

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



**MIKRORNA MIR-29:
EXPRESE A BIOLOGICKÁ AKTIVITA**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2018

Soňa Andree

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Soňa Andree

**MIKRORNA MIR-29:
EXPRESE A BIOLOGICKÁ AKTIVITA**

DISERTAČNÍ PRÁCE

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

Obor: Lékařská chemie a biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční a kombinované formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2011 - duben 2018.

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

V Olomouci dne 23. 4. 2018

.....

Mgr. Soňa Andree

Na tomto místě bych ráda vyjádřila svoje poděkování všem lidem, kteří přispěli k realizaci této práce. V první řadě bych chtěla poděkovat mému 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 sepsování disertační práce. Současně bych ráda poděkovala pracovníkům Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP za vytvoření dobrého pracovního prostředí a pomoc při řešení odborných problémů. Zvláště děkuji Ing. Evě Gabrielové, Ph.D, Mgr. Zdeňku Dostálovi a Mgr. Veronice Tomšíčkové, Ph.D. za cennou pomoc a spolupráci při řešení odborných záležitostí.

Část práce byla realizována v rámci studijního pobytu na Univerzitě v Padově v Itálii, tímto bych chtěla poděkovat také Prof. Stefanovi Vassanellimu a kolektivu za vstřícnost a ochotnou pomoc při realizaci tamních experimentů.

Pracovníkům hemato-onkologické kliniky FN Olomouc především Prof. RNDr. Mgr. Marii Jarošové, CSc a RNDr. Martině Divoké, Ph.D. děkuji za spolupráci a za poskytnutí biologických materiálů a klinických dat pacientů.

Mgr. Janě Zapletalové, Dr. z Ústavu lékařské biofyziky děkuji za odbornou pomoc při statistickém vyhodnocení výsledků.

Mgr. Janě Jemelkové z Ústavu imunologie děkuji za pomoci při zpracování expresních plazmidů.

RNDr. Petrovi Doleželovi, CSc. z Ústavu lékařské biologie děkuji za měření buněčného cyklu průtokovou cytometrií.

Práce byla vypracována v rámci řešení projektů 303/09/H048, LF_2012_014, LF_2013_008 a CZ.1.07/2.4.00/17.0015.

Zvláštní dík patří také mé rodině a mému muži Tomášovi za pochopení, trpělivost a podporu při studiu.

Děkuji také mému zaměstnavateli za vstřícnost v průběhu celé distanční formy studia.

SOUHRN

Předkládaná disertační práce se zabývá expresí mikroRNA-29 (miR-29) a její biologickou aktivitou v různých buněčných procesech. Jelikož se jedná o významnou rodinu mikroRNA zapojující se do mnoha důležitých biologických procesů v buňce, lze jejich význam studovat na rozdílných úrovních. Celkový význam studia těchto molekul je v hledání možného využití v léčbě nádorových onemocnění. V této práci jsme se pokusili odhalit vliv miR-29 na průběh chronické myeloidní leukémie (CML). Zjistili jsme, že u pacientů s CML dochází ke snížení exprese rodiny miR-29, kdy v souvislosti s léčbou imatinibem dochází k nárůstu exprese miR-29. Při dosažení remise onemocnění klesá hladina exprese miR-29 k hladině srovnatelné se zdravými buňkami. Ověřením těchto výsledků na K562 buněčné linii bylo zjištěno, že ke změně hladiny exprese rodiny miR-29 dochází pravděpodobně nezávisle na hladině BCR-ABL. Zároveň však nelze považovat K562 buněčnou linii za vhodný model k porovnávání s experimenty na vzorcích pacientů s CML, jelikož se jedná o velice komplexní onemocnění, jehož průběh se výrazně liší mezi jednotlivými pacienty.

Další část disertační práce se týká schopnosti miR-29 ovlivňovat toxicitu xenobiotik. Zjistili jsme, že miR-29b zvyšuje toxicitu etoposidu na buněčné linii HeLa změnou poměru Mcl-1L/Mcl-1S a tento efekt může být spojen s transportem zralé miR-29b do jádra.

Tyto experimenty naznačují slibné využití molekul miR-29 v budoucí léčbě CML ale i jiných nádorových onemocnění.

Klíčová slova: mikroRNA, miR-29, chronická myeloidní leukémie, BCR-ABL, imatinib, etoposid, Mcl-1.

SUMMARY

Dissertation thesis focuses on the expression of microRNA-29 (miR-29) and its biological activity in various cellular processes. Since it is a family of microRNAs involved in many important biological processes in a cell, their value can be studied on different levels. The overall importance of studying these molecules is in the search for possible use in the treatment of cancer. In this work we attempted to reveal the effect of miR-29 on the development of chronic myelogenous leukemia (CML). We found that miR-29 family expression was down-regulated in CML patients when miR-29 expression increased in association with imatinib therapy. Upon remission of the disease, the level of miR-29 expression decreases to a level comparable to healthy cells. Validation of these results on the K562 cell line revealed that alteration in the level of expression of the miR-29 family was probably independent of the BCR-ABL level. At the same time, however, the K562 cell line can not be considered as a suitable model for comparison with experiments on samples of patients with CML, as it is a very complex disease whose development varies considerably between patients.

Another part of the dissertation deals with the ability of miR-29 to affect the toxicity of xenobiotics. We found that miR-29b increases the toxicity of etoposide in HeLa cell line by altering the Mcl-1L / Mcl-1S ratio and this effect may be associated with the transport of mature miR-29b to the nucleus.

These experiments suggest a promising use of miR-29 molecules in future treatments of CML as well as other cancer types.

Keywords: microRNA, miR-29, chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL, imatinib, etoposide, Mcl-1.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| 1. ÚVOD..... | 1 |
| 2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY | 2 |
| 2.1 <i>MikroRNA</i> | 2 |
| 2.1.1 Historie objevu mikroRNA..... | 2 |
| 2.1.2 Definice miRNA | 3 |
| 2.1.3 Biogeneze miRNA..... | 3 |
| 2.2 <i>Rodina miRNA-29</i> | 4 |
| 2.2.1 Regulace exprese miR-29 | 4 |
| 2.2.2 Role miR-29 při normální a maligní krvetvorbě | 7 |
| 2.2.3 Cílové geny rodiny miR-29 | 8 |
| 2.2.3.1 <i>Tcl-1 jako cílový gen miR-29</i> | 9 |
| 2.2.3.2 <i>Mcl-1 jako cílový gen miR-29</i> | 10 |
| 2.2.3.3 <i>DNA methyltransferáza jako cílový gen miR-29</i> | 11 |
| 2.2.4 Role miR-29 v individuálních hematopoetických malignitách | 13 |
| 2.2.4.1 <i>Chronická lymfocytární leukémie (CLL)</i> | 13 |
| 2.2.4.2 <i>Akutní myeloidní leukémie (AML)</i> | 15 |
| 2.2.4.3 <i>Chronická myeloidní leukémie (CML)</i> | 17 |
| 2.2.4.4 <i>Mnohočetný myelom (MM)</i> | 17 |
| 2.2.5 MiR-29 versus další maligní onemocnění | 18 |
| 3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE..... | 20 |
| 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 21 |
| 4.1 <i>Biologický materiál</i> | 21 |
| 4.1.1 Buněčný materiál | 21 |
| 4.1.2 Vzorky pacientů..... | 21 |
| 4.2 <i>Chemikálie, roztoky a přístroje</i> | 24 |
| 4.2.1 Chemikálie | 24 |
| 4.2.2 Roztoky | 28 |

| | |
|---|----|
| 4.2.3 Přístroje..... | 30 |
| 4.2.4 Ostatní materiál..... | 32 |
| 4.3 Použité metody..... | 32 |
| 4.3.1 Kultivace buněk..... | 32 |
| 4.3.1.1 Kultivace buněčné linie HepG2, HeLa, CHO-K1 a 293T..... | 32 |
| 4.3.1.2 Kultivace buněčné linie K562..... | 32 |
| 4.3.2 Stanovení počtu buněk..... | 33 |
| 4.3.3 Transfekce lipofekčními činidly..... | 33 |
| 4.3.3.1 Lipofectamine 2000..... | 33 |
| 4.3.3.2 FuGENE 6..... | 34 |
| 4.3.4 Transfekce nukleofekcí..... | 34 |
| 4.3.5 Transfekce „single-cell“ elektroporace..... | 35 |
| 4.3.6 Stanovení koncentrace bílkovin..... | 35 |
| 4.3.6.1 Metoda dle Bradfordové..... | 35 |
| 4.3.7 Stanovení specifických proteinů elektroforézou..... | 36 |
| 4.3.7.1 Stanovení proteinů - Mcl-1, Bak, aktin, β -tubulin..... | 37 |
| 4.3.8 Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie..... | 37 |
| 4.3.9 Stanovení buněčné viability..... | 38 |
| 4.3.9.1 MTT test..... | 38 |
| 4.3.9.2 xCELLigence systém..... | 39 |
| 4.3.10 Aktivita kaspázy-3..... | 40 |
| 4.3.11 Detekce chemiluminiscence..... | 40 |
| 4.3.12 Fluorescenční mikroskopie..... | 41 |
| 4.3.13 Intoxikace buněk xenobiotiky..... | 41 |
| 4.3.13.1 Etoposid..... | 41 |
| 4.3.13.2 Imatinib..... | 42 |
| 4.3.13.3 Kyselina all-trans retinová (ATRA)..... | 42 |
| 4.3.14 Namnožení, izolace a kontrola plazmidů..... | 42 |
| 4.3.14.1 Transformace <i>E. coli</i> | 42 |
| 4.3.14.2 Inokulace..... | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.14.3 Izolace plazmidů | 43 |
| 4.3.14.4 Restrikční analýza..... | 43 |
| 4.3.14.5 Sekvenace | 45 |
| 4.3.15 Izolace RNA trizolovou metodou a stanovení celkové RNA | 45 |
| 4.3.16 Reverzní transkripce | 45 |
| 4.3.17 Real – time PCR | 46 |
| 4.3.17.1 Hodnocení exprese miRNA | 47 |
| 4.3.18 Stanovení BCR-ABL | 47 |
| 4.3.19 Statistická analýza..... | 47 |
| 5. VÝSLEDKY | 49 |
| 5.1 <i>Expresa miR-29</i> | 49 |
| 5.1.1 Expresa miR-29 u pacientů s CML..... | 50 |
| 5.1.2 Expresa BCR-ABL u pacientů s CML | 54 |
| 5.1.3 Expresa miR-29 u pacientů s CML v souvislosti s BCR-ABL a dalšími parametry..... | 55 |
| 5.2 <i>K562 jako model CML</i> | 58 |
| 5.2.1 Stanovení toxicity imatinibu na K562 buněčné linii | 58 |
| 5.2.2 Stanovení hladiny BCR-ABL na K562 buněčné linii..... | 59 |
| 5.2.3 MiR-29 u K562..... | 60 |
| 5.2.4 Kyselina all-trans retinová | 62 |
| 5.3 <i>Vliv miR-29 na toxicitu etoposidu v HeLa buněčné linii</i> | 64 |
| 5.3.1 MiR-29b zvyšuje toxicitu etoposidu v HeLa buněčné linii | 64 |
| 5.3.2 MiR-29b neovlivňuje buněčný cyklus | 65 |
| 5.3.3 MiR-29 ovlivňuje expresi proteinu Mcl-1 v HeLa buněčné linii | 66 |
| 5.4 <i>Transfekce „single-cell“ elektroporací savčích buněk</i> | 70 |
| 5.4.1 Transfekce „single-cell“ elektroporací expresními plazmidy..... | 70 |
| 5.4.2 Namnožení a následná kontrola plazmidů | 72 |
| 5.4.3 Transfekce plazmidů do jiných buněčných linií alternativními metodami | 74 |
| 6. DISKUSE..... | 75 |

OBSAH

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 6.1 | <i>Expese miR-29</i> | 75 |
| 6.2 | <i>K562 jako model CML</i> | 77 |
| 6.3 | <i>Vliv miR-29 na toxicitu xenobiotik u buněčných linií</i> | 80 |
| 6.4 | <i>Jednobuněčné experimenty</i> | 82 |
| 7. | ZÁVĚRY | 84 |
| 8. | SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI | 85 |
| 9. | LITERATURA | 87 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|--------------|---|
| AML | Akutní myeoloidní leukémie |
| ATRA | Kyselina all-trans retinová |
| BCR | B buněčný receptor |
| BSA | Bovinní sérový albumin |
| CEBPA | CCAAT/enhancer vazebný protein α |
| CLL | Chronická lymfocytární leukémie |
| CML | Chronická myeoloidní leukémie |
| DGCR8 | Digeorge syndrome critical region 8 gene |
| DMSO | Dimethyl sulfoxid |
| DNMT | DNA methyltransferáza |
| DTT | Dithiotreitol |
| EDTA | Ethylendiamin tetraacetic acid |
| FBS | Fetální bovinní sérum |
| HDAC | Histon deacetyláza |
| HSC | Hematopoetická kmenová buňka |
| IFN | Interferon |
| IFNAR | Receptor interferonu |
| MCL | Mantle cell lymphoma - lymfom z pláštěvé zóny |
| Mcl-1 | Myeloid cell leukemia sequence 1 |
| miR-29 | MikroRNA-29 |
| miRNA | MikroRNA |
| MM | Mnohočetný myelom |
| NPM1 | Nukleofosmin |
| PBS | Fosfátový pufr |
| PcG | Polycomb group |
| pRb | Protein retinoblastoma |
| pre-miRNA | Prekurzor miRNA |
| pri-miRNA | Primární transkript miRNA |
| qPCR | Kvantitativní PCR |
| RA | Reporter assay |
| RISC | RNA- induced silencing complex |
| SBE | Smad vazebný element |
| SCF | Faktor kmenových buněk |
| SOCS-1 | Suppressor of cytokine signaling -1 |
| TCL/LEF | T-cell faktor/lymphoid enhancer faktor |
| Tcl-1 | T-cell leukemia oncogene |
| TGF- β | Nádorový růstový faktor β |
| TK | Tyrosin kináza |
| T-PLL | T-buněčná prolymfocytická leukémie |
| UTR | Untranslated region - nepřekládaná oblast |
| WB | Western blot |

1. ÚVOD

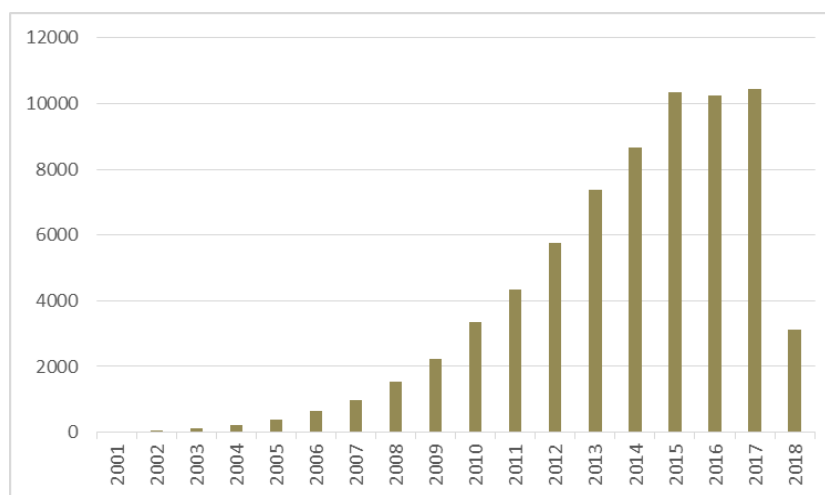
MikroRNA patří mezi jednu z nejrychleji se rozvíjejících oblastí molekulární biologie, kterou se zabývají vědci na celém světě již do roku 1993. Tyto molekuly si zasloužily velikou pozornost díky jejich významným schopnostem ve všech důležitých životních procesech v buňkách. Dnes už nikoho nepřekvapí, že hrají velkou roli při vývoji takřka všech nádorových onemocnění. Rodina miR-29, která se skládá ze tří členů: miR-29a, miR-29b a miR-29c je dnes již známým regulátorem u mnoha hematopoetických malignit ale i jiných nádorových onemocněních. Proto jsme náš výzkum zaměřili na tuto skupinu molekul a hledali jsme její význam u chronické myeloidní leukémie, což je jedna z nejčastěji se vyskytujících leukémií u dospělých pacientů (25%). Ačkoli má dnes léčba imatinibem velmi dobrý efekt, někteří pacienti se stávají vůči imatinibu rezistentní a tak je potřeba hledat nové přístupy léčby tohoto onemocnění. Tím by mohla být miR-29 vzhledem k jejím schopnostem chovat se jako nádorový supresor. Navíc řada studií odhalila možné souvislosti mezi miR-29 a chemoterapeutickou léčbou. Z tohoto důvodu je část této disertační práce zaměřena na sledování vlivu miR-29 na toxicitu etoposidu, což je jedno z chemoterapeutik využívaných při léčbě nádorových onemocnění. Náš výzkum se zaměřil také na hledání cílového genu, který je v tomto případě ovlivňován pomocí miR-29. Neméně důležitá je také část disertační práce zaměřená na novou metodu „single-cell“ elektroporace, která by mohla mít velký význam při studiu miRNA ale i jakýchkoli jiných molekul.

2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

2.1 MikroRNA

2.1.1 Historie objevu mikroRNA

Úplný počátek objevu mikroRNA neboli miRNA se datuje do roku 1993, kdy se laboratoř zabývající se studiem genů podílejících se na regulaci přechodu mezi vývojovými stádii hlístice *C. elegans* (hád'átko obecné), zaměřila na geny *lin-4* a *lin-14*. V laboratoři dospěli k závěru, že gen *lin-4* je dlouhý 22 nukleotidů a nekóduje žádný protein, nýbrž se váže na komplementární vazebné místo v 3'UTR oblasti genu *lin-14*, čímž ho posttranskripčně inhibuje. Tato regulace poté umožňuje přechod do vyššího stádia larvy [1, 2]. Následoval objev 21 nukleotidů dlouhého genu *let-7*, který je zodpovědný za přechod z pozdního stádia larvy na dospělého jedince [3]. *Let-7* byl dále objeven také u řady dalších živočišných druhů [4]. Tento nově objevený endogenní způsob regulace genové exprese se stal velice slibným podnětem zkoumání a odstartoval vlnu výzkumů zabývajících se těmito malými molekulami, které byly později nazvány mikroRNA. Prudký vzestup zájmu o tyto molekuly a jejich důležitost lze dokázat také nárůstem vědeckých publikací v mezinárodní lékařské databázi PubMed v průběhu let (viz Obrázek 1). Dodnes bylo u člověka identifikováno bezmála 1917 miRNA (http://mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa dne 01.04.2018).



Obrázek 1 Počet publikací v databázi PubMed, klíčové slovo miRNA.

2.1.2 Definice miRNA

MiRNA je krátká nekódující jednovláknová molekula RNA, která se skládá z 21-23 nukleotidů. Geny pro miRNA jsou s výjimkou chromozomu Y rozmístěny na všech lidských chromozomech. Přibližně 50% miRNA se nachází ve formě klastrů, které jsou přepisovány jako polycistronní primární transkripty, přičemž miRNA v jednom klastru bývají funkčně spřízněny cílením do stejných nebo různých genů v rámci jedné signální dráhy [5]. Na základě bioinformatických předpovědí se předpokládá, že miRNA mohou regulovat řádově stovky cílových mRNA a mají potenciál regulovat více než polovinu kódujících genů v lidském genomu [6]. Dnes je již všeobecně známo, že se miRNA podílejí na většině důležitých životních procesů v buňce, jako jsou vývoj, proliferace, diferenciace a apoptóza.

2.1.3 Biogeneze miRNA

Biogeneze miRNA je několikakrokový proces, který začíná v jádře buňky a končí v cytoplazmě, kde se váže na cílovou mRNA a ovlivňuje tak biologické procesy v buňce [7]. Geny pro miRNA mají vlastní promotory a jsou přepisovány pomocí RNA polymerázy II (některé studie popisují také účast RNA polymerázy III) do primárních transkriptů – pri-miRNA, která se skládá z terminální smyčky, dvouvláknového kmene a dvou volných jednovláknových konců [8-10]. Pri-miRNA je pomocí mikroprocesorového komplexu skládajícího se z ribonukleázy Drosha a RNA vázajícího proteinu DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8 gene) zvaný také Pasha sestřižena na pre-miRNA. Pre-miRNA má vlásenkovou strukturu, která je dlouhá cca 70 nukleotidů. Pre-miRNA je dále transportována do cytoplazmy pomocí jaderného proteinu Ran-GTP s transportním receptorem Exportinem-5 [9], kde je dále štěpena RNázou III zvanou Dicer na krátké RNA duplexy. RNA duplex se skládá ze dvou vláken, zralé miRNA a k ní komplementární RNA, která je po rozpletení degradována [11]. Zralá miRNA se naváže na protein Ago a vytvoří multiproteinový komplex RISC (RNA- induced silencing complex), který je nezbytný pro rozpoznání a navázání na cílovou mRNA. V závislosti na míře komplementarity miRNA s cílovou mRNA dojde k potlačení translace (neúplná komplementarita) nebo k degradaci cílové mRNA (úplná komplementarita)[12].

2.2 Rodina miRNA-29

Rodina miR-29 se skládá ze tří členů: miR-29a, miR-29b a miR-29c. MiR-29a a miR-29b-1 leží ve stejné oblasti na chromozomu 7 a miR-29b-2 a miR-29c leží ve stejné oblasti na chromozomu 1. MiR-29b-1 a miR-29b-2 mají identickou finální sekvenci zatímco miR-29a a miR-29c se liší v jednom nukleotidu mimo „seed region“, což je oblast, kterou se miRNA připojuje na cílovou mRNA. Každý člen rodiny miRNA je charakterizován stejnou „seed region“ oblastí [13]. Navzdory podobné sekvenci mají členové rodiny miR-29 rozdílné vnitrobuněčné rozmístění. MiR-29a se nachází převážně v cytoplazmě, zatímco miR-29b se hojně vyskytuje v jádře. Za přenos finální miR-29b do jádra je zodpovědná 3' terminální sekvence AGUGUU, kde může hrát roli regulátoru transkripce nebo regulátoru spojování (splicing regulator)[7].

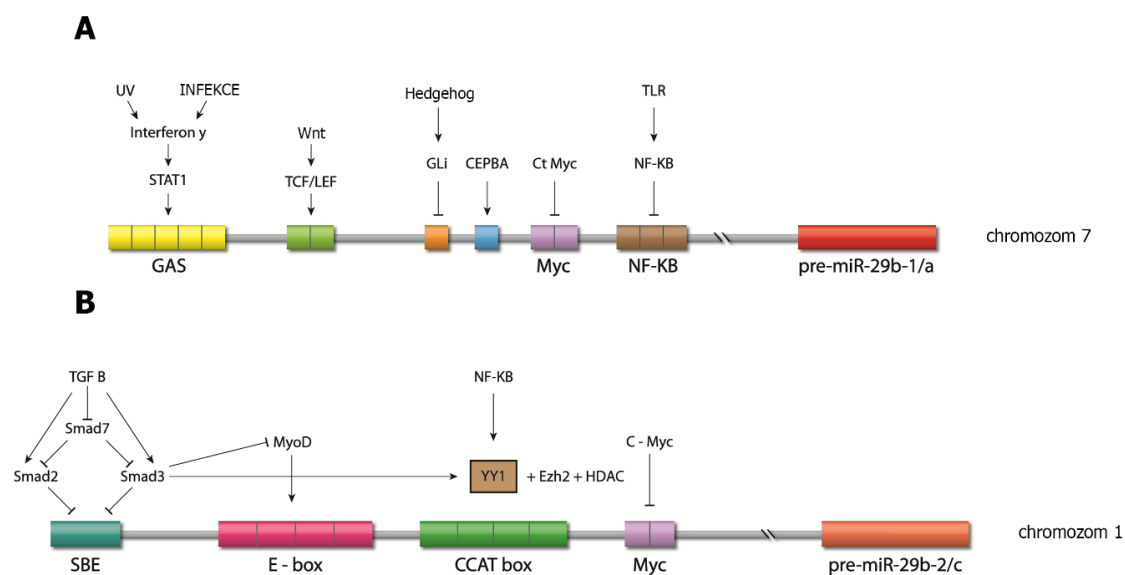
V současné době je známo několik cílových genů, které jsou regulovány pomocí miR-29. Význačné jsou například Tcl-1 (T-cell leukemia oncogene), Mcl-1 (myeloid cell leukemia sequence 1) a DNMT (DNA methyltransferase) 3A a 3B. Mnoho cílových genů pravděpodobně ještě nebylo odhaleno[14-16].

2.2.1 Regulace exprese miR-29

Ačkoli počet studií zabývajících se miRNA v posledních letech enormně roste, většina vědeckého úsilí je zaměřena na identifikaci cílových genů různých miRNA a jen málo prací se zaměřuje na pochopení regulace miRNA. Jako jedni ze zajímavých oblastí vyšetřování regulace miRNA zůstávají promotory a regulační elementy. Na druhé straně, post-transkripční regulace na úrovni primární miRNA, extranukleární transport a další procesy vedoucí k dozrávání miRNA mohou ukázat individuální rozdíly mezi jednotlivými miRNA. U různých typů buněk byl již zjištěn způsob regulačních mechanismů řídících expresi miR-29, základní regulace miR-29 je však stále předmětem debaty.

Existují dva způsoby regulace rodiny miR-29. Jeden je dopadem transkripčních faktorů na promotorovou oblast a druhý je post-transkripční regulace. Rozdíl mezi promotorovou regulací miR-29a/b-1 a miR-29b-2/c klastrů může být odpovědný za nerovnoměrný poměr exprese jednotlivých miR-29a, miR-29b a miR-29c napříč tkáněmi

[17]. Souhrn regulací klastrů miR-29 transkripčními faktory na chromozomech 1 a 7 je zobrazen viz Obrázek 2.



Obrázek 2 Souhrn regulací klastrů miR-29 transkripčními faktory.

Myc je onkogenní transkripční faktor, který je patologicky aktivován u mnoha lidských maligních onemocnění. Vazebné místo pro transkripční faktor Myc bylo nalezeno v promotorové oblasti obou miR-29 klastrů, Myc je tedy schopen negativně regulovat expresi všech členů rodiny miR-29 [18].

V epiteliálních buňkách žlučovodu byla zjištěna negativní regulace promotoru miR-29b-1/a pomocí c-Myc, Hedgehog a NF- κ B. C-Myc se váže na E-box Myc vazebné místo, čímž sníží promotorovou aktivitu o 50%. Regulace Hedgehog cestou je tvořena vazbou na Gli vazebné místo nacházející se v promotorové oblasti miR-29b-1/a. Regulace pomocí NF- κ B probíhá vazbou na NF- κ B vazebné místo, přičemž je aktivován přes TLR signalizaci [19].

Pozitivní regulace promotoru miR-29b-1/a byla zjištěna pomocí CEBPA, TCF/LEF a STAT1. CEBPA neboli CCAAT/enhancer vazebný protein α aktivuje promotor a tím pozitivně reguluje expresi miR-29b u akutní myeloidní leukémie [20]. TCF/LEF neboli T-cell faktor/lymphoid enhancer faktor se váže na dvě vazebná místa uvnitř proximálního promotoru a je nezbytný pro diferenciaci osteoblastů [21]. Promotor miR-29b-1/a obsahuje pět GAS elementů, což je místo, kde se váže transkripční faktor STAT1 [22]. STAT1 je aktivován

interferonem γ , cytokinem tvořícím přirozenou imunitní odpověď a zároveň majícím silnou anti-proliferativní aktivitu v důsledku působení infekce nebo UV zářením [23]. Bylo zjištěno, že interferon γ indukuje STAT1, čímž aktivuje promotor miR-29b-1/a. To vede ke zvýšené expresi miR-29a a miR-29b, zatímco hladina pri-miR-29b-2/c zůstává nedetekovatelná. V tomto případě vede zvýšená exprese miR-29a a miR-29b ke zvýšení exprese CDK6, což způsobí zastavení buněčného cyklu ve fázi G1 u melanomových buněk [24].

Na rozdíl od promotoru miR-29b-1/a se na promotoru miR-29b-2/c nachází čtyři YY1 vazebná místa, která jsou spojována s transkripčními represorovými faktory PcG (Polycomb group) Ezh2 a HDAC1. Tyto výsledky napovídají, že se YY1 a PcG komplex vážou na regulační element a tím způsobují epigenetické potlačení transkripce miR-29b-2/c v progenitorových svalových buňkách [25]. U myoblastů bylo zjištěno, že je YY1 pod pozitivní regulací transkripčního faktoru NF- κ B [26]. Díky tomu bylo potvrzeno, že NF- κ B negativně reguluje expresi miR-29. Nízká aktivita NF- κ B a YY1 ve spojení s vyšší hladinou exprese miR-29 v průběhu diferenciaci kosterních svalových buněk demonstruje roli miR-29 v normální myogenezi [25].

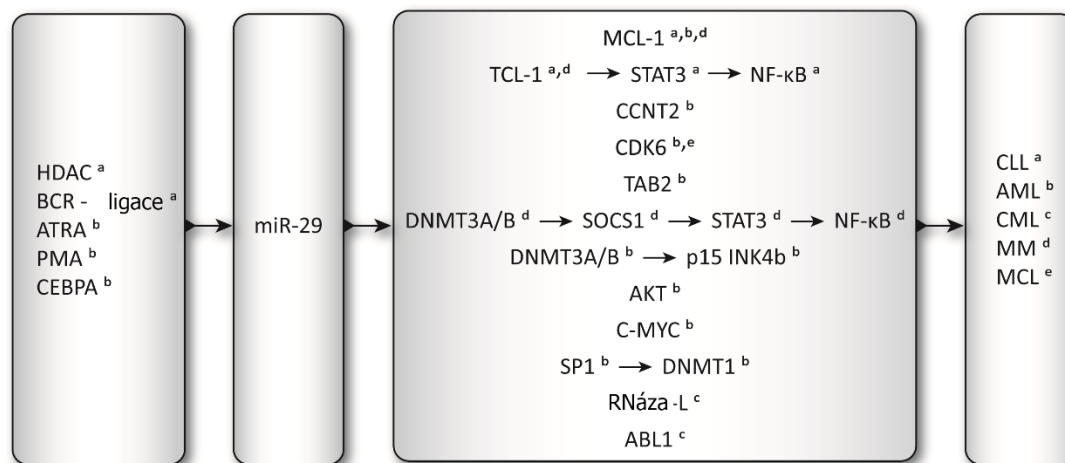
Další nedávno objevený regulátor miR-29 je TGF- β neboli nádorový růstový faktor β [27]. TGF- β je jeden z nejsilnějších fibrogenních cytokinů, který způsobuje trans-diferenciaci myogenních buněk na myofibroblasty a svalovou myogenezi [28]. Navázáním TGF- β na jeho receptor se přenesou signál fosforylací Smad2 a Smad3, které jsou translokovány do jádra, kde regulují expresi různých cílových genů. V případě fibrotických genů se vážou na SBE neboli Smad vazebný element. TGF- β inhibuje také Smad7, což je inhibitor Smad2/3, čímž provádí negativní zpětnou vazbu [29]. Promotorová oblast myší miR-29b-2/c obsahuje čtyři E-boxy - vazebné oblasti pro MyoD. MyoD je transkripční faktor zajišťující diferenciaci kosterních svalových buněk [30]. Byl odhalen nový mechanismus, při kterém Smad3 ovlivňuje vazbu MyoD na E-box a současně vazbu YY1 na CCAT box. TGF- β aktivuje Smad3, který se váže na SBE, čímž zabrání vazbě MyoD na E-box, který leží v těsné blízkosti a umožní vytvoření komplexu YY1, Ezh2 a HDAC1, který inhibuje transkripci miR-29. Pokud není Smad3 aktivován pomocí TGF- β , může MyoD vazbou na E-box spustit transkripci miR-29. Signální cesta TGF- β -Smad3 takto ovlivňuje expresi miR-29 dvěma mechanismy [31].

V HeLa buňkách byla objevena regulace miR-29 na post-transkripční úrovni. Ačkoli jsou oba klastry miR-29b-1/a i miR-29b-2/c transkribovány, každý člen rodiny miR-29 je ve zralé formě exprimován jinak. MiR-29a je detekována ve všech stádiích buněčného cyklu, miR-29b pouze v průběhu mitózy a miR-29c není detekovatelná [7]. Jiný zdroj uvádí jako vysvětlení rychlejší rozpad miR-29c oproti miR-29a [32].

2.2.2 Role miR-29 při normální a maligní krevtvorbě

MiR-29 hrají důležitou roli v životě T a B buněk. Brzlík je nezbytný pro diferenciaci T buněk, proto s jeho zánikem klesá i jejich tvorba. Jeden z mechanismů zániku brzlíku během infekce je prostřednictvím produkce interferonů typu I (IFN α , β) Tyto interferony jsou produkovány v důsledku působení patogenů [33]. Produkce I IFN probíhá přes aktivaci IFN α , β receptorů (IFNAR), které jsou exprimovány téměř všemi typy buněk. Vazbou na IFNAR se aktivuje Jak/Stat dráha, která chrání buňku před infekcí [34]. MiR-29a/b-1 inhibuje produkci IFNAR1, čímž ovlivňuje aktivitu I IFN v epiteliálních buňkách brzlíku [35]. MiR-29a/b-1 má tedy kritickou funkci při tvorbě T buněk a při ochraně před nevhodným zánikem brzlíku [36]. Zrání T buněk může probíhat dvěma cestami buněčnou a humorální. Pro buněčnou cestu je typická silná produkce IFN γ a pro humorální cestu je typická silná produkce IL-4. MiR-29 pravděpodobně potlačuje buněčnou cestu působením na tři geny – IFN γ , T-bet a Eomes, což zvýší expresi T-bet a Eomes, kteří redukuje práh indukce buněčné cesty a zajišťují tak mechanismus zpětné vazby [37]. Vystavením působení vnitrobuněčných bakterií dochází ke snížení exprese miR-29, která potlačuje produkci IFN γ , tudíž se zvýší imunitní odpověď vůči infekci [38].

MiR-29 hrají důležitou roli také v B-buňkách vzhledem k cílovým molekulám miR-29, které se různými způsoby podílejí na signálních cestách B-buněk. Obrázek 3
zobrazuje příklady cílových molekul miR-29, které jsou asociovány s různými maligními poruchami krevtvorby. Proto monitorování těchto faktorů nebo biomarkerů může odkrýt dosud neznámé asociace a souvislosti u hematologických onemocnění.



Obrázek 3 Souhrnný diagram regulace rodiny miR-29 a jejich cílových genů mezi různými hematologickými malignitami. První rámeček ukazuje faktory ovlivňující miR-29 expresi. Třetí rámeček obsahuje dosud známé cílové geny miR-29, které mění procesy v hematologických malignitách uvedených ve čtvrtém rámečku. Horní indexy indikují, které faktory se týkají, kterého onemocnění.

2.2.3 Cílové geny rodiny miR-29

Podle počítačových analýz existuje okolo 6000 cílových genů miR-29 [39]. Nicméně experimentálně bylo ověřeno asi jen 24 z nich viz Tabulka 1. Tyto údaje ukazují, že rodina miR-29 hraje důležitou roli napříč mnoha buněčnými procesy od diferenciace, ovlivňování imunitní odpovědi, vytváření struktur extracelulární matrix, přes buněčnou proliferaci až k apoptóze [39]. Vzhledem k zaměření této disertační práce na hematologické malignity bylo vybráno jen několik cílových genů, které budou podrobněji popsány níže.

Tabulka 1 Seznam cílových genů, které byly validovány třemi metodami – reporter assay (RA), western blot (WB) a kvantitativní PCR (qPCR). Některé geny jsou validovány také technologií mikroarray. Relevantní reference pro každý cílový gen jsou uvedeny ve druhém sloupci. Data byla převzata z miRTarBase [40].

| Cílový gen | Citace | Regulace prostřednictvím rodiny miR-29 | Metoda |
|------------|--------------------------|--|--------------------------|
| COL1A1 | [41-43] | miR-29b | RA, WB, qPCR, microarray |
| SP1 | [42, 44] | miR-29b | RA, WB, qPCR, microarray |
| CDK6 | [16, 45] | miR-29a, miR-29b, miR-29c | RA, WB, qPCR |
| DNMT3A | [46, 47] | miR-29a, miR-29b, miR-29c | RA, WB, qPCR, microarray |
| DNMT3B | [44, 46] | miR-29a, miR-29b, miR-29c | RA, WB, qPCR |
| COL4A1 | [43, 48] | miR-29a, miR-29b | RA, WB, qPCR |
| COL4A2 | [48, 49] | miR-29a | RA, WB, qPCR |
| Mcl-1 | [15, 43, 45, 47, 50, 51] | miR-29a, miR-29b, miR-29c | RA, WB, qPCR, microarray |
| Bcl-2 | [51] | miR-29a, miR-29b, miR-29c | RA, WB, qPCR |
| SFRP2 | [21] | miR-29a | RA, WB, qPCR |
| DKK1 | [21] | miR-29a | RA, WB, qPCR |
| PPM1D | [52] | miR-29a | RA, WB, qPCR, microarray |
| PIK3R1 | [53] | miR-29a | RA, WB, qPCR |
| Tcl-1A | [14, 54] | miR-29b | RA, WB, qPCR, microarray |
| KREMEN2 | [21] | miR-29a | RA, WB, qPCR |
| GRN | [55] | miR-29b | RA, WB, qPCR |
| COL3A1 | [43, 56] | miR-29b | RA, WB, qPCR |
| MMP2 | [43] | miR-29b | RA, WB, qPCR |
| LPL | [57] | miR-29a | RA, WB, qPCR |
| HMGA2 | [58] | miR-29b | RA, WB, qPCR |
| SAPCD2 | [59] | miR-29a | RA, WB, qPCR |
| SPARC | [60, 61] | miR-29a | RA, WB, qPCR, microarray |
| SERPINB9 | [62] | miR-29a | RA, WB, qPCR, microarray |
| BACE1 | [63] | miR-29c | RA, WB, qPCR |

2.2.3.1 *Tcl-1* jako cílový gen *miR-29*

Ve zralých T-buňkách leukémie dochází k častému chromozomálnímu přeskupení v 14q31.2, což je místo cílení *Tcl-1* onkogenu [62]. *Tcl-1* je koaktivátor Akt onkoproteinu, což je kritická molekula v transdukci antiapoptotických signálů v B a T buňkách [64]. Vysoká hladina *Tcl-1* indikuje agresivní formu B-CLL. Zároveň bylo potvrzeno, že vysoká hladina *Tcl-1* koreluje s nemutovaným VH stavem a Zap70 pozitivitou pacientů s agresivní formou B-CLL [65]. V roce 2006 bylo poprvé zjištěno, že *miR-29* a *miR-181* inhibují *Tcl-1* expresi a jejich hladina koreluje s typem B-CLL. Zvýšená exprese *Tcl-1* koreluje s agresivní formou B-

CLL a s agresivní formou B-CLL s delecí 11q chromozomu. Závěr byl takový, že miR-29 a miR-181 reguluje expresi Tcl-1 a zároveň koreluje s typem B-CLL. Vzhledem k tomu, že ani miR-29 ani miR-181 neleží na chromozomu 11, pravděpodobně tato delece ovlivňuje jiný regulátor, který zasahuje do tvorby těchto miRNA [14]. Tato data byla potvrzena také studií, která ukázala, že pacienti s negativní miR-29c exprimují signifikantně vyšší hladinu Tcl-1 než pacienti s miR-29c pozitivitou [66].

2.2.3.2 Mcl-1 jako cílový gen miR-29

Mcl-1 je antiapoptotický protein z rodiny Bcl-2, který obsahuje Bcl-2-homologní doménu BH1-3, která heterodimerizuje se členy rodiny Bcl-2. Mcl-1 je schopen inhibovat proapoptotické proteiny BH3-only Bim, Bid, Bik, Noxa, Puma a Bak. Vazbou Mcl-1 na Bid nebo Bim dochází k ochraně před TRAIL indukovanou buněčnou smrtí [67]. Regulace Mcl-1 je nezbytná, jelikož nedostatek Mcl-1 způsobuje buněčnou smrt a naopak jeho nadměrná exprese může vést k nádorové transformaci [68].

Existují tři známé varianty tohoto proteinu: Mcl-1L (dlouhá varianta), Mcl-1S (krátká varianta) a Mcl-1ES (extrakrátká varianta). Mcl-1L je obecně považován za antiapoptotický protein zatímco Mcl-1S je proapoptotický, jelikož obsahuje BH3-only doménu. Mcl-1L protein interaguje také s jinými proteiny z rodiny Bcl-2, například s proteinem Bak, zatímco protein Mcl-1S interaguje především se svým protějškem a to Mcl-1L [69]. Interakce proteinů Mcl-1L s Mcl-1S byla zjištěna jako důležitá v signálních drahách apoptózy [70].

K predikci miRNA, které regulují Mcl-1, byly využity počítačové programy jako TargetScan, miRANDA, PicTar a miRBase Targets [15, 71]. Všichni členové rodiny miR-29 sdílí prvních 9 nukleotidů s minimálním rozdílem, díky čemuž mohou všichni potenciálně regulovat Mcl-1. Navíc, mezi miR-29b a 3'UTR oblastí Mcl-1 existuje dokonalá komplementarita [15].

V roce 2007 vědci studovali buňky lidských nemaligních a maligních cholangiocyty, protože zjistili, že v maligních buňkách dochází k nárůstu Mcl-1. Zjistili, že miR29b je v nemaligních cholangiocytech vysoce exprimovaná a naopak je snižena exprese miR-29b u maligních buněk, což koresponduje s vysokou expresí Mcl-1 u maligních cholangiocyty. Zvýšení exprese miR-29b v maligních cholangiocytech vede k redukci Mcl-1 a ke zvýšení

citlivosti vůči TRAIL cytotoxicitě. Nemaligní buňky s vysokou expresí miR-29b transfekovali antagonistou miR-29b, čímž došlo ke zvýšení Mcl-1 a tím k redukcí TRAIL buněčné smrti [15].

Monitoring tří lidských myelomových buněčných linií (HMCLs) SKO-007, U266 a XG7 odhalil, že hladina exprese miR-29b je signifikantně nižší ve všech třech buněčných liniích oproti expresi miR-29a a miR-29c. Transfekcí adenovirálním vektorem s miR-29b došlo k nárůstu exprese miR-29b a tím byla dramaticky snížena hladina Mcl-1 proteinu. Inhibice Mcl-1 nebyla způsobena degradací cílové mRNA, jelikož její hladina zůstala nezměněna. Zvýšením exprese miR-29b v HMCLs byl zastaven růst a spuštěna apoptóza indukci přes kaspázu-3. Dále byl odhalen vztah mezi expresí miR-29b, aktivitou IL-6 a expresí Mcl-1 u mnohočetného myelomu (MM). MiR-29b částečně přerušil proces zvýšené exprese Mcl-1 indukující IL-6 a potlačil tím ochrannou funkci IL-6 v MM. Tyto výsledky naznačují, že miR-29b může významně regulovat myeloidní buňky a může mít vliv na progresi mnohočetného myelomu [71].

2.2.3.3 DNA methyltransferáza jako cílový gen miR-29

Methylační změny v epigenomu jsou kontrolovány DNA methyltransferázami (DNMT), které katalyzují přenos methylové skupiny z S-adenosyl methioninu na pátý uhlík cytosinu v kontextu sekvence 5'cytosin-guanosin (CpG) [72]. Promotorové oblasti přibližně 50% lidských genů obsahují oblasti DNA s CpG ostrůvky a jejich hypermethylace zprostředkovává transkripční tlumení genů [73]. U savců byly identifikovány tři DNA methyltransferázy: DNMT1, DNMT3A a DNMT3B. Zatímco DNMT1 přednostně replikuje již existující methylace, DNMT3A a 3B jsou zodpovědné za tvorbu *de novo* methylací a mohou zavést methylové skupiny na mateřský řetězec DNA [74]. Hladiny DNMT mRNA jsou údajně zvýšené v různých malignitách.

Hypermethylace je zodpovědná za tlumení nádorově supresorových genů u plicního karcinomu jako jsou například CDKN2A, CDH13 [75], FHIT, WWOX [76, 77], CDH1 a RASSF1A [78].

Počítačové programy PicTar, TargetScan, miRANDA a miRGen predikovali fascinující komplementaritu členů rodiny miR-29 k 3'UTR oblasti DNMT3A a 3B. Zvýšená exprese

miR-29 indukuje značnou redukci hladin DNMT3A a 3B. Na druhé straně, potlačení miR-29 antisense molekulami indukuje zvýšení hladin DNMT3A a 3B. Navíc mRNA DNMT3B byla více redukována než 3A. To je pravděpodobně způsobeno dokonalejší komplemetaritou miR-29 k 3'UTR DNMT3B než k 3'UTR DNMT3A. Zvýšená exprese miR-29 vede k redukci DNA methylocí a obnově nádorově supresorových genů jako jsou FHIT a WWOX a tím k inhibici tvorby nádorů [46].

Regulace DNA methyltransferáz pomocí miR-29 byla nalezena také u akutní myeloidní leukémie. Zde probíhá hypomethylace cílením miR-29b na DNMT3A a 3B, ale také nepřímo sníženou expresí DNMT1 přes snížení exprese Sp1, což je známý transaktivační faktor DNMT1. Transfekcí a následným zvýšením miR-29b dojde ke globální hypomethylaci a znovu obnovené expresi hypermetylovaných potlačených p15(INK4b) a ESR1 u AML buněčné linie [44]. Znovu obnovená exprese těchto genů koresponduje s klinickou odpovědí pacientů, kterým byl podáván decitabin, což je hypomethylační agens [79]. Proto kombinace inhibitorů DNMT1 (decitabin nebo azacytidin) se syntetickou miR-29b může vyústit v synergický hypomethylační efekt [44].

Stejně výsledky regulace DNMT3A a 3B pomocí miR-29 byly nalezeny také v počátečních buňkách myších embrií. Navíc miR-29b může hrát důležitou roli ve vývoji ženských pohlavních žláz [80].

Snížená exprese miR-29c a hypermethylace genů souvisejících s nádory je také spojována s kožními melanomy. Všechny tři miR-29 měli sníženou expresi ve stádiu III a IV metastáz ve srovnání se stádiem I/II primárních nádorů. MiR-29c je signifikantně snížena u metastatických nádorů. Exprese DNMT3A a 3B byla signifikantně zvýšena ve stádiu III a IV metastáz ve srovnání se stádiem I/II primárních nádorů. Tyto studie ukazují, že miR-29c může být potencionální klinickopatologický biomarker, vhodný pro rozlišení stádií melanomu a jeho snížená hladina exprese může indikovat agresivní formu onemocnění [81].

2.2.4 Role miR-29 v individuálních hematopoetických malignitách

Expres rodiny miR-29 v různých hematopoetických malignitách je shrnuta viz Tabulka 2.

2.2.4.1 Chronická lymfocytární leukémie (CLL)

CLL je nejčastěji se vyskytující leukémie v západním světě. Vyskytuje se ve dvou formách - agresivní a indolentní. Přestože byly prostudovány klinické znaky a genomické abnormality tohoto onemocnění, molekulární mechanismy vývoje nemoci jsou stále neznámé [82]. Mnoho studií se zaměřilo na miR-15a a miR-16-1, jako na důležité regulátory v patogenezi CLL. Obě fungují jako nádorové supresory, jelikož tlumí řadu onkogenů, jako například Bcl-2, Mcl-1, CCND1 a WNT3A, které podporují buněčnou proliferaci, zabraňují apoptóze nádorových buněk a podporují tumorigenicitu [83]. MiR-15a a miR-16-1 leží na 13. chromozomu v oblasti 13q14.3, která je u více než 55% pacientů s CLL deletována. Alelická ztráta v této oblasti koreluje se sníženou hladinou exprese těchto miRNA [84]. Tyto výsledky potvrdila také naše studie, která ukázala, že u pacientů s monoalelickou delecí 13q14.3 byla zjištěna signifikantně vyšší hladina miR-15a než u pacientů s bialelickou delecí. Zároveň byla signifikantně snížena hladina obou miRNA u pacientů s bialelickou delecí 13q14.3 vyskytující se u 77% a buněk a více [85]. Bylo zjištěno, že znovuoobením exprese miR-15a a miR-16-1 dojde ke spuštění apoptózy a potlačení tumorigenicity. Tyto miRNA budou pravděpodobně hrát významnou roli v regulaci apoptózy u CLL [86].

Jak již bylo zmíněno výše Tcl-1 onkogen může být zapojen do patogeneze agresivní formy CLL [14]. Tcl-1 byl první identifikovaný cíl translokace a inverze na 14q32.1 chromozomu, běžné chromozomální aberace v T-buněčné prolymfocytické leukémii (T-PLL) [62]. Tcl-1 je koaktivátor Akt onkoproteinu, který je kritickou molekulou v transdukcii antiapoptotického signálu v B a T buňkách [87]. Bylo zjištěno, že aktivace Tcl-1 způsobí CLL aktivaci NF- κ B cesty a inhibicí AP-1 [88]. Zvýšená hladina exprese miR-29 je spojována s indolentním charakterem CLL, snížená hladina exprese naopak s agresivní formou CLL [89].

Agresivní forma CLL se špatnou prognózou je spojována také s chromozomální aberací zasahující do nádorového supresorového genu TP53, který kóduje protein p53, který je

zapojený v buněčné odpovědi na poškození DNA. Pacienti s delecí nebo mutací genu TP53 mají snížené hladiny několika miRNA, mezi nimiž je i miR-29c [50]. V HeLa buněčné linii byla potvrzena nepřímá aktivace p53 pomocí rodiny miR-29 [53]. Zde se nabízí významná hypotéza o zpětnovazebné smyčce mezi p53 a miR-29c u CLL.

U CLL byla nalezena také epigenetická regulace několika miRNA. Ukázalo se, že histon deacetylázy (HDAC) jsou nadměrně exprimovány v CLL a zprostředkují tak epigenetické potlačení miR-15a, miR-16 a miR-29b. Indukce miR-15a, miR-16 a miR-29b způsobená inhibicí HDAC je spojována se s níženou hladinou exprese antiapoptotického proteinu Mcl-1, se ztrátou mitochondriálních funkcí a s aktivací buněčné smrti [90]. Jedna hypotéza udává, že STAT3, což je aktivátor transkripce, zprostředkovává epigenetické tlumení různých genů, včetně HDAC genů. Tím může STAT3 indukovat epigenetické tlumení různých miRNA v CLL buňkách [91]. Navíc nefosforylovaná forma STAT3 detekovaná ve vysoké míře v CLL buňkách aktivuje transkripční faktor NF- κ B, který je znám jako spouštěč produkce některých prozánětlivých cytokinů a aktivátor buněčného přežití [92].

Jiná studie vyvozuje, že by miRNA mohla regulovat povrchový imunoglobulinový B buněčný receptor (BCR) exprimovaný CLL buňkami. BCR regulující miRNA mohou přispívat k organizaci B buněčné proliferace, apoptóze nebo senzitivitě na BCR signály. Naopak stimulace BCR může měnit exprese miRNA [93]. Mnoho z těchto miRNA, které jsou ovlivněny BCR signalizací v CLL a v normálních B buňkách, jsou současně ty, které mají souvislost s příznivou nebo nepříznivou prognózou CLL. Aktivace přes BCR může redukovat např. hladinu miR-29c, miR-150, miR-181b nebo miR-223 a relativně nízké hladiny těchto miRNA byly nalezeny v CLL buňkách pacientů s krátkým celkovým přežitím [94]. Je známo, že exprese miRNA v CLL jsou ovlivněny abnormální metylací a acetylací jejich promotorové oblasti, což může být důsledek odpovědi na BCR stimulaci. V těchto situacích, využití histon deacetyláz může změnit exprese miRNA a zvýšit citlivost CLL buněk k apoptotickým impulzům [90].

Mantle cell lymphoma (MCL) neboli lymfom z pláštěvé zóny je jednou z neagresivnějších forem B buněčných lymfomů, což je onemocnění biologicky podobné CLL. U těchto pacientů byla zjištěna snížená hladina exprese několika miRNA včetně miR-29 rodiny. Snížená exprese miR-29 je spojována s krátkým celkovým přežitím pacientů s MCL.

MiR-29 zde přímo reguluje CDK6. Zvýšená hladina CDK6, asociovaná s nedostatkem miR-29, spolupracuje s cyklinem D1 podporující progres buněčného cyklu. Snížená exprese miRNA je běžnou událostí v MCL a miR-29 by mohla být cenným prognostickým markrem a patogenetickým faktorem v MCL [16].

2.2.4.2 Akutní myeloidní leukémie (AML)

AML je heterogenní onemocnění charakterizované nekontrolovatelnou proliferací hematopoetických progenitorů a zablokováním myeloidní diferenciací [95]. U AML bylo identifikováno mnoho cytogenetických a molekulárních abnormalit. Molekulární a prognostická klasifikace je založena na specifických chromozomálních translokacích, delecích a amplifikacích (např. t(15; 17), -5q, -7q, +8), na objevených genových mutacích (např. FLT3-ITD, CEBPA, NMP1) a na deregulacích onkogenů (např. ERG, BAALC) [96].

Nedávné studie odhalily deregulace několika miRNA v AML, např. miR-155, miR196a/b nebo miR-181 [97-99]. Ačkoli mnoho studií AML se zaměřilo na rodinu miR-29, hladiny exprese jsou dosti rozdílné. Může to být dáno výraznou heterogenitou tohoto onemocnění, kdy je téměř nemožné porovnávat navzájem rozdílné subtypy této nemoci.

Han a kolektiv ukázali vysokou hladinu exprese miR-29a v lidské AML. Studie byla zaměřena na funkce miR-29a a samoobnovovací kapacitu v hematopoetických progenitorech. Samoobnova je nezbytná vlastnost pro udržení celoživotní hematopoezy. Jelikož je miR-29a vysoce exprimovaná ve většině testovaných AML, může pravděpodobně fungovat také jako onkogen během leukemogeneze. Může se podílet na přeměně myeloidních progenitorů na leukemické kmenové buňky kritické pro vývoj AML [100]. Samoobnova je nalezena v hematopoetických kmenových buňkách (HSC) a také v maligních protějšcích HSC progenitorech lidské AML [101]. Samoobnova je důležitá schopnost získaná normálními progenitory během leukemické transformace a je nezbytná pro založení leukemických kmenových buněk [102].

Protichůdné výsledky byly nalezeny ve studii, která detekovala sníženou expresi miR-29a a miR-142-3p u 52 diagnostikovaných AML pacientů. Tyto výsledky vychází napříč pěti AML klasifikačními subtypy M1, M2, M3, M4 a M5 [103]. Dále byla zjištěna snížená hladina miR-29a u AML vzorků s delecí 7q [104].

Následující studie sledovala vliv miR-29 a miR-142-3p na hematopoezu u AML a demonstrovala pozitivní efekt těchto miRNA na diferenciaci monocytů a granulocytů (myeloidní diferenciaci) a zjistila tři cíle zahrnuté ve vývoji AML. Obě miRNA přímo inhibují cyklin T2 geny, které chrání před uvolněním hypofosforylovaných proteinů retinoblastoma (pRb) a mají za následek indukci diferenciaci monocytů. Dále cílový protein miR-29a – CDK6 a cílový protein miR-142-3p – TGF- β aktivující kinázu 1/MAP3K7, jsou zahrnuty do regulace diferenciaci monocytů a granulocytů. Tato zjištění potvrzují úlohu miR-29a a miR-142-3p v regulaci normální myeloidní diferenciaci a jejich redukce je zapojena do vývoje AML [103].

Jiná studie posiluje názor, že miR-29a a miR-29b v AML buňkách inhibují buněčný růst a indukují apoptózu. Po transfekci těchto miRNA do AML buněk lze pozorovat antiproliferativní efekt po 24 hodinách a apoptotický efekt po 48 hodinách. Tyto výsledky naznačují, že se u miR-29 jedná o nádorově supresorovou aktivitu. Což potvrdila také studie na myších s AML, kde po transfekci syntetickou miR-29b došlo ke zmenšení nádorů nebo úplnému vymizení. Zvýšená exprese miR-29b snížila hladinu antiapoptotického Mcl-1, čímž indukovala apoptózu a utlumila buněčný růst AML buněk [45].

Jedna třetina pacientů s AML má pozitivní mutaci v genu pro nukleofosmin (NPM1), která koreluje se zvýšenou hladinou exprese rodiny miR-29 [105].

U dětských pacientů s nově diagnostikovanou AML byla zjištěna snížená hladina exprese miR-29a. Analýza ukázala, že miR-29a může být prediktor krátkého relapsu onemocnění a celkového přežití nezávisle na cytogenetických abnormalitách. Ukázalo se také, že snížená miR-29a je asociována s klasifikačním subtypem M7 a nepříznivým cytogenetickým riskem [106].

Epigenetický vliv miR-29 na AML byl zjištěn identifikací DNMT jako cílových genů miR-29. U AML bylo zjištěno potlačení nádorově supresorových genů abnormální DNA hypermethyloací [107]. MiR-29b potlačuje přímo DNMT3A a 3B a nepřímo DNMT1 [44].

Jak již bylo zmíněno výše, CEBPA je důležitý transkripční faktor v normální hematopoeze, u AML však bývá často poškozen nebo mutován [108, 109]. Zároveň bylo zjištěno, že CEBPA zprostředkovává expresi miR-29a/b-1. Což vysvětluje sníženou expresi miR-29b u pacientů s AML s poškozeným CEBPA nebo se změnami na chromozomu 7 [20].

Snížená hladina miR-29 rodiny byla zjištěna u AML také v souvislosti se zvýšenou expresí jejich cílových proteinů AKT2, CCND2 a c-Myc. Obnovením exprese miR-29 naopak došlo k opravě abnormální buněčné proliferace, a potlačené apoptóze a zastavení myeloidní diferenciace [110].

2.2.4.3 Chronická myeloidní leukémie (CML)

CML je myeloproliferativní onemocnění, které je charakterizováno translokací mezi chromozomy 9 a 22, známé jako Philadelphský chromozom. To vede ke tvorbě specifického fúzního proteinu – BCR/ABL tyrozin kinázy, která aktivuje mnoho signálních cest vedoucích k proliferaci, redukcii závislosti růstového faktoru a k rezistenci k apoptóze [111]. Jedna studie CML prokázala posttranskripční regulaci RNázy-L rodinou miR-29 přes čtyři cílové oblasti v 3'UTR [112]. RNáza-L je endoribonukleáza, která je konečnou složkou cesty rozpadu RNA regulované interferonem, který má antimikrobiální a nádorově supresorové funkce [113]. Jiné zjištění tvrdí, že RNáza-L hraje novou onkogenní roli. Transfekce K562 CML buněk pomocí miR-29 vedla k redukcii proliferace, zvýšené apoptóze a inhibici tumorogeneze [112].

Jiná studie se zaměřila na efekt exprese miR-29 a BCR/ABL1 u CML. Autoři studie zjistili, že exprese miR-29b je nižší u pacientů s CML ve srovnání se zdravými dobrovolníky. Také zjistili, že miR-29b potlačuje expresi ABL1 a BCR/ABL1 v K562 CML buňkách [114].

2.2.4.4 Mnohočetný myelom (MM)

MM je jeden z nejčastěji se vyskytujících nádorů plazmatických buněk. Patogeneze MM je několikakrokový proces s chromozomálními změnami, genetickými a epigenetickými vlivy během různých stádií onemocnění [115]. Jak jsme zmínili výše v kostní dřeni MM je významně snížena hladina miR-29b. MiR-29 zde má dokonalou komplementaritu s antiapoptotickým Mcl-1. Navíc miR-29b částečně přerušuje proces zvýšené exprese Mcl-1 indukovaný IL-6 a tím potlačuje ochranný efekt IL-6 v myelomových buňkách [71].

Také epigenetika hraje důležitou roli v MM [116]. MiR-29b zde tlumí DNMT3A a 3B a redukuje tím globální DNA metylaci [117]. Epigenetická aktivita miR-29 vede k demethylaci promotoru SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling -1) a hypermethylaci

nádorově supresorových genů. Demetylovaná SOCS-1 je spojována s redukcí STAT3 fosforylace a poškozením NF- κ B aktivity [118].

Tabulka 2 Shrnutí hladiny exprese rodiny miR-29 v různých hematopoetických malignitách.

| Hemato-poetické malignity | miR-29 isoformy | ↓snížená/ ↑zvýšená hladina exprese | Experimenty | Biologický materiál |
|---------------------------|-----------------|---|-----------------|--|
| CLL | c | ↓ | <i>in vivo</i> | normální B buňky [66] |
| | a, b, c | ↑↓ | <i>in vivo</i> | normální B buňky [90] |
| | b | ↓ | <i>in vivo</i> | primární CLL B buňky [91] |
| | c | ↓ | <i>in vivo</i> | CLL B buňky s TP53 [50] |
| AML | a | ↑ | <i>in vivo</i> | mononukleární buňky z normální kostní dřeně [100] |
| | a | ↓ | <i>in vivo</i> | mononukleární buňky z normální periferní krve [103] |
| | a, b, c | ↓ | <i>in vivo</i> | AML pacienti bez t(11q23) [104] |
| | a | ↓ | <i>in vivo</i> | pacienti s normálním karyotypem [45] |
| | a,c | ↑ | <i>in vivo</i> | AML pacienti bez cytoplazmatického nukleofosminu [105] |
| | a | ↓ | <i>in vivo</i> | normální kostní dřeň [106] |
| | b | ↓ | <i>in vivo</i> | normální zralé monocyty a granulocyty [20] |
| | a, b, c | ↓ | <i>in vivo</i> | normální CD34+ buňky [110] |
| CML | b | ↓ | <i>in vitro</i> | K562 buňky [114] |
| MCL | a, b, c | ↓ | <i>in vivo</i> | normální B lymfocyty [16] |
| MM | b | ↓ | <i>in vitro</i> | lidská myelomová buněčná linie [71] |

2.2.5 MiR-29 versus další maligní onemocnění

Jak již bylo zmíněno výše, miR-29 se nepodílí pouze na ovlivnění hematologických nádorů, ale může mít vliv také na celou řadu solidních nádorů.

Jako cílový gen miR-29 byl identifikován například CDK6, což je důležitý regulátor buněčného cyklu. Porušení jeho rovnováhy může vést k buněčné smrti nebo abnormální proliferaci. Například u rakoviny děložního čípku byla zjištěna role miR-29, kde prostřednictvím YY1 a CDK6 omezuje progresi buněčného cyklu a indukuje apoptózu maligních buněk indukovaných HPV virem [119].

MiR-29 hraje důležitou roli také při rozvoji rhabdomyosarkomu. Zde je hladina exprese miR-29 potlačena pomocí NF- κ B a YY1 a přispívá tím rozvoji nemoci. Naopak znovuoobnovení exprese miR-29 u myši vedla k inhibici růstu nádoru a stimulaci diferenciaci [25].

Funkce miR-29 ovlivňovat apoptózu je dána především cílením na mnoho faktorů ovlivňujících apoptózu, např. Mcl-1. Tento způsob regulace byl sledován nejen u AML, ale také u karcinomu žlučových cest nebo u hepatocelulárního karcinomu. U buněk odvozených z karcinomu žlučových cest bylo zjištěno potlačení exprese miR-29. Její zvýšení vedlo k redukcii Mcl-1 a indukci apoptózy zprostředkované přes TRAIL [15]. U hepatocelulárního karcinomu byla také zjištěna snížená hladina exprese miR-29. Zvýšením exprese miR-29 došlo ke ztrátě mitochondriálního potenciálu a tím uvolnění cytochromu c do cytoplazmy, čímž se nastartovala apoptóza mitochondriální cestou zahrnující Mcl-1 a Bcl2 [51].

Schopnost ovlivňovat regulaci extracelulární matrix pomocí miR-29 vede k podpoře migrace nádorových buněk a metastázování. Například u karcinomu nosohltanu může vést k metastázování díky tomu, že potlačuje geny pro tvorbu extracelulární matrix například pro kolageny a laminin gamma1 [60]. U rakoviny děložního hrdla byl zase odhalen cílový gen miR-29c a to EMT (epiteliálně mezenchymální přechod), což je klíčový krok tvorby metastáz [120].

Epigenetická modulace nádorů v souvislosti s miR-29 byla nalezena např. u karcinomu plic, epitheliálního mezoteliomu nebo u kožního melanomu. Cílovými geny v těchto případech jsou DNMT3a a DNMT3b.

U karcinomu žaludku byly miR-29 a miR-21 identifikovány potenciální diagnostické a prognostické biomarkery [121].

Ačkoli u většiny nádorových onemocnění bývá hladina exprese miR-29 potlačena, existují výjimky, kde je jejich hladina exprese naopak zvýšena. Hladina exprese miR-29 je zvýšená například u rakoviny prsu, maligního pohrudničního mezoteliomu a u difuzního velkobuněčného B-lymfomu [122-124].

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Záměrem předkládané disertační práce bylo zjistit, jakým způsobem se rodina miR-29 zapojuje do regulace nádorových onemocnění a to konkrétně u pacientů s chronickou myeloidní leukémií. Dalším cílem bylo odhalit možnou schopnost rodiny miR-29 ovlivňovat toxicitu etoposidu a zjistit jakým mechanismem k tomu může docházet.

Konkrétní cíle byly:

1. Studium hladiny exprese rodiny miR-29 u pacientů s CML.
 - Sledování změn hladiny exprese miR-29 v souvislosti s léčbou imatinibem a hladinou BCR-ABL u pacientů s CML
 - Sledování změn hladiny exprese miR-29 u buněčného modelu CML - K562 buněčné linie (vliv imatinibu a ATRA)

2. Studium vlivu rodiny miR-29 na toxicitu etoposidu v HeLa buněčné linii.
 - Vliv na toxicitu
 - Vliv na buněčný cyklus
 - Vliv na cílové proteiny miR-29 rodiny.

3. Transfekce „single-cell“ elektroporací.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Biologický materiál

4.1.1 Buněčný materiál

HepG2 je lidská buněčná linie odvozená z jaterní tkáně pacienta s hepatocelulárním karcinomem (ECACC No. 85011430).

HeLa je lidská buněčná linie odvozená z karcinomu děložního čípku (ECACC No. 93021013).

CHO-K1 je buněčná linie odvozená z vaječníku křečka čínského (ECACC No. 91091802).

293T je lidská buněčná linie odvozená z ledvin embrya (ATCC CRL-3216).

K562 je suspenzní lidská buněčná linie odvozená z chronické myeloidní leukémie (ECACC No. 85011407).

One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen; kat. č. C4040-06)

4.1.2 Vzorky pacientů

RNA pacientů byly získány z Hemato-onkologické kliniky FN v Olomouci od prof. RNDr. Marie Jarošové, CSc. Vzorky byly odebrány v rámci běžných diagnostických postupů a využity pro výzkumné účely se zachováním anonymity s výhradním informovaným souhlasem pacientů a v souladu se stanoviskem etické komise FN Olomouc. Souhrn pacientů s diagnostickými parametry je uveden viz Tabulka 3.

Jako kontrola byly využity odběry zdravých dobrovolných dárců krve.

Tabulka 3 Klinické parametry sledovaných pacientů s CML; Ž – žena, M – muž, - parametr nestanoven.

| Po hla ví | Věk v době diagnózy | Počet měsíců od diagnózy | Sokalův index | Celkové přežití (rok) | BCR/ABL (%) | Po hla ví | Věk v době diagnózy | Počet měsíců od diagnózy | Sokalův index | Celkové přežití (rok) | BCR/ABL (%) |
|-----------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------|----------------|-----------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------|----------------|
| 1 | Ž | 63 | střední | 2,99 | 65,16 | 7 | M | 66 | střední | 2,61 | 27,27 |
| | | | | | | | | | | | 81,15 |
| | | | | | | | | | | | 0,01 |
| | | | | | | | | | | | - |
| 2 | M | 21 | vysoký | 3,10 | 65,49 | 0 | 8 | 45 | střední | 2,94 | 8,25 |
| | | | | | | | | | | | 39,93 |
| | | | | | | | | | | | 0,3 |
| | | | | | | | | | | | 0,05 |
| 3 | M | 28 | nízký | 2,41 | 67,51 | 0 | 9 | 60 | vysoký | 3,05 | 100 |
| | | | | | | | | | | | 36,48 |
| | | | | | | | | | | | 0,1 |
| | | | | | | | | | | | 0,03 |
| 4 | Ž | 62 | střední | 2,25 | 79,97 | 1 | 10 | 52 | střední | 3,12 | 9,52 |
| | | | | | | | | | | | 47,28 |
| | | | | | | | | | | | 0,24 |
| | | | | | | | | | | | 0,07 |
| 5 | M | 74 | střední | 2,95 | 79,18 | 0 | 11 | 60 | střední | 5,83 | 95,16 |
| | | | | | | | | | | | 47,21 |
| | | | | | | | | | | | 5,33 |
| | | | | | | | | | | | 0,0001 |
| 6 | M | 53 | střední | 2,33 | 81,49 | 0 | 12 | 71 | střední | 2,84 | 41,45 |
| | | | | | | | | | | | 2,63 |
| | | | | | | | | | | | 0,61 |
| | | | | | | | | | | | 0 |
| 7 | M | 66 | střední | 2,61 | 81,36 | 0 | 13 | 37 | nízký | 3,03 | 0 |
| | | | | | | | | | | | 81,36 |
| | | | | | | | | | | | 1,01 |
| | | | | | | | | | | | 1,68 |
| 8 | Ž | 45 | střední | 2,94 | 8,25 | 2 | 14 | 39 | vysoký | 2,95 | 13,5 |
| | | | | | | | | | | | 1,19 |
| | | | | | | | | | | | 0,21 |
| | | | | | | | | | | | 0,01 |
| 9 | M | 60 | vysoký | 3,05 | 100 | 1 | 15 | 61 | vysoký | 2,95 | 36 |
| | | | | | | | | | | | 39,92 |
| | | | | | | | | | | | 23,28 |
| | | | | | | | | | | | 1,74 |
| 10 | Ž | 52 | střední | 3,12 | 101,1 | 4 | 16 | 56 | střední | 1,08 | 9,52 |
| | | | | | | | | | | | 9,52 |
| | | | | | | | | | | | 2,73 |
| | | | | | | | | | | | 0,05 |
| 11 | Ž | 60 | střední | 5,83 | 95,16 | 0 | 17 | 54 | vysoký | 3,19 | 0,03 |
| | | | | | | | | | | | 0,03 |
| | | | | | | | | | | | 0,0001 |
| | | | | | | | | | | | 0,06 |
| 12 | Ž | 71 | střední | 2,84 | 41,45 | 7 | 18 | 53 | nízký | 2,87 | 0,06 |
| | | | | | | | | | | | 0,06 |
| | | | | | | | | | | | 0 |
| | | | | | | | | | | | 0 |
| 13 | Ž | 37 | nízký | 3,03 | 81,49 | 0 | 18 | 53 | nízký | 2,87 | 29,63 |
| | | | | | | | | | | | 29,63 |
| | | | | | | | | | | | - |
| | | | | | | | | | | | - |

4.2 Chemikálie, roztoky a přístroje

4.2.1 Chemikálie

2-Merkaptoetanol, kapal. (Fluka; kat. č. 63700)

2-log DNA Ladder (standard molekulových hmotností DNA) (New England Biolabs; kat. č. N3200S)

Ac-DEVD-AMC (Cayman; kat. č. 169332-61-0)

Ac-DEVD-CHO (Cayman; kat. č. 184179-08-6)

Agar (Sigma Aldrich; kat. č. A 5054)

Agarosa (Bioline; kat. č. BIO-41025)

Akrylamid (Sigma Aldrich; kat. č. A3553)

Amoniak (Sigma Aldrich; kat. č. 7664-41-7)

Ampicilin (Sigma Aldrich; kat. č. A1593)

Bromfenolová modř, prášek (Sigma Aldrich; kat. č. B 0126)

BSA (Bovinní sérový albumin) prášek (Sigma Aldrich; kat. č. A 9647)

BSA 100x roztok pro restrikční reakce (New England Biolabs; kat. č. B9001S)

Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza Cologne AG; kat. č. VCA-1003)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva; k. č. 35051)

Dihydrogenfosforečnan draselný (p.a.) (Lach-Ner, s.r.o.; kat. č. 30016-AP0)

Dithiotreitol (DTT) (Sigma Aldrich; kat. č. 3483-12-3)

DMSO (Dimethyl sulfoxid) kapal. (Sigma Aldrich; kat. č. D 8418)

Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem (DMEM) (Sigma Aldrich; kat. č. D5546)

EDTA (p.a.) (Ethylenediamine tetraacetic acid) (Serva; kat. č. 11278)

Etanol 96% (p.a.) (Lach-Ner; s.r.o.; kat. č. 20025-A96)

Etoposid (Sigma Aldrich; kat. č. 33419-42)

Ethidium bromid, prášek (Sigma Aldrich; kat. č. E 7637)

F-12 Ham médium (Sigma Aldrich; kat. č. N4888)

Fetální bovinní sérum (FBS) tepelně inaktivované (Gibco Invitrogen; kat. č. 10500-064)

FuGENE 6 Transfection Reagent (Promega; kat. č. E2691)

GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotum; kat. č. 41003)

- Glutamin (Sigma Aldrich; kat. č. G3126)
- Glycerol, kapal. (Sigma Aldrich; kat. č. G 5516)
- Glycin (p.a.) (Lach-Ner, s.r.o.; kat. č. 40059-AP0)
- HEPES (Sigma Aldrich; kat. č. H3375)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner; s.r.o.; kat. č. 30061-AP0)
- Chlorid draselný (p.a.) (Lach-Ner; s.r.o.; kat. č. 30076-AP0)
- Chlorid sodný (p.a.) (Lach-Ner; s.r.o.; kat. č. 30093-AP0)
- Chloroform (Sigma Aldrich; kat. č. 611778)
- Imatinib (Sigma Aldrich; kat. č. 022173)
- Isopropanol (Lach-Ner; s.r.o.; kat. č. 30470)
- Kyselina all -trans retinová (Sigma Aldrich; kat. č. R2625)
- Kyselina chlorovodíková 37% (Lach-Ner; s.r.o.; kat. č. 10033-A35)
- Kyselina octová 99,8% (Lach-Ner; s.r.o.; kat. č. 10047-A9B)
- Lipofectamine 2000 (ThermoFisher; kat. č. 11668027)
- Luciferin (Sigma Aldrich; kat. č. L9504)
- Methanol (p.a.) (Lach-Ner; s.r.o.; kat. č. 20038-AT0)
- microRNA Expression Vector:
- miR-29a (OriGene; kat. č. SC400309)
 - miR-29b (OriGene; kat. č. SC400311)
 - miR-29c (OriGene; kat. č. SC400312)
 - pCMV (OriGene; kat. č. PCVMIR)
- Minimální esenciální médium (MEM) (Sigma Aldrich; kat. č. M2279)
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) (ThermoFisher; kat. č. M6494)
- NEBuffer 2 (New England Biolabs; kat. č. B7002S)
- NEBuffer 3 (New England Biolabs; kat. č. B7003S)
- NEBuffer 4 (New England Biolabs; kat. č. B7004S)
- NEBuffer EcoRI (New England Biolabs; kat. č. B0101S)
- Neesenciální aminokyseliny (NEAA) (Caygen; kat. č. NEAA-10201-100)
- N,N'-metylenbisakrylamid (Sigma Aldrich; kat. č. 294381)

Nuclease-free Water (ThermoFisher; kat. č. AM9914G)

Octan sodný anhydrát, prášek (Sigma Aldrich; kat. č. S 2889)

Opti-MEM I Reduced Serum Media (ThermoFisher; kat. č. 31985062)

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas; kat. č. SM1811)

Penicillin-Streptomycin (100 x) (Sigma Aldrich; kat. č. P0781)

Peptone Bacteriological (OXOID Ltd; kat. č. LP0034)

Plazmid RARE-luc (dar od dr. Patricka Balaguera – Universita Montpellier)

pmaxGFP vektor (0,5 µg/µl) (součástí kitů Cell Line Nucleofector Kit; Lonza Cologne AG)

Ponceau S (Sigma Aldrich; kat.č. 6226-79-5)

Pre-miRNA:

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

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

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

pre-miR negative control (ThermoFisher; kat. č. 17100)

Propidium jodid (Sigma Aldrich; kat. č. P4170)

Proteasový inhibitor Complete™ (Roche; kat. č. 11836153001)

Protilátky:

aktin (Santa Cruz; kat. č. sc-47778)

β-tubulin (Abcam; kat.č. ab6046)

Bak (Abcam; kat. č. ab32371)

Mcl-1 (Santa Cruz; kat.č . sc-12756)

sekundární kozi protilátka (Sigma Aldrich; kat. č. A5420-1)

sekundární králičí protilátka (Sigma Aldrich; kat. č. A0545)

sekundární myší protilátka (Sigma Aldrich; kat.č. A9917)

QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN; kat. č. 12143)

RPMI-1640 Medium (Sigma Aldrich; kat. č. R0883)

Reporter Lysis 5x Buffer (Promega; kat. č. E3971)

Restrikční enzymy (New England Biolabs):

ApaI (50 000 units/ml) (kat. č. R0114L)

AvaII (10 000 units/ml) (kat. č. R0152L)

- DraI (10 000 units/ml) (kat. č. R0129L)
- EcoRV (20 000 units/ml) (kat. č. R0195L)
- PstI (20 000 units/ml) (kat. č. R0140L)
- SacI (20 000 units/ml) (kat. č. R0156S)
- StuI (10 000 units/ml) (kat. č. R0187S)
- Ribonukleáza A (Sigma Aldrich; kat. č. 9001-99-4)
- S.O.C. Médium (Invitrogen; kat. č. 15544-034)
- Sacharosa (p.a.) (Lach-Ner; s.r.o.; kat. č. 40135-AP0)
- SDS (Dodecylsulfát sodný) (Merck; kat. č. 1137602500)
- Sušené mléko Laktino (1,3 % tuku) od firmy PML (ČR)
- TaqMan® MicroRNA Transcription Kit (Applied Biosystems; 4366596)
- TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems; 436434)
- TaqMan MicroRNA assays
- hsa-miR-29a (ThermoFisher; kat. č. 4427975)
 - hsa-miR-29b (ThermoFisher; kat. č. 4427975)
 - hsa-miR-29c (ThermoFisher; kat. č. 4427975)
 - RNU6B (ThermoFisher; kat. č. 4427975)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine) (Serva; kat. č. 35930)
- Tris – Trizma base (Sigma Aldrich; kat. č. T 6066)
- 10 × Tris-glycin pufr (Bio-Rad; kat.č. 1610734)
- Tris-HCl – Trizma hydrochloride (Sigma Aldrich; kat. č. T 5941)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich; kat.č. 9002-93-1)
- TriZOL Reagent (Invitrogen; kat. č. 15596018)
- Trypanová modř (0,4% roztok) pro tkáňové kultury (Sigma Aldrich; kat. č. T8154)
- Trypsin-EDTA (1 x) (PAA; kat. č. L11-660)
- Tween 20 (Bio Basic Inc.; kat. č. T897629)
- Hydrogenuhličitan sodný (p.a.) (Lach-Ner; s.r.o.; kat. č. 30067-AP0)
- Vývojka na filmy G150 koncentrát (10 x) (AGFA; kat. č. G150)
- Western blotting luminol činidlo A a B pro chemiluminiscenční detekci HRP (Santa Cruz; SC-2048)

Pro práci s buněčnými kulturami byly použity kyslík a oxid uhličitý od firmy Linde Technoplyn (ČR).

Ostatní chemikálie stupně čistoty p.a. byly zakoupeny od firmy Pliva-Lachema (ČR).

4.2.2 Roztoky

Zásobní roztok fosfátového pufru (PBS)

10 × PBS: NaCl (0,137 mol·l⁻¹), KCl (0,00268 mol·l⁻¹), Na₂HPO₄ (0,00896 mol·l⁻¹), KH₂PO₄ (0,00147 mol·l⁻¹), pro experimenty byl zásobní roztok 10× zředěn.

Roztoky pro SDS-PAGE a Western blot

Lyzační pufr: Tris (20 mmol·l⁻¹), EGTA (5 mmol·l⁻¹), NaCl (150 mmol·l⁻¹), glycerolfosfát (20 mmol·l⁻¹), Na₃VO₄ (1 mmol·l⁻¹), NaF (1 mmol·l⁻¹), Triton X-100 (1%, v/v), Tween 20 (0,1%, v/v), inhibitor proteas CompleteTM (1 tableta v 50 ml), pH 7,5.

Migrační pufr: Tris/HCl (1,5 mol·l⁻¹), pH 8,8.

Migrační gel: 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 %); 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% amonium persulfát (1 %), tetramethylethyldiamin (0,1 %).

Zaostřovací pufr: Tris (0,5 mmol·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 mmol·l⁻¹), glycin (0,192 mol·l⁻¹), metanol (20%, v/v), SDS (0,1%, m/v), pH 8,3.

TBS (tris-buffered saline): Tris (0,1 mol·l⁻¹), NaCl (0,137 mol·l⁻¹), pH 7,6.

TBS/T: Tween 20 (0,05%, v/v) v TBS.

TBS/T/mléko: Tween 20 (0,05%, v/v), sušené mléko (5%, m/v) v TBS.

TBS/T/BSA: Tween 20 (0,05%, v/v), BSA (5%, m/v) v TBS.

Vzorkový pufr: Tris ($0,125 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 6,8; SDS (4%, m/v), glycerol (20%, v/v), DTT ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), bromfenolová modř (0,02%, 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-merkaptoetanol ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 6,7.

Roztoky pro stanovení aktivity kaspázy-3

Lyzační pufr: HEPES ($0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,4; Triton X-100 (0,5 %, v/v), inhibitor proteas CompleteTM (1 tableta v 50 ml), DTT ($0,005 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Reakční pufr: HEPES ($0,02 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,1; EDTA ($0,002 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), inhibitor proteas CompleteTM (1 tableta v 50 ml), DTT ($0,005 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Zásobní roztok substrátu pro kaspázu-3: $0,010 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ac-DEVD-AMC v DMSO

Zásobní roztok inhibitoru pro kaspázu-3: $0,002 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ac-DEVD-CHO v DMSO

Reakční směs se substrátem: 995 μl vzorkového pufru a 5 μl substrátu ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Ac-DEVD-AMC v DMSO)

Reakční směs s inhibitorem: 995 μl vzorkového pufru, 5 μl substrátu (výsledná koncentrace $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 0,5 μl inhibitoru (výsledná koncentrace $0,001 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Roztok pro stanovení chemiluminiscence

Luciferazový pufr: 40 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM MgSO_4 ; 0,5 mM EDTA; 0,5 mM ATP; 10 mM DTT; 0,5 mM koenzym A; 0,5 mM luciferin.

Roztoky pro stanovení bílkovin

Pracovní roztok pro stanovení dle Bradfordové: 0,01% (m/v) Coomassie Brilliantová modř v 50 ml 95% etanolu a 100 ml 85% H_3PO_4 doplněno do 1000 ml vodou.

Standardy bovinního sérového albuminu o koncentraci 0 - 2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Roztoky pro agarosovou elektroforézu

50x TAE pufr: 1,5 M Tris-HCl, 1 mM kyselina octová, 0,1 M EDTA, pH 8

Elektrodový pufr: 1 l TAE pufr, 50 μl 2 mM ethidium bromid

10x nanášecí pufr: 50% glycerol, 0,2 M EDTA, pH 9,3, 0,05% (w/v) bromfenolová modř

Izolace plazmidové DNA

Eluční TE pufr: 10 mM Tris-HCL, pH 8, 1 mM EDTA

Roztoky pro izolaci a kultivaci buněk

Buněčná linie HeLa:

Kultivační médium: MEM Eagle Médium, penicilin ($100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$), streptomycin ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), L-glutamin ($2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), FBS (10 %, v/v).

Buněčná linie HepG2 a 293T:

Kultivační médium: DMEM, penicilin ($100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$), streptomycin ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), FBS (10 %, v/v), NEAA.

Buněčná linie CHO-K1:

Kultivační médium: F-12 Ham, penicilin ($100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$), streptomycin ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), FBS (10 %, v/v).

Buněčná linie K562:

Kultivační médium: RPMI 1640, penicilin ($100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$), streptomycin ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), L-glutamin ($2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), FBS (10 %, v/v).

E. coli:

LB-agar: 1% pepton, 0,5% yeast extract, 1% NaCl, 1,5% agar

LB-médium: 1% pepton, 0,5% yeast extract, 1% NaCl

4.2.3 Přístroje

Centrifuga Labofuge 400 (Heraeus, Německo)

Centrifugy MiniSpin® (Eppendorf, Německo)

Fluorometr Flouorolog 322 (Spex-Jobin-Yvon-Horiba)

Fotometr pro měření absorbance v 96-jamkových deskách Sunrise Remote (Tecan, Švýcarsko)

Chlazená centrifuga Mikro 22 (Hettrich Zentrifugen, Německo)

Chlazená centrifuga Rotina 38R (Hettrich Zentrifugen, Německo)

Chlazená centrifuga Z 323 K (Hermle Labortechnik, Německo)

Inkubátor Cellstar (Queue System, USA)

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

- Laminární box CLF (Schoeller Instruments, ČR)
- Laminární box pro RT-PCR (BioAir Instruments, ČR)
- LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Švýcarsko)
- Luminometr FB 12 pro měření chemiluminiscence (Berthold Detection System, Německo)
- Magnetická míchačka IKA RH basic KT/C (Slabo, ČR)
- Mikroskop CK40 (Olympus, Japonsko)
- Nanospektrofotometr P-Class P300 (Implen, Německo)
- Nucleofector® II Device Lonza (Cologne AG, Německo)
- Osciloskop Agilent 54641A 350 MHz (Agilent Technologies, USA)
- pH-metr inoLab Level 1 (Schoeller Instruments, ČR) s elektrodou SenTix41 (WTW, Německo)
- Průtokový cytometr Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, USA)
- Systém pro elektroforézu Mini-Protean® 3 Cell se zdrojem PowerPac 200, PowerPac 3000 nebo PowerPac universal (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Tank elektroforetický horizontální s nalévací vaničkou (OWL)
- Termocykler MiniOpticon™ (BioRad, ČR)
- Termomixer Comfort (Eppendorf, Německo)
- Třepačka Duomax 1030 (Heidolph, Německo)
- Třepačka OLS 200 (Grant Instruments, Velká Británie)
- Třepačka Reax top (Heidolph, Německo)
- UV-VIS spektrofotometr UV-2401PC (Shimadzu, Japonsko)
- Váhy AX105 DeltaRange® (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- Vlnový generátor Agilent 33250A 80 MHz (Agilent Technologies, USA)
- xCELLigence systém RTCA DP (Roche, Švýcarsko)
- Zařízení pro přípravu deionizované vody Ultrapur (Watrex, ČR)
- Zdroj napěťový a proudový BioRad Power Pac 300 (pro agarosovou elektroforézu) (Bio-Rad, USA)

4.2.4 Ostatní materiál

E-Plate VIEW 16 – desky pro xCELLingence systém (Bio-Tech, ČR)

Fotografický film *Kodak X-Omat AR Film XAR5*, fotografická vývojka a ustalovač *Kodak GBX* (Eastman Kodak, USA).

Kultivační láhve *NunclonTM*, kultivační desky, filtry a centrifugační zkuševky (Nunc, Dánsko).

Plastové injekční stříkačky (B. Braun, Německo)

Plastové mikrozkuševky (Eppendorf, Německo)

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

Silikonový mikročip pro „single-cell“ elektroporaci (ITC-irst, Italy)

Sterilizační filtry 0,22 μm *Millex[®]-GS* (Millipore, USA).

4.3 Použité metody

4.3.1 Kultivace buněk

4.3.1.1 Kultivace buněčné linie HepG2, HeLa, CHO-K1 a 293T

Buňky byly uchovávány v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Médium bylo vyměněno každých 24 - 72 hodin. Po dosažení přibližně 80% konfluency, byly buňky pasážovány trypsinizací. Buňky byly opláchnuty sterilním PBS (10 ml), uvolněny inkubací s 0,25% roztoku trypsinu s EDTA (1 ml; 2 - 3 min.; 37 °C) a resuspendovány v 10 ml kultivačního média. Následně byly buňky spočítány trypanovou modří s využitím Bürkerovy komůrky a použity do pokusů.

4.3.1.2 Kultivace buněčné linie K562

Buňky byly uchovávány v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Médium bylo vyměněno každých 24 - 72 hodin. Jelikož se jedná o suspenzní buněčnou linii, byly buňky pasážovány bez trypsinizace. Následně byly buňky spočítány po aplikaci trypanové modří a s využitím Bürkerovy komůrky a použity do pokusů.

4.3.2 Stanovení počtu buněk

10 μ l buněčné suspenze bylo smícháno s 90 μ l trypanové modři, směs byla nanesena do Bürkerovy komůrky (10 μ l) překryté krycím sklíčkem. Buňky byly počítány pod světelným mikroskopem. Koncentrace živých buněk byla vypočtena dle vztahu:

$$\text{Počet buněk / ml} = \text{počet buněk v } 0,1 \mu\text{l} \times 10\,000 \times \text{ředění}$$

4.3.3 Transfekce lipofekčními činidly

Jedná se o směs lipidů a dalších komponent (v 80% etanolu), která vytváří komplexy s DNA nebo RNA a transportují je do savčích buněk. Pro účinnou transfekci je potřeba, aby buňky byly v dobré kondici, tedy bez kontaminací například mykoplasma a nejlépe v růstové lag fázi. Během transfekce se nedoporučuje přidávat antibiotika, protože vyvolávají buněčnou smrt.

4.3.3.1 Lipofectamine 2000

Buňky byly před transfekcí vysety do konfluency přibližně 80 %. Po 24 hodinové stabilizaci byla provedena transfekce viz Tabulka 4. Ve sterilní zkumavce bylo smícháno odpovídající množství Opti-MEM média s odpovídajícím množstvím Lipofectamine reagentu, ve druhé zkumavce bylo smícháno odpovídající množství Opti-MEM média s odpovídajícím množstvím příslušného plazmidu nebo pre-miRNA. Směs Opti-MEMu s transfekčním činidlem byla přepipetována do zkumavky s Opti-MEMem a plazmidem nebo pre-miRNA, krátce promíchána a inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Mezitím bylo na vyseté stabilizované buňky napipetováno příslušné množství zahřátého média bez séra a antibiotik. Po inkubaci byl všechn objem napipetován do přichystaných jamek. Po 24 hodinách byla provedena výměna média za médium se sérem a antibiotiky.

Tabulka 4 Rozpis složek pro transfekci Lipofectaminem 2000.

| | 96 j. (triplikát) | 24 j. (duplikát) | 6 j. (jedna jamka) |
|---|---------------------|-------------------|--------------------|
| Adherentní buňky | 2×10^4 | 7×10^4 | $0,45 \times 10^6$ |
| Opti-MEM Medium (μ l) | 25 | 50 | 150 |
| Lipofectamine reagent (μ l) | 1 | 2 | 6 |
| Opti-MEM Medium (μ l) | 125 | 250 | 700 |
| DNA/pre-miRNA | 2,5 μ g/125pmol | 5 μ g/200pmol | 14 μ g/560pmol |
| DNA-lipid komplex na jamku (μ l) | 10 | 50 | 250 |
| Finální koncentrace na jamku DNA/pre-miRNA | 100ng/5pmol | 500ng/20pmol | 2500ng/100pmol |

4.3.3.2 FuGENE 6

Buňky byly před transfekcí vysety do konfluencie přibližně 80 %. Po 24 hodinové stabilizaci byla provedena transfekce viz Tabulka 5. Ve sterilní zkumavce bylo smícháno odpovídající množství Opti-MEM média s odpovídajícím množstvím FuGENE reagentu. Směs byla inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo přidáno odpovídající množství příslušného plazmidu. Směs byla krátce promíchána a inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Poté byla napipetována na připravené buňky.

Tabulka 5 Rozpis složek pro transfekci FuGENE 6

| | 96 j. | 24 j. | 6 j. |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Adherentní buňky | 2×10^4 | 7×10^4 | $0,45 \times 10^6$ |
| FuGENE 6 reagent (μ l) | 0,6 | 1 | 4 |
| DNA (0,2 -1 μ g/ μ l) | 2 μ g | 5 μ g | 15 μ g |
| DNA-lipid komplex na jamku (μ l) | 10 | 50 | 250 |
| Finální koncentrace DNA (μ g) | 100 | 500 | 2500 |

4.3.4 Transfekce nukleofekcí

Nukleofekce je transfekční metoda vyvinutá firmou Amaxa (Lonza Cologne AG). Metoda funguje na principu elektroporace. Nukleofektor (elektroporační přístroj) má přednastavené programy, které se volí v kombinaci s různými pufrými pro jednotlivé buněčné linie.

Buňky K562 byly pasážovány den před transfekcí. Na jednu reakci bylo použito 1×10^6 buněk. Buňky byly stočeny, médium bylo kompletně odsáto. Buňky byly resuspendovány ve

100 μ l transfekčního roztoku (82 μ l Nucleofector Solution + 18 μ l Supplement). K buněčné suspenzi byly přidány 2 μ g plazmidu nebo 200 nM pre-miRNA. Suspenze byla přenesena do kyvety (součást kitu), kyveta byla vložena do přístroje a byl spuštěn program T-016. Pomocí Pasteurovy pipety a 0,5 ml kultivačního média byla buněčná suspenze přenesena do 12 jamkového panelu obsahujícího 1,5 ml předeřátého kultivačního média. Po 48 h inkubace byla hodnocena účinnost transfekce.

4.3.5 Transfekce „single-cell“ elektroporace

Nová metoda transfekce - „single-cell“ elektroporace na čipu umožňuje vpravit do buňky DNA oligonukleotidy, siRNA nebo plazmidové vektory. Výhoda této metody spočívá v umožnění transfekce předem vybrané konkrétní buňky a sledování změn vyvolaných vloženými geny na úrovni jedné buňky nikoli celé populace. V kombinaci s mikroskopem lze sledovat změny v čase přímo *in situ*.

K transfekci byly využity jedno - kondenzátorové čipy umístěné na petriho misce, které byly udržovány ve sterilním prostředí. Na čip bylo vyseto 4000 buněk CHO-K1 v 15 μ l média. Poté byly čipy inkubovány 15 min v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Poté byly přidány 2 ml média. Po 24 hodinách bylo odsáto médium a přidány 2 ml sterilního PBS. Buňky byly vyfotografovány před elektroporací. Poté bylo odsáto PBS a přidány 2 μ g plazmidu v 15 μ l sterilního elektroporačního pufru B1. Funkčním generátorem byl vyvolán elektroporační impuls podle Maschietto a kolektiv [125]. Čip byl inkubován 20 min při laboratorní teplotě. Následně byl odsát elektroporační roztok a napipetovány 2 ml média. Takto byly buňky inkubovány 24 hodin v inkubátoru a následně sledována účinnost transfekce na fluorescenčním mikroskopu.

4.3.6 Stanovení koncentrace bílkovin

4.3.6.1 Metoda dle Bradfordové

Stanovení je založeno na tvorbě komplexu mezi barvivem (Coomassie brilliant blue G-250) a proteiny ve vzorku. Barvivo se vyskytuje ve třech formách: kation (470 nm; červený), neutrální molekula (650 nm; zelená) a anion (595 nm; modrý). Vazba proteinu

stabilizuje aniontovou formu a vyvolává změnu zbarvení, které je změřeno fotometricky při 595 nm [126].

K 10 μ l standardu / vzorku bylo přidáno 100 μ l pracovního roztoku a po promíchání byla měřena absorbance. Hodnota byla odečtena z kalibračního grafu.

4.3.7 Stanovení specifických proteinů elektroforézou

Proteiny jsou rozděleny pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE), přeneseny na membránu a následně detekovány pomocí specifických protilátek.

Buňky byly seškrábány do média a centrifugovány (5 min., 150 \times g, 4 °C). Pelet byl promyt vychlazeným roztokem PBS (1 ml) a opět centrifugován (10 min., 150 \times g, 4 °C). Supernatant byl odsát a pelet byl lyzován v lyzačním pufriu (50 μ l, 15 min., 4 °C). Poté byl lyzát centrifugován (15 min., 11 400 \times g, 4 °C) a zamražen (-80 °C).

Vzorky byly naředěny 2 \times vzorkovým pufrem a denaturovány povařením (5 min., 95 °C). V aparatuře pro elektroforézu byl připraven 10 % separační a 15 % zaostřovací polyakrylamidový gel o tloušťce 1,5 mm. Do jamek zaostřovacího gelu byly aplikovány vzorky s obsahem 20 - 30 μ g bílkovin. Množství bílkovin bylo stanoveno pomocí metody Bradfordové. Elektroforéza byla provedena v migračním pufriu při proudu 15 mA. Po dosažení separačního gelu byla hodnota proudu zvýšena na 30 mA. Po rozdělení proteinů následoval jejich přenos („western blotting“) na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu v tankovém uspořádání v přenosovém pufriu (60 min., 400 mA, 4 °C).

Po ukončení přenosu byla membrána 3 \times promyta (5 min., TBS) pro odstranění přenosového pufriu, blokována (2 hod., TBS/T/mléko, 25 °C) a poté inkubována s primární protilátkou (TBS/T/mléko, 4 °C, 16 hod.). Po inkubaci byla membrána promyta (3 \times 5 min., TBS/T) a následně inkubována se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidasou (IgG-HRP, TBS/T/mléko, 2 hod., 25 °C). Poté byla membrána promyta (3 \times 5 min., TBS/T) a následně detekována. Pro detekci byl použit chemiluminiscenční systém Western Blotting Luminol Reagent a vzniklá chemiluminiscence byla zaznamenána na fotografický film.

4.3.7.1 Stanovení proteinů - Mcl-1, Bak, aktin, β -tubulin

Stanovení Mcl-1

Pro stanovení proteinu byla použita primární polyklonální králičí protilátka (Mcl-1, TBS/T/mléko, 1:500, 4 °C, 16 hod.) a sekundární králičí protilátka značená křenovou peroxidasou (IgG-HRP, TBS/T/mléko, 1:7 500, 2 hod., 25 °C). Protilátka detekuje obě formy proteinu Mcl-1L i Mcl-1S.

Stanovení Bak

Pro stanovení proteinu byla použita primární kozí protilátka (Bak, TBS/T/mléko, 1:1 000, 4 °C, 16 hod.) a sekundární kozí protilátka značená křenovou peroxidasou (IgG-HRP, TBS/T/mléko, 1:10 000, 2 hod., 25 °C).

Stanovení aktinu

Po stanovení daného proteinu byla membrána zbavena navázaných proteinů aplikací „stripping“ pufru (60 °C; 30 min) a promyta 500 ml deionizované vody. Pro stanovení proteinu byla použita primární kozí protilátka (aktin I-19, TBS/T/BSA, 1:2 000, 4 °C, 16 hod.) a sekundární kozí protilátka značená křenovou peroxidasou (kozy IgG-HRP, TBS/T/mléko, 1:15 000, 2 hod., 25 °C).

Stanovení β -tubulinu

Po stanovení daného proteinu byla membrána zbavena navázaných proteinů aplikací „stripping“ pufru (60 °C; 30 min) a promyta 500 ml deionizované vody. Pro stanovení proteinu byla použita primární myší protilátka (β -tubulin, TBS/T/BSA, 1:1 000, 4 °C, 16 hod.) a sekundární myší protilátka značená křenovou peroxidasou (myší IgG-HRP, TBS/T/mléko, 1:15 000, 2 hod., 25 °C).

4.3.8 Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie

Testované buňky byly centrifugovány 3 minuty při 900 rpm. Po centrifugaci byly buňky resuspendovány v 100 μ l studeného PBS a 230 μ l ledového 100% ethanolu a následně fixovány minimálně 24 hodin při -20 °C. Po 24 hodinové fixaci byl stanovován buněčný

obsah DNA. Fixát byl centrifugován 3 minuty při 1710 rpm při 4 °C, poté byl pečlivě odsát supernatant a pelet byl resuspendován v 1 ml PBS s 0,1% Triton X-100, 20 µg·ml⁻¹ ribonukleázy A a 20 µg·ml⁻¹ propidium jodidu a byl inkubován 30 minut při laboratorní teplotě v temnu. Po inkubaci byly vzorky analyzovány pomocí průtokového cytometru Cytomics FC 500 Series. Propidium jodid byl excitován argonovým laserem při 488 nm a fluorescence byla detekovaná na FL3 tunelu využitím 600 nm dlouhých filtrů a 615 nm krátkých filtrů. Procenualita buněk v G1, S a G2/M fázi buněčného cyklu byla počítána využitím MultiCycle AV softwaru.

4.3.9 Stanovení buněčné viability

4.3.9.1 MTT test

MTT neboli žlutá tetrazoliová sůl (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu) je redukována mitochondriálními dehydrogenázami metabolicky aktivních buněk na nerozpustné fialové formazanové barvivo, jehož koncentrace je po rozpuštění v organickém rozpouštědle stanovena spektrofotometricky při 540 nm [127].

Na několik jamek bylo aplikováno 10 µl 10% Tritonu X-100, ke stanovení pozadí. Buňky byly po intoxikaci opláchnuty roztokem PBS a poté byla aplikována směs obsahující 100 µl MTT na 1000 µl média. Suspenze byla inkubována 3 hodiny (37 °C; 5 % CO₂), poté bylo médium s MTT odsáto a do jamek bylo přidáno 200 µl DMSO s 1 % amoniakem. Buňky byly promíchány a ponechány 5 minut, aby došlo k úplnému rozpuštění formazanového barviva.

Následně byla změřena absorbance vzniklého modrofialového roztoku při 540 nm.

Životnost buněk byla počítána dle vztahu:

$$\text{Životnost (\%)} = 100 * ((A_V - A_P)/(A_K - A_P))$$

A_P absorbance pozadí (buňky inkubované s Tritonem X-100)

A_V absorbance vzorku (buňky inkubované s xenobiotiky)

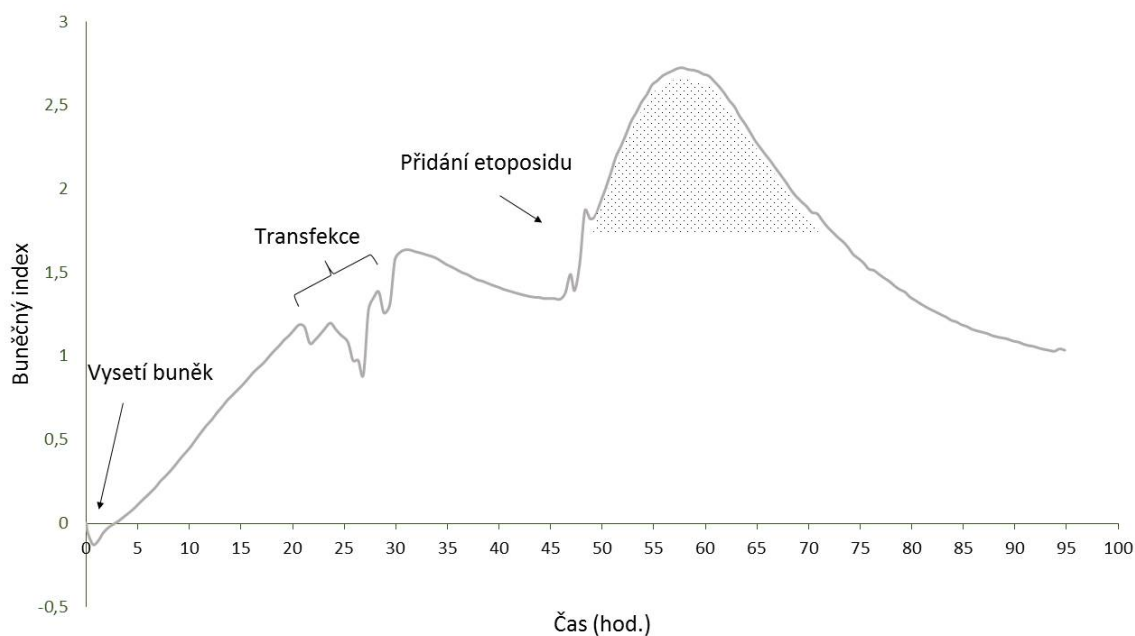
A_K absorbance kontroly (buňky neovlivněné žádnou látkou)

4.3.9.2 xCELLigence systém

Systém měří elektrickou impedanci pomocí mikroelektrod zabudovaných na dně každé jamky, ve které jsou vysety buňky. Toto měření poskytuje kvantitativní vyhodnocení biologického stavu buněk (počet, viabilita a morfologie). Relativní změna elektrické impedance je zobrazena buněčným indexem viz Obrázek 4. Nárůst buněčného indexu signalizuje růst buněk, pokles naopak signalizuje porušení adherentnosti buněk a tím smrt.

Buněčný index byl převeden na soubor ASCII pro výpočet plochy pod křivkou. Plocha pod křivkou byla spočítána z oblasti mezi vzestupnou a klesající částí křivky vyznačené na obrázku 4. Tato oblast byla normalizována k negativní kontrole, která byla stanovena jako 100% viabilita a poté použita pro srovnání mezi různými postupy ošetření buněk.

K experimentu byly využity 16-jamkové desky, přičemž velikost jamek se rovná velikosti jamek používaných na 96-jamkových deskách. HeLa buňky byly vysety v množství 10 000 buněk na jamku. Poté byly ponechány 24 hodin v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Poté byla provedena transfekce buněk a po dalších 24 hodinách přidán etoposid rozpuštěný v médiu o koncentraci 60 μM.



Obrázek 4 Příklad buněčného indexu. Křivka znázorňuje nárůst buněčného indexu po vysetí buněk, po 24 hodinách byla provedena transfekce s následnou výměnou média (po 4h)

a v čase 48 hodin byl přidán etoposid. Vyznačená oblast křivky byla použita pro výpočet viability buněk.

4.3.10 Aktivita kaspázy-3

Míra apoptózy byla sledována pomocí aktivity kaspázy-3. Buňky byly opláchnuty PBS a seškrábnuty do zkumavky. Následovala centrifugace při 2000g 10 min při 4°C. Ze zkumavky byl odsát supernatant. Sediment byl rozpuštěn ve vychlazeném lyzačním roztoku a ikubován 10 min na ledu. Poté byl centrifugován při 15000 g 10 min při 4°C. V supernatantu byl stanoven celkový protein Bradfordovou metodou. U každého vzorku bylo vždy napipetováno 4 µl supernatantu s 80 µl reakční směsi se substrátem (Ac-DEVD-AMC) a 4 µl supernatantu s 80 µl reakční směsi se substrátem a inhibítorem (Ac-DEVD-CHO). Každý vzorek byl inkubován při 37 °C po dobu 30 min. Fluorescence byla měřena při 380/450 nm s využitím spektrofluorometru (Tecan Magelan). Relativní aktivita kaspázy-3 se vypočítá odečtením intenzity fluorescence v přítomnosti inhibítoru od intenzity fluorescence bez inhibítoru a následným vydělením stanoveným množstvím proteinu v mg.

4.3.11 Detekce chemiluminiscence

Chemiluminiscence je citlivá analytická metoda, která se uplatňuje jako samostatná metoda nebo ve spojení s jinou analytickou metodou jako detektor. Při chemiluminiscenční reakci musí vznikat dostatek energie, aby došlo k excitaci elektronů. Excitovaný produkt musí být schopný ztrácet svoji energii buď ve formě fotonu nebo ji převádět na fluoreskující sloučeniny. Přímá emise fotonu z excitovaného produktu obvykle poskytuje krátké záblesky světla, zatímco transfer energie na fluoreskující sloučeniny se většinou projevuje jako dlouhodobá (v minutách) světelná emise. Chemická reakce zodpovědná za vznik světelného záření může být vyvolána činidlem (luminol) nebo biologickou cestou (enzym luciferasa a luciferin)[128].

Ke stanovení chemiluminiscence bylo z buněk odsáto médium, poté byly 2x opláchnuty PBS. Následně byly lyzovány pomocí Reporter Lysis 5x Buffer. K 7 µl buněčného lyzátu bylo přidáno 70 µl luciferázového pufru. Směs byla krátce vortexována a ihned měřena na luminometru.

4.3.12 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence byla pozorována pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu Olympus IX80 a analyzována softwarem Olympus *MicroImage*. K zachycení obrazu byla využita zabudovaná kamera Camedia C-3030 (Olympus).

4.3.13 Intoxikace buněk xenobiotiky

Xenobiotika byla rozpuštěna v DMSO na potřebnou zásobní koncentraci. V této formě byla uchovávána při -20 °C. Pro použití byla rozmrazena při laboratorní teplotě a naředěna v médiu na správnou koncentraci. Buňky byly rozesety na desku (96 jamková, 24 jamková nebo 6 jamková) v odpovídajícím množství a ponechány přes noc v inkubátoru ke stabilizaci (37 °C, 5% CO₂). Následující den bylo z jamek odsáto médium a aplikována směs média s xenobiotikem. Buňky byly inkubovány 24 nebo 48 hodin, dle pokusu a následně byly využity k analýzám experimentů.

4.3.13.1 Etoposid

Etoposid je semisyntetickým derivátem podofylotoxinu. Je jedním z nejčastěji využívaných protinádorových léčiv používaných převážně v kombinacích s jinými cytostatiky v první linii terapie. Používá se převážně k léčbě následujících maligních neoplastických onemocnění: testikulární tumory, choriokarcinom, karcinom ovarií, malobuněčný a nemalobuněčný bronchogenní karcinom, Hodgkinův a nonhodgkinovy lymfomy, akutní myeloblastická leukemie, karcinom žaludku. Účinky má podobné jako podofylotoxin, tj. inhibuje polymerizaci tubulinu, což vede k destrukci mitotického vřeténka. Etoposid ovlivňuje funkci topoizomerázy II (což je enzym rozvolňující DNA) a inhibuje syntézu DNA v terminální fázi. To vede k rozštěpení jednoduchého a dvojitého řetězce DNA. K úmrtí buněk dochází v závislosti na koncentraci etoposidu a délce expozice. Etoposid je fázově specifický a zastavuje buňky ve fázi S a rané fázi G2 buněčného cyklu, liší se však od jiných derivátů podofylotoxinu tím, že nevyvolává akumulaci v metafázi, ale brání mitóze buněk nebo ničí buňky připravující se k mitóze [129].

4.3.13.2 Imatinib

Imatinib je nízkomolekulární inhibitor tyrosin kinázy, který účinně inhibuje aktivitu Bcr-Abl tyrosin kinázy (TK) a dalších receptorových tyrosin kináz: Kit, receptor pro růstový faktor kmenových buněk (SCF, stem cell factor) kódovaný protoonkogenem c-Kit, receptory diskoidinové domény (DDR1 and DDR2), receptor kolonie stimulujícího faktoru (CSF-1R) a receptory pro trombocytární růstový faktor alfa a beta (PDGFR-alfa a PDGFR-beta). Imatinib také může inhibovat buněčné procesy, na kterých se tyto receptorové kinázy podílí. Látka selektivně inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu u Bcr-Abl pozitivních buněčných linií, stejně jako u čerstvých leukemických buněk od pacientů s CML s pozitivním Philadelphia chromozomem (Ph+) a od pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL)[130].

4.3.13.3 Kyselina all-trans retinová (ATRA)

Kyselina all-trans retinová (ATRA) je derivát vitamínu A a je jedním z možných chemoterapeutik díky své schopnosti indukovat signály pro buněčnou diferenciaci, inhibici proliferace buněk nebo apoptózu. V kombinaci s jinými terapeutickými metodami má aditivní a synergické účinky v protinádorové léčbě. ATRA se v buňkách váže na retinoidní receptor, který ovlivňuje transkripci cílových genů [131]. V současnosti jsou známy dva retinoidní receptory RAR a RXR, přičemž každý z nich obsahuje tři isoformy α , β , γ . ATRA se stále více využívá k protinádorové léčbě například Kaposiho sarkomu, karcinomu dlaždicových buněk hlavy a krku, karcinomu vaječníků, močového měchýře, neuroblastomu atd [132].

4.3.14 Namnožení, izolace a kontrola plazmidů

4.3.14.1 Transformace *E. coli*

Pro selekci a klonování plazmidů byly použity TOP10 chemicky kompetentní buňky *E. coli*. Tyto buňky umožňují stabilní replikaci vysokého počtu kopií připravených plazmidů. Práce s buňkami byla prováděna za sterilních podmínek. Komerční plazmidy byly naředěny v poměru 1:4 ddH₂O. Buňky byly rozmrazeny na ledu. 5 μ l naředěných plazmidů bylo přidáno k buňkám a promícháno poklepáním na zkumavku. Buňky byly inkubovány 30 min na ledu. Buňky byly vystaveny teplotnímu šoku při 42 °C po dobu 30 s. Transformované

buňky byly resuspendovány ve 250 μ l S.O.C. média a směs byla inkubována při 37 °C na třepačce (200 rpm) 1 h.

4.3.14.2 Inokulace

Transformované buňky byly po hodinové inkubaci rozetřeny na Petriho misky s „lysogeny broth“ (LB) agarem obsahujícím 100 μ g/ml ampicilinu. Petriho misky s transformovanými buňkami byly inkubovány přes noc při 37 °C. 12 – Vybrané bakteriální kolonie byly přeneseny do 5 ml tekutého LB média s ampicilem (100 μ g/ml) a byly inkubovány přes noc při 37 °C na třepačce.

4.3.14.3 Izolace plazmidů

Z narostlých bakteriálních klonů byla izolována plazmidová DNA. Izolace plazmidové DNA byla provedena pomocí kitu QIAGEN Plasmid Midi Kit. Narostlá bakteriální kultura byla centrifugována (6000 x g, 15 min, 4 °C). Supernatant byl odstraněn. Buněčný pelet byl resuspendován v pufru P1 (7 ml pufru na 1 g peletu). Buňky byly lyzovány pomocí stejného množství pufru P2. Suspenze byla s pufrům promíchána převrácením a potom byla inkubována 5 min za laboratorní teploty. Lyzát byl neutralizován stejným objemem pufru P3. Suspenze byla inkubována 20 min na ledu. Potom byla směs stočena (20000 x g, 30 min, 4 °C). Supernatant byl přenesen na kolonu, která byla předem ekvilibrována 4 ml pufrům QBT. DNA navázaná na koloně byla promyta 2 x 10 ml pufru QC. DNA byla eluována 5 ml pufru QF a poté byla precipitována 3,5 ml isopropanolu (25 °C). Vzorek byl promíchán a následně centrifugován (15000 x g, 30 min, 4 °C). Supernatant byl odstraněn. Pelet byl omyt 2 ml 70% ethanolu (25 °C). Směs byla centrifugována (15000 x g, 10 min, 4 °C) Supernatant byl odsán. Pelet byl vysušen na vzduchu a potom rozpuštěn v 100 μ l TE pufru, pH = 8. Koncentrace DNA byla stanovena pomocí UV spektrofotometrie při 260 nm. Čistota DNA byla ověřena spektrofotometricky poměrem absorbancí, $A_{260/280} = 1,8-2$.

4.3.14.4 Restrikční analýza

Pomocí volně dostupného počítačového programu BioEdit byly navrženy vhodné kombinace restrikčních endonukleáz. Produkty restrikčních reakcí byly separovány pomocí

agarosové elektroforézy, fragmenty DNA byly vizualizovány EtBr a srovnávány s molekulovou hmotností markeru. Reakční směsi byly napipetovány podle níže uvedeného rozpisu a inkubovány ≥ 2 h při uvedené teplotě viz Tabulka 6.

Tabulka 6 Rozpis reakčních směsí pro restrikční analýzu.

| | Namnožený plazmid | Komerční plazmid | Namnožený plazmid | Komerční plazmid | | |
|---------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|------------|----------|
| miR-29a | 25°C | 1,29 µg/ul | 200µg/ml | 37°C | 1,29 µg/ul | 200µg/ml |
| | | Apal | Apal | | EcoRV | EcoRV |
| | | 1 | 2 | | 1 | 2 |
| | pufr NEB4 | 1,5 | 1,5 | pufr NEB3 | 1,5 | 1,5 |
| | BSA | 0,15 | 0,15 | BSA | 0,15 | 0,15 |
| | enzym | 0,2 | 0,2 | enzym | 0,2 | 0,2 |
| | voda | 12,15 | 11,15 | voda | 12,15 | 11,15 |
| miR-29b | 37°C | 1,55µg/ul | 200µg/ml | 37°C | 1,55µg/ul | 200µg/ml |
| | | PstI | PstI | | DraI | DraI |
| | | 1 | 2 | | 1 | 2 |
| | pufr NEB3 | 1,5 | 1,5 | pufr NEB4 | 1,5 | 1,5 |
| | BSA | 0,15 | 0,15 | | | |
| | enzym | 0,2 | 0,2 | enzym | 0,2 | 0,2 |
| | voda | 12,15 | 11,15 | voda | 12,3 | 11,3 |
| miR-29c | 25°C | 1,165µg/ul | 200µg/ml | 37°C | 1,165µg/ul | 200µg/ml |
| | | SacI | SacI | | Avall | Avall |
| | | 1 | 2 | | 1 | 2 |
| | pufr NEB1 | 1,5 | 1,5 | pufr NEB4 | 1,5 | 1,5 |
| | BSA | 0,15 | 0,15 | | | |
| | enzym | 0,2 | 0,2 | enzym | 0,2 | 0,2 |
| | voda | 12,15 | 11,15 | voda | 12,3 | 11,3 |
| miR-150 | 37°C | 1,27µg/ul | 200µg/ml | 37°C | 1,27µg/ul | 200µg/ml |
| | | Avall | Avall | | StuI | StuI |
| | | 1 | 2 | | 1 | 2 |
| | pufr NEB4 | 1,5 | 1,5 | pufr NEB4 | 1,5 | 1,5 |
| | | | | | | |
| | enzym | 0,2 | 0,2 | enzym | 0,2 | 0,2 |
| | voda | 12,3 | 11,3 | voda | 12,3 | 11,3 |
| pCMV | 37°C | 1,185µg/ul | 200µg/ml | 37°C | 1,185µg/ul | 200µg/ml |
| | | Avall | Avall | | EcoRI | EcoRI |
| | | 1 | 2 | | 1 | 2 |
| | pufr NEB4 | 1,5 | 1,5 | pufr NEB4 | 1,5 | 1,5 |
| | | | | | | |
| | enzym | 0,2 | 0,2 | enzym | 0,2 | 0,2 |
| | voda | 12,3 | 11,3 | voda | 12,3 | 11,3 |

4.3.14.5 Sekvenace

Část vzorku byla odeslána na sekvenaci do laboratoře IEB Laboratory of Molecular Cytogenetic and Cytometry, Olomouc.

4.3.15 Izolace RNA trizolovou metodou a stanovení celkové RNA

RNA byla izolována z buněk na 6 jamkové desce. Dané vzorky byly vždy v duplikátech. Buňky byly 2x promyty PBS, poté bylo do každé jamky napipetováno 500 μl TRI reagentu. Pomocí škrabky byly buňky odděleny ode dna a přeneseny do sterilní zkumavky, vždy 2 duplikáty do jedné zkumavky. Následně byly homogenizovány pipetováním a inkubovány 5 min při laboratorní teplotě. Poté bylo ke směsi přidáno 200 μl chloroformu a lehce promícháno převrácením. Inkubace 3 min při laboratorní teplotě. Vzorek byl poté centrifugován 15 min při 12000g a 4°C. Horní vodná fáze byla odebrána a přenesena do nové zkumavky, k ní bylo přidáno 500 μl isopropanolu. Následovala inkubace 10 min při laboratorní teplotě a centrifugace 10 min, 12000g, 4°C. Supernatant byl odsán pipetou a usazený pelet byl promyt 300 μl 75% ledovým ethanolem. Poté byl centrifugován 5 min, 7500g, 4°C, supernatant opatrně odsán a pelet vysušen na vzduchu ve flow boxu. Vysušený pelet byl rozpuštěn v 10-50 μl ddH₂O.

Koncentrace a čistota RNA byla určena spektrofotometrickým měřením při 260, 280 a 230 nm. Pokud byla změřena uspokojivá hodnota čistoty ($A_{260}/A_{280} \geq 1,8$; $A_{260}/A_{230} \geq 1,7$), bylo možno použít hodnotu A_{260} pro výpočet koncentrace RNA.

4.3.16 Reverzní transkripce

Pro stanovení jednotlivých miRNA je potřeba nejdříve izolovanou RNA přepsat na cDNA. Ke specifické reverzní transkripci byl použit TaqMan® MicroRNA Transcription Kit (Applied Biosystems) a stem-loop RT primery, které jsou součástí TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems). Celková RNA byla naředěna na koncentraci 4 ng. μl^{-1} , přičemž do reakce bylo použito 5 μl , výsledná koncentrace byla tedy 20 ng. μl^{-1} . Během postupu byly všechny komponenty uchovávány na ledu.

Příprava reakční směsi (množství (μl) na jednu 15 μl reakci):

| | |
|--|------|
| dNTPs mix (100mM total) | 0,15 |
| MultiScribe™ RT (50 U.μl ⁻¹) | 1,00 |
| 10X RT Buffer | 1,50 |
| RNase inhibitor | 0,19 |
| Nuclease Free Water | 4,16 |
| RT Primer | 3,00 |
| RNA (4ng.μl ⁻¹) | 5,00 |

Zkumavky byly krátce centrifugovány a poté vloženy do termocykleru nastaveného na následující program. Vytvořená cDNA byla uchovávána při -20°C.

| | |
|--------|------|
| 30 min | 16°C |
| 30 min | 42°C |
| 5min | 85°C |
| ∞ | 4°C |

4.3.17 Real – time PCR

Stanovení exprese miRNA bylo provedeno na přístroji LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche). K reakci byla použita cDNA získaná z reverzní transkripce.

Reakční směs (20 μl)

| | |
|---|----------|
| TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG | 10,00 μl |
| TaqMan MicroRNA assays (primer) | 1,00 μl |
| Nuclease Free Water | 7,67 μl |
| cDNA | 1,33 μl |

Vzorky byly napipetovány na mikrotitrační destičku o 96 jamkách vždy v tripletech. Následně byly krátce centrifugovány z důvodu eliminace bublin. Na termocykleru byl nastaven tento program:

| | | |
|----------------------|-------------|-------|
| Počáteční denaturace | 95°C 10 min | |
| Denaturace | 95°C 15 s | } 40x |
| Annealing | 60°C 60 s | |
| Ochlazení | 4°C | |

4.3.17.1 Hodnocení exprese miRNA

Pro výpočet relativní kvantifikace jsme využili metodu $\Delta\Delta Ct$. Ct je prahový cyklus, při kterém detekované signály začnou odpovídat exponenciálnímu růstu množství amplifikačního produktu. Jako endogenní kontrola se používají některé houskeepingové geny, o kterých se soudí, že ve studované tkáni vykazují stabilní expresi [133]. My jsme jako houskeepingový gen zvolili malou jadernou snRNA U6 (RNU6B). Pro výpočet normalizované hodnoty porovnávající expresi mezi zdravou a nádorovou tkání lze použít následující vzorec.

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

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{vzorek, nádorová tkáň}) - \Delta Ct (\text{kalibrátor, zdravá tkáň})$$

$$\text{Normalizovaná hodnota} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4.3.18 Stanovení BCR-ABL

Stanovení BCR-ABL bylo provedeno na Hemato-onkologické klinice FN v Olomouci metodou real-time PCR podle Dongen a kolektiv [134].

4.3.19 Statistická analýza

Všechny experimenty *in vitro* byly provedeny v tripletech ve třech nezávislých opakováních, pokud není uvedeno jinak. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ($p < 0,05$).

Statistické vyhodnocení buněčných experimentů bylo provedeno pomocí ANOVA (Analysis of variance, analýza rozptylu) a Tukeyho testu v programu Statistica.

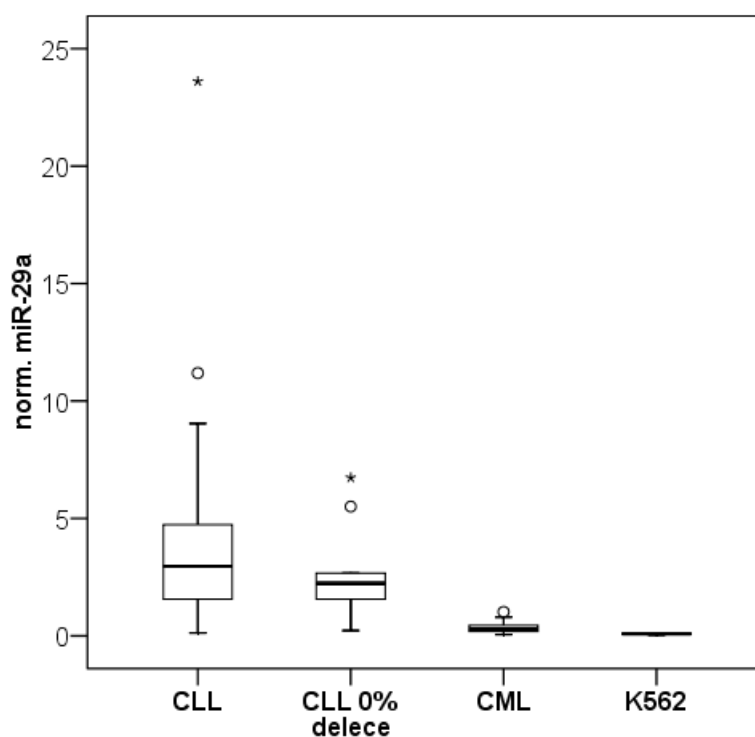
Ke statistické analýze pacientů byl použit software SPSS verze 15 (SPSS Inc., Chicago, USA). Analýza kategoriálních parametrů byla provedena pomocí Fisherova přesného testu (Fisher's exact test), kvantitativní parametry byly analyzovány pomocí

neparametrických metod Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Spearmanova korelační analýza. Normalita dat byla ověřena pomocí testu Shapiro-Wilk. Testy byly provedeny na hladině signifikance 0,05. Kvartilový box graf popisuje distribuci hodnot měřeného parametru pomocí kvartilů. Silná čára uvnitř boxu reprezentuje medián hodnot (tj. 2 kvartil), dno boxu reprezentuje 1. kvartil a víko boxu 3. kvartil. Výška boxu odpovídá mezikvartilovému rozpětí (tj. charakteristice variability dat – v intervalu mezi 1. a 3. kvartilem leží 50% naměřených hodnot). Anténka dole a nahoře odpovídají minimální a maximální neodlehle hodnotě. Odlehle hodnoty jsou označeny symbolem kroužek a extrémní hodnoty symbolem hvězdička.

5. VÝSLEDKY

5.1 Exprese miR-29

Prvním impulzem pro tuto studii byl výsledek z mojí diplomové práce, ve které jsem mimo jiné sledovala vliv exprese miR-29 na pacienty s chronickou lymfocytární leukémií (CLL). Jako srovnávací vzorek jiného hematologického onemocnění byla vybrána malá skupina pacientů s chronickou myeloidní leukémií, na které se ukázalo signifikantní snížení hladiny exprese všech členů rodiny miR-29 oproti hladiny exprese u pacientů s CLL. Totožný výsledek byl sledován také u buněčné linie K562 odvozené od pacientky s CML viz Obrázek 5 [135]. Proto jsme se rozhodli studovat vliv miR-29 u tohoto typu onemocnění a této buněčné linie.



Obrázek 5 Signifikantně snížená hladina exprese miR-29a u pacientů s CML a u K562. U miR-29b a c byl obdobný výsledek.

5.1.1 Exprese miR-29 u pacientů s CML

Na souboru 27 pacientů s CML byla pomocí metody real-time PCR stanovena hladina exprese rodiny miR-29 a RNU6B, což je gen, který nám posloužil jako endogenní kontrola. K dispozici bylo 13 mužů a 14 žen. Průměrný věk pacientů byl 51 let, přičemž nejmladšímu bylo 16 a nejstaršímu 74 let. Tak jako je u pacientů sledována hladina BCR-ABL jako hlavní parametr odpovědi na léčbu imatinibem, byla sledována i hladina exprese všech miR-29. Měření proběhla vždy při stanovení diagnózy, poté několikrát v průběhu léčby a nakonec zpravidla při dosažení remise pacienta, tedy dosažení hladiny BCR-ABL na 0% případně poslední odběr, který byl k dispozici. Počet průběžných odběrů se liší podle odpovědi na léčbu imatinibem. Kompletní seznam pacientů s dostupnými klinickými parametry je v tabulce 3 (4.1.2 vzorky pacientů). Pro názorné porovnání s hodnotami získanými z kontrolní skupiny zdravých dárců jsme nepoužili normalizované hodnoty miR-29, nýbrž hodnoty ΔCt (Ct cílová miRNA – Ct RNU6B). Výsledky naměřených hodnot ΔCt (Ct cílová miRNA – Ct RNU6B) jsou uvedeny viz Tabulka 7.

Pro přehlednost byla ke statistické analýze využita vždy tři měření – při diagnóze, 2. měření zpravidla po 2 – 3 měsících léčby a poslední měření (remise). Tato tři měření byla vybrána, jelikož u nich docházelo k nejmarkantnějším změnám hladiny BCR-ABL. Výsledné hodnoty byly vneseny do kvartilového krabicového grafu viz Obrázek 6. Graf A znázorňuje pokles hladiny exprese miR-29a v době diagnózy, při druhém měření lze pozorovat nárůst a při posledním měření klesá hladina zpět na úroveň kontrolních buněk. U miR-29b a miR-29c lze pozorovat mírný nárůst hladiny exprese v průběhu druhého měření a opětovný mírný pokles při posledním měření.

Tabulka 7 Hodnoty Δ Ct rodiny miR-29 u pacientů s CML. Písmena A-F označují měření v průběhu léčby; * průměrná hodnota zdravých dárců.

| | miR-29a Δ Ct | miR-29b Δ Ct | miR-29c Δ Ct |
|-----|------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 A | -5,43046 | 0,59205 | -1,0099 |
| B | -6,58346 | -1,37717 | -2,78517 |
| C | -4,79149 | 1,99813 | 6,53417 |
| D | -5,37536 | 0,84581 | 5,94274 |
| 2 A | -5,87357 | -1,08587 | -1,4435 |
| B | -6,58666 | -1,47253 | -2,61439 |
| C | -4,54979 | 1,01419 | 6,77314 |
| D | -5,28981 | 0,39683 | -1,27822 |
| 3 A | -6,11653 | -1,91071 | -3,957 |
| B | -3,11751 | 1,86476 | 0,96783 |
| C | -5,76948 | -1,41542 | -1,83938 |
| D | -3,85679 | 2,99642 | 7,3677 |
| E | -5,42566 | 0,34293 | 5,48916 |
| 4 A | -4,30766 | 0,07848 | -2,274 |
| B | -6,82198 | -0,6656 | -3,00612 |
| C | -7,14741 | -2,83431 | -2,54463 |
| D | -3,98514 | 3,41377 | 7,04836 |
| E | -4,57873 | 1,05269 | 6,57388 |
| 5 A | -5,33723 | -0,1971 | -2,35105 |
| B | -5,81108 | -0,75554 | -1,39057 |
| C | -4,76096 | -0,60016 | -0,30597 |

| | miR-29a Δ Ct | miR-29b Δ Ct | miR-29c Δ Ct |
|------|------------------------|------------------------|------------------------|
| D | -3,83211 | 3,34245 | 0,8817 |
| E | -4,8734 | 0,6729 | 6,20987 |
| 6 A | -4,01844 | 0,1591 | -1,79254 |
| B | -6,309 | -1,03296 | -2,25884 |
| C | -7,61589 | -2,88147 | -2,61822 |
| D | -4,18077 | 1,86101 | -0,19212 |
| E | -2,97097 | 2,82646 | 8,47141 |
| 7 A | -4,25827 | 0,86128 | -0,00722 |
| B | -5,10405 | 1,23248 | -0,3411 |
| C | -3,81515 | 1,9534 | 7,69106 |
| D | -6,50659 | -1,9078 | -2,14348 |
| E | -4,36673 | 1,10238 | 6,76644 |
| F | -4,81543 | 1,04103 | 6,6066 |
| 8 A | -1,151 | -1,04377 | -1,23303 |
| B | -5,30629 | 0,16872 | 5,55505 |
| C | -7,48371 | -2,12995 | -3,33371 |
| D | -5,02023 | 1,29457 | 6,0324 |
| E | -6,26259 | 0,25865 | 4,91568 |
| 9 A | -4,79739 | -0,62477 | -1,9767 |
| B | -7,36165 | -3,40799 | -3,30513 |
| C | -7,63188 | -1,54886 | -2,73761 |
| D | -5,60334 | 0,78844 | 5,72905 |
| E | -5,988 | -0,42332 | 5,6183 |
| 10 A | -2,2755 | 0,61793 | -0,11831 |
| B | -5,4022 | -0,48005 | -0,97609 |
| C | -6,78351 | -1,66858 | -1,33832 |
| D | -5,77055 | -0,81148 | -1,40032 |
| 11 A | -3,36684 | 1,61372 | 0,96345 |

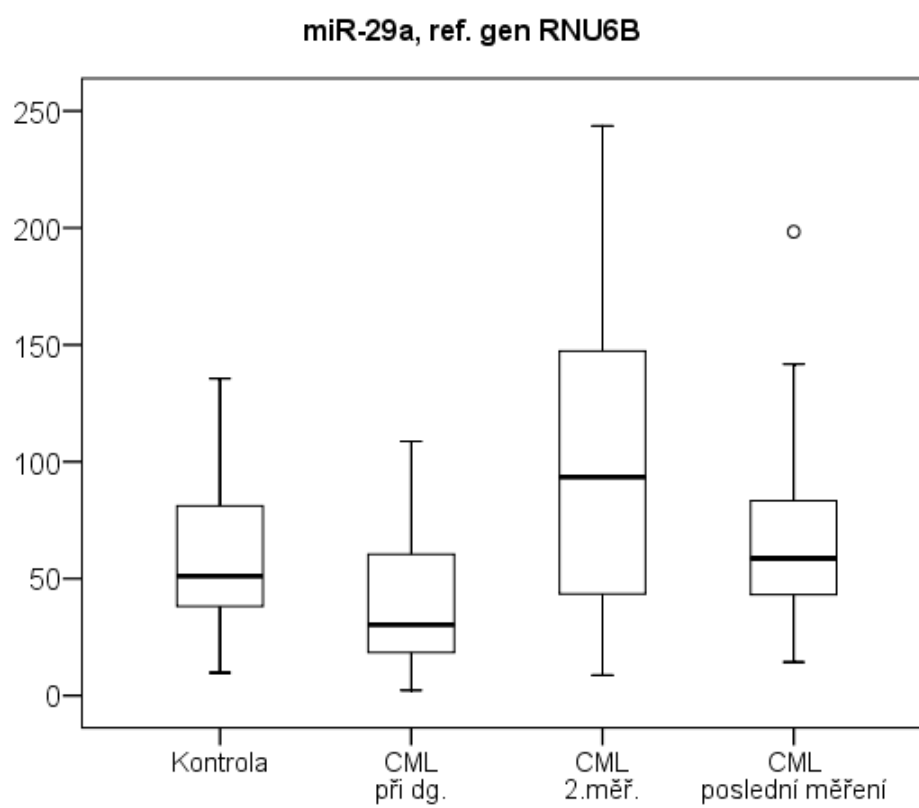
| | miR-29a Δ Ct | miR-29b Δ Ct | miR-29c Δ Ct |
|------|------------------------|------------------------|------------------------|
| B | -5,82979 | 1,03284 | -0,56216 |
| C | -4,63327 | -0,47446 | -0,08121 |
| 12 A | -6,48205 | -2,01252 | -1,92939 |
| B | -7,92854 | -0,43712 | -2,13496 |
| C | -6,962 | -1,91038 | -2,89287 |
| D | -5,2196 | 1,49398 | 6,16214 |
| 13 A | -4,54836 | -0,17012 | -0,16802 |
| B | -6,76455 | -1,14127 | -2,41224 |
| C | -7,02539 | -2,78008 | -2,70077 |
| D | -6,37952 | -0,76829 | -0,74667 |
| E | -5,07713 | 0,84661 | 5,7983 |
| F | -6,4366 | -0,7843 | 4,29979 |
| 14 A | -5,99118 | 0,03169 | -2,05165 |
| B | -7,43836 | -1,58567 | -2,57094 |
| C | -4,14881 | 2,40295 | 7,03474 |
| D | -6,16437 | -0,81621 | 4,87537 |
| E | -5,11486 | 0,95504 | 6,23818 |
| F | -4,55771 | 1,0995 | 6,29454 |
| 15 A | -4,26665 | 2,29692 | -0,0942 |
| B | -4,95099 | 0,48054 | 6,13554 |
| C | -5,17319 | 1,17818 | -0,79475 |
| D | -5,49414 | 0,6421 | 5,81303 |
| E | -6,3614 | -0,17071 | 4,2286 |
| F | -3,79165 | 1,98255 | 6,92712 |
| 16 A | -6,63645 | -1,38729 | -2,97918 |
| B | -4,0076 | 2,05898 | 0,40067 |
| C | -6,63397 | -1,53358 | -2,50862 |
| D | -6,29472 | -0,45591 | -2,22631 |

| | miR-29a ΔCt | miR-29b ΔCt | miR-29c ΔCt |
|------|----------------|----------------|----------------|
| E | -5,09275 | 0,76132 | 5,76685 |
| F | -5,81503 | 1,03772 | 5,04993 |
| 17 A | -2,98466 | 2,37404 | 0,21205 |
| B | -5,35534 | 0,22422 | -2,31747 |
| C | -6,37324 | -0,71178 | -2,155 |
| D | -5,15078 | 2,50256 | -0,82111 |
| E | -5,31613 | 1,59366 | 6,14307 |
| F | -5,08605 | 0,55869 | 6,03341 |
| 18 A | -4,5925 | 0,93855 | -0,27859 |
| B | -4,74371 | 0,86027 | 6,58691 |
| C | -6,29247 | -1,20302 | -1,85938 |
| D | -5,36187 | 0,67522 | 5,59716 |
| E | -6,27438 | 0,14199 | 5,05688 |
| 19 A | -4,22127 | 2,16097 | -0,35438 |
| B | -6,4284 | 0,01508 | 4,8773 |
| C | -5,80675 | 0,04168 | 5,43617 |
| D | -5,29284 | 0,78826 | 5,41063 |
| 20 A | -3,66869 | 1,78569 | -0,38314 |
| B | -5,47749 | 0,56101 | -1,1756 |
| C | -4,55066 | 1,03202 | 5,62042 |
| D | -5,73771 | -0,64388 | -1,07954 |
| E | -3,86936 | 2,1187 | 6,91297 |
| F | -5,3779 | 0,59099 | 5,61066 |
| 21 A | -5,54615 | 0,42153 | -1,70909 |
| B | -4,46032 | 1,65288 | 6,54212 |
| C | -4,83316 | 1,73778 | 6,79748 |
| D | -5,16115 | 1,07256 | 5,85339 |
| E | -5,32181 | 0,12354 | 5,86394 |

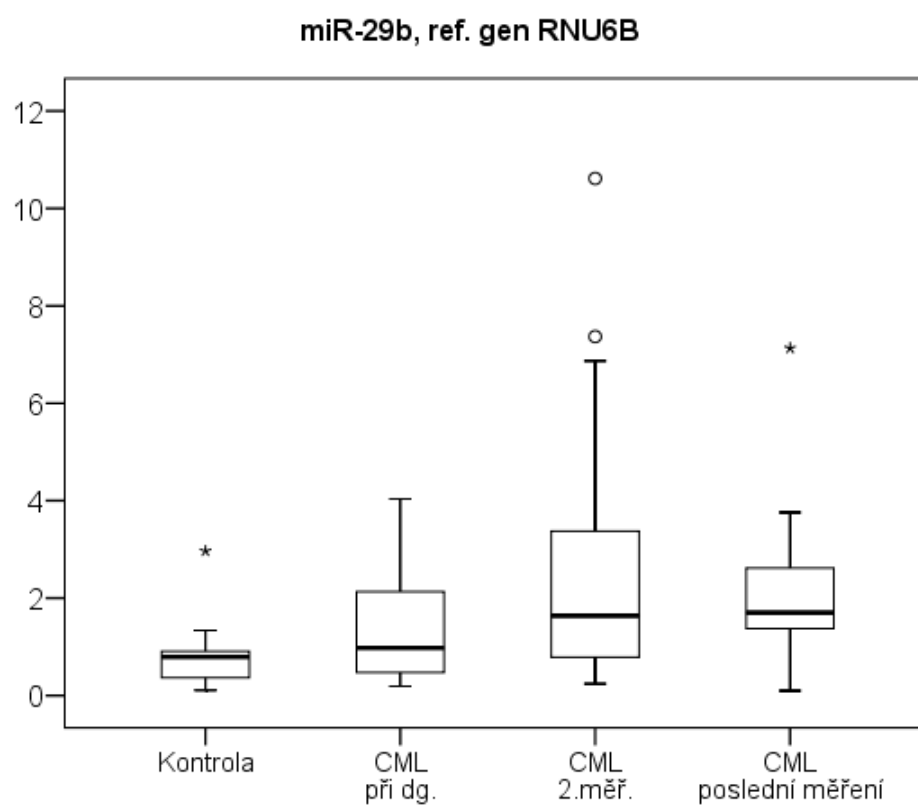
| | miR-29a ΔCt | miR-29b ΔCt | miR-29c ΔCt |
|------|----------------|----------------|----------------|
| 22 A | -4,02553 | 2,36585 | 7,00834 |
| B | -5,90506 | -0,49463 | 4,49755 |
| C | -6,22502 | -0,17641 | 4,78262 |
| D | -5,53643 | 0,54229 | 5,74033 |
| E | -5,03238 | 1,12965 | 5,77052 |
| 23 A | -3,28952 | 3,51541 | 7,57228 |
| B | -5,33087 | 0,83975 | 5,52228 |
| D | -4,56024 | 0,80254 | 6,2044 |
| E | -5,46755 | 0,78076 | 4,93763 |
| 24 A | -3,07354 | 2,67422 | 7,07134 |
| B | -5,68806 | 0,57354 | 4,70954 |
| C | -5,27496 | 0,16466 | 5,16929 |
| D | -5,76503 | -0,22266 | 4,81882 |
| E | -6,13323 | -0,43904 | 4,32494 |
| 25 A | -5,60189 | 1,03478 | 5,08892 |
| B | -2,85708 | 3,37008 | 7,9779 |
| C | -4,53475 | 2,38541 | 5,7561 |
| D | -5,75928 | 0,01202 | 4,26674 |
| E | -4,88611 | 1,38418 | 5,77912 |
| 26 A | -6,42474 | 0,70782 | 3,81441 |
| B | -4,34319 | 1,98929 | 6,3801 |
| C | -4,025 | 4,15711 | 6,62971 |
| D | -5,31575 | 1,1442 | 5,47396 |
| E | -5,98528 | -0,02617 | 4,16293 |
| 27 A | -3,477 | 3,05595 | 7,59045 |
| B | -5,26179 | -0,56962 | 4,08538 |
| C | -4,53166 | 1,65508 | 6,45093 |
| D | -6,23251 | -0,88638 | 3,26888 |

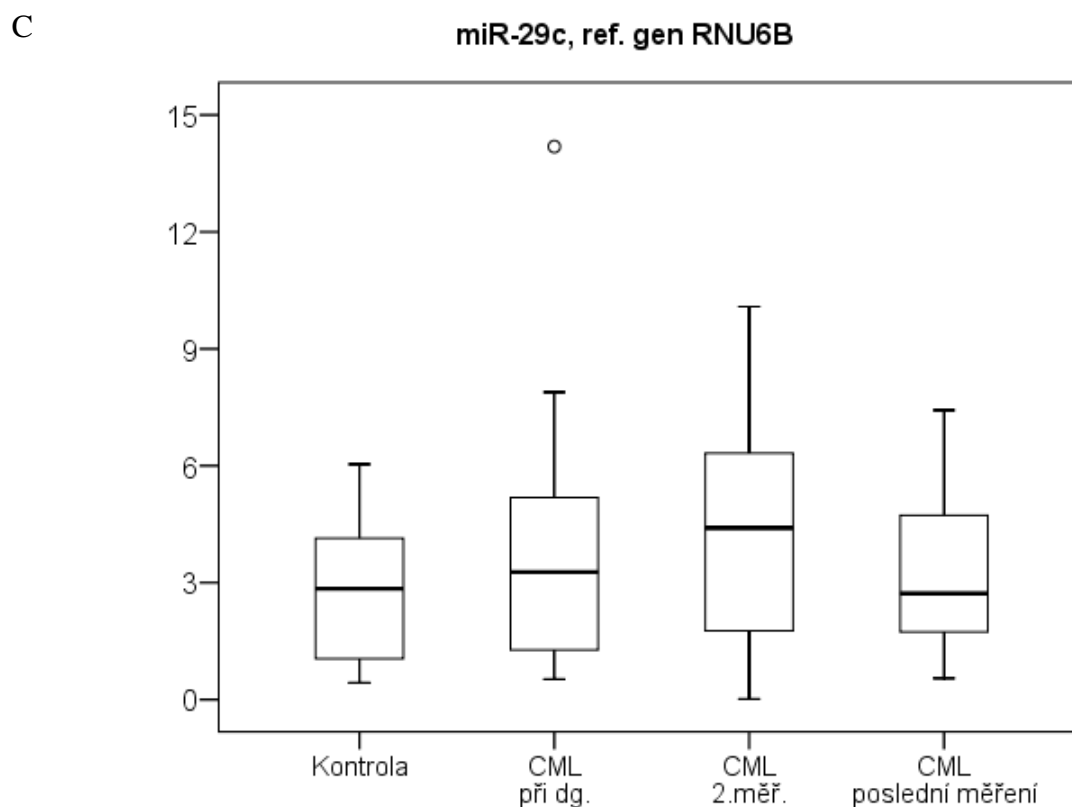
| | miR-29a ΔCt | miR-29b ΔCt | miR-29c ΔCt |
|---|----------------|----------------|----------------|
| E | -6,11808 | -0,56997 | 4,62732 |
| * | -5,63658 | 0,84896 | -1,26052 |

A



B

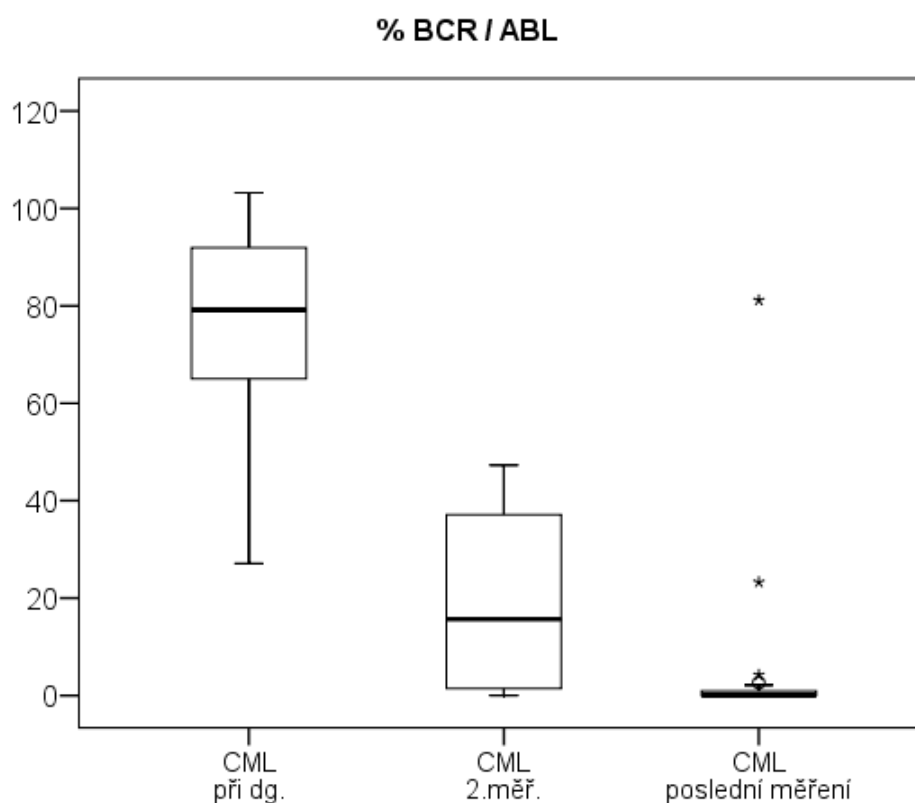




Obrázek 6 Kvartilové box grafy znázorňují distribuci hodnot ΔC_t pro každou miR-29 ve třech měřeních – při diagnóze, 2. měření a poslední měření.

5.1.2 Exprese BCR-ABL u pacientů s CML

Pro názornost byl vytvořen také kvartilový box graf hladiny BCR-ABL stanovené ve stejných časových intervalech u pacientů jako exprese rodiny miR-29 viz Obrázek 7. Z grafu lze vidět významný pokles hladiny BCR-ABL během léčby (2. měření) a při posledním měření - remise onemocnění.



Obrázek 7 Graf hladiny BCR-ABL u pacientů s CML.

5.1.3 *Expresí miR-29 u pacientů s CML v souvislosti s BCR-ABL a dalšími parametry*

Pro zjištění korelace mezi hladinami exprese miR-29, BCR-ABL a ostatními parametry byly provedeny Spearmanovy korelační analýzy.

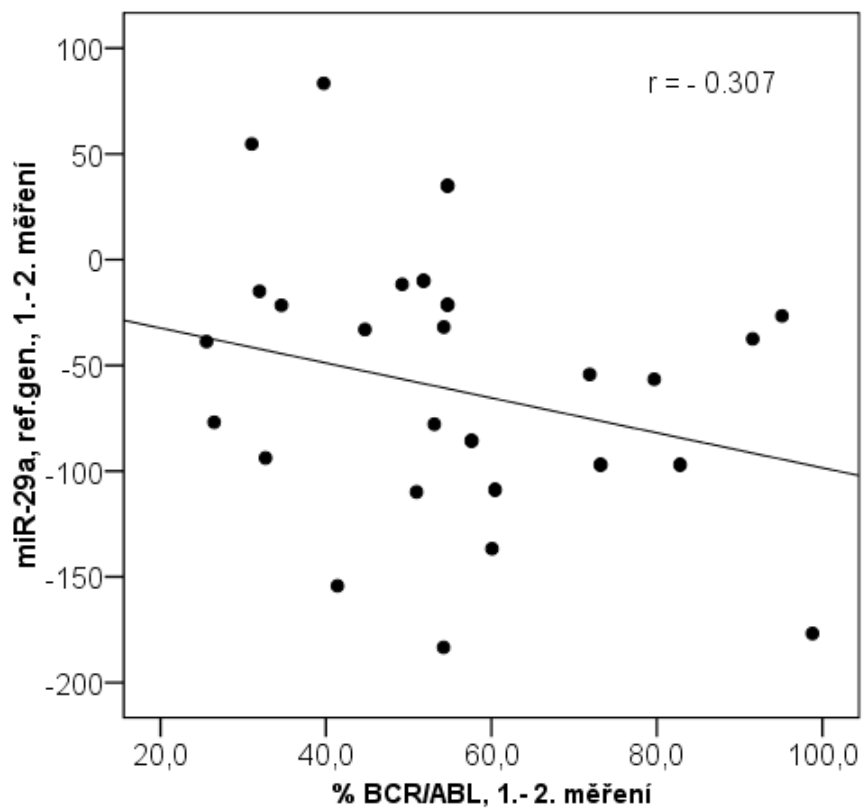
Při sledování změny exprese miR-29 při všech třech měřeních s věkem pacienta a indexem dle Sokala nebyla prokázána signifikantní závislost.

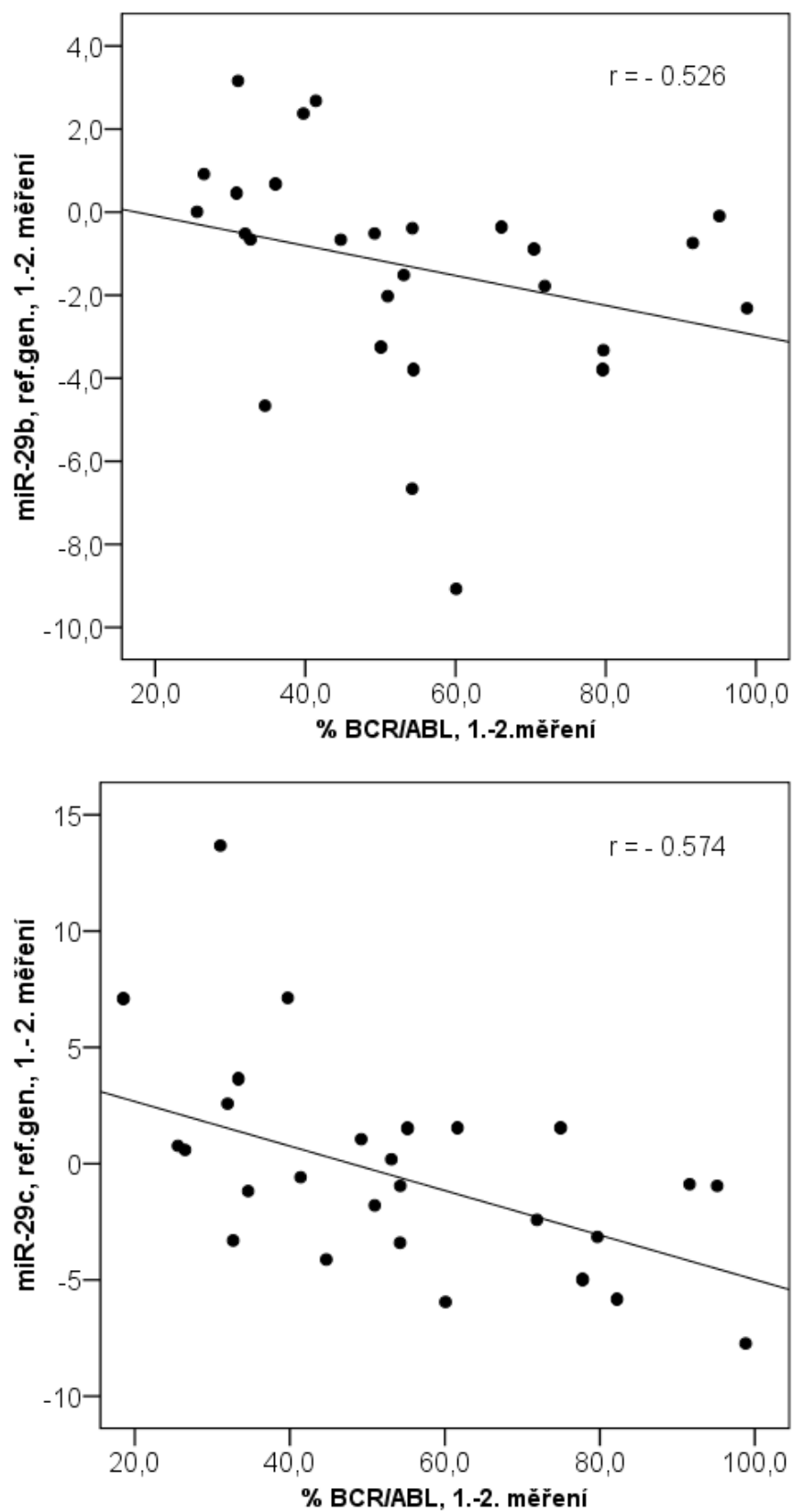
Pro každého pacienta byl vypočítán Spearmanův korelační koeficient pro vyjádření míry závislosti mezi hladinou BCR-ABL a expresí miR-29a, miR-29b a miR-29c. Výsledky viz Tabulka 8. Mezi BCR-ABL a hladinou exprese miR-29c byla zjištěna slabě pozitivní korelace.

Závislost mezi změnou parametru BCR-ABL při 2. měření a změnou exprese miR-29a při 2. měření nebyla statisticky významná. Spearmanova korelační analýza prokázala signifikantní negativní korelaci mezi změnou BCR-ABL při 2. měření a změnou miR-29b, resp. změnou miR-29c při 2. měření. Výsledky viz Obrázek 8.

Tabulka 8 Popisné charakteristiky korelačních koeficientů

| % BCR/ABL vs. | Průměr | SD | 95%CI pro průměr | Median | Minimum | Maximum |
|---------------|--------------|-------|---------------------------|--------|---------|---------|
| miR-29a | -0,012 | 0,552 | -0,226 to +0,202 | 0,050 | -0,9 | 1 |
| miR-29b | 0,209 | 0,555 | - 0,006 to + 0,425 | 0,351 | -0,9 | 1 |
| miR-29c | 0,234 | 0,522 | + 0,032 to + 0,437 | 0,279 | -0,8 | 1 |





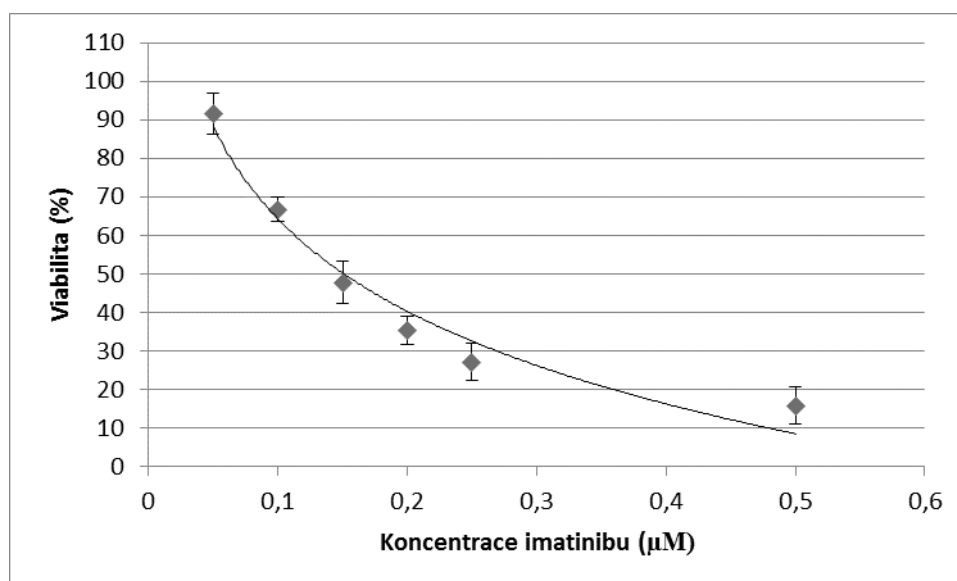
Obrázek 8 Korelace mezi změnou BCR-ABL a změnou exprese miR-29 při 2. měření.

5.2 K562 jako model CML

Pro studium CML byla vybrána modelová buněčná linie K562, která byla odvozena z buněk 53 leté pacientky s CML v terminální blastické krizi. K562 buňky jsou multipotenciální hematopoetické maligní buňky, které spontánně diferencují na rozpoznatelné progenitory řady erytrocytů, granulocytů a monocytů. Buňky obsahují Philadelphský chromozom a jsou tedy BCR-ABL pozitivní [136].

5.2.1 Stanovení toxicity imatinibu na K562 buněčné linii

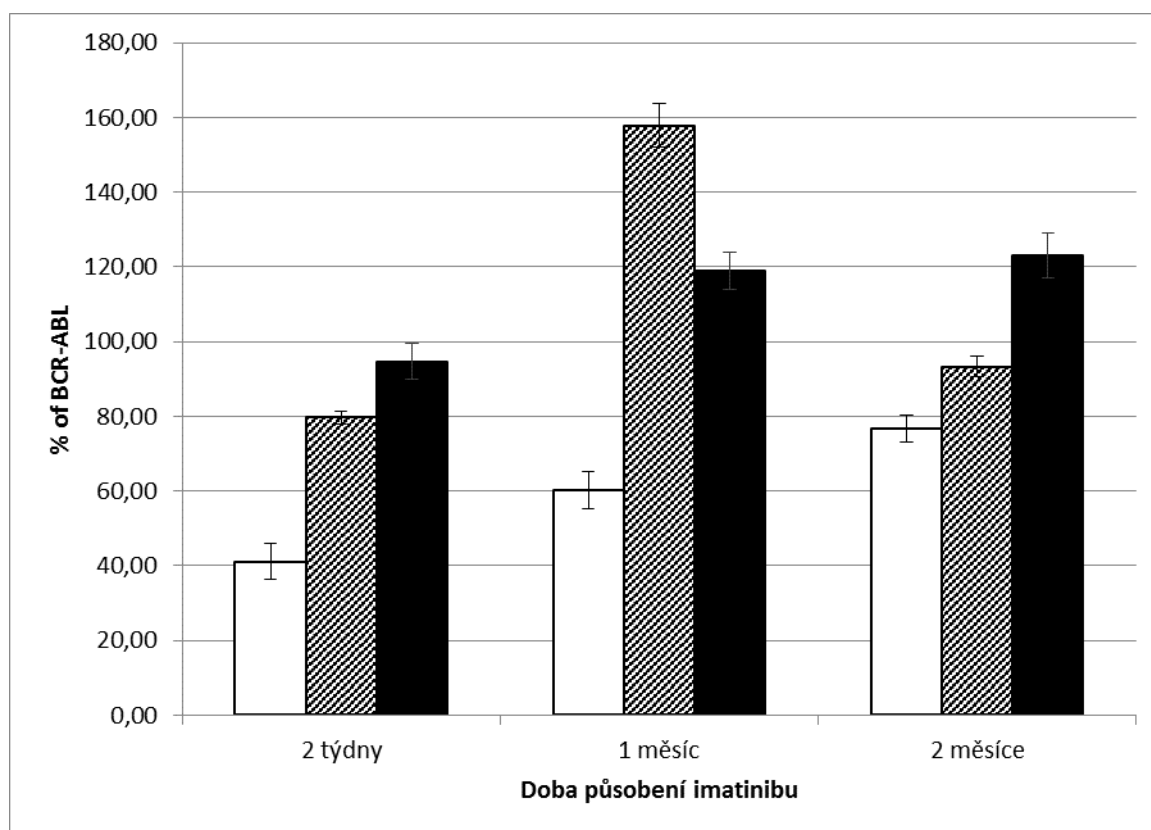
První cíl naší studie bylo zjistit, jestli jsou buňky K562 citlivé na imatinib, což je inhibitor tyrozin kináz a zároveň jeden z nejúčinnějších léků používaných v léčbě CML. Byla stanovena koncentrační řada imatinibu v koncentracích 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 a 0,5 μM . Buňky byly vystaveny působení imatinibu po dobu 48 h. V kratších časech nedocházelo k relevantní odezvě viability buněk. Po 48 hodinách byla změřena viabilita buněk pomocí MTT testu. Výsledné body byly proloženy spojnici trendu a z rovnice regrese byla vypočítána hodnota IC_{50} , která vyšla 0,15 μM . Pro následné experimenty byly použity vždy dvě koncentrace imatinibu 0,05 a 0,15 μM , viz Obrázek 9.



Obrázek 9 Toxicita imatinibu po 48 hodinách na K562 buněčné linii. Data jsou průměrem ze čtyř nezávislých experimentů a doplněny o směrodatné odchylky.

5.2.2 Stanovení hladiny BCR-ABL na K562 buněčné linii

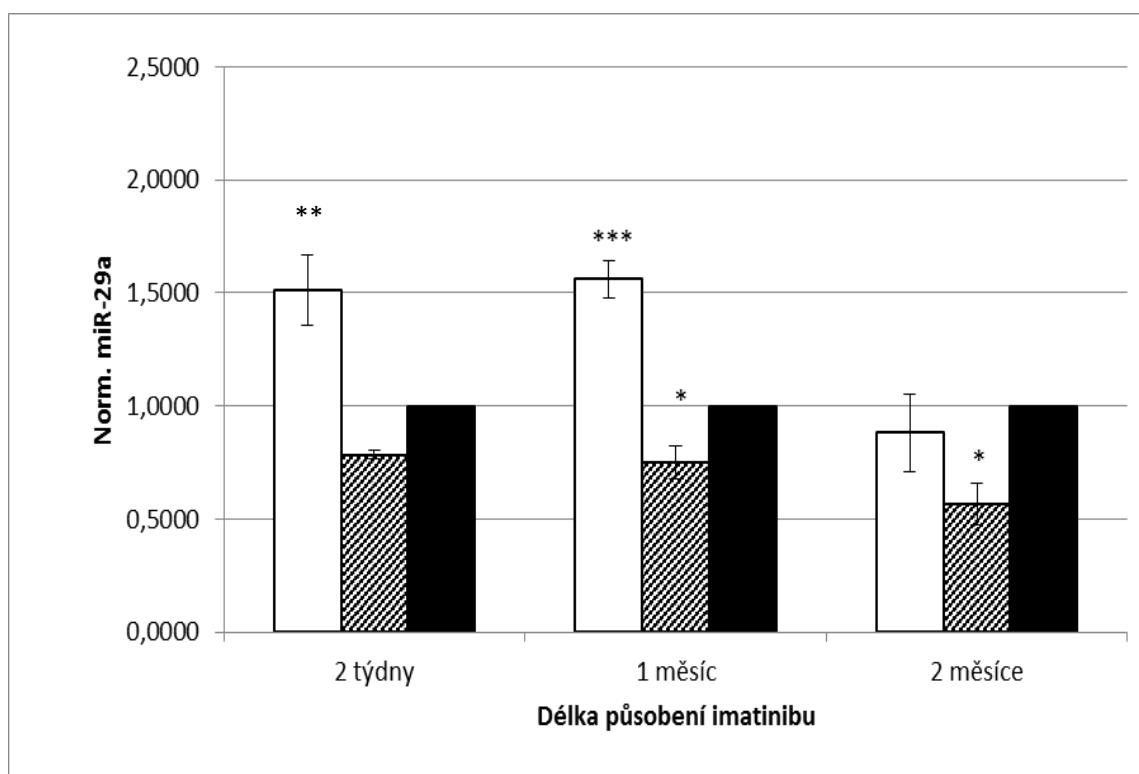
Informace týkající se obsahu BCR-ABL v K562 buněčné linii se liší napříč publikacemi. Proto jsme se rozhodli stanovit hladinu BCR-ABL u našich konkrétních buněk a experiment jsme doplnili o působení imatinibu. Buňky byly vystaveny působení imatinibu v koncentracích 0,05 a 0,15 μM po dobu dvou měsíců. Ve třech časových intervalech byly odebrány suspenze buněk a analyzován obsah BCR-ABL. U kontrolních buněk ošetřených pouze rozpouštědlem DMSO lze vidět relativně stabilní hladinu BCR-ABL. Koncentrace 0,05 μM vedla ke snížení hladiny BCR-ABL, přičemž postupem času opětovně narůstala. Zajímavý nárůst a následný pokles BCR-ABL byl sledován při použití 0,15 μM imatinibu viz Obrázek 10.

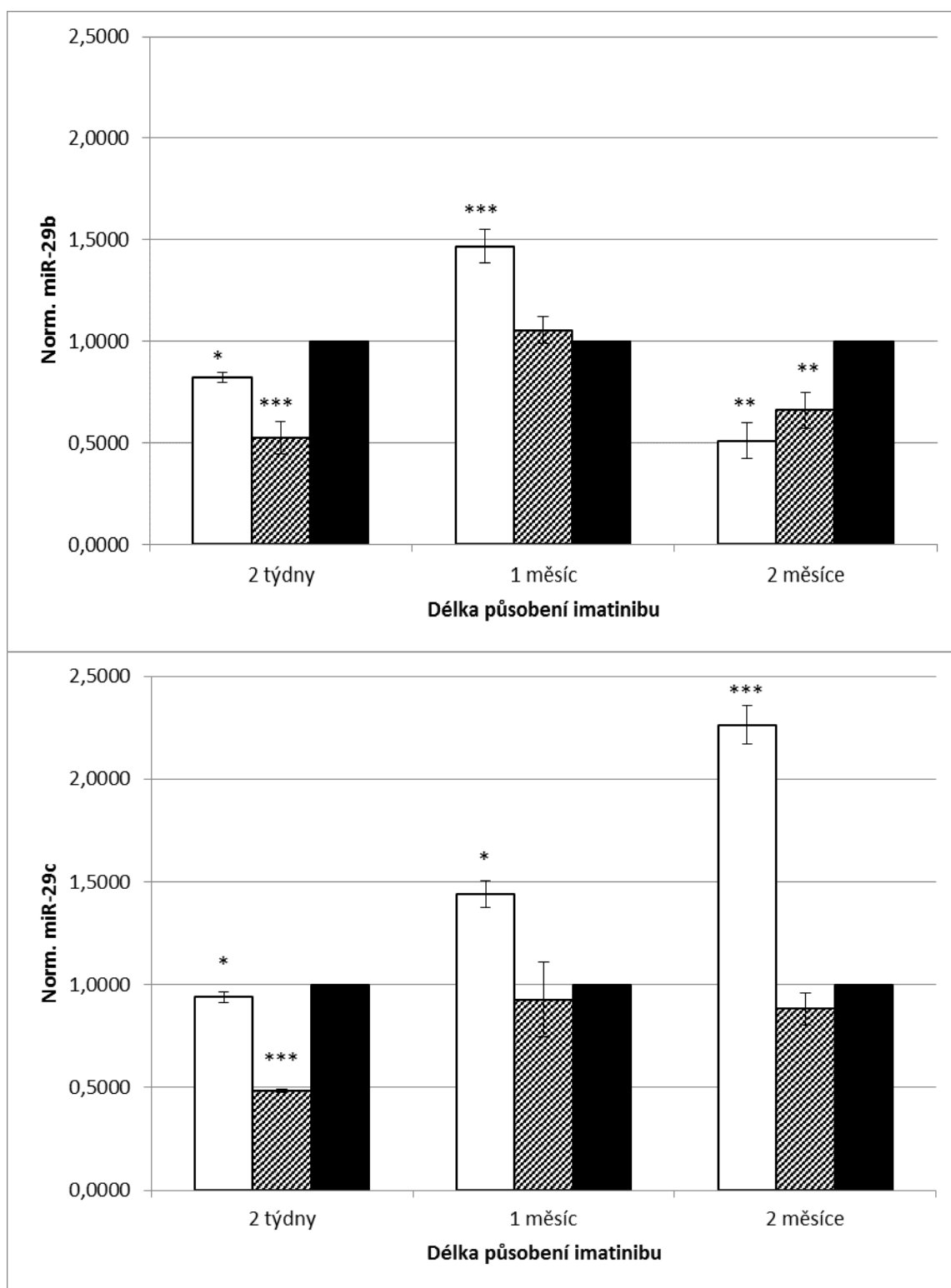


Obrázek 10 Hladina BCR-ABL u K562 buněčné linie po působení imatinibem. Koncentrace imatinibu: bílý sloupec – 0,05 μM , pruhovaný sloupec – 0,15 μM a tmavý sloupec pouze DMSO.

5.2.3 MiR-29 u K562

Tak jako při analýze BCR-ABL nás zajímaly hladiny exprese rodiny miR-29. Byly proto provedeny totožné experimenty, kdy byly buňky vystaveny působení imatinibu v koncentracích 0,05 a 0,15 μM po dobu dvou měsíců. Ve třech časových intervalech byly odebrány suspenze buněk, izolována RNA a analyzována hladina exprese jednotlivých miR-29, přičemž buňky ošetřené pouze rozpouštědlem DMSO byly využity jako kontrola pro normalizaci hladin. U miR-29b lze vidět při použití imatinibu nárůst po jednom měsíci a následný pokles. Tento trend je podobný jako u měření hladiny BCR-ABL. Hladina exprese mi-29c při použití koncentrace 0,05 μM roste s rostoucí dobou působení a po dvou měsících se takřka zdvojnásobí, viz Obrázek 11.



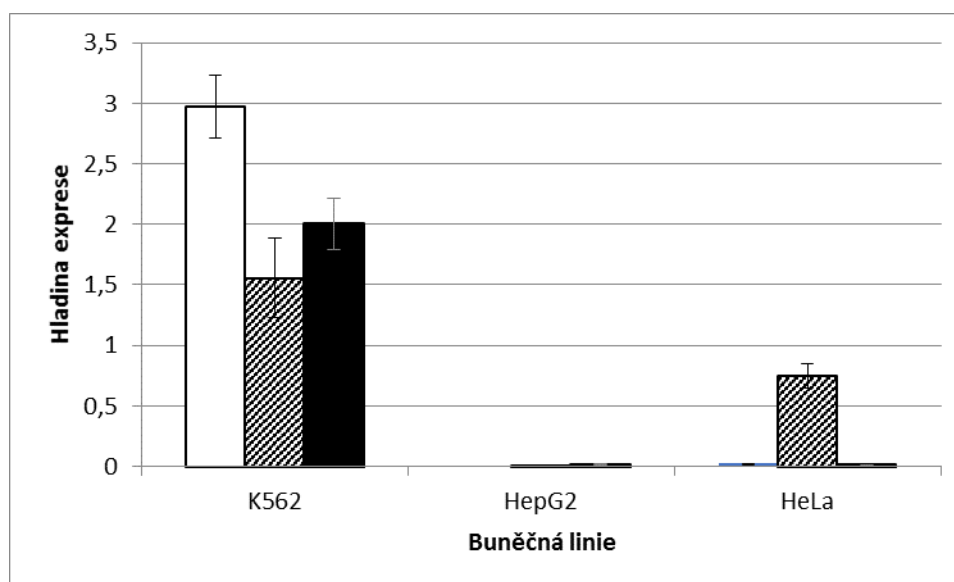


Obrázek 11 Hladiny exprese uvedených miR-29 u K562 buněčné linie po působení imatinibem. Byly nalezeny signifikantní rozdíly mezi označenými sloupci a kontrolou pro daný časový interval expozice imatinibu. * 0,05; ** 0,01 a *** 0,001. Koncentrace imatinibu: bílý sloupec – 0,05 μM , pruhovaný sloupec – 0,15 μM a tmavý sloupec pouze DMSO.

5.2.4 Kyselina all-trans retinová

Kyselina all-trans retinová (ATRA) je derivát vitamínu A a je jedním z možných chemoterapeutik díky své schopnosti indukovat signály pro buněčnou diferenciaci, inhibici proliferace buněk nebo apoptózu. V kombinaci s jinými terapeutickými metodami má aditivní a synergické účinky v protinádorové léčbě. ATRA se v buňkách váže na retinoidní receptor, který ovlivňuje transkripci cílových genů [131].

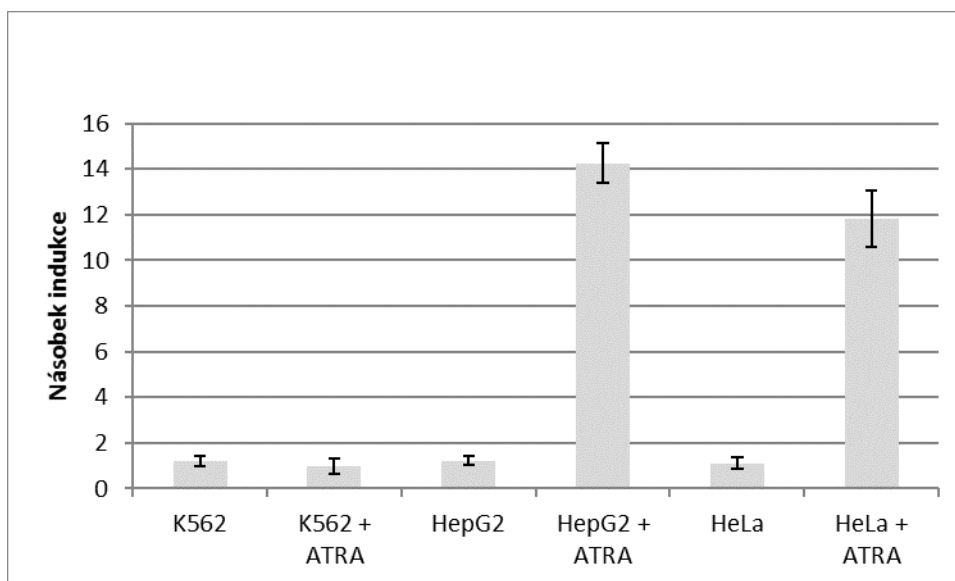
V našem pilotním experimentu jsme sledovali vliv ATRA na expresi miR-29 u jednotlivých buněčných linií. Působením kyseliny all-trans retinové došlo k navýšení hladiny exprese miR-29 u K562 buněčné linie. U HepG2 a HeLa buněčné linie došlo ke snížení hladiny exprese miR-29, viz Obrázek 12. Tento výsledek naznačuje korelaci aktivity BCR-ABL a retinoidního receptoru.



Obrázek 12 Hladiny exprese rodiny miR-29 u jednotlivých buněčných linií po působení kyselinou all-trans retinovou. Na buňky působila kyselina all-trans retinová o koncentraci 100 μ M po dobu 24 h. Jako kontrola posloužily buňky neošetřené kyselinou all-trans retinovou. Bílý sloupec – miR-29a, pruhovaný sloupec – miR-29b, tmavý sloupec – miR-29c

Přítomnost retinoidního receptoru v buněčných liniích jsme ověřili transfekcí plazmidu RARE-luc, který nese vazebné místo pro retinoidní receptor a gen pro luciferasu. Jeho

aktivitu jsme podpořili přidáním kyseliny all-trans retinové (ATRA). V HepG2 a HeLa buněčných liniích je retinoidní receptor aktivní, v K562 nikoli, viz Obrázek 13.



Obrázek 13 Transkripční aktivita retinoidního receptoru u jednotlivých buněčných linií.

5.3 Vliv miR-29 na toxicitu etoposidu v HeLa buněčné linii

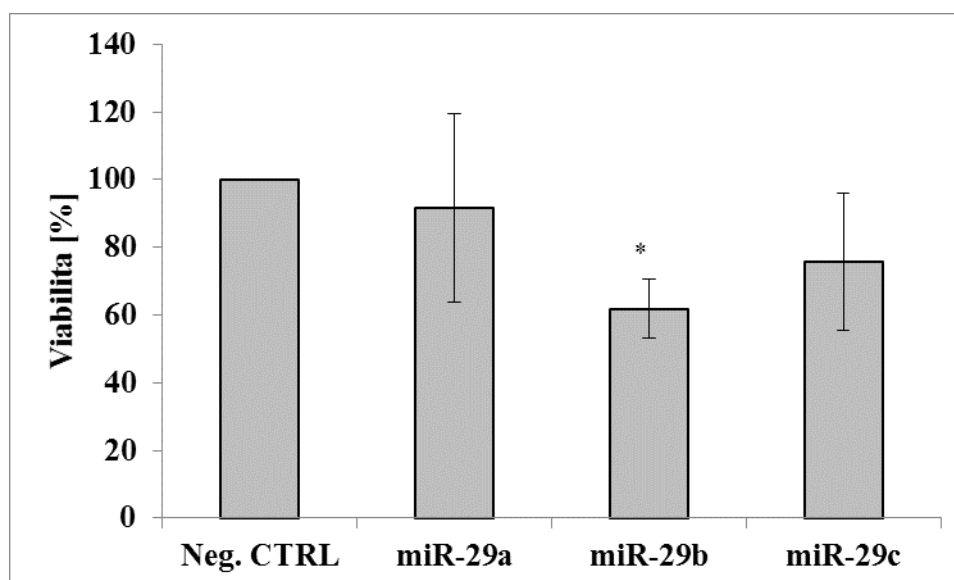
5.3.1 MiR-29b zvyšuje toxicitu etoposidu v HeLa buněčné linii

Jak již bylo zmíněno výše, exprese rodiny miR-29 bývá u nádorových onemocnění zpravidla snížena [121, 137]. Jejich schopnost chovat se jako nádorové supresory podporuje naši hypotézu možného využití rodiny miR-29 k léčbě nádorových onemocnění. Proto jsme se rozhodli vyhodnotit účinek prekurzorů rodiny miR-29 na léčbu etoposidem na HeLa buněčné linii. Vybrali jsme HeLa buněčnou linii, jelikož je to dlouho používaný a dobře známý buněčný model. HeLa buňky exprimují všechny tři členy rodiny miR-29. Nejnižší hladina exprese byla zjištěna u miR-29b, miR-29c byla exprimována 2-3x více než hladina miR-29b a hladina miR-29a byla 20-30x vyšší než hladina miR-29b. Podobná data publikoval také Hwang a kolektiv v roce 2007 [7]. Jednoduchou transfekcí s použitím Lipofectaminu 2000 a pre-miR-29 byla zvýšena hladina jednotlivých miR-29 řádově tisíckrát s výjimkou miR-29a, která se přirozeně vyskytuje v HeLa buňkách ve vyšších hladinách, viz Tabulka 9.

Tabulka 9 Expresa miR-29 v HeLa buňkách po transfekci.

| Vzorek RNA | miRNA | Expresa |
|-------------------|----------------|----------------|
| netransf. | miR-29a | 1,00 |
| transf-29a | miR-29a | 625,37 |
| netransf. | miR-29b | 1,00 |
| transf-29b | miR-29b | 1221,05 |
| netransf. | miR-29c | 1,00 |
| transf-29c | miR-29c | 1205,79 |

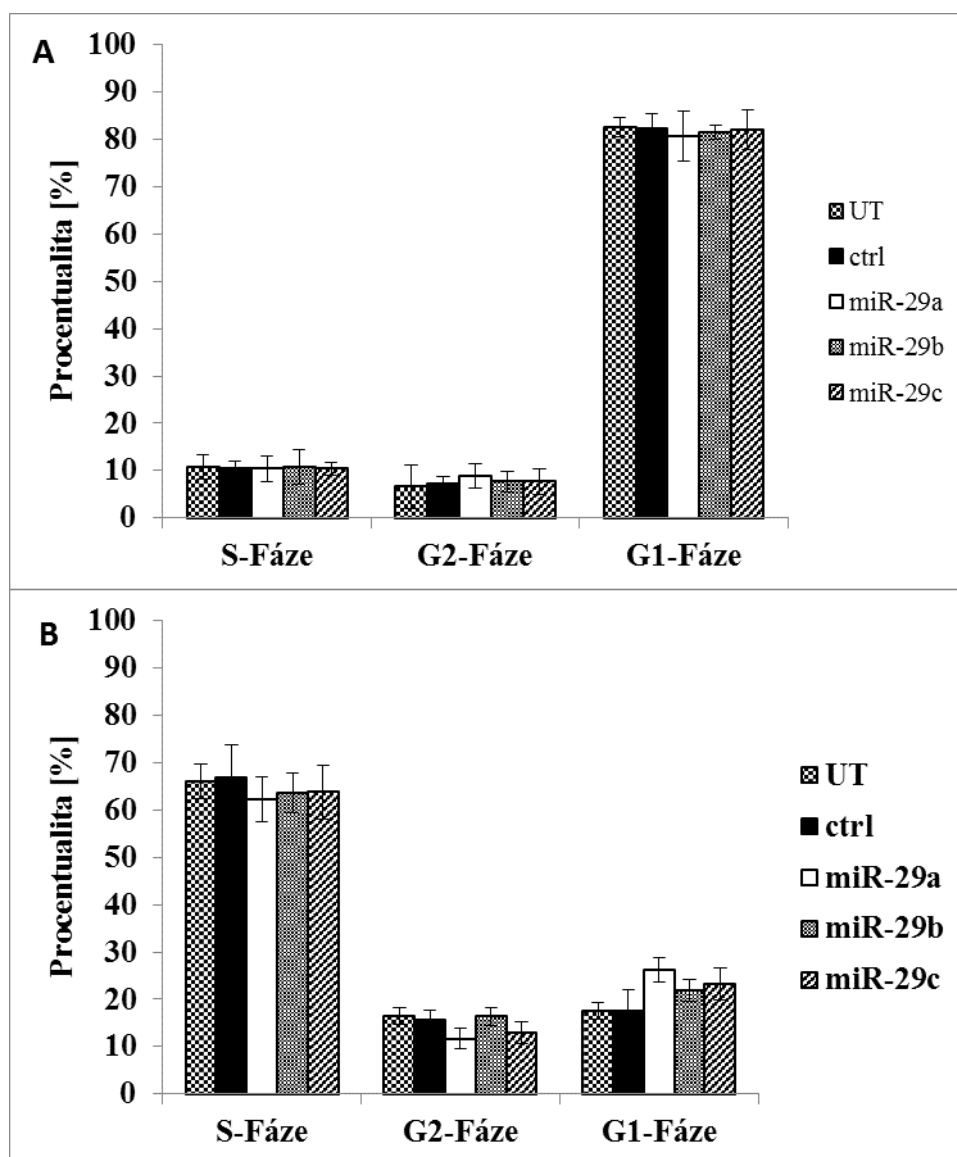
Koncentrace etoposidu, kterou jsme použili, je 60 μ M a odpovídá hodnotě IC₅₀, která byla stanovena v předchozí studii [135]. Abychom mohli sledovat průběžné účinky etoposidu na buňkách, využili jsme xCELLigence systém se šestnácti jamkami. Bylo zjištěno, že miR-29b signifikantně navyšuje toxicitu etoposidu, viz Obrázek 14. Podobný efekt byl pozorován také v experimentu Lucie Kubienové [138]. Jelikož změny, které způsobují miR-29a a miR-29c nejsou signifikantní, zaměřili jsme se v dalších experimentech na odhalení mechanismu miR-29b na toxicitu etoposidu.



Obrázek 14 Efekt členů rodiny miR-29 na toxicitu etoposidu. HeLa buňky byly transfekovány (4h) prekurzory miR-29 nebo negativní kontrolou. Potom byly buňky ošetřeny 60 μ M etoposidem (24 h po transfekci) a inkubovány dalších 48 h. Viabilita byla spočítána z oblasti pod křivkou, jak je uvedeno v experimentální části této disertační práce. Každý sloupec reprezentuje průměrnou hodnotu \pm SD ze čtyř nezávislých experimentů. V každém experimentu bylo měřeno v triplikátech. * $p < 0,05$

5.3.2 MiR-29b neovlivňuje buněčný cyklus

Etoposid mění distribuci fází buněčného cyklu. Většinou blokuje buňky v S fázi buněčného cyklu, což je efekt podobný účinkům inhibice topoizomerázy II. Proto jsme testovali, zdali může rodina miR-29 ovlivňovat změny distribuce fází buněčného cyklu sama nebo v kombinaci s etoposidem. Pro analýzu metodou průtokové cytometrie jsme použili standardní protokol s propidium jodidem, který umožňuje rozlišit jednotlivé fáze buněčného cyklu na základě rozdílného množství DNA v buňkách. Naše data ukázala, že rodina miR-29 neovlivňuje distribuci fází buněčného cyklu. Stejně tak rodina miR-29 neovlivňuje distribuci fází buněčného cyklu ovlivněné etoposidem, viz Obrázek 15. Etoposid je v tomto experimentu jediná látka ovlivňující buněčný cyklus a zvýšená toxicita je pravděpodobně způsobena jinými efekty.



Obrázek 15 Vliv rodiny miR-29 na distribuci fází buněčného cyklu. Byly připraveny dvě sady vzorků. V každé sadě byly buňky transfekovány (4h) prekurzory miR-29 nebo negativní kontrolou. Panel A – transfekované buňky rostly 48 hodiny bez přidání etoposidu. Panel B – transfekované buňky byly po 24 h ošetřeny přidáním 60 μ M etoposidu a inkubovány dalších 24h.

5.3.3 MiR-29 ovlivňuje expresi proteinu Mcl-1 v HeLa buněčné linii

Jak bylo zmíněno výše, rodina miR-29 ovlivňuje mnoho proteinů. Jedním z nich je Mcl-1 protein, který je členem rodiny Bcl-2 a díky tomu je významným regulátorem proliferace a apoptózy [15]. V mnoha případech nádorů byla zjištěna deregulace genové exprese tohoto

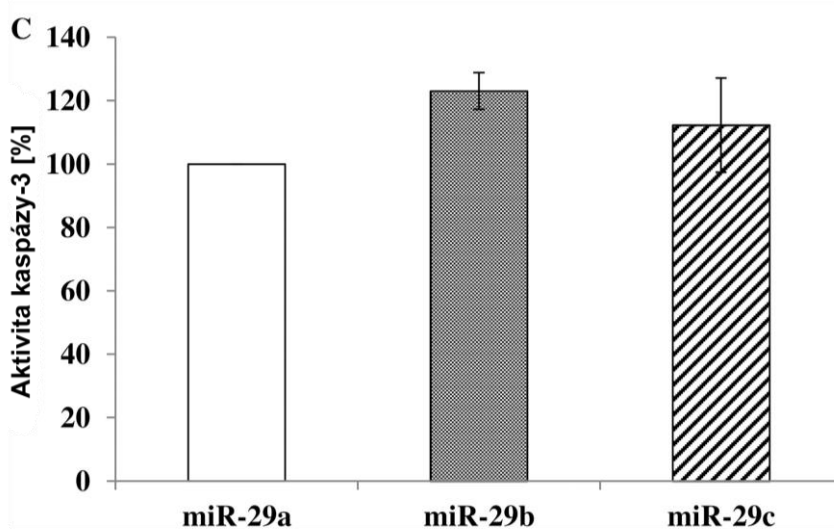
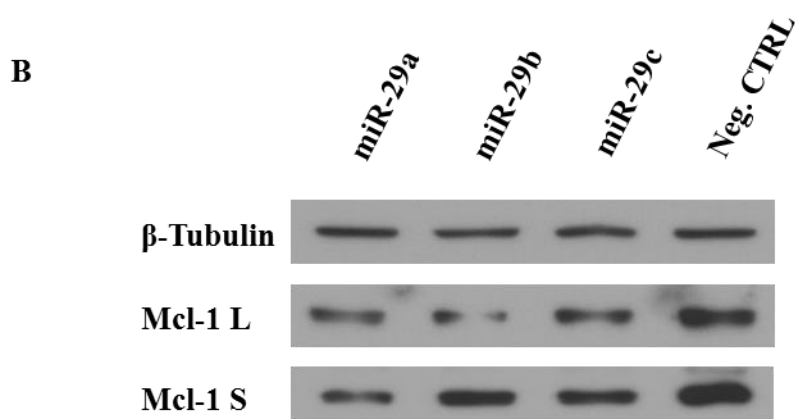
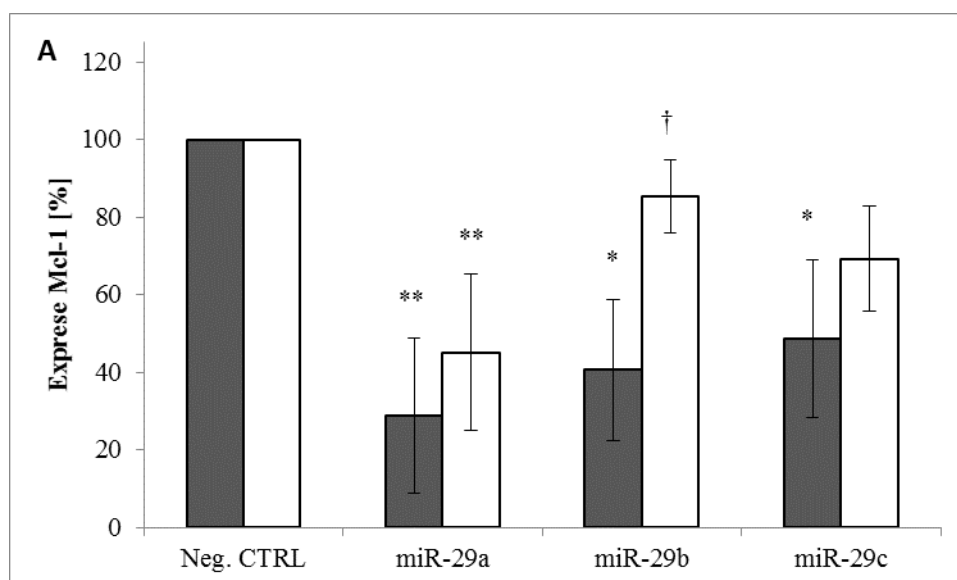
proteinu [139, 140]. Existují tři známé varianty tohoto proteinu: Mcl-1L (dlouhá varianta), Mcl-1S (krátká varianta) a Mcl-1ES (extrakrátká varianta). Zatímco Mcl-1 je známý cílový protein miR-29, protein Bak je pouze předpokládán cíl nepodložený žádnými studiemi.

V našem experimentu jsme testovali, zdali rodina miR-29 ovlivňuje expresi proteinů Mcl-1L, Mcl-1S nebo Bak. HeLa buňky byly opět transfekovány prekurzory miR-29 a inkubovány v přítomnosti etoposidu po dobu 48 h. Celé buněčné lyzáty byly využity pro imunodetekci Mcl-1L, Mcl-1S, Bak, aktinu a β -tubulinu. Výsledky ukázaly signifikantní snížení exprese proteinu Mcl-1L všemi třemi miR-29. Signifikantní snížení Mcl-1S bylo zjištěno pouze u miR-29a viz Obrázek 16 A. Výsledek vlivu jednotlivých miR-29 na exprese proteinů Mcl-1L a Mcl-1S lze vyjádřit také poměrem Mcl-1L/Mcl-1S. Signifikantní poměr Mcl-1L/Mcl-1S byl zjištěn pouze u miR-29b viz Tabulka 10. Expresi proteinu Bak rodina miR-29 nijak neovlivňovala.

Změna poměru Mcl-1L/Mcl-1S ovlivňuje buněčnou apoptózu [70], proto jsme v našem experimentu testovali změnu aktivity kaspázy-3 v souvislosti s rodinou miR-29. Naše výsledky neukázaly signifikantní změny, nicméně miR-29b souvisí očividně s vyšší hladinou apoptózy. Kromě toho buňky transfekované miR-29b vykazovaly statisticky signifikantně nižší obsah proteinu v čase měření aktivity kaspázy-3, což podporuje myšlenku, že většina buněk již byla v tomto momentě mrtvá.

Tabulka 10 Poměr exprese Mcl-1L/Mcl-1S detekovaných v HeLa buňkách transfekovaných odpovídajícími prekurzory miR-29.

| | Mcl-1L/Mcl-1S |
|---------|---------------|
| miR-29a | 0,87 |
| miR-29b | 0,47* |
| miR-29c | 0,70 |



Obrázek 16 Změny exprese Mcl-1 způsobené prekurzory rodiny miR-29. HeLa buňky byly transfekovány (4 h) prekurzory miR-29 nebo negativní kontrolou. Potom byly buňky

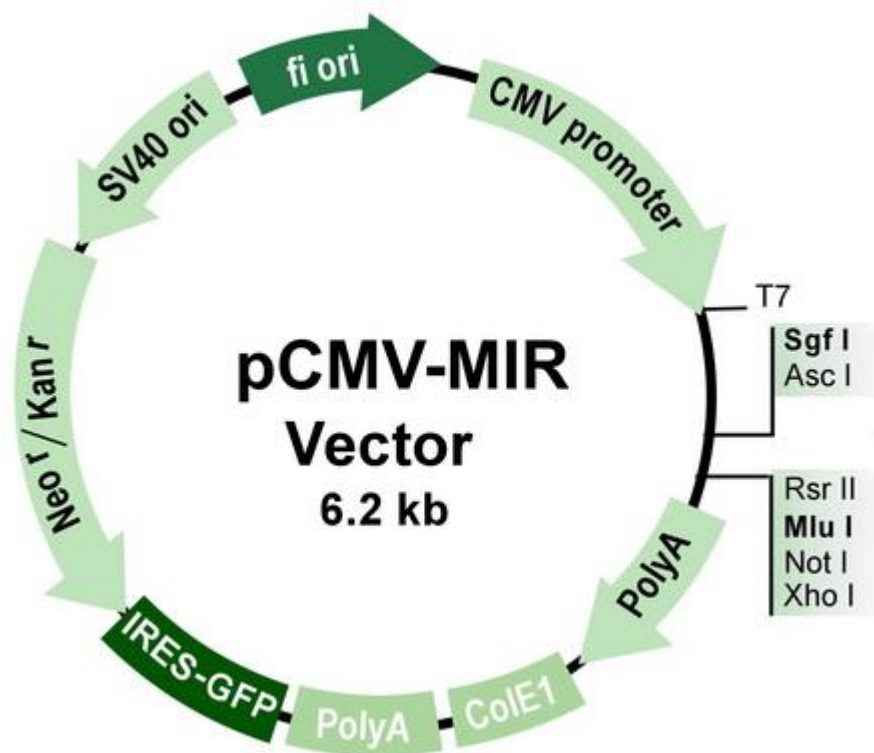
lyzovány a připraveny pro analýzu Western blot za použitím anti-Mcl-1 protilátek. Panel A: Šedý sloupec reprezentuje intenzitu Mcl-1L bandu vs. β -tubulin a bílý sloupec reprezentuje intenzitu Mcl-1S bandu vs. β -tubulin. Data jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů. * $p < 0,05$ (** $p < 0,01$) vs. negativní kontrola, † $p < 0,05$ vs. miR-29a. Panel B: Reprezentativní western blot. Panel C: Relativní aktivita kaspázy-3 detekované v HeLa buňkách transfekovaných odpovídajícími prekurzory miR-29. Data jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů, přičemž relativní aktivita kaspázy-3 u buněk transfekovaných miR-29a byla zvolena jako 100 %.

5.4 Transfekce „single-cell“ elektroporací savčích buněk

Tradičně využívané metody transfekce buněk a následné pozorování buněčného chování na úrovni celé populace buněk může maskovat individuální vlastnosti buňky, což může vést k zavádějícím nebo nedostatečným biologickým výsledkům. Nová metoda transfekce - „single-cell“ elektroporace umožňuje transfekci předem vybrané konkrétní buňky. Tato technika je jedinečná díky tomu, že umožňuje sledovat změny volané vloženými geny na úrovni jedné buňky nikoli celé populace a v kombinaci s mikroskopem lze sledovat změny v čase přímo *in situ*. Tuto metodu lze využít pro vpravení cizorodé DNA obsahující zájmové geny ve formě DNA oligonukleotidů, siRNA nebo plazmidových vektorů [141-143].

5.4.1 Transfekce „single-cell“ elektroporací expresními plazmidy

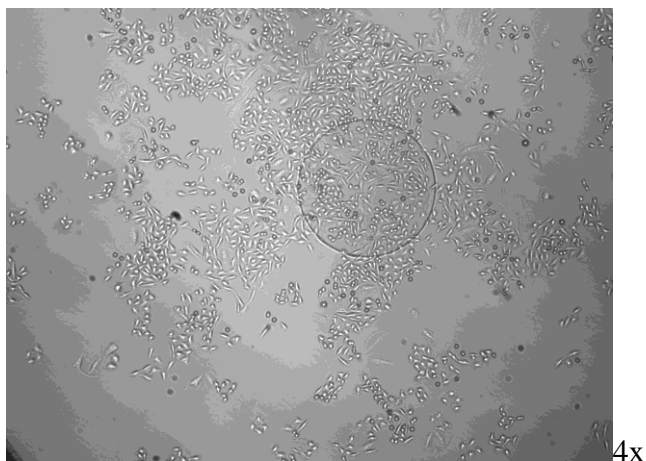
K experimentu byla využita CHO-K1 buněčná linie, vzhledem k ověřeným experimentům a zkušenostem daného pracoviště s těmito buňkami [144]. Naším cílem bylo do buněk vpravit miRNA expresní vektor, což je plazmid, který obsahuje prekurzory pro každou miRNA z rodiny miR-29, miR-150 nebo prázdný kontrolní vektor. Vektor dále obsahuje gen pro zelený fluorescenční protein - GFP, díky kterému lze sledovat účinnost transfekce ve fluorescenčním mikroskopu, viz Obrázek 17



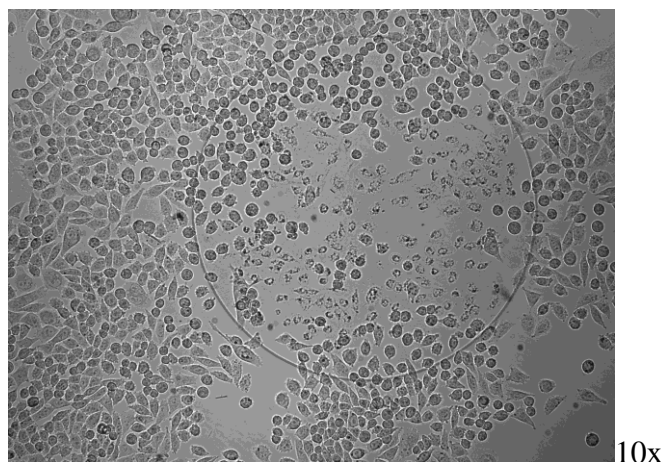
Obrázek 17 Expresní vektor nesoucí prekurzory pro miRNA a pro GFP.

Bylo využito 20 jednokondenzátorových čipů, přičemž experiment byl proveden 6x. Transfekce byla pro každý plazmid provedena 20x (plazmid miR-29a, miR-29b, miR-29c, jako kontrola byl vybrán plazmid s miR-150 a prázdný pCMV plazmid). Prakticky ve všech experimentech byl negativní výsledek po transfekci, tzn. ve fluorescenčním mikroskopu nebyly nalezeny buňky exprimující GFP, transfekce tedy nebyla úspěšná viz Obrázek 18.

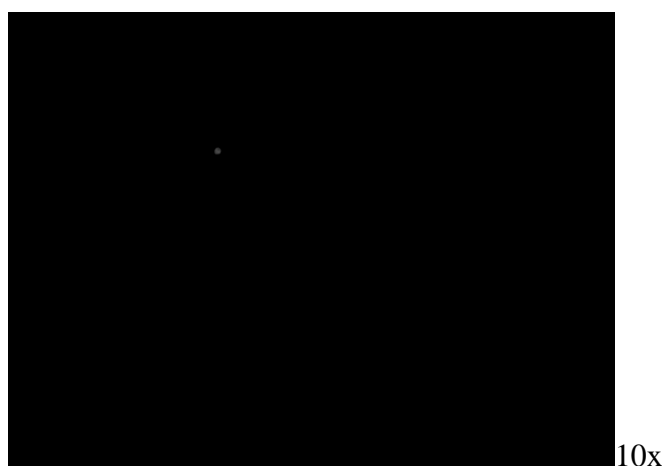
A



B



C



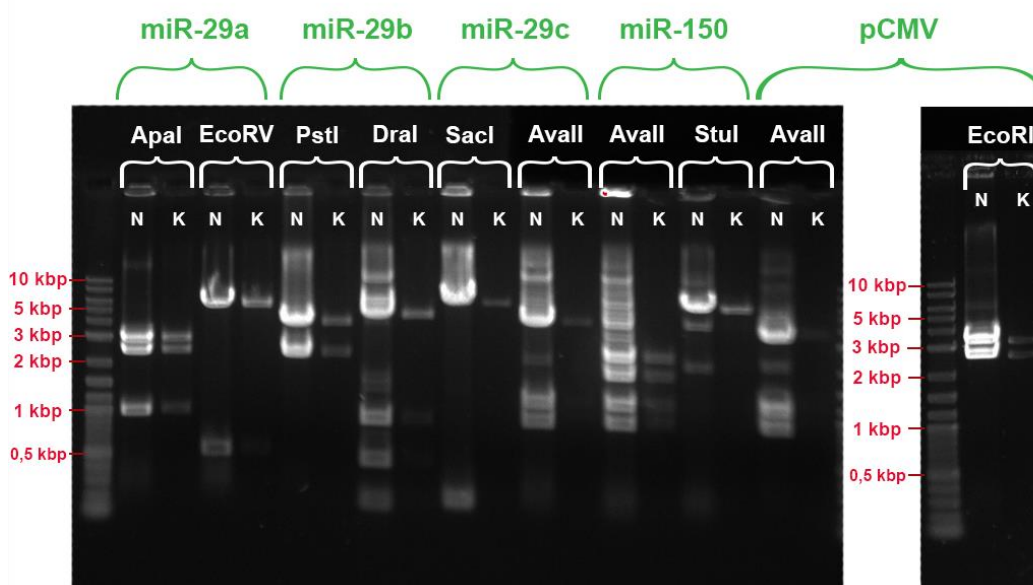
Obrázek 18 Reprezentativní fotografie CHO-K1 buněk na čipu. A: Buňky na čipu před elektroporací v průchozím světle, B: buňky na čipu po elektroporaci kontrolním plazmidem pCMV v průchozím světle, C: buňky na čipu po elektroporaci kontrolním plazmidem pCMV v UV světle.

5.4.2 Namnožení a následná kontrola plazmidů

Abychom si ověřili, jestli jsou zakoupené plazmidy v pořádku, bylo provedeno jejich namnožení, izolace a následná kontrola restričním štěpením a sekvenováním.

Tabulka 11 Velikosti produktů štěpení expresních plazmidů restričními enzymy.

| | Restriční enzym | Očekávaná velikost produktů (bp) |
|---------|-----------------|-----------------------------------|
| miR-29a | Apal | 1058; 2591; 3157 |
| | EcoRV | 572; 6234 |
| miR-29b | PstI | 2480; 4361 |
| | DraI | 25; 210; 527; 985; 5094 |
| miR-29c | SacI | 247; 6611 |
| | AvaII | 1073; 1114; 2187; 4671 |
| miR-150 | AvaII | 405; 938; 1073; 2011; 2416; 4411 |
| | StuI | 2278; 4549 |
| pCMV | AvaII | 733; 1073; 1810; 4409; 5146; 5482 |
| | EcoRI | 2762; 3457 |

**Obrázek 19** Restriční analýza plazmidů. N – namnožené plazmidy, K – komerční plazmidy.

Byly namnoženy a izolovány plazmidy pCMV-miR-29a, pCMV-miR-29b, pCMV-miR-29c, pCMV-miR-150 a pCMV, identita komerčních i namnožených plazmidů byla potvrzena restriční analýzou. Čistota DNA byla ověřena spektrofotometricky poměrem absorbancí, $A_{260/280} = 1,8-2$. Velikosti fragmentů štěpené DNA odpovídají teoretickým hodnotám viz Tabulka 11, Obrázek 19. Potvrzení identity insertu bylo provedeno sekvenováním.

5.4.3 Transfekce plazmidů do jiných buněčných linií alternativními metodami

Jelikož výsledek restriční analýzy a sekvenace inzertů plazmidů dopadl v pořádku, zaměřili jsme se při transfekcích na jiné buněčné linie a jiné způsoby transfekcí:

Použité buněčné linie a uvedené metody transfekce:

- K562 (Amaxa)
- HeLa (Lipofectamin 2000, Fugene 6)
- CHO (Lipofectamin 2000, Fugene 6)
- HepG2 (Lipofectamin 2000)
- 293T (Fugene 6)

Ve všech uvedených typech experimentů byly negativní výsledky, tedy při sledování ve fluorescenčním mikroskopu nebyly zviditelněny buňky exprimující GFP. Pro porovnání účinnosti s prekurzory miRNA byla provedena kvantifikační analýza na HeLa buněčné linii pomocí real-time PCR, viz Tabulka 12. Účinnost transfekce pomocí plazmidů je nulová oproti transfekci za použití prekurzorů miRNA.

Tabulka 12 Kvantifikace miRNA real-time PCR metodou.

| HeLa | UT | Negativní kontrola | Plazmid miR-29a | Pre-miR-29a | Plazmid miR-29b | Pre-miR-29b | Plazmid miR-29c | Pre-miR-29c |
|---------|------|--------------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| miR-29a | 1,00 | 0,97 | 1,51 | 1573,97 | - | - | - | - |
| miR-29b | 1,00 | 0,87 | - | - | 1,70 | 1444,17 | - | - |
| miR-29c | 1,00 | 0,88 | - | - | - | - | 2,09 | 3161,60 |

6. DISKUSE

Ve své disertační práci jsem se věnovala především expresi miR-29 a její biologické aktivitě. Jelikož se jedná o významnou rodinu mikroRNA zapojující se do mnoha důležitých biologických procesů v buňce, přístupů zkoumání těchto molekul může být mnoho. Jedním z nich je zmapovat jejich funkce u nádorových onemocnění, například u chronické myeloidní leukémie jako v našem případě. S tím souvisí hledání vhodného kandidáta pro *in vitro* experimenty, jako je například K562. V neposlední řadě je to všeobecná schopnost mikroRNA ovlivňovat toxicitu xenobiotik, v našem příkladu protinádorového léčiva etoposidu. Tyto experimenty jsme doplnili také o hledání nových přístupů zkoumání, jakým je „single-cell“ elektroporace buněk.

6.1 Exprese miR-29

MikroRNA jsou krátké molekuly RNA, které posttranskripčně regulují genovou expresi a tím se stávají kritickými molekulami v mnoha buněčných procesech. Dnes je již všeobecně známo, že se nezvyklé hladiny expresí mikroRNA podílejí na mnoha důležitých procesech v buňkách, které ovlivňují tvorbu nádorů. Rodina miR-29 se skládá ze tří izoform (a, b, c) a hraje důležitou roli napříč mnoha buněčnými procesy od diferenciace, ovlivňování imunitní odpovědi, vytváření struktur extracelulární matrix, přes buněčnou proliferaci až k apoptóze [39].

Pilotní experiment v mojí diplomové práci odhalil chronickou myeloidní leukémii jako vhodného kandidáta pro výzkum rodiny miR-29. U všech tří miR-29 byla zjištěna signifikantně nižší hladina exprese ve srovnání s pacienty s chronickou lymfocytární leukémií. Tyto výsledky jsou v souladu s několika publikacemi. Li a kolektiv zjistil signifikantně sníženou hladinu exprese miR-29b u pacientů s CML [114] a José-Enériz a kolektiv publikovali sníženou hladinu exprese miR-29a a miR-29c a dalších 16 miRNA u pacientů s CML [145].

V disertační práci jsme soubor pacientů rozšířili na počet 27 a naším cílem bylo sledovat změnu hladiny exprese miR-29 v souvislosti s odpovědí na léčbu imatinibem. Měření proběhla vždy při stanovení diagnózy, poté několikrát v průběhu léčby a nakonec zpravidla

při dosažení remise pacienta. Současně byla měřena hladina BCR-ABL jako hlavní parametr odpovědi na léčbu imatinibem. Z výsledků je patrné, že u BCR-ABL došlo k signifikantně rychlejší změně k normálním hodnotám, tj. 0% BCR-ABL detekovaných u pacienta, než tomu bylo u miR-29.

Při sledování změny exprese rodiny miR-29 ve třech měřeních (při diagnóze, po 2 – 3 měsících léčby a při posledním měření) s věkem pacienta a indexem dle Sokala nebyla prokázána signifikantní závislost.

Ve studii Li a kolektivu byla publikována informace o tom, že cílovou molekulou miR-29b je také ABL1. Zvýšená exprese miR-29b u K562 buněk vedla k redukci BCR-ABL mRNA a proteinu díky vazbě na 3'UTR oblast ABL1. Současně bylo potvrzeno, že miR-29 potlačuje buněčnou proliferaci a indukuje apoptózu [114]. Tyto výsledky mohou mít význam pro budoucí léčbu CML, jelikož se stále častěji objevuje rezistence vůči imatinibu a nalezení nového terapeutického přístupu je v současnosti nejdůležitějším úkolem týkající se tohoto onemocnění. V našem souboru pacientů nebyla mezi BCR-ABL a hladinou exprese miR-29a resp. miR-29b zjištěna signifikantní závislost. Mezi BCR-ABL a hladinou exprese miR-29c byla zjištěna slabě pozitivní korelace. Nicméně při sledování změny BCR-ABL a miR-29b resp. miR-29c při 2. měření byla prokázána signifikantní negativní korelace. Zároveň je však v našem experimentu snížena hladina již působením imatinibu, nelze se tedy vyjádřit k možnému efektu miR-29 na BCR-ABL, který může být tímto maskován. Nicméně z výsledků je zřejmé, že hodnoty BCR-ABL poměrně rychle klesají, zatímco exprese miR-29 spíše osciluje, tj. že se hodnoty zvyšují a zase snižují, ale exprese se také vcelku snižuje.

Zajímavý trend, který je nejvíce patrný u miR-29a, ale lze ho nalézt i u miR-29b a miR-29c, je viditelná nízká hladina exprese miR-29 při diagnóze, která při 2. měření roste a při posledním měření opět klesá, vrací se k hodnotě srovnatelné se zdravými buňkami. Tyto výsledky naznačují, že v průběhu léčby imatinibem, kdy dochází k inhibici BCR-ABL dochází zároveň k aktivaci transkripce miR-29, která potenciálně funguje jako nádorový supresor a napomáhá apoptóze. Při posledním měření je zpravidla hladina BCR-ABL na 0%, čímž se buňky chovají jako zdravé buňky a hladina miR-29 je opět v normálu. Otázkou je, kterým mechanismem může docházet k vybuzení exprese miR-29 v odpovědi na léčbu imatinibem. Signální dráhy, které ovlivňuje BCR-ABL a zároveň působí na expresi miR-29 je

hned několik, může to být například JAK/STAT dráha, Hedgehog/Gli dráha, CEPBA dráha, C-myc dráha, NF- κ B dráha nebo úplně jiná dosud neobjevená signální dráha. S ohledem na regulaci exprese miR-29 vlivem C-myc, se jeví tato signální dráha jako nejpravděpodobnější. Objevení tohoto mechanismu může významně přispět k pochopení jak rezistence buněk vůči imatinibu, tak i k nalezení nových léčebných přístupů v tomto onemocnění. Je to tedy slibný objev naznačující cestu smysluplných experimentů v budoucnu.

6.2 K562 jako model CML

Výsledky, které jsme získali při studii na pacientech, jsme chtěli ověřit také na experimentech in vitro, proto jsme hledali vhodný buněčný model pro tento typ zkoumání. Jako nejvhodnější se zdála být buněčná kultura K562, jelikož je odvozena od pacientky s CML. Zároveň u ní, stejně jako u pacientů s CML, byla významně snížena hladina exprese rodiny miR-29 v původním experimentu z diplomové práce. Existuje řada studií zabývajících se tímto buněčným modelem. Například studie Drexler a kolektivu z roku 1999 zjistila, že u buněk K562 je exprimován protein BCR-ABL, avšak vzniká tvorbou amplifikace onkogenů, což je zmnožení daného úseku chromozomu projevující se homogenní barvou při barvení chromozomů, tzv. hsr (homogenously staining regions – homogenně se barvící oblasti). Buněčná linie K562 je často považována za Ph⁺ CML buněčnou linii, jelikož molekulární studie potvrzují přítomnost translokace ABL z chromozomu 9 na 22 a expresi BCR-ABL mRNA a proteinu, nejedná se však o klasický Philadelphský chromozom [146]. Bohužel na původních buňkách, ze kterých byla odvozena K562 buněčná linie nebyla provedena cytogenetická analýza [136].

Abychom vyloučili, jestli není naše buněčná linie rezistentní vůči imatinibu, provedli jsme nejprve test viability a stanovili hladinu IC₅₀ na 0,15 μ M, navíc jsme v experimentech pro zajímavost používali i koncentraci 0,05 μ M. Tak jako v experimentech u pacientů s CML byla naše studie zaměřena na dlouhodobé zkoumání v čase a hlavně na sledování odpovědi na léčbu imatinibem. Pokusili jsme se navodit dlouhodobé působení imatinibu na K562 buněčnou linii a sledovat vliv na expresi rodiny miR-29 a BCR-ABL v časech 2 týdny, 1 měsíc a 2 měsíce.

U miR-29b lze vidět podobný trend jako u vzorků s pacienty. Po měsíci působení imatinibu dojde k nárůstu hladiny exprese miR-29b a po dvou měsících působení dojde k opětovnému poklesu. Tento výsledek však nekoreluje s hladinou BCR-ABL, která by se měla podle předpokladů tak, jako u pacientů, snižovat. Hladina BCR-ABL u K562 buněk však podobně jako miR-29b narůstá a posléze klesá. Vypadá to, že by tyto buňky mohly být rezistentní vůči imatinibu, nicméně test viability potvrdil, že imatinib snižuje jejich viabilitu. Dochází zde pravděpodobně k jiným mechanismům, které ovlivňují viabilitu buněk, ale nepůsobí na hladinu BCR-ABL. Mohlo by to být způsobeno pravděpodobně schopností miR-29 inhibovat anti-apoptotické proteiny Mcl-1 a Bcl-2, které sledovala skupina vědců u pacientů s AML a CML. V periferních krevních buňkách pacientů s AML a CML byla zjištěna signifikantně nižší hladina exprese miR-29a/29b a vyšší hladina exprese obou cílových genů Bcl-2 a Mcl-1 než u zdravé skupiny. Tato data naznačují, že miR-29a resp. miR-29b fungují jako nádorové supresory a jejich nedostatečná exprese vede k proliferaci a blokaci apoptózy [147]. Jiná studie zase poukazuje na schopnost rodiny miR-29 potlačovat růst nádorů inhibicí exprese proteinu RNázy-L v K562 buňkách [112]. Možné navýšení exprese miR-29a resp. 29b vlivem působení imatinibu spustí apoptózu a tím se sníží jejich viabilita bez ovlivnění hladiny BCR-ABL. Jejich regulační mechanismy budou pravděpodobně probíhat odděleně. Ke stejnému závěru došli také vědci v publikaci od Salati a kolektivu, kteří studovali vliv exprese miR-29a, miR-494 a miR-660 na senzitivitu tyrozin kinázových inhibitorů u CML kmenových buněk. Tato studie ukázala, že miR-29a je deregulována v K562 buňkách mechanismem nezávislým na BCR-ABL [148].

Vzhledem k našim výsledkům hladiny BCR-ABL a exprese miR-29 není zřejmě buněčná linie K562 vhodný buněčný model, pro porovnání s experimenty na vzorcích pacientů. Jiná studie například ukázala, že rozdílné chování K562 buněk může být způsobeno jejich schopností částečně přisedat k povrchu inkubačních lahví (adherenci) a částečně fungovat jako suspenzní buněčná linie. Vědci rozdělili dvě subpopulace buněk na adherentní a suspenzní a zkoumali jejich odpovědi na léčbu imatinibem. Adherentní subpopulace buněk vykazovala signifikantně vyšší hladinu BCR-ABL než suspenzní subpopulace. Obě subpopulace taktéž vykazovaly odlišné profily exprese miRNA. Navíc působením imatinibu došlo k redukci viability u suspenzní subpopulace buněk rapidněji než u adherentní

subpopulace. Tyto výsledky napovídají, že adherentní subpopulace buněk K562 má vyšší rezistenci vůči imatinibu než suspenzní [149]. Proto se také výsledky naší studie, které probíhaly na kompletní populaci buněk, mohou výrazně lišit od výsledků naší studie na pacientech. Navíc je CML velice komplexní onemocnění, kdy každý pacient vykazuje rozdílné odpovědi na léčbu, takže je nelze tak snadno porovnat s buněčnou linií odvozenou od jedné pacientky s CML.

Velice malá pilotní studie zabývající se kyselinou all-trans retinovou a jejími účinky na K562 buňky ukázala zajímavý objev. Působením kyseliny all-trans retinové došlo k navýšení hladiny exprese rodiny miR-29 u této buněčné linie. Následný experiment ovšem ukázal, že v buněčné linii K562 není retinoidní receptor aktivní.

Bylo zjištěno, že u K562 buněčné linie tyrozin kináza BCR-ABL indukuje zvýšenou expresi PRAME (nádorový antigen) a zároveň je asociována s progresí CML [150]. PRAME funguje také jako dominantní represor retinoidních receptorů [151]. Tímto mechanismem je pravděpodobně ovlivněn náš negativní výsledek aktivity retinoidního receptoru u K562 buněčné linie, jelikož může být blokován zvýšenou expresí PRAME. Zároveň bylo zjištěno, že PRAME potlačuje expresi TRAIL. TRAIL (tumor related apoptosis inducing ligand) je člen TNF- α (tumor necrosis factor) rodiny a je významným spouštěčem apoptózy u nádorových buněk [152-154]. U K562 buněk i u pacientů s CML byla zjištěna snížená exprese TRAIL indukovaná pomocí BCR-ABL. Potlačením exprese PRAME došlo k navýšení exprese TRAIL, což podpořilo indukci apoptózy a zvýšilo citlivost vůči imatinibu u K562 buněk [150]. Tyto výsledky podporují také známou skutečnost, čímž je schopnost rodiny miR-29 potlačovat anti-apoptotický protein Mcl-1, který inhibuje TRAIL [68]. Zároveň bylo zjištěno, že kyselina retinová indukuje apoptózu leukemických buněk zprostředkovanou přes TRAIL [155]. Naše výsledky naznačují, že působením kyseliny all-trans retinové dojde k indukci apoptózy prostřednictvím zvýšené exprese miR-29 a pravděpodobně i TRAIL, přičemž tyto výsledky jsou nezávislé na BCR-ABL. Teoretické působení sledovaných genů v CML buňkách viz Obrázek 20. Tyto a další objevené souvislosti mezi těmito molekulami mohou mít významný vliv při hledání budoucích

terapeutických strategií CML a kyselina trans-all retinová se jeví jako slibný prostředek k léčbě CML v kombinaci s imatinibem.



Obrázek 20 Teoretické působení sledovaných genů v CML buňkách.

6.3 Vliv miR-29 na toxicitu xenobiotik u buněčných linií

Je již všeobecně známo, že miR-29 ovlivňuje exprese proteinů, které jsou zapojené do apoptózy a genetických regulací, jmenovitě se jedná o Mcl-1 a DNA-methyltransferázy [15, 46]. Řada studií také naznačuje možné souvislosti mezi miR-29 a chemoterapeutickou léčbou. Nedávná studie například popsala spojení mezi léčbou azacytidinem a miR-29c u pacientů s akutní myeloidní leukémií [156]. Naše hypotéza se zakládá na tom, že rodina miR-29 je schopná potenciálně ovlivňovat některá chemotereapeutika, která působí na syntézu DNA nebo methylaci. Z naší prvotní studie vyšel etoposid jako vhodný kandidát na léčivo, které můžeme dobře sledovat při působení na HeLa buněčnou linii. Pomocí MTT testu byla odhalena miR-29b, jako jedna z rodiny miR-29, která ovlivňuje toxicitu etoposidu. Vědecká literatura popisuje, že všichni tři členové rodiny miR-29 regulují stejnou sérii proteinů. Nicméně důležitou roli může hrát také skutečnost, že miR-29b se v lidském genomu nachází ve dvou kopiích. Na druhou stranu literatura je plná informací ukazujících jednoho konkrétního člena rodiny miR-29 působícího v konkrétní situaci.

Pro testování naší hypotézy byl zvolen xCELLigence systém, který nám umožňuje sledovat viabilitu buněk v závislosti na čase. Ověřili jsme významné zvýšení toxicity etoposidu v přítomnosti prekurzoru miR-29b transfekovaného do buněk. Transfekce buněk je nefyziologická situace, protože úroveň transfekce mikroRNA může překročit tisícinásobek oproti normální situaci. V našem případě se po transfekci zvýšily hladiny každého člena rodiny miR-29 tisícinásobně, což nemusí být úroveň dosažitelná fyziologickými procesy. Někdy i samotný proces transfekce může způsobit buněčnou smrt apoptotickou nebo jinou. U

transfekovaných členů rodiny miR-29 jsme neviděli žádný vliv na životaschopnost HeLa buněk. Existují však nejnovější zprávy o miR-29, které způsobují apoptózu u buněk K562 [121] nebo dermálních fibroblastů [157]. Obě zprávy však poukazují na jedinečnost buňky, léčiva nebo růstových podmínek. Proto jsme zkoumali, proč pouze jeden z členů rodiny miR-29 způsobuje v našem případě účinek zvýšení toxicity.

Členové rodiny miR-29 modulují expresi několika proteinů [158, 159]. Jeden z prvních identifikovaných cílů byl protein Mcl-1 [15]. Vzhledem k tomu, že modulace proteinu Mcl-1 rodinou miR-29 je považována za důležitou v několika situacích například diabetes – mellitus spojený s kardiovaskulárním onemocněním [159], byla zřejmá naše volba hodnocení Mcl-1. Bak protein byl zahrnut do našich experimentů, protože je heterodimerizační partner Mcl-1 a ukázalo se, že miR-29b moduluje expresi proteinu Bak v neuronech [160]. Dle očekávání, všechny tři miR-29 ovlivnily expresi Mcl-1 a neměly žádný vliv na expresi Bak. SiRNA anti-Mcl-1 měla stejný účinek na toxicitu etoposidu jako miR-29b, zatímco anti-Bak siRNA neměla žádný účinek. Je evidentní, že Mcl-1 zde hraje důležitou roli, naopak interakce mezi Bak a Mcl-1 je v tomto případě bezvýznamná.

Ve skutečnosti, dvě nedávné studie prokázaly, že snížená hladina Mcl-1 pomocí miRNA přispěla k toxicitě doxorubicinu. Doxorubicin je inhibitor topoizomerázy II a prostředek pro interkalaci do DNA. V jednom případě byla zvýšená toxicita doxorubicinu u HepG2 buněk pomocí miR-101 regulací Mcl-1 [161]. Ve druhém případě miR-193b zvýšila citlivost MCF-7 buněk prostřednictvím potlačení exprese Mcl-1 proteinu [162]. Zatímco obě studie zkoumaly překonání chemorezistence na doxorubicin, modulace apoptózy se ukázala být důležitější než transport léčiv. Navíc byla nedávno publikovaná studie, kde byl prokázán vliv miR-29a na zvrát chemorezistence na doxorubicin a cisplatinu potlačením exprese Mcl-1 v lidském osteosarkomu [163]. Tyto zprávy a naše prezentovaná data naznačují obecnou spolupráci mezi modulací Mcl-1 zprostředkovanou miRNA a citlivostí na chemoterapeutická léčiva ovlivňující syntézu DNA.

Naše data ukazují, že zvýšení citlivosti HeLa buněk na etoposid pomocí miR-29b může být způsobeno změnou poměru Mcl-1L/Mcl-1S, které se v podstatě nezměnily u ostatních dvou členů rodiny miR-29. Jedno z možných vysvětlení může být tvrzení, že v 3'UTR oblasti Mcl-1 existuje vazebné místo cílené všemi třemi miR-29, avšak v kódující oblasti genu pro

Mcl-1 existuje druhé vazebné místo, které je cílené pouze miR-29b [159]. Toto prohlášení jsme ověřili v genomové knihovně a zjistili jsme, že vazebné místo se nachází v exonu II tohoto genu, přesně v pozici 1354-1376. Protože Mcl-1S neobsahuje exon II, který je odstraněn alternativním sestřihem, spekulovali jsme, že miR-29b může mít jen minimální vliv na expresi Mcl-1S. To, že miR-29b spustí alternativní sestřih vazbou na jeho provizorní vazebné místo v exonu II, je vysoce spekulativní.

Při našem pokusu otestovat, zda je rozhodující transport miR-29b do jádra pro účinek na poměr Mcl-1L/Mcl-1S, jsme nezískali jednoznačnou odpověď. Testovali jsme dvě speciálně modifikované miRNA s různými lokalizacemi v buňce, které popsal Hwang a kolektiv. Nejprve jsme zkontrolovali lokalizaci modifikovaných miRNA pomocí separace cytosolu a jádra s následnou analýzou RT-PCR. Za druhé jsme ověřili, že obě modifikované miRNA ovlivňují expresi Mcl-1L a Mcl-1S proteinů. Překvapivě byly obě modifikované formy m3 a TM-1 účinnější než endogenní miR-29b při potlačení Mcl-1L proteinu. Naše experimenty s viabilitou buněk ukázaly, že m3 miRNA, která je převážně nukleární, je stejně účinná jako miR-29b při působení na toxicitu etoposidu. TM-1, která je převážně cytosolová, byla méně účinná, i když rozdíl mezi TM-1 a m3 nebyl statisticky významný. Na druhou stranu m3 neměla stejný účinek na poměr Mcl-1/Mcl-S jako miR-29b.

Dospěli jsme k závěru, že miR-29b zvyšuje toxicitu etoposidu v HeLa buňkách změnou poměru Mcl-1L/Mcl-1S a tento efekt může být spojen s transportem zralé miR-29b do jádra.

6.4 Jednobuněčné experimenty

Hlavní výzvou dnešních genetických výzkumů je rozluštit jakým způsobem geny a jejich kontrolní elementy spolupracují a jak tím modulují fyziologické, vývojové a patologické odpovědi v živých buňkách. Jednobuněčné experimenty představují možný nástroj na řešení tohoto problému. Sledování celé populace buněk může být zavádějící, jelikož mezi jednotlivými buňkami dochází k náhodně variabilitě v genové expresi [144]. Skutečnost, že se DNA, mnoho mRNA a enzymy často vyskytují v nízkých počtech a podílí se na stochastických efektech, má za následek rozdíly v genové expresi mezi jednotlivými buňkami v populaci působící navenek homogenně.[164, 165].

V této práci jsme se pokusili zavést metodu „single-cell“ elektroporace ke sledování vlivu rodiny miR-29 na viabilitu buněk případně na ovlivnění toxicity xenobiotik. V padovské laboratoři byly testovány jedno - kondenzátorové silikonové čipy, na kterých byly vysety CHO-K1 buňky, do kterých měly být transfekcí vpraveny expresní plazmidy vyvolávající zvýšení hladiny exprese rodiny miR-29. K usnadnění kontroly účinnosti transfekce posloužil gen pro GFP protein, který měl být po úspěšné transfekci detekován ve fluorescenčním mikroskopu. Takto bychom mohli sledovat jednak změny konkrétních buněk, v nichž došlo k navýšení exprese dané miR-29, ale také po přidání zvoleného xenobiotika sledovat jeho toxicitu. Bohužel tímto způsobem k navýšení hladiny exprese miR-29 v buňkách nedošlo. Při experimentech využívajících jiný způsob transfekce – lipofekci a při testování na jiných buněčných liniích byl výsledek opět negativní. Chyba je zřejmě na straně plazmidů, ačkoli po jejich důkladné kontrole restrikcí a sekvenací nebyl nalezen problém, který by tyto negativní výsledky vysvětloval. Jinou možností, jak sledovat změny v jednotlivých buňkách po navýšení hladiny exprese miR-29, je využití prekurzorů pre-miR-29 mající sice výbornou účinnost, avšak bohužel nemají žádnou kontrolní značku, jenž by potvrzovala aktuální účinnost transfekce.

Ačkoli v našem případě se nepodařilo využít potenciálu, který poskytuje tato moderní metoda, i tak bych ji v každém případě doporučila nejen pro její jedinečný efekt sledování jednotlivých buněk v čase, ale i pro její relativně snadnou možnost zavedení ve standardně vybavených laboratořích. Kombinace sledování transfekce v čase a prostoru slibuje otevření nových experimentálních perspektiv v těch oblastech biologie, kde je potřeba sledovat komplexní buněčný systém na molekulární úrovni.

7. ZÁVĚRY

Ze získaných výsledků lze vyvodit tyto závěry:

1. Studium hladiny exprese rodiny miR-29 u pacientů s CML
 - Byla zjištěna snížená hladina exprese rodiny miR-29 u pacientů s CML.
 - Při sledování změny BCR-ABL a miR-29b resp. miR-29c při 2. měření byla prokázána signifikantní negativní korelace.
 - Byla zjištěna nízká hladina exprese miR-29 při diagnóze, při 2. měření došlo k nárůstu exprese miR-29 a při posledním měření exprese opět klesá, vrací se k hodnotě srovnatelné se zdravými buňkami.
 - Buněčná linie K562 není vhodný buněčný model pro porovnání s experimenty na vzorcích pacientů.
 - Změna hladiny exprese rodiny miR-29 je iniciována pravděpodobně nezávisle na hladině BCR-ABL.
2. Studium vlivu rodiny miR-29 na toxicitu etoposidu v HeLa buněčné linii
 - MiR-29b zvyšuje toxicitu etoposidu v HeLa buňkách
 - MiR-29b neovlivňuje buněčný cyklus
 - MiR-29 ovlivňuje expresi proteinu Mcl-1 v HeLa buňkách
3. Transfekce „single-cell“ elektroporací.
 - Nepodařilo se transfekovat buňky plazmidem nesoucím gen pro miR-29 metodou „single-cell“ elektroporace

8. SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI

Publikace:

1. Humplíková L., Kollinerová S., Papajík T., Pikalová Z., Holzerová M., Procházka V., Divoká M., Modrianský M., Indrák K., Jarošová M.: Expression of miR-15a and miR-26-1 in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **157**, 284-93 (2013).
2. Kollinerová S., Vassanelli S., Modrianský M.: The role of miR-29 family members in malignant hematopoiesis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **158**, 489-501 (2014).
3. Kollinerová S., Dostál Z., Modrianský M.: MicroRNA hsa-miR-29b potentiates etoposide toxicity in HeLa cells via down-regulation of Mcl-1. *Toxicology in vitro.* **40**, 289-296 (2017).

Prezentace na konferencích:

1. Kollinerová S., Gabrielová E., Modrianský M.: Dexamethason navyšuje expresi hsa-miR-29 v HeLa buňkách. *XV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů*, 1.-2.11.2011, Brno, Česká republika.
2. Kollinerová S., Dostál Z., Divoká M., Jarošová M., Modrianský M.: Ovlivnění exprese miR-29 u chronické myeloidní leukémie. *XXIII. Biochemický sjezd*, 26.-29.08.2012, Brno, Česká republika.
3. Kollinerová S., Modrianský M.: Ovlivnění toxicity xenobiotik pomocí miR-29. *XIII. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků z Čech a Slovenska*, 14.-17.05.2013, Žďár nad Sázavou, Česká republika.
4. Kollinerová S., Divoká M., Jarošová M., Zapletalová J., Modrianský M.: Expression of miR-29 in chronic myeloid leukemia patients after imatinib treatment. *Federation of European Biochemical Societies Congress 2013*, 6.-11.07.2013, Petrohrad, Rusko.
5. Kollinerová S. MiR-29 expression during imatinib treatment of chronic myeloid leukemia patients. *Seminář projektu 303/09/H048*, 2012, Olomouc, Česká republika.

6. Kollinerová S. Expression of miR-29 affects the toxicity of xenobiotics. *Seminář projektu TransMedChem*, 11.12.2012, Olomouc, Česká republika.

9. LITERATURA

1. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
2. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
3. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
4. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 86-9.
5. Kim, V.N. and J.W. Nam, *Genomics of microRNA*. Trends Genet, 2006. **22**(3): p. 165-73.
6. Hansen, T.B., J. Kjems, and J.B. Bramsen, *Enhancing miRNA annotation confidence in miRBase by continuous cross dataset analysis*. RNA Biol, 2011. **8**(3): p. 378-83.
7. Hwang, H.W., E.A. Wentzel, and J.T. Mendell, *A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import*. Science, 2007. **315**(5808): p. 97-100.
8. Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer, *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 642-55.
9. Liu, X., K. Fortin, and Z. Mourelatos, *MicroRNAs: biogenesis and molecular functions*. Brain Pathol, 2008. **18**(1): p. 113-21.
10. Borchert, G.M., W. Lanier, and B.L. Davidson, *RNA polymerase III transcribes human microRNAs*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1097-101.
11. Cullen, B.R., *Transcription and processing of human microRNA precursors*. Mol Cell, 2004. **16**(6): p. 861-5.
12. Farazi, T.A., S.A. Juraneck, and T. Tuschl, *The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members*. Development, 2008. **135**(7): p. 1201-14.
13. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
14. Pekarsky, Y., et al., *Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11590-3.
15. Mott, J.L., et al., *mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis*. Oncogene, 2007. **26**(42): p. 6133-40.
16. Zhao, J.J., et al., *microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma*. Blood, 2010. **115**(13): p. 2630-9.
17. Sempere, L.F., et al., *Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation*. Genome Biol, 2004. **5**(3): p. R13.
18. Chang, T.C., et al., *Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis*. Nat Genet, 2008. **40**(1): p. 43-50.
19. Mott, J.L., et al., *Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB*. J Cell Biochem, 2010. **110**(5): p. 1155-64.
20. Eyholzer, M., et al., *The tumour-suppressive miR-29a/b1 cluster is regulated by CEBPA and blocked in human AML*. Br J Cancer, 2010. **103**(2): p. 275-84.
21. Kapinas, K., et al., *miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop*. J Biol Chem, 2010. **285**(33): p. 25221-31.
22. Reinsbach, S., et al., *Dynamic regulation of microRNA expression following interferon-gamma-induced gene transcription*. RNA Biol, 2012. **9**(7): p. 978-89.
23. Kortylewski, M., et al., *Interferon-gamma-mediated growth regulation of melanoma cells: involvement of STAT1-dependent and STAT1-independent signals*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(2): p. 414-22.
24. Schmitt, M.J., et al., *Interferon-gamma-induced activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) up-regulates the tumor suppressing microRNA-29 family in melanoma cells*. Cell Commun Signal, 2012. **10**(1): p. 41.
25. Wang, H., et al., *NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma*. Cancer Cell, 2008. **14**(5): p. 369-81.
26. Wang, H., et al., *NF-kappaB regulation of YY1 inhibits skeletal myogenesis through transcriptional silencing of myofibrillar genes*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(12): p. 4374-87.

27. Winbanks, C.E., et al., *TGF-beta regulates miR-206 and miR-29 to control myogenic differentiation through regulation of HDAC4*. J Biol Chem, 2011. **286**(16): p. 13805-14.
28. Li, Y., et al., *Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis*. Am J Pathol, 2004. **164**(3): p. 1007-19.
29. Cencetti, F., et al., *Transforming growth factor-beta1 induces transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts via up-regulation of sphingosine kinase-1/SIP3 axis*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(6): p. 1111-24.
30. Sabourin, L.A. and M.A. Rudnicki, *The molecular regulation of myogenesis*. Clin Genet, 2000. **57**(1): p. 16-25.
31. Zhou, L., et al., *Inhibition of miR-29 by TGF-beta-Smad3 signaling through dual mechanisms promotes transdifferentiation of mouse myoblasts into myofibroblasts*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33766.
32. Zhang, Z., et al., *Uracils at nucleotide position 9-11 are required for the rapid turnover of miR-29 family*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(10): p. 4387-95.
33. Dooley, J. and A. Liston, *Molecular control over thymic involution: from cytokines and microRNA to aging and adipose tissue*. Eur J Immunol, 2012. **42**(5): p. 1073-9.
34. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 778-809, table of contents.
35. Papadopoulou, A.S., et al., *The thymic epithelial microRNA network elevates the threshold for infection-associated thymic involution via miR-29a mediated suppression of the IFN-alpha receptor*. Nat Immunol, 2011. **13**(2): p. 181-7.
36. Liston, A., et al., *MicroRNA-29 in the adaptive immune system: setting the threshold*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(21): p. 3533-41.
37. Steiner, D.F., et al., *MicroRNA-29 regulates T-box transcription factors and interferon-gamma production in helper T cells*. Immunity, 2011. **35**(2): p. 169-81.
38. Ma, F., et al., *The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon-gamma*. Nat Immunol, 2011. **12**(9): p. 861-9.
39. Kriegel, A.J., et al., *The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury*. Physiol Genomics, 2012. **44**(4): p. 237-44.
40. Hsu, S.D., et al., *miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D78-85.
41. Li, Z., et al., *Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation*. J Biol Chem, 2009. **284**(23): p. 15676-84.
42. Ogawa, T., et al., *Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **391**(1): p. 316-21.
43. Steele, R., J.L. Mott, and R.B. Ray, *MBP-1 upregulates miR-29b that represses Mcl-1, collagens, and matrix-metalloproteinase-2 in prostate cancer cells*. Genes Cancer, 2010. **1**(4): p. 381-387.
44. Garzon, R., et al., *MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1*. Blood, 2009. **113**(25): p. 6411-8.
45. Garzon, R., et al., *MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia*. Blood, 2009. **114**(26): p. 5331-41.
46. Fabbri, M., et al., *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): p. 15805-10.
47. Kovalchuk, O., et al., *microRNAome changes in bystander three-dimensional human tissue models suggest priming of apoptotic pathways*. Carcinogenesis, 2010. **31**(10): p. 1882-8.
48. Du, B., et al., *High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells*. FEBS Lett, 2010. **584**(4): p. 811-6.
49. Wang, C., et al., *A combined approach identifies three mRNAs that are down-regulated by microRNA-29b and promote invasion ability in the breast cancer cell line MCF-7*. J Cancer Res Clin Oncol, 2012. **138**(12): p. 2127-36.
50. Mraz, M., et al., *MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and disease subtypes*. Leuk Lymphoma, 2009. **50**(3): p. 506-9.
51. Xiong, Y., et al., *Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2010. **51**(3): p. 836-45.
52. Meng, X.Z., et al., *microRNA expression alteration after arsenic trioxide treatment in HepG-2 cells*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26**(1): p. 186-93.
53. Park, S.Y., et al., *miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(1): p. 23-9.

54. Efanov, A., et al., *CD5+CD23+ leukemic cell populations in TCL1 transgenic mice show significantly increased proliferation and Akt phosphorylation*. *Leukemia*, 2010. **24**(5): p. 970-5.
55. Jiao, J., et al., *MicroRNA-29b regulates the expression level of human progranulin, a secreted glycoprotein implicated in frontotemporal dementia*. *PLoS One*, 2010. **5**(5): p. e10551.
56. Maurer, B., et al., *MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(6): p. 1733-43.
57. Chen, T., et al., *MicroRNA-29a regulates pro-inflammatory cytokine secretion and scavenger receptor expression by targeting LPL in oxLDL-stimulated dendritic cells*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(4): p. 657-63.
58. Wu, J., et al., *HMG2 overexpression-induced ovarian surface epithelial transformation is mediated through regulation of EMT genes*. *Cancer Res*, 2011. **71**(2): p. 349-59.
59. Cui, Y., et al., *MiR-29a inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest through the downregulation of p42.3 in human gastric cancer*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e25872.
60. Sengupta, S., et al., *MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(15): p. 5874-8.
61. Russ, A.C., et al., *Integrative nucleophosmin mutation-associated microRNA and gene expression pattern analysis identifies novel microRNA - target gene interactions in acute myeloid leukemia*. *Haematologica*, 2011. **96**(12): p. 1783-91.
62. Virgilio, L., et al., *Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(26): p. 12530-4.
63. Zong, Y., et al., *miR-29c regulates BACE1 protein expression*. *Brain Res*, 2011. **1395**: p. 108-15.
64. Laine, J., et al., *The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator*. *Mol Cell*, 2000. **6**(2): p. 395-407.
65. Herling, M., et al., *TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state*. *Leukemia*, 2006. **20**(2): p. 280-5.
66. Stamatopoulos, B., et al., *microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification*. *Blood*, 2009. **113**(21): p. 5237-45.
67. Chen, L., et al., *Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function*. *Mol Cell*, 2005. **17**(3): p. 393-403.
68. Opferman, J.T., et al., *Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1*. *Nature*, 2003. **426**(6967): p. 671-6.
69. Bae, J., et al., *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): p. 25255-61.
70. Morciano, G., et al., *Mcl-1 involvement in mitochondrial dynamics is associated with apoptotic cell death*. *Mol Biol Cell*, 2016. **27**(1): p. 20-34.
71. Zhang, Y.K., et al., *Overexpression of microRNA-29b induces apoptosis of multiple myeloma cells through down regulating Mcl-1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **414**(1): p. 233-9.
72. Jeltsch, A., *Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases*. *Chembiochem*, 2002. **3**(4): p. 274-93.
73. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. *Nat Rev Genet*, 2002. **3**(6): p. 415-28.
74. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. *Cell*, 1999. **99**(3): p. 247-57.
75. Ulivi, P., et al., *p16INK4A and CDH13 hypermethylation in tumor and serum of non-small cell lung cancer patients*. *J Cell Physiol*, 2006. **206**(3): p. 611-5.
76. Fabbri, M., et al., *WWOX gene restoration prevents lung cancer growth in vitro and in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(43): p. 15611-6.
77. Iliopoulos, D., et al., *Fragile genes as biomarkers: epigenetic control of WWOX and FHIT in lung, breast and bladder cancer*. *Oncogene*, 2005. **24**(9): p. 1625-33.
78. Suzuki, M., et al., *RNA interference-mediated knockdown of DNA methyltransferase 1 leads to promoter demethylation and gene re-expression in human lung and breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2004. **64**(9): p. 3137-43.
79. Blum, W., et al., *Phase I study of decitabine alone or in combination with valproic acid in acute myeloid leukemia*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(25): p. 3884-91.
80. Takada, S., et al., *Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos*. *RNA*, 2009. **15**(8): p. 1507-14.
81. Nguyen, T., et al., *Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma*. *Epigenetics*, 2011. **6**(3): p. 388-94.
82. Pekarsky, Y., N. Zanasi, and C.M. Croce, *Molecular basis of CLL*. *Semin Cancer Biol*, 2010. **20**(6): p. 370-6.

83. Aqeilan, R.I., G.A. Calin, and C.M. Croce, *miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives*. Cell Death Differ, 2010. **17**(2): p. 215-20.
84. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
85. Humplikova, L., et al., *Expression of miR-15a and miR-16-1 in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2013. **157**(4): p. 284-93.
86. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
87. Pekarsky, Y., et al., *Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3028-33.
88. Pekarsky, Y., et al., *Tcl1 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(50): p. 19643-8.
89. Calin, G.A., et al., *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2005. **353**(17): p. 1793-801.
90. Sampath, D., et al., *Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2012. **119**(5): p. 1162-72.
91. Rozovski, U., et al., *Signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 regulates microRNA gene expression in chronic lymphocytic leukemia cells*. Mol Cancer, 2013. **12**: p. 50.
92. Liu, Z., et al., *STAT-3 activates NF-kappaB in chronic lymphocytic leukemia cells*. Mol Cancer Res, 2011. **9**(4): p. 507-15.
93. Kluiver, J.L. and C.Z. Chen, *MicroRNAs regulate B-cell receptor signaling-induced apoptosis*. Genes Immun, 2012. **13**(3): p. 239-44.
94. Mraz, M. and T.J. Kipps, *MicroRNAs and B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2013. **54**(8): p. 1836-9.
95. Fröhling, S., et al., *Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications*. J Clin Oncol, 2005. **23**(26): p. 6285-95.
96. Mrózek, K., et al., *Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification?* Blood, 2007. **109**(2): p. 431-48.
97. Forrest, A.R., et al., *Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation*. Leukemia, 2010. **24**(2): p. 460-6.
98. Danen-van Oorschot, A.A., et al., *Differentially expressed miRNAs in cytogenetic and molecular subtypes of pediatric acute myeloid leukemia*. Pediatr Blood Cancer, 2012. **58**(5): p. 715-21.
99. Schwind, S., et al., *Prognostic significance of expression of a single microRNA, miR-181a, in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study*. J Clin Oncol, 2010. **28**(36): p. 5257-64.
100. Han, Y.C., et al., *microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia*. J Exp Med, 2010. **207**(3): p. 475-89.
101. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
102. Passegué, E., et al., *Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100 Suppl 1**: p. 11842-9.
103. Wang, X.S., et al., *MicroRNA-29a and microRNA-142-3p are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **119**(21): p. 4992-5004.
104. Garzon, R., et al., *MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia*. Blood, 2008. **111**(6): p. 3183-9.
105. Garzon, R., et al., *Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(10): p. 3945-50.
106. Zhu, C., et al., *Prognostic value of miR-29a expression in pediatric acute myeloid leukemia*. Clin Biochem, 2013. **46**(1-2): p. 49-53.
107. Mizuno, S., et al., *Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1172-9.
108. Pabst, T. and B.U. Mueller, *Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML*. Oncogene, 2007. **26**(47): p. 6829-37.
109. Radomska, H.S., et al., *CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 4301-14.

110. Gong, J.N., et al., *The role, mechanism and potentially therapeutic application of microRNA-29 family in acute myeloid leukemia*. Cell Death Differ, 2014. **21**(1): p. 100-12.
111. Jabbour, E. and H. Kantarjian, *Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring, and management*. Am J Hematol, 2012. **87**(11): p. 1037-45.
112. Lee, T.Y., et al., *Regulation of human RNase-L by the miR-29 family reveals a novel oncogenic role in chronic myelogenous leukemia*. J Interferon Cytokine Res, 2013. **33**(1): p. 34-42.
113. Hassel, B.A., et al., *A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon*. EMBO J, 1993. **12**(8): p. 3297-304.
114. Li, Y., et al., *miR-29b suppresses CML cell proliferation and induces apoptosis via regulation of BCR/ABL1 protein*. Exp Cell Res, 2013. **319**(8): p. 1094-101.
115. Palumbo, A. and K. Anderson, *Multiple myeloma*. N Engl J Med, 2011. **364**(11): p. 1046-60.
116. Galm, O., et al., *DNA methylation changes in multiple myeloma*. Leukemia, 2004. **18**(10): p. 1687-92.
117. Amodio, N., et al., *DNA-demethylating and anti-tumor activity of synthetic miR-29b mimics in multiple myeloma*. Oncotarget, 2012. **3**(10): p. 1246-58.
118. Amodio, N., et al., *miR-29b induces SOCS-1 expression by promoter demethylation and negatively regulates migration of multiple myeloma and endothelial cells*. Cell Cycle, 2013. **12**(23): p. 3650-62.
119. Li, Y., et al., *Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29*. J Pathol, 2011. **224**(4): p. 484-95.
120. Castilla, M., et al., *Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma*. J Pathol, 2011. **223**(1): p. 72-80.
121. Wang, D., et al., *Hsa-miR-21 and Hsa-miR-29 in Tissue as Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Gastric Cancer*. Cell Physiol Biochem, 2015. **37**(4): p. 1454-62.
122. Wu, Q., et al., *Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection*. Clin Chim Acta, 2012. **413**(13-14): p. 1058-65.
123. Pass, H.I., et al., *hsa-miR-29c* is linked to the prognosis of malignant pleural mesothelioma*. Cancer Res, 2010. **70**(5): p. 1916-24.
124. Fang, C., et al., *Serum microRNAs are promising novel biomarkers for diffuse large B cell lymphoma*. Ann Hematol, 2012. **91**(4): p. 553-9.
125. Maschietto, M., et al., *Microchip-Integrated EOSCs (Electrolyte Oxide Semiconductor Capacitors) as Devices for High Efficiency and Selective Electroporation of Mammalian Cells* IFMBE, 2009. **25**(VIII): p. 321-324.
126. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
127. Sieuwerts, A.M., et al., *The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1995. **33**(11): p. 813-23.
128. Nieman, T., *Chemiluminescence: Theory and Instrumentation*. Encyclopedia of Analytical Science, 1995: p. 608-613.
129. *Státní ústav pro kontrolu léčiv: Souhrn údajů o přípravku Etoposid, s.z. sukls198498/2016*, Editor. 2016.
130. *Státní ústav pro kontrolu léčiv: Souhrn údajů o přípravku Imatinib*. 2013.
131. Wang, Q., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 and all-trans-retinoic acid sensitize breast cancer cells to chemotherapy-induced cell death*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 2040-8.
132. Siddikuzzaman, C. Guruvayoorappan, and V.M. Berlin Grace, *All trans retinoic acid and cancer*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2011. **33**(2): p. 241-9.
133. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
134. van Dongen, J.J., et al., *Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia*. Leukemia, 1999. **13**(12): p. 1901-28.
135. Kollinerová, S., *Změna exprese mikroRNA u pacientů s B-CLL*, in *Katedra biochemie*. 2011, Univerzita Palackého v Olomouci: Přírodovědecká fakulta. p. 81.
136. Lozzio, C.B. and B.B. Lozzio, *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. Blood, 1975. **45**(3): p. 321-34.
137. Jiang, H., et al., *Diverse roles of miR-29 in cancer (review)*. Oncol Rep, 2014. **31**(4): p. 1509-16.
138. Kubienová, L., *Vliv hsa-miR-29 na toxicitu vybraných xenobiotik*, in *Katedra biochemie*. 2009, Univerzita Palackého v Olomouci: Přírodovědecká fakulta. p. 83.

139. Beekman, A.M. and L.A. Howell, *Small-Molecule and Peptide Inhibitors of the Pro-Survival Protein Mcl-1*. ChemMedChem, 2016. **11**(8): p. 802-13.
140. Bose, P. and S. Grant, *Mcl-1 as a Therapeutic Target in Acute Myelogenous Leukemia (AML)*. Leuk Res Rep, 2013. **2**(1): p. 12-14.
141. Raser, J.M. and E.K. O'Shea, *Noise in gene expression: origins, consequences, and control*. Science, 2005. **309**(5743): p. 2010-3.
142. Rosenfeld, N., et al., *Gene regulation at the single-cell level*. Science, 2005. **307**(5717): p. 1962-5.
143. Longo, D. and J. Hasty, *Dynamics of single-cell gene expression*. Mol Syst Biol, 2006. **2**: p. 64.
144. Vassanelli, S., et al., *Space and time-resolved gene expression experiments on cultured mammalian cells by a single-cell electroporation microarray*. N Biotechnol, 2008. **25**(1): p. 55-67.
145. San José-Enériz, E., et al., *MicroRNA expression profiling in Imatinib-resistant Chronic Myeloid Leukemia patients without clinically significant ABL1-mutations*. Mol Cancer, 2009. **8**: p. 69.
146. Drexler, H.G., R.A. MacLeod, and C.C. Uphoff, *Leukemia cell lines: in vitro models for the study of Philadelphia chromosome-positive leukemia*. Leuk Res, 1999. **23**(3): p. 207-15.
147. Xu, L., et al., *Altered expression pattern of miR-29a, miR-29b and the target genes in myeloid leukemia*. Exp Hematol Oncol, 2014. **3**: p. 17.
148. Salati, S., et al., *Deregulated expression of miR-29a-3p, miR-494-3p and miR-660-5p affects sensitivity to tyrosine kinase inhibitors in CML leukemic stem cells*. Oncotarget, 2017. **8**(30): p. 49451-49469.
149. Karimiani, E.G., et al., *Single-cell analysis of K562 cells: an imatinib-resistant subpopulation is adherent and has upregulated expression of BCR-ABL mRNA and protein*. Exp Hematol, 2014. **42**(3): p. 183-191.e5.
150. De Carvalho, D.D., et al., *BCR-ABL-mediated upregulation of PRAME is responsible for knocking down TRAIL in CML patients*. Oncogene, 2011. **30**(2): p. 223-33.
151. Epping, M.T., et al., *The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling*. Cell, 2005. **122**(6): p. 835-47.
152. Schmaltz, C., et al., *T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity*. Nat Med, 2002. **8**(12): p. 1433-7.
153. Walczak, H., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells*. Cancer Res, 2000. **60**(11): p. 3051-7.
154. Wang, S. and W.S. El-Deiry, *TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8628-33.
155. Altucci, L., et al., *Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL*. Nat Med, 2001. **7**(6): p. 680-6.
156. Butrym, A., et al., *Clinical response to azacitidine therapy depends on microRNA-29c (miR-29c) expression in older acute myeloid leukemia (AML) patients*. Oncotarget, 2016. **7**(21): p. 30250-7.
157. Jafarnejad-Farsangi, S., et al., *MicroRNA-29a induces apoptosis via increasing the Bax:Bcl-2 ratio in dermal fibroblasts of patients with systemic sclerosis*. Autoimmunity, 2015. **48**(6): p. 369-78.
158. Kollinerova, S., S. Vassanelli, and M. Modriansky, *The role of miR-29 family members in malignant hematopoiesis*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2014. **158**(4): p. 489-501.
159. Ślusarz, A. and L. Pulakat, *The two faces of miR-29*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2015. **16**(7): p. 480-90.
160. Kole, A.J., et al., *miR-29b is activated during neuronal maturation and targets BH3-only genes to restrict apoptosis*. Genes Dev, 2011. **25**(2): p. 125-30.
161. He, H., et al., *MicroRNA-101 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to doxorubicin-induced apoptosis via targeting Mcl-1*. Mol Med Rep, 2016. **13**(2): p. 1923-9.
162. Long, J., et al., *miR-193b Modulates Resistance to Doxorubicin in Human Breast Cancer Cells by Downregulating MCL1*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 373574.
163. Osaki, S., et al., *Ablation of MCL1 expression by virally induced microRNA-29 reverses chemoresistance in human osteosarcomas*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 28953.
164. Lahav, G., et al., *Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells*. Nat Genet, 2004. **36**(2): p. 147-50.
165. Nelson, D.E., et al., *Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression*. Science, 2004. **306**(5696): p. 704-8.