je miRNA zapojena i do vyvolání různých patologických stavů jako jsou kardiovaskulární choroby nebo nádorová onemocnění [2,3]. Tyto poznatky vedly k novému využití jednotlivých molekul miRNA jako prognostických a prediktivních markerů. Další možnou rolí miRNA je její využití jako terapeutického cíle právě v nádorových onemocněních. Vybrané molekuly miRNA nesou příslib možného



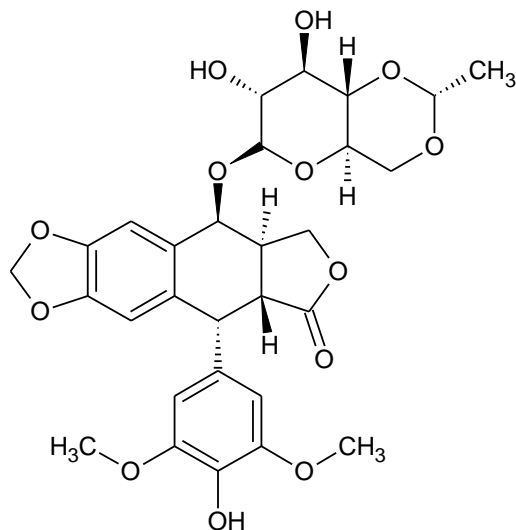
obcházení rezistence nádorů [4,5], která vzniká během léčby díky selekčnímu tlaku protinádorové terapie. Současný výzkum v oblasti miRNA se věnuje mnoha látkám hojně zastoupeným v dietě a poukazuje na jejich schopnost upravovat expresi miRNA. Publikovaná data naznačují potenciální dopad na terapii onkologických pacientů [6].

Nedílnou součástí potravy jsou polyfenoly, které představují velkou skupinu přírodních látek tvořených rostlinami a označovaných jako jejich sekundární metabolity. Člověk je schopen zkonzumovat i více než jeden gram směsi látek řadících se do této skupiny [7,8]. Jednou z důležitých komponent je i kvercetin, který je obsažen v mnoha druhích ovoce a zeleniny, ale i v čaji nebo víně. V literatuře je díky této skutečnosti označován jako všudypřítomný. Při tak významném příjmu v potravě je důležité zkoumat pozitivní i negativní vliv těchto látek na organismus. miRNA jsou jedním z kandidátů cílového působení v buňce, kde polyfenoly, a obzvláště kvercetin, mohou zasahovat. Proto mohou ovlivňovat celou řadu proteinů včetně souvisejících signálních drah. Výsledkem je potenciál pro modulaci cytotoxicity xenobiotik.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Etoposid

Etoposid, známý pod generickým názvem VP-16-213, je polosyntetický derivát podofylotoxinu, který je obsažen například v noholistu štítnatém (*Podophyllum peltatum* L.), ale i v dalších rostlinách [9]. V současnosti je etoposid vyráběn plně synteticky, jeho chemická struktura je uvedena na obrázku 1. První písemně zaznamenané použití podofylotoxinů v lékařství se datuje do období středověku kolem roku 900 až 950. Ve zmíněné době se k léčbě nádorů využívaly kořeny kerblíku lesního (*Anthriscus sylvestris*) [10]. Z pohledu současné medicíny získává etoposid na významu kolem roku 1973, kdy vstoupil do klinických zkoušek spolu se svým derivátem tenoposidem [11]. Dalším důležitým milníkem v jeho historii je rok 1983, kdy byl schválen americkou agenturou FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) [12] a uvolněn na trh s léčivý v USA. Etoposid je využíván v léčbě Hodgkinova lymfomu, Non-Hodgkinova lymfomu, krevních malignit jako je akutní nebo chronická myeloidní leukemie, ale i malobuněčného a nemalobuněčného karcinomu plic [12-14]. Etoposid se používá jako monoterapie, často však v kombinaci s jinými léčivý pro vytvoření synergického efektu [15].

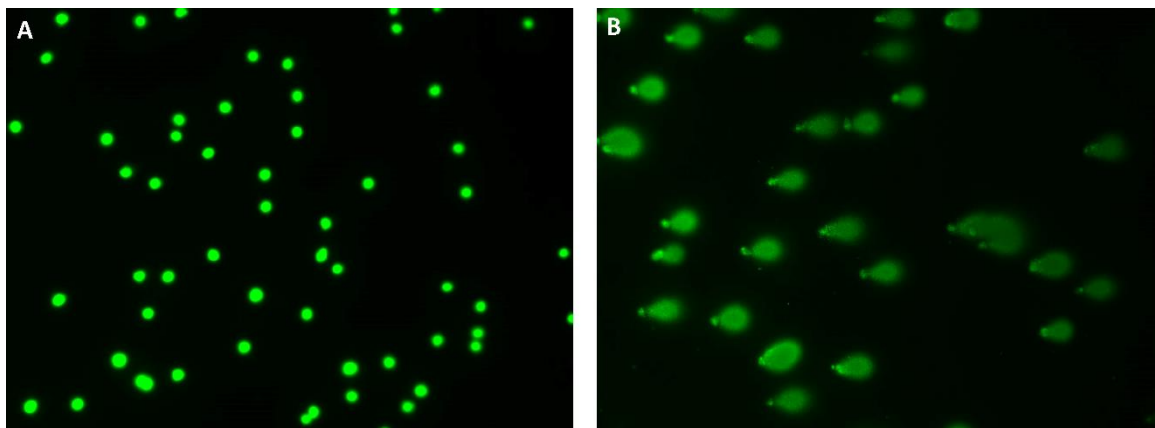


**Obrázek 1: Chemická struktura etoposidu.** Nakresleno ve freeware ACD/ChemSketch.

Hlavním mechanismem účinku etoposidu je inhibice topoizomerázy II, což je efekt pozorovatelný na úrovni jednotlivých buněk. Topoizomerázy jsou rodina enzymů, která kompenzuje topologické změny v DNA. Tyto změny jsou do DNA vnášeny různými

helikázami obzvláště během replikace, ale do jisté míry dochází k topologickým změnám i např. při transkripci, kdy je nutné rozplést DNA. Pro tento účel se využívá obecný transkripční faktor TFIIH, který má helikázovou aktivitu [16]. Rozvolnění DNA helikázami probíhá za hydrolýzy ATP, kdy helikázy aplikují mechanickou práci pouze na jedno vlákno. Výsledkem je utahující se struktura DNA šroubovice před helikázou. Přílišné utahení má za následek kompletní zablokování jakýchkoliv procesů vyžadujících rozplétání DNA, např. replikace nebo transkripce. Topoizomerázy, které kompenzují změny vyvolané helikázami, se rozdělují na dvě skupiny. Topoizomerázy I, které vytváří pouze jednovláknové zlomy a nadšroubovicové vinutí se kompenzuje protočením neštěpeného vlákna kolem vlákna intaktního. Topoizomerázy II naopak vytvářejí dvouvláknové zlomy na DNA, přes které se provléká intaktní dvoušroubovice DNA. Etoposid nasedá na topoizomerázu ve chvíli, kdy dojde ke vzniku komplexu enzymu s DNA a jejímu rozštěpení, tím zablokuje opětovné spojení vláken „opravované“ molekuly DNA. Po uvolnění zablokovaného enzymu dojde v závislosti na dávce k vytvoření množství jednovláknových a dvouvláknových zlomů v DNA [12,17] (viz. obrázek 2), což vyvolá velký chaos v jádře a obvykle končí přechodem buňky do apoptózy.

Jedním z vedlejších účinků, který může během léčby etoposidem nastat, je vznik mutací ve zdravých buňkách a zvýšená pravděpodobnost vytvoření nových transformovaných buněk, které jsou základem pro nové nádory [18]. Příkladem může být vznik sekundární akutní myeloidní leukemie (AML), velmi často díky změnám v oblasti kolem genu *MLL* (11q23, histon methyltransferáza) [19,20]. Vyšší riziko vzniku sekundární AML je spojováno i s nevhodným terapeutickým režimem [21]. Dalším efektem souvisejícím s inhibicí topoizomerázy II je zablokování replikace DNA. Výsledek působení etoposidu se projeví na buněčném cyklu tak, že dochází k jeho zastavení v S fázi [22]. Výsledky různých studií naznačují, že etoposid preferuje izoformu  $\alpha$  topoizomerázy II [23].



**Obrázek 2: Vliv etoposidu na poškození DNA.** Poškození DNA vyvolané etoposidem v použitém experimentálním modelu (HeLa buňky) ve srovnání s neošetřenou kontrolou (aplikováno pouze DMSO). Vyhodnocení bylo provedeno metodou kometové analýzy po 24 hodinové inkubaci s testovaným léčivem. Modul A reprezentuje neošetřenou kontrolu. Modul B reprezentuje vzorek ošetřený etoposidem v koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . DNA byla označena sondou Sybr Green naředěnou v poměru 1:10 000 TE pufrům. Fotky byly pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu Zeiss AxiovertC a ovládacího softwaru AxioVision Rel. 4.8. Použitá kamera AxioCam ICm1 je černobílá, proto byly fotky dobarveny pomocí programu ImageJ.

### 2.1.1 Základní metabolismus etoposidu

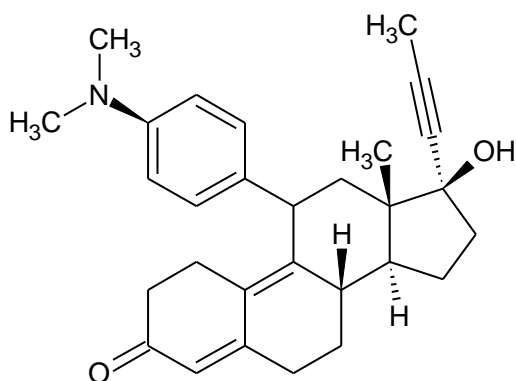
Etoposid se velmi ochotně váže na plazmatické bílkoviny, proto se v krvi nachází pouze 6–8 % volné formy [24]. Metabolismus etoposidu probíhá v játrech, kde se zapojují izoformy cytochromů P450 (CYP) 3A4 a 3A5. Ty se podílí na vytvoření katecholu ve struktuře etoposidu, který je dále přeměněn na chinon díky aktivitě myeloperoxidázy. Vzniklý metabolit je následně konjugován s glutathionem za katalýzy glutathion-S-transferázy pi a theta [20,25]. Metabolity etoposidu dále podléhají glukuronidaci pomocí UDP-glukuronyltransferázy 1A1. Na eliminaci etoposidu se podílejí i ABC transportéry, které brání intracelulární akumulaci léčiva a patří sem především přenašeče ABCB1, ABCC1 nebo ABCC3 [25]. Metabolismus etoposidu shrnuje obrázek 3. Etoposid a jeho metabolity jsou vylučovány močí a žlučí. Z celkové vyloučené dávky je třetina až polovina tvořena nezměněnou formou [10].



## 2.2 Mifepriston

Mifepriston je staré, synteticky vyráběné léčivo. Molekula byla objevena počátkem osmdesátých let ve Francii, kde došlo k jejímu schválení v roce 1988. Na přelomu tisíciletí bylo léčivo schváleno i agenturou FDA [29]. V literatuře se často vyskytuje pod svým generickým názvem RU-486. Za první a v lékařství nejrozsáhlejší využití je považováno antagonistické působení na progesteronový receptor. Výsledkem je abortivní efekt, proto je dodnes mifepriston podáván pro farmakologické vyvolání potratu do 49. dne od početí. Standardní postup spočívá v podání 600 mg mifepristonu s následnou aplikací 400  $\mu\text{g}$  prostaglandinu  $\text{E}_2$  po 48 hodinách od podání prvního léčiva. Celý úkon je zakončen kontrolou po 12 dnech od zahájení terapie. V České republice je dnes farmakologické ukončení těhotenství možností první volby. Pacientka se vyhne celkové anestezii a operativnímu zásahu. K revizi dělohy lékaři přistupují až při selhání farmakoterapie. Terapie využívá nutnost aktivace progesteronového receptoru v časných fázích těhotenství [30].

Funkčně je mifepriston antagonistou progesteronového ( $\text{IC}_{50} = 0,2 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  [31], transkripční aktivita, PR), glukokortikoidního ( $\text{IC}_{50} = 2,6 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  [31], transkripční aktivita, GR) a androgenního receptoru ( $\text{K}_i = 5,95 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  [32], vazebná inhibice, AR). Chemicky se řadí mezi steroidy [33] (obrázek 4). Molekula mifepristonu je silně hydrofobní, což ulehčuje průchod membránou do buňky, kde interaguje s jadernými receptory. V některých typech buněk se mifepriston chová jako částečný agonista glukokortikoidního receptoru. Podmínkou je nepřítomnost jiných silných agonistů. V buňkách WCL-2 vyvolává až 13,8% aktivaci ve srovnání s odezvou dosaženou pomocí plné saturace dexametazonem. Schopnost aktivovat receptor je závislá na míře exprese GR. Detailní popis lze nalézt v publikaci Zhang a kol. [34].

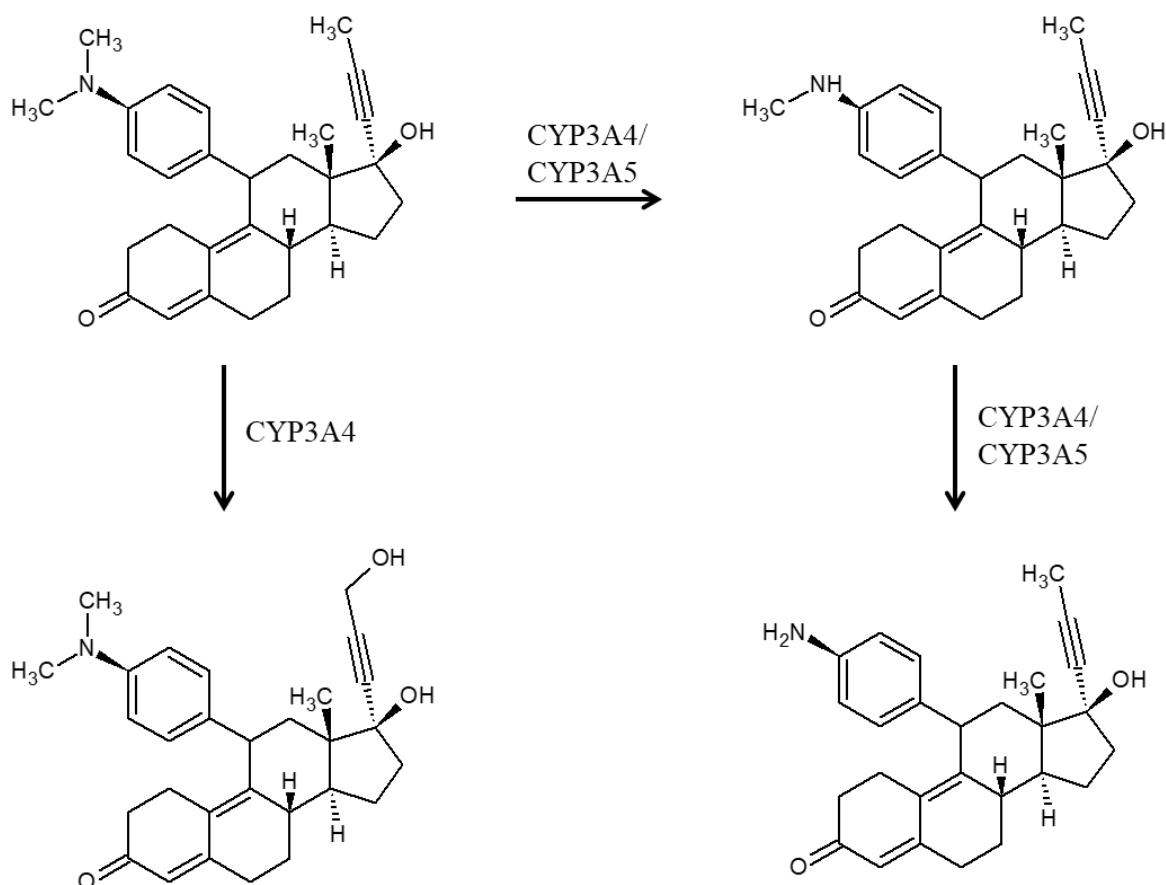


**Obrázek 4: Chemická struktura mifepristonu.** Nakresleno ve freeware ACD/ChemSketch.

Během posledních dvaceti let byla publikována řada článků zhodnocujících působení mifepristonu na různá místa v buňce, čímž může negativně ovlivnit růst a agresivitu nádorů [35]. Příkladem mohou být inhibiční účinky na transportní membránové pumpy, které jsou za spotřeby ATP schopné transportovat xenobiotika přes cytoplazmatickou membránu. Velký význam mají u transportu toxických látek ven z buňky, čímž omezují jejich negativní působení. Nádorové buňky zneužívají schopnost ABC transportérů k odstranění chemoterapeutik, což má za následek zvýšení rezistence vůči terapii. Mifepriston způsobuje relativně nespecifickou inhibici ABC transportérů, což dokazují i výsledky našich akumulčních a cytometrických experimentů [36]. Velmi zajímavou informací byla schopnost mifepristonu upravovat expresi proteinů zapojených do regulace apoptózy, hlavně Bax, Bcl-2 [35] a Mcl-1 [37]. Inkubace mifepristonu s bazálními kmenovými nádorovými buňkami triple-negativního karcinomu prsu způsobila zvýšení exprese miR-153. Výsledkem bylo snížení exprese proteinu KLF5, který zastává roli transkripčního faktoru podporujícího proliferaci, přežívání a růst nádoru. Experimenty provedené s inhibítorem miR-153 a plazmidem pro navýšení exprese KLF5 ukázali částečný zvrát efektu mifepristonu. Z výše uvedených dat lze usuzovat na existenci mechanismu nezávislého na miR-153 [38]. Mcl-1 je navíc jedním z validovaných cílů miR-153 [39], což bylo potvrzeno také v předchozím zmiňovaném článku [38]. Testy s buňkami lymfomu U937 ukázaly schopnost mifepristonu navodit apoptózu přes aktivaci proteinu p38 spolu s úpravou membránového potenciálu mitochondrií a snížením hladiny Mcl-1 [37]. Velmi zajímavý objev ukázaly experimenty na buněčné linii HCC1937, která reagovala na kultivaci s mifepristonem, přestože měla díky RNAi utlumenou expresi GR a AR a prakticky nulovou expresi PR [38]. Získaná data naznačují, že efekty mifepristonu mohou být zprostředkovány jak působením přes steroidní receptory, tak i bez jejich zapojení.

Mifepriston se v organismu metabolizuje dvěma cytochromy P450 (CYP), z nichž hlavní slovo má CYP3A4 [40]. V průběhu těchto reakcí vznikají tři metabolity: na vzniku mono- a didemethylovaných metabolitů se podílí izoformy CYP3A4/3A5, tvorbu hydroxylového metabolitu katalyzuje izoforma CYP3A4 (obrázek 5) [35]. V literatuře byla popsána silná a účinná inhibice CYP3A4 a CYP2B6 *in vitro*, podmíněna přítomností NADPH [41,42]. Inhibice je ireverzibilní, závislá na čase a koncentraci mifepristonu. Zmíněná schopnost souvisí s metabolickou aktivací mifepristonu pomocí CYP schopných hydroxylace na trojně vazbě. Aktivace pravděpodobně probíhá přes reaktivní oxirenový

derivát a keten, které mohou tvořit kovalentní vazbu s apoproteinem CYP nebo se vázat na hem [42]. Naopak CYP3A5 mifepristonem inhibován není [43], protože katalyzuje pouze demethylaci. V důsledku toho se při používání mifepristonu nesmí zapomínat na mezilékové interakce.



**Obrázek 5: Základní metabolismus mifepristonu.** Obrázek převzat z Chen a kol. [35].

### 2.3 Polyfenoly

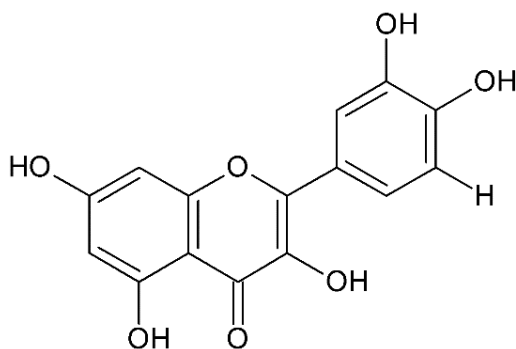
Jedná se o rozsáhlou skupinu přírodních látek označovaných jako sekundární metabolity rostlin. Základním účelem jejich existence je ochrana rostlin před bakteriemi, požírači nebo UV zářením, ale slouží také jako atraktanty pro opylovače [44,45]. Skupina je tvořena více než 6 000 sloučeninami [46]. Rozdělují se na velké množství podskupin, jako jsou anthokyany, flavonoidy, fenolové kyseliny, lignany, kumariny, hydroxyskořicové kyseliny, stilbeny a další [44]. Denní příjem polyfenolů může u mnoha jedinců přesáhnout i 1 g [7,8]. Celá řada těchto látek vykazuje biologickou aktivitu, ať už při pokusech *in vitro*, *in vivo* nebo přímo v lidském organismu [47]. Mezi významné



aktivity se řadí antioxidační a protizánětlivé vlastnosti, ale nelze opomenout ani vliv na signální dráhy [48,49].

### 2.3.1 Kvercetin

Kvercetin patří mezi flavonoidy, do podskupiny flavonolů [50]. Vyskytuje se hojně v potravě od ovoce (jablka) a zeleniny (cibule) počínaje, po nápoje (čaj) a koření konče [51,52]. Jedná se o žlutou krystalickou látku, dobře rozpustnou v DMSO ( $150 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , pokojová teplota) [53], hůře v 50% ethanolu ( $4,02 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) [54] a téměř nerozpustnou ve vodě ( $4,7/10,28 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , hodnota závisí na vlastnostech použitého roztoku PBS) [54,55].



**Obrázek 6: Chemická struktura kvercetinu.** Nakresleno ve freeware ACD/ChemSketch.

V přírodě a lidské dietě se kvercetin nachází ve formě aglykonu a různých glykosidů. Ty mají na základní molekule (obrázek 6) navázanou cukernou jednotku. Příkladem může být glukóza, či další mono nebo disacharidy (rhamnóza, rutinóza) připojené *O*-glykosidovou vazbou na různé uhlíky v molekule kvercetinu. Nejčastěji modifikované místo je uhlík v poloze C-3, ale byly nalezeny i glykosidy modifikované v poloze C-4' a C-7 [56]. Někteří autoři naopak považují za nejčastější 4'-*O*-glukosidy [57]. Mimo to byly v literatuře popsány i C-glykosidy [58]. Glykosidy kvercetinu mají lepší rozpustnost ve vodě, ale jejich biologická aktivita je značně omezena. Podle starších článků nedochází ve střevě ke vstřebávání glykosidů a je nutné tyto látky hydrolyticky štěpit [59]. Jiná publikovaná data ale naznačují, že by k transportu glykosidů mohlo docházet. Aziz a kol. [60] detekovali stopy glykosidů kvercetinu v krvi pokusných zvířat.

První místo, kde může dojít k hydrolyze glykosidů, je dutina ústní. Zde jsou molekuly štěpeny jak přítomnými bakteriemi, tak buňkami sliznice. Walle a kol. dokonce

pozorovali, že část kvercetinu byla epiteliálními buňkami sliznice vstřebána [61]. Významnými deglykosilačními místy v organismu jsou tenké a tlusté střevo, kde se na hydrolytických reakcích podílí různé enzymy, hlavně laktáza-floridzin hydroláza (LPH) nebo cytosolická  $\beta$ -glukosidáza s širokou specifitou [62,63]. Důležitosti LPH nahrává i fakt, že se nachází na lumenální straně kartáčového lemu střeva [62]. Druhý zmíněný enzym je lokalizován v cytosolu enterocytů a hepatocytů a jeho zapojení vyžaduje transport intaktního glukosidu do buňky. V neposlední řadě se na deglykosilaci podílí střevní mikroflóra [61,64], která způsobuje i rychlou degradaci kvercetinu. Tato skutečnost byla pozorována jak v *in vitro*, tak *in vivo* modelech a je doprovázena tvorbou produktů vzniklých rozštěpením aromatických kruhů kvercetinu [64,65]. Rozpad kvercetinu v lidském organismu, ale i u potkanů, může pokračovat až na CO<sub>2</sub>, který byl pozorovaný během experimentů s radioaktivně značeným kvercetinem [66,67].

Kvercetin je po absorpci metabolizován různými enzymy druhé fáze biotransformace. Produkty těchto reakcí jsou převážně glukuronidy a sulfáty, které vznikají v hepatocytech a enterocytech [44,68,69]. Mezi další produkty metabolismu je řazen methylovaný kvercetin [44,69]. Metabolity jsou vylučovány v moči, stolici a nachází se ve vydechaném vzduchu. Pokud jsou konjugáty kvercetinu transportované do stolice, může docházet účinkem bakteriálních enzymů k hydrolytickému štěpení hydrofilní skupiny a aglykon může být opětovně vstřebán [44,70].

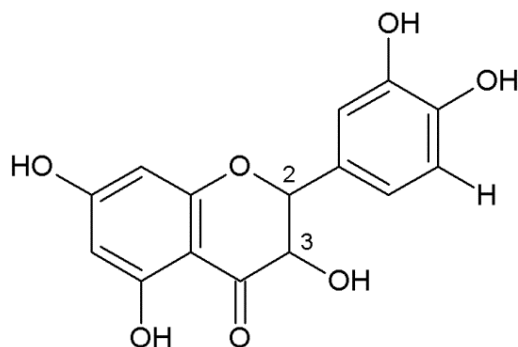
Kvercetin je schopen inhibovat aktivitu některých CYP *in vitro* [71], což může ovlivňovat metabolismus různých léčiv. Pokles exprese mRNA pro CYP1A1 a CYP1B1 byl popsán u buněčné linie CCD-18Co po inkubaci s frakcí bohatou na flavonoly získanou z extraktu listů rostliny *Ilex vomitoria* [72]. Nicméně, v literatuře lze narazit na protichůdné informace. Například pro isokvercitrin (kvercetin-3-*O*-glukosid), který byl podáván potkanům pomocí žaludeční sondy a vyvolal navýšení aktivity tří vybraných CYP [73].

Jedním z cílů současného výzkumu je zvyšování biodostupnosti kvercetinu. Z výsledků publikovaných ve článku Gugler a kol. [74] lze vyvodit závěr, že jednorázové vysoké dávky nevedou ke zvýšené absorpci. Nejvýznamnější překážkou je špatná rozpustnost kvercetinu ve vodě, kterou je možné vylepšit použitím jeho nanočástic [75]. Dále je možné usnadnit vstup přes membrány. Zajímavé řešení je uzavírání kvercetinu do speciálních micel [76] nebo tvorba směsí s různými lipidy [54]. Jiným přístupem pro

překonání nízké biodostupnosti je opakované podávání menších dávek. Hypotéza byla ověřena na lidském modelu při aplikaci 1 g kvercetinů denně po dobu 28 dní. Koncentrace dosažená v plazmě dobrovolníků se blížila hodnotě  $1,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Studie má bohužel velké omezení. Během preanalytické přípravy byly vzorky podrobeny hydrolýze, čímž došlo ke ztrátě veškeré informace o přítomnosti glukuronidů, sulfátů a dalších konjugátů [77]. Ze studie je patrné, že dlouhý eliminační poločas je spojen s bioakumulací kvercetinů.

### 2.3.2 Taxifolin

Jedná se o redukovanou formu kvercetinů, proto se někdy v literatuře označuje jako dihydrokvercetin [78]. Redukce je spojena se zánikem dvojně vazby mezi uhlíky číslo 2 a 3 (obrázek 7). Fyzikálně se jedná o bílou krystalickou látku, někdy s nádechem do hněda. Taxifolin je dobře rozpustný v DMSO ( $60 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a v ethanolu ( $60 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), ale jeho rozpustnost ve vodě a vodných roztocích je relativně nízká, méně než  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .



**Obrázek 7: Chemická struktura taxifolinu.** Nakresleno ve freeware ACD/ChemSketch.

Taxifolin se nachází v modřínu sibiřském (*Larix sibirica*) [79] nebo semenech ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) [78]. Stejně jako oxidovaný protějšek kvercetin, se taxifolin velmi často vyskytuje ve formě různých glykosidů. Sacharidy jako glukóza, arabinóza nebo rhamnóza se obvykle vážou pomocí *O*-glykosidových vazeb. Obvyklá modifikovaná místa jsou pozice C-3, C-3' nebo C-4' [80-85].

Při průchodu střevem dochází k absorpci i degradaci taxifolinu díky přítomné střevní mikroflóře. Degradací produkty budou obdobné jako u kvercetinů, neboť prvním krokem bakteriální degradace kvercetinů je redukce na taxifolin. Postupnou degradací se

budou opět tvořit produkty vzniklé štěpením aromatických kruhů sledované látky jako je kyselina 2-(3,4-dihydroxyfenyl)octová, malé molekuly například butyrát a acetát. V neposlední řadě se tvoří i plyny jako CO<sub>2</sub> [86,87].

Podobně jako jiné flavonoidy je taxifolin po absorpci metabolizován za pomoci enzymů první a druhé fáze biotransformace [88]. Experimenty na suspenzích lidských hepatocytů ukázaly tvorbu velkého množství sulfatovaného taxifolinu. Další pozorovanou modifikací byla methylace. Méně významná byla redukce a kombinace methylace a konjugace s kyselinou glukuronovou [89]. Taxifolin a jeho metabolity se z organismu vylučují v moči nebo přes žluč do stolice [88]. Eliminační poločas stanovený po intravenózní aplikaci 8 mg taxifolinu·kg<sup>-1</sup> je u králíků 0,56 hodiny [90].

Hledání možností navýšení biodostupnosti je i u taxifolinu jedním ze směrů výzkumu. Zajímavým přístupem je tvorba nanočástic. Biodostupnost takto upraveného taxifolinu se při testech na potkanech navýšila přibližně 7krát [91].

## 2.4 mikroRNA

miRNA jsou krátké nekódující sekvence RNA o délce přibližně 18–25 nukleotidů. První záznam o jejich existenci se datuje do roku 1993, kdy Lee a kol. [1] publikovali článek pojednávající o krátké sekvenci RNA přepisované z genu *lin-4*, která je schopná regulovat expresi genu *lin-14*. Popisovaná regulace souvisí s řízením průběhu jednotlivých stádií larválního vývoje háďátka *Caenorhabditis elegans*. Deregulace genu *lin-4* vede k různým odchylkám [1]. V následujících letech došlo k rozsáhlému studiu těchto malých molekul, což vedlo k objevu dalších stovek miRNA. Počet miRNA se neustále mění. Roste v závislosti na nově objevených miRNA, ale může také klesat díky zjištění, že některé miRNA jsou dnes považovány za fragmenty větších molekul. Například miR-923 je označována za fragment 28S rRNA [92]. miRNA jsou zajímavé obzvláště svou schopností ovlivňovat expresi různých genů, a to ne jednoho, nýbrž desítek až stovek v závislosti na tkáni a stimulaci. Celou situaci stěžuje schopnost různých miRNA regulovat stejné cílové mRNA, viz. miRTarBase [93]. V současnosti se počet prekurzorů ustálil na čísle 1917 (miRBase 22, <http://www.mirbase.org/>).

Studium exprese a expresních profilů miRNA mezi nádorovou a nenádorovou tkání ukázalo, že mnoho miRNA vykazuje různou úroveň deregulace, která často souvisí

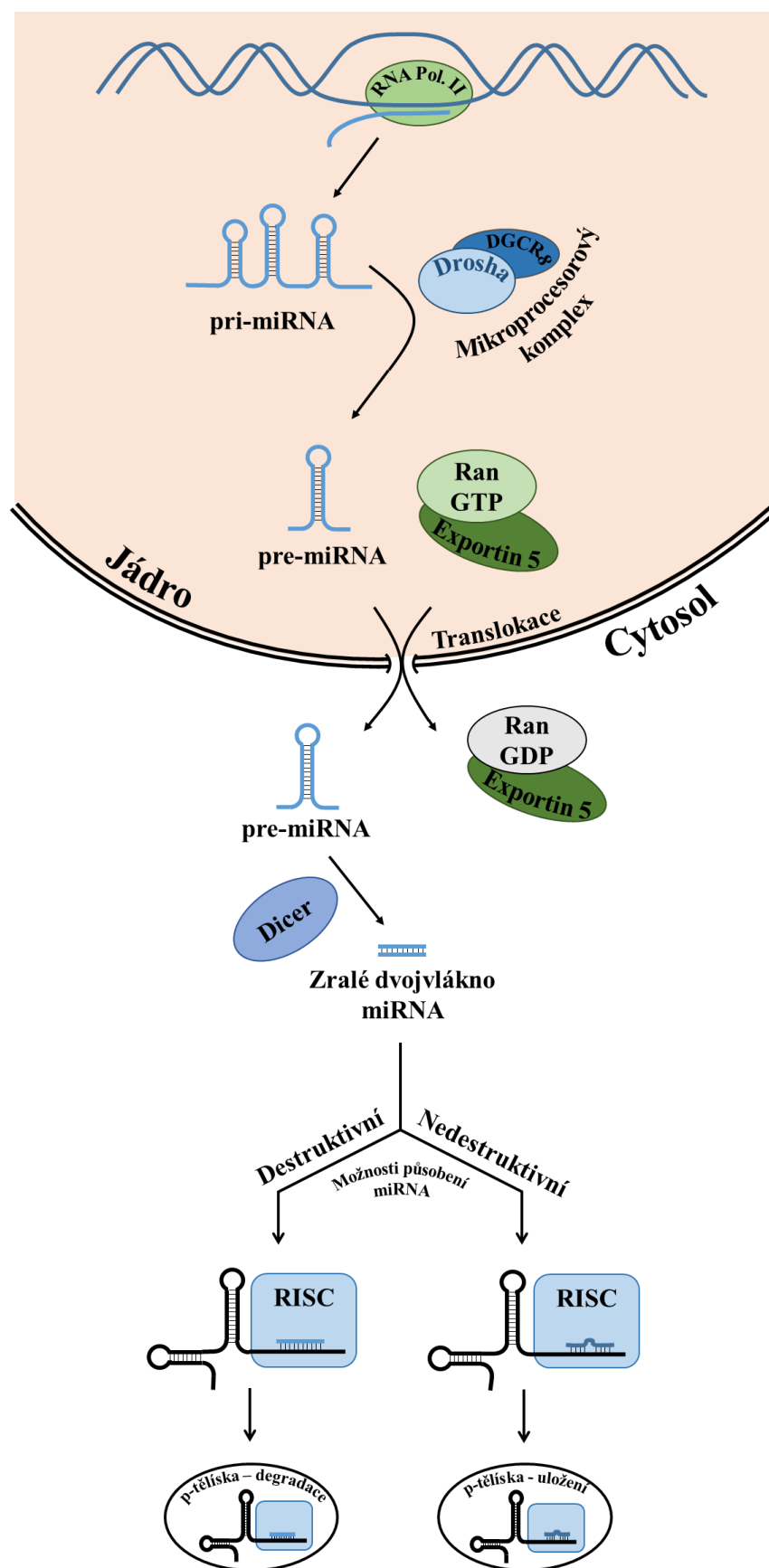
s agresivnějším charakterem nádorového onemocnění [94] nebo vyšším rizikem metastazování [95]. miRNA byly detekovány v různých tělních tekutinách jako je plazma, sérum a v mnoha dalších, kam se dostávají za pomoci aktivního transportu, tvorby mikrovezikul nebo uvolněním během apoptózy [96,97]. Existence miRNA v těchto agresivních prostředích ukazuje na její relativně velkou stabilitu, čemuž dopomáhají její transportní formy tvořené extracelulárními vezikuly nebo putuje navázaná na speciálních lipidech. Uvažuje se o existenci mezibuněčné komunikace zprostředkované cirkulujícími miRNA [97,98]. Složení cirkulující miRNA se v krvi liší mezi vzorky získanými od zdravých dárců a onkogenních pacientů, proto mají tyto molekuly velký potenciál jako prognostické a predikční markery. Změna množství takových miRNA poskytuje informaci o přítomnosti některých typů onkologických onemocnění [96,99]. Výhodou takových stanovení je nízká invazivita vyšetření. Jako každá metoda má i sledování cirkulující miRNA své stinné stránky. Problém může nastat při hemolýze krve, kdy se celková miRNA obohacuje o oligonukleotidy z rozpadlých červených krvinek [100]. Mnoho miRNA je současnou literaturou označováno za nádorově supresorové nebo onkogenní, na základě kombinace jejich deregulace a cílových proteinů. Bohužel toto označení není absolutní, protože miRNA může vykazovat konfliktní chování v závislosti na typu nádoru. Krásným příkladem je rodina miR-29 [101] nebo miR-944 [102,103]. Jako prognostický faktor nemusí sloužit jenom míra exprese jednotlivých miRNA. Ukazuje se, že jednobodové mutace hrají důležitou roli v časném výskytu některých nádorových onemocnění. Studie z roku 2008 publikovaná Shenem a kolektivem [104] jasně prokazuje význam jednobodového polymorfismu v prekurzoru pro miR-146a a jeho souvislost s nižším věkem diagnostikování familiárního karcinomu prsu nebo vaječníků.

## 2.5 Biogeneze miRNA

Biogeneze miRNA začíná přepisem příslušného genu z DNA do formy primárního transkriptu (pri-miRNA), nejčastěji za katalýzy RNA polymerázy II [105]. V roce 2006 byla vydána publikace, kde Borchert a kol. prokázali podíl RNA polymerázy III na přepisu části genů miRNA [106]. Primární transkript je molekula dlouhá i více než jednu tisícovku bází, která je postupně zkracována až na finální délku 18–25 nukleotidů procesy souhrnně označovanými jako zrání. Ještě v jádře je primární transkript upraven dalšími enzymy, které se podílejí na vzniku kratší, přibližně 70 nukleotidů dlouhé molekuly,

nazývané prekurzorová miRNA (pre-miRNA). Obzvláště důležité součásti mikroprocesorového komplexu jsou proteiny Drosha, člen rodiny RNáz III a DGCR8 (*DiGeorge syndrom critical region 8*) [107,108]. Pre-miRNA je z jádra přenášena jaderným exportním systémem za využití RanGTP a proteinu Exportin 5 [109,110]. Po uvolnění do cytosolu k molekule okamžitě přistupuje RNáza III Dicer a dochází k vytvoření duplexu RNA o konečné délce přibližně 22 nukleotidů [111,112]. Posledním krokem je rozvinutí duplexu miRNA a zabudování jednoho z vláken do komplexu RIS (RNA-induced silencing complex). Rozplétání zahajuje N-doména proteinu Argonaut 2 [113], která je součástí komplexu RIS spolu s proteiny jako jsou Dicer a TRBP [114]. O zabudování vlákna do komplexu rozhoduje termodynamická stabilita jednotlivých vláken. Vlákno s méně stabilním párováním na 5' konci je zabudováno do komplexu RIS a nese označení vedoucí vlákno. Vlákno určené k degradaci je charakterizováno stabilnějším párováním [115]. V tuto chvíli vzniká aktivní komplex schopný štěpit cílové mRNA. K určování cílových mRNA dochází na základě „seed sekvence“, která leží na 5' konci oligonukleotidu mezi nukleotidy 2–7. Přesnost komplementarity proti 3'UTR oblasti cílové molekuly mRNA rozhodne o jejím dalším osudu. Při plné komplementaritě dojde ke snížení stability mRNA, výsledkem je její degradace mRNA a ztráta signálu pro translaci. Pokud dojde k neúplné komplementaritě, blokuje komplex RIS ribozomální translaci, ale nedochází k okamžitému štěpení molekuly [116]. Komplexy miRNA/RISC jsou s největší pravděpodobností skladovány a degradovány v p-tělískách. Bližší informace o p-tělískách lze najít v přehledovém článku publikovaném Parkrem a kolegy [117].

Výše popsaná cesta je označovaná jako kanonická a reprezentuje majoritní způsob syntézy miRNA. Průběh kanonické dráhy demonstruje obrázek 8. Kromě výše zmíněné cesty bylo objeveno několik minoritních, které se označují jako nekanonické, vyznačující se vynecháním některého ze základních kroků biogeneze. Tyto cesty byly objeveny při sledování klíčových proteinů pro biogenezi miRNA. Jedná se o Drosha a DGCR8 nezávislou dráhu [118], popisovanou u zvláštní skupiny miRNA, která je zpracovaná pomocí spliceozomu místo mikroprocesorového komplexu. Terminální uridyl transferázy jsou součástí nekanonické tvorby některých členů rodiny let-7 označovaných jako skupina II [119] nebo na diceru nezávislá dráha objevená u miR-451 [120]. Více informací o těchto drahách lze dohledat v přehledovém článku Ha a kol. [121].



**Obrázek 8: Biogeneze miRNA pomocí kanonické cesty.** Obrázek vytvořen v softwaru PowerPoint podle nastudované literatury.

Expresí miRNA může být regulovaná například dlouhými nekódujícími RNA (lnc-RNA). Tyto molekuly RNA jsou schopné vychytávat specifické miRNA na principu napodobování 3'UTR konce jejich cílových mRNA [122].

Aby vše nebylo tak jednoduché, v roce 2007 publikovali v časopise *Science* článek, který standardní dogma efektu miRNA narušil [123]. Publikace popisuje molekuly miRNA, které po zastavení buněčného cyklu vystupují jako aktivátory exprese. Studie byla provedena s miR-369-3 a na AU bohatým elementem (ARE) lokalizovaným v 3'UTR oblasti mRNA tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Expresní plazmid s ARE v 3'UTR oblasti vykazoval navýšení exprese v přítomnosti miR-369-3 za bez sérových podmínek. Podobný efekt sledovali autoři i se synteticky připravenou miRNA v kombinaci s komplementárním plazmidem nebo let-7 a plazmidem obsahujícím 3'UTR oblast HMGA2. Pro navýšení exprese jsou potřebné proteiny FXR1 a AGO2 [123].

## 2.6 Rodina miR-29

Rodina miR-29 se skládá ze tří členů, jmenovitě miR-29a, miR-29b a miR-29c, označovaných jako izoformy. Sekvence jednotlivých izoform se liší pouze minimálně, což způsobuje překryv jejich validovaných cílů (viz. MirTarBase [93], <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>). Přesné rozdíly mezi izoformami jsou popsány na obrázku 9, modul A. Geny pro jednotlivé izoformy miR-29 leží ve dvou klastrech označovaných jako miR-29a/b-1 a miR-29b-2/c [124]. Klastř miR-29a/b-1 se nachází na chromozomu 7 v oblasti q32.3, kdežto klastř miR-29b-2/c je umístěn v oblasti q32.2 na chromozomu 1 [125]. Výše uvedený text obsahuje jednu velice zajímavou informaci, a to existenci dvou genů pro izoformu miR-29b, což se odráží ve vzniku dvou různých prekurzorových molekul pre-miR-29b-1 a pre-miR-29b-2. Produkty těchto dvou genů mají sekvenci totožnou. Oproti nenádorové tkáni je v nádorech exprese členů rodiny miR-29 často deregulovaná [126] a její snížení je spojováno s horší prognózou pacientů [127]. miR-29b je považována za regulátor EMT [128].



A

Sekvence zralých izoforem miR-29

miR-29a

5' UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA 3'

miR-29b

5' UAGCACCAUUGAAAUCAGUGUU 3'

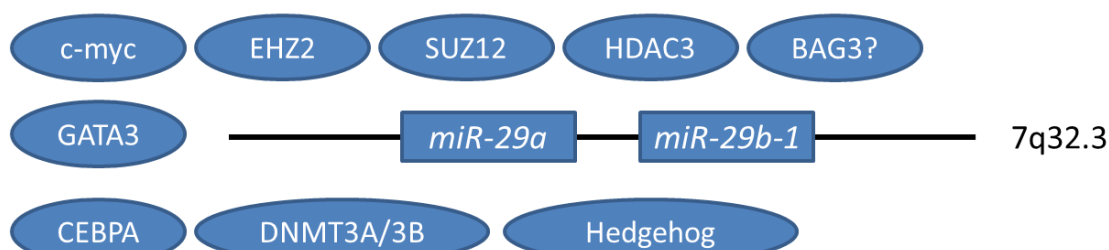
miR-29c

5' UAGCACCAUUGAAAUCGGUUA 3'

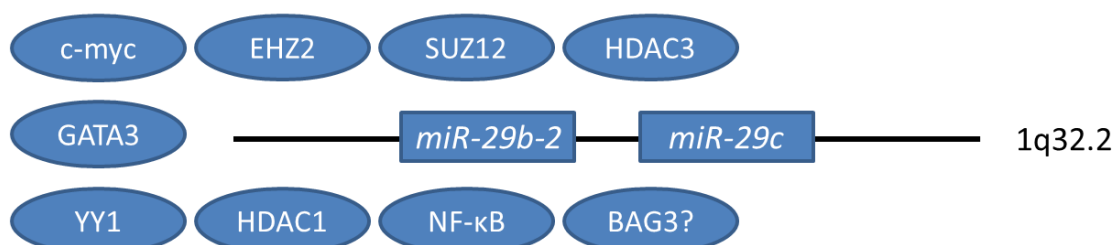
B

Genové klastry pro rodinu miR-29 a jejich regulace

Klastr miR-29a/b-1



Klastr miR-29b-2/c



**Obrázek 9: Základní charakteristika rodiny miR-29.** Modul A reprezentuje zralé sekvence jednotlivých izoforem rodiny miR-29. Odlišnosti sekvencí jednotlivých izoforem v porovnání s miR-29a jsou označeny červeně. Modrý rámeček charakterizuje „seed sekvenci“, která se nachází mezi nukleotidy 2–7. Sekvence jsou zapsány ve směru od 5' konce k 3' konci. Modul B reprezentuje jednotlivé klastry rodiny miR-29 a možnosti regulace jejich exprese. Modul B převzat z Jiang a kol. [126], následně upraven a doplněn.

### 2.6.1 Základní regulace exprese rodiny miR-29

Regulace exprese miR-29 může být zprostředkována přes signální molekuly, které se podílejí na iniciaci transkripce jednotlivých genových klastrů. Druhou, neméně významnou možností je epigenetická regulace pomocí deacetylce a methylace promotorových oblastí. Pokud se zaměříme blíže na regulační proteiny, můžeme si

povšimnout různé selektivity proti jednotlivým klastrům. Proteiny c-myc nebo GATA3 jsou schopné regulace obou klastrů, ale DNMT3A, DNMT3B nebo Yin Yang 1 (YY1) se podílí pouze na regulaci jednoho z klastrů.

Onkogenní transkripční faktor c-myc je díky signalizaci/amplifikaci často nadexprimován v širokém spektru nádorů [124,129-131], kde se podílí na epigenetickém snížení exprese miR-29. Průběh této regulace byl postupně objasněn ve třech článcích. V únoru roku 2012 byl publikován článek popisující epigenetickou regulaci miR-29 za pomoci zvýšené exprese histonacetyláz (HDAC) [132]. V publikaci se autoři zaměřili na chronickou lymfocytární leukemii, kde bylo popsáno negativní ovlivnění exprese miR-29b přibližně u 37 % případů. Kromě miR-29b se autoři zaměřili na další dva nádorové supresory miR-15a a miR-16 [132]. V červnu a v říjnu téhož roku vyšly dvě publikace, jejichž autory jsou Zhang a kol. [133,134]. Články naznačují podíl c-myc na zapojení HDAC, která má dopad jak na miR-29b, tak na miR-15a a miR-16 [133,134]. C-myc tvoří spolu s HDAC3, enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) a suppressor of zeste 12 protein homolog (SUZ12) transkripční ko-represorový komplex, kde HDAC3 zprostředkovává spojení mezi c-myc a proteiny SUZ12 a EZH2. HDAC3 katalyzuje deacetylaci na histonu H3 a EZH2 se podílí na trimethylaci jeho lyzinu 27, což má za následek potlačení transkripce miR-29. Regulace c-myc probíhá na více úrovních. Zhang a kolektiv popisují zapojení c-myc v regulaci EZH2 za vzniku pozitivní zpětnovazebná smyčka. C-myc je schopný regulovat expresi miR-26a, která negativně ovlivňuje tvorbu EZH2. EZH2 naopak inhibuje miR-494, jejímž validovaným cílem je právě c-myc [134].

Transkripční faktor GATA3 je důležitý pro správnou diferenciaci luminálních epiteliálních buněk mléčné žlázy. Narušení jeho exprese nebo funkce se často objevuje u karcinomu prsu, což má za následek modulaci mikroprostředí uvnitř nádoru spojené se snazším metastazováním. Zvýšená invazivita je spojována se změnou exprese miR-29, kterou GATA3 indukuje přímo přes vazebná místa na promotorech obou klastrů, ale i nepřímo přes regulaci exprese transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) a jaderného faktoru kappa B (NF- $\kappa$ B) [95].

Jiné signální molekuly vykazují specifickou regulační funkci pouze proti jednomu z klastrů. Příkladem může být protein CCAAT/enhancer-binding protein-alpha (CEBPA), který v myeloidních leukemických buňkách ovlivňuje pouze transkripci klastru

miR-29a/b-1. Na klastr miR-29b-2/c nemá žádný vliv [135]. Další dráhou regulující klastr miR-29a/b-1 je hedgehog dráha, která expresi miR-29b potlačuje [131].

U nemalobuněčného karcinomu plic byla prokázána hypermethylace klastru miR-29a/b-1 způsobená enzymy DNMT3A a DNMT3B. Epigenetická regulace klastru miR-29b-2/c pomocí DNMT nebyla pozorována [136].

Publikace Wang a kol. [137] popisuje vliv dráhy NF- $\kappa$ B na potlačení exprese klastru miR-29b-2/c. Aktivace NF- $\kappa$ B vede k navýšení exprese transkripčního cíle YY1, který tvoří s proteiny HDAC1 a EZH2 regulační komplex. Vazba komplexu na klastr probíhá přes regulační oblast v blízkosti počátku transkripce a vyvolává epigenetické utlumení miR-29b-2/c. YY1 je validovaným cílem rodiny miR-29, což vede ke vzniku zpětnovazebné smyčky, která se využívá při diferenciaci myoblastů na myotubuly [137]. Snížení exprese miR-29 přes dráhu NF- $\kappa$ B popisuje i článek Mott a kol. [131]

Publikace Sugio a kol. [138] obsahuje informaci o negativní regulaci miR-29b za pomoci navýšení exprese Bcl-2 associated athanogene 3 (BAG3), který tímto způsobem ovlivňuje množství proteinu Mcl-1 v buňkách karcinomu vaječníku, což vede ke zvýšení chemorezistence [138]. Podobný efekt popsali i Habata a kol. [139] u buněk adenokarcinomu endometria. Snížení exprese miR-29b způsobené proteinem BAG3 mělo za následek významné navýšení množství matrixové metaloproteinázy 2 (MMP2). Výsledkem byla vyšší invazivita a metastatický potenciál testovaných buněk [139]. Metaloproteinázy jsou obecně spojené s modulacemi extracelulární matrix a ulehčují migraci nádorových buněk. Články však nepopisují mechanismus, kterým BAG3 snižuje expresi miR-29b.

### **2.6.2 Specifická odlišnost miR-29b od ostatních členů rodiny**

Jednotlivé izoformy rodiny miR-29 se liší různou mírou zastoupení mezi jádrem a cytosolem. miR-29b vykazuje na rozdíl od ostatních izoform majoritně jadernou lokalizaci, kterou určuje specifická šesti-nukleotidová sekvence na 3' konci molekuly [140].

### 2.6.3 Vliv rodiny miR-29 na regulaci buněčných dějů

Významným validovaným cílem rodiny miR-29 jsou proteiny DNMT3A a DNMT3B [141], které hrají důležitou roli v methylaci DNA. Pokud je exprese DNMT snížena, může docházet k nedostatečné methylaci související s aktivací onkogenů. Naopak při nadbytku lze očekávat zvýšenou aktivitu a možnost epigenetického zablokování důležitých tumor supresorových genů. Příkladem může být Wnt signalizace, která u nemalobuněčného karcinomu plic podléhá aberantní aktivaci díky hypermethylaci promotoru Wnt inhibičního faktoru 1 (WIF-1) [142]. Navýšení exprese rodiny miR-29 je schopné díky negativní regulaci DNMT3A/3B zvrátit methylaci promotoru proteinu WIF-1. Buňky ošetřené prekurzory miR-29 vykazují pokles viability a významnou aktivaci apoptózy. Autoři Tan a kol. [136] v článku z roku 2013 popisují zpětnovazebnou smyčku mezi DNMT3A/3B a klastrem miR-29a/b-1.

miR-29 ovlivňuje významné regulátory apoptotické signalizace Mcl-1 [4] nebo Bcl-2 [127]. Dráha p53, která podobně jako rodina Bcl-2 reaguje na buněčný stres, je také regulovaná rodinou miR-29. Navýšení množství miR-29 negativně reguluje expresi proteinů p85 $\alpha$  a CDC42, které se řadí mezi inhibitory exprese proteinu p53. Výsledkem je navýšení exprese proteinu p53, což se projeví na množství buněk vstupujících do apoptózy [143].

miR-29 má antifibrotický efekt zprostředkovaný modulací proteinů působících v extracelulární matrix. Příkladem mohou být elastin [144], fibrilin 1 [145], MMP-2 nebo různé kolageny [146]. Působení bylo pozorováno na různých orgánech včetně plic, srdce, ledvin a jater [125].

Rodina miR-29 je obecně označovaná jako tumor supresorová, nicméně byla pozorována situace, kdy působí onkogenně [126,128,147]. Například navýšení exprese miR-29a, které se významně podílí na vzniku indolentní formy chronické lymfocytární leukemie [101].

## 2.7 Působení kvercetinu na expresi miRNA

Kvercetin je znám svými rozsáhlými biologickými účinky od anti-radikálového působení, přes ovlivňování různých signálních drah, až po vliv na expresi miRNA. Následující text je zaměřený na poslední zmiňovaný efekt a je rozdělen na odstavce podle jednotlivých miRNA. Charakterizace experimentů, souhrn ovlivněných miRNA a jejich validované či předpokládané dopady na buňku shrnují tabulka 1, tabulka 2 a tabulka 3.

### 2.7.1 Studie zaměřené na *in vitro* experimenty

#### miR-16

Skupina japonských vědců zkoumala vliv kvercetinu na buněčné linii adenokarcinomu plic A549. Inkubace s kvercetinem v koncentraci  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  navyšovala expresi miR-16 přibližně na 1,4násobek negativní kontroly po 24 hodinové expozici. Inkubace v délce 6 a 24 hodin měly za následek snížení množství Claudinu-2 na úrovni mRNA a proteinu. Pro potvrzení vlivu kvercetinu na miR-16 byl využit miR-16 inhibitor, který účinky kvercetinu částečně zvrátil [148].

#### miR-17-3p

Profilování exprese miRNA provedené na buněčném modelu kolorektálního adenokarcinomu Caco-2 TC7 odhalilo zvýšenou expresi 33 miRNA v reakci na kvercetin v koncentraci  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Doplnková tabulka ve článku Lesjak a kol. [149] uvádí 35 miRNA. Mezi navýšenými miRNA byla miR-17-3p, jejíž vazebné místo je obsaženo v 3'UTR oblasti mRNA pro ferroportin. Ověření analýzou RT-PCR potvrdilo nárůst exprese miR-17-3p o 90 arbitrárních jednotek (AJ) ve srovnání s neošetřenou kontrolou. Autoři dále uvádí, že kvercetin a jeho 4'-*O*-methylovaný derivát zvyšují absorpci a zároveň snižují export železa v duodenu potkana. Ferroportin je membránový transportér železa ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) ve střevě, umístěný v bazolaterální membráně enterocyty [149], kde se podílí na transportu železa z intracelulárního do extracelulárního prostoru. Regulace tohoto proteinu představuje možný benefit pro pacienty trpící hemochromatózou IV. typu [150].

miR-21

miR-21 je obecně považována za onkogenní miRNA, která hraje důležitou roli v regulaci proliferace, apoptózy nebo metastazování [151,152]. V rámci literární rešerše jsme narazili celkem na pět článků popisujících vliv kvercetin na tuto miRNA v různých modelech.

Článek autorů Yang a kol. [153] popisuje snížení exprese miR-21 v buněčné linii karcinomu prostaty PC-3 po inkubaci s kombinací kvercetin:hyperosid (kvercetin-3-galaktosid) v poměru 1:1. Kombinace vyvolala 4,3násobné snížení exprese miR-21. Pozorovaná redukce byla doprovázena navýšením exprese nádorového supresoru PDCD4 na úrovni mRNA a proteinu [153]. Stejnou kombinaci látek skupina testovala v roce 2014 na buňkách renálního adenokarcinomu 786-O, kde pozorovali modulaci miR-27a. Jelikož je hyperosid glykosid kvercetin, synergický efekt může být způsoben navýšením koncentrace volného kvercetin za pomoci deglykosylace. Tuto úvahu lze aplikovat na oba články [153,154].

Arctigenin ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a kvercetin ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) je další kombinací látek se schopností snižovat expresi miR-21. Autoři provedli experiment na modelech karcinomu prostaty reprezentovaných buněčnými liniemi LAPC-4 a LNCaP. Kombinace testovaných látek vyvolala přibližně 1,7/1,25násobné snížení exprese po 48 hodinách inkubace. Naopak samotný kvercetin expresi překvapivě navyšoval 1,4/1,7násobek kontroly. V rámci studie byl popsán i vliv testovaných látek na miR-19b a miR-148a (viz. tabulka 1). Ve studii bohužel nebyl ověřen dopad žádné z modulovaných miRNA na jejich validované cíle. Z výsledků je zřejmé, že buněčná linie LAPC-4 je vůči kombinaci testovaných látek citlivější [155].

Buněčná linie MCF-7 odvozená od karcinomu prsu reagovala na 24 hodinovou inkubaci s kvercetinem v koncentraci  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  2násobným snížením exprese miR-21. Objevená deregulace vede k navýšení množství mRNA kódujících proteiny PTEN a Maspin, validovaných cílů miR-21. Proliferace MCF-7 byla významně snížena pouze při koncentraci kvercetin  $50$  a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Publikace obsahuje nesrovnalost mezi informacemi prezentovanými v textu ( $\text{IC}_{50} = 7,06 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a obrázku pro  $\text{IC}_{50}$  [156].

Lidské tělo je trvale vystaveno různým škodlivinám ze životního prostředí. Velkou vstupní cestou, ale i postiženým místem jsou plíce. Jakožto významná součást dýchacích

cest jsou zasazeny množstvím polutantů obsažených ve vdechovaném vzduchu. Jednou z těchto škodlivin je karcinogenní šestimocný chrom, který je znám svou schopností iniciovat tvorbu ROS. Pratheeskumar a kol. [157] zvolili dichroman draselný jako zdroj chromových iontů pro akutní i chronické experimenty, kde navyšoval expresi miR-21 korespondující s mírou oxidačního stresu. Kvercetin ve zvolených koncentracích snižoval expresi miR-21 v testované buněčné linii BEAS-B2, což mělo za následek nárůst exprese proteinu PDCD4. Akutní přístup byl charakterizován 24 hodinovou inkubací, během které kvercetin vyvolal 3násobné snížení exprese miR-21 ve srovnání s pozitivní kontrolou. Při chronickém přístupu byla délka kultivace s testovanými látkami 2/4/6 měsíců. Dlouhodobá inkubace s chromem měla vyvolat maligní transformaci. Buňky ošetřené kvercetinem vykazovali její zmírnění díky snížení exprese miR-21 2,1/2,5/5,0×. Poslední dva provedené experimenty využily myši xenograftový model. První experiment využíval chromem transformované buňky (CrT) aplikované subkutánně do slabin. Po dosažení zvolené velikosti nádoru byla zahájena 30 denní terapie s kvercetinem ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), která vyvolala pokles exprese miR-21 ( $1,5\times$ ) spojený s menší velikostí nádorů. Ve druhém experimentu byly aplikovány buňky BEAS-B2 kultivované 6 měsíců s  $0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{Cr}^{\text{VI}}$  nebo jeho kombinací s kvercetinem v koncentraci  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Autoři opět pozorovali pokles exprese miR-21 ( $1,7\times$ ) a menší velikost nádorů ve skupině ošetřené kvercetinem. Velmi slibný se jeví protektivní účinek relativně nízkých dávek kvercetinu během chronických experimentů [157].

V roce 2018 byl popsán antifibrotický efekt kvercetinu na modelu epiteliálních buněk ledvinového tubulu HK-2. Preinkubace buněčné linie s TGF- $\beta$  způsobila navýšení množství miR-21-5p. Během experimentu docházelo k 1,4násobnému snížení množství miR-21 po ošetření kvercetinem v koncentraci  $15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  ve srovnání s TGF- $\beta$  pozitivní kontrolou. Snížení miR-21 bylo doprovázeno navýšením množství PTEN a TIMP3 na úrovni mRNA i proteinu. Článek bohužel nezmiňuje délku inkubace. Použití syntetických oligonukleotidů imitujících miR-21 efekt kvercetinu částečně zvrátilo. Koncentrace uvedená ve článku vyvolává otázku, zda se jedná o finální koncentraci aplikovanou na buňky. Tak vysoké koncentrace totiž budou ve vodných roztocích velmi obtížně dosažitelné [158].

miR-27a

Del Follo Martinez s kolegy [159] publikoval v roce 2013 studii zkoumající vliv kombinace resveratrolu a kvercetinu v poměru 1:1 na buněčném modelu karcinomu tlustého střeva. Kombinace testovaných látek v koncentraci  $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  byla inkubována s buněčnou linií HT-29 po dobu 24 hodin. Výsledkem byl dvojnásobný pokles exprese miR-27a spojený s navýšením hladiny proteinu ZBTB10 (zinc finger and BTB domain containing protein 10), který může způsobovat inhibici Sp transkripčních faktorů (Specificity Protein). Efekt kvercetinu byl potvrzen pomocí molekul napodobujících miR-27a. Tato miRNA je označována za onkogenní [159].

Velmi podobný článek publikovala skupina Li a kol. [154], kde využili totožný návrh experimentů jako Del Follo Martinez a kol. [159], rozdíl byl pouze v použité kombinaci přírodních látek a buněčné linii. Li a kol. [154] se zaměřili na kombinaci kvercetinu a hyperosidu v poměru 1:1 testovanou na buněčné linii 786-O představující model renálního adenokarcinomu. Výsledky RT-PCR ukázaly 2násobný pokles exprese miR-27a v reakci na použitou směs polyfenolů. Další dopad na buňky je obdobný jako u předchozího článku. Navýšení exprese ZBTB10 spojené s inhibicí Sp1 [154]. Velmi překvapivé bylo zjištění, že publikované výsledky se velmi podobají výše zmíněnému článku od autorů Del Follo Martinez a kol. [159]. Podobnost lze pozorovat i v různých částech textu [154].

miR-142-3p

Buněčné linie duktálního adenokarcinomu pankreatu MIA-PaCa-2 a Capan-1, stejně jako buněčná linie S2-013 odvozená od jaterní metastázy karcinomu pankreatu byly vystaveny kvercetinu v koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Inkubace vyvolala více než 3násobné navýšení exprese miR-142-3p u MIA-PaCa-2 a S2-013 a 9 násobné u Capan-1. Publikace je ale převážně zaměřena na další testovanou látku – triptolid [160].



### miR-145

Vliv kvercetinu na expresi miR-145 byl popsán v modelu karcinomu vaječníků. Buněčné linie SOKOV-3 a A2780 byly vystaveny kvercetinu v koncentraci  $100 \mu\text{m}\cdot\text{ml}^{-1}$  po dobu 24 hodin. Článek charakterizuje množství testované látky jednotkou  $\mu\text{m}\cdot\text{ml}^{-1}$ , nicméně není jasné, co tato nestandardní jednotka představuje, protože při úvaze  $1 \mu\text{m} = 1 \mu\text{mol}$  vychází  $100 \mu\text{m}\cdot\text{ml}^{-1}$  jako  $0,1 \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Publikace uvádí, že výsledkem bylo navýšení exprese miR-145 na 3/3,5násobek kontroly. Článek již bohužel neřeší jaký protein/jaké proteiny jsou miR-145 ovlivněny a věnuje se pouze efektu pozorovanému na celé buňce, kde kvercetin inhiboval růst a zesílil aktivaci kaspázy-3. Autoři využili pro tyto experimenty koncentraci  $50 \mu\text{m}\cdot\text{ml}^{-1}$ , která odpovídá přibližně hodnotě  $\text{LD}_{50}$  po 48 hodinové inkubaci [161].

### miR-146a

miR-146a je známá svým zapojením v jemné regulaci vrozené zánětlivé odpovědi, především díky negativnímu vlivu na expresi proteinů IRAK1 a TRAF6 [162]. Příkladem důležitých validovaných cílů z pohledu nádorů jsou BRCA1 a BRCA2 [104] podílející se na opravě dvouvláknových zlomů DNA. Dalším velmi známým cílem je receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) představující transmembránovou tyrozin kinázu spojenou se signalizací přežití a agresivním chováním nádorových buněk [163].

V roce 2011 byl publikován článek, který popisuje efekt na flavonoidy bohaté frakce extraktu listů rostliny *Ilex vomitoria* na miR-146a [72]. Analýza pomocí HPLC/MS/MS<sup>2</sup>/MS<sup>3</sup> označila za hlavní komponenty frakce kvercetin-3-rutinosid a kaempferol-3-rutinosid. Množství polyfenolů v testované frakci bylo vyjádřeno v ekvivalentech kyseliny gallové $\cdot\text{l}^{-1}$  ( $\text{GAE}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Buněčná linie CCD-18Co, reprezentující normální fibroblasty tlustého střeva, vykazovala po stimulaci LPS snížení exprese miR-146a oproti neošetřené kontrole. Koncentrace  $40 \text{mg GAE}\cdot\text{l}^{-1}$  navrácí expresi miR-146a sníženou pomocí LPS na úroveň neošetřené kontroly. Zajímavé výsledky se objevují ve fázi ověření sledovaného efektu přes anti-miR, kdy buňky současně ošetřené polyfenolovou frakcí ( $20 \text{mg GAE}\cdot\text{l}^{-1}$ ), LPS a anti-miR-146a dosahují vyšší exprese než neošetřená kontrola. Autoři dále navrhuji, že miR-146a přispívá k protizánětlivým vlastnostem testované frakce díky regulaci validovaných cílů IRAK-1 a TRAF-6 [72].

Další článek, který se zabýval vlivem kvercetinu na totožnou miRNA, publikovali Tao a kol. v roce 2015 [164]. Experimenty byly provedeny na lidských buňkách karcinomu prsu. Při nejvyšší koncentraci kvercetinu ( $100 \mu\text{m}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) došlo u buněčných linií MCF-7/MDA-MB-231 k 4,0/4,5násobnému nárůstu exprese miR-146a ve srovnání s kontrolou. Doba kultivace s kvercetinem činila 48 hodin. Mezi proteiny reagujícími na změnu exprese sledované miRNA byly EGFR (snížená exprese), kaspáza-3 a Bax (navýšená exprese). Délka experimentu pro proteinovou analýzu metodou western blot činila pouze 24 hodin. Autoři pokračovali ve studii experimentem *in vivo* na potkaním xenograft modelu. Kvercetin v dávce  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  po dobu 8 týdnů snižoval růst nádoru a dvojnásobně navýšoval expresi miR-146a u nádorových buněk. Na druhou stranu článek obsahuje nesrovnalosti mezi textem a obrázky [164]. Role miR-146a je v buněčné linii MCF-7 nejednoznačná. Tvzení podporuje publikace Gao a kol. [165], kde navýšení proliferace kopíruje míru exprese miR-146a-5p. Data naznačují přítomnost dalšího vlivu kvercetinu, který je v součinnosti s navýšením exprese miR-146a.

### miR-155

LPS stimulace buněčné linie myších makrofágů RAW264.7 měla za následek dvanáctinásobné navýšení exprese miR-155 proti negativní kontrole. Boesch-Saadatmandi a kol. [166] provedli experimenty, které ukázaly schopnost kvercetinu/isorhamnetinu snižovat efekt LPS o přibližně 1,8/1,5×. Autory navrhovaný mechanismus regulace miR-155 využívá přímou modulaci miRNA a nepřímou modulaci přes NF- $\kappa$ B. Kvercetin-3-glukuronid, který se považuje za velmi častý metabolit, nevykazoval žádný efekt [166].

### Rodina let-7

Další dva články prokázaly vliv kvercetinu na tumor supresorovou rodinu let-7. V roce 2014 publikovali Appari a kol. [167] práci popisující navýšení exprese let-7a po 72 hodinové inkubaci kvercetinem nebo jeho kombinací s buněčnými liniemi duktálního adenokarcinomu slinivky MIA-PaCa2, BxPC-3 a PacaDD-183. Ve srovnání s negativní kontrolou docházelo k navýšení přibližně 2,45/1,6/1,45násobku u buněk ošetřených kvercetinem a v rámci kombinace sulforafan/kvercetin byl pozorován synergní účinek

s navýšením na 3,0/2,3/2,45×. Při kombinaci kvercetinů a katechinů ze zeleného čaje dosáhlo navýšení hodnot 3,2/3,1/3,1×. Popisované navýšení miRNA se projevilo na regulaci proteinu K-Ras [167]. Regulace Ras pomocí let-7a je v souladu s dalšími studii např. Johnson a kol. [168]. Normální buňky pankreatu vykazovali pouze minimální změny v reakci na kvercetin [167].

Experimenty na stejném typu nádorových buněk provedla i skupina z Německa. Výsledky jsou zveřejněny v publikaci Nwaeburu a kol. [169]. Pro experimenty byly zvoleny buněčné linie AsPC-1/AsanPACA/PANC-1. Nejvyšší použitá koncentrace kvercetinů ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) společně s 12 hodinovou inkubací měla za následek přibližně 1,8/1,3/1,9násobné navýšení exprese let-7c. Autoři popsali deregulaci dalších pěti miRNA, jmenovitě miR-200a/200b/103/125b/1202, stanovenou pomocí metody RT-PCR. Další provedené experimenty naznačují, že deregulovaná let-7c zasahuje do signalizace buňky úpravou hladin proteinů Notch a Numb. V neposlední řadě publikace zmiňuje dalších 24 miRNA podléhajících vlivu kvercetinů stanovených pomocí mikroarray čipů [169].

### miR-200b

Studie Nwaeburu a kol. z roku 2017 [170] navazuje na studii Nwaeburu a kol. z přechozího roku [169]. Navýšení miR-200b bylo pozorováno u buněčné linie duktálního adenokarcinomu pankreatu AsPC-1 po 12 hodinové inkubaci s kvercetinem v koncentraci  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jednalo se přibližně o 2,6násobek exprese kontroly. Dále experimenty prokázaly aktivitu miR-200b proti 3'UTR oblasti mRNA kódující Notch pomocí experimentů s reportérovým plazmidem. Navýšení exprese miR-200b a související inhibice proteinu Notch vyvolané kvercetinem mají dopad na typ buněčného dělení. Dochází k potlačení symetrického dělení buněk s charakterem nádorových kmenových buněk a podpoře asymetrického dělení [170]. Podobně jako let-7c [169] i transfekce miR-200b navyšuje množství proteinu Numb [170]. Při zhodnocení článků Nwaeburu a kol. [169,170] si můžeme všimnout synergického efektu mezi miR-200b a let-7c u buněk duktálního adenokarcinomu pankreatu ošetřených kvercetinem. Obě miRNA způsobují navýšení exprese proteinu Numb, známého inhibitoru Notch [169,170].

miR-217

Během experimentů s buněčnou linií 143B představující model osteosarkomu, pozorovali Zhang a kol. [6] 1,45/1,8násobný nárůst exprese miR-217 jako výsledek 24/48 hodinové inkubace s kvercetinem v koncentraci  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Důsledek navýšení miR-217 se projevil ve zvýšení citlivosti buněk proti cisplatině. Expresi miR-217 navyšuje i cisplatina, proto kombinace obou látek působí synergicky. Navrhovaný mechanismus účinku miR-217 je regulace exprese K-Ras na úrovni mRNA a proteinu s následnou regulací dráhy PI3K/AKT. Význam miR-217 v senzitivaci buněk byl prokázán experimenty se syntetickou miR-217 a anti-miR-217, které zesilují/redukují efekt kombinace kvercetinu a cisplatin. V neposlední řadě je schopen regulovat PI3K/AKT dráhu i kvercetin [6].

Informace z celé podkapitoly „Studie zaměřené na *in vitro* experimenty“ jsou shrnuty v tabulce 1, která popisuje charakteristiky citovaných studií včetně prokázaných nebo navrhovaných důsledků zkoumaných terapií s kvercetinem.

**Tabulka 1: Souhrn miRNA ovlivněných kvercetinem, jejich ovlivněné cíle a charakteristika experimentu – *in vitro*.**

<i>In vitro</i>						
miRNA	Míra modulace miRNA [násobky kontroly]	Experimentální model	Aplikovaná dávka [nejvyšší koncentrace]	Délka experimentu [hod]	Zapojené proteiny	Literatura
miR-16	↑ 1,4	A549	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	24	Claudin-2 ↓	Sonoki a kol. [148]
miR-17-3p	↑ více než 1,5	Caco-2 TC7	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	18	Ferroportin ↓ (bez přímého potvrzení)	Lesjak a kol. [149]
34 miRNA						
miR-21	↓ 4,3 (77 %)	PC3	20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (směs kvercetin/hyperosid)	24	PDCD4 ↑	Yang a kol. [153]
miR-19b	↓ 3,4	LAPC-4	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - arctigenin	48	bez přímého potvrzení	Wang a kol. [155]
miR-21	↓ 1,7		10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - kvercetin			
miR-148a	↓ 3,5	LNCaP	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - arctigenin		bez přímého potvrzení	
miR-19b	↓ 1,2		10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - kvercetin			
miR-21	↓ 1,3					
miR-148a	↓ 1,5	LAPC-4	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - kvercetin		bez přímého potvrzení	
miR-19b	↓ 1,45					
miR-21	↑ 1,4					
miR-148a	↓ 1,5	LNCaP	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - kvercetin		bez přímého potvrzení	
miR-19b	↓ 1,75					
miR-21	↑ 1,7					
miR-148a	↓ 1,05					
miR-21	↓ 1,8	MCF-7	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	24	PTEN↑ a Maspin ↑ (bez přímého potvrzení)	Tofigh a kol. [156]
miR-21	↓ 3,0 <sup>x</sup>	BEAS-2B	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (+ 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Cr <sup>VI</sup> )	24 (akutní)	PDCD4 ↑	Pratheeshkumar a kol. [157]
miR-21	↓ 2,1 <sup>x</sup>		2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (+ 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Cr <sup>VI</sup> )	2 měsíce	PDCD4 ↑	
	↓ 2,5 <sup>x</sup>			4 měsíce	PDCD4 ↑	
	↓ 4,3 <sup>x</sup>			6 měsíců	PDCD4 ↑	
miR-21-5p	↓ 1,4 <sup>y</sup>	HK-2	15 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )		PTEN ↑ a TIMP3 ↑	Cao a kol. [158]
miR-27a	↓ 2,0	HT-29	20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (směs resveratrol/kvercetin)	24	ZBTB10 (na úrovni mRNA) ↑	Del Follo-Martinez a kol. [159]
miR-27a	↓ 2,0	786-O	20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (směs kvercetin/hyperosid)	24	ZBTB10 (na úrovni mRNA) ↑	Li a kol. [154]
miR-142-3p	↑ 3,1	MIA-PaCa2	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	24	bez přímého potvrzení s kvercetinem; (Hsp70 ↓)	MacKenzie a kol. [160]
	↑ 7,6	Capan-1				
	↑ 3,4	S2-013				
miR-145	↑ 3,0	SKOV-3	100 $\mu\text{m}\cdot\text{ml}^{-1}$	24	Kaspáza-3 ↑ (inhibice růstu)	Zhou a kol. [161]
	↑ 3,5	A2780				
miR-146a	↑ vrácí expresi na úroveň kontroly nebo ji přesahuje	CCD-18Co	nestanovení 20 - 40 $\text{mg}\cdot\text{GAE}\cdot\text{l}^{-1}$ (frakce bohatá na flavonoly)	preinkubace 30 min. před stimulací LPS nebo LPS + anti-miR	IRAK1 ↓ a TRAF6 ↓ (bez přímého potvrzení)	Noratto a kol. [72]
miR-146a	↑ 4,0	MCF-7	100 $\mu\text{m}\cdot\text{ml}^{-1}$	48	Bax ↑, Kaspáza-3 ↑, EGFR ↓	Tao a kol. [164]
	↑ 4,5	MDA-MB-231				
miR-155	↓ ~ 1,8*	RAW264.7	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	6	autoři navrhuji TNF- $\alpha$ (bez přímého potvrzení)	Boesch-Saadatmandi a kol. [166]
let-7a	↑ 2,45	MIA-PaCa2	200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - kvercetin	72	K-Ras ↓ (na úrovni mRNA) (expresie na úrovni proteinu vykazovala výjimky po inkubaci se sulforafanem nebo kvercetinem) (bez přímého potvrzení)	Appari a kol. [167]
	↑ 1,6	BxPC-3				
	↑ 1,45	PacaDD-183				
	↑ 1,35 #	CRL1097	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - sulforafan 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - kvercetin			
	↑ 3,0	MIA-PaCa2				
	↑ 2,3	BxPC-3				
	↑ 2,45	PacaDD-183	40 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - extrakt zeleného čaje 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - kvercetin			
	↑ 1,5 #	CRL1097				
	↑ 3,2	MIA-PaCa2				
	↑ 3,1	BxPC-3				
↑ 3,1	PacaDD-183					
↑ 1,6 #	CRL1097					
let-7c	↑ 1,8	AsPC-1	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	12	Numb ↑  Notch ↓  bez přímého potvrzení	Nwaeburu a kol. [169] Nwaeburu a kol. [170]
	↑ 1,3	ASANPaCa				
	↑ 1,9	PANC-1				
miR-200b	↑ 2,6	AsPC-1	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	12	bez přímého potvrzení	Zhang a kol. [6]
miR-200a	↑ 2,1					
miR-103	↓ 1,3					
miR-125b	↓ 1,4					
miR-1202	↓ 3,3					
miR-217	↑ 1,45	143B	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - kvercetin	24	K-Ras ↓	
	↑ 1,8		5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - kvercetin	48		
	↑ 2,9		5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - kvercetin	24		
	↑ 3,5		5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ - cisplatin	48		

Hodnoty pro expresi miRNA byly stanoveny/odhadnuty z grafů článků. Zkratky a znaky: \* vztaženo proti pozitivní LPS stimulaci, † autoři určili množství polyfenolových látek v testované frakci přes celkovou redukční kapacitu a kyselinu gallovou jako standard, hodnoty jsou vyjádřeny jako ekvivalenty kyseliny gallové (20 mg GAE·l<sup>-1</sup> = mg gallové kyseliny·l<sup>-1</sup>), přímé potvrzení = například přes pokus s transfekcí anti-miR, # = statisticky nevýznamné, x = vztaženo k Cr<sup>VI</sup>+ stimulovaným buňkám, y = vztaženo k TGF- $\beta$  stimulovaným buňkám.

### 2.7.2 Studie zaměřené pouze na *in vivo* experimenty

V roce 2015 prezentovali Wein a kol. [171] zajímavou studii s kvercetinem provedenou na samcích potkana wistar. Potkani byli krmeni dietou obsahující kvercetin při dávce přibližně  $10 \text{ mg kvercetinu} \cdot \text{kg}^{-1}$  za den. Z 352 testovaných miRNA pomocí PCR miRNA array bylo 23 deregulovaných proti negativní kontrole. Podle textu mělo devatenáct z nich expresi více než  $3\times$  nižší, ale publikovaná tabulka uvádí jen třináct. Zbylé čtyři naopak měly expresi více než  $3\times$  vyšší. rno-miR-125b-3p, nejvýznamněji deregulovaná miRNA, pravděpodobně indukuje  $\gamma$ -glutamylhydrolázu na úrovni mRNA [171].  $\gamma$ -glutamylhydroláza je enzym způsobující hydrolýzu anti-folylpolygamma-glutamátů. Nadměrná exprese popisovaného enzymu vede ke vzniku rezistence nádorových buněk, proti terapii zaměřené na inhibici enzymů využívajících folát jako substrát. Tento enzym se také považuje za negativní prognostický marker invazivního karcinomu prsu [172].

Kvercetin a dalších osm polyfenolů bylo podáváno apoE deficientním samcům myši kmene C57BL/6, jako kontrola byly v experimentu použity standardní myši bez vnesené modifikace. Model simuloval deregulovaný metabolismus lipidů. Pro analýzu expresních profilů byly zvoleny miRNA a mRNA čipy obsahující 567 a 35 852 sond. Kvercetin byl zvířatům podáván po dobu dvou týdnů v množství, které odpovídá lidské denní dávce 30 mg. Analýza odhalila 47 odlišně exprimovaných miRNA ve srovnání s ApoE deficientní kontrolou. 25 miRNA vykazovalo navýšení exprese, kdežto zbylých 22 miRNA snížení. Velmi zajímavá je informace, že pět miRNA podléhalo velmi podobné modulaci v rámci všech testovaných polyfenolů. mmu-miR-30c-1\*, mmu-miR-374\* a mmu-miR-467\* byly potlačeny a mmu-miR-291b-5p a mmu-miR-296-5p byly navýšeny oproti deficientní kontrole. Dále analýza dat objevila pozoruhodný fenomén. miRNA expresní profil ApoE deficientních myši byl polyfenoly částečně navrácen směrem k expresnímu profilu kontroly s původním genem [173].

Garelnabi a kol. [174] publikovali zajímavé účinky kvercetinu, cvičení a jejich kombinace na expresi miRNA a jejich interakci s aterogenní dietou. Jako model byl zvolen myši klon C57BL/6J LDL<sup>-/-</sup>. Exprese byla stanovovaná v aortě a játrech. Výsledky naznačují navýšení exprese miR-21 v aortě u skupiny, která cvičila a skupiny s kombinací kvercetinu a cvičení. Ve stejné tkáni byla u kombinace kvercetin/cvičení navýšena i exprese miR-125b. Na druhou stranu miR-451 vykazovala pouze nevýznamné změny.

U jater byl trend exprese miR-21 velmi podobný jako u aorty. Navíc kvercetin mírně posiloval efekt cvičení, avšak při monoterapii neměl žádný vliv. Cvičení mělo také za následek snížení exprese jaterní miR-451, ale v kombinaci s kvercetinem dochází k omezení efektu cvičení. Samotný kvercetin vykazoval jen zanedbatelné účinky. Jako poslední byla zhodnocena exprese miR-125b ve vzorcích jater. Kvercetin i zde vykazoval pouze zanedbatelné rozdíly. Naopak jeho kombinace se cvičením vedla k redukci cvičením navýšené exprese. Některé z výsledků v publikaci popisují pouze trend exprese miRNA [174].

Další miRNA, které podléhají navýšení exprese v reakci na kvercetin v rámci *in vivo* experimentu, jsou miR-122 a miR-125b. Jako zvířecí model byly zvoleny myši C57BL/6J a podáním diety s vysokým obsahem tuku byl vyvolán chronický subakutní zánět. Pro pokus byla zvířata rozdělena do tří skupin. Kontrolní a dvou skupin s krmivem obohaceným o kvercetin v množství 0,2 nebo 2 mg kvercetinu·g<sup>-1</sup> diety. Délka experimentu byla šest týdnů. Exprese testovaných miRNA byla navýšena 1,6/1,5× (miR-122/miR125b) proti neošetřené kontrole u skupiny, které bylo podáno krmivo s vyšší dávkou kvercetinu. Myši krmené dietou s nízkým přídatkem kvercetinu vykazovaly pouze nesignifikantní zvýšení [175].

Informace z celé podkapitoly „Studie zaměřené pouze na *in vivo* experimenty“ jsou shrnuty v tabulce 2, která popisuje charakteristiky citovaných studií včetně prokázaných nebo navrhovaných důsledků zkoumaných terapií s kvercetinem.

**Tabulka 2: Souhrn miRNA ovlivněných kvercetinem, jejich ovlivněné cíle a charakteristika experimentu – *in vivo*.**

<i>In vivo</i>											
miRNA	Míra modulace miRNA [násobky kontroly]	Experimentální model	Aplikovaná dávka [nejvyšší koncentrace]	Délka experimentu	Zapojené proteiny	Literatura					
miR-146a	↑ více než 1,75	samice myši kmene BALB/c athymic nude	10 mg kg <sup>-1</sup> denně	8 týdnů	autofágozomy pouze velikost nádoru a míru exprese miR-146a	Tao a kol. [164]					
miR-21	↓ 1,5 ↓ 1,7 <sup>a</sup>	samice myši kmene NU/NU Athymic nude	CrT buňky aplikovány do slabiny myši, 10 mg kg <sup>-1</sup> denně, ip administrace předem ošetřené buňky BEAS-2B aplikovány do slabiny myši, 2 μmol·l <sup>-1</sup> (+ 0,5 μmol·l <sup>-1</sup> Cr <sup>VI</sup> )	30 dní preinkubace buněk BEAS-2B - 6 měsíců, vyhodnocení po 30 dnech od aplikace	PDCD4 ↑	Pratheeshkumar a kol. [157]					
miR-125b-3p	↓ 9	samci potkana kmene Wistar	10 mg kg <sup>-1</sup> denně (100-ppm kvercetin)	7 týdnů	γ-glutamylhydroláza (bez přímého potvrzení)  nezměňovány	Wein a kol. [171]					
miR-133b	↓ 7										
miR-505	↓ 7										
miR-1	↓ 6										
miR-342-3p	↓ 5										
miR-298	↓ 5										
miR-503	↓ 4										
miR-206	↓ 4										
miR-33	↓ 4										
miR-216a	↓ 4										
miR-301a	↓ 3										
miR-21	↓ 3										
miR-205	↓ 3										
miR-125a-3p	↑ 5										
miR-132	↑ 5										
miR-411	↑ 4										
miR-484	↑ 3										
25 miRNA	↑ více než 1,5	samci myši kmene C57BL/6, buď standardní nebo apoE deficiční	0,006 % (w/w) (ekvivalent příjmu 30 mg denně u člověka)	2 týdny	diskutováno několik drah (bez přímého potvrzení)	Milenkovic a kol. [173]					
22 miRNA	↓ více než 1,5	samci myši kmene C57BL/6J LDL <sup>-/-</sup>	100 μg denně 100 μg denně + cvičení 100 μg denně 100 μg denně + cvičení 100 μg denně 100 μg denně + cvičení 100 μg denně 100 μg denně + cvičení	30 dní	bez přímého potvrzení  STAT3 ↓ a NF-κB ↑ (diskutováno v textu, vlastní data chybí)  bez přímého potvrzení	Garelnabi a kol. [174]					
miR-21 aorta	↑ 1,2 ↑ 1,85										
miR-21 játra	↓ 1,12 ↑ 2,0										
miR-125b aorta	↓ 1,1 ↑ 1,79										
miR-125b játra	↓ 1,26 ↑ 2,77										
miR-451 aorta	↑ 2,0 ↓ 1,1										
miR-451 játra	↓ 1,4 ↓ 2,03										
miR-122	↑ 1,6						samice myši kmene C57BL/6J (játra)	0,2 a 2 mg·g <sup>-1</sup> diety	6 týdnů	acyloxyacyl hydroláza ↓ (bez přímého potvrzení) TNF-α ↓ (spekulace)	Boesch-Saadatmandi a kol. [175]
miR-125b	↑ 1,5										

Hodnoty pro expresi miRNA byly stanoveny/odhadnuty z grafů článků. Zkratky a znaky: přímé potvrzení = například přes pokus s transfekcí anti-miR, x = vztaženo k Cr<sup>VI</sup> stimulovaným buňkám, CrT = chromem transformované buňky a ip = intraperitoneální aplikace.

### 2.7.3 Studie zaměřená na patientské vzorky

Kromě *in vitro* a *in vivo* experimentů byl proveden i experiment s patientskými vzorky. Studie byla zaměřena na tkáňové vzorky od pacientů s karcinomem plic (adenokarcinom/spinocelulární karcinom). Otázkou bylo, jak množství kvercetin v dietě ovlivní expresi miRNA ve vzorcích. Výsledky ukázaly 2/4 miRNA se zvýšenou a 2/8 miRNA se sníženou expresí mezi pacienty konzumující nejvyšší a nejnižší množství potravin bohatých na kvercetin. Výzkumníci přidali do analýzy i další faktory jako je



histologie nádorů a nekuřák/kuřák/bývalý kuřák, jejich kombinace a třídění podle rodin miRNA v kombinaci s ostatními faktory [176]. Výsledky studie jsou shrnuty v tabulce 3.

**Tabulka 3: Souhrn miRNA ovlivněných kvercetinem, jejich ovlivněné cíle a charakteristika experimentu – pacientské vzorky.**

Pacientské vzorky						
miRNA	Míra modulace miRNA [násobky kontroly]	Experimentální model	Aplikovaná dávka	Délka experimentu	Zapojené proteiny	Literatura
miR-502	↑ 1,124	vzorky adenokarcinomu plic	statisticky významné odlišnosti exprese mezi vzorky od pacientů s dietou obsahující vysoké a nízké množství kvercetinu	X	X	Lam a kol. [176]
miR-125a	↑ 1,505					
miR-564	↓ 1,124					
miR-124a	↓ 1,174					
miR-155	↑ 1,399					
miR-18b	↑ 1,483					
miR-612	↑ 1,069	vzorky spinocelulárního karcinomu plic				
miR-363*	↑ 1,222					
miR-510	↓ 1,147					
miR-605	↓ 2,315					
miR-373	↓ 1,091					
miR-453	↓ 1,112					
miR-502	↓ 1,248					
miR-183	↓ 1,464					
miR-573	↓ 1,151					
miR-524*	↓ 1,170					

Některé výzkumné skupiny se zaměřili na vliv samotných glykosidů kvercetinu nebo jeho derivátů na expresi miRNA. Zde uvádím jen několik vybraných článků. Jedním ze studovaných derivátů kvercetinu je rhamnetin, který je schopen modulovat v různých buněčných liniích miR-34a [177-179]. Jako poslední uvádím článek, který pracoval s převrácenou logikou. Autoři využili miR-143 pro zvýšení chemosenzitivity buněk karcinomu žaludku vůči kvercetinu díky inhibici autofagie. Inhibice autofagie byla zprostředkována přes GABARAPL1, validovaný cíl miR-143 [180].

Mnoho citovaných článků v této sekci využívá vysoké “akademické“ koncentrace kvercetinu, obvykle vyšší než  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tak vysoké koncentrace jsou při běžné dietě fyziologicky nedosažitelné. Fyziologické koncentrace se pohybují kolem  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  [181]. Na druhou stranu lze na data nahlížet jako na zajímavou možnost pro adjuvantní terapie.

## 2.8 Působení taxifolinu na expresi miRNA

V rámci literární rešerše jsem nevyhledal žádný článek, který by studoval efekt taxifolinu na expresi miRNA.

## 2.9 Proteiny rodiny Bcl-2

Rodina Bcl-2 je velmi důležitá pro udržení homeostázy mezi apoptózou a přežíváním a je považována za jeden z hlavních regulátorů vnitřní dráhy apoptózy. Relativní koncentrace proapoptotických a anti-apoptotických Bcl-2 proteinů, tvorba různých komplexů mezi jednotlivými členy a další faktory rozhodují o osudu buňky [182]. Z pohledu struktury a funkce se dělí do tří skupin. První skupinou jsou proteiny obsahující pouze doménu BH3 (Bcl-2 homology), označované jako BH3-only proteiny. Mezi tyto proteiny se řadí například Bid, Bad, Bik nebo Bim a v buňce vykazují proapoptotické funkce. Na základě schopnosti interagovat s dalšími proteiny rodiny Bcl-2 jsou rozdělovány na přímé aktivátory proteinů Bax a Bak a senzibilizátory [183]. Další skupinou jsou proapoptotické proteiny Bax a Bak schopné tvořit póry v mitochondriální membráně [184]. Dnes je součástí této skupiny i protein Bcl-2 related ovarian killer (Bok), který dokáže indukovat apoptózu nezávisle na proteinech Bax a Bak [185]. Poslední skupinu proteinů tvoří anti-apoptotické proteiny. Všechny obsahují alespoň tři různé BH domény označované čísly 1 až 4. Příkladem mohou být proteiny Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w nebo Mcl-1 [186]. Jakákoliv změna v regulaci apoptózy a souvisejících Bcl-2 proteinů může zapříčinit vznik různých chorob od neurodegenerativních, po nádorové [187]. Proteiny z rodiny Bcl-2 jsou často v nádorech při srovnání s normální tkání deregulované [188,189]. Výsledkem je jeden z typických znaků nádorů – vyhýbání se apoptóze [190,191]. Jedná se o jeden z mechanismů rezistence nádorových buněk vůči terapii. Pokud je apoptóza nejvhodnější způsob, jak může nádor zareagovat na terapii, stává se z Bcl-2 proteinů potenciální terapeutický cíl [189,192].

### 2.9.1 Mcl-1

Protein myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) je produkt genu *MCL1*, který leží na q raménku chromozomu 1 (1q21.2, Ensembl 2018, release 96) [193]. Na první zmínku o proteinu narazíme v roce 1993, kdy byl objeven během studia diferenciací myeloidních buněk [194]. V literatuře je označován jako regulátor schopnosti sebeobnovy kmenových nádorových buněk [195], které jsou spojovány s vysokou agresivitou a odolností vůči terapiím. Od ostatních proteinů z rodiny Bcl-2 se odlišuje motivy PEST, které souvisejí s relativně krátkým poločasem rozpadu a jsou považovány za proteolytické signály [196]. Literatura obvykle udává poločas rozpadu Mcl-1 do 4 hodin [197]. Expresi proteinu

Mcl-1 je regulována na více úrovních od transkripce až po posttranslační úroveň. Byl popsán vliv růstových faktorů EGF [198], VEGF [199] nebo PDGF [200]. Literatura se zmiňuje o působení cytokinů z rodiny interleukinů [199,201,202] a estrogenu přes jeho receptor ER $\alpha$  [203].

Na posttranskripční úrovni je protein Mcl-1 regulován pomocí miRNA. U nádorů je diskutován vliv miR-26a, miR-29b nebo miR-101, u kterých je Mcl-1 považován za validovaný cíl [4,5,204].

Ovlivnění konečného množství proteinu není regulováno jen rychlostí jeho tvorby, ale i jeho degradací. Prvním krokem k odstranění Mcl-1 je ubikvitinace, která může být závislá i nezávislá na fosforylaci PEST motivů obsažených na N-konci proteinu [205]. Fosforylace probíhá postupně a je zprostředkována enzymy JNK a GSK3 [206]. Tyto posttranslační modifikace slouží jako impuls a usnadňují polyubikvitinace [205]. Proti degradaci působí deubikvitináza USP9X. Navýšení exprese USP9X je spojováno s lepším přežíváním nádorových buněk [207]. Více informací týkajících se ubikvitinace proteinu Mcl-1 lze nalézt v přehledovém článku Mojsa a kol. [205]. V neposlední řadě může být protein Mcl-1 degradován i nezávisle na ubikvitinu [208].

Gen *MCL1* obsahuje celkem tři exony a v závislosti na alternativním sestřihu vzniká jedna ze tří možných variant proteinu. Jednotlivé varianty se označují jako dlouhá, krátká a extrémně krátká:

- Mcl-1L – dlouhá varianta

Dlouhá varianta nese informaci ze všech tří exonů a výsledný protein tvoří 350 aminokyselin (AMK). Mcl-1L obsahuje domény BH1 až BH3, transmembránovou doménu a motivy PEST [209]. Dlouhá varianta proteinu vykazuje anti-apoptotický efekt a její zvýšená exprese je v mnoha nádorech spojována se špatnou prognózou pacienta. Mcl-1L interaguje díky hydrofobnímu žlábků s BH3-only proteiny a proteiny Bax a Bak, čímž zabraňuje aktivaci a dimerizaci proteinů Bax a Bak [192]. Krátká životnost této formy usnadňuje indukci apoptózy.

- Mcl-1S – krátká varianta

U krátké varianty proteinu Mcl-1 dochází k vystřižení exonu II a změně čtecího rámce. Vzniklá izoforma obsahuje 271 AMK a ztrácí transmembránovou doménu a domény

BH1, BH2. Jelikož Mcl-1S obsahuje pouze doménu BH3, je řazena mezi BH3-only proteiny a funguje jako proapoptotický signál. Krátká varianta proteinu Mcl-1 interaguje s variantou dlouhou, čímž zamezuje tvorbě dimerů mezi Mcl-1L a proteiny Bak, Bax nebo BH3-only proteiny. Neinteraguje však s dalšími proteiny z Bcl-2 rodiny. Toto tvrzení je značně omezené, neboť autoři článku sledovali jen omezené množství členů rodiny Bcl-2 [209].

- Mcl-1ES – extra krátká varianta

Jako poslední byla objevena sestřihová varianta Mcl-1ES o délce 197 AMK. U extra krátké varianty dochází k vystřížení části exonu I. Izoforma přichází o motivy PEST, ale domény BH1 až BH3 a transmembránová doména na proteinu zůstávají. Přítomnost BH3 domény je důležitá pro mitochondriální lokalizaci proteinu, interakci s Mcl-1L a schopnost tvořit dimery. Vzniklé vyšší struktury jsou schopné permeabilizovat vnější mitochondriální membránu nezávisle na proteinech Bax a Bak. Podobně jako Mcl-1S je i Mcl-1ES schopná interagovat pouze s Mcl-1L [210,211].

### 2.9.2 Bax a Bak

Podle funkce lze Bax a Bak definovat jako proteiny proapoptotické. Jejich primárním úkolem je spouštění apoptózy vytvořením pórů ve vnější mitochondriální membráně. To umožňuje uvolnění cytochromu c a dalších faktorů např. proteinu SMAC/DIABLO z mezimembránového prostoru do cytosolu. Uvolněný cytochrom c se podílí na tvorbě apoptozomu a aktivaci kaspázy-9. Z výše uvedeného textu je patrné, že Bax a Bak se podílí na aktivaci vnitřní mitochondriální dráhy [212]. Struktura Bax/Bak obsahuje celkem devět  $\alpha$ -helixů, domény BH1 až BH3 a C-terminální transmembránovou doménu. Oba proteiny jsou regulovány složitou sítí protein-proteinových interakcí mezi jednotlivými skupinami rodiny Bcl-2. Rozhodnutí, zda buňka vstoupí do apoptózy nebo přežije, závisí na relativní koncentraci antiapoptotických a proapoptotických Bcl-2 proteinů a dalších faktorech [184,213]. Zajímavá je nejednotnost v tvrzení o počtu BH domén obsažených v Bax a Bak. Mnohé články popisují přítomnost i BH4 domény, jiné se zmiňují pouze o přítomnosti domén BH1 až BH3 [184,212-214].

### 2.9.2.1 Bax

Název Bax je zkratkou pro Bcl-2 Associated X Protein. Gen kódující primární transkript leží na dlouhém raménku chromozomu 19 (19q13.33; Ensembl 2018, release 96) [193]. Struktura proteinu Bax obsahuje kanonický hydrofobní žlábek a hydrofobní kapsu lokalizovanou na opačné straně proteinu. Obě místa hrají důležitou roli v aktivaci Bax [215,216], na které závisí jeho lokalizace uvnitř buňky. U zdravých buněk je umístěn v cytosolu jako neaktivní globulární protein. Experimenty ukázaly, že se do hydrofobního žlábků neaktivního proteinu Bax váže helix  $\alpha 9$  obsahující transmembránovou doménu. To je pravděpodobně jeden ze zásadních vlivů na cytosolickou lokalizaci [217,218]. Cytosolická lokalizace je také udržována retrotranslokací zprostředkovanou interakcí s proteinem Bcl-xL, což zabraňuje jeho akumulaci v mitochondriální membráně. Rychlost retrotranslokace navyšují proteiny Mcl-1 a Bcl-2. Aktivovaná forma je naopak přítomna převážně v mitochondriích, přesněji v jejich vnější membráně [219].

Aktivace proteinu Bax je popisována jako postupná a bivalentní. Jedná se o po sobě jdoucí změny konformace proteinu, které vedou k tvorbě dimerů a oligomerů vyšších řádů [184]. Vazba proapoptotických proteinů do kapsy na zadní straně proteinu vyvolá prvotní konformační změnu, která vypudí helix  $\alpha 9$  s transmembránovou doménou z hydrofobního žlábků. Důsledkem je translokace do vnější mitochondriální membrány [215,217]. Další interakce, tentokrát mezi hydrofobním žlábkem a BH3-only proteiny, vede k další změně konformace a odhalení BH3 domény Bax. Interakce je dočasná, kdy po navázání dochází k aktivaci a okamžitému rozvolnění, tzv. „hit and run“ [216,220]. Odhalená BH3 doména se může vázat na další protein Bax a vznikají dimery. Ty přes různá místa v molekule interagují s dalšími monomery a vznikají oligomerní struktury, které se formují do pórů (detailně rozepsáno v přehledovém článku Pena-Blanco a kol. [184]).

V neposlední řadě se Garner a kol. [214] zmiňují o autoinhibici. Tento typ inhibice probíhá v cytosolu. Interakce dvou molekul Bax probíhá mezi N-terminální doménou jedné molekuly s C-terminální doménou druhého dimerizačního partnera. Oba interagující povrchy zahrnují místa důležitá pro aktivaci. Výsledkem je vznik inaktivních dimerů s vyšší odolností vůči aktivaci ve srovnání s monomery [214].

### 2.9.2.2 Bak

Celý název proteinu Bak je Bcl-2 homologous antagonist killer. Jeho gen leží na krátkém raménku chromozomu 6 (6p21.31; Ensembl 2018, release 96) [193]. Při pohledu na strukturu proteinu si lze všimnout významné odlišnosti mezi proteiny Bax a Bak. Protein Bak má na helixu  $\alpha 9$  umístěnou mnohem hydrofobnější transmembránovou doménu. Výsledkem je preference hydrofobnějšího prostředí, což se odráží v odlišné lokalizaci proteinu. Ten se vyskytuje převážně ve vnější mitochondriální membráně. S hydrofobicitou transmembránové domény souvisí i omezení rychlosti retrotranslokace, na které se podílí Bcl-xL nebo Mcl-1 [221].

K aktivaci vnitřní mitochondriální dráhy dochází velmi podobně jako u proteinu Bax. I zde se jedná o postupný vícekrokový proces. Jelikož je Bak majoritně lokalizovaný na mitochondriální membráně, nemusí podstupovat translokaci. Proto buňky deficientní na protein Bax vykazují rychlejší odezvu na proapoptotické signály než buňky postrádající protein Bak [222]. V první fázi musí dojít k aktivaci proteinu za pomoci vybraných BH3-only proteinů, které přechodně interagují s BH3 vazebným žlábkem. Po interakci dojde ke změně konformace Bak, což vede k dimerizaci, následné oligomerizaci a tvorbě pórů [223].

Inhibice Bak může být zprostředkována vazbou izomeru VDAC2 (voltage-dependent anion-selective channel protein 2) do dimerizační domény proteinu Bak. Proto jsou buňky neexprimující VDAC2 citlivější na apoptotické stimuly. Navýšení exprese VDAC2 vede ke snížení citlivosti [224].

## 2.10 ZEB2

Protein ZEB2, celým názvem Zinc finger E-box-binding homeobox 2 se v literatuře objevuje i pod zkratkou SIP1 (SMAD interacting protein 1). Zkratka byla vytvořena na základě interakce mezi rSMAD a ZEB2, ve které ZEB2 funguje jako korepresor transkripce. Tato interakce je schopná zastavit signalizaci vyvolanou aktivací TGF- $\beta$  receptoru. Z pohledu dalšího zařazení se jedná o protein z rodiny ZEB, která je u obratlovců tvořena dvěma konzervovanými proteiny ZEB1 a ZEB2. Oba proteiny jsou transkripční faktory řídící genovou expresi vimentinu, N-cadherinu, MMP-1/2 a dalších [225]. ZEB2 je zapojen do dějů spojených s normálním fungováním organismu.

Příkladem může být vliv proteinu na vývoj neuronů v mozku [226], během gastrulace nebo morfogenezi srdce [225]. Protein ZEB2 se podílí na vzniku patologického stavu vyvolaného různými mutacemi nebo delecemi jeho genu na chromozomu 2 v lokusu q22, které je označováno jako Mowat-Wilsonův syndrom, což je vzácné genetické onemocnění popsané Mowatem a kolegy v roce 1998. Onemocnění je označováno jako multi-systémové a projevuje se mentální retardací, mikrocefalií a je často doprovázeno Hirschsprungovou chorobou [227]. Dalším patologickým stavem souvisejícím se ZEB2 jsou nádorová onemocnění, ve kterých hraje důležitou roli při indukci epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT). EMT je proces spojený s indukcí dediferenciace a takto postižené epiteliální buňky získávají mezenchymální fenotyp, což se projeví ztrátou polaritity buněk a změnami v mezibuněčných spojkách. V průběhu EMT dochází k represí E-cadherinu a aktivaci N-cadherinu zprostředkovanou proteinem ZEB2 [228]. Pokud v nádorech dojde k navýšení exprese proteinu ZEB2, výsledkem je agresivnější chování, proto se o ZEB2 uvažuje jako o jednom z prognostických markerů pro sledování agresivity metastazujících karcinomů a odhadování šancí pacientů na přežití [229].

### 3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Záměrem předkládané disertační práce bylo studium ovlivnění cytotoxicity etoposidu pomocí miR-29b v buněčné linii HeLa a objasnění mechanismu účinku. Dále si práce kladla za cíl odhalení mechanismu účinku mifepristonu na toxicitu etoposidu pozorovanou v buněčné linii Hep G2. Efekt byl odhalen v rámci výsledků výzkumu skupiny při studiu působení farmakoterapie cílené na aktivaci/inhibici glukokortikoidního receptoru spojenou s ovlivněním exprese miR-29b a možným vlivem na cytotoxicitu etoposidu. Posledním bodem práce se stalo sledování vlivu vybraných polyfenolů, které se běžně vyskytují v potravě, na expresní profil miRNA v buněčné linii Hep G2 a primárních kulturách lidských hepatocytů. Práce pokračovala vyhodnocením vlivu vybraných deregulovaných miRNA se změnou exprese větší/menší než 1,5násobek exprese kontrolních buněk na jejich cílové proteiny a související signální dráhy.

Konkrétní cíle byly:

1. Studium mechanismu účinku miR-29b na cytotoxicitu etoposidu v buněčné linii HeLa.
2. Studium vlivu mifepristonu na cytotoxicitu etoposidu v buněčné linii Hep G2 a jeho mechanismu účinku.
3. Ovlivnění expresního profilu miRNA buněčné linie Hep G2 a primárních kultur lidských hepatocytů kvercetinem a taxifolinem.



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Biologický materiál

#### 4.1.1 Buněčný materiál

Lidská buněčná linie HeLa (lidská buněčná linie karcinomu děložního čípku) byla zakoupena od ECACC (katalogové číslo 93021013).

Lidská buněčná linie Hep G2 (lidská buněčná linie karcinomu jater) byla zakoupena od ECACC (katalogové číslo 85011430).

Lidská buněčná linie K562 (lidská buněčná linie chronické myeloidní leukémie) byla zakoupena od ECACC (katalogové číslo 89121407).

Lidská buněčná linie K562/Dox (lidská buněčná linie chronické myeloidní leukémie) se zvýšenou expresí P-glykoproteinu (P-gp) díky retrovirovému vektoru HaMDR obsahujícímu cDNA kódující lidský MDR1 byla získána darem od Prof. J.P. Marie (University of Paris 6, Francie).

Lidská buněčná linie K562/DoxDR2 (lidská buněčná linie chronické myeloidní leukémie). stabilně exprimující shRNA proti genu *ABCB1* byla vytvořena pomocí komerčně dostupného vektoru pGeneClip neomycin.

Lidská buněčná linie K562/ABCG2 (lidská buněčná linie chronické myeloidní leukémie) se zvýšenou expresí ABCG2 díky retrovirovému vektoru SPsLdS, obsahujícímu cDNA kódující lidský ABCG2 byla získána darem od Prof B. Sarkadi (National Blood Center and Semmelweis University, Budapešť, Maďarsko). Buněčná linie K562/ABCG2 je velice heterogenní a jednotlivé buňky vykazují rozdílnou míru exprese ABCG2 transportéru. Subklony K562/ABCG2CL10 s vysokou a K562/ABCG2CL1 s nízkou expresí ABCG2 byly z této linie získány pomocí rozkultivování jednotlivých buněk na 96 jamkové desce.

Primární kultury lidských hepatocytů byly izolovány z jater multiorgánových dárců. Veškerá práce byla prováděna s povolením Etické komise FNOL a LF UP v Olomouci v souladu s mezinárodní legislativou.

## 4.2 Chemikálie

- 1-propanol (Sigma Aldrich; kat. č. 402893)
- 2-propanol (Sigma Aldrich; kat. č. I9516)
- 2-merkapt ethanol (Sigma Aldrich; kat. č. M6250)
- Agaróza typ I (Sigma Aldrich; kat. č. A6013)
- Agaróza typ VII (Sigma Aldrich; kat. č. A4018)
- Akrylamid/N,N'-methylenbisakrylamid (29:1, 40% roztok) (Merck; kat. č. 1.00641.1000)
- Pierce™ BCA Protein Assay pro stanovení proteinů (ThermoFisher; kat. č. 23225)
- Bromfenolová modř, prášek (Sigma Aldrich; kat. č. B0126)
- Coomassie Brilliant blue G-250 (Serva; kat. č. 35051)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich; kat. č. D2650)
- Disodná sůl kyseliny ethylen-diamintetraoctové (Na<sub>2</sub>EDTA) (Sigma Aldrich; kat. č. 03685)
- DL-dithiotreitol (DTT) (Sigma Aldrich; kat. č. D0632)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma Aldrich; kat. č. L5750)
- Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem (DMEM) (Sigma Aldrich; kat. č. D5796)
- Ethanol (Dr. Kulich Pharma; kat. č. ES 200-578-8)
- Fetální bovinní sérum (FBS) (GE Healthcare Life Sciences; kat. č. SV 30160.03)
- Fluorid sodný (Sigma Aldrich; kat. č. S7920)
- Glycerol (Sigma Aldrich; kat. č. G2025)
- Hovězí sérový albumin-frakce V (BSA) (Serva; kat. č. 11930.03)
- Chloroform (Sigma Aldrich; kat. č. C2432)
- ImmunoCruz Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz; kat. č. sc-2048)
- Kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová (EGTA) (Sigma Aldrich; kat. č. E4378)
- Kyselina chlorovodíková 35% (Penta; kat. č. 19360-11000)
- Kyselina N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-etansulfonová (HEPES) (Sigma Aldrich; kat. č. H3375)
- Kyselina octová 99% (Lach-Ner; kat. č. 10047-A99)
- L-glutamin, (Sigma Aldrich; kat. č. G6392)
- Lipofectamine 2 000 (Life Technologies; kat. č. 11668-019)
- Methanol (HPLC grade) (VWR; kat. č. 20864.320)
- Minimální esenciální médium (MEM) (Sigma Aldrich; kat. č. M4655)

Neesenciální aminokyseliny (NEAA) (Life Technologies; kat. č. 11140050)

N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva; kat. č. 35930)

Opti-MEM® (ThermoFisher; kat. č. 11058021)

PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoFisher; kat. č. 26616)

Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich; kat. č. P4333)

Peroxodisíran amonný (Sigma Aldrich; kat. č. A3678)

Ponceau S (Sigma Aldrich; kat. č. P3504)

Pre-miRNA:

hsa-miR-29a (ThermoFisher; kat. č. 17100, PM12499)

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

hsa-miR-29c (ThermoFisher; kat. č. 17100, PM10518)

Pre-miR™ miRNA Precursor Negative Control #1 (ThermoFisher; kat. č. 17110)

Proteázový inhibitor Complete™ (Roche; kat. č. 04 693 116 001)

Protilátky primární:

ABCB1 (Novusbio; kat. č. NBP2-52654)

ABCC1 (Cell Signaling; kat. č. 14685),

ABCG2 (Sigma-Aldrich; kat. č. AV43649)

Aktin (Santa Cruz; kat. č. sc-1616)

Bak (Santa Cruz; kat. č. sc-832)

Bax (Santa Cruz; kat. č. sc-20067)

Bcl-2 (Cell Signaling; kat. č. 2872),

β-tubulin (Cell Signaling; kat. č. 2146)

Cytochrom c (Santa Cruz; kat. č. sc-8385)

Lamin B1 (Santa Cruz; kat. č. sc-377000)

Mcl-1 (Santa Cruz; kat. č. sc-819)

Kaspáza-3 (Santa Cruz; kat. č. sc-7148),

Vimentin (Novusbio; kat. č. NBP2-44832)

ZEB2 (Santa Cruz; kat. č. sc-271984)

Protilátky sekundární konjugované s křenovou peroxidázou (HRP) od firmy Santa Cruz (kat. č. sc-2004, kat. č. sc-2922, a kat. č. sc-2005) a Cell signaling (kat. č. 7074 a kat. č. 7076)

Sacharóza (Sigma Aldrich; kat. č. S0389)

SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer Kit (Merck; kat. č. 407207)

siRNA proti Mcl-1 a Bak (Sigma Aldrich; identifikační čísla jsou uvedena v tabulce 4)

TaqMan® MicroRNA assays:

hsa-miR-29a (ThermoFisher; kat. č. 4427975, assay ID 002112)

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

hsa-miR-29c (ThermoFisher; kat. č. 4427975, assay ID 000587)

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

Trans-Blot® Turbo™ 5x Transfer Buffer (BioRad; kat. č. 10026938)

Triton X-100 (Sigma Aldrich; kat. č. T9284)

TRI Reagent® (Sigma Aldrich; kat. č. T9424)

Tween® 20 (Sigma Aldrich; kat. č. P1379)

tris(hydroxymethyl)aminometan (Tris) (Carl Roth; kat. č. 0188.4)

trypanová modř 0,4% roztok (Sigma Aldrich; kat. č. T8154)

trypsin-EDTA, 0,25% roztok (Life Technologies; kat. č. 25200-056)

vanadičnan trisodný (Sigma Aldrich; kat. č. S6508)

voda pro molekulární biologii (Sigma Aldrich; kat. č. W4502)

Pro práci s buněčnými kulturami byl použit oxid uhličitý od firmy Siad (ČR).

Ostatní chemikálie stupně čistoty p.a. byly zakoupeny od firmy Lach-Ner (ČR).

**Tabulka 4: Seznam identifikačních čísel siRNA zakoupených ze Sigma Aldrich, které byly využity v našich experimentech.**

Protein	Řazení	siRNA ID
Mcl-1	1	SASI_Hs01_00162656
	2	SASI_Hs01_00162657
	3	SASI_Hs01_00162658
Bak	1	SASI_Hs02_00331326
	2	SASI_Hs01_00075044
	3	SASI_Hs02_00331327

### 4.3 Roztoky

#### Roztoky pro stanovení aktivity kaspázy-3

**Lyzační pufr:** HEPES ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pH 7,4; Triton X-100 (0,5%, v/v), inhibitor proteáz Complete<sup>TM</sup> (1 tableta v 50 ml), DTT ( $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

**Reakční pufr:** HEPES ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pH 7,1; EDTA ( $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), inhibitor proteáz Complete<sup>TM</sup> (1 tableta v 50 ml), DTT ( $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

**Zásobní roztok substrátu pro kaspázu-3:**  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Ac-DEVD-AMC v DMSO.

**Zásobní roztok inhibitoru pro kaspázu-3:**  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Ac-DEVD-CHO v DMSO.

**Reakční směs se substrátem:** 995  $\mu\text{l}$  reakčního pufru a 5  $\mu\text{l}$  substrátu (výsledná koncentrace  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

**Reakční směs se substrátem a inhibitorem:** 995  $\mu\text{l}$  reakčního pufru, 5  $\mu\text{l}$  substrátu (výsledná koncentrace  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), 0,5  $\mu\text{l}$  inhibitoru (výsledná koncentrace  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

#### Zásobní roztok fosfátového pufru (PBS)

NaCl ( $137 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), KCl ( $2,68 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $8,96 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1,47 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pro experimenty byl zásobní roztok  $10\times$  zředěn.

#### Roztoky pro přípravu celkových lyzátů

**HUVEC pufr:** Tris ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), EGTA ( $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), NaCl ( $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), glycerolfosfát ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ),  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), NaF ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), Triton X-100 (1%, v/v), Tween 20 (0,1%, v/v), inhibitor proteáz Complete<sup>TM</sup> (1 tableta v 50 ml), pH 7,5.

**RIPA pufr:** Tris ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), NaCl ( $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), Triton X-100 (1%, v/v), dodecylsulfát sodný (0,1%, m/v), deoxycholát (0,5%, m/v), inhibitor proteáz Complete<sup>TM</sup> (1 tableta v 50 ml), pH 8,0.

#### Roztoky pro SDS-PAGE a Western blot

**Migrační pufr:** Tris/HCl ( $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pH 8,8.

**Migrační gel:** 7% SDS polyakrylamidový gel: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (18,5 %), deionizovaná voda (54,7 %), migrační pufr (24,7 %), 10% dodecylsulfát sodný (1 %), 10% peroxidisíran amonný (1 %), tetramethylethyldiamin (0,1 %); 10% SDS polyakrylamidový gel: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (24,7 %), deionizovaná voda (48,5 %), migrační pufr (24,7 %), 10% dodecylsulfát sodný (1 %), 10% peroxidisíran amonný (1 %), tetramethylethyldiamin (0,1 %); 12,5% SDS polyakrylamidový gel: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (30,9 %), deionizovaná voda (42,3 %), migrační pufr (24,7 %), 10% dodecylsulfát sodný (1 %), 10% peroxidisíran amonný (1 %), tetramethylethyldiamin (0,1 %) a 15% SDS polyakrylamidový gel: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (37,1 %), deionizovaná voda (36,1 %), migrační pufr (24,7 %), 10% dodecylsulfát sodný (1 %), 10% peroxidisíran amonný (1 %), tetramethylethyldiamin (0,1 %).

**Zaostřovací pufr:** Tris ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pH 6,8.

**Zaostřovací gel:** 10% polyakrylamidový gel: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (13,1 %), deionizovaná voda (60,6 %), zaostřovací pufr (24,7 %), 10% dodecylsulfát sodný (1 %), 10% peroxidisíran amonný (0,3 %), tetramethylethyldiamin (0,15 %).

**Přenosový pufr:** Tris ( $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), glycin ( $192 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), methanol (20%, *v/v*), SDS (0,1%, *m/v*), pH 8,3.

**TBS (tris-buffered saline):** Tris ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), NaCl ( $154 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pH 7,5.

**TBS/T:** Tween 20 (0,1%, *v/v*) v TBS.

**TBS/T/mléko:** Tween 20 (0,1%, *v/v*), sušené mléko (5%, *m/v*) v TBS.

**TBS/T/BSA:** Tween 20 (0,1%, *v/v*), BSA (5%, *m/v*) v TBS.

**Vzorkový pufr:** Tris ( $312,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pH 6,8; SDS (10%, *m/v*), glycerol (50%, *v/v*), DTT ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), bromfenolová modř (0,05%, *m/v*).

**Barvicí roztok:** kyselina octová (5%, *v/v*); Ponceau S (0,1% *m/v*).

**„Stripping pufr“:** Tris ( $62,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), SDS (2%, *v/v*), 2-merkptoethanol ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pH 6,8.

### Roztoky pro stanovení bílkovin

**Pracovní roztok pro stanovení dle Bradfordové:** 0,01% (*m/v*), 100 mg Coomassie Brilliantové modře v 50 ml 96% ethanolu a 100 ml 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> doplněno do 1000 ml deionizovanou vodou.

Standardy bovinního sérového albuminu o koncentraci 0–2 g·l<sup>-1</sup>.

### Roztoky pro kometovou analýzu

**Lyzační pufr:** NaCl (2,5 mol·l<sup>-1</sup>), EDTA (100 mmol·l<sup>-1</sup>), Tris (10 mmol·l<sup>-1</sup>), Triton X-100 (1%, *v/v*), pH 10.

**Neutralizační roztok:** Tris (400 mmol·l<sup>-1</sup>), pH 7,5.

**Roztok pro elektroforézu:** NaOH (300 mmol·l<sup>-1</sup>), EDTA (1 mmol·l<sup>-1</sup>).

### Roztoky pro izolaci a kultivaci buněk

#### *Primární kultury lidských hepatocytů:*

**Premix:** glukóza (189 mmol·l<sup>-1</sup>), glutamin (64,7 mmol·l<sup>-1</sup>), penicilin (1,62 mg·ml<sup>-1</sup>), streptomycin (3,78 mg·ml<sup>-1</sup>), pyruvát sodný (10,08 mmol·l<sup>-1</sup>), dexametazon (48,2 μmol·l<sup>-1</sup>), holotransferin (0,135 mg·ml<sup>-1</sup>), ethanolamin (0,0108% *v/v*), inzulin (9,31 μmol·l<sup>-1</sup>), kyselina linolová (0,138 mmol·l<sup>-1</sup>), kyselina askorbová (2,11 mmol·l<sup>-1</sup>), glukagon (1,55 μmol·l<sup>-1</sup>), amphotericin B (Fungizone 50mg; 36,9 μg·ml<sup>-1</sup>), diflucan (13,24 μmol·l<sup>-1</sup>).

**ISOM – bezsérové médium:** směs médií Williams E a Ham-F12 v poměru 1:1. Obě média byla zakoupena v práškové formě.

Příprava Williams E média: obsah balení + NaHCO<sub>3</sub> (26,2 mmol·l<sup>-1</sup>), pH 7,2.

Příprava Ham-F12 média: obsah balení + NaHCO<sub>3</sub> (14 mmol·l<sup>-1</sup>), pH 7,2.

Média byla smíchaná v poměru 1:1 a přidáno 37 ml roztoku premix.

**ISOM – vysévací médium:** bezsérové médium obohacené o 10 % FBS.

**Roztok kolagenu na potahování kultivačních desek:** 0,2% sterilní roztok kolagenu (typ I) a 0,1% CH<sub>3</sub>COOH v poměru 1:15.

***Buněčná linie HeLa:***

**Bezsérové médium:** MEM, penicilin (100 U·ml<sup>-1</sup>), streptomycin (100 mg·l<sup>-1</sup>), NEAA (1%, v/v).

**Kultivační médium:** bezsérové médium obohacené o 10 % FBS.

**Zamrazovací médium:** FBS (90%, v/v), DMSO (10%, v/v).

***Buněčná linie Hep G2:***

**Bezsérové médium:** DMEM, penicilin (100 U·ml<sup>-1</sup>), streptomycin (100 mg·l<sup>-1</sup>), NEAA (1%, v/v).

**Kultivační médium:** bezsérové médium obohacené o 10 % FBS.

**Zamrazovací médium:** FBS (90%, v/v), DMSO (10%, v/v).

***Buněčná linie K562:***

**Bezsérové médium:** RPMI 1640, penicilin (100 U·ml<sup>-1</sup>), streptomycin (100 mg·l<sup>-1</sup>), NEAA (1%, v/v).

**Kultivační médium:** bezsérové médium obohacené o 10 % FBS.

**Zamrazovací médium:** FBS (90%, v/v), DMSO (10%, v/v).



#### 4.4 Přístroje

Chlazená centrifuga *Z 323 K* (Hermle Labortechnik, Německo)

Chlazená centrifuga *Mikro 22R* (Hettrich Zentrifugen, Německo)

Chlazená centrifuga *Rotina 38R* (Hettrich Zentrifugen, Německo)

Chlazená centrifuga *Rotina 380R* (Hettrich Zentrifugen, Německo)

Centrifuga *Labofuge 400* (Heraeus, Německo)

Centrifugy *MiniSpin*<sup>®</sup> (Eppendorf, Německo)

Minicentrifuga *Z 100 M* (Hermle Labortechnik, Německo)

CO<sub>2</sub> inkubátor *MCO-17AIC* (Sanyo Electric Biomedical, Japonsko)

CO<sub>2</sub> inkubátor *MCO-18AIC* (Sanyo Electric Biomedical, Japonsko)

Laminární box *CLF* (Schoeller Instruments, ČR)

Laminární box *Clean Air* (Schoeller Instruments, ČR)

Laminární box pro RT-PCR *Topsafe 1.8* (BioAir Instruments, ČR)

Fotometr pro měření absorbance/fluorescence v 96-jamkových deskách *Infinite M200 pro* (Tecan, Švýcarsko)

UV-VIS spektrofotometr *UV-2401PC* (Shimadzu, Japonsko)

NanoPhotometer Pearl<sup>®</sup> *P 300* (Implen, Německo)

Hlubokomrazicí box *VX 380* (Jouan, Francie)

Hlubokomrazicí box *Inova U535* (Eppendorf, Německo)

Homogenizátor *Ultra-Turax T 25 basic* (Ika Werte, Německo)

Ultrazvuková termostatová vodní lázeň *PS 01000A* (Notus-Powersonic, Slovensko)

Termomixer *Comfort* (Eppendorf, Německo)

Turbo Thermo Shaker *TMS-200* (labmark, ČR)

Mikroskop *CK40* (Olympus, Japonsko)

Inverzní fluorescenční mikroskop *Olympus IX 70 S8F* (Olympus, Japonsko) s kamerou *PCO VC 45-CG-23* (CCD Imaging, Německo)

pH-metr *inoLab Level 1* (Schoeller Instruments, ČR) s elektrodou *SenTix41* (WTW, Německo)

Třepačka *OLS 200* (Grant Instruments, Velká Británie)

Třepačka *OLS Aqua pro* (Grant Instruments, Velká Británie)

Odsávačka *Gilson Safe Aspiration Station* (Gilson, USA)

Třepačka *Duomax 1030* (Heidolph, Německo)

Třepačka *Reax top* (Heidolph, Německo)

Třepačka *Rotamax 120* (Heidolph, Německo)

Magnetická míchačka *IKA RH basic KT/C* (Slabo, ČR)

Systém pro elektroforézu *Mini-Protean<sup>®</sup> 3 Cell* se zdrojem *PowerPac 200*, *PowerPac 3000* nebo *PowerPac universal* (Bio-Rad Laboratories, USA)

Váhy *AX105 DeltaRange<sup>®</sup>* (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Zařízení pro přípravu deionizované vody *Ultrapur* (Watrex, ČR)

Vakuové čerpadlo *Vacc-space* (Chromservis, Slovensko)

Pipetovací nástavec *accu-jet<sup>®</sup>* pro (Brand, Německo)

Systém *xCELLigence* (ACEA Biosciences, USA)

*GeneChip<sup>®</sup> Fluidics station 450* (Affymatrix, USA)

*GeneChip<sup>®</sup> Hybridization Oven 645* (Affymatrix, USA)

*GeneChip<sup>®</sup> Scanner 3000 7G* (Affymatrix, USA)

HPLC/MS systém byl složen z *Dionex UltiMate 3000* (Dionex Corp., Sunnyvale, CA) jehož součástí je degasser (*SRD-3400, 4 DEGASSERCH*), binární pumpa (*HPG-3400SD*), autoinjektor (*WPS-3000 TSL ANALYTICAL*), kolonový termostat (*TCC-3000RS*) a detektor diodového pole—DAD (*DAD-3000*, 190–400 nm) s online napojením na hmotnostní spektrometr *LCQ Fleet* s kvadrupólem a iontovou pastí (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Pro analýzu byla použita kolona Purospher Star, RP-18e 55-2, (3  $\mu\text{m}$ ) (Merck, Darmstadt, Germany)

Ostatní materiál:

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

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

PVDF membrána *Immun-Blot<sup>TM</sup>* (0,2  $\mu\text{m}$ ; Bio-Rad Laboratories, USA).

Sterilizační filtry 0,22  $\mu\text{m}$  *Millex<sup>®</sup>-GS* (Millipore, USA).

Kultivační láhve *Nunclon<sup>TM</sup>*, kultivační desky, filtry a centrifugační zkumavky (Nunc, Dánsko).

Plastové injekční stříkačky (B. Braun, Německo)

Plastové mikrozukavky (Eppendorf, Německo)

Filtrační papír *Whatman* (Whatman, USA)

*Aerosil<sup>®</sup> Rumec Silica* (Evonik Industrie, Německo)

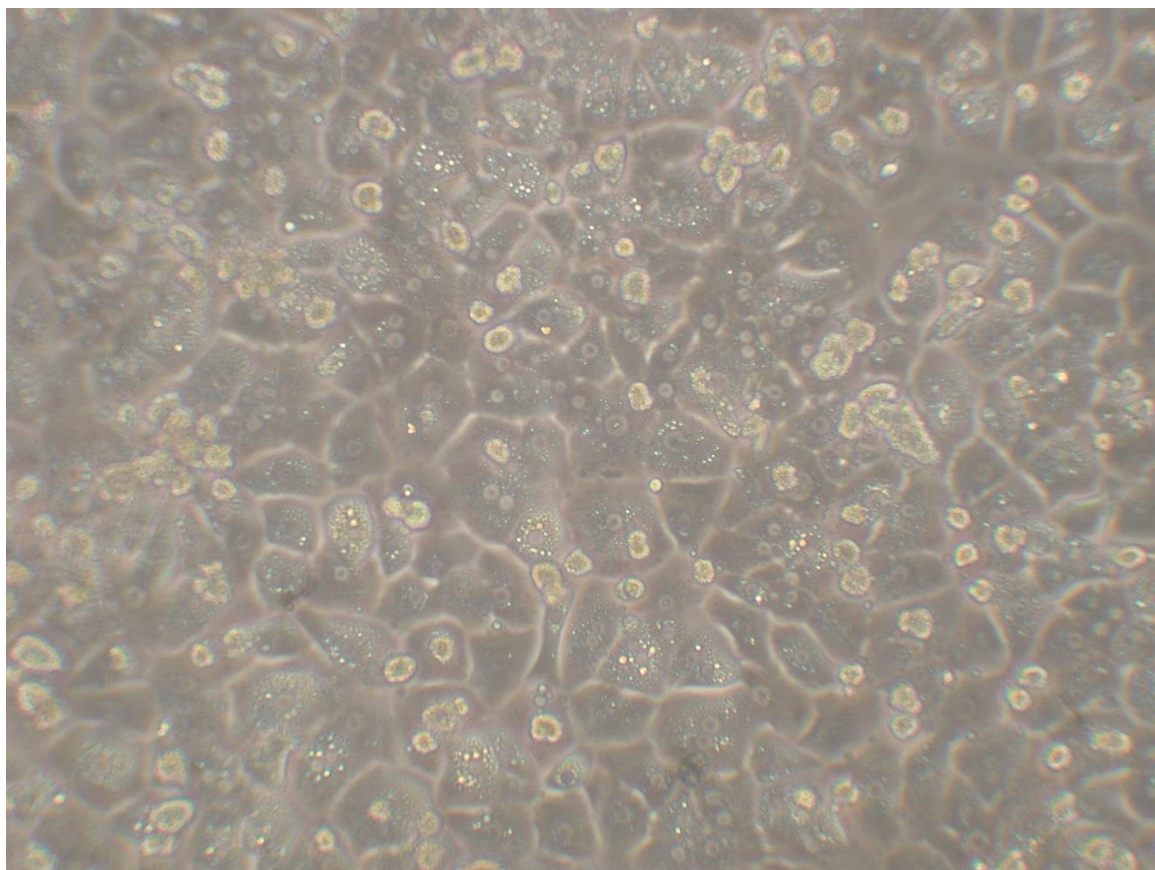
## **4.5 Použité metody**

### **4.5.1 Izolace a příprava primárních kultur lidských hepatocytů**

Izolace byly provedeny pracovníky Ústavu lékařské chemie a biochemie podle protokolu popsáno v Pichard a kol. [230]. Primární kultury lidských hepatocytů byly získány z jater multiorgánových dárců se svolením etické komise FNOL a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Stanovisko etické komie ze dne 15. 3. 2010, číslo jednací 119/07.

### **4.5.2 Kultivace primárních kultur lidských hepatocytů**

Primární kultury lidských hepatocytů byly vysety v médiu ISOM doplněném o 10 % fetálního bovinního séra. Přesné složení kultivačního média je uvedeno v sekci 4.3 Roztoky. Po 24 hodinách od vysetí bylo vyměněno médium za bezsérový ISOM. Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C a 5% atmosféře CO<sub>2</sub>.



**Obrázek 10: Monovrstva primárních kultur lidských hepatocytů.** Ilustrativní obrázek monovrstvy primárních kultur lidských hepatocytů. Fotografie byla pořízena na Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP na mikroskopu Olympus CK40, při zvětšení 100×.

#### 4.5.3 Kultivace buněčných linií HeLa, Hep G2 a K562

Buněčná linie HeLa byla kultivována v médiu MEM (minimální esenciální médium). Buňky byly uchovány v inkubátoru při 37 °C a 5% atmosféře CO<sub>2</sub>. Buňky byly podle potřeby pasážovány jednou za 2–4 dny.

Pro kultivaci buněčné linie Hep G2 bylo použito médium DMEM – s vysokou koncentrací glukózy (Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem, 4 500 mg glukózy·l<sup>-1</sup> média). Buňky byly uchovány v inkubátoru při 37 °C a 5% atmosféře CO<sub>2</sub>. Buňky byly podle potřeby pasážovány jednou za 2–4 dny.

Pro kultivaci buněčné linie K562 bylo použito médium RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640). Buňky byly uchovány v inkubátoru při 37 °C a 5% atmosféře CO<sub>2</sub>. Buňky byly podle potřeby pasážovány jednou za 2–4 dny.

Pasážování bylo provedeno při dosažení 70–80% konfluence. Prvním krokem bylo omytí buněk roztokem PBS vytemperovaným na 37 °C, které bylo jedenkrát opakováno. Cílem je odstranění veškerých zbytků původního média obsahujících metabolity a sérum, které by způsobilo inhibici trypsinu, jež je používán pro uvolnění adherentních buněk od matrice. Po odstranění PBS byl přidán 0,25% roztok trypsinu-EDTA a dojde k postupnému uvolnění buněk. Buňky byly rozsuspendovány v kultivačním médiu. Výsledkem je inhibice trypsinu a zamezení dalšího poškozování buněk. Postup pokračuje centrifugací při 178×g po dobu 3 minut, odstraněním supernatantu a rozsuspendováním peletu buněk v čerstvém kultivačním médiu. Nakonec byly buňky spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a roztoku trypanové modři [231] nebo přístroje MUSE s využitím kitu Cell count and viability. V závislosti na experimentu byly buňky vysety v patřičném množství na kultivační desky/Petriho misky a část byla vrácena do nové kultivační láhve–lahví pro další experimenty. Pokud by bylo pasážování provedeno při dosažení 100% konfluence, buňky mění své chování.

Pasážování buněk K562 vyžadovalo drobnou modifikaci protokolu, protože buněčná linie K562 je suspenzní a nevytváří kontakt s matricí. Proto byly přeskočeny první kroky související s trypsinizací buněk. Pasážování bylo zahájeno přenesením buněk z kultivační lahve do falkony a jejich centrifugací při 178×g po dobu 3 minut. Zbytek postupu byl totožný jako u adherentních buněk.

#### 4.5.4 Systém xCELLigence

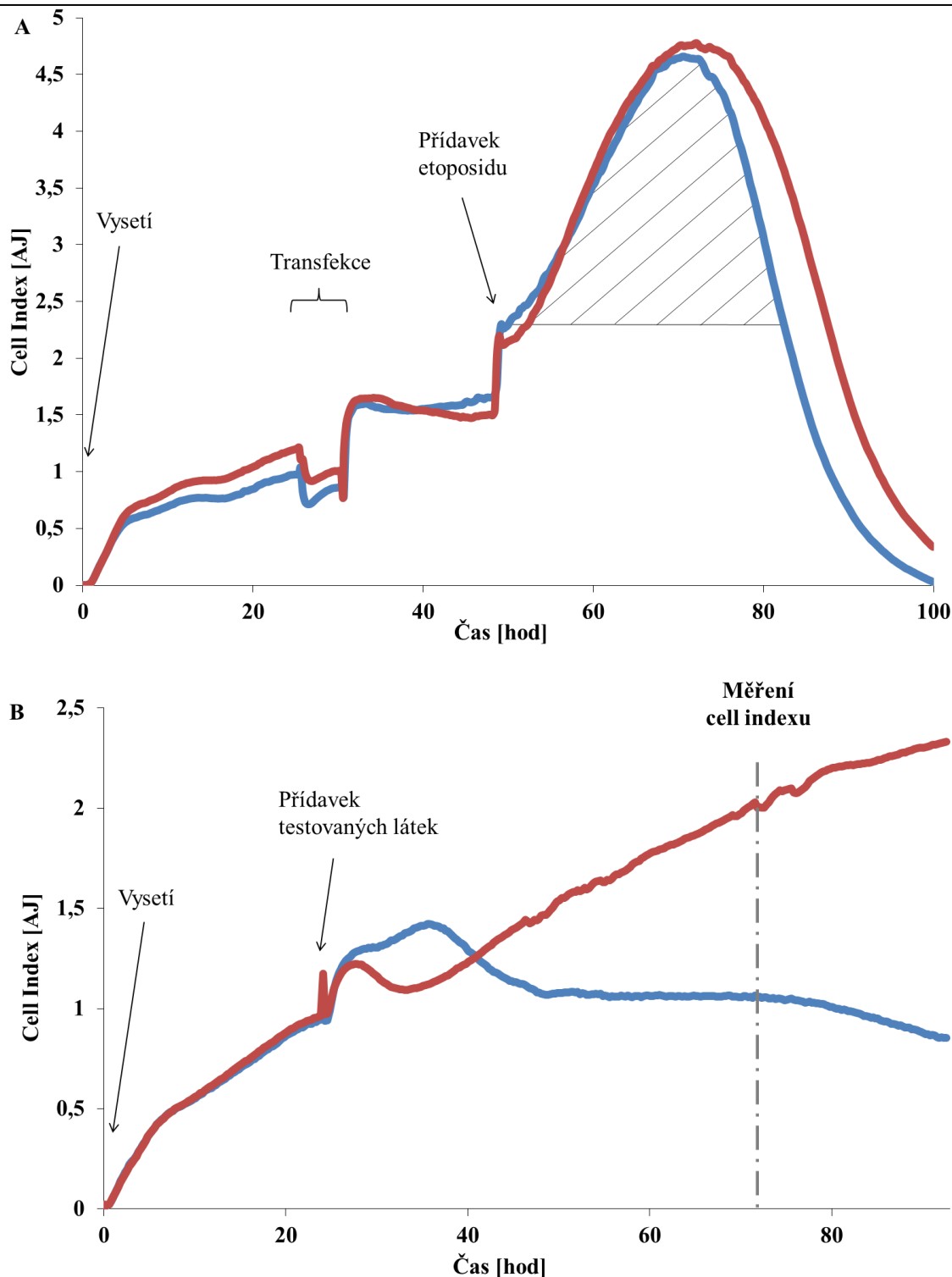
Systém xCELLigence je založen na sledování změny impedance v jednotlivých jamkách testovací destičky. Každá jamka testovací destičky odpovídá ploše jedné jamky na standardní 96 jamkové desce. Na rozdíl od standardní desky je celé dno jamek pokryto zlatými elektrodami. V rámci experimentu byly použity dva typy desek, které se liší v materiálu použité matrice, E-Plate view 16 (sklo) a E-Plate view PET (polyethylentereftalát). Obě varianty obsahují celkem 16 jamek pro jednotlivé vzorky, které jsou proměřovány nezávisle. Po vysetí zvolené buněčné linie (HeLa/Hep G2), buňky adherovaly na dno destičky, což vyvolalo změnu impedance. Naměřené hodnoty přístroj přepočítává na další veličinu, která se nazývá cell index a reprezentuje množství buněk, které je v kontaktu se dnem každé jamky. Znásobení počtu buněk v jamce nebo zvětšení povrchu buněk se odrazí na růstu hodnoty cell indexu. Umírání buněk a jejich

uvolňování od matrice se naopak projevuje poklesem hodnoty cell indexu. Cell index je veličina relativní a nemá jednotku. Hodnoty impedance se v průběhu experimentu zaznamenávaly každých 15 minut. Četnost měření lze upravovat podle potřeby.

#### 4.5.5 Vyhodnocení cytotoxicity z křivek vygenerovaných systémem xCELLigence

Pokud byl v experimentu použit etoposid ve všech vzorcích, získané křivky obsahují typický „peak“, který se objevuje po přidání testované látky. Sledovaný „peak“ je způsoben zablokováním buněk v S fázi buněčného cyklu, což má za následek nabobtnání buněk a zvětšení jejich povrchu, což se projevuje nárůstem hodnoty cell index. Tento „peak“ jsme využili pro stanovení cytotoxicity testovaných vzorků, kdy bylo vyhodnocení provedeno pomocí stanovení plochy pod křivkou podobně jako u HPLC. V našich experimentech jsme pro výpočet plochy pod křivkou využili volně dostupný software Graph 4.3 (Ivan Johansen, <http://www.padowan.dk/>). Následně jsme porovnávali velikost plochy vzorku oproti kontrole, viz. obrázek 11, modul A.

Jiný postup musel být zvolen v experimentech, jejichž kontrola neobsahovala etoposid. Díky nepřítomnosti „peaku“ jsme zvolili obvyklé vyhodnocení za pomoci hodnot cell index ve stanoveném čase a jejich porovnáním s kontrolními buňkami, viz. obrázek 11, modul B. Čas odečítání rozhodující hodnoty cell indexu byl určen na základě dat analýzy aktivity kaspázy-3 a proteinové exprese.



**Obrázek 11: Příklady postupu při vyhodnocování záznamů ze systému xCELLigence.** Modul A reprezentuje vyhodnocení výsledků získaných z experimentů obsahujících etoposid ve všech vzorcích (včetně kontroly). Červená křivka reprezentuje kontrolní HeLa buňky transfekované prekurzorem pro negativní miRNA (100 pmol/jamka) v přítomnosti etoposidu ( $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Jedná se o směs speciálně navržených sekvencí, které by neměly v testovaných buňkách vyvolávat regulaci žádné mRNA a používá se jako kontrola. Modrá křivka naopak popisuje transfekci stejné buněčné linie prekurzorem pro miR-29b, následovanou inkubací s etoposidem v koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Modul B reprezentuje postup vyhodnocení za nepřítomnosti etoposidu v kontrolním vzorku, kdy nevzniká charakteristický „peak“. Červená křivka reprezentuje kontrolní buňky Hep G2 ošetřené pouze mifepristonem ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), kdežto modrá křivka charakterizuje průběh inkubace při použití kombinace mifepriston/etoposid ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}/60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

#### 4.5.6 Stanovení aktivity kaspázy-3

Ke stanovení aktivity enzymu kaspázy-3 byl využit fluorescenčně značený substrát. Prakticky se jedná o oligopeptid Ac-DEVD-AMC. Na C-konci obsahuje fluorescenční značku (aminomethylkumarin) Pro inhibici aktivity kaspázy-3 byl využit Ac-DEVD-CHO, který má na C-konci molekuly zaměněnou fluorescenční značku za aldehydovou skupinu. Měření aktivity bylo provedeno s a bez přítomnosti inhibitoru pro ošetření fluorescenčního pozadí.

Po skončení inkubace s testovanými látkami byly buňky dvakrát omyty pomocí ledového PBS, do kterého byly následně seškrábány. Byla provedena centrifugace při  $1\,960\times g$  po dobu 5 minut při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Supernatant byl odstraněn a bylo přidáno  $50\ \mu\text{l}$  lyzačního pufru obsahujícího  $0,77\ \text{mg DTT}\cdot\text{ml}^{-1}$  a pelety byly zhomogenizovány. Postup pokračoval 10 minutovou inkubací, během které byl obsah mikrozkušavek opakovaně promíchán. Po uplynutí inkubace byly vzorky centrifugovány při  $21\,000\times g$ , po dobu 10 minut a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $4\ \mu\text{l}$  každého vzorku byly napipetovány do mikrozkušavek s  $80\ \mu\text{l}$  reakčního pufru obsahujícího  $0,77\ \text{mg DTT}\cdot\text{ml}^{-1}$  a fluorescenční substrát pro kaspázu-3 ( $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) nebo s kombinací substrátu ( $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a inhibitoru ( $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pro ošetření fluorescenčního pozadí. Nakonec byla provedena 30 minutová inkubace při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  bez přístupu světla. Po ukončení inkubace byla reakční směs z každé mikrozkušavky rozpipetována do 4 jamek ( $20\ \mu\text{l}/\text{jamka}$ ) 96 jamkové desky, byla doplněna do  $200\ \mu\text{l}$  vodou a proměřena intenzita fluorescence při excitaci  $380\ \text{nm}$  a emisi  $450\ \text{nm}$ . Výpočet hodnot byl proveden podle obrázku 12 a získané výsledky byly normalizovány na celkový protein stanovený metodou podle Bradfordové. Metoda BCA není pro vzorky vhodná díky vysokému obsahu DTT v lyzačním pufru, který způsobí prakticky okamžité zfalování reakční směsi. Poskytuje okamžitou falešně pozitivní reakci.

$$x = \frac{\frac{\text{fluorescence}_{\text{vzorek substrát}} - \text{fluorescence}_{\text{vzorek substrát+inhibitor}}}{\text{celkový protein}_{\text{vzorek}}}}{\frac{\text{fluorescence}_{\text{kontrola substrát}} - \text{fluorescence}_{\text{kontrola substrát+inhibitor}}}{\text{celkový protein}_{\text{kontrola}}}}$$

**Obrázek 12: Rovnice využitá pro výpočet aktivity kaspázy-3.**



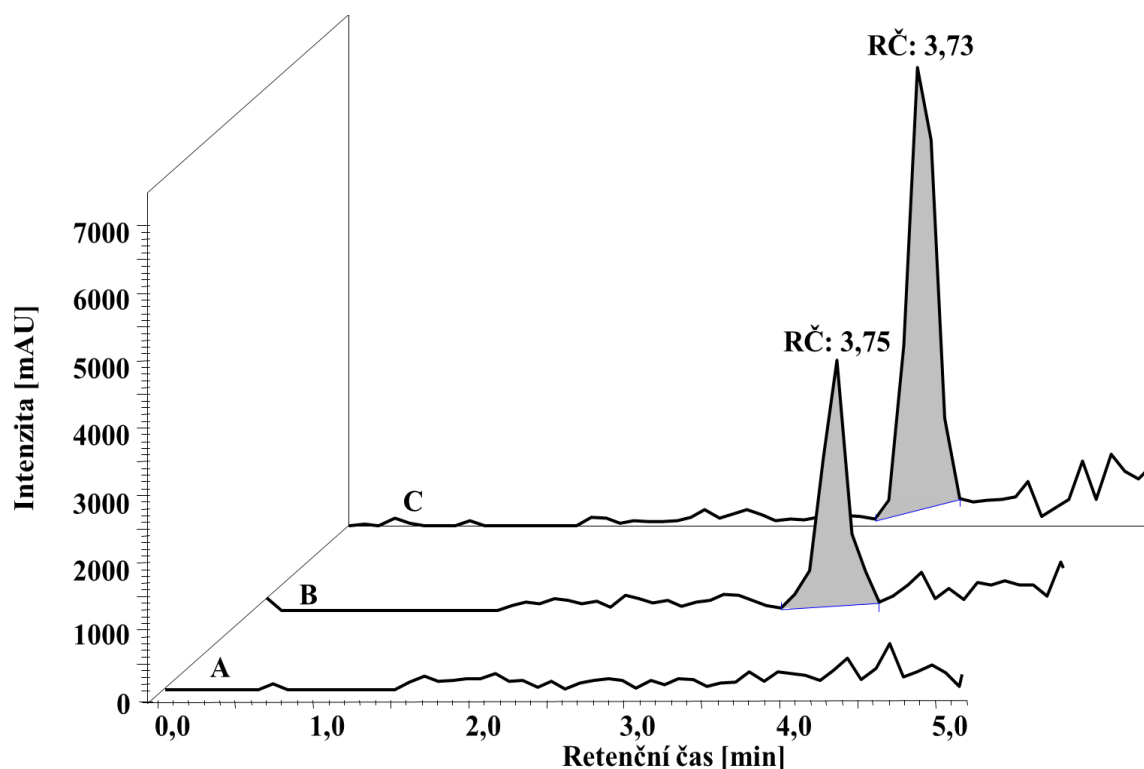
#### 4.5.7 Stanovení akumulace etoposidu v intracelulárním prostoru buněčné linie Hep G2

Buňky byly vysety na Petriho misky s průměrem 10 cm ( $4 \times 10^6$  buněk/Petriho miska) a byly ponechány do druhého dne. Následně byla provedena šestihodinová inkubace s testovanými látkami samostatně, v kombinaci nebo s DMSO jako negativní kontrolou. Po uplynutí inkubace byly buňky omyty 5 ml PBS, seškrábány do 3 ml čerstvého PBS a centrifugovány 5 minut při  $1\,960 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$ . Supernatant byl odebrán, buňky byly rozsuspendovány ve 100  $\mu\text{l}$  PBS a ponechány 1 minutu v ultrazvukové lázni. 10  $\mu\text{l}$  suspenze bylo využito pro stanovení celkové koncentrace proteinu v jednotlivých vzorcích pomocí metody BCA. Ke zbytku suspenze bylo přidáno 400  $\mu\text{l}$  methanolu obsahujícího 1 % kyseliny octové. Po důkladném zhomogenizování byly vzorky opět umístěny do ultrazvukové lázně na 1 minutu. Nakonec byly vzorky podrobeny centrifugací při  $14\,000 \times g$ , po dobu 3 minut. Takto připravený supernatant byl použit k nástřiku 10  $\mu\text{l}$  vzorku do systému HPLC s MS detekcí.

HPLC/MS systém byl složen z Dionex UltiMate 3000 (Dionex Corp., Sunnyvale, CA) jehož součástí je degasser (SRD-3400, 4 DEGASSERCH), binární pumpa (HPG-3400SD), autoinjektor (WPS-3000 TSL ANALYTICAL), kolonový termostat (TCC-3000RS) a detektor diodového pole—DAD (DAD-3000, 190–400 nm) s online napojením na hmotnostní spektrometr LCQ Fleet s kvadrupólem a iontovou pastí (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Pro analýzu byla použita kolona Purospher Star, RP-18e 55-2, (3  $\mu\text{m}$ ) (Merck, Darmstadt, Germany), temperovaná na  $30^\circ\text{C}$ . Průtok mobilní fáze byl nastaven na  $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Mobilní fáze A byla složena z methanolu (37 %), vody (62,5 %) a kyseliny octové (0,5 %), Jako mobilní fáze B byl použit čistý methanol. Pro analýzu byla použita gradientové eluce (čas/ % B, v/v): 0–3 minuty (0 % B), 3–5 minut (100 % B), 5–5,1 minuty (0 % B) a 5,1–8,5 minuty (0 % B). MS detekce proběhla v pozitivním módu při 606 m/z. Retenční čas etoposidu byl 3,75 minuty. Výsledky všech analýz byly normalizovány na celkový protein stanovený metodou BCA.

#### 4.5.8 Vyhodnocení intracelulární koncentrace etoposidu v buňkách Hep G2

Vyhodnocení množství etoposidu v buňkách Hep G2 bylo provedeno za pomoci stanovení plochy pod křivkou a následného srovnání velikosti ploch jednotlivých vzorků proti standardům testovaných látek (obrázek 13). Pro každou analýzu byly použity čerstvě připravené standardy.



**Obrázek 13: Spojený HPLC/MS chromatogram analýzy etoposidu v intracelulárním prostoru testovaných buněk.** Křivka A reprezentuje buňky Hep G2 ošetřené pouze DMSO, využitý jako negativní kontrola. Křivka B reprezentuje Hep G2 buňky inkubované s etoposidem v koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Poslední křivka, označená písmenem C, reprezentuje vliv kombinace etoposidu ( $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a mifepristonu ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

#### 4.5.9 Příprava celkových lyzátů

Pro přípravu celkových lyzátů byly použity pufrы HUVEC nebo RIPA popsané v sekci 4.3 Roztoky.

Po ukončení experimentu byly buňky dvakrát opláchnuty ledovým roztokem PBS. Po promytí byly buňky seškrábány do  $500 \mu\text{l}$  ledového PBS. Metoda pokračovala centrifugací na  $1960\times g$  po dobu 5 minut při  $4^\circ\text{C}$ . Supernatant byl odebrán a pelet zhomogenizován v  $75 \mu\text{l}$  lyzačního pufru (HUVEC/RIPA). Vzorky byly inkubovány

30 minut na ledu. Během inkubace byly minimálně 3× promíchány. Na inkubaci navazovala další centrifugace v délce 13 minut při 21 000×g a 4 °C, během které byly odděleny zbytky buněk. Supernatant byl přenesen do čisté zkumavky a byla stanovena celková koncentrace proteinu pomocí metody BCA. Nevyužité a nezpracované lyzáty byly uchovány zamražené při –80 °C.

Při využití pro techniku western blot byly vzorky smíchány s 5x vzorkovým pufrem v poměru 1:4 (20 µl pufru:80 µl celkového lyzátu). Vzorky byly povařeny při 95 °C, 5 minut, zchlazeny, krátce centrifugovány a zamraženy na –20 °C. Před aplikací na gel byly vzorky rozmraženy a 5 minut inkubovány v termobloku temperovaném na 45 °C.

#### 4.5.10 Extrakce cytosolické a jaderné frakce buněk

Pro extrakci cytosolické a jaderné frakce byl využit Nuclear extract kit od firmy Active Motif. Kit je optimalizován pro extrakci z většího množství biologického materiálu (buněk z Petriho misek s průměrem od 60 mm nebo tkání). Kit umožňuje získat aktivní nedenaturované buněčné frakce pro následnou analýzu RNA nebo proteinů.

Při využití Petriho misek s průměrem 10 cm začínala metoda odsátím média a oplachem buněk pomocí 5 ml ledového roztoku PBS, který obsahoval inhibitory fosfatáz. Tím bylo zajištěno zablokování rychlých defosforylačních změn řadících se mezi posttranslační modifikace proteinů. Ošetření má za následek zablokování odstraňování fosfátu z cílových proteinů a změně od skutečného stavu poměrů fosforylovaných a nefosforylovaných proteinů uvnitř buňky. Po odsátí roztoku PBS byly buňky z Petriho misky seškrábány do 3 ml čerstvého PBS opět s inhibitory fosfatáz. Následovala centrifugace na 200×g, 5 minut při 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet rozsuspendován v 500 µl hypotonického pufru. Vzorky byly inkubovány 15 minut na ledu. Během této doby buňky nabírají vodu, zvětšují svůj objem a membrána se stává velmi křehkou. Na konci inkubace byl přidán detergent (5 µl na každých 100 µl hypotonického pufru) a vzorky byly 10 sekund míchány na vortexu. V tomto kroku je možné zkontrolovat, zda došlo k dostatečnému poničení cytoplazmatické membrány a vylití cytosolu do pufru, vizuální kontrolou několika mikrolitrů suspenze buněk mikroskopem s fázovým kontrastem. Buňky s nepoškozenou membránou se jeví jako svítící kolečka s tmavým hustějším jádrem uvnitř. Naopak pouhá jádra se pod

mikroskopem jeví jako tmavá kolečka. Metoda pokračovala krátkou centrifugací na 14 000×g po dobu 30 sekund při 4 °C. Došlo k vytvoření peletu z jader, což umožnilo odebrat supernatant obsahující cytosolickou frakci do čisté mikrozkuhavky. Jádra byla následně rozsuspendována v 50 µl lyzačního pufru AM1, který obsahoval inhibitory proteáz a DTT v koncentraci 1 mmol·l<sup>-1</sup>. Pokud chceme zlepšit výtěžnost proteinů zapuštěných do jaderné membrány, je možné přidat do pufru 2,5 µl detergentu. Detergent podpoří její rozpad a uvolnění proteinů. Takto byly vzorky inkubovány na ledu za stálého třepání 15 minut při 150 RPM. Dalším krokem byla centrifugace na 14 000×g po dobu 10 minut při 4 °C. Po stočení byl odebrán supernatant obsahující jadernou frakci do čistých mikrozkuhovek. Takto připravené frakce byly dále využity k přípravě vzorků pro elektroforézu a western blot. Během celého postupu byly vzorky drženy na ledu.

#### 4.5.11 Elektroforéza

Pro přípravu gelu byl použit 40% roztok obsahující směs akrylamidu a bisakrylamidu v poměru 29:1. Na základě velikosti sledovaných proteinů byly použity gely s podílem akrylamidu/bis-akrylamidu v rozsahu od 7 % do 15 %. Složení gelů je popsáno v sekci 4.3 Roztoky. Připravené gely měly obvykle tloušťku 1,5 mm a byly využity 10 jamkové hřebínky. Množství naneseného vzorku se pohybovalo v rozsahu 5 až 60 µg proteinu/jamku. Elektroforéza probíhala za konstantního proudu 15 mA při průchodu zaostřovací částí gelu a 30 mA při vlastní separaci. Uvedený proud byl používán pro elektroforézu jednoho gelu. Při použití více gelů byla uvedená hodnota vynásobena jejich počtem. Pro určení místa se správnou molekulovou hmotností byly využívány předznačené proteinové žebříčky s definovanou molekulovou hmotností jednotlivých markerů. Po ukončení elektroforézy byly gely vyjmuty ze skel a inkubovány 5 minut v transferovém pufru.

#### 4.5.12 Western blot

V rámci techniky western blot byly v závislosti na velikosti stanovovaných proteinů využívány dvě dostupné techniky. Bez ohledu na zvolenou techniku transferu proteinů (jednoduché „tankové“/polosuché blotování) byly vždy použity polyviniliden fluoridové

(PVDF) membrány. Tento materiál se ve vodě nesmáčí, proto bylo potřeba provést krátkou rehydrataci v methanolu (několik sekund). Následně byl methanol zaměněn za vodu. Před zahájením vlastního transferu byla membrána inkubována v transferovém pufru po dobu 5 minut.

#### 4.5.12.1 Jednoduché „tankové“ blotování

V závislosti na tloušťce a hustotě gelu byl transfer prováděn až hodinu a 45 minut při konstantním proudu 0,4 A.

#### 4.5.12.2 Polosuché blotování

V rámci techniky polosuchého blotování byl využit standardní předdefinovaný protokol výrobcem, při kterém byl na sestavu aplikován konstantní proud 1 A po dobu 30 minut.

### 4.5.13 Detekce

Detekce byla provedena klasickým dvoukrokovým procesem s primární a sekundární protilátkou. Prvním krokem postupu bylo zablokování membrán v 5% roztoku odtučněného mléka nebo v 5% roztoku BSA v TBS/T (0,1%, v/v). Následně byla nanesena primární protilátka a přes noc inkubována při 4 °C. Primární protilátka byla standardně ředěna v poměru 1:1 000 roztokem 5% mléka nebo 5% BSA v TBS/T (0,1%, v/v) v závislosti na doporučení výrobce. Druhý den byly membrány 3x promyty po dobu 10 minut v pufru TBS/T (0,1%, v/v). Metoda pokračovala jednohodinovou inkubací se sekundární protilátkou při pokojové teplotě. Sekundární protilátka byla konjugována s křenovou peroxidázou (HRP) a standardně ředěna v poměru 1:10 000 nebo 1:5 000 roztokem 5% mléka v TBS/T (0,1%, v/v). Pro detekci byl využit buď komerčně dostupný substrát Immunocruz nebo svépomocí připravený, obsahující luminol, p-kumarovou kyselinu, peroxid vodíku, TRIS bázi a vodu. Detekce byla provedena pomocí fotografických filmů Carestream Kodak BioMax light nebo Fuji medical x-ray. Vyvolávání filmů probíhalo pomocí standardního protokolu s vývojkou a ustalovačem.

Následně byly filmy černobíle naskenovány při rozlišení alespoň 600 DPI a uloženy ve formátu Tiff. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí denzitometrie přes program ImageJ [232]. Kromě ImageJ lze použít i software dodaný k přístroji Tajfun.

#### 4.5.14 Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena zavedenou Chomczynského fenol/chloroformovou extrakcí [233,234].

Po ukončení experimentu byly buňky dvakrát opláchnuty ledovým roztokem PBS. Následně byl přidán 1 ml/1,5 ml TRI Reagent® (Hep G2, HeLa/primární kultury lidských hepatocytů, 1 jamka na 6 jamkové desce) a pipetou homogenizováno do rozpuštění všech buněk. Takto zpracované vzorky byly zamrazeny při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Vlastní izolace pokračovala rozmražením vzorků na ledu a 15 minutovou inkubací při pokojové teplotě, kdy dojde k rozvolnění veškerých struktur nukleových kyselin. Ke vzorkům bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  chloroformu a byly 30 s míchány na vortexu. Po uplynutí 5 minutové inkubace při pokojové teplotě byly vzorky centrifugovány na  $12\ 000\times g$ , 15 minut při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Centrifugace urychlí a napomůže lepšímu rozdělení jednotlivých fází. Horní vodná fáze obsahovala RNA. Mezifáze obsahovala DNA. Spodní, organická fáze obsahovala proteiny a DNA. Vodné fáze byly odebrány do čistých mikrozkušavek a pro vysrážení RNA byl přidán izopropanol v poměru 1:1. Vzorky byly promíchány převrácením mikrozkušavek a inkubovány 10 minut při pokojové teplotě. Vysrážená RNA byla centrifugována na  $12\ 000\times g$ , 10 minut při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Supernatant byl odstraněn a pelety RNA přečištěny přidáním 1 ml ledového 75% ethanolu. Pelety byly uvolněny převrácením mikrozkušavek. Vzorky byly opět podrobeny centrifugaci po dobu 5 minut při  $6\ 182\times g$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po odstranění supernatantu byly vzorky ještě jednou krátce centrifugovány, byl odebrán zbytek roztoku ethanolu a RNA pelety byly rozpuštěny ve vhodném objemu vody s certifikací pro molekulární biologii.

Posledním krokem extrakce bylo proměření absorbance při vlnových délkách 260 nm a 280 nm a stanovení koncentrace celkové RNA ve vzorcích. K proměření byl využit nanofotometr od společnosti Implen, schopný měřit čistotu a množství RNA v objemu 1  $\mu\text{l}$ . Na rozdíl od konkurenčního Nanodropu 2000 umožňuje Implen měření i v klasických květech. Pro nanoaplikace byl využit speciální nástavec a víčka.

#### 4.5.15 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla provedena pomocí miRNA reverse transcription kit od společnosti Applied Biosystems, podle výrobcem stanoveného protokolu s drobnými úpravami.

V prvním kroku byl připraven roztok „Master Mix“, jehož složení je uvedeno v tabulce 5. Uvedené objemy odpovídají jednomu vzorku. Do připravené směsi byly napipetovány specifické primery (3  $\mu$ l) a vzorek celkové RNA v objemu 5  $\mu$ l obsahující 20 ng celkové RNA. Po promíchání a centrifugaci byly vzorky inkubovány 5 minut na ledu a následně byly vloženy do thermocykleru s programem nastaveným podle tabulky 6. Po proběhnutí protokolu byly vzorky dále zpracovány nebo zamraženy na  $-20$  °C.

**Tabulka 5: Složení roztoku Master Mix pro reverzní transkripci.**

Komponenta	Objem [ $\mu$ l]
100 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dNTPs	0,15
Multiscribe <sup>TM</sup> reverzní transkriptáza	1,00
Pufř pro reverzní transkribci	1,50
Inhibitor RNáz	0,19
Voda pro molekulární biologii	4,16
Celkový objem	7,00

Objemy uvedené v tabulce odpovídají jednomu vzorku.

**Tabulka 6: Časové a teplotní nastavení thermocykleru.**

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]
1	16	30
2	42	30
3	85	5
4	4	$\infty$

#### 4.5.16 Real-time PCR

Pro detekci přeepsaných cDNA byl použit kit TaqMan<sup>®</sup> miRNA assay. Prvním krokem byla příprava pracovního roztoku smícháním 2x TaqMan Universal PCR Master Mix

(10  $\mu$ l) s vodou (7,67  $\mu$ l, pro molekulární biologii). K hotové směsi v RT-PCR destičce byly napipetovány primery se sondou a cDNA. Objemy uvedené v tabulce 7 odpovídají jednomu vzorku, měření bylo provedeno v tripletech. Po promíchání a centrifugaci byly vzorky vloženy do thermocyklieru s programem nastaveným podle tabulky 8. Pro výpočet relativního množství byla použita delta delta komparativní metoda publikovaná v roce 2001 [235], viz. obrázek 14. Jako endogenní kontrolní RNA byla použita RNU6B.

**Tabulka 7: Složení směsi pro RT-PCR.**

Komponenta	Objem [ $\mu$ l]
TaqMan <sup>TM</sup> MicroRNA assay (20x)	1,00
cDNA produkt	1,33
TaqMan <sup>TM</sup> 2x Universal PCR Master Mix, No AmpErase <sup>TM</sup> UNG	10,00
Voda pro molekulární biologii	7,67
Celkový objem	20,00

Objemy uvedené v tabulce odpovídají jednomu vzorku.

**Tabulka 8: Časové a teplotní nastavení thermocyklieru.**

Krok	Aktivace Ampli <sup>®</sup> TaqGold <sup>®</sup> enzymu	PCR	
		Cyklus (40 cyklů)	
		denaturace	nasednutí/amplifikace
Čas	10 min	15 sec	60 sec
Teplota [°C]	95	95	60

$$\Delta Ct = Ct_{\text{cílová miRNA}} - Ct_{\text{RNU6B}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{vzorek}} - \Delta Ct_{\text{kontrola}}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

**Obrázek 14: Rovnice využitá pro výpočet relativní exprese.**



#### 4.5.17 Stanovení proteinů

Různé metody stanovení proteinů byly použity na základě složení lyzačních roztoků, jelikož mnohé komponenty těchto roztoků jsou schopné s reakčními činidly interagovat a způsobovat interference v měření. To se projeví falešně pozitivními výsledky. Ve většině případů jsme používali dvě základní zavedené metody, a to metodu dle Bradfordové a bicinchoninovou metodu. Výhody a nevýhody stanovení budou diskutovány u jednotlivých metod.

##### 4.5.17.1 Metoda podle Bradfordové

Metoda je založena na interakci barviva Coomassie Blue G-250 s molekulou proteinu v kyselém prostředí. Adsorpční vazba se tvoří mezi barvičkou a argininem, ale i dalšími bazickými a aromatickými aminokyselinami [236,237].

10  $\mu$ l vzorku/standardu bylo smícháno v mikrotitrační destičce se 100  $\mu$ l pracovního roztoku. Směs byla inkubována při pokojové teplotě 5 min a následně byla proměřena absorbance na destičkovém spektrofotometru při vlnové délce 595 nm. Pro přípravu standardů byl použit protein BSA.

Metoda je obzvláště citlivá na přítomnost jakýchkoliv detergentů. Při vysoké koncentraci detergentů a nízkém množství proteinu ve vzorku je lepší použít bicinchoninovou metodu

##### 4.5.17.2 Bicinchoninová metoda

Metoda je založena na interakci měďnatých iontů s peptidovými vazbami sledovaných proteinů produkující ionty  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , které mohou tvořit barevný komplex s přítomnou sodnou solí bicinchoninové kyseliny [238].

10  $\mu$ l vzorku/standardu bylo smícháno v mikrotitrační destičce s 200  $\mu$ l pracovního roztoku. Pracovní roztok byl připraven smícháním roztoku A s roztokem B v poměru 50:1. Roztoky byly dodány jako komerčně dostupný kit. Směs byla inkubována při 37 °C 30 min a následně byla proměřena absorbance na destičkovém spektrofotometru při vlnové délce 562 nm. Pro přípravu standardů byl použit protein BSA.

Metoda je velmi citlivá na přítomnost kovových iontů. Dalším důvodem nepoužitelnosti metody je vysoký obsah DTT v lyzačním pufru. Takové vzorky dávají

falešně pozitivní reakci, kterou lze velmi lehce rozpoznat. Vzoroky totiž vykazují velmi rychlou reakci a téměř okamžitě dochází ke změně barvy reakčního činidla. Výhodou je kompatibilita metody s většinou iontových a neiontových detergentů.

#### 4.5.18 Transfekce buněk

Pro transfekci buněk byla využita transfekční reagentie Lipofectamine 2 000. Principem metody je vytvoření komplexu oligonukleotidu, například miRNA, s lipofectaminem 2 000. Vytvořené částice komplexu buňka ochotně vychytává pomocí pinocytózy.

Prvním krokem byla příprava transfekční směsi. Protokol popisuje přípravu transfekční směsi jedné jamky u šesti jamkové desky. Pro jiné velikosti jamek jsou data uvedena v manuálu výrobce. 250  $\mu$ l Opti-MEM bylo ve zkumavce smícháno s 5  $\mu$ l Lipofectaminu 2 000, který byl přidán po kapkách přímo do média. Nikdy se nepřidává po stěně zkumavky, protože by došlo k naadsorbování reagentie na zkumavku a transfekce by nebyla účinná. Vytvořená směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Dále byla připravena druhá zkumavka obsahující 250  $\mu$ l Opti-MEM a 100 pmol prekurzoru miRNA nebo siRNA. Po uplynutí inkubace byl obsah zkumavek spojen a jemně promíchán. Následovala 15 minutová inkubace při pokojové teplotě, během které došlo k vytvoření komplexů oligonukleotidu s lipofectaminem 2 000. Obsah zkumavky byl doplněn médiem na objem 2 000  $\mu$ l, směs byla opatrně promíchána a nanesena na adherované buňky. Po čtyřech až šesti hodinách byl roztok nad buňkami vyměněn za klasické růstové médium. Pokud nedojde k výměně, skutečnost se projeví velkým nárůstem toxicity transfekce. Během transfekce je nutné používat médium bez antibiotik, které by zbytečně navyšovali toxicitu transfekčního činidla.

Lipofectaminem 2 000 lze transfekovat i buňky v suspenzi. Postup je stejný jako v předchozím případě. Jediný rozdíl je na konci protokolu, kde byla místo bezsérového média přidána suspenze s požadovaným množstvím buněk. Takto vytvořená směs byla opatrně promíchána a vyseta na kultivační desky.

#### 4.5.19 Kometová analýza

Kometová analýza byla použita pro sledování míry poškození DNA v testovaném experimentálním modelu. Metoda využívá elektroforetické dělení DNA ve vhodném migračním pufru se zásaditým pH, který způsobí záporné nabití DNA. Pokud je DNA v buňce poškozena, dochází k její fragmentaci a vzniklé různě rychle putující kusy vytváří typický ocásek. Naopak nepoškozená intaktní DNA se jeví jako krásná fluoreskující kulička.

Prvním krokem byla příprava podložních skel. Skla byla vyčištěna pomocí 6% peroxidu vodíku za varu po dobu 30 minut. Po omytí v destilované vodě byla podložní sklička osušena, byl připraven 1% roztok agarózy a skličko bylo svislým ponořením pokryto. Spodní část sklička byla otřena o kádinku a skličko bylo ponecháno zaschnout. Neponořená část sklička byla využita pro jejich označení diamantovou tužkou. Po zaschnutí byla sklička vložena na 30 minut do sušárny vytemperované na 60 °C.

V den provedení analýzy byla dokončena příprava podložního sklička a samotného preparátu. Na připravené podložní sklo bylo v dubletu nanášeno 85 µl 1% standardní vysokotuhnoucí agarózy. Po přikrytí agarózy krycími skly byla sklička přenesena na 15 minut do lednice, kde proběhlo zatuhnutí.

Buňky byly uvolněny za pomoci 0,25% trypsinu s EDTA. Pro inhibici trypsinu bylo použito fetální bovinní sérum. Následně byly buňky rozsuspendovány v 1 ml PBS a centrifugovány 10 minut při 2 000×g a 4 °C. Získaný pelet byl rozsuspendován v 50 µl PBS. 20 µl připravené suspenze bylo přidáno k 85 µl 1% nízkotuhnoucí agarózy, překryto krycím sklem a ochlazen na 4 °C. Po zatuhnutí gelu bylo krycí skličko sejmuta a byla provedena lyzace buněk 1% roztokem Tritonu X-100 po dobu 1 hodiny při 4 °C.

Metoda pokračovala elektroforetickou separací (20 minut, 20 V, 4 °C). Následně byla sklička 3krát inkubována 5 minut v neutralizačním roztoku.

Na plochy agarózy bylo aplikováno 25 µl roztoku Sybr Green a kapka byla překryta krycím sklem. Poškození DNA bylo pozorováno pomocí fluorescenčního mikroskopu Zeiss AxiovertC. V rámci jednoho vzorku bylo vyhodnoceno 50 buněk. Buňky byly vizuálně děleny do pěti skupin od nepoškozených označovaných stupněm 0 až po úplně poškozené, které byly označeny stupněm 4 [239].

#### 4.5.20 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence byla pozorována pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu Zeiss AxiovertC a analyzována softwarem AxioVision Rel. 4.8 dodaným k mikroskopu. Pro zachycení obrazu byla využita zabudovaná kamera Zeiss AxioCam ICm1 (Carl Zeiss). Pomocí sondy Sybr green a excitačního filtru 470 nm byla pozorována zelená fluorescence přes emisní filtr 515 nm. Excitaci zajišťovala rtuťová výbojka HBO50. Z důvodu použití černobílé kamery Zeiss AxioCam ICM1 byl pro dobarvení obrázků použit program ImageJ [232].

#### 4.5.21 Průtoková cytometrie

Měření průtokovou cytometrií provedla laboratoř doc. Petra Mlejnka. Metoda byla detailně popsána v článku Dostál a kol. [36].

#### 4.5.22 mikroRNA arrays

Platforma Affymetrix GeneChip miRNA 3.0 Array byla využita pro stanovení expresního profilu 1733 zralých lidských miRNA. Technologie využívá sadu různých oligonukleotidových sond imobilizovaných na skleněné matrici, které jsou komplementární ke sledovaným miRNA. Metoda využívá vytvoření polyA ocásku na konci miRNA a její označení biotinem. Po ukončení hybridizace byla navázaná miRNA označena fluorescenční sondou navázanou na streptavidin za pomoci vytvoření pevné vazby streptavidin/biotin. Délka miRNA sondy je 25 oligonukleotidů nebo kratší v závislosti na sekvenci sledované miRNA. V konečné fázi byl čip oskenován. Pro testování lze použít vzorky obsahující jak celkovou RNA nebo obohacené o krátké RNA. Čip obsahuje celkem 19 724 různých sond. Přesný postup při čipové analýze byl popsán v mé diplomové práci [240].

#### 4.5.23 Počítání buněk a měření jejich viability na systému MUSE cell analyser

Systém MUSE cell analyser představuje zmenšenou verzi průtokového cytometru s jedním laserem. Je schopen detekovat sérii různých sond, které jsou obsaženy v jednotlivých kitech.

V našem případě byl využíván kit s názvem Cell count and viability, který je navržen pro stanovení počtu buněk a jejich životnosti. Kit je považován za alternativu ke standardně používanému stanovení počtu buněk v 1 ml suspenze za pomoci trypanové modře [231].

Před vlastním zahájením počítání buněk bylo nutné přístroj vyčistit pomocí programu „complete clean“. Přístroj byl promyt za pomoci Guava instrument cleaning fluid, což je směs KOH a blíže nespecifikovaného detergentu. Postup pokračoval promytím destilovanou vodou. Tím byly eliminovány jakékoliv stopy čistícího roztoku.

Další důležitou činností je kalibrace, která byla prováděna jednou týdně za pomoci kalibračního kitu „Muse System Check Kit“. Ten obsahuje pufr a fluorescenčně značené polystyrenové kuličky (v našem případě 56 000 částic/ml). Do speciální zkumavky bylo k 190  $\mu$ l pufru přidáno 10  $\mu$ l polystyrenových kuliček. Tato směs byla jemně zhomogenizována, vložena do přístroje a bylo provedeno třikrát vlastní měření. Podle naměřeného počtu částic a odchylky bylo vyhodnoceno, zda proběhla kalibrace v pořádku nebo selhala.

Po spasázování buněk byla připravena základní suspenze, ze které byl odebrán požadovaný objem pro analýzu. Objem byl odhadnut na základě množství vyzolovaných buněk. Toto množství bylo přidáno do reakčního činidla. Z poměru objemů přidané suspenze a reakčního činidla bylo vypočítáno konečné ředění, která bylo zadáno do přístroje před začátkem měření. (20  $\mu$ l buněční suspenze:180  $\mu$ l činidla – ředění 10x). Při měření většího množství vzorků výrobce doporučuje po 20 měřeních spustit rychlé čištění přístroje vodou.

Přístroj má i své nevýhody. Hlavní je nutnost velmi dobrého zpracování testovaných buněk. Obzvláště velká pozornost je vyžadována u linií, které tvoří rády shluky buněk, protože způsobují ucpání kapiláry v přístroji. Ucpání se řeší výměnou vzorku za čistou zkumavku a zapnutím zpětného toku přístroje. Pokud neprovedeme výměnu, vzorek bude kontaminován.

#### 4.5.24 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena za pomoci statistického programu Statistica 12. Testovaná data byla podrobena jednofaktorové ANOVA s Tukeyho posthoc testem. Stejný program byl využit pro vytvoření série pokročilejšího statistického vyhodnocení dat pocházejících z čipové technologie firmy Affymetrix. Pro získání vlastních dat ze souborů vytvořených systémem Affymetrix byl použit plugin pro R software Bioconductor [241]. Pokročilé statistické metody jako klastrovací analýza byly provedeny v programu Statistica 12 Mgr. Martinem Seberou, Ph.D.

## 5 VÝSLEDKY

Expres miRNA může být využita jako prognostický marker, který hodnotí pravděpodobnou odezvu pacienta na léčbu a jeho prognózu. Druhou možností pohledu je její terapeutické využití jako součást léčebního procesu, a tedy ovlivňování účinnosti xenobiotik (léčiv). V takovém případě je velmi dobrým modelem navýšování exprese tumor supresorové miRNA, jejíž množství a tvorba je u nádorů ve srovnání s nenádorovou populací buněk často potlačena. Expresi molekul jako jsou miRNA lze ovlivňovat několika způsoby. Jednou z možností, kterou lze využít, je transfekce zralých miRNA. Pokud jsou použity prekurzorové molekuly, jsou přetvořeny na zralé miRNA až uvnitř buňky, přítomnou enzymatickou výbavou. Zmíněný příklad můžeme označit jako „nefyziologické“ upravování exprese miRNA, protože buňka sama intenzitu přepisu genu pro danou miRNA nemění. Někdy se může buňka umělému navýšení bránit za pomoci indukce exprese regulačních molekul, například některé lncRNA, které imitují cíle miRNA. Výsledkem je vychytání části molekul miRNA, což má za následek omezení pozorovaného dopadu na buňku [242]. Druhou možností modulace exprese miRNA představují signální dráhy. Popsané působení probíhá prakticky pořád velkým množstvím stimulů od přirozeně se vyskytujících (např. hormony), požitých či vdechnutých látek z potravy a prostředí až po volné radikály [157,243]. Tyto zásahy můžeme provádět záměrně, vystavením buněk různým signálním látkám nebo „nevědomky“. Například při kontaktu s látkami z životního prostředí nebo při konzumaci ovoce a zeleniny. Zmíněné plodiny totiž obsahují v hojné míře látky z rodiny polyfenolů, které jsou známé svými peiotrofními efekty. Mezi ně se počítá i ovlivnění miRNA a s ním související působení na fenotyp buňky. V průběhu studia jsme se zaměřili na oba dva přístupy.

### 5.1 Vliv rodiny miR-29 na cytotoxicitu protinádorového léčiva etoposidu se zaměřením na studium mechanismu účinku

Prvním zkoumaným přístupem byla transfekce miRNA testovaná jako komponenta kombinované léčby. Naším cílem bylo navýšení cytotoxicity etoposidu ( $60 \mu\text{mol} \cdot \Gamma^{-1}$ ) proti testovanému buněčnému modelu, spojené se snahou popsat mechanismus účinku. V naší první studii jsme se zaměřili na rodinu miR-29. Tato rodina obsahuje celkem tři členy označované jako izoformy, pojmenované miR-29a, miR-29b a miR-29c. Díky modulovaným cílovým proteinům a obvykle snížené expresi v nádorech se označuje jako

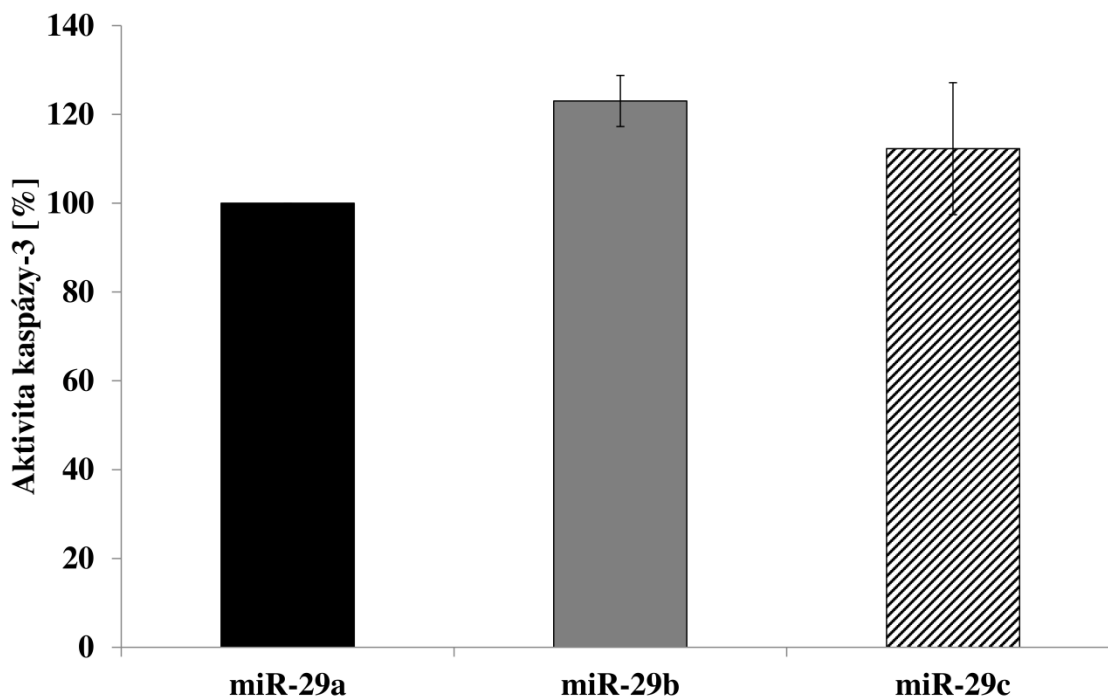
nádorově supresorová miRNA [147]. V prvním kroku se studie zabývala sledováním efektu jednotlivých izoforem rodiny miR-29 na cytotoxicitu etoposidu s využitím buněčné linie HeLa. Experiment provedený na systému xCELLigence ukázal, že jediná aktivní izoforma je miR-29b. Ostatní izoformy vykazovaly jen nepatrné zvýšení cytotoxicity etoposidu (výsledky publikovány v disertační práci Andree 2018 [244]). Naším dalším cílem byla snaha objasnit mechanismus účinku miR-29b, který ji činí v našem modelu výjimečnou. V rámci disertační práce Andree [244] byly publikovány data týkající se vlivu transfekce jednotlivých prekurzorů na dva proteiny rodiny Bcl-2. Anti-apoptický protein a validovaný cíl rodiny miR-29 Mcl-1 a protein Bak, jehož modulace byla pozorována u buněčné linie HeLa po transfekci prekurzorem miR-29c v rámci disertační práce Gabrielové [245]. Výsledky z analýz technikou western blot ukázaly, že protein Mcl-1 vykazuje ovlivnění exprese jeho izoforem. Po transfekci prekurzorem miR-29b vykazovala dlouhá izoforma snížení exprese na proteinové úrovni, kdežto exprese krátké izoformy byla modulována jen nepatrně. Výsledkem je změna poměru jednotlivých izoforem proteinu Mcl-1, což má dopad na ochotu buněk ke vstupu do apoptózy. U zbylých dvou izoforem došlo ke snížení exprese obou izoforem proteinu a výsledný poměr nebyl významně odlišný. U proteinu Bak byla v reakci na transfekci pozorována pouze zanedbatelná změna u všech tří testovaných prekurzorů rodiny miR-29.

### 5.1.1 Vliv rodiny miR-29 na aktivitu kaspázy-3

Zastavení růstu a zvýšené umírání nádorových buněk jako důsledek terapie je velmi důležité. Nemělo by se ale zapomínat na typ buněčné smrti, kterou terapií vyvoláme. Při zjednodušeném pohledu se může buněčná smrt rozdělit na dva základní typy. Prvním a v našem případě vhodným je apoptóza, která končí smrtí pouze zasažené buňky. Nedochozí k vyvolání zánětu a poškození okolní tkáně. Nekróza, druhá a horší varianta, končí ztrátou integrity membrány a vylitím obsahu buňky do prostředí. Následuje zánětlivá odpověď a poškození okolní tkáně. Dnes se popisují další typy buněčné smrti obvykle charakterizované jiným způsobem iniciace. Příkladem může být ferroptóza – vyvolaná za pomoci přítomnosti železa, která je dnes v literatuře považovaná za nový typ buněčné smrti a zařazuje se mezi první dvě zmíněné. Označení ferroptóza a její definice se v literatuře objevily v roce 2012 [246]. Více informací o ferroptóze lze nalézt například v publikaci Hirschhorna a Stockwella z roku 2018 [247].



Z výše uvedeného je patrné, že vhodná terapeutická strategie by měla u testovaného buněčného modelu vyvolávat apoptózu, spíše než nekrózu. Navíc byl u buněk transfekovaných prekurzorem miR-29b zjištěn vliv na expresi jednotlivých forem proteinu Mcl-1, které plní rozdílné role v apoptotické signalizaci [248]. Proto jsme se rozhodli sledovat vliv transfekce a následné inkubace s etoposidem v koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  na aktivitu kaspázy-3. Kaspáza-3 patří mezi hlavní enzymy apoptózy a je označovaná jako její významný marker. Pro stanovení míry aktivace kaspázy-3 lze použít několik přístupů, mezi něž se řadí sledování množství aktivního enzymu pomocí techniky western blot v oblasti 17 kDa. Ve člancích se objevují i doplňující analýzy sledující štěpení proteinu PARP-1 [159]. Nicméně pro naše účely jsme zvolili zavedenou metodu s fluorescenčním substrátem a inhibitorem pro kaspázu-3. Aktivita kaspázy-3 byla měřena po 16 hodinách od zahájení inkubace s etoposidem ( $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Získaná data pro jednotlivé prekurzory miRNA byla porovnána a změny mezi jednotlivými miRNA vyšly statisticky nevýznamné. Při porovnání trendů vykazuje miR-29b nejvyšší aktivitu kaspázy-3 (obrázek 15). V čase měření měly buňky transfekované preurzory miR-29b signifikantně nižší obsah proteinu ve srovnání s kontrolou. To ukazuje na skutečnost, že většina buněk byla v daném okamžiku mrtvá.



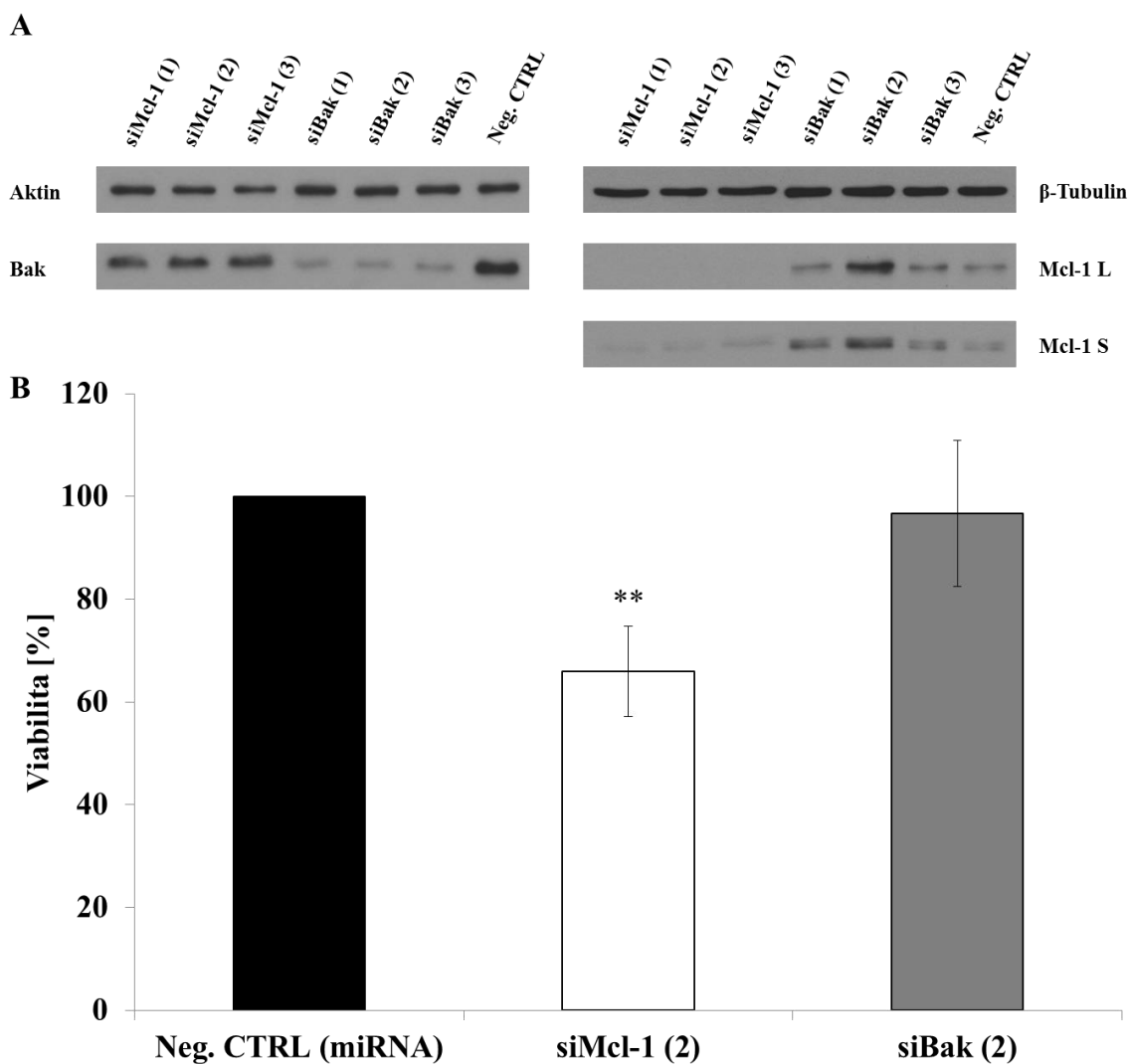
**Obrázek 15: Vliv transfekce na aktivitu kaspázy-3 během inkubace etoposidu ( $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) s buněčnou linií HeLa.** Vyhodnocení vlivu transfekce prekurzory rodiny miR-29 na aktivitu kaspázy-3 v buněčné linii HeLa. Buňky byly transfekovány (4 hodiny) jednotlivými prekurzory rodiny miR-29. 24 hodin po transfekci byly buňky vystaveny etoposidu ( $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Po 16 hodinách byly buňky zpracovány podle standardního protokolu pro stanovení aktivity kaspázy-3 popsáno v sekci 4.5 Použité metody. Naměřené hodnoty byly ošetřené na efekt fluorescenčního pozadí přípravou druhé série totožných vzorků inkubovaných s reakčním pufrem se substrátem, obohaceným o inhibitor sledovaného enzymu. Výsledky byly normalizovány na celkový protein. Data představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku tří nezávislých měření. Relativní aktivita jednotlivých vzorků byla vztažena proti buňkám transfekovaným prekurzorem pro miR-29a.

### 5.1.2 Testování účinnosti použitých siRNA proti proteinům Mcl-1 a Bak

Molekuly miRNA jsou schopné ovlivňovat expresi velkého množství cílových mRNA. Pro prokázání vlivu vybraných proteinů je vhodné využít přístup, který umožňuje regulaci exprese ideálně pouze jednoho proteinu. Pokud se jedná o navýšení, lze využít různých expresních plazmidů. Pro snížení exprese je vhodné použít například molekuly siRNA nebo shRNA. Pro transfekci buněk siRNA jsme použili totožný protokol transfekce jako pro miRNA. Cílem je pomocí RNA interference snížit množství zvoleného proteinu na co nejnižší hodnotu. V rámci testování efektivity jsme zakoupili šest siRNA, tři proti Mcl-1 a tři proti Bak. Nejúčinnější siRNA pro použitý buněčný model jsme stanovili pomocí metody western blot. Experiment byl složen z transfekce následované analýzou hladiny proteinů Mcl-1 a Bak po 24, 48 a 72 hodinách od transfekce. Na základě výsledků jsme zvolili pro další experimenty siRNA s číselným označením (2), viz. obrázek 16, modul A.

### 5.1.3 Vliv proteinů Mcl-1 a Bak na cytotoxicitu etoposidu

Nejefektivnější siRNA byly využity pro sledování vlivu snížení exprese proteinů Mcl-1 a Bak na cytotoxicitu etoposidu. Výsledky potvrdily naši hypotézu. Pro navýšení cytotoxicity je důležité snížení exprese proteinu Mcl-1. Naopak regulace proteinu Bak měla pouze zanedbatelný efekt, viz. obrázek 16, modul B.



**Obrázek 16: Efekt různých siRNA na cytotoxicitu etoposidu ( $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v buněčné linii HeLa.** Modul A – HeLa buňky byly transfekovány (4 hodiny) šesti různými siRNA proti proteinům Mcl-1 a Bak nebo miRNA negativní kontrolou. 24 hodin po transfekci byly buňky vystaveny etoposidu ( $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Dále byly ve zvolených časových intervalech (24, 48 a 72 hodin) připraveny celkové lyzáty a provedena elektroforéza následovaná technikou western blot. Modul ukazuje reprezentativní western blot po 48 hodinách od transfekce. Modul B – vyhodnocení vlivu transfekce nejvhodnějších siRNA proti proteinům Mcl-1 a Bak na cytotoxicitu etoposidu v buněčné linii HeLa. Buňky byly transfekovány (4 hodiny) vybranými siRNA (Mcl-1 (2) a Bak (2)) nebo miRNA negativní kontrolou. 24 hodin po transfekci byly buňky vystaveny etoposidu v koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Toxicita byla vypočítaná podle postupu popsaného v experimentální části. Data představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku čtyř nezávislých měření. Jednotlivé experimenty byly připraveny v tripletu. \*\* $p < 0,01$  proti negativní kontrolě.

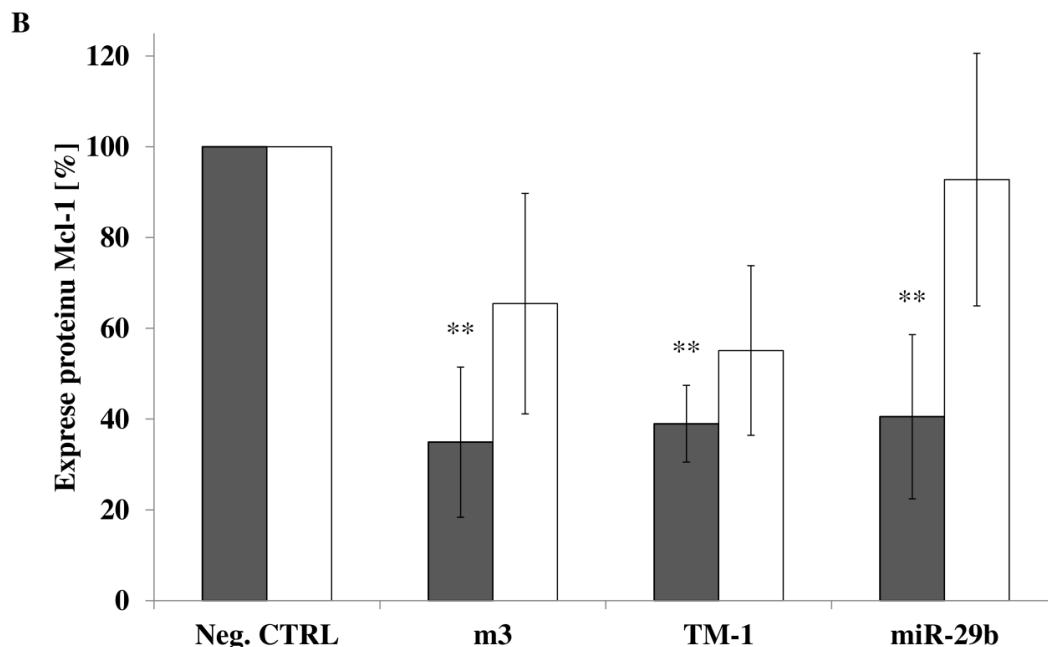
#### 5.1.4 Vliv upravených sekvencí miR-29b na expresi proteinu Mcl-1

miR-29b se od ostatních izoform rodiny miR-29 podstatně liší. Podléhá významné translokaci do jádra buňky, kdežto ostatní izoformy zůstávají majoritně v cytosolu. Výsledná lokalizace závisí na šestinukleotidové sekvenci na 3' konci jejího řetězce. Hwang a kol. [140], kteří v roce 2007 popsali tuto vlastnost miR-29b, používali při jejím studiu syntetické řetězce miR-29b s upravenými 3' konci. Dvě z těchto molekul jsme si nechali připravit. Jednalo se o molekuly označené jako m3 a TM-1. Molekula m3 obsahovala mutaci způsobenou záměnou uracilu za adenin na dvacátém nukleotidu sekvence (počítáno od 5' konce) a vykazovala převážně jadernou lokalizaci (71 % v jaderné frakci a 29 % v cytosolické frakci). Molekula TM-1 byla vytvořena za pomoci přesunutí nukleotidu z pozice sedmnáct na pozici dvacet tři od 5' konce, tím se celý hexanukleotid posunul o jedno místo blíže k 5' konci. Tato syntetická molekula je do jádra translokována pouze minoritně. V jaderné frakci bylo nalezeno 34 % oligonukleotidu TM-1, zbylých 66 % vykazovalo cytosolickou lokalizaci. Sekvence použitých syntetických molekul jsou uvedeny v obrázku 17, modul A. Distribuci mezi cytosolem a jádrem jsme ověřili pomocí RT-PCR a potvrdili jsme data Hwang a kol. [140].

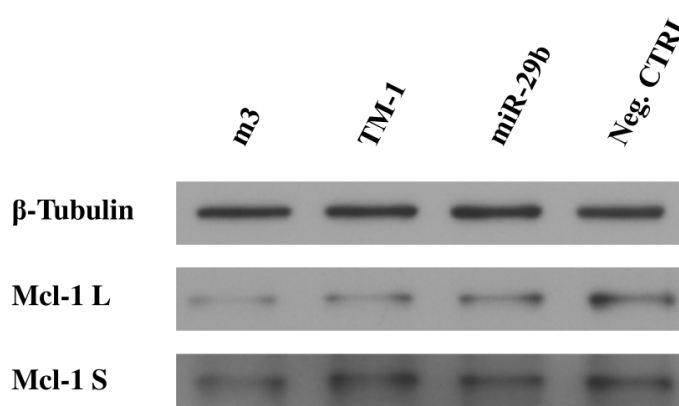
Předchozí výsledky ukázaly, že pro vlastní navýšení toxicity je velmi důležité ovlivnění exprese a poměru izoform proteinu Mcl-1. miRNA rozeznává své cíle primárně podle takzvané „seed sekvence“ tvořené šesticí nukleotidů na 5' konci, na pozici 2–7 a její komplementarity proti 3'UTR oblasti cílové mRNA. Případné změny na opačné straně molekuly by nemusely hrát při rozeznávání cílů významnou roli. Na druhou stranu může docházet ke změně dalších vlastností, což může mít dopad na vlastní funkci, proto jsme se rozhodli ověřit funkčnost použitých upravených sekvencí si-miR-29b m3 a si-miR-29b TM-1 z pohledu vlivu na expresi proteinu Mcl-1. Analýza technikou western blot ukázala, že obě syntetické molekuly (m3 i TM-1) jsou schopné negativně regulovat expresi proteinu Mcl-1, viz. obrázek 17, modul B a C.

### A Sekvence zralé miR-29b a použitých syntetických analog

Sekvence zralé endogenní miR-29b - 5'UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU 3'  
 Syntetická sekvence m3 - 5'UAGCACCAUUUGAAAUCAGAGUU 3'  
 Syntetická sekvence TM-1 - 5'UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUUC 3'



### C

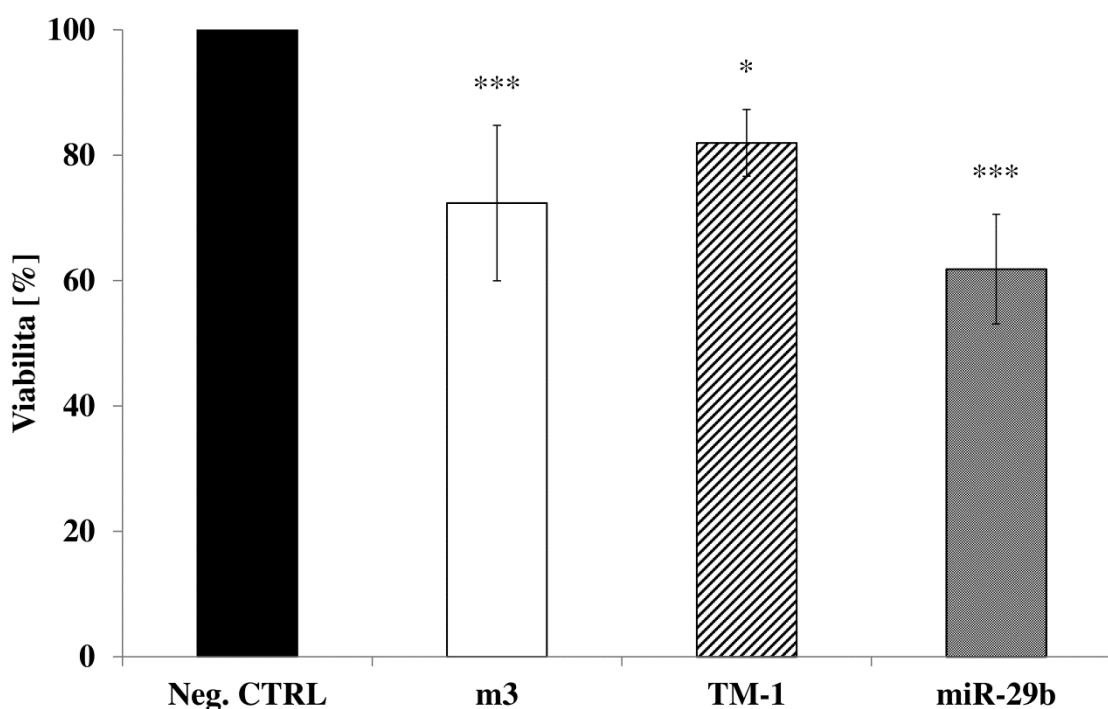


### Obrázek 17: Efekt rozdílné buněčné lokalizace miR-29b na expresi dlouhé a krátké izoformy proteinu Mcl-1.

Modul A ukazuje sekvenci zralé lidské miR-29b. Součástí modulu jsou sekvence použitých syntetických analog miR-29b podle Hwan a kol. [140] s barevně vyznačenými odlišnostmi v jednotlivých sekvencích. Sekvence označená jako m3 byla upravena záměnou uridinu za adenosin na pozici číslo 20 od 5' konce oligonukleotidu. Zaměněný nukleotid je zvýrazněn červeně. Sekvence vykazuje majoritně jadernou lokalizaci. Sekvence označená jako TM-1 byla upravena přesunutím celého hexanukleotidu na 3' konci o jeden nukleotid (nukleotid číslo 7 se přesune na pozici 1, počítáno od 3' konce). Přesunutý blok šesti nukleotidů je v sekvenci zvýrazněn červeným rámečkem. Sekvence vykazuje majoritně cytosolickou lokalizaci. Modul B – představuje vyhodnocení vlivu transfekce upravenými syntetickými sekvencemi si-miR-29b m3 a TM-1 na expresi proteinu Mcl-1 v buněčné linii HeLa. Buňky byly transfekovány (4 hodiny) si-miRNA m3, si-miRNA TM-1, standardním prekurzorem pro miR-29b a negativní kontrolní miRNA. 24 hodin po transfekci byly buňky vystaveny etoposidu v koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Lyzáty byly připraveny 48 hodin po přidavku etoposidu. Data představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku tří nezávislých měření.  $**p < 0,01$  proti negativní kontrole. Modul C – ukazuje reprezentativní western blot.

### 5.1.5 Vliv upravených syntetických sekvencí miR-29b na cytotoxicitu etoposidu

Syntetické oligonukleotidy reprezentující upravenou molekulu miR-29b s různou lokalizací jsme za pomoci transfekce vpravili do HeLa buněk a po 24 hodinové inkubaci byl přidán etoposid v koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V průběhu inkubace byl systémem xCELLigence sledován vliv různé lokalizace miR-29b na toxicitu testovaného léčiva. Ze získaných dat je patrné, že jaderná lokalizace hraje důležitou roli v pozorovaném efektu miR-29b na cytotoxicitu etoposidu v buněčném modelu HeLa (obrázek 18).



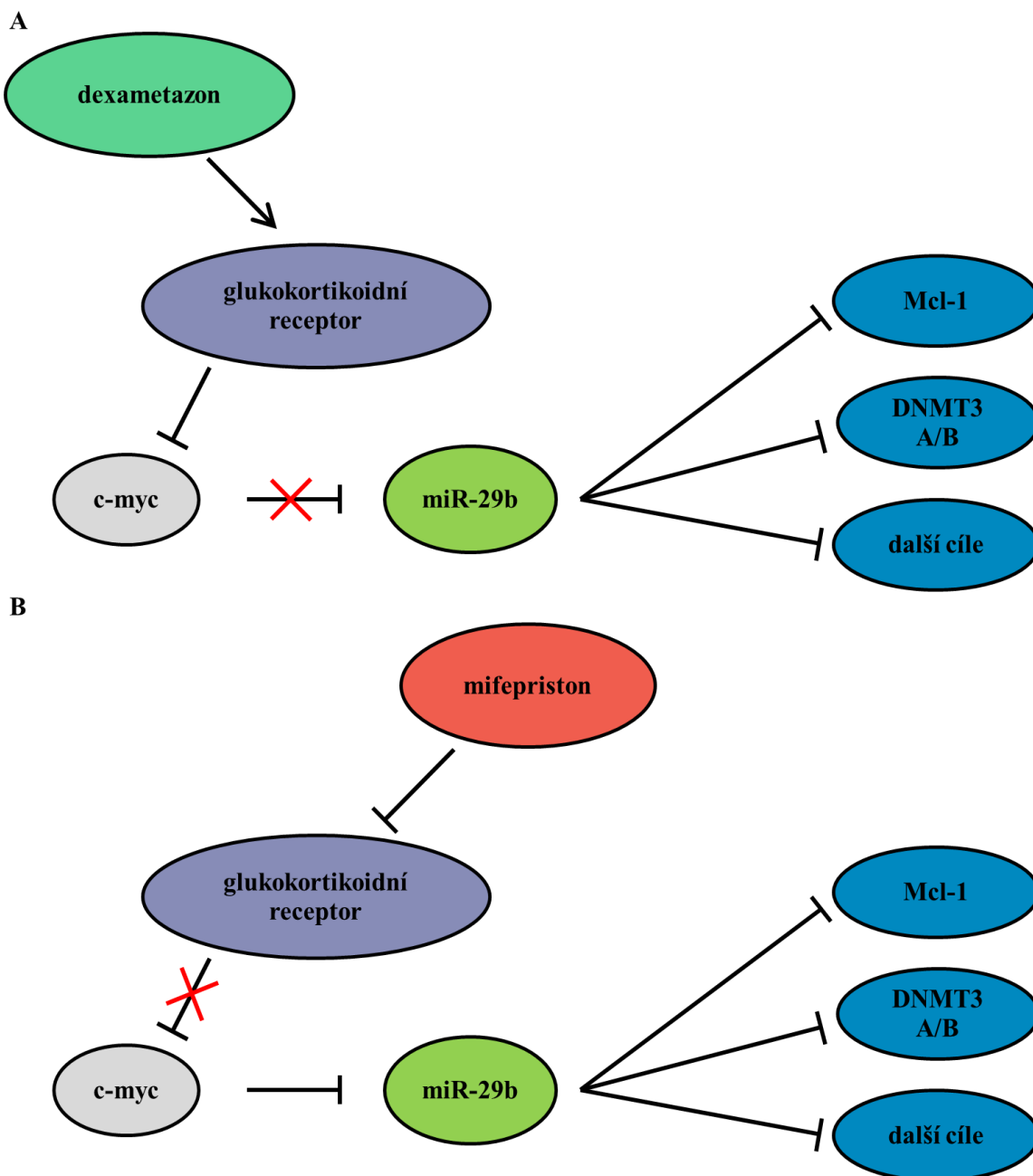
**Obrázek 18: Efekt rozdílné buněčné lokalizace miR-29b na cytotoxicitu etoposidu.**

Obrázek představuje vyhodnocení vlivu transfekce upravených syntetických sekvencí si-miR-29b m3 a TM-1 na cytotoxicitu etoposidu v buněčné linii HeLa. Buňky byly transfekovány (4 hodiny) si-miRNA m3, si-miRNA TM-1, standardním prekurzorem pro miR-29b a negativní kontrolní miRNA. 24 hodin po transfekci byly buňky vystaveny  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  etoposidu. Toxicita byla vypočítaná podle postupu popsaného v materiálech a metodách. Data představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku čtyř nezávislých měření. Jednotlivé experimenty byly připraveny v tripletu. \* $p < 0,05$  (\*\*\*) $p < 0,001$ ) proti negativní kontrole.

## 5.2 Farmakologický přístup k ovlivňování exprese miRNA

Z literatury se můžeme dočíst, že exprese miRNA lze ovlivňovat pomocí farmakoterapie. Příkladem může být miboleron, syntetický androgen, a s ním spojená aktivace androgenního receptoru doprovázená snížením exprese miR-21 u karcinomu

prsu [249]. Stejně zajímavé je, že podobné efekty byly pozorovány i u látek obsažených v dietě jako je kvercetin [169], resveratrol [159] a další. Na základě našich předchozích výsledků publikovaných ve článku Kollinerová a kol. [22] jsme se rozhodli otestovat tuto hypotézu na tumor supresorové miR-29b. Literatura popisuje tři základní dráhy ovlivňující expresi zvolené miRNA. Jedná se o dráhu působící přes glukokortikoidní receptor a protein c-myc, která byla pozorována u různých typů nádorů [127,129-131]. Dále byl popsán vliv drah hedgehog (cholangiokarcinom) a NF- $\kappa$ B (nemaligní cholangiocyty) [131]. Více informací o regulaci rodiny miR-29 je uvedeno v sekci 2.5 Rodina miR-29. Z nalezených signálních drah, které ovlivňují miR-29b jsme se rozhodli ovlivnit signalizaci přes protoonkoprotein c-myc. Původní hypotéza vycházela z následující úvahy. Pokud je k testovanému modelu obsahujícímu aktivní glukokortikoidní receptor přidán dexametazon, dochází k aktivaci glukokortikoidního receptoru, což se projeví inhibicí signalizace c-myc a navýšením exprese miR-29b. Výsledek bude spojen s inhibicí exprese cílových genů miR-29b (obrázek 19, modul A). Při použití inhibitoru jako je mifepriston, způsobíme inhibici glukokortikoidního receptoru. Výsledkem bude navýšení množství c-myc s následným snížením exprese miR-29b spojeným s deregulací cílových proteinů (obrázek 19, modul B).



**Obrázek 19: Schéma prvotní hypotézy farmakologického ovlivnění exprese miR-29b v experimentálních modelech.** Obrázek schematicky popisuje první vytvořenou hypotézu a teoretický vliv testovaných látek na expresi miR-29b a potenciálně ovlivněné validované cíle, zapojené do důležitých buněčných procesů jako je apoptotická signalizace nebo methylace DNA spojená s epigenetickým ovlivňováním exprese dalších genů. Modul A – vyobrazuje efekt dexametazonu na model s funkčním glukokortikoidním receptorem. Modul B – vyobrazuje efekt mifepristonu na model s funkčním glukokortikoidním receptorem. Obrázek vytvořen v softwaru PowerPoint na základě naší hypotézy.

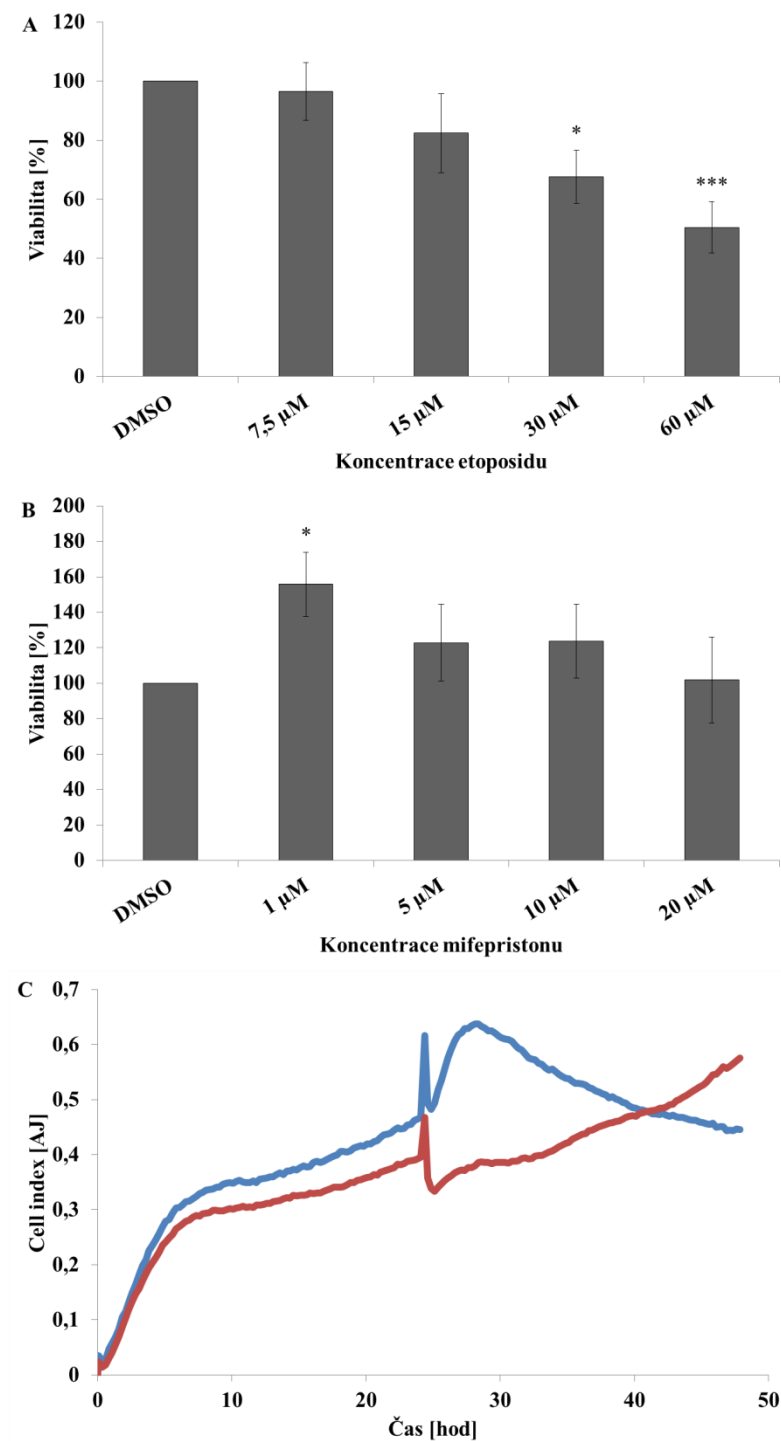
Předběžné experimenty publikované v diplomové práci Kollinerové [250] se skládaly z MTT testu provedeného po 24 hodinové expozici dexametazonem, představujícím agonistu a mifepristonem reprezentujícím antagonistu glukokortikoidního receptoru



a jejich kombinací nebo DMSO. Experiment pokračoval 24 hodinovou inkubací s etoposidem v koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Buněčná linie HeLa, obsahující funkční glukokortikoidní receptor reagující na aktivaci zprostředkovanou dexametazonem a buněčná linie Hep G2, s neaktivním glukokortikoidním receptorem, byly zvoleny jako experimentální modely. Výsledky po ukončení experimentu ukázaly velmi zajímavý poznatek, že ne dexametazon v buněčné linii HeLa, ale naopak mifepriston v buněčné linii Hep G2 způsobuje statisticky významné navyšování cytotoxicity etoposidu. Tyto neočekávané primární výsledky nás inspirovaly k objasnění mechanismu účinku pozorovaného efektu kombinace etoposid/mifepriston.

### 5.2.1 Efekt jednotlivých testovaných látek na viabilitu buněčné linie Hep G2

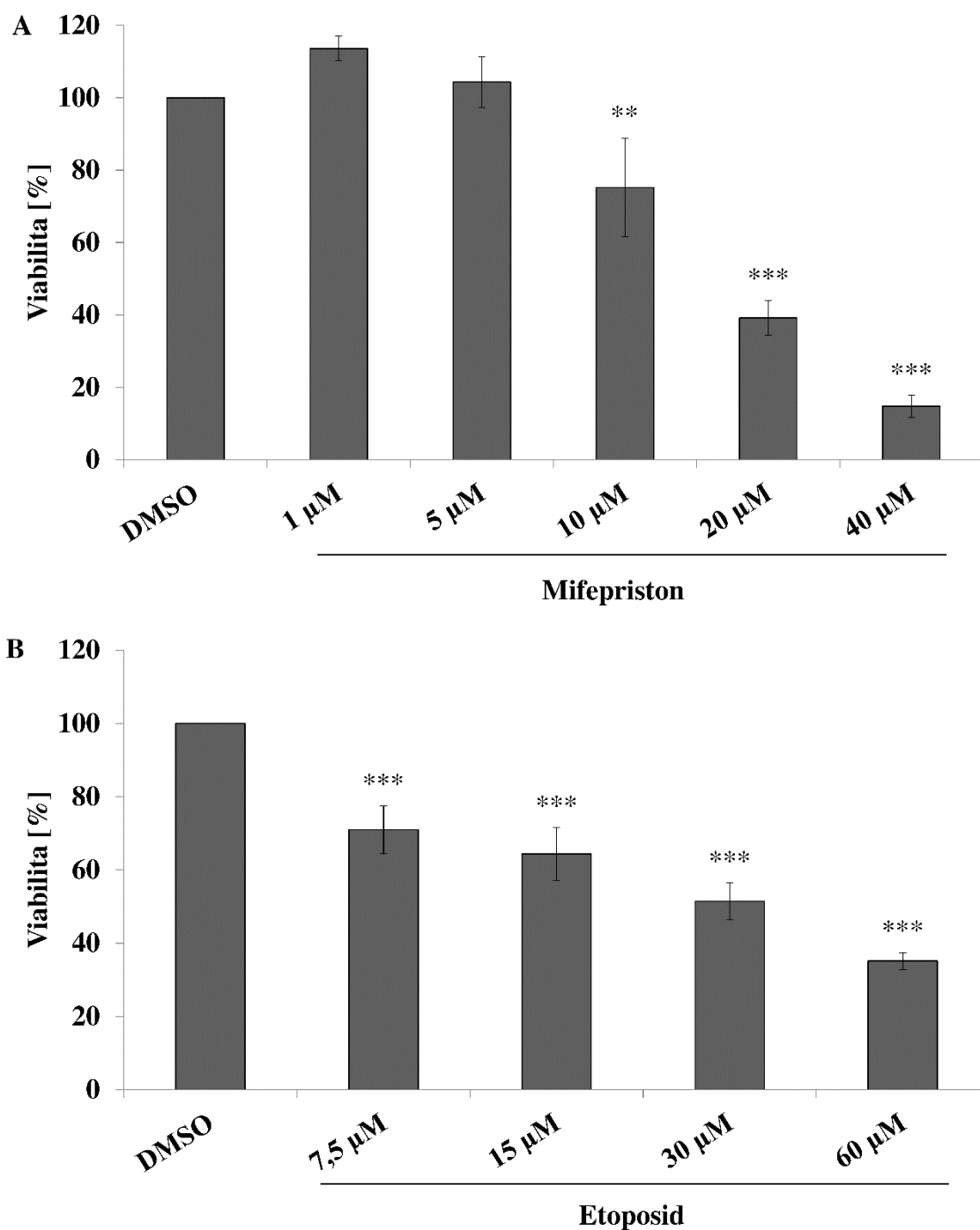
Pro lepší pochopení vlivu mifepristonu na buněčnou linii Hep G2 jsme provedli sofistikovanější experimenty na systému xCELLigence. Jako první krok celé studie bylo provedeno testování cytotoxicity jednotlivých látek na zvoleném experimentálním modelu. Zde se ukázalo, že etoposid vykazuje v buněčné linii Hep G2 navyšování cytotoxicity závislé na dávce v celém rozsahu použitých koncentrací ( $7,5\text{--}60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; obrázek 20, modul A). Pro další experimenty byla zvolena koncentrace etoposidu  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  na základě dat získaných metodami MTT a xCELLigence. Zvolená koncentrace odpovídá přibližně hodnotě  $\text{IC}_{50}$  (data byly publikovány v diplomové práci Kollinerové [250]). Naopak mifepriston se choval jako látka netoxická v celém testovaném rozsahu ( $1\text{--}20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Při koncentraci  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  dokonce viabilitu mírně navyšoval (obrázek 20, modul B). Toxické efekty mifepristonu na buněčnou linii Hep G2 jsme pozorovali až při koncentraci  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Informace byla získána při analýze na xCELLigence během prvotních měření. Tato skutečnost byla hlavním důvodem, proč jsme mifepriston v koncentraci  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v našich experimentech dále nepoužívali (obrázek 20, Modul C). Jinými slovy, kombinujeme látku, která by měla být díky svému efektu na buňku toxická (etoposid), s látkou vykazující na testovaném modelu toxicitu zanedbatelnou (mifepriston).



**Obrázek 20: Stanovení vlivu jednotlivých testovaných látek na viabilitu buněčné linie Hep G2.** Modul A – představuje toxicitu etoposidu ve srovnání s negativní kontrolou, která obsahovala pouze DMSO po 72 hodinách od vysetí buněk. Etoposid byl přidán 24 hodin od vysetí. Data představují průměr ± směrodatnou odchylku tří nezávislých měření. Jednotlivé experimenty byly připraveny v tripletu. \* $p < 0,05$  (\*\*\*) $p < 0,001$  proti negativní kontrole. Modul B představuje toxicitu mifepristonu ve srovnání s negativní kontrolou, která obsahovala pouze DMSO po 72 hodinách od vysetí buněk. Mifepriston byl přidán 24 hodin od vysetí. Modul C – představuje reprezentativní záznam ze systému xCELLigence a demonstruje negativní vliv  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  mifepristonu na buněčnou linii Hep G2. Modrá křivka reprezentuje vzorek obsahující  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  mifepristonu a červená křivka reprezentuje buňky ošetřené pouze DMSO, který byl použit jako rozpouštědlo. Ostrý skok v oblasti 24 hodin po zahájení experimentu je způsoben výměnou média.

### 5.2.2 Efekt různých kombinací etoposidu a mifepristonu na viabilitu buněčné linie Hep G2

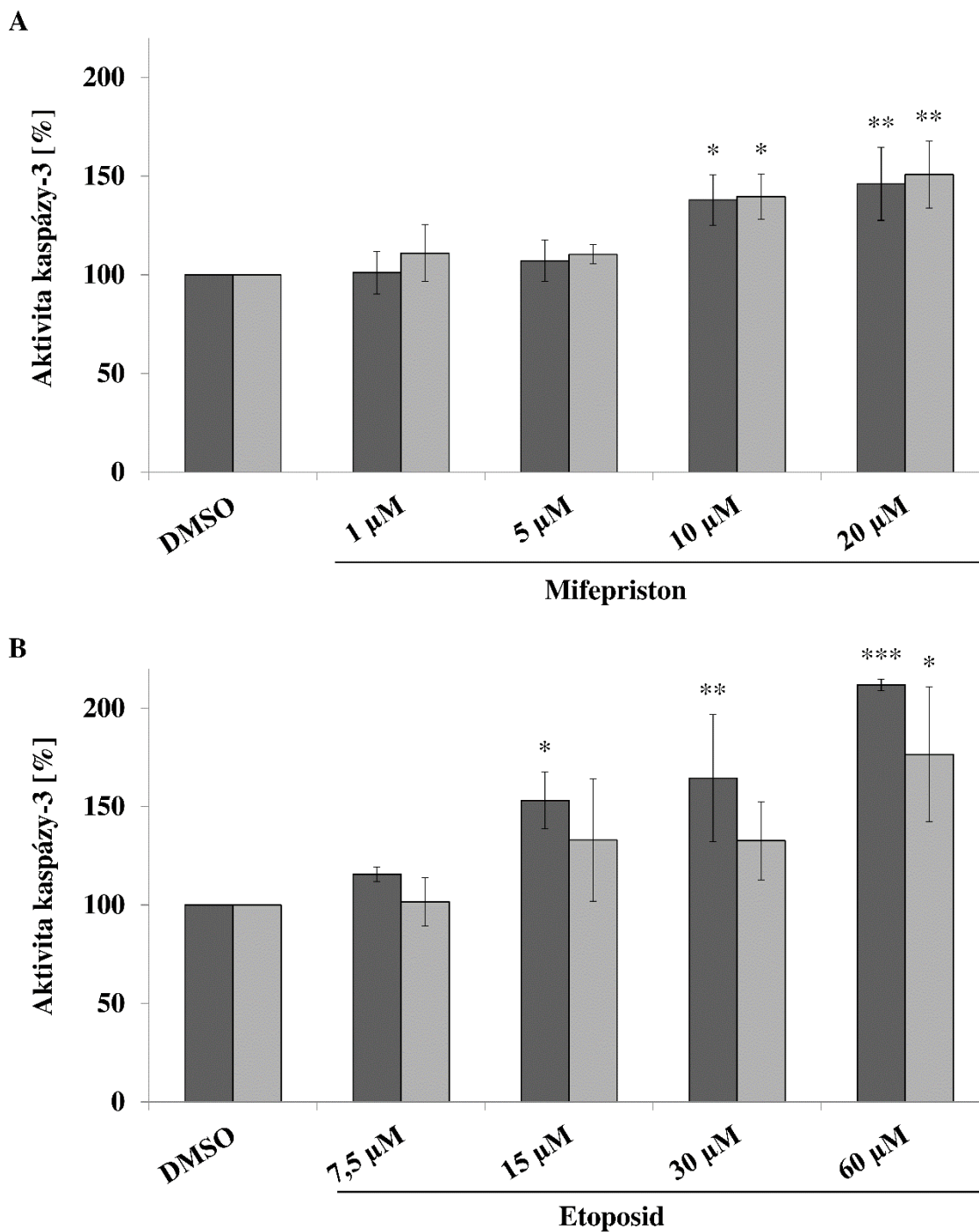
První přístup k vlastnímu testování byl složen z vysetí (15 000 buněk/jamka) a 24 hodinové stabilizace buněk, následované 24 hodinovou pre-inkubací s různými koncentracemi mifepristonu ( $1\text{--}20\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Teprve po uplynutí pre-inkubace bylo médium vyměněno za čerstvé obsahující pouze etoposid v koncentraci  $60\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Buňky byly takto ponechány až do ukončení experimentu. Podle hypotézy měl mifepriston vyvolat změny v expresi miR-29b a následně způsobit navýšení cytotoxicity etoposidu. Data o vlivu mifepristonu na expresi miR-29b byla prezentována v diplomové práci Kollinerové [250]. Výsledek experimentu ukázal, že i přes popsání vlivu mifepristonu na miR-29b nedochází k žádanému statisticky významnému navýšení cytotoxicity etoposidu na systému xCELLigence. Z tohoto důvodu byla další sada experimentů zaměřena na společnou inkubaci mifepristonu s etoposidem, a to v různých kombinacích koncentrací testovaných látek. Experimenty ukázaly dávkovou závislost toxicity etoposidu na koncentraci mifepristonu a naopak (obrázek 21).



**Obrázek 21: Vliv různé kombinace etoposidu a mifepristonu na viabilitu buněčné linie Hep G2.** Modul A reprezentuje vliv různých koncentrací mifepristonu na cytotoxicitu etoposidu. Etoposid byl přítomen ve všech vzorcích v koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Modul B reprezentuje vliv různých koncentrací etoposidu na cytotoxicitu mifepristonu. Mifepriston byl přítomen ve všech vzorcích v koncentraci  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Data představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku tří nezávislých měření. Jednotlivé experimenty byly připraveny v tripletu. \*\* $p < 0,01$  (\*\*\*) $p < 0,001$ ) proti kontrole obsahující pouze jednu z testovaných látek.

### **5.2.3 Efekt různých kombinací etoposidu a mifepristonu na aktivaci kaspázy-3 v buněčné linii Hep G2**

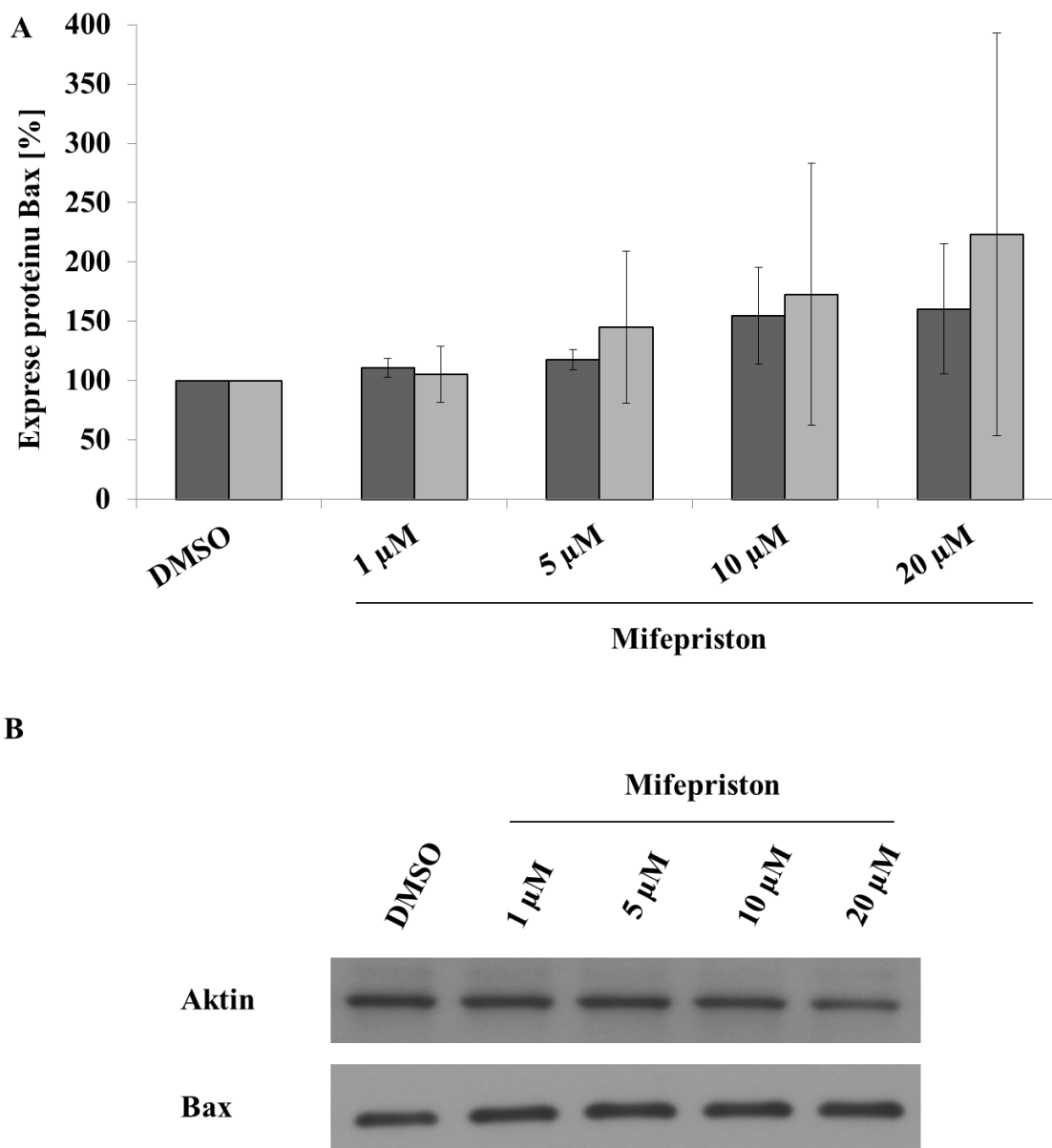
Pokud vystavíme buňky kombinaci různých látek, může vznikat značně agresivní chemický „koktejl“, který má za následek velice rychlé a rozsáhlé umírání buněk způsobené nekrózou. Nekróza je z pohledu mnohobuněčných organismů, kterým je i člověk, jako buněčná smrt velice nevýhodná, protože je spojená se zánětem a s poškozením okolní tkáně. Data z experimentů zaměřených na sledování cytotoxicity ukázaly, že dochází ke zvýšenému umírání buněk, proto jsme se rozhodli ověřit, zda se jedná o apoptózu. Pro získání potřebných dat jsme využili sledování aktivity kaspázy-3 za pomoci komerčně dostupného, fluorescenčně značeného substrátu pro testovaný enzym. Efekt na kaspázu-3 byl stanoven po 24 a 48 hodinách od podání kombinace testovaných látek (uspořádání bylo totožné jako u experimentů v sekci 5.2.2). Výsledky jasně ukazují statisticky významné navyšování aktivity kaspázy-3, které bylo závislé na dávce (obrázek 22).



**Obrázek 22: Aktivita kaspázy-3 stanovená po inkubaci různých kombinací etoposidu a mifepristonu s buněčnou linií Hep G2.** Modul A představuje vliv různých koncentrací mifepristonu v kombinaci s etoposidem na aktivitu kaspázy-3. Tmavě šedé sloupce představují 24 hodinovou inkubaci, kdežto světle šedé sloupce popisují aktivitu kaspázy-3 po 48 hodinách od vystavení testovaným látkám. Etoposid byl přítomen ve všech vzorcích v koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Modul B představuje vliv různých koncentrací etoposidu v kombinaci s mifepristonem na aktivitu kaspázy-3. Tmavě šedé sloupce představují 24 hodinovou inkubaci, kdežto světle šedé sloupce popisují aktivitu kaspázy-3 po 48 hodinách od vystavení testovaným látkám. Mifepriston byl přítomen ve všech vzorcích v koncentraci  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Data představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku minimálně tří nezávislých měření. \* $p < 0,05$  (\*\* $p < 0,01$  a \*\*\* $p < 0,001$ ) proti kontrole obsahující vždy pouze jednu z testovaných látek.

#### 5.2.4 Efekt kombinace etoposidu a mifepristonu na expresi vybraných proteinů

V dalších experimentech jsme se zaměřili na hledání mechanismu účinku mifepristonu, který souvisí se sledovaným nárůstem toxicity etoposidu. O mifepristonu je známo, že ovlivňuje expresi některých proteinů zapojených v apoptotické signalizaci (viz. přehledový článek Chen a kol. [35]) a je možné, že díky modulaci některého z proteinů mohou buňky ochotněji přecházet do programované buněčné smrti. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli ověřit míru exprese proapoptického proteinu Bax a anti-apoptického Bcl-2 po 24 a 48 hodinové inkubaci. Mezi testované proteiny jsme zařadili i protein Mcl-1, protože z předběžných výsledků publikovaných v diplomové práci Kollinerové [250] je patrné, že mifepriston ovlivňuje expresi miR-29b, u které se Mcl-1 řadí mezi její validované cíle [4]. Dalším důvodem byl negativní vliv mifepristonu na expresi proteinu Mcl-1 v leukemické buněčné linii U937 popsané v publikaci Jang a kol. [37]. V rámci experimentu jsme zvolili spojení technik elektroforézy a western blot. Výsledky pokusů ukázaly, že mifepriston ovlivňuje expresi proteinu Bax v závislosti na dávce jak po 24, tak 48 hodinové inkubaci (obrázek 23). Nicméně lze pozorovat pouze trend, jelikož data nejsou statisticky významná. Vysoké směrodatné odchylky mohly být způsobeny rozsáhlou apoptózou navozenou v testovaných buňkách. V takovém případě dochází ke značnému štěpení proteinů pomocí efektorových kaspáz (aspartát specifické cysteinové proteázy [251]), které vyvolává v buňce obrovský chaos.



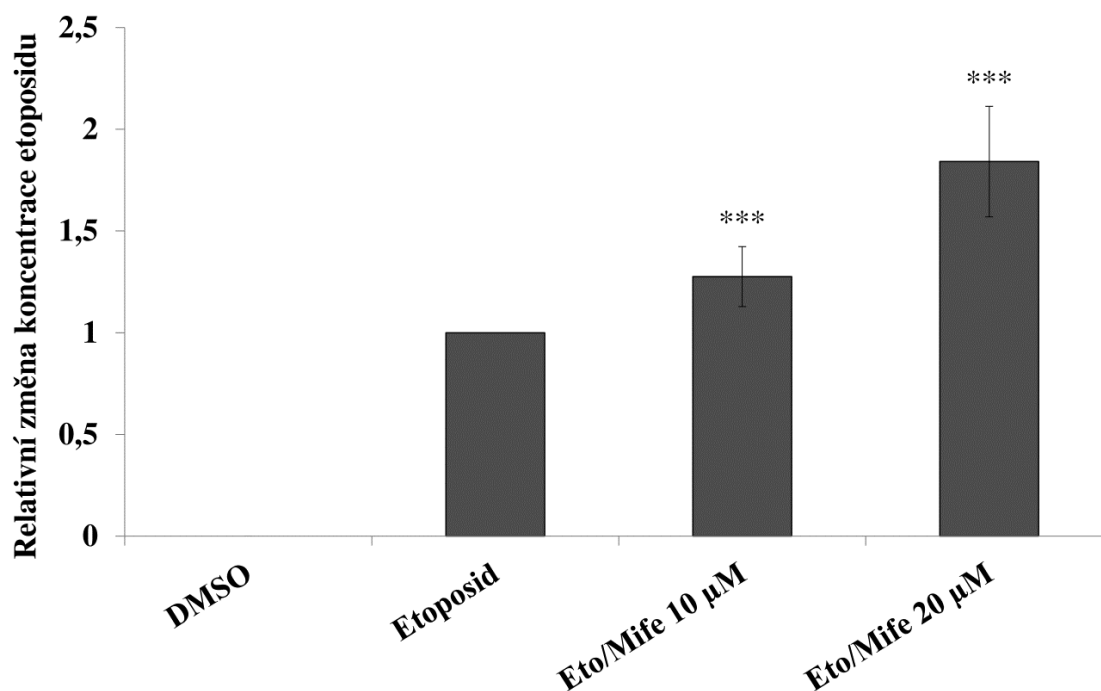
**Obrázek 23: Modulace exprese proteinu Bax pomocí mifepristonu.** Testované buňky byly vystaveny etoposidu nebo jeho kombinacím s mifepristonem (1–20  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Modul A představuje sledování exprese proteinu Bax po 24/48 hodinách inkubace (tmavě šedé/světle šedé sloupce). Etoposid byl přítomen ve všech vzorcích v koncentraci 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Data představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku tří nezávislých měření. Modul B představuje reprezentativní western blot po 48 hodinách od zahájení inkubace s testovanými látkami.

### 5.2.5 Efekt mifepristonu na intracelulární akumulaci etoposidu v buněčné linii Hep G2

Mifepriston vykazuje vlastnosti silného nespecifického inhibitoru ABC transportérů [35]. Jedná se o transmembránové proteiny, které hrají důležitou roli v odstraňování toxických látek z intracelulárního prostředí jejich transportem ven z buňky



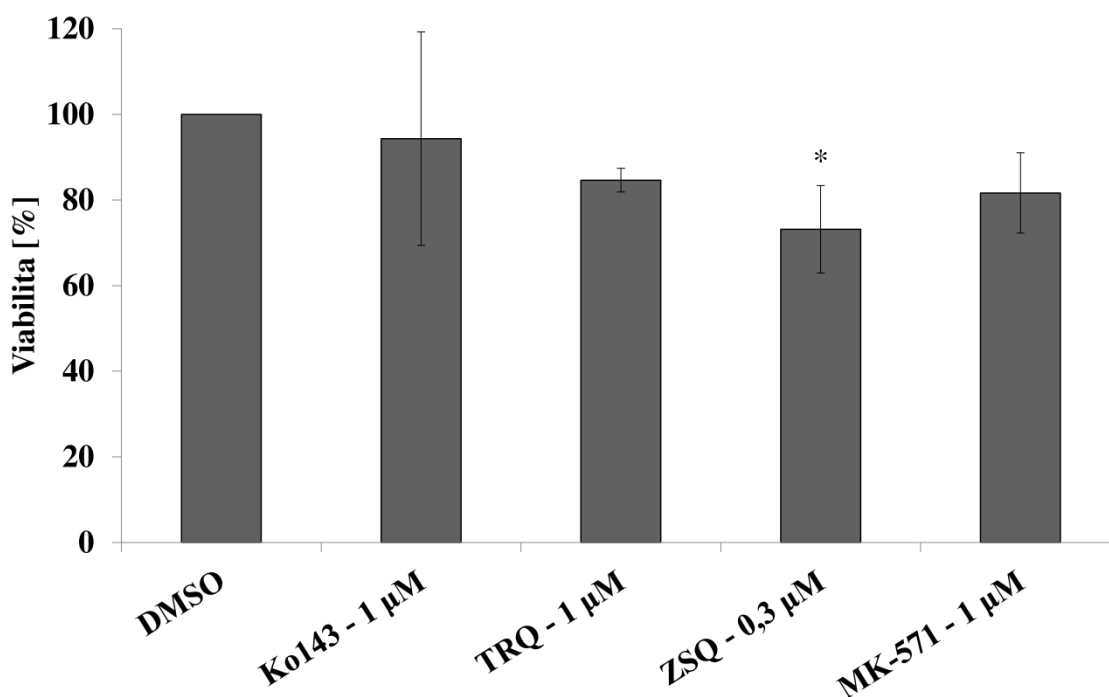
za spotřeby ATP. Pokud dochází k inhibici těchto pump, výsledkem by měl být nárůst intracelulární koncentrace etoposidu v mifepristonem ošetřených buňkách. V rámci této hypotézy jsme se rozhodli sledovat intracelulární množství etoposidu v různě ošetřených vzorcích. V rámci experimentu byla použita analýza provedená pomocí HPLC/MS systému. V první části experimentu byly testované buňky inkubovány bez etoposidu (jako neošetřená kontrola), s etoposidem ( $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) nebo kombinací etoposidu ( $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) s mifepristonem v koncentraci 10 a  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Reprezentativní chromatogram je prezentován na obrázku 13 v sekci Experimentální část. Získané data vztažená k monoterapii etoposidu jasně ukazují, že mifepriston navyšuje koncentraci uvnitř testovaných buněk. Toto navýšení je závislé na dávce mifepristonu (obrázek 24). V rámci experimentů jsme stanovili i koncentraci etoposidu v testovaných buňkách a získali jsme následující hodnoty: pro vzorky obsahující pouze DMSO (negativní kontrola)  $0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  etoposidu, pro monoterapii etoposidem ( $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) jsme stanovili  $8,62 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} \pm 1,79$  a hodnoty  $10,66 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} \pm 1,78$  /  $16,56 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} \pm 5,89$  pro etoposid ( $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v kombinaci s mifepristonem ( $10/20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Všechny stanovené koncentrace etoposidu jsou normalizovány na celkový protein.



**Obrázek 24: Intracelulární akumulace etoposidu po 6 hodinové inkubaci s testovanými látkami v buněčné linii Hep G2.** Vliv mifepristonu byl testován při dvou různých koncentracích  $10/20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Koncentrace etoposidu použitého v experimentu byla  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vzorek označený jako DMSO byl inkubován pouze s touto látkou. Data představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku čtyř nezávislých měření. \*\*\* $p < 0,001$  versus monoterapie etoposidem (Eto/Mife označuje kombinaci etoposidu v koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a mifepristonu  $10/20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

### 5.2.6 Vliv specifických inhibitorů ABC transportérů na cytotoxicitu etoposidu v buněčné linii Hep G2

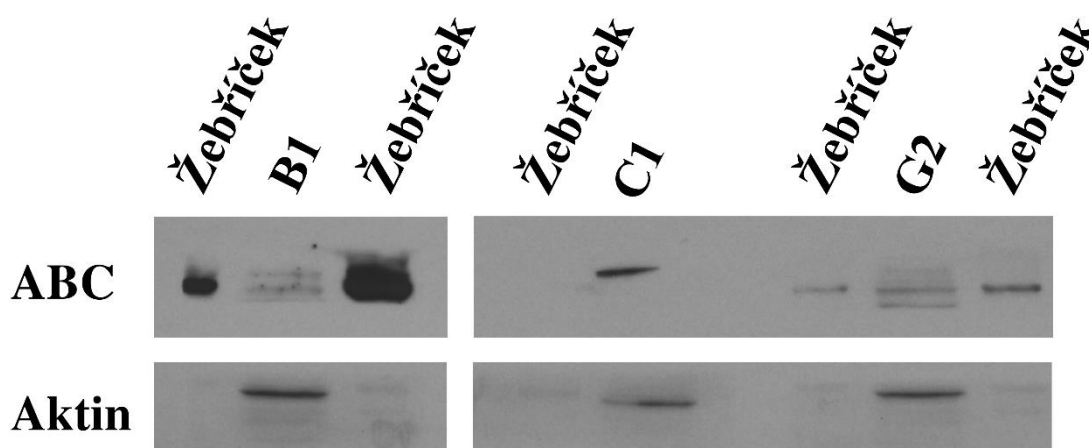
Další úvaha směřovala opět k využití systému xCELLigence. Rozhodli jsme se otestovat vliv specifických inhibitorů ABC transportérů na modulaci cytotoxicity etoposidu. Pokud hraje některý z vybraných ABC transportérů důležitou roli v regulaci intracelulární koncentrace etoposidu, mělo by dojít při jeho podání k podobnému efektu, který byl sledován u mifepristonu. Pro experiment byly zvoleny standardní inhibitory ABC transportérů Zosuquidar (ZSQ, ABCB1), Tarquidar (TRQ, ABCB1), Ko141 (ABCG2) a MK-571 (ABCC1). Analyzované výsledky ukazují statisticky významné ovlivnění cytotoxicity etoposidu po zablokování ABCB1 transportéru pomocí inhibitoru Zosuquidar. Dále je patrný i vliv ABCC1 transportéru, nicméně výsledky nedosáhly statistické významnosti. Naopak ABCG2 transportér vykazoval efekt téměř nulový (obrázek 25).



**Obrázek 25: Efekt selektivních inhibitorů vybraných ABC transportérů na cytotoxicitu etoposidu.** 24 hodin po vysetí byly buňky vystaveny etoposidu nebo jeho kombinaci s vybranými selektivními inhibitory a byly inkubovány společně do ukončení experimentu. Etoposid byl přítomen ve všech vzorcích v koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Použitá koncentrace specifických inhibitorů je vždy součástí jednotlivých popisků na ose x. Data představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku tří nezávislých měření. Jednotlivé experimenty byly připraveny v kvadrupletu. \* $p < 0,05$  proti kontrole obsahující pouze etoposid.

### 5.2.7 Sledování přítomnosti ABC transportérů ABCB1, ABCC1 a ABCG2 v buněčné linii Hep G2, pomocí metody western blot

Výsledky v odstavci 5.2.6 prokázaly, že inhibice ABCB1 a ABCC1 je důležitá pro navýšení cytotoxicity etoposidu. Abychom podpořili naši hypotézu, pokusili jsme se prokázat přítomnost těchto proteinů v membráně použitých buněk. Získaná data ukazují, že testovaný buněčný model opravdu exprimuje zvolené ABC transportéry, jmenovitě ABCB1, ABCC1 a ABCG2 (obrázek 26).



**Obrázek 26: Expres ABC transportérů ABCB1, ABCC1 a ABCG2 v testované buněčné linii Hep G2.** Obrázek představuje reprezentativní western blot z testování Hep G2 buněk na přítomnost tří vybraných ABC transportérů. Každý z testovaných proteinů byl detekován na jiné membráně. Membrány byly umístěny v expoziční kazetě vedle sebe.

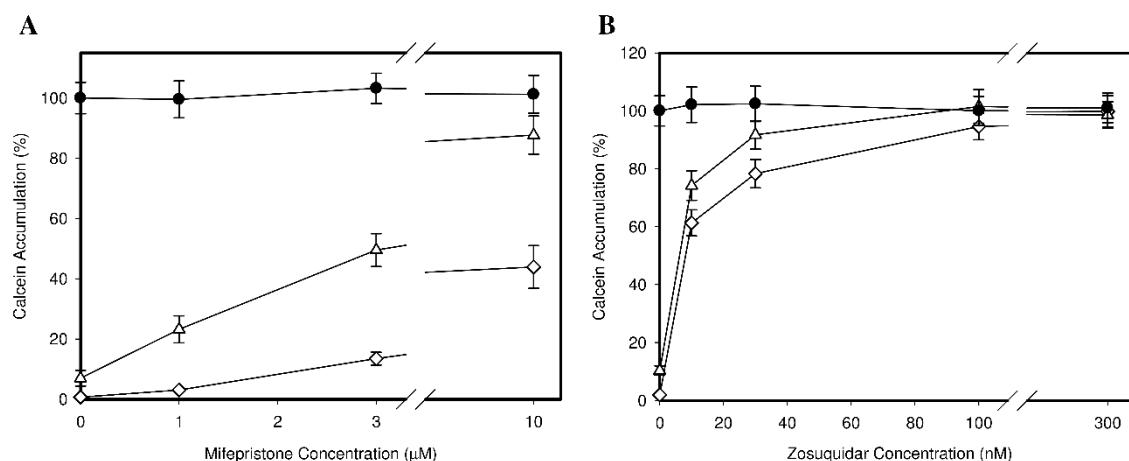
### 5.2.8 Testování efektivity inhibice specifických ABC transportérů mifepristonem v buněčné linii K562 s různou intenzitou jejich exprese.

V rámci studie bylo provedeno stanovení míry inhibice transportérů ABCB1 a ABCG2 mifepristonem. Pro experiment byla použita buněčná linie K562 s různou expresí ABCB1 a ABCG2. Experiment byl postaven na sledování akumulace fluorescenční sondy uvnitř použitého modelu za pomoci průtokové cytometrie. Pro ověření funkčnosti modelu byly provedeny totožné experimenty s různými koncentracemi selektivních inhibitorů.

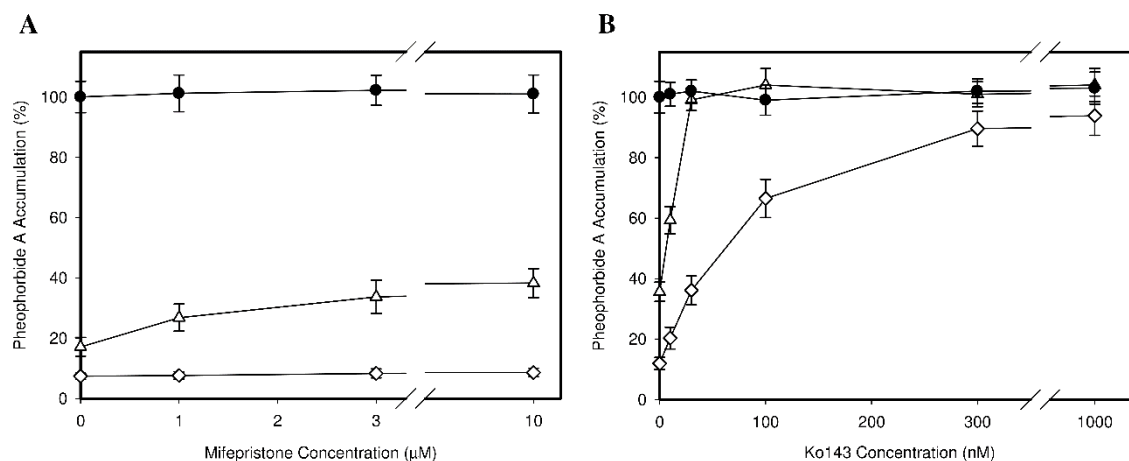
Pro stanovení míry inhibice transportéru ABCB1 mifepristonem, byla využita metoda sledující akumulaci sondy calcein acetoxyethyl ester (calcein AM) [252]. Výsledky ukázaly, že mifepriston efektivně inhibuje vytláčování calceinu AM v závislosti na dávce, při klinicky významných koncentracích (do  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) [253,254]. Efektivita inhibice

dále závisí na úrovni exprese ABCB1. U buněk K562/DoxDR2 s nízkou expresí ABCB1 byla míra efektivity velmi podobná efektu ZSQ. Naopak buněčná linie K562/Dox, která má vysokou expresi ABCB1, vykazovala jen částečnou inhibici (obrázek 27, modul A). Pro ověření funkce systému byl použit standardní inhibitor ABCB1 transportéru ZSQ (obrázek 27, modul B).

Pro stanovení míry inhibice transportéru ABCG2 mifepristonem, byla využita metoda sledující akumulaci sondy pheophorbide A [255]. Výsledky opět ukázaly, že mifepriston efektivně inhibuje vytlačování sondy u buněk exprimujících nízkou míru ABCG2. Pozorovaná inhibice byla závislá na dávce, nicméně při vysoké expresi tohoto transportéru mifepriston selhává (obrázek 28, modul A). Pro ověření funkce systému byl použit standardní inhibitor ABCG2 transportéru Ko143 (obrázek 28, modul B).



**Obrázek 27: Vliv mifepristonu a specifického inhibitoru ABCB1 transportéru (Zosuquidaru) na akumulaci fluorescenčně značeného substrátu Calcein AM v buněčné linii K562 s různou expresí ABCB1.** Modul A: jednotlivé subklony buněčné linie K562 byly inkubovány s fluorescenční sondou calcein AM ( $0,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) spolu s různými koncentracemi mifepristonu. Modul B: Vliv ZSQ na akumulaci fluorescenční sondy calcein AM v různých subklonech buněčné linie K562. Data jsou vyjádřena jako průměrná intenzita fluorescence analyzovaná průtokovou cytometrií. Černé kroužky – kontrolní buňky neexprimující ABCB1 transportér, bílé trojúhelníky – subklon K562 exprimující nízké množství ABCB1 transportéru, bílé kosočtverce - subklon K562 exprimující vysoké množství ABCB1 transportéru.



**Obrázek 28: Vliv mifepristonu a specifického inhibitoru ABCG2 (Ko143) transportéru na akumulaci fluorescenčně značeného substrátu pheophorbide A v buněčné linii K562 s různou expresí ABCG2.** Modul A: jednotlivé subklony buněčné linie K562 byly inkubovány s fluorescenční sondou pheophorbide A ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) spolu s různými koncentracemi mifepristonu. Modul B: Vliv Ko143 na akumulaci fluorescenční sondy pheophorbide A v různých subklonech buněčné linie K562. Černé kroužky – kontrolní buňky neexprimující ABCG2 transportér, bílé trojúhelníky – subklon K562 exprimující nízké množství ABCG2 transportéru, bílé kosočtverce - subklon K562 exprimující vysoké množství ABCG2 transportéru.

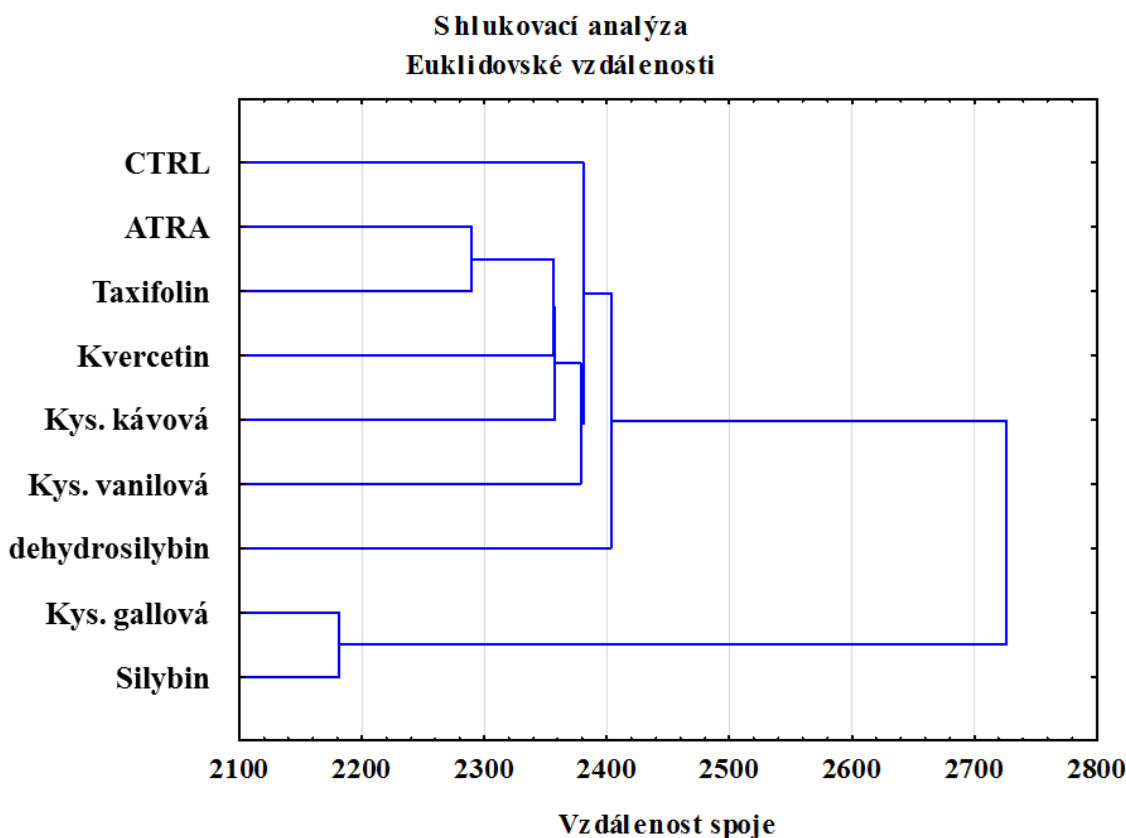
### 5.3 Ovlivnění miRNA za pomoci látek běžně se vyskytujících ve stravě člověka

Jako třetí pohled jsme zvolili vliv biologicky dosažitelné koncentrace ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) vybraných polyfenolů na expresi miRNA v buněčné linii Hep G2 a primárních kulturách lidských hepatocytů. Polyfenoly jsou velká skupina látek, která se nachází v lidské stravě. Pozitivní vliv těchto látek na lidský organizmus je nesporný a byl prokázán množstvím studií [51,52]. V rámci výzkumu jejich pozitivních vlastností bylo objeveno velké množství různých příspěvků. Velmi vhodnými kandidáty na studium ovlivnění expresního profilu miRNA je kvercetin a jeho redukováná forma taxifolin. Kvercetin se nachází téměř v každém ovoci a zelenině, proto je lidské tělo vystaveno dlouhodobě relativně velkému množství [52].

#### 5.3.1 Statistické vyhodnocení expresního profilu výsledků z Affymetrix miRNA array analýzy

Podrobnější analýza dat získaných pomocí čipové technologie firmy Affymetrix pro prvotní screening. Základní výsledky byly zveřejněny již v diplomové práci, na kterou

část této disertační práce navazuje [240]. V rámci prvotní statistické analýzy jsme se zaměřili na shlukovací analýzu. Její výsledky ukazují velkou podobnost mezi expresními profily Hep G2 inkubovaných s kyselinou gallovou a silybinem nebo kyselinou all-trans retinovou a taxifolinem (obrázek 29).



**Obrázek 29:** Shlukovací analýza dat získaných z expresního profilování na buněčné línii Hep G2 ošetřené vybranými polyfenoly ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a negativní kontrolou obsahující pouze DMSO.

### 5.3.2 Protein ZEB2 jako možný cíl miRNA ovlivněných pomocí kvercetinu a taxifolinu

V rámci studie jsme objevili několik miRNA, které splňovaly následující kritéria. Jejich validovaným cílem byl protein ZEB2 a jejich exprese byla po 24 hodinové inkubaci s kvercetinem nebo taxifolinem snižena minimálně o 1,5násobek ve srovnání s kontrolou obsahující pouze DMSO. Taxifolin moduloval miR-153 [93], miR-204 [256], miR-211-5p [257] a miR-377-3p [258] v buněčné línii Hep G2. V primárních kulturách

lidských hepatocytů pak miR-211-5p [257] a miR-377-3p [258]. Bližší informace jsou uvedeny v tabulce 9. Výsledky pro kvercetin odhalily sníženou expresi miR-153 [93], miR-338 [259] a miR-377-3p [258] v primárních kulturách lidských hepatocytů. Bližší informace jsou uvedeny v tabulce 10.

**Tabulka 9: Seznam miRNA vykazujících sníženou expresi po inkubaci s taxifolinem v testovaných modelech a mají ZEB2 jako validovaný cíl.**

miRNA	Průměrná relativní exprese vztažená ke kontrole				Literatura
	Hep G2		Lidské hepatocyty		
	Průměr	Sm. Odch.	Průměr	Sm. Odch.	
hsa-miR-153	0,67	0,27	1,39	0,89	Chou a kol. [93]
hsa-miR-204	0,68	0,32	0,86	0,38	Wang a kol. [256]
hsa-miR-211-5p	0,59	0,20	0,74	0,33	Jiang a kol. [257]
hsa-miR-377-3p	0,64	0,43	0,57	0,05	Ye a kol. [258]

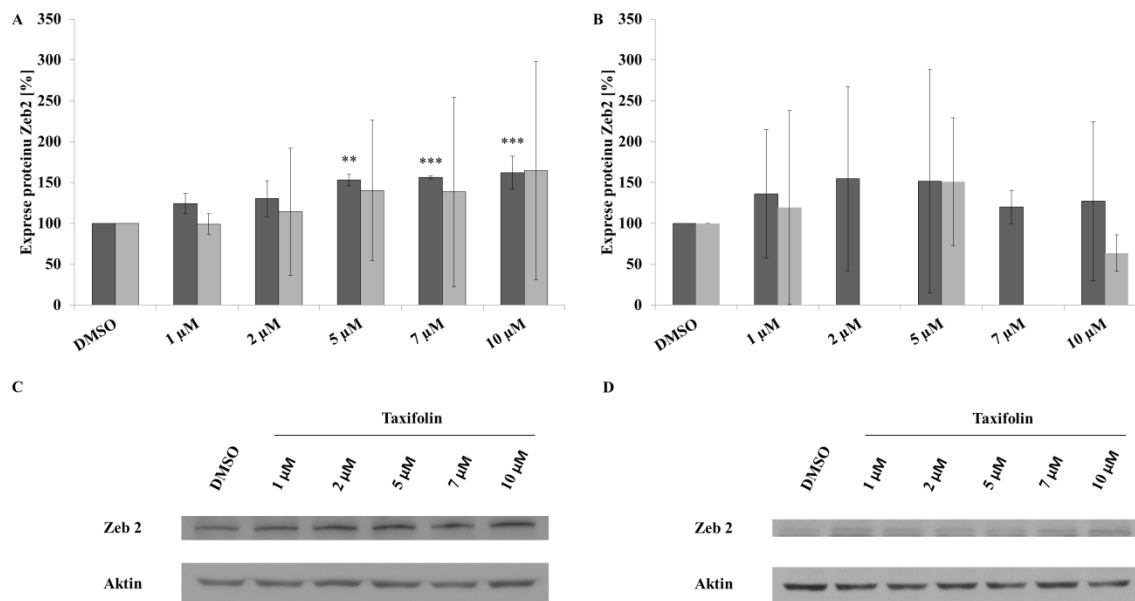
**Tabulka 10: Seznam miRNA vykazujících sníženou expresi po inkubaci s kvercetinem v testovaných modelech a mají ZEB2 jako validovaný cíl.**

miRNA	Průměrná relativní exprese vztažená ke kontrole				Literatura
	Hep G2		Lidské hepatocyty		
	Průměr	Sm. Odch.	Průměr	Sm. Odch.	
hsa-miR-153	1,02	0,37	0,72	0,24	Chou a kol. [93]
hsa-miR-338-3p	1,40	0,62	0,66	0,15	Huang a kol. [259]
hsa-miR-377-3p	1,42	1,16	0,65	0,19	Ye a kol. [258]

### 5.3.3 Vliv kvercetinu a taxifolinu na expresi proteinu ZEB2 a související působení na protein vimentin

ZEB2 je zajímavá a důležitá molekula, protože se podílí kromě fyziologických funkcí například v nervové soustavě i na epiteliálně-mezenchymální tranzici. Tento děj vede k nádorům s vyšší agresivitou a lepší schopností metastazování související s dediferenciací. Při stanovení exprese proteinu ZEB2 v experimentálních modelech jsme pozorovali statisticky významné navýšení u buněčné linie Hep G2 ošetřené taxifolinem, které bylo závislé na dávce (obrázek 30, modul A). U stejné linie ošetřené kvercetinem byl objeven vzrůstající trend, nicméně velké odchylky mezi jednotlivými měřeními způsobily statistickou nevýznamnost navýšení (obrázek 30, modul A). Negativního

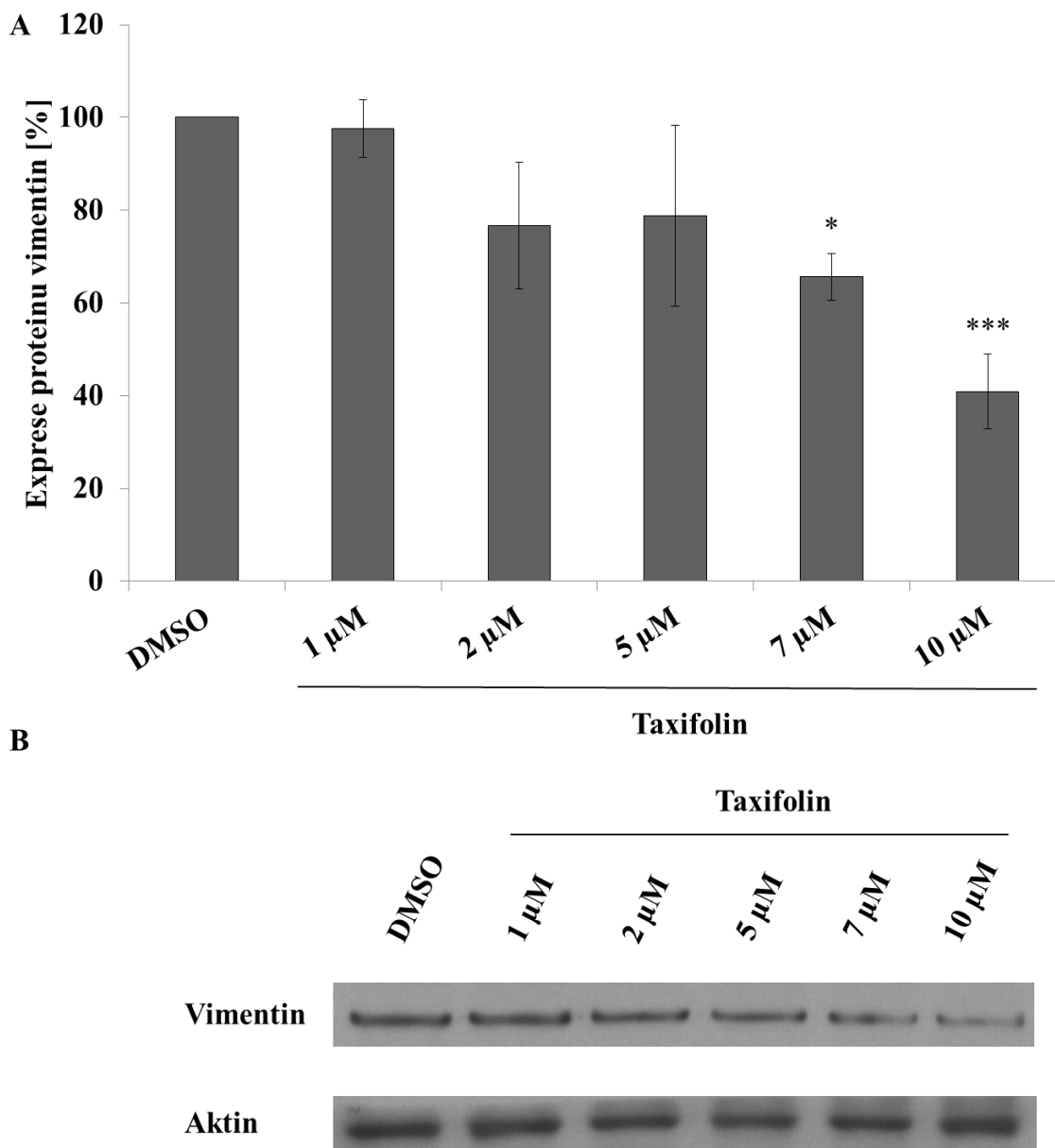
výsledku bylo dosaženo také u primárních kultur lidských hepatocytů, a to bez ohledu na použitou látku nebo koncentraci (obrázek 30, modul B).



**Obrázek 30: Vliv taxifolinu a kvercetinu na expresi proteinu ZEB2 v buněčné linii Hep G2 a primárních kulturách lidských hepatocytů.** Modul A reprezentuje vliv různých koncentrací taxifolinu a kvercetinu ( $1\text{--}10\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na expresi proteinu ZEB2 v buněčné linii Hep G2. Tmavě šedé sloupce představují inkubaci s taxifolinem, kdežto světle šedé sloupce popisují inkubaci s kvercetinem 24 hodin od vystavení testovaným látkám. Data představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku tří nezávislých měření. \*\* $p < 0,01$  (\*\* $p < 0,001$ ) proti kontrole obsahující pouze DMSO. Modul B reprezentuje vliv různých koncentrací taxifolinu a kvercetinu ( $1\text{--}10\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na expresi proteinu ZEB2 v primárních kulturách lidských hepatocytů. Tmavě šedé sloupce představují inkubaci s taxifolinem, kdežto světle šedé sloupce popisují inkubaci s kvercetinem 24 hodin od vystavení testovaným látkám. Data představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku čtyř nezávislých měření. Modul C představuje reprezentativní western blot pro analýzu vlivu taxifolinu na protein ZEB2 v buněčné linii Hep G2. Modul D představuje reprezentativní western blot pro analýzu vlivu taxifolinu na protein ZEB2 v primárních kulturách lidských hepatocytů.

ZEB2 je protein zapojený do signalizace, která vede k EMT, a proto jsme pokračovali stanovením EMT markeru – vimentinu. Korelace exprese proteinu ZEB2 s expresí vimentinu lze pozorovat například u epitheliálních buněk karcinomu prsu v publikaci Bindels a kol. [260]. Primární hypotéza pracovala se skutečností, že pokud je zvýšený ZEB2 protein, mělo by docházet i k navýšení vimentinu. Výsledek byl velmi zajímavý, neboť exprese vimentinu nebyla zvýšená, ale naopak došlo k jejímu snížení (obrázek 31). Tyto skutečnosti naznačují přítomnost další signální dráhy nebo efektu taxifolinu v testovaném buněčném modelu.





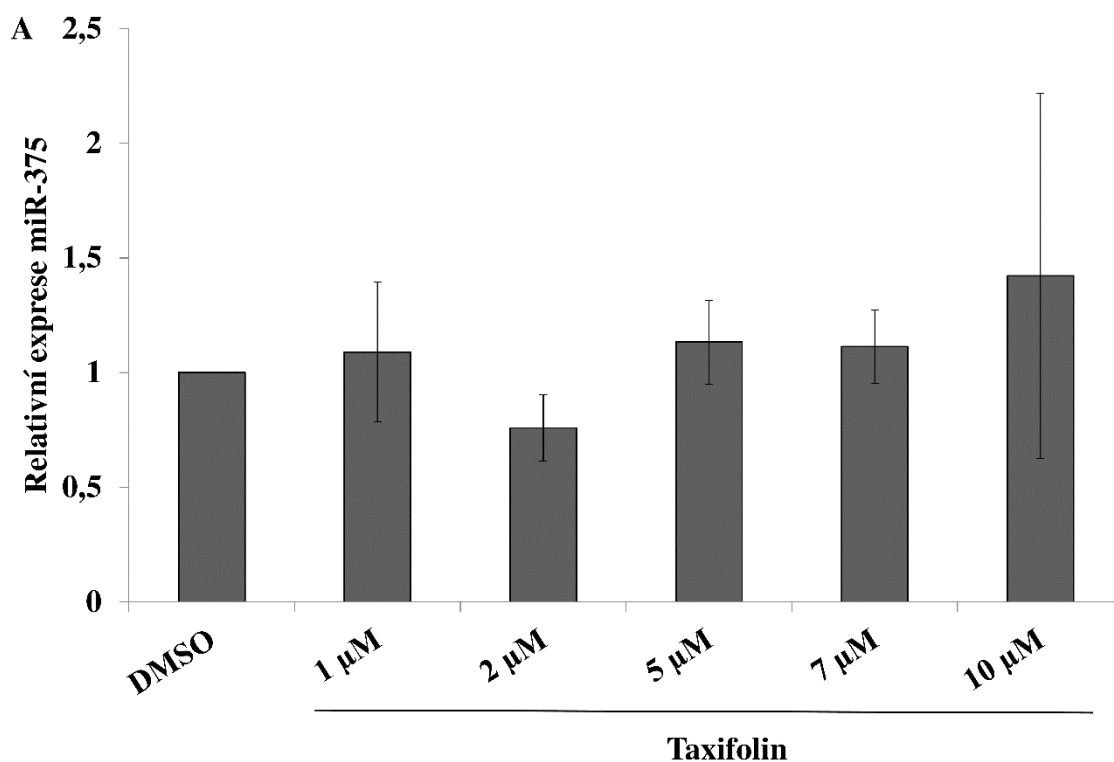
**Obrázek 31: Vliv taxifolinu na expresi proteinu vimentin v buněčné linii Hep G2.**

Modul A reprezentuje vliv různých koncentrací taxifolinu ( $1\text{--}10\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na expresi proteinu vimentinu. Délka inkubace byla stanovena na 24 hodin. Data představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku tří nezávislých měření. \* $p < 0,05$  proti kontrole obsahující pouze DMSO. Modul B představuje reprezentativní western blot pro analýzu proteinu vimentinu.

### 5.3.4 miR-375 jako potenciální regulátor vimentinu

Možnou proměnnou je miR-375, u které je vimentin označován jako validovaný cíl [261]. Je možné, že se na celkovém pozorovaném efektu taxifolinu může podílet více než jedna miRNA, příkladem mohou být například články Nwaeburu a kol [169,170], kde autoři popisují vliv kvercetinu na duktální adenokarcinom pankreatu. Z článků je patrné,

že výsledný efekt se skládá z navýšení exprese miR-200b-3p a miR-let-7c. V průběhu základního screeningu pomocí miRNA array Affymetrix jsme pozorovali navýšení exprese miR-375 v buněčné linii Hep G2 přibližně 2,5×, při koncentraci taxifolinu  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a délce inkubace 24 hodin. U vzorků z primárních kultur lidských hepatocytů jsme pozorovali navýšení na 2,0× kontrolních vzorků. Její expresi jsme proto validovali u buněčné linie Hep G2 pomocí RT-PCR s využitím TaqMan MicroRNA assay v rozsahu koncentrací  $1\text{--}10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky analýzy RT-PCR ale ukázaly nulový vliv taxifolinu na expresi zvolené miRNA v celém rozsahu testovaných koncentrací (obrázek 32).



**Obrázek 32: Vliv taxifolinu na expresi miR-375.** Obrázek reprezentuje RT-PCR analýzu vlivu různých koncentrací taxifolinu ( $1\text{--}10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na expresi miR-375. Vzorky byly inkubovány s taxifolinem 24 hodin. Data představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku dvou nezávislých měření. Jednotlivé experimenty byly připraveny v tripletu.

## 6 DISKUZE

### 6.1 Vliv rodiny miR-29 na cytotoxicitu etoposidu

Vytvořená pracovní hypotéza je založená na dvou poznacích. Jedním byly data popisující rozdílnou odezvu pacientů s AML na léčbu azacytidinem v závislosti na expresi miR-29c [262]. Druhý tvořily validované cíle rodiny miR-29, které jsou Mcl-1 a DNMT3A/3B [4,141]. Podle této hypotézy je možné ovlivňovat efektivitu protinádorových léčiv, které cílí na syntézu DNA a její metylaci, změnou exprese jednotlivých členů rodiny miR-29. Z testovaných chemoterapeutik (etoposid, azacytidin, amiodaron a cytarabin) byl na základě prvotních MTT experimentů zvolen etoposid jako modelové léčivo. Dalším krokem bylo ověření hypotézy pomocí systému xCELLigence. Výsledky analýzy prokázaly významné navýšení toxicity jen po transfekci prekurzory miR-29b, přestože se soubory validovaných cílů jednotlivých izoforem miR-29 překrývají. Na druhou stranu miR-29b vykazuje sérii unikátních vlastností jako je existence dvou kopií genů a specifická sekvence na 3'konci, která způsobuje převažující jadernou lokalizaci.

Protein Mcl-1 je součástí souboru validovaných cílů rodiny miR-29 a na jeho zařazení do studie [93] mělo rozhodující vliv jeho zapojení ve vzniku rezistence nádorových buněk [192]. Dále naši volbu podporuje i fakt, že změna exprese Mcl-1 způsobená rodinou miR-29 hraje významnou roli v kardiovaskulárních onemocněních spojených s diabetem melitem [263]. Protein Bak byl do studie zařazen na základě dat z disertační práce Gabrielové [245], kde je popisována jeho snížená exprese po transfekci prekurzorem miR-29c. Vliv miR-29b na Bak byl dále pozorován v neuronech [264]. V neposlední řadě hrála roli i skutečnost, že je vazebným partnerem proteinu Mcl-1. Experimenty s pre-miR-29, siRNA anti-Mcl-1 a siRNA anti-Bak potvrdily naše očekávání. Hlavní roli v navyšování cytotoxicity hraje Mcl-1, kdežto význam proteinu Bak je zanedbatelný.

Dvě současné studie demonstrovaly vliv miRNA na toxicitu doxorubicinu spojený se snížením exprese Mcl-1. Doxorubicin je protinádorové léčivo, jehož mechanismus účinku je založen na interkalaci do DNA a inhibici topoizomerázy II. V první studii byla citlivost buněk Hep G2 na doxorubicin navýšena regulací exprese Mcl-1 díky miR-101 [265]. Druhá studie popsala pokles exprese Mcl-1 vyvolaný miR-193b, který vedl ke zlepšení odezvy buněčné linie MCF-7 na doxorubicin [266]. Tyto objevy společně s našimi

výsledky ukazují na součinnost mezi regulací Mcl-1 způsobenou miRNA a citlivostí na farmakologickou terapii narušující syntézu DNA.

Z našich dat je patrné, že působení miR-29b navozuje nárůst cytotoxicity etoposidu, které je spojeno s modulací poměru Mcl-1L/Mcl-1S, což se řadí mezi unikátní vlastnost tohoto člena rodiny. Kromě vazebného místa na 3'UTR oblasti se v genu pro Mcl-1 nachází další, specifické pro miR-29b. Toto místo je součástí exonu II [263], přesněji mezi nukleotidy 1 354-1 376. Přesné umístění bylo získáno analýzou genové knihovny. Během alternativního sestřihu dochází k odstranění exonu II z izoformy Mcl-1S, což vede ke dvěma možným závěrům. První, díky ztrátě exonu II může být vliv miR-29b na tvorbu Mcl-1S zanedbatelný. Druhý, interakce miR-29b s vazebným místem na exonu II by mohla zahájit alternativní sestřih mRNA.

Posledním krokem studie bylo ověření vlivu jaderné translokace na efektivitu etoposidu a změnu poměru izoform Mcl-1L/Mcl-1S. Pro experiment jsme využili syntetické oligonukleotidy miR-29b s modifikovanými 3'konci, které vykazují rozdílnou lokalizaci. Pomocí metody western blot jsme zjistili, že oba modifikované oligonukleotidy regulují expresi Mcl-1L i Mcl-1S a ve srovnání s endogenní miR-29b snižují efektivněji expresi Mcl-1L. Vliv na poměr Mcl-1L/Mcl-1S ale není jednoznačný. Podobné ovlivnění cytotoxicity etoposidu jako u miR-29b bylo pozorováno i u jaderně lokalizovaného oligonukleotidu m3. Naopak účinnost molekuly TM charakterizované cytosolovou lokalizací je nižší. Statistická analýza ale charakterizovala rozdíl mezi m3 a TM jako nevýznamný.

## **6.2 Farmakologický přístup k ovlivňování exprese miRNA**

Prvotní experimenty, které studovaly vliv dexametazonu a mifepristonu na transkripční aktivitu genů miR-29b v buněčné linii Hep G2 byly velkým překvapením. I přes necitlivý glukokortikoidní receptor buněk Hep G2 [267] byl mifepriston schopen navyšovat expresi miR-29b [250]. Proto by měla preinkubace s tímto léčivem skrývat stejný potenciál pro navození chemosenzitivity vůči etoposidu jako transfekce prekurzory miR-29b v buněčné linii HeLa popsaná v publikaci Kollinerova a kol. [22]. Tato hypotéza byla záhy vyvrácena, neboť preinkubace s různými koncentracemi mifepristonu neměla žádný vliv na cytotoxicitu etoposidu. Bez ohledu na ovlivnění miR-29b mifepristonem, není tento efekt převeden v navýšení cytotoxicity etoposidu. Jedním z možných důvodů je rychlý metabolismus mifepristonu, protože etoposid byl přidán až 24 hodin po prvním léčivu.

Tyto důvody nás vedly k experimentům založeným na společné inkubaci mifepristonu a etoposidu v buňkách Hep G2. Naše data jasně prokázaly, že součinnost mezi testovanými léčivy vede k navýšení cytotoxického vlivu etoposidu v závislosti na dávce (obrázek 21). Naopak samotný mifepriston toxický nebyl nebo viabilitu buněčné linie Hep G2 mírně navyšoval (obrázek 20). Prvním krokem ve snaze popsat mechanismus účinku mifepristonu bylo studium jeho proapoptického vlivu, protože kombinace mifepristonu s etoposidem navyšovala aktivitu kaspázy-3 (obrázek 22). Podle literatury je mifepriston schopen ovlivňovat expresi proteinů Bax, Bcl-2 nebo Bcl-xL [35]. Modulace těchto proteinů je u nádorů stěžejní, neboť hrají roli při vzniku senzitivity a rezistence. Proteiny Bax a Bcl-2 jsou označovány za nejčastější cíle mifepristonu [35]. Navzdory minimálnímu vlivu mifepristonu na cytotoxicitu etoposidu během preinkubačních experimentů jsme otestovali možnou regulaci Mcl-1. Bax byl jediný protein, který byl ovlivněn společnou inkubací mifepristonu a etoposidu. Výsledky analýzy nejsou statisticky významné, představují pouze trend. Přesto nelze vliv Bax kompletně vyloučit. V současné době je role rodiny Bcl-2 v regulaci buněčné smrti vnímána jako dynamický proces, který zahrnuje mnoho faktorů jako je lokalizace, stabilita, množství a afinita [182]. Proto zdánlivě nevýznamná změna jednoho proteinu může být rozhodující pro osud buňky. Naše data jsou omezena pouze na množství proteinu. I tak dokazujeme, že aktivita kaspázy-3 jako výkonné složky programované buněčné smrti je po ošetření kombinací mifepristonu a etoposidu navýšena. Kromě toho prezentovaná data ukazují nápadnou shodu mezi viabilitou buněk a aktivitou kaspázy-3 (obrázek 21 a obrázek 22).

Za synergní účinek kombinace testovaných léčiv může být zodpovědná inhibice ABC transportérů. Literatura popisuje vliv mifepristonu na funkci p-glykoproteinu a potenciaci cytotoxicity doxorubicinu u buněk s mnohočetnou lékovou rezistencí [268]. Následná studie ukázala, že mifepriston je schopen zvrátit lékovou rezistenci zprostředkovanou proteiny spojenými s mnohočetnou rezistencí k lékům [269]. Oba články zdůrazňují, že použitá koncentrace mifepristonu ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) je dosažitelná *in vivo*. Při pohledu na naše data je zřejmé, že akumulace etoposidu způsobená inhibicí ABC transportérů je zapojena do synergního vlivu. Naše experimenty prokázaly, že mifepriston způsobuje navýšení intracelulární koncentrace etoposidu v buňkách Hep G2 (obrázek 24) a je málo pravděpodobné, že vliv je spouštěn jakýmkoliv jiným mechanismem než modulací aktivity ABC transportérů. Proto jsme použili známé inhibitory ABC transportérů v koinkubaci s etoposidem. Naše data ukazují, že inhibitory ABCB1 a ABCC1

navyšovaly cytotoxicitu etoposidu podobně jako mifepriston (obrázek 25), což podporuje i prokázaná přítomnost vybraných ABC transportérů v buněčné linii Hep G2 (obrázek 26). Na základě výsledků můžeme pouze spekulovat, že ABCB1 a ABCC1 jsou v buněčné linii Hep G2 dominantní, kdežto ABCG2 má jen minoritní roli.

Ve snaze odpovědět na tuto otázku jsme sledovali vliv mifepristonu na inhibici dvou hlavních lékových transportérů, ABCB1 a ABCG2 v modelové buněčné linii exprimující různé množství vybraných ABC transportérů. Mifepriston inhiboval transport fluorescenčního barviva ven z buněk exprimujících ABCB1 za klinicky dostupných koncentrací (do  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) (obrázek 27). Inhibiční efekt mifepristonu závisí na míře exprese ABC transportérů. Vyšší exprese vyžaduje vyšší koncentraci inhibitoru (obrázek 27). V buňkách K562/DoxDR2, které mají nízkou expresi ABCB1 dosáhl mifepriston inhibice srovnatelné s ZSQ [269]. To je obzvláště důležité, protože exprese ABC transportérů je v nádorech spíše nižší než vyšší. Naopak u buněk K562/Dox, které exprimují velké množství ABCB1 byla dosažena pouze částečná inhibice. Míru exprese ABCB1 srovnatelnou s K562/DOX dosahují nádory jen velmi obtížně [270]. Tyto výsledky naznačují, že inhibice ABCB1 umocňuje apoptotický efekt etoposidu.

Na rozdíl od ABCB1 byla účinnost mifepristonu na inhibici ABCG2 nízká. Při pokusech s K562/ABCG2CL10, které exprimují vysoké množství transportéru ABCG2 nebyl pozorován žádný vliv mifepristonu (obrázek 28) a jen nízká inhibice byla objevena u K562/ABCG2CL1 s nízkou expresí ABCG2 (obrázek 28). Exprese ABCG2 je v nádorech obvykle nižší, proto je možné, že mifepriston potencuje alespoň z části apoptotický vliv etoposidu přes ABCG2 (obrázek 28).

### **6.3 Ovlivnění miRNA za pomoci látek běžně se vyskytujících ve stravě člověka**

Poslední část disertační práce se věnovala vlivu polyfenolů na expresní profil miRNA v buněčné linii Hep G2 a primárních kulturách lidských hepatocytů. Zvolené buněčné modely reprezentují játra jako jeden z nejdůležitějších orgánů, ale také první orgán zasažený po absorpci polyfenolů ze střeva. V rámci experimentu jsme zvolili koncentraci  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , protože je v séru za fyziologických podmínek dosažitelná [77,181]. Toxikologické experimenty dále prokázaly, že zvolená dávka testovaných polyfenolů není pro buněčnou linii Hep G2 cytotoxická [240].

Analýzu pomocí miRNA array čipů jsme zvolili jako komplexní nástroj pro rychlé a efektivní stanovení expresních profilů miRNA. Nabízí velké množství sond pro různé miRNA umístěné na skleněné matici v přesně definovaných pozicích. Díky fluorescenčnímu značení miRNA na dosyntetizovaném poly A ocásku a známé pozice jednotlivých sond systém detekuje množství jednotlivých miRNA na základě intenzity fluorescence.

Výsledky čipové technologie dále odhalily několik miRNA se sníženou expresí v reakci na taxifolin, které regulují protein ZEB2 – jeden z hlavních regulátorů EMT. Analýza technikou western blot odhalila na dávce závislé navýšení exprese ZEB2 u buněčné linie Hep G2. Během EMT dochází ke změnám v expresi mnoha proteinů jako jsou E-cadherin nebo N-cadherin, které slouží také jako markery tohoto významného buněčného děje. Výsledkem je ztráta epiteliálního a získání mezenchymálního fenotypu. Epiteliální dediferenciace je spojena s regulací složek různých mezibuněčných spojů, což umožňuje snazší migraci buněk [228]. Dalším z ovlivněných proteinů je vimentin, který je součástí buněčného cytoskeletu, hraje roli v hojení ran a metastazování nádorových buněk [271]. Podle hypotézy by měl vimentin odrážet expresi ZEB2. Naše výsledky ale hypotézu zcela vyvrací, protože vimentinu v testované buněčné linii ubývalo v závislosti na dávce taxifolinu. To naznačuje existenci jiného a silnějšího mechanismu/signalizace, který dokáže působit zcela proti signalizaci vyvolané proteinem ZEB2. Mezi dráhy, které ovlivňují vimentin se řadí signalizace přes NF- $\kappa$ B a  $\beta$ -catenin. NF- $\kappa$ B má relativně významnou roli u nádorových onemocnění, avšak ve srovnání s krevními malignitami jsou u solidních nádorů mutace způsobující přímou aktivaci NF- $\kappa$ B spíše vzácné [272]. Některé publikace naopak navrhuje, že určitá konsektivní aktivita NF- $\kappa$ B v buňkách Hep G2 existuje. Příkladem může být výsledek inkubace této buněčné linie s inhibítorom IKK-2, který snižoval aktivitu NF- $\kappa$ B [273]. V rámci našich experimentů byl vliv taxifolinu na NF- $\kappa$ B podle očekávání nulový. Pro testování vlivu taxifolinu na  $\beta$ -catenin nás dovedlo několik publikací, které popisují negativní vliv taxifolinu na expresi  $\beta$ -catenin v nádorových buňkách karcinomu prsu [274] nebo v buňkách kolorektálního karcinomu HCT116 a HT29 [275].  $\beta$ -catenin hraje důležitou roli v regulaci mnoha důležitých dějů souvisejících s nádory. Po rozpadu degračního komplexu proteinů spojených s Wnt signální dráhou, následuje redistribuce  $\beta$ -catenin mezi cytosolem a jádrem [274,276], což ovlivňuje jeho funkci transkripčního faktoru a koaktivátoru pro transkripční faktor Lef/TCF [276]. Významným důsledkem aktivace

$\beta$ -catenin je navýšení exprese vimentinu [274]. Předběžné výsledky analýzy  $\beta$ -catenin v jaderné a cytosolické frakci ukazují jednoznačný trend v poklesu  $\beta$ -catenin v cytosolu a nejednoznačné výsledky pro  $\beta$ -catenin s jadernou lokalizací. Pokud by další dvě opakování prokázaly snížení množství  $\beta$ -catenin v jádře, umožnilo by to vysvětlení překvapivého snížení vimentinu. Druhou možností je snížení množství  $\beta$ -catenin pouze v cytosolu, což by naznačovalo zvýšenou degradaci. Část cytosolického  $\beta$ -catenin interaguje s E-cadherinem, kde zajišťuje jeho stabilizaci překrytím pest sekvencí. Pozorovaný úbytek by mohl souviset se změnou v mezibuněčných interakcích.



## 7 ZÁVĚRY

Ze získaných výsledků lze vyvodit tyto závěry.

### 7.1 Ovlivnění cytotoxicity etoposidu rodinou miR-29 v buněčné linii HeLa

Ve studii nás zajímalo, jakým mechanismem ovlivňuje miR-29b cytotoxicitu etoposidu v buněčné linii HeLa. Zda je do regulace cytotoxicity zapojena jen přes působení na cílové proteiny, nebo se na sledovaném efektu podílí i přes lokalizaci miR-29b:

- Navýšení cytotoxicity etoposidu je spojeno s regulací proteinu Mcl-1.
- Syntetické analoga miR-29b stále vykazují aktivitu proti Mcl-1.
- Jaderná lokalizace je důležitá pro zkoumaný efekt miR-29b.
- Nejefektivnější siRNA jsou siRNA proti Mcl-1 a Bak s označením (2).
- Transfekce prekurzorem miR-29b vede navýšení aktivity kaspázy-3 během inkubace s etoposidem.

### 7.2 Vliv mifepristonu na cytotoxicitu etoposidu v buněčné linii Hep G2

V případě linie Hep G2 jsme se zaměřili na stanovení mechanismu účinku mifepristonu na sledované navýšení cytotoxicity etoposidu, vliv mifepristonu na expresi proteinů Bax, Mcl-1 a Bcl-2, schopnosti mifepristonu navyšovat intracelulární koncentraci etoposidu a popis inhibiční aktivity mifepristonu na buněčné linii K562 exprimující různé množství ABC transportérů:

- Mifepriston navyšuje cytotoxicitu etoposidu.
- Pro navýšení cytotoxicity je nutná kombinovaná terapie, preinkubace s mifepristonem je neúčinná.
- Mifepriston vykazuje cytotoxicitu na Hep G2 buňkách až při koncentraci  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Používané koncentrace v experimentech jsou netoxické.
- Mifepriston navyšuje intracelulární koncentrace etoposidu v buněčné linii Hep G2.
- Inhibice ABC transportérů hraje důležitou roli v mechanismu účinku mifepristonu.

- Mifepriston efektivně inhibuje aktivitu ABCB1 transportéru u buněk s nízkou expresí tohoto proteinu. Naopak u buněk s vysokou expresí ABCB1 je efekt mifepristonu omezen.
- Mifepriston inhibuje pouze částečně aktivitu ABCG2 transportéru u buněk s nízkou expresí tohoto proteinu. U buněk s vysokou expresí ABCG2 ale mifepriston v inhibici selhává.

### 7.3 Efekt kvercetinu a taxifolinu na miRNA profil a jeho důsledky

Projekt měl za cíl studium vlivu polyfenolů na expresní profil miRNA v buněčné linii Hep G2 a primárních kulturách hepatocytů a zkoumat důsledky vyvolaných změn:

- Polyfenoly modulují expresi miRNA už při fyziologicky dostupné koncentraci  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  jak v buněčné linii Hep G2, tak v primárních kulturách lidských hepatocytů.
- Taxifolin ovlivňuje sérii miRNA, které jsou schopné modulovat expresi proteinu ZEB2
- Taxifolin navyšuje expresi proteinu ZEB2. Tento vliv ale není doprovázen zvyšováním exprese vimentinu.
- Výsledky naznačují existenci další signalizace vyvolanou taxifolinem, která zvrátí účinky proteinu ZEB2.
- Prvotní výsledky naznačují možnou regulaci  $\beta$ -catenin, která může souviset s poklesem vimentinu po inkubaci s taxifolinem.

## 8 SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI

### Publikace:

1. Kollinerová S., Dostál Z., Modrianský M.: MicroRNA hsa-miR-29b potentiates etoposide toxicity in HeLa cells via down-regulation of Mcl-1. *Toxicol. in Vitro.* **40**, 289-296 (2017). I<sub>F2016</sub> = 2.866
2. Dostál Z., Kosina P., Mlejnek P., Kikalová K., Modrianský M.: Mifepristone potentiates etoposide toxicity in Hep G2 cells by modulating drug transport. *Toxicol. in Vitro.* **54**, 33-40 (2019). I<sub>F2018</sub> = 3.105
3. Dostál Z., Modrianský M.: The effect of quercetin on microRNA expression: A critical review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **163**(2), 95-106 (2019). I<sub>F2018</sub> = 1.141

### Prezentace na konferencích:

1. Dostál Z., Sebera M., Josef Srovnal, Sedláčková M., Modrianský M.: Influence of selected natural substances on global microRNA expression in Hep G2 cell line. *IX. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days.* 21. 11.–22. 11. 2013, Olomouc, Česká Republika.
2. Dostál Z., Sebera M., Srovnal J., Sedláčková M., Štaffová K., Radová L., Modrianský M.: Vliv vybraných přírodních látek na globální expresi mikroRNA v hepatocytech. *XIV. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků* 13.–16. 5. 2014, Milovy, Česká Republika.
3. Dostál Z., Sebera M., Srovnal J., Sedláčková M., Radová L., Štaffová K., Modrianský M., Ulrichová J.: Influence of quercetin and taxifolin on microRNA 375 expression in Hep G2 cell line and human hepatocytes. *X. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days.* 3.–4. 12. 2014, Olomouc, Česká Republika.
4. Dostál Z., Kollinerová S., Modrianský M.: MicroRNA hsa-miR-29b potentiates etoposide toxicity in HeLa cells via down-regulation of Mcl-1. *XI. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days.* 3.–4. 12. 2015, Olomouc, Česká Republika.
5. Dostál Z., Kollinerová S., Modrianský M.: Nuclear shuttling of microRNA hsa-miR-29b enhances etoposide toxicity in HeLa cells. *XII. Diagnostic, Predictive*

- and Experimental Oncology Days*. 30. 11.–1. 12. 2016, Olomouc, Česká Republika.
6. Dostál Z., Kosina P., Modrianský M.: Ovlivnění cytotoxicity etoposidu. *XXIX. Xenobiochemické symposium*. 24. 5.–26. 5. 2017, Telč, Česká Republika.
  7. Dostál Z., Kosina P., Mlejnek P., Kikalová K., Modrianský M.: Inhibition of ABC transporters by mifepristone is responsible for enhanced etoposide toxicity in Hep G2 cells. *The 43rd FEBS congress*. 7.–12. 7. 2018, Praha, Česká Republika.
  8. Dostál Z., Srovnal J., Štaffová K., Radová L., Ulrichová J., Modrianský M.: Contradictory taxifolin effects on ZEB2 signalling pathway in Hep G2 cells. *XIV. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days* 19.–21. 11. 2018, Olomouc, Česká Republika.

## 9 OSTATNÍ PRÁCE

### Publikace

1. Zholobenko A.V., Mouithys-Mickalad A., Dostal Z., Serteyn D. a Modrianský M.: On the causes and consequences of the uncoupler-like effects of quercetin and dehydrosilybin in H9c2 cells. *PLoS One*. **12** (10): e0185691 (2017).  $I_{F2016} = 2.806$

## 10 LITERATURA

1. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
2. Ardekani AM, Naeini MM. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna J Med Biotechnol* 2010;2(4):161-79.
3. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2016;1:15004. doi: 10.1038/sigtrans.2015.4.
4. Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 2007;26(42):6133-40. doi: 10.1038/sj.onc.1210436.
5. Gao J, Li LS, Wu MQ, Liu M, Xie XH, Guo JL, Tang HL, Xie XM. MiR-26a Inhibits Proliferation and Migration of Breast Cancer through Repression of MCL-1. *Plos One* 2013;8(6). doi: 10.1371/journal.pone.0065138.
6. Zhang X, Guo Q, Chen J, Chen Z. Quercetin Enhances Cisplatin Sensitivity of Human Osteosarcoma Cells by Modulating microRNA-217-KRAS Axis. *Mol Cells* 2015;38(7):638-42. doi: 10.14348/molcells.2015.0037.
7. Grosso G, Stepaniak U, Topor-Madry R, Szafraniec K, Pajak A. Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the Polish arm of the HAPIEE study. *Nutrition* 2014;30(11-12):1398-403. doi: 10.1016/j.nut.2014.04.012.
8. Ovaskainen ML, Torronen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellstrom J, Reinivuo H, Mattila P. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr* 2008;138(3):562-6. doi: 10.1093/jn/138.3.562.
9. Ardalani H, Avan A, Ghayour-Mobarhan M. Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent. *Avicenna J Phytomed* 2017;7(4):285-94. doi: 10.22038/ajp.2017.8779.
10. Slevin ML. The clinical pharmacology of etoposide. *Cancer* 1991;67(1 Suppl):319-29. doi: 10.1002/1097-0142(19910101)67:1+<319::aid-cnrcr2820671319>3.0.co;2-d.
11. Sinkule JA. Etoposide: a semisynthetic epipodophyllotoxin. Chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, adverse effects and use as an antineoplastic agent. *Pharmacotherapy* 1984;4(2):61-73. doi: 10.1002/j.1875-9114.1984.tb03318.x.
12. Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 1998;34(10):1514-21. doi: 10.1016/S0959-8049(98)00228-7.
13. Alvarado-Luna G, Morales-Espinosa D. Treatment for small cell lung cancer, where are we now?-a review. *Transl Lung Cancer Res* 2016;5(1):26-38. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.13.
14. Liu MY, Wang WZ, Liao FF, Wu QQ, Lin XH, Chen YH, Cheng L, Jin XB, Zhu JY. Selective and effective targeting of chronic myeloid leukemia stem cells by topoisomerase II inhibitor etoposide in combination with imatinib mesylate in vitro. *Cell Biol Int* 2017;41(1):16-23. doi: 10.1002/cbin.10686.
15. Henwood JM, Brogden RN. Etoposide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in combination chemotherapy of cancer. *Drugs* 1990;39(3):438-90. doi: 10.2165/00003495-199039030-00008.
16. Dvir A, Conaway RC, Conaway JW. A role for TFIIF in controlling the activity of early RNA polymerase II elongation complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(17):9006-10.
17. Montecucco A, Biamonti G. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett* 2007;252(1):9-18. doi: 10.1016/j.canlet.2006.11.005.
18. Davis AJ, Chen DJ. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res* 2013;2(3):130-43. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02.
19. Kačírková P, Campr V. Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně: Grada Publishing a.s.; 2007. 304 p.
20. Fan Y, Schreiber EM, Giorgianni A, Yalowich JC, Day BW. Myeloperoxidase-catalyzed metabolism of etoposide to its quinone and glutathione adduct forms in HL60 cells. *Chem Res Toxicol* 2006;19(7):937-43. doi: 10.1021/tx0600595.
21. Pui CH, Ribeiro RC, Hancock ML, Rivera GK, Evans WE, Raimondi SC, Head DR, Behm FG, Mahmoud MH, Sandlund JT, et al. Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1991;325(24):1682-7. doi: 10.1056/NEJM199112123252402.
22. Kollinerova S, Dostal Z, Modriansky M. MicroRNA hsa-miR-29b potentiates etoposide toxicity in HeLa cells via down-regulation of Mcl-1. *Toxicol In Vitro* 2017;40:289-96. doi: 10.1016/j.tiv.2017.02.005.
23. Gatto B, Leo E. Drugs acting on the beta isoform of human topoisomerase II (p180). *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003;3(3):173-85. doi: 10.2174/1568011033482486.

24. K.R. Hande. Topoisomerase II inhibitors. *Update Canc Therapeut* 2008;3(1):13-26. doi: 10.1016/j.uct.2008.02.001.
25. Yang J, Bogni A, Schuetz EG, Ratain M, Dolan ME, McLeod H, Gong L, Thorn C, Relling MV, Klein TE, Altman RB. Etoposide pathway. *Pharmacogenet Genomics* 2009;19(7):552-3. doi: 10.1097/FPC.0b013e32832e0e7f.
26. Schacter L. Etoposide phosphate: What, why, where, and how? *Semin Oncol* 1996;23(6):1-7.
27. Fields SZ, Igwemezie LN, Kaul S, Schacter LP, Schilder RJ, Litam PP, Himpler BS, McAleer C, Wright J, Barbhuiya RH, et al. Phase I study of etoposide phosphate (etopophos) as a 30-minute infusion on days 1, 3, and 5. *Clin Cancer Res* 1995;1(1):105-11.
28. Hoffman R, Benz JEJ, Silberstein LE, Heslop H, Weitz J, Anastasi J. Hematology: Basic Principles and Practice, 7th Edition 2017. 2378 p.
29. Schaff EA. Mifepristone: ten years later. *Contraception* 2010;81(1):1-7. doi: 10.1016/j.contraception.2009.08.004.
30. Trávník P. Principy farmakologického ukončení těhotenství a evakuace děložní dutiny. *Praktické lékárenství* 2015;11(1):2.
31. Jiang W, Allan G, Fiordeliso JJ, Linton O, Tannenbaum P, Xu J, Zhu P, Gunnet J, Demarest K, Lundeen S, Sui Z. New progesterone receptor antagonists: phosphorus-containing 11beta-aryl-substituted steroids. *Bioorg Med Chem* 2006;14(19):6726-32. doi: 10.1016/j.bmc.2006.05.066.
32. Sindelar DK, Carson MW, Morin M, Shaw J, Barr RJ, Need A, Alexander-Chacko J, Coghlan M, Gehlert DR. LLY-2707, a novel nonsteroidal glucocorticoid antagonist that reduces atypical antipsychotic-associated weight gain in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2014;348(1):192-201. doi: 10.1124/jpet.113.205864.
33. Gallagher P, Young AH. Mifepristone (RU-486) treatment for depression and psychosis: a review of the therapeutic implications. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2006;2(1):33-42.
34. Zhang S, Jonklaas J, Danielsen M. The glucocorticoid agonist activities of mifepristone (RU486) and progesterone are dependent on glucocorticoid receptor levels but not on EC50 values. *Steroids* 2007;72(6-7):600-8. doi: 10.1016/j.steroids.2007.03.012.
35. Chen J, Wang J, Shao J, Gao Y, Xu J, Yu S, Liu Z, Jia L. The unique pharmacological characteristics of mifepristone (RU486): from terminating pregnancy to preventing cancer metastasis. *Med Res Rev* 2014;34(5):979-1000. doi: 10.1002/med.21311.
36. Dostal Z, Kosina P, Mlejnek P, Kikalova K, Modriansky M. Mifepristone potentiates etoposide toxicity in Hep G2 cells by modulating drug transport. *Toxicol In Vitro* 2018;54:33-40. doi: 10.1016/j.tiv.2018.09.005.
37. Jang JH, Woo SM, Um HJ, Park EJ, Min KJ, Lee TJ, Kim SH, Choi YH, Kwon TK. RU486, a glucocorticoid receptor antagonist, induces apoptosis in U937 human lymphoma cells through reduction in mitochondrial membrane potential and activation of p38 MAPK. *Oncol Rep* 2013;30(1):506-12. doi: 10.3892/or.2013.2432.
38. Liu R, Shi P, Nie Z, Liang H, Zhou Z, Chen W, Chen H, Dong C, Yang R, Liu S, Chen C. Mifepristone Suppresses Basal Triple-Negative Breast Cancer Stem Cells by Down-regulating KLF5 Expression. *Theranostics* 2016;6(4):533-44. doi: 10.7150/thno.14315.
39. Xu J, Liao X, Wong C. Downregulations of B-cell lymphoma 2 and myeloid cell leukemia sequence 1 by microRNA 153 induce apoptosis in a glioblastoma cell line DBTRG-05MG. *Int J Cancer* 2010;126(4):1029-35. doi: 10.1002/ijc.24823.
40. Jang GR, Wrighton SA, Benet LZ. Identification of CYP3A4 as the principal enzyme catalyzing mifepristone (RU 486) oxidation in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1996;52(5):753-61. doi: 10.1016/0006-2952(96)00357-7.
41. Jang GR, Benet LZ. Antiprogestin-mediated inactivation of cytochrome P450 3A4. *Pharmacology* 1998;56(3):150-7. doi: 10.1159/000028193.
42. Lin HL, Zhang H, Hollenberg PF. Metabolic activation of mifepristone [RU486; 17beta-hydroxy-11beta-(4-dimethylaminophenyl)-17alpha-(1-propynyl)-estra-4,9-dien -3-one] by mammalian cytochromes P450 and the mechanism-based inactivation of human CYP2B6. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;329(1):26-37. doi: 10.1124/jpet.108.148536.
43. Khan KK, He YQ, Correia MA, Halpert JR. Differential oxidation of mifepristone by cytochromes P450 3A4 and 3A5: selective inactivation of P450 3A4. *Drug Metab Dispos* 2002;30(9):985-90. doi: 10.1124/dmd.30.9.985.
44. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56(11):317-33. doi: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x.
45. Di Ferdinando M, Brunetti C, Agati G, Tattini M. Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environ Exp Bot* 2014;103:107-16. doi: 10.1016/j.envexpbot.2013.09.012.

46. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000;55(6):481-504. doi: 10.1016/S0031-9422(00)00235-1.
47. Hussain T, Tan B, Yin YL, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev* 2016;7432797. doi: 10.1155/2016/7432797.
48. Moosavi F, Hosseini R, Saso L, Firuzi O. Modulation of neurotrophic signaling pathways by polyphenols. *Drug Des Devel Ther* 2016;10:23-42. doi: 10.2147/DDDT.S96936.
49. Mansuri ML, Parihar P, Solanki I, Parihar MS. Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways. *Genes Nutr* 2014;9(3):400. doi: 10.1007/s12263-014-0400-z.
50. Cao J, Zhang Y, Chen W, Zhao XJ. The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake. *Brit J Nutr* 2010;103(2):249-55. doi: 10.1017/S000711450999170x.
51. Kawabata K, Mukai R, Ishisaka A. Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. *Food Funct* 2015;6(5):1399-417. doi: 10.1039/c4fo01178c.
52. D'Andrea G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* 2015;106:256-71. doi: 10.1016/j.fitote.2015.09.018.
53. Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, Baker J, Kerr DJ. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 1996;2(4):659-68.
54. Priprem A, Watanatorn J, Sutthiparinyanont S, Phachonpai W, Muchimapura S. Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine* 2008;4(1):70-8. doi: 10.1016/j.nano.2007.12.001.
55. Gao L, Liu G, Wang X, Liu F, Xu Y, Ma J. Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology. *Int J Pharm* 2011;404(1-2):231-7. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.11.009.
56. Wang WY, Sun CX, Mao LK, Ma PH, Liu FG, Yang J, Gao YX. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Food Sci Tech* 2016;56:21-38. doi: 10.1016/j.tifs.2016.07.004.
57. Kiviranta J, Huovinen K, Hiltunen R. Variation of phenolic substances in onion. *Acta Pharm Fenn* 1988;97:67-72.
58. Fang N, Yu SG, Mabry TJ. Flavonoids from Ageratina-Calophylla. *Phytochemistry* 1986;25(11):2684-6. doi: 10.1016/S0031-9422(00)84545-8.
59. Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1976;24:117-91.
60. Aziz AA, Edwards CA, Lean ME, Crozier A. Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-beta-glucoside and isorhamnetin-4'-O-beta-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Radic Res* 1998;29(3):257-69.
61. Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr* 2005;135(1):48-52. doi: 10.1093/jn/135.1.48.
62. Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, McLauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 2000;468(2-3):166-70. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01211-4.
63. Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett* 1998;436(1):71-5. doi: 10.1016/s0014-5793(98)01101-6.
64. Griffiths LA, Barrow A. Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem J* 1972;130(4):1161-2. doi: 10.1042/bj1301161.
65. Zhang Z, Peng X, Li S, Zhang N, Wang Y, Wei H. Isolation and identification of quercetin degrading bacteria from human fecal microbes. *PLoS One* 2014;9(3):e90531. doi: 10.1371/journal.pone.0090531.
66. Ueno I, Nakano N, Hirono I. Metabolic fate of [<sup>14</sup>C] quercetin in the ACI rat. *Jpn J Exp Med* 1983;53(1):41-50.
67. Walle T, Walle UK, Halushka PV. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J Nutr* 2001;131(10):2648-52. doi: 10.1093/jn/131.10.2648.
68. Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srail SK, Rice-Evans C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* 1999;458(2):224-30. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01160-6.
69. Graf BA, Ameho C, Dolnikowski GG, Milbury PE, Chen CY, Blumberg JB. Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. *J Nutr* 2006;136(1):39-44. doi: 10.1093/jn/136.1.39.



70. Moon YJ, Wang L, DiCenzo R, Morris ME. Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharm Drug Dispos* 2008;29(4):205-17. doi: 10.1002/bdd.605.
71. Elbarbry F, Ung A, Abdelkawy K. Studying the Inhibitory Effect of Quercetin and Thymoquinone on Human Cytochrome P450 Enzyme Activities. *Pharmacogn Mag* 2018;13(Suppl 4):S895-S9. doi: 10.4103/0973-1296.224342.
72. Noratto GD, Kim Y, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Flavonol-rich fractions of yaupon holly leaves (*Ilex vomitoria*, Aquifoliaceae) induce microRNA-146a and have anti-inflammatory and chemopreventive effects in intestinal myofibroblast CCD-18Co cells. *Fitoterapia* 2011;82(4):557-69. doi: 10.1016/j.fitote.2011.01.013.
73. Krizkova J, Burdova K, Stiborova M, Kren V, Hodek P. The effects of selected flavonoids on cytochromes P450 in rat liver and small intestine. *Interdiscip Toxicol* 2009;2(3):201-4. doi: 10.2478/v10102-009-0018-y.
74. Gugler R, Leschik M, Dengler HJ. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol* 1975;9(2-3):229-34. doi: 10.1007/BF00614022.
75. Han QS, Wang XH, Cai SF, Liu XL, Zhang YF, Yang L, Wang C, Yang R. Quercetin nanoparticles with enhanced bioavailability as multifunctional agents toward amyloid induced neurotoxicity. *J Mater Chem B* 2018;6(9):1387-93. doi: 10.1039/c7tb03053c.
76. Dian L, Yu E, Chen X, Wen X, Zhang Z, Qin L, Wang Q, Li G, Wu C. Enhancing oral bioavailability of quercetin using novel soluplus polymeric micelles. *Nanoscale Res Lett* 2014;9(1):2406. doi: 10.1186/1556-276X-9-684.
77. Conquer JA, Maiani G, Azzini E, Raguzzini A, Holub BJ. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *J Nutr* 1998;128(3):593-7. doi: 10.1093/jn/128.3.593.
78. Weidmann AE. Dihydroquercetin: More than just an impurity? *Eur J Pharmacol* 2012;684(1-3):19-26. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.03.035.
79. Lee SB, Cha KH, Selenge D, Solongo A, Nho CW. The chemopreventive effect of taxifolin is exerted through ARE-dependent gene regulation. *Biol Pharm Bull* 2007;30(6):1074-9.
80. Gallori S, Bilia AR, Bergonzi MC, Barbosa WLR, Vincieri FF. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai palm). *Chromatographia* 2004;59(11-12):739-43. doi: 10.1365/s10337-004-0305-x.
81. Sakushima A, Ohno K, Coskun M, Seki K, Ohkura K. Separation and identification of Taxifolin 3-O-glucoside isomers from *Chamaecyparis obtusa* (Cupressaceae). *Nat Prod Lett* 2002;16(6):383-7. doi: 10.1080/10575630290033141.
82. Hosoi S, Shimizu E, Ohno K, Yokosawa R, Kuninaga S, Coskun M, Sakushima A. Structural studies of zoospore attractants from *Trachelospermum jasminoides* var. *pubescens*: taxifolin 3-O-glycosides. *Phytochem Anal* 2006;17(1):20-4. doi: 10.1002/pca.876.
83. Fossen T, Pedersen AT, Andersen OM. Flavonoids from red onion (*Allium cepa*). *Phytochemistry* 1998;47(2):281-5. doi: 10.1016/S0031-9422(97)00423-8.
84. Sato M, Islam SQ, Awata S, Yamasaki T. Flavanonol glucoside and proanthocyanidins: Oviposition stimulants for the cerambycid beetle, *Monochamus alternatus*. *J Pestic Sci* 1999;24(2):123-9. doi: 10.1584/jpestics.24.123.
85. Jurgenliemk G, Nahrstedt A. Phenolic compounds from *Hypericum perforatum*. *Planta Med* 2002;68(1):88-91. doi: 10.1055/s-2002-20053.
86. Schneider H, Blaut M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. *Arch Microbiol* 2000;173(1):71-5. doi: 10.1007/s002030050010.
87. Marin L, Miguez EM, Villar CJ, Lombo F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int* 2015;2015:905215. doi: 10.1155/2015/905215.
88. Yang P, Xu F, Li HF, Wang Y, Li FC, Shang MY, Liu GX, Wang X, Cai SQ. Detection of 191 Taxifolin Metabolites and Their Distribution in Rats Using HPLC-ESI-IT-TOF-MSn. *Molecules* 2016;21(9). doi: 10.3390/Molecules21091209.
89. Vacek J, Papouskova B, Kosina P, Vrba J, Kren V, Ulrichova J. Biotransformation of flavonols and taxifolin in hepatocyte in vitro systems as determined by liquid chromatography with various stationary phases and electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2012;899:109-15. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.05.009.
90. Pozharitskaya ON, Karlina MV, Shikov AN, Kosman VM, Makarova MN, Makarov VG. Determination and pharmacokinetic study of taxifolin in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography. *Phytomedicine* 2009;16(2-3):244-51. doi: 10.1016/j.phymed.2008.10.002.

91. Zu Y, Wu W, Zhao X, Li Y, Wang W, Zhong C, Zhang Y, Zhao X. Enhancement of solubility, antioxidant ability and bioavailability of taxifolin nanoparticles by liquid antisolvent precipitation technique. *Int J Pharm* 2014;471(1-2):366-76. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.05.049.
92. Altmae S, Martinez-Conejero JA, Esteban FJ, Ruiz-Alonso M, Stavreus-Evers A, Horcajadas JA, Salumets A. MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reprod Sci* 2013;20(3):308-17. doi: 10.1177/1933719112453507.
93. Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW, Huang WC, Sun TH, Tu SJ, Lee WH, Chiew MY, Tai CS, Wei TY, Tsai TR, Huang HT, Wang CY, Wu HY, Ho SY, Chen PR, Chuang CH, Hsieh PJ, Wu YS, Chen WL, Li MJ, Wu YC, Huang XY, Ng FL, Buddhakosai W, Huang PC, Lan KC, Huang CY, Weng SL, Cheng YN, Liang C, Hsu WL, Huang HD. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 2018;46(D1):D296-D302. doi: 10.1093/nar/gkx1067.
94. Nair VS, Maeda LS, Ioannidis JP. Clinical outcome prediction by microRNAs in human cancer: a systematic review. *J Natl Cancer Inst* 2012;104(7):528-40. doi: 10.1093/jnci/djs027.
95. Chou J, Lin JH, Brenot A, Kim JW, Provot S, Werb Z. GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression. *Nat Cell Biol* 2013;15(2):201-13. doi: 10.1038/ncb2672.
96. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *P Natl Acad Sci USA* 2008;105(30):10513-8. doi: 10.1073/pnas.0804549105.
97. Sohail MH. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achiev Life Sci* 2016;10:175-86. doi: 10.1177/1933719112453507.
98. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9(6):654-U72. doi: 10.1038/ncb1596.
99. Wang H, Peng R, Wang JJ, Qin ZL, Xue LX. Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. *Clinical Epigenetics* 2018;10. doi: 10.1186/s13148-018-0492-1.
100. Kirschner MB, Edelman JJ, Kao SC, Vallely MP, van Zandwijk N, Reid G. The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Front Genet* 2013;4:94. doi: 10.3389/fgene.2013.00094.
101. Pekarsky Y, Croce CM. Is miR-29 an Oncogene or Tumor Suppressor in CLL? *Oncotarget* 2010;1(3):224-7. doi: 10.18632/oncotarget.129.
102. Flores-Perez A, Marchat LA, Rodriguez-Cuevas S, Bautista VP, Fuentes-Mera L, Romero-Zamora D, Maciel-Dominguez A, de la Cruz OH, Fonseca-Sanchez M, Ruiz-Garcia E, Astudillo-de la Vega H, Lopez-Camarillo C. Suppression of cell migration is promoted by miR-944 through targeting of SIAH1 and PTP4A1 in breast cancer cells. *Bmc Cancer* 2016;16. doi: 10.1186/S12885-016-2470-3.
103. He HF, Tian W, Chen HL, Jiang K. MiR-944 functions as a novel oncogene and regulates the chemoresistance in breast cancer. *Tumor Biol* 2016;37(2):1599-607. doi: 10.1007/s13277-015-3844-x.
104. Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, Odunsi K, Lele SB, Zhao H. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* 2008;29(10):1963-6. doi: 10.1093/carcin/bgn172.
105. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23(20):4051-60. doi: 10.1038/sj.emboj.7600385.
106. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13(12):1097-101. doi: 10.1038/nsmb1167.
107. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006;125(5):887-901. doi: 10.1016/j.cell.2006.03.043.
108. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425(6956):415-9. doi: 10.1038/nature01957.
109. Kohler A, Hurt E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(10):761-73. doi: 10.1038/nrm2255.
110. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003;17(24):3011-6. doi: 10.1101/gad.1158803.
111. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409(6818):363-6. doi: 10.1038/35053110.

112. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;293(5531):834-8. doi: 10.1126/science.1062961.
113. Kwak PB, Tomari Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* 2012;19(2):145-51. doi: 10.1038/nsmb.2232.
114. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(2):126-39. doi: 10.1038/nrm2632.
115. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003;115(2):199-208. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00759-1.
116. Farazi TA, Juranek SA, Tuschl T. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development* 2008;135(7):1201-14. doi: 10.1242/dev.005629.
117. Parker R, Sheth U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 2007;25(5):635-46. doi: 10.1016/j.molcel.2007.02.011.
118. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 2007;448(7149):83-6. doi: 10.1038/nature05983.
119. Heo I, Ha M, Lim J, Yoon MJ, Park JE, Kwon SC, Chang H, Kim VN. Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs. *Cell* 2012;151(3):521-32. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.022.
120. Yang JS, Maurin T, Robine N, Rasmussen KD, Jeffrey KL, Chandwani R, Papapetrou EP, Sadelain M, O'Carroll D, Lai EC. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(34):15163-8. doi: 10.1073/pnas.1006432107.
121. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(8):509-24. doi: 10.1038/nrm3838.
122. Bayoumi AS, Sayed A, Broskova Z, Teoh JP, Wilson J, Su H, Tang YL, Kim IM. Crosstalk between Long Noncoding RNAs and MicroRNAs in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2016;17(3):356. doi: 10.3390/ijms17030356.
123. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007;318(5858):1931-4. doi: 10.1126/science.1149460.
124. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 2008;40(1):43-50. doi: 10.1038/ng.2007.30.
125. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics* 2012;44(4):237-44. doi: 10.1152/physiolgenomics.00141.2011.
126. Jiang H, Zhang G, Wu JH, Jiang CP. Diverse roles of miR-29 in cancer (review). *Oncol Rep* 2014;31(4):1509-16. doi: 10.3892/or.2014.3036.
127. Xiong Y, Fang JH, Yun JP, Yang J, Zhang Y, Jia WH, Zhuang SM. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010;51(3):836-45. doi: 10.1002/hep.23380.
128. Yan B, Guo Q, Fu FJ, Wang Z, Yin Z, Wei YB, Yang JR. The role of miR-29b in cancer: regulation, function, and signaling. *Onco Targets Ther* 2015;8:539-48. doi: 10.2147/OTT.S75899.
129. Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H. c-Myc Represses Tumor-Suppressive microRNAs, let-7a, miR-16 and miR-29b, and Induces Cyclin D2-Mediated Cell Proliferation in Ewing's Sarcoma Cell Line. *PLoS One* 2015;10(9):e0138560. doi: 10.1371/journal.pone.0138560.
130. Wu DW, Hsu NY, Wang YC, Lee MC, Cheng YW, Chen CY, Lee H. c-Myc suppresses microRNA-29b to promote tumor aggressiveness and poor outcomes in non-small cell lung cancer by targeting FHIT. *Oncogene* 2015;34(16):2072-82. doi: 10.1038/onc.2014.152.
131. Mott JL, Kurita S, Cazanave SC, Bronk SF, Werneburg NW, Fernandez-Zapico ME. Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB. *J Cell Biochem* 2010;110(5):1155-64. doi: 10.1002/jcb.22630.
132. Sampath D, Liu C, Vasani K, Sulda M, Puduvali VK, Wierda WG, Keating MJ. Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119(5):1162-72. doi: 10.1182/blood-2011-05-351510.
133. Zhang X, Chen X, Lin J, Lwin T, Wright G, Moscinski LC, Dalton WS, Seto E, Wright K, Sotomayor E, Tao J. Myc represses miR-15a/miR-16-1 expression through recruitment of HDAC3 in mantle cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Oncogene* 2012;31(24):3002-8. doi: 10.1038/onc.2011.470.
134. Zhang X, Zhao X, Fiskus W, Lin J, Lwin T, Rao R, Zhang Y, Chan JC, Fu K, Marquez VE, Chen-Kiang S, Moscinski LC, Seto E, Dalton WS, Wright KL, Sotomayor E, Bhalla K, Tao J. Coordinated

- silencing of MYC-mediated miR-29 by HDAC3 and EZH2 as a therapeutic target of histone modification in aggressive B-Cell lymphomas. *Cancer Cell* 2012;22(4):506-23. doi: 10.1016/j.ccr.2012.09.003.
135. Eyholzer M, Schmid S, Wilkens L, Mueller BU, Pabst T. The tumour-suppressive miR-29a/b1 cluster is regulated by CEBPA and blocked in human AML. *Brit J Cancer* 2010;103(2):275-84. doi: 10.1038/sj.bjc.6605751.
136. Tan M, Wu JJ, Cai Y. Suppression of Wnt signaling by the miR-29 family is mediated by demethylation of WIF-1 in non-small-cell lung cancer. *Biochem Bioph Res Co* 2013;438(4):673-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.123.
137. Wang H, Garzon R, Sun H, Ladner KJ, Singh R, Dahlman J, Cheng A, Hall BM, Qualman SJ, Chandler DS, Croce CM, Guttridge DC. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* 2008;14(5):369-81. doi: 10.1016/j.ccr.2008.10.006.
138. Sugio A, Iwasaki M, Habata S, Mariya T, Suzuki M, Osogami H, Tamate M, Tanaka R, Saito T. BAG3 upregulates Mcl-1 through downregulation of miR-29b to induce anticancer drug resistance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2014;134(3):615-23. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.06.024.
139. Habata S, Iwasaki M, Sugio A, Suzuki M, Tamate M, Satohisa S, Tanaka R, Saito T. BAG3 increases the invasiveness of uterine corpus carcinoma cells by suppressing miR-29b and enhancing MMP2 expression. *Oncol Rep* 2015;33(5):2613-21. doi: 10.3892/or.2015.3831.
140. Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* 2007;315(5808):97-100. doi: 10.1126/science.1136235.
141. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(40):15805-10. doi: 10.1073/pnas.0707628104.
142. Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Lee AY, Mikami I, Reguart N, Rosell R, McCormick F, Jablons DM. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res* 2004;64(14):4717-20. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1389.
143. Park SY, Lee JH, Ha M, Nam JW, Kim VN. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p53 alpha and CDC42. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16(1):23-9. doi: 10.1038/nsmb.1533.
144. Sudo R, Sato F, Azechi T, Wachi H. MiR-29-mediated elastin down-regulation contributes to inorganic phosphorus-induced osteoblastic differentiation in vascular smooth muscle cells. *Genes Cells* 2015;20(12):1077-87. doi: 10.1111/gtc.12311.
145. Plaisier CL, Pan M, Baliga NS. A miRNA-regulatory network explains how dysregulated miRNAs perturb oncogenic processes across diverse cancers. *Genome Res* 2012;22(11):2302-14. doi: 10.1101/gr.133991.111.
146. Steele R, Mott JL, Ray RB. MBP-1 upregulates miR-29b that represses Mcl-1, collagens, and matrix-metalloproteinase-2 in prostate cancer cells. *Genes Cancer* 2010;1(4):381-7. doi: 10.1177/1947601910371978.
147. Kwon JJ, Factora TD, Dey S, Kota J. A Systematic Review of miR-29 in Cancer. *Mol Ther Oncolytics* 2019;12:173-94. doi: 10.1016/j.omto.2018.12.011.
148. Sonoki H, Sato T, Endo S, Matsunaga T, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Sugatani J, Ikari A. Quercetin Decreases Claudin-2 Expression Mediated by Up-Regulation of microRNA miR-16 in Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *Nutrients* 2015;7(6):4578-92. doi: 10.3390/nu7064578.
149. Lesjak M, Hoque R, Balesaria S, Skinner V, Debnam ES, Srari SK, Sharp PA. Quercetin inhibits intestinal iron absorption and ferroportin transporter expression in vivo and in vitro. *PLoS One* 2014;9(7):e102900. doi: 10.1371/journal.pone.0102900.
150. Ward DM, Kaplan J. Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823(9):1426-33. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.03.004.
151. Shin VY, Chu KM. MiRNA as potential biomarkers and therapeutic targets for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20(30):10432-9. doi: 10.3748/wjg.v20.i30.10432.
152. Feng YH, Tsao CJ. Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomed Rep* 2016;5(4):395-402. doi: 10.3892/br.2016.747.
153. Yang FQ, Liu M, Li W, Che JP, Wang GC, Zheng JH. Combination of quercetin and hyperoside inhibits prostate cancer cell growth and metastasis via regulation of microRNA21. *Mol Med Rep* 2015;11(2):1085-92. doi: 10.3892/mmr.2014.2813.
154. Li W, Liu M, Xu YF, Feng Y, Che JP, Wang GC, Zheng JH. Combination of quercetin and hyperoside has anticancer effects on renal cancer cells through inhibition of oncogenic microRNA-27a. *Oncol Rep* 2014;31(1):117-24. doi: 10.3892/or.2013.2811.

155. Wang P, Phan T, Gordon D, Chung S, Henning SM, Vadgama JV. Arctigenin in combination with quercetin synergistically enhances the antiproliferative effect in prostate cancer cells. *Mol Nutr Food Res* 2015;59(2):250-61. doi: 10.1002/mnfr.201400558.
156. Tofigh R, Tutunchi S, Akhavan S, Panahi G. The effects of Quercetin on miRNA-21 expression in MCF-7 cells. *Arch Med Lab Sci* 2017;3(3):15-20.
157. Pratheeshkumar P, Son YO, Divya SP, Wang L, Turcios L, Roy RV, Hitron JA, Kim D, Dai J, Asha P, Zhang Z, Shi X. Quercetin inhibits Cr(VI)-induced malignant cell transformation by targeting miR-21-PDCD4 signaling pathway. *Oncotarget* 2017;8(32):52118-31. doi: 10.18632/oncotarget.10130.
158. Cao YC, Hu JL, Sui JY, Jiang LM, Cong YK, Ren GQ. Quercetin is able to alleviate TGF $\beta$ -induced fibrosis in renal tubular epithelial cells by suppressing miR-21. *Exp Ther Med* 2018;16(3):2442-8. doi: 10.3892/etm.2018.6489.
159. Del Follo-Martinez A, Banerjee N, Li XR, Safe S, Mertens-Talcott S. Resveratrol and Quercetin in Combination Have Anticancer Activity in Colon Cancer Cells and Repress Oncogenic microRNA-27a. *Nutr Cancer* 2013;65(3):494-504. doi: 10.1080/01635581.2012.725194.
160. MacKenzie TN, Mujumdar N, Banerjee S, Sangwan V, Sarver A, Vickers S, Subramanian S, Saluja AK. Triptolide induces the expression of miR-142-3p: a negative regulator of heat shock protein 70 and pancreatic cancer cell proliferation. *Mol Cancer Ther* 2013;12(7):1266-75. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1231.
161. Zhou J, Gong J, Ding C, Chen G. Quercetin induces the apoptosis of human ovarian carcinoma cells by upregulating the expression of microRNA-145. *Mol Med Rep* 2015;12(2):3127-31. doi: 10.3892/mmr.2015.3679.
162. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(33):12481-6. doi: 10.1073/pnas.0605298103.
163. Li Y, Vandenboom TG, 2nd, Wang Z, Kong D, Ali S, Philip PA, Sarkar FH. miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2010;70(4):1486-95. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2792.
164. Tao SF, He HF, Chen Q. Quercetin inhibits proliferation and invasion acts by up-regulating miR-146a in human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2015;402(1-2):93-100. doi: 10.1007/s11010-014-2317-7.
165. Gao W, Hua J, Jia Z, Ding J, Han Z, Dong Y, Lin Q, Yao Y. Expression of miR-146a-5p in breast cancer and its role in proliferation of breast cancer cells. *Oncol Lett* 2018;15(6):9884-8. doi: 10.3892/ol.2018.8589.
166. Boesch-Saadatmandi C, Loboda A, Wagner AE, Stachurska A, Jozkowicz A, Dulak J, Doring F, Wolffram S, Rimbach G. Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. *J Nutr Biochem* 2011;22(3):293-9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.02.008.
167. Appari M, Babu KR, Kaczorowski A, Gross W, Herr I. Sulforaphane, quercetin and catechins complement each other in elimination of advanced pancreatic cancer by miR-let-7 induction and K-ras inhibition. *Int J Oncol* 2014;45(4):1391-400. doi: 10.3892/ijo.2014.2539.
168. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 MicroRNA family. *Cell* 2005;120(5):635-47. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.014.
169. Nwaeburu CC, Bauer N, Zhao Z, Abukiwan A, Gladkich J, Benner A, Herr I. Up-regulation of microRNA let-7c by quercetin inhibits pancreatic cancer progression by activation of Numbl. *Oncotarget* 2016;7(36):58367-80. doi: 10.18632/oncotarget.11122.
170. Nwaeburu CC, Abukiwan A, Zhao Z, Herr I. Quercetin-induced miR-200b-3p regulates the mode of self-renewing divisions in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2017;16(1):23. doi: 10.1186/s12943-017-0589-8.
171. Wein SA, Laviano A, Wolffram S. Quercetin induces hepatic gamma-glutamyl hydrolase expression in rats by suppressing hepatic microRNA rno-miR-125b-3p. *J Nutr Biochem* 2015;26(12):1660-3. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.010.
172. Shubbar E, Helou K, Kovacs A, Nemes S, Hajizadeh S, Enerback C, Einbeigi Z. High levels of gamma-glutamyl hydrolase (GGH) are associated with poor prognosis and unfavorable clinical outcomes in invasive breast cancer. *BMC Cancer* 2013;13:47. doi: 10.1186/1471-2407-13-47.
173. Milenkovic D, Deval C, Gouranton E, Landrier JF, Scalbert A, Morand C, Mazur A. Modulation of miRNA expression by dietary polyphenols in apoE deficient mice: a new mechanism of the action of polyphenols. *PLoS One* 2012;7(1):e29837. doi: 10.1371/journal.pone.0029837.

174. Garelnabi M, Mahini H. Modulation of microRNA 21, 125 b and 451 expression by quercetin intake and exercise in mice fed atherogenic diet. *Biomed Prev Nutr* 2014;4(3):359-63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2014.04.005>.
175. Boesch-Saadatmandi C, Wagner AE, Wolfram S, Rimbach G. Effect of quercetin on inflammatory gene expression in mice liver in vivo - role of redox factor 1, miRNA-122 and miRNA-125b. *Pharmacol Res* 2012;65(5):523-30. doi: 10.1016/j.phrs.2012.02.007.
176. Lam TK, Shao S, Zhao Y, Marincola F, Pesatori A, Bertazzi PA, Caporaso NE, Wang E, Landi MT. Influence of quercetin-rich food intake on microRNA expression in lung cancer tissues. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21(12):2176-84. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0745.
177. Kang J, Kim E, Kim W, Seong KM, Youn H, Kim JW, Kim J, Youn B. Rhamnetin and cirsiol induce radiosensitization and inhibition of epithelial-mesenchymal transition (EMT) by miR-34a-mediated suppression of Notch-1 expression in non-small cell lung cancer cell lines. *J Biol Chem* 2013;288(38):27343-57. doi: 10.1074/jbc.M113.490482.
178. Lan L, Wang Y, Pan Z, Wang B, Yue Z, Jiang Z, Li L, Wang C, Tang H. Rhamnetin induces apoptosis in human breast cancer cells via the miR-34a/Notch-1 signaling pathway. *Oncol Lett* 2019;17(1):676-82. doi: 10.3892/ol.2018.9575.
179. Jia H, Yang Q, Wang T, Cao Y, Jiang QY, Ma HD, Sun HW, Hou MX, Yang YP, Feng F. Rhamnetin induces sensitization of hepatocellular carcinoma cells to a small molecular kinase inhibitor or chemotherapeutic agents. *Biochim Biophys Acta* 2016;1860(7):1417-30. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.04.007.
180. Du F, Feng Y, Fang J, Yang M. MicroRNA-143 enhances chemosensitivity of Quercetin through autophagy inhibition via target GABARAPL1 in gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2015;74:169-77. doi: 10.1016/j.biopha.2015.08.005.
181. Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol* 2012;83(1):6-15. doi: 10.1016/j.bcp.2011.08.010.
182. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ* 2018;25(1):65-80. doi: 10.1038/cdd.2017.186.
183. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 2008;27 Suppl 1:S2-19. doi: 10.1038/onc.2009.39.
184. Pena-Blanco A, Garcia-Saez AJ. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J* 2018;285(3):416-31. doi: 10.1111/febs.14186.
185. Einsele-Scholz S, Malmsheimer S, Bertram K, Stehle D, Johanning J, Manz M, Daniel PT, Gillissen BF, Schulze-Osthoff K, Essmann F. Bok is a genuine multi-BH-domain protein that triggers apoptosis in the absence of Bax and Bak. *J Cell Sci* 2016;129(11):2213-23. doi: 10.1242/jcs.181727.
186. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis* 2019;10(3):177. doi: 10.1038/s41419-019-1407-6.
187. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging* 2012;4(5):330-49. doi: 10.18632/aging.100459.
188. Campbell KJ, Tait SWG. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol* 2018;8(5):180002. doi: 10.1098/rsob.180002.
189. Thomas S, Quinn BA, Das SK, Dash R, Emdad L, Dasgupta S, Wang XY, Dent P, Reed JC, Pellecchia M, Sarkar D, Fisher PB. Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17(1):61-75. doi: 10.1517/14728222.2013.733001.
190. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
191. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
192. De Blasio A, Vento R, Di Fiore R. Mcl-1 targeting could be an intriguing perspective to cure cancer. *J Cell Physiol* 2018;233(11):8482-98. doi: 10.1002/jcp.26786.
193. Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, Billis K, Cummins C, Gall A, Giron CG, Gil L, Gordon L, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, To JK, Laird MR, Lavidas I, Liu Z, Loveland JE, Maurel T, McLaren W, Moore B, Mudge J, Murphy DN, Newman V, Nuhn M, Ogeh D, Ong CK, Parker A, Patricio M, Riat HS, Schuilenburg H, Sheppard D, Sparrow H, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Walts B, Zadissa A, Frankish A, Hunt SE, Kostadima M, Langridge N, Martin FJ, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Staines DM, Trevanion SJ, Aken BL, Cunningham F, Yates A, Flicek P. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res* 2018;46(D1):D754-D61. doi: 10.1093/nar/gkx1098.
194. Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. Mcl1, a Gene Expressed in Programmed Myeloid Cell-Differentiation, Has Sequence Similarity to Bcl2. *P Natl Acad Sci USA* 1993;90(8):3516-20. doi: 10.1073/pnas.90.8.3516.

195. Singh S, Bora-Singhal N, Kroeger J, Laklai H, Chellappan SP. beta Arrestin-1 and Mcl-1 Modulate Self-Renewal Growth of Cancer Stem-Like Side-Population Cells in Non-Small Cell Lung Cancer. *Plos One* 2013;8(2):e55982. doi: 10.1371/journal.pone.0055982.
196. Rechsteiner M, Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 1996;21(7):267-71. doi: 10.1016/S0968-0004(96)10031-1.
197. Yang-Yen HF. Mcl-1: a highly regulated cell death and survival controller. *J Biomed Sci* 2006;13(2):201-4. doi: 10.1007/s11373-005-9064-4.
198. Booy EP, Henson ES, Gibson SB. Epidermal growth factor regulates Mcl-1 expression through the MAPK-Elk-1 signalling pathway contributing to cell survival in breast cancer. *Oncogene* 2011;30(20):2367-78. doi: 10.1038/onc.2010.616.
199. Le Gouill S, Podar K, Amiot M, Hideshima T, Chauhan D, Ishitsuka K, Kumar S, Raje N, Richardson PG, Harousseau JL, Anderson KC. VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood* 2004;104(9):2886-92. doi: 10.1182/blood-2004-05-1760.
200. Iqbal S, Zhang SM, Driss A, Liu ZR, Kim HRC, Wang YR, Ritenour C, Zhou HE, Kucuk O, Chung LWK, Wu DQ. PDGF Upregulates Mcl-1 Through Activation of beta-Catenin and HIF-1 alpha-Dependent Signaling in Human Prostate Cancer Cells. *Plos One* 2012;7(1):e30764. doi: 10.1371/journal.pone.0030764.
201. Wang JM, Chao JR, Chen WH, Kuo ML, Yen JJY, Yen HFY. The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* 1999;19(9):6195-206. doi: 10.1128/mcb.19.9.6195.
202. Huang HM, Huang CJ, Yen JJY. Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways. *Blood* 2000;96(5):1764-71.
203. Schacter JL, Henson ES, Gibson SB. Estrogen regulation of anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 expression in breast cancer cells. *PLoS One* 2014;9(6):e100364. doi: 10.1371/journal.pone.0100364.
204. Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang SM. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res* 2009;69(3):1135-42. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2886.
205. Mojsa B, Lassot I, Desagher S. Mcl-1 ubiquitination: unique regulation of an essential survival protein. *Cells* 2014;3(2):418-37. doi: 10.3390/cells3020418.
206. Morel C, Carlson SM, White FM, Davis RJ. Mcl-1 Integrates the Opposing Actions of Signaling Pathways That Mediate Survival and Apoptosis. *Mol Cell Biol* 2009;29(14):3845-52. doi: 10.1128/Mcb.00279-09.
207. Schwickart M, Huang X, Lill JR, Liu J, Ferrando R, French DM, Maecker H, O'Rourke K, Bazan F, Eastham-Anderson J, Yue P, Dornan D, Huang DC, Dixit VM. Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 2010;463(7277):103-7. doi: 10.1038/nature08646.
208. Stewart DP, Koss B, Bathina M, Perciavalle RM, Bisanz K, Opferman JT. Ubiquitin-independent degradation of antiapoptotic MCL-1. *Mol Cell Biol* 2010;30(12):3099-110. doi: 10.1128/MCB.01266-09.
209. Bae J, Leo CP, Hsu SY, Hsueh AJ. MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem* 2000;275(33):25255-61. doi: 10.1074/jbc.M909826199.
210. Kim JH, Bae J. MCL-1ES induces MCL-1L-dependent BAX- and BAK-independent mitochondrial apoptosis. *PLoS One* 2013;8(11):e79626. doi: 10.1371/journal.pone.0079626.
211. Kim JH, Sim SH, Ha HJ, Ko JJ, Lee K, Bae J. MCL-1ES, a novel variant of MCL-1, associates with MCL-1L and induces mitochondrial cell death. *FEBS Lett* 2009;583(17):2758-64. doi: 10.1016/j.febslet.2009.08.006.
212. Alberts B, Johnson AD, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 6th edition ed: W. W. Norton & Company; 2014.
213. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813(4):521-31. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.12.019.
214. Garner TP, Reyna DE, Priyadarshi A, Chen HC, Li S, Wu Y, Ganesan YT, Malashkevich VN, Cheng EH, Gavathiotis E. An Autoinhibited Dimeric Form of BAX Regulates the BAX Activation Pathway. *Mol Cell* 2016;64(2):431. doi: 10.1016/j.molcel.2016.10.005.
215. Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, Tu HC, Kim H, Cheng EHY, Tjandra N, Walensky LD. BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 2008;455(7216):1076-U6. doi: 10.1038/nature07396.
216. Czabotar PE, Westphal D, Dewson G, Ma S, Hockings C, Fairlie WD, Lee EF, Yao SG, Robin AY, Smith BJ, Huang DCS, Kluck RM, Adams JM, Colman PM. Bax Crystal Structures Reveal How BH3 Domains Activate Bax and Nucleate Its Oligomerization to Induce Apoptosis. *Cell* 2013;152(3):519-31. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.031.

217. Gavathiotis E, Reyna DE, Davis ML, Bird GH, Walensky LD. BH3-Triggered Structural Reorganization Drives the Activation of Proapoptotic BAX. *Mol Cell* 2010;40(3):481-92. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.019.
218. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000;103(4):645-54. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00167-7.
219. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnoult D, Wang CX, Neutzner A, Tjandra N, Youle RJ. Bcl-x(L) Retrotranslocates Bax from the Mitochondria into the Cytosol. *Cell* 2011;145(1):104-16. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.034.
220. Kushnareva Y, Andreyev AY, Kuwana T, Newmeyer DD. Bax Activation Initiates the Assembly of a Multimeric Catalyst that Facilitates Bax Pore Formation in Mitochondrial Outer Membranes. *Plos Biol* 2012;10(9):e1001394. doi: 10.1371/journal.pbio.1001394.
221. Todt F, Cakir Z, Reichenbach F, Emschermann F, Lauterwasser J, Kaiser A, Ichim G, Tait SW, Frank S, Langer HF, Edlich F. Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. *EMBO J* 2015;34(1):67-80. doi: 10.15252/embj.201488806.
222. Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2009;36(3):487-99. doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.030.
223. Dai H, Smith A, Meng XW, Schneider PA, Pang YP, Kaufmann SH. Transient binding of an activator BH3 domain to the Bak BH3-binding groove initiates Bak oligomerization. *J Cell Biol* 2011;194(1):39-48. doi: 10.1083/jcb.201102027.
224. Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 2003;301(5632):513-7. doi: 10.1126/science.1083995.
225. Vandewalle C, Van Roy F, Berx G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 2009;66(5):773-87. doi: 10.1007/s00018-008-8465-8.
226. Epifanova E, Babaev A, Newman AG, Tarabykin V. Role of Zeb2/Sip1 in neuronal development. *Brain Res* 2019;1705:24-31. doi: 10.1016/j.brainres.2018.09.034.
227. Mowat DR, Croaker GD, Cass DT, Kerr BA, Chaitow J, Ades LC, Chia NL, Wilson MJ. Hirschsprung disease, microcephaly, mental retardation, and characteristic facial features: delineation of a new syndrome and identification of a locus at chromosome 2q22-q23. *J Med Genet* 1998;35(8):617-23. doi: 10.1136/jmg.35.8.617.
228. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, Van Roy F, Berx G. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res* 2005;33(20):6566-78. doi: 10.1093/nar/gki965.
229. Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, Trope CG, Kvalheim G, Goldberg I, Reich R, Davidson B. Snail, slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 2005;103(8):1631-43. doi: 10.1002/cncr.20946.
230. Pichard L, Gillet G, Fabre I, Daletbeluche I, Bonfils C, Thenot JP, Maurel P. Identification of the Rabbit and Human Cytochromes-P-450iii as the Major Enzymes Involved in the N-Demethylation of Diltiazem. *Drug Metab Dispos* 1990;18(5):711-9.
231. Tennant JR. Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. *Transplantation* 1964;2:685-94.
232. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9(7):671-5. doi: 10.1038/nmeth.2089.
233. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-9. doi: 10.1006/abio.1987.9999.
234. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993;15(3):532-4, 6-7.
235. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
236. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
237. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 1985;151(2):369-74.
238. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150(1):76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
239. Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS commun* 1995;3:102-15.



240. Dostál Z. Vliv přírodních látek na expresi mikroRNA v buněčné linii Hep G2 (Master's thesis). Získáno z <http://theses.cz/> (Online 1.11.2018)2013.
241. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, Bravo HC, Davis S, Gatto L, Girke T, Gottardo R, Hahne F, Hansen KD, Irizarry RA, Lawrence M, Love MI, MacDonald J, Obenchain V, Oles AK, Pages H, Reyes A, Shannon P, Smyth GK, Tenenbaum D, Waldron L, Morgan M. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods* 2015;12(2):115-21. doi: 10.1038/nmeth.3252.
242. Yoon JH, Abdelmohsen K, Gorospe M. Functional interactions among microRNAs and long noncoding RNAs. *Semin Cell Dev Biol* 2014;34:9-14. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.05.015.
243. Ribas J, Ni X, Haffner M, Wentzel EA, Salmasi AH, Chowdhury WH, Kudrolli TA, Yegnasubramanian S, Luo J, Rodriguez R, Mendell JT, Lupold SE. miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res* 2009;69(18):7165-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1448.
244. Andree S. MikroRNA miR-29: exprese a biologická aktivita (Disertační práce). Získáno z <http://theses.cz/> (Online 27.11.2018)2018.
245. Gabrielová E. Mechanismy Regulace Expresce Mitochondriálních Proteinů (Disertační práce). Získáno z <http://theses.cz/> (Online 27.11.2018)2010.
246. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B, 3rd, Stockwell BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;149(5):1060-72. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
247. Hirschhorn T, Stockwell BR. The development of the concept of ferroptosis. *Free Radic Biol Med* 2019 133:130-43. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.043.
248. Morciano G, Giorgi C, Balestra D, Marchi S, Perrone D, Pinotti M, Pinton P. Mcl-1 involvement in mitochondrial dynamics is associated with apoptotic cell death. *Mol Biol Cell* 2016;27(1):20-34. doi: 10.1091/mbc.E15-01-0028.
249. Casaburi I, Cesario MG, Dona A, Rizza P, Aquila S, Avena P, Lanzino M, Pellegrino M, Vivacqua A, Tucci P, Morelli C, Ando S, Sisci D. Androgens downregulate miR-21 expression in breast cancer cells underlining the protective role of androgen receptor. *Oncotarget* 2016;7(11):12651-61. doi: 10.18632/oncotarget.7207.
250. Kollinerová S. Změna exprese mikroRNA u pacientů s B-CLL (Diplomová práce). Získáno z <http://theses.cz/> (Online 10.07.2017)2011.
251. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91(4):443-6. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80430-4.
252. Hegedus C, Ozvegy-Laczka C, Apati A, Magocsi M, Nemet K, Orfi L, Keri G, Katona M, Takats Z, Varadi A, Szakacs G, Sarkadi B. Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *Br J Pharmacol* 2009;158(4):1153-64. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00383.x.
253. Sarkar NN. Mifepristone: bioavailability, pharmacokinetics and use-effectiveness. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;101(2):113-20.
254. Teng YN, Dong RQ, Wang BJ, Liu HJ, Jiang ZM, Wei CM, Zhang R, Yuan GY, Liu XY, Guo RC. Determinations of mifepristone and its metabolites and their pharmacokinetics in healthy female Chinese subjects. *Yao Xue Xue Bao* 2011;46(10):1241-5.
255. Weidner LD, Zoghbi SS, Lu S, Shukla S, Ambudkar SV, Pike VW, Mulder J, Gottesman MM, Innis RB, Hall MD. The Inhibitor Ko143 Is Not Specific for ABCG2. *J Pharmacol Exp Ther* 2015;354(3):384-93. doi: 10.1124/jpet.115.225482.
256. Wang YZ, Zhou YJ, Yang ZC, Chen BY, Huang WN, Liu YY, Zhang Y. MiR-204/ZEB2 axis functions as key mediator for MALAT1-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Tumor Biol* 2017;39(7). doi: 10.1177/1010428317690998.
257. Jiang G, Wen L, Deng W, Jian Z, Zheng H. Regulatory role of miR-211-5p in hepatocellular carcinoma metastasis by targeting ZEB2. *Biomed Pharmacother* 2017;90:806-12. doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.081.
258. Ye C, Hu Y, Wang J. MicroRNA-377 targets zinc finger E-box-binding homeobox 2 to inhibit cell proliferation and invasion of cervical cancer. *Oncol Res* 2019;27(2):183-92. doi: 10.3727/096504018X15201124340860.
259. Huang N, Wu Z, Lin L, Zhou M, Wang L, Ma H, Xia J, Bin J, Liao Y, Liao W. MiR-338-3p inhibits epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells by targeting ZEB2 and MACC1/Met/Akt signaling. *Oncotarget* 2015;6(17):15222-34. doi: 10.18632/oncotarget.3835.
260. Bindels S, Mestdagt M, Vandewalle C, Jacobs N, Volders L, Noel A, van Roy F, Berx G, Foidart JM, Gilles C. Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene* 2006;25(36):4975-85. doi: 10.1038/sj.onc.1209511.

261. Jimenez L, Lim J, Burd B, Harris TM, Ow TJ, Kawachi N, Belbin TJ, Angeletti R, Prystowsky MB, Childs G, Segall JE. miR-375 Regulates Invasion-Related Proteins Vimentin and L-Plastin. *Am J Pathol* 2017;187(7):1523-36. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.02.019.
262. Butrym A, Rybka J, Baczynska D, Poreba R, Kuliczkowski K, Mazur G. Clinical response to azacitidine therapy depends on microRNA-29c (miR-29c) expression in older acute myeloid leukemia (AML) patients. *Oncotarget* 2016;7(21):30250-7. doi: 10.18632/oncotarget.7172.
263. Slusarz A, Pulakat L. The two faces of miR-29. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2015;16(7):480-90. doi: 10.2459/JCM.0000000000000246.
264. Kole AJ, Swahari V, Hammond SM, Deshmukh M. miR-29b is activated during neuronal maturation and targets BH3-only genes to restrict apoptosis. *Gene Dev* 2011;25(2):125-30. doi: 10.1101/gad.1975411.
265. He H, Tian W, Chen H, Deng Y. MicroRNA-101 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to doxorubicin-induced apoptosis via targeting Mcl-1. *Mol Med Rep* 2016;13(2):1923-9. doi: 10.3892/mmr.2015.4727.
266. Long J, Ji Z, Jiang K, Wang Z, Meng G. miR-193b Modulates Resistance to Doxorubicin in Human Breast Cancer Cells by Downregulating MCL-1. *Biomed Res Int* 2015;2015:373574. doi: 10.1155/2015/373574.
267. Dvorak Z, Vrzal R, Pavek P, Ulrichova J. An evidence for regulatory cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor in HepG2 cells. *Physiol Res* 2008;57(3):427-35.
268. Lecureur V, Fardel O, Guillouzo A. The antiprogesterin drug RU 486 potentiates doxorubicin cytotoxicity in multidrug resistant cells through inhibition of P-glycoprotein function. *FEBS Lett* 1994;355(2):187-91. doi: 10.1016/0014-5793(94)01186-9.
269. Payen L, Delugin L, Courtois A, Trinquart Y, Guillouzo A, Fardel O. Reversal of MRP-mediated multidrug resistance in human lung cancer cells by the antiprogesterin drug RU486. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258(3):513-8. doi: 10.1006/bbrc.1999.0671.
270. Mlejnek P, Kosztyu P, Dolezel P, Bates SE, Ruzickova E. Reversal of ABCB1 mediated efflux by imatinib and nilotinib in cells expressing various transporter levels. *Chem Biol Interact* 2017;273:171-9. doi: 10.1016/j.cbi.2017.06.012.
271. Battaglia RA, Delic S, Herrmann H, Snider NT. Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Res* 2018;7. doi: 10.12688/f1000research.15967.1.
272. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF-kappaB, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res* 2014;2(9):823-30. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0112.
273. McElwee MK, Song MO, Freedman JH. Copper activation of NF-kappaB signaling in HepG2 cells. *J Mol Biol* 2009;393(5):1013-21. doi: 10.1016/j.jmb.2009.08.077.
274. Gilles C, Polette M, Mestdagt M, Nawrocki-Raby B, Ruggeri P, Birembaut P, Foidart JM. Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2003;63(10):2658-64.
275. Razak S, Afsar T, Ullah A, Almajwal A, Alkholief M, Alshamsan A, Jahan S. Taxifolin, a natural flavonoid interacts with cell cycle regulators causes cell cycle arrest and causes tumor regression by activating Wnt/ beta -catenin signaling pathway. *BMC Cancer* 2018;18(1):1043. doi: 10.1186/s12885-018-4959-4.
276. Manigandan K, Manimaran D, Jayaraj RL, Elangovan N, Dhivya V, Kaphe A. Taxifolin curbs NF-kappaB-mediated Wnt/beta-catenin signaling via up-regulating Nrf2 pathway in experimental colon carcinogenesis. *Biochimie* 2015;119:103-12. doi: 10.1016/j.biochi.2015.10.014.