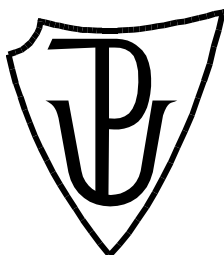


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Změna exprese mikroRNA u pacientů s B-CLL**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

|                         |                                          |
|-------------------------|------------------------------------------|
| Autor:                  | <b>Bc. Soňa Kollinerová</b>              |
| Studijní program:       | M1406 Biochemie                          |
| Studijní obor:          | Biochemie                                |
| Forma studia:           | Prezenční                                |
| Vedoucí práce:          | <b>doc. Mgr. Martin Modrianský Ph.D.</b> |
| Termín odevzdání práce: | 21.04.2011                               |

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením svého vedoucího. Použité informace jsem citovala z níže uvedené literatury. Praktickou část jsem měřila sama a potvrzuji, že všechny výsledky zde publikované jsou má originální práce.

V Olomouci dne 21.04.2011

.....  
Bc. Soňa Kollinerová

Děkuji pracovníkům Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP za vytvoření příjemného pracovního prostředí a pomoc při řešení problémů. Zvláště děkuji svému školiteli Doc. Mgr. Martinovi Modrianskému, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady, zájem a obětavý a trpělivý přístup při vypracovávání diplomové práce. Ing. Evě Gabrielové, Ph.D. děkuji za pomoc a předání zkušeností při praktické části v laboratoři.

Prof. RNDr. Marii Jarošové, CSc. děkuji za poskytnutí vzorků RNA pacientů z Hemato-onkologické kliniky. Mgr. Lence Humplíkové děkuji za pomoc při stanovení hladin mikroRNA metodou real-time PCR. Pracovníkům transfúzního oddělení LF UP děkuji za poskytnutí kalibrátoru.

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

Práce byla vypracována v rámci řešení projektů LF\_2010\_022, LF\_2011\_006, MSM 6198959216 a MSM 6198959205.

## **Bibliografická identifikace:**

|                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Soňa Kollinerová                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Název práce             | Změna exprese mikroRNA u pacientů s B-CLL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Typ práce               | Diplomová                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Pracoviště              | Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP Olomouc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Vedoucí práce           | doc. RNDr. Martin Modrianský, Ph.D.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Rok obhajoby práce      | 2011                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Abstrakt                | <p>MikroRNA jsou krátké nekódující oligonukleotidy odpovědné za regulaci exprese proteinů na posttranskripční úrovni. Exprese některých mikroRNA je spojována s incidencí maligních onemocnění, v případě chronické lymfocytární leukemie (B-CLL) byly jako důležité identifikovány miR-15a, miR-16-1, miR-29 a miR-181. Tato práce potvrzuje vztah miR-15a a miR-16-1 vůči deleci 13q [REDACTED]</p> <p>[REDACTED]</p> <p>[REDACTED] Dále ukazujeme, že dexamethason navyšuje expresi miR-29b, avšak na rozdíl od syntetické miR-29b nezvyšuje toxicitu etoposidu, což bylo ukázáno s využitím transfekce syntetických isoformů miR-29 v HeLa buňkách.</p> |
| Klíčová slova           | mikroRNA, chronická leukemie, transfekce, xenobiotika, dexamethason                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Počet stran             | 81                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Počet příloh            | 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Jazyk                   | Český                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

**Bibliographical identification:**

|                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Author's first name and surname | Bc. Soňa Kollinerová                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Title                           | Alterations in microRNA expression in B-CLL patients                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Type of thesis                  | Master                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Department                      | Department of medical chemistry and biochemistry<br>LF UP Olomouc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Supervisor                      | doc. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| The year of presentation        | 2011                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Abstrakt                        | <p>MicroRNA are short non-coding oligonucleotides responsible for regulation of protein expression on post-transcriptional level. Expression of some microRNAs is linked to some cancers, in the case of chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) miR-15a, miR-16-1, miR-29 and miR-181 were identified as important. This work verifies the miR-15a and miR-16-1 relationship towards 13q deletion [REDACTED]</p> <p>[REDACTED]</p> <p>[REDACTED] Furthermore, we show that dexamethasone enhances the expression of miR-29b but, in contrast to synthetic miR-29b, it does not enhance the toxicity of etoposide, a phenomenon demonstrated using transient transfection of synthetic miR-29 isoforms into HeLa cells.</p> |
| Keywords                        | microRNA, chronic leukemia, transfection, xenobiotics, dexamethasone                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Number of pages                 | 81                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Number of appendices            | 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Language                        | Czech                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

## OBSAH

|                                                          |        |
|----------------------------------------------------------|--------|
| CÍLE PRÁCE.....                                          | - 8 -  |
| TEORETICKÁ ČÁST .....                                    | - 9 -  |
| 1. ÚVOD.....                                             | - 9 -  |
| 2. CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE.....                  | - 10 - |
| 2.1 Definice.....                                        | - 10 - |
| 2.2 Epidemiologie a etiologické souvislosti.....         | - 10 - |
| 2.3 Klinický obraz a průběh nemoci .....                 | - 11 - |
| 2.4 Imunofenotyp CLL .....                               | - 11 - |
| 2.5 Molekulární patogeneze.....                          | - 12 - |
| 2.6 Prognostické faktory .....                           | - 17 - |
| 2.7 Terapie CLL.....                                     | - 20 - |
| 3. MIKRO RNA.....                                        | - 23 - |
| 3.1 Historie miRNA .....                                 | - 23 - |
| 3.2 Výskyt miRNA .....                                   | - 23 - |
| 3.3 Biogeneze miRNA .....                                | - 25 - |
| 3.4 Funkce miRNA .....                                   | - 28 - |
| 3.5 Cíle miRNA a mechanismy působení.....                | - 29 - |
| 3.6 Význam miRNA v patogenezi nádorových onemocnění..... | - 30 - |
| 4. MIRNA U CLL.....                                      | - 31 - |
| 4.1 MiR-15a a miR-16-1 .....                             | - 32 - |
| 4.2 Rodina miR-29.....                                   | - 34 - |
| 4.3 MiR-34.....                                          | - 36 - |
| 5. FUNKCE VYBRANÝCH XENOBIOTIK.....                      | - 37 - |
| 5.1 Cytarabin.....                                       | - 37 - |
| 5.2 Azacytidin.....                                      | - 37 - |
| 5.3 Etoposid .....                                       | - 38 - |
| 5.4 Dexamethason.....                                    | - 38 - |
| 5.5 Mifepriston.....                                     | - 38 - |
| 5.6 Amiodaron .....                                      | - 38 - |
| EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....                                | - 40 - |
| 6. MATERIÁL .....                                        | - 40 - |
| 6.1 Biologický materiál.....                             | - 40 - |
| 6.2 Kultivační média.....                                | - 41 - |
| 6.3 Ostatní materiál .....                               | - 42 - |
| 7. METODY .....                                          | - 43 - |

|                                                                                                                  |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 7.1 Kultivace buněčných linií .....                                                                              | - 43 - |
| 7.2 Stanovení počtu buněk.....                                                                                   | - 43 - |
| 7.3 Transfekce syntetickou pre-miRNA .....                                                                       | - 43 - |
| 7.4 Intoxikace buněk xenobiotiky.....                                                                            | - 45 - |
| 7.5 Stanovení buněčného poškození MTT testem .....                                                               | - 45 - |
| 7.6 Izolace RNA trizolovou metodou a stanovení celkové RNA .....                                                 | - 46 - |
| 7.7 Reverzní transkripce .....                                                                                   | - 46 - |
| 7.8 Real-time PCR .....                                                                                          | - 47 - |
| 7.9 Statistické vyhodnocení .....                                                                                | - 48 - |
| 8. VÝSLEDKY .....                                                                                                | - 49 - |
| 8.1 Změny exprese miRNA u pacientů s CLL.....                                                                    | - 49 - |
| 8.2 Stanovení toxicity vybraných xenobiotik na HepG2 a HeLa buněčné linii.....                                   | - 53 - |
| 8.3 Vliv syntetické miR-29 transfekované do HepG2 buněk na toxicitu etoposidu .....                              | - 55 - |
| 8.4 Sledování vlivu dexamethasonu a mifepristonu na expresi miR-29 u HeLa a HepG2 buněk.....                     | - 56 - |
| 8.5 Srovnání toxicity kombinací xenobiotik – etoposid, dexamethason, mifepriston na HepG2 a HeLa buňkách .....   | - 57 - |
| 8.6 Vliv transfekovaných miR-29 na toxicitu azacytidinu v HepG2 a HeLa buňkách ...                               | - 59 - |
| 8.7 Srovnání toxicity kombinací xenobiotik – azacytidin, dexamethason, mifepriston na HepG2 a HeLa buňkách ..... | - 62 - |
| DISKUSE.....                                                                                                     | - 64 - |
| ZÁVĚR .....                                                                                                      | - 68 - |
| LITERATURA .....                                                                                                 | - 69 - |
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....                                                                                    | - 79 - |

## **CÍLE PRÁCE**

1. Stanovit úroveň exprese miR-15a, miR-16-1, miR-29 u CLL pacientů a jejich porovnání s diagnostickými daty
2. Vliv dexamethasonu na expresi miR-29
3. Vliv syntetické miR-29 na toxicitu vybraných xenobiotik

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1. ÚVOD

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) patří výskytem mezi nejčastější leukemie západního světa. I přes skutečnost, že existence tohoto onemocnění je v povědomí více než 80 let a jejímu pochopení bylo věnováno ohromné úsilí, stále nejsme schopni tuto nemoc úplně vyléčit a bohužel neznáme ani podstatu jejího vzniku. Když byla před nedávnem objevena významná skupina regulátorů genové exprese - mikroRNA, která by mohla hrát roli v patogenezi nádorových onemocnění, byla pochopitelně část výzkumu zabývajícího se mikroRNA zaměřena také na chronickou lymfocytární leukemii. Takto bylo v CLL identifikováno několik mikroRNA, jmenovitě miR-15a, miR-16-1, miR-29, miR-181, miR-34, které zřejmě ovlivňují patogenezi tohoto typu leukemie. Nicméně pro úplné pochopení podstaty této nemoci je potřeba dohledat ještě velké množství faktorů, ať už mikroRNA nebo jiných molekul. My jsme se v této práci pokusili osvětlit alespoň vztah miR-15a, miR-16-1 a rodiny miR-29 s CLL. V další části se zabýváme xenobiotiky, která by mohla potenciálně ovlivňovat hladinu exprese miR-29, a naopak sledujeme vliv pozměněné exprese miR-29 na toxicitu vybraných xenobiotik na HepG2 a HeLa buňkách. Tyto poznatky mohou v budoucnu vést k účinnější terapii CLL, ale i jiných maligních onemocnění.

## **2. CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE**

### **2.1 Definice**

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je charakterizována jako vysoce variabilní onemocnění korelující s několika biologickými prognostickými markery. Onemocnění se vyznačuje akumulací klonálních, maligně transformovaných vyzrálých B-lymfocytů v krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách, slezině, játrech a příležitostně i v jiných orgánech (Chiorazzi et al., 2005). Přes relativní morfologickou a imunofenotypovou homogenost má CLL extrémně variabilní průběh, od indolentní choroby, která nekrátí život a nevyžaduje léčbu, po agresivní onemocnění s poměrně krátkou dobou přežití i přes intenzivní terapii (Jemal et al., 2004).

### **2.2 Epidemiologie a etiologické souvislosti**

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je nejčastější leukemií dospělých na západní polokouli, kde tvoří přibližně 30% všech diagnostikovaných leukemií. V Dánsku tvoří dokonce 35-40 %, naopak v Číně a Japonsku jen 3-5 % všech leukemií (Redaelli et al., 2004). V USA bylo v roce 2010 diagnostikováno 14990 nových případů (8870 mužů, 6120 žen) a 4390 úmrtí (2650 mužů, 1740 žen) na toto zhoubné onemocnění (Amer.Canc.Soc., 2010). V České republice byla na území Jihomoravského kraje k datu 31. srpna 2008 provedena analýza na 14 hematologických pracovištích. K tomuto datu bylo diagnostikováno 540 pacientů s CLL (306 mužů, 234 žen), prevalence tedy byla 48 případů na 100 000 obyvatel. CLL je onemocnění převážně starších lidí, jen zřídka se vyskytuje u mladších 40 let, medián věku při stanovení diagnózy podle jihomoravské analýzy byl 65 let (Panovská et al., 2010). CLL je 2x častější u mužů než u žen, ženy však žijí déle a tato choroba u nich kulminuje o 6 let později, proto se nakonec vyrovnají součty incidencí CLL u všech mužů a žen (Mayer & Starý, 2002). Poměr v Jihomoravském kraji byl 1,3:1 (Panovská et al., 2010).

I přes rozsáhlý výzkum zabývající se CLL, je příčina vzniku stále neznámá. Nebyla prokázána souvislost s infekcí, imunodeficiencí nebo jinými zevními vlivy, ani s působením radioaktivního záření či alkylačních cytostatik, jak je obvyklé u jiných typů leukemií. Pouze je znám vyšší výskyt u pracovníků v zemědělství a u lidí, kteří jsou v kontaktu s azbestem a chemickými rozpouštědly (Adam et al., 2008). Familiární výskyt CLL je vzácný. Příbí příbuzní mají oproti průměrné populaci 3x vyšší pravděpodobnost získat tuto chorobu nebo jiné lymfoproliferativní onemocnění (Mayer & Starý, 2002).

### 2.3 Klinický obraz a průběh nemoci

Tato diagnóza je často stanovena zcela náhodně při vyšetření krevního obrazu, jelikož může mít až desetiletí trvající bezpříznakové období. Jediným znakem je lymfocytosa, což je zvýšený počet lymfocytů v krvi. Jiné formy mohou mít naopak průběh agresivní, kdy se stav nemocného rychle zhoršuje a obvykle jej přivede ke stanovení diagnózy vyšetření pro symptomy, jako je noční pocení, úbytek hmotnosti či zvýšená teplota (Adam et al., 2008). K častým příznakům patří:

- Lymfadenopatie – mnohočetné zvětšení uzlin, obvykle již z počátku generalizované, postihuje uzliny krku, axil a třísel. Méně výrazná je abdominální lymfadenopatie v mediastinu.
  - Splenomegalie a hepatosplenomegalie – zvětšená slezina se vyskytuje u 50% nemocných již v počátku nemoci. Hepatomegalie je méně častá.
  - Infiltrace mimouzlinových tkání – málokdy vyvolává symptomy. Nejčastěji se udává infiltrace kůže a tonzil, méně často zažívacího traktu, plic, pleury, CNS, ledvin a kostí.
  - Anémie – chudokrevnost je nejčastější komplikace CLL. Pro léčbu je nutno pečlivě analyzovat etiologii.
  - Imunosuprese – pokles aktivity protilátkové imunity může být způsoben několika příčinami. Buňky CLL produkují cytokinin TGF  $\beta$ , který inhibuje proliferaci imunoglobulinů. Pokles aktivity T-buněčné imunity, je způsobena poruchou T-lymfocytů (NK, LAK-buněk). Pokles neutrofilů při progresi onemocnění.
  - Přítomnost monoklonálního imunoglobulinu – M-Ig může poškozovat organismus vyvoláním glomerulonefritidy, nefrotického syndromu nebo zasahovat do koagulační kaskády.
  - Zvýšení viskozity krve vlivem lymfocytů – při vysokých počtech lymfocytů ( $500-1000 \cdot 10^9/l$ ) poruchy prokrvení.
  - Transformace v lymfoproliferativní onemocnění vyšší malignity – u 3-5 % nemocných dojde k transformaci obvykle v difuzní velkobuněčný lymfom (Richterův syndrom) nebo v prolymfocytární leukemii se změnou morfologie lymfocytů.
- (Adam et al., 2008)

### 2.4 Imunofenotyp CLL

Imunofenotypizace CLL je základním diagnostickým prvkem, pomocí kterého dokážeme odlišit CLL od jiných maligních zvratů. Provádí se pomocí průtokové cytometrie. Pro buňky CLL je typická přítomnost povrchového imunoglobulinu (sIg), nejčastěji sIgM nebo sIgD, ale intenzita jeho exprese je slabá. Společné znaky B-lymfocytární řady jsou CD19, CD20, CD24, CD37, CD40 a CD45RA. Antigen CD9, přítomný na normálních pre-B-

lymfocytech, je nalézán jen u <20% případů CLL. Pro buňky CLL je typická přítomnost CD5 antigenu, který se fyziologicky nachází jen na T-lymfocytech, druhým typickým znakem je přítomnost antigenu CD23, což je nízkofinitní Fc-IgE receptor, který je vzácně nalézán i na jiných maligních B-lymfocytech. CD22 a FMC7 se vyskytují jen velmi vzácně nebo vůbec. Antigen CD35 je přítomný na normálních B-lymfocytech, ale na CLL buňkách se nevyskytuje. CD79b je u CLL obvykle negativní a u ostatních lymfocytických leukemií je pozitivní. Ke stanovení diagnózy CLL byl určen skórovací systém, který hodnotí 6 znaků (sIg, CD5, CD23, FMC7, CD22 a CD79b) (Adam et al., 2008).

## 2.5 Molekulární patogeneze

Chronická lymfocytární leukemie je charakterizována akumulací monoklonálních CD5+CD23+CD27+sIg<sup>slabě</sup> B-lymfocytů v periferní krvi, kostní dřeni a lymfatických orgánech. Přes morfológickou a imunofenotypovou homogenost má CLL výrazně variabilní klinický průběh. S variabilitou zřejmě souvisí přítomnost/absence somatických hypermutací ve variabilní oblasti těžkého řetězce B-buněčného receptoru (IgVH), díky kterým dělíme CLL na dva subtypy (Mráz et al., 2010a). Předpokládá se, že pro patogenezi CLL je zásadní vliv antigenní stimulace. Po stimulaci antigenem dochází ke klonální expanzi B lymfocytů, ty putují do germinálního centra, kde je B-buněčný receptor (BCR) upraven somatickou hypermutací, jejímž výsledkem je vyšší afinita protilátek pro antigen. Polovina případů CLL, kde proběhla somatická mutace IgVH genu, vznikla po setkání s antigenem a jeví se jako prognosticky příznivá. Druhá skupina, která nemá mutovaný IgVH gen, je odvozena z buněk, které neprošly germinálním centrem (Brejcha, 2010). Přítomnost somatických hypermutací v IgVH je jedním z nejčastěji využívaných prognostických markerů. Analýzou genové exprese bylo zjištěno, že se buňky s mutovaným a nemutovaným IgVH odlišují v expresi pouze několika desítek genů a že oba subtypy jsou odvozeny z paměťových buněk (Klein et al., 2001). Studium patogeneze CLL by se dalo shrnout do 3 skupin: signalizace přes BCR, narušení apoptotických drah a úloha mikroprostředí (Mráz et al., 2010a).

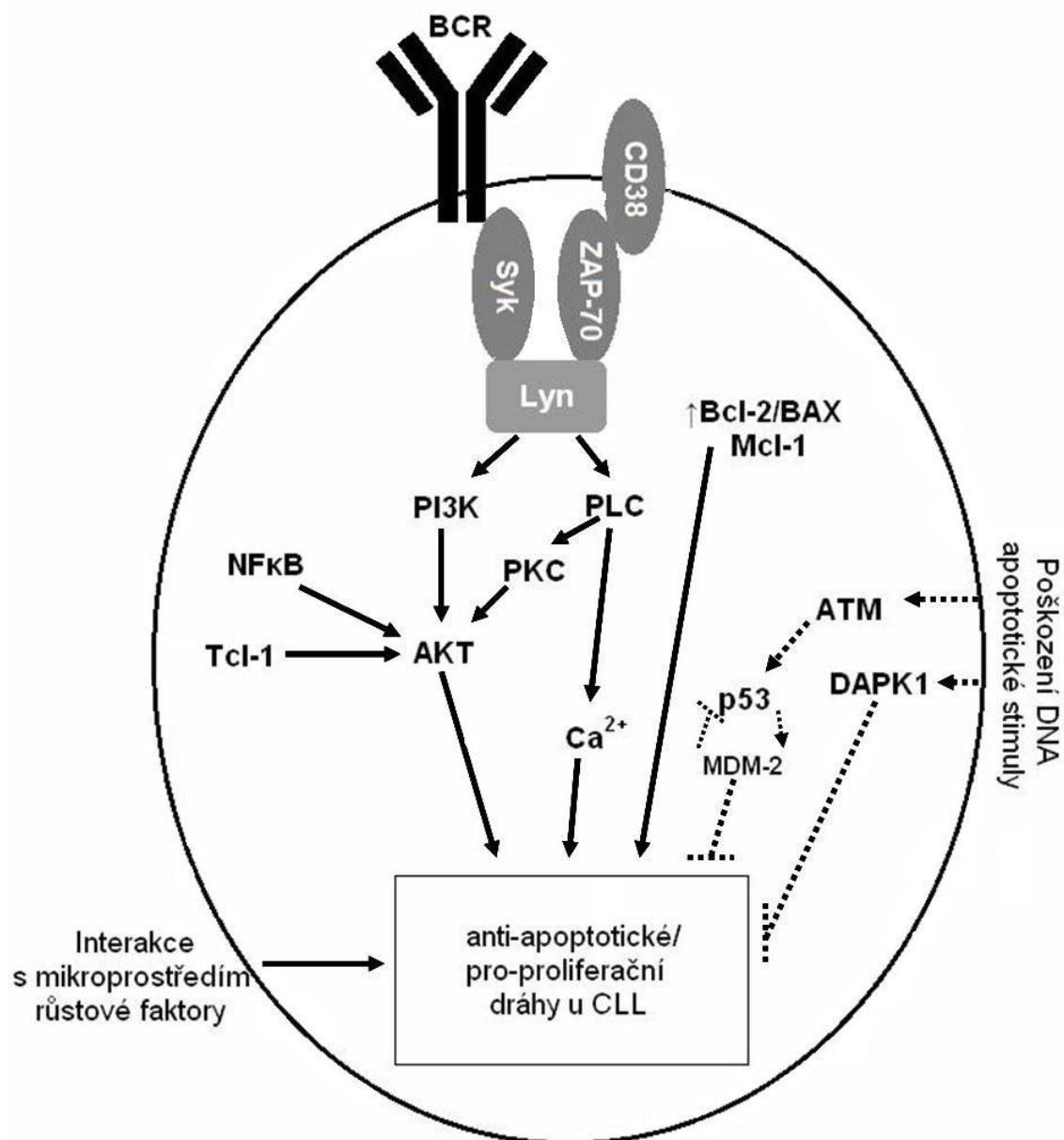
### 2.5.1 B-buněčný receptor a jeho signalizace

B-buněčný receptor (BCR; B-cell receptor) je vystaven na povrchu zralého B-lymfocytu, kde slouží k rozpoznání antigenu a následné tvorbě protilátek, což je tentýž protein v solubilní formě. Signalizace prostřednictvím BCR je nezbytná pro přežití a proliferaci normálních i nádorových B-lymfocytů (Mráz et al., 2010a). Variabilita BCR vzniká přestavbou subgenů pro V, D a J oblasti těžkých a V, J oblasti lehkých řetězců imunoglobulinů a náhodným včleňováním HCDR3 oblasti (heavy chain complementarity determining region 3) (Murray et al., 2008). Důležitou roli při vzniku IgVH hraje enzym AID (activation-induced cytidine

deaminase), který do něj vnáší somatické hypermutace a tím zvyšuje specifitu produkovaných protilátek. Na základě mutace IgVH můžeme pacienty s CLL rozdělit na dvě skupiny: s mutovaným IgVH (medián přežití 25 let) a nemutovaným IgVH (medián přežití 8 let). Porucha AID může vnášet nežádoucí mutace i do jiných genů například BCL6 a C-MYC u lymfomů (Nilsen et al., 2005). Vnesením hypermutací může také dojít k inaktivaci genu p53 (Malčíková et al., 2008).

Cytoplazmatickou signalizaci BCR zprostředkovávají převážně Lyn a Syk kinasy. Jejich aktivací se přenáší signál na další signální molekuly. Jedna z klíčových signálních molekul je fosfatidylinositol-3-kinasa (PI3K) a fosfolipasa C (PLC). PI3K tvoří fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP<sub>3</sub>), který aktivuje AKT kinasu a další signální molekuly. Aktivace PLC vede k uvolnění intracelulárního Ca<sup>2+</sup> a aktivaci protein kinasy C (PKC). Signální kaskáda tvořena extracelulárním signálem (ERK) aktivuje MAPK (mitogen-activated protein kinases), zahrnuje jaderný faktor NF-κB, který také aktivuje AKT kinasu (Niño & Clark, 2002). AKT kinasa následně zvyšuje hladinu anti-apoptotického proteinu z rodiny Bcl-2, kterým je Mcl-1. Kinasa AKT může být také aktivována proto-onkogenem Tcl-1, jehož zvýšená exprese byla pozorována u 90% pacientů s CLL (Herling et al., 2006). BCR signalizace na membráně se účastní také molekuly ZAP-70 (70-kDa zeta-asociovaný protein) a CD38, jejich výskyt je asociován převážně s nemutovaným IgVH a s tím souvisí agresivnější průběh onemocnění, proto jsou nejčastěji využívanými prognostickými markery (Scielzo et al., 2006). Signální dráha je naznačena na obrázku 1. Pacienti s nemutovaným IgVH a vyšší hladinou ZAP-70 a CD38 častěji reagují na aktivaci BCR fosforylací Syk a uvolněním intracelulárního Ca<sup>2+</sup>, zatímco buňky pacientů s mutovaným IgVH setrvávají ve stavu anergie, který je považován za důsledek chronické stimulace autoantigenem (Zupo et al., 1996). U CLL byla popsána abnormální aktivace Lyn a Syk kinas, které přenášejí anti-apoptotický signál bez vazby antigenu na receptor. Inhibice těchto kinas vedla k apoptose CLL buněk (Gobessi et al., 2009).

ZAP-70 je tyrosin kinasa, která byla donedávna považována za signální molekulu výhradně pro T-lymfocyty. Nicméně později se ukázalo, že ZAP-70 je exprimována také na B-lymfocytech převážně s nemutovaným IgVH genem u CLL (Scielzo et al., 2006). ZAP-70 je strukturním homologem Syk kinasy a pravděpodobně nepřímo přes jiné asociované molekuly moduluje BCR signalizaci (Chen et al., 2002). Toto tvrzení podpořil experiment vnesení ZAP-70 do CLL buněk, což vedlo k silné aktivaci Syk, ERK a AKT kinas, tedy stejných signálních molekul jako pro BCR signalizaci (Chen et al., 2005a). A překvapivě to potvrdila také skutečnost, že po stimulaci BCR nedojde k aktivaci (fosforylaci) ZAP-70, přestože signální dráhy (Syk, ERK, AKT) byly aktivovány (Gobessi et al., 2007). S horší prognózou je asociována také exprese molekuly CD38 (Shanafelt et al., 2004). Povrchový antigen CD38 je zapojen do BCR signalizace a spolupracuje s ZAP-70, což se odráží na horší prognóze pacientů CD38+/ZAP-70+ ve srovnání s pacienty CD38+/ZAP-70- (Deaglio et al., 2007).



**Obrázek 1** Molekulární defekty, které umožňují CLL buňkám přežít. Přerušované - aberace v apoptotických drahách. Plná čára – převaha anti-apoptotických molekul (Mráz et al., 2010a).

### 2.5.2 Narušení apoptotických drah

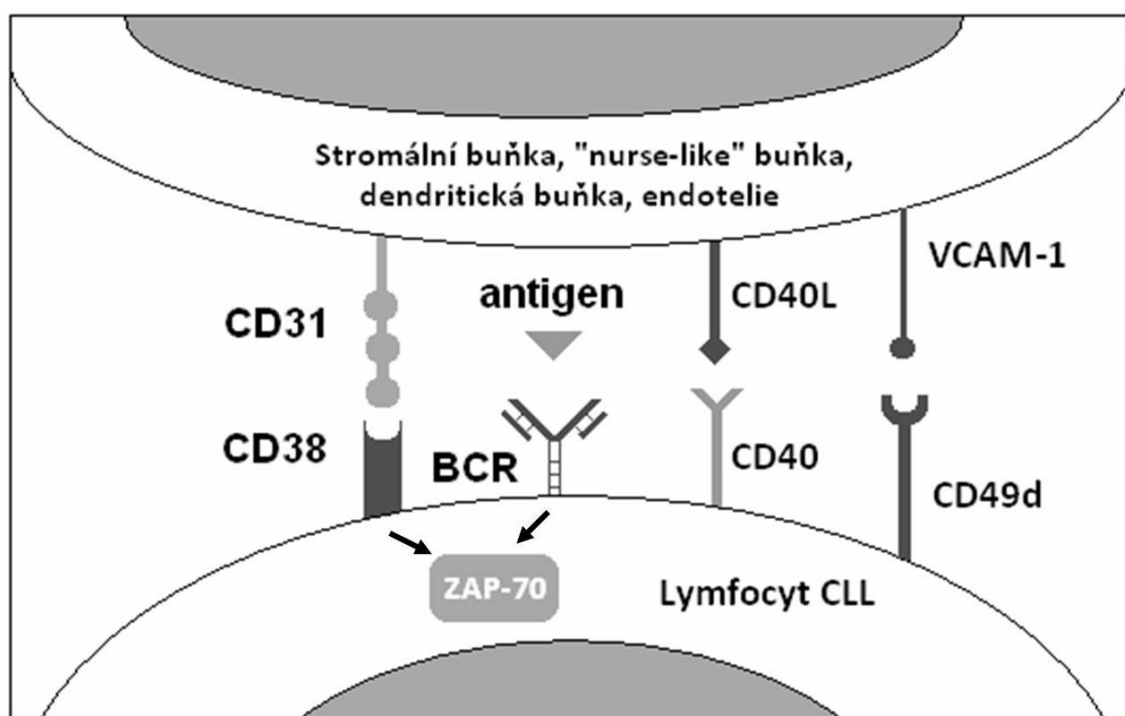
Apoptosa u normálních B-lymfocytů je přísně regulována. Paměťové buňky dlouhodobě přežívají a B-lymfocyty se slabou vazbou antigenu zanikají. CLL je onemocnění, ve kterém B-lymfocyty příliš neproliferují, ale spíše setrvávají v G<sub>0</sub> fázi buněčného cyklu. Defekty, které umožňují těmto buňkám přežít, jsou aberace v apoptotických drahách a relativní převaha anti-apoptotických molekul. V souvislosti s narušenou apoptosou je dlouhou dobu studována zvýšená exprese pro a anti-apoptotických proteinů rodiny Bcl-2 (Mráz et al., 2010a). U žádného nádorového onemocnění není exprimována tak vysoká hladina Bcl-2 jako u CLL. CLL je charakterizována jako Bcl-2 závislé onemocnění (Del Gaizo Moore et al., 2007). Bcl-2 rodina je charakteristická přítomností BH domén a obsahuje pro-apoptotické a anti-apoptotické molekuly, jejichž vzájemné interakce rozhodují o aktivaci apoptosy. Samotný Bcl-2 protein je u CLL exprimován ve velmi vysoké hladině, což nebylo zatím vysvětleno (Hanada et al., 1993). Jelikož jsou ale CLL buňky stále citlivé k látkám navozujícím apoptosu, neblokuje Bcl-2 apoptosu nevratně (Keating et al., 2005). Samotná hladina Bcl-2 nebyla prokázána jako prognostický marker, ale pro osud CLL buňky je klíčový především poměr proteinů Bcl-2 a Bax, kdy Bax je pro-apoptotický protein (Thomas et al., 1996). U CLL byla také popsána vyšší hladina Mcl-1 proteinu, který inhibuje další aktivátory apoptosy a nese sebou agresivnější fenotyp (Kitada et al., 1998). Další defekty apoptosy mohou být způsobeny mutací nádorového supresoru p53 a ATM kinasy. Za normálních okolností je v důsledku poškození DNA aktivován p53 ATM kinasou, který následně aktivuje transkripci pro-apoptotických proteinů, jako např. Bax (obrázek 1). Pacienti s defektem p53 tvoří podskupinu s výrazně agresivnějším onemocněním a špatně reagují na cytotoxickou terapii (Malčíková et al., 2009). Další pro-apoptotická molekula, u které byla popsána porucha u CLL, je DAPK1 (death-associated protein kinase 1), byla zjištěna mutace v promotoru DAPK1 a její promotor byl methylován (Blum et al., 2009).

### 2.5.3 Úloha mikroprostředí

Na patogenezi se kromě porušení vnitřních regulačních mechanismů B-lymfocytů podílí také porucha externí regulace. Stěžejní význam mikroprostředí pro přežití CLL buněk je jasně patrný při jejich kultivaci *in vitro*, kde bez kontaktu s podpůrnými buňkami spontánně umírají (Mráz et al., 2010a). Tento fakt lze vysvětlit interakcemi maligních buněk s T-lymfocyty, stromálními buňkami, „nurse-like“ buňkami, endoteliemi a dendritickými buňkami v mikroprostředí kostní dřeně, lymfatických uzlin a sleziny, kde jsou chráněny proti apoptose a stimulovány ke zvýšené proliferaci (Smolej, 2010).

Významnou roli v interakci s mikroprostředím mají chemokiny. CLL lymfocyty mají exprimován receptor CXCR4 a stromální a podpůrné („nurse-like“) buňky secernují ligand CXCL12. Tato signální dráha hraje zásadní roli při směřování maligních buněk do výhodného

mikroprostředí (Burger & Kipps, 2006). Mezi nejdůležitější interakce mikroprostředí patří CD40-CD40 ligand, který vykazuje zvýšenou expresi na T-lymfocytech v pseudofolikulech (von Bergwelt-Baildon et al., 2004). Další signální dráha účastníci se migrace a proliferace je dráha CD31/CD38/ZAP-70. K ZAP-70 vedou také signály z BCR receptoru po stimulaci antigenem (Pleyer et al., 2009). Molekula CD49d je povrchová adhezí molekula CLL, která se váže na VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) v proliferačních centrech, což vede ke zvýšené viabilitě buněk (Zucchetto et al., 2009). Interakce mezi B-lymfocyty a mikroprostředím jsou znázorněny na obrázku 2.



**Obrázek 2** Přehled důležitých interakcí mezi receptory a ligandy v mikroprostředí dřeně a lymfatických orgánů (Smolej, 2010).

Angiogeneze je mnohastupňový proces tvorby nových cév, který se podílí na progresi CLL zvýšeným přísunem živin a ochranou proti apoptose. Klíčovou podmínkou pro vznik nových cév v organismu je nerovnováha mezi novotvorbou cév a její inhibicí (Smolej, 2010). Angienní procesy jsou výsledkem interakcí CLL buněk s endoteliemi, ale i dalšími buněčnými typy. Lymfocyty jsou schopny produkovat širokou paletu pro- i anti-angienních látek, mezi nejdůležitější patří cévní endotelový růstový faktor – VEGF a bazický růstový faktor pro fibroblasty – bFGF.

## 2.6 Prognostické faktory

Jelikož je CLL onemocnění s velice heterogenní prognózou, je třeba odlišit skupinu pacientů s indolentním onemocněním a pacienty s horší prognózou, u kterých je potřeba zahájit léčbu ve správném okamžiku. Proto se dnes hledají nové prognostické markery, které společně s těmi klasickými pomohou rozdělit pacienty na optimální skupiny a navrhnout efektivní terapii (Kozák, 2010b).

### 2.6.1 Klasické prognostické faktory

Mezi klasické prognostické faktory CLL patří klinické stádium, pohlaví, věk nebo zdvojovací čas lymfocytů (LDT, lymfocyte doubling time). Pro klasifikaci stupně pokročilosti choroby a velikosti masy maligních buněk se používají kritéria, které definovali Rai a Binet (Mayer & Starý, 2002). Klasifikace podle Raie je popsána v tabulce 1.

**Tabulka 1** Klasifikace klinického stádia podle Raie.

| Stádium | Znaky                                                                             | Medián přežití (roky) |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 0       | Pouze lymfocytosa v periferní krvi a kostní dřeni                                 | 12-15                 |
| I       | Lymfocytosa a lymfadenopatie                                                      | 9                     |
| II      | Lymfocytosa a splenomegalie nebo hepatomegalie                                    | 5                     |
| III     | Lymfocytosa a anémie, konc. hemoglobinu $<110 \text{ g.l}^{-1}$                   | $<1-2$                |
| IV      | Lymfocytosa a trombocytopenie, počet trombocytů $<100 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ | $<1-2$                |

Převzato z Mayer & Starý, 2002.

Klasifikace klinického stádia podle Bineta je založena na počtu postižených oblastí definovaných přítomností zvětšených lymfatických uzlin větších než 1cm nebo organomegálií a toho, zda je přítomna anémie nebo trombocytopenie (Kozák, 2010b). Klasifikace podle Bineta je popsána v tabulce 2.

**Tabulka 2** Klasifikace klinického stádia podle Bineta.

| Stadium                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Znaky                                                                                                                                                                                           | Median přežití (roky) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Jsou splněny podmínky 1, 2 a 3:<br>1. počet postižených oblastí <3<br>2. koncentrace hemoglobinu $\geq 100 \text{ g.l}^{-1}$<br>3. počet trombocytů $\geq 100 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$       | 8                     |
| B                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Jsou splněny podmínky 1, 2 a 3:<br>1. počet postižených oblastí $\geq 3$<br>2. koncentrace hemoglobinu $\geq 100 \text{ g.l}^{-1}$<br>3. počet trombocytů $\geq 100 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ | 8                     |
| C                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Bez ohledu na organomegalii je splněna jedna nebo obě podmínky:<br>1. koncentrace hemoglobinu $< 100 \text{ g.l}^{-1}$<br>2. počet trombocytů $< 100 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$                | 2                     |
| Definice postižených oblastí: <ul style="list-style-type: none"> <li>• uzliny hlavy, krku, lymfatická tkáň Waldeyerova okruhu</li> <li>• unilaterální nebo bilaterální postižení axilárních uzlin</li> <li>• unilaterální nebo bilaterální postižení tříselných a povrchových femorálních uzlin</li> <li>• hmatná zvětšená slezina</li> <li>• hmatná zvětšená játra</li> </ul> |                                                                                                                                                                                                 |                       |

Převzato z Mayer & Starý, 2002.

Dalším prognostickým markerem je zdvojovací čas lymfocytů (LDT), to je doba, za níž dojde k nárůstu lymfocytů v periferní krvi o 100 % původní hodnoty. Pacienti, u kterých je LDT delší než 12 měsíců, mají velmi dlouhé přežití (Kozák, 2010b). Pohlaví a věk jsou také prediktory prognózy. Pacienti s CLL mají kratší přežití než pacientky, přitom biologická podstata tohoto rozdílu není vysvětlena (Molica, 2006). Starší pacienti mají sice absolutní přežití kratší než mladší pacienti, ale relativní přežití mají delší (Molica et al., 1994).

## 2.6.2 Nové prognostické faktory

### 2.6.2.1 Molekulární cytogenetika

Obecně je vznik nádorového onemocnění podmíněn změnami v buněčném cyklu a to buď nadbytkem proto-onkogenů, nebo nedostatkem nádorových supresorů. S tím souvisí změny na struktuře DNA, kde ve většině případů dochází k mutacím, delecím, translokacím, či dokonce ke změně celkového počtu chromosomů. Tyto změny jsou detekovatelné pomocí molekulární cytogenetiky, která umožňuje odhalit další prediktivní faktory v řadě onemocnění. U chronické lymfocytární leukemie byla nalezena řada chromosomových změn, díky kterým můžeme rozdělit pacienty do různých prognostických skupin. Nejčastěji identifikované chromosomové aberace u CLL jsou delece 13q14, trisomie 12, delece 11q, delece 17p13 (Berková & Michalová, 2010).

Delece dlouhých ramen chromosomu 13 je nejčastější změnou, která se vyskytuje u více než 50 % pacientů s CLL, z toho ještě třetina společně s jinou aberací. Ostatní delece CLL jsou

monoalelické, tato delece je ve čtvrtině případů bialelická nebo v kombinaci s monoalelickou. Několik studií potvrdilo, že výskyt monoalelické delece 13q14 jako jediné aberace souvisí s příznivým průběhem onemocnění, u bialelické delece se to však nepotvrdilo (Chena et al., 2008). Četnost delecí vedla k myšlence, že se v této oblasti nachází nádorový supresor, jehož nepřítomnost má význam v patogenezi CLL. V této oblasti se nachází RB-1 gen, ale nebyla prokázána žádná souvislost s etiopatogenezí choroby (Dohner et al., 1994). Stále větší pozornost je věnována miR-15a a miR-16-1, které se nachází v této oblasti a regulují anti-apoptotický protein Bcl-2, více o nich bude zmíněno v kapitole miRNA u CLL (Cimmino et al., 2005).

Trisomie chromosomu 12 je detekována u 10-25 % pacientů. I přes velké množství studií, které se touto klonální numerickou změnou zabývaly, její prognostický význam zůstává stále nejasný (Hamblin, 1997).

Delece 11q22-q23 se vyskytuje u 10-20 % nemocných s CLL a společně s delecí 17p13 předpovídá rychlou progresi a velmi špatnou prognózu onemocnění. V této oblasti se nachází gen pro protein ATM, který v důsledku poškození DNA aktivuje nádorový supresor p53. Absence ATM tedy může vést k narušení p53-dependentní apoptotické dráhy (Pettitt et al., 2001). U těchto buněk byla prokázána také zvýšená rezistence k cytotoxickým chemoterapeutikům (Austen et al., 2007).

Četnost mutace 17p13 je 10-15 %. V této oblasti se nalézá gen pro nádorový supresor p53 a v případě, že není tato oblast deletována, je u naprosté většiny pacientů mutována, což vede ke stejné špatné prognóze. Tento častý výskyt mutací souvisí mimo jiné také se špatnou odpovědí na terapii a chemorezistencí (Zenz et al., 2008).

#### 2.6.2.2 Mutační stav IgVH

Somatická hypermutace ve variabilní oblasti těžkého řetězce B-buněčného receptoru rozlišuje pacienty na dvě skupiny s odlišnou prognózou. Pacienti s mutací IgVH mají výrazně lepší prognózu než pacienti s nemutovaným IgVH. Somatické hypermutace se fyziologicky odehrávají v germinálních centrech a předpokládá se, že mutované IgVH charakterizuje subtyp, u nějž prošly leukemické buňky germinálním centrem (Hamblin et al., 1999). Další významná souvislost s nepříznivou prognózou byla zjištěna u mutovaného IgVH a genu VH3.21, u kterých byl zjištěn častý výskyt mutace p53 (Rassenti & Kipps, 2000).

#### 2.6.2.3 CD38 a ZAP-70

CD38 má funkci jak enzymu, tak receptoru. Původně nalezená souvislost mezi nemutovaným IgVH a vyšší expresí CD38 vedla k myšlence, že by CD38 mohl nahradit těžko stanovovaný parametr IgVH. Tato myšlenka se však nepotvrdila, nicméně potvrdilo se spojení vyšší exprese CD38 se špatnou prognózou CLL a CD38 se stal nezávislým prognostickým

znakem (Hamblin et al., 2000). Prahová hodnota pro určení positivity, respektive negativity v expresi znaku byla stanovena na 30 % (Ghia et al., 2003).

Na základě expresního profilování CLL byla popsána zvýšená intracelulární exprese ZAP-70 v buňkách s nemutovaným IgVH. Podobně jako v případě CD38, také u ZAP-70 se původní konkordance nepotvrdila, nicméně zvýšená exprese ZAP-70 má pouze negativní prognostický význam. U pacientů s nemutovaným IgVH a ZAP-70- je lepší prognóza oproti pacientů s nemutovaným IgVH a ZAP-70+ a u pacientů s mutovaným IgVH a ZAP-70+ je horší oproti pacientům s mutovaným IgVH a ZAP-70-. Podobný vliv byl nalezen v kombinaci s CD38, kdy pacienti s CD38+ a ZAP-70+ mají nejhorší prognózu a pacienti s CD38- a ZAP-70- mají nejlepší (Del Principe et al., 2006).

#### 2.6.2.4 Sérové markery a další prognostické znaky

V séru CLL pacientů bylo nalezeno množství markerů, jejichž zvýšená hladina je obvykle spojena s agresivnějším průběhem onemocnění a s horší prognózou. Mezi nejčastější patří laktátdehydrogenasa (LDH),  $\beta_2$  mikroglobulin ( $\beta_2$ M), solubilní CD23, CD27, CD44 a thymidinkinasa (TK).

Další prognostické faktory jsou markery angiogeneze. Vyšší hladina VEGF, bFGF, receptory pro VEGF a matrix metaloproteinasy 9 (MMP-9) jsou spojeny s pokročilým klinickým stadiem CLL a časnou progresí (Kozák, 2010b).

## 2.7 Terapie CLL

Chronická lymfocytární leukemie je považována za nevyléčitelné onemocnění, u něhož i moderní chemoterapie pouze mírní příznaky a dočasně tlumí progresi onemocnění. Nicméně dnes používané kombinace cytostatik s monoklonálními protilátkami a alogenní transplantace krvetvorných buněk mají slibné výsledky v odpovědi na léčbu a navození kompletní remise (Kozák, 2010a).

### 2.7.1 Chemoterapie

#### 2.7.1.1 Alkylační cytostatika

Alkylační cytostatika byla prvním léčebným prostředkem s potenciálem navodit remisi choroby. Nejčastěji byl používán chlorambucil, který lze užívat perorálně, avšak v monoterapii má velmi pomalu nastupující účinek (Adam et al., 2008). Méně užívaným, ale stejně účinným jako chlorambucil, je cyklofosamid. Léčebný účinek je stejný s relativně vysokým počtem odpovědí, ale se zanedbatelným počtem kompletních remisí (Kozák, 2010a). Relativně lepší výsledky vykazuje bendamustin, který má nejen alkylační vlastnosti, ale také indukuje apoptosu

nezávisle na p53 (Roue et al., 2008). Efektivnější účinky umožňuje kombinovaná chemoterapie. Nejčastěji používaná je kombinace vinkristin, cyklofosfamid a prednison (COP) nebo vinkristin, adriamycin, cyklofosfamid a prednison s akronymem (CHOP). Tato léčba dosahuje léčebné odpovědi rychleji, není však prokázáno, že by dosahovala delšího přežití než léčba samotnými alkylačními cytostatiky (Adam et al., 2008).

#### 2.7.1.2 Glukokortikoidy

Glukokortikoidy indukují v jádře fyziologických, ale i patologických lymfocytů apoptotickou smrt buňky (Adam et al., 2008). Patří mezi ně prednison, methylprednison nebo dexamethason a jsou používány v léčbě autoimunitních cytopenií. Tyto látky mají lymfolytický efekt a v relativně krátké době vedou k ústupu lymfadenopatie a splenomegalie. Jejich účinek není závislý na apoptotické dráze spojené s p53. Nejčastěji se používají v kombinaci s monoklonálními protilátkami (Kozák, 2010a).

#### 2.7.1.3 Purinová analoga

Fludarabin je adenosinový analog a navodí vysoký počet odpovědí a dokáže navodit nezanedbatelný počet kompletních remisí. Mnohem účinnější je však v kombinaci s alkylačními cytostatiky. Kombinace s chlorambucilem byla zatížena nadměrnou toxicitou, ale kombinace s cyklofosfamidem (FC) vede k významně vyššímu počtu odpovědí a kompletních remisí než monoterapie. FC kombinace má typický synergický efekt, kdy fludarabin zabraňuje opravě DNA poškozené cyklofosfamidem (Eichhorst et al., 2006).

Kladribin (2-chlordeoxyadenosin) má srovnatelný efekt s fludarabinem. Samotná kombinace s cyklofosfamidem (CC) neměla výrazný účinek, ale kombinace s mitoxantronem (CCM) vedla k významně vyššímu počtu léčebných odpovědí a kompletních remisí, nicméně je zatížena větším množstvím infekcí (Robak et al., 2006).

#### 2.7.1.4 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky představují novou skupinu protinádorových přípravků, jež působí cíleně na nádorovou buňku a dovedou indukovat její zánik odlišnými mechanismy od účinků cytostatik.

Alemtuzumab (humanizovaná anti-CD52 monoklonální protilátka) je namířena proti antigenu CD52 vyskytujícímu se na povrchu všech B i T-lymfocytů včetně nádorových buněk CLL. Přesný mechanismus účinku není znám. Mechanismy působení protilátky jsou založeny na aktivaci komplementu a protilátkově závislé buněčné toxicity pomocí vazby na Fc receptor protilátky, dochází i k přímé indukci apoptosy lymfoidní buňky (Flynn & Byrd, 2000). Alemtuzumab je vhodným lékem pro nemocné s defekty genu p53, u kterých ostatní typy léčby vesměs selhávají. Monoterapie alemtuzumabem je schválena jako vhodná léčba 1. linie pro

nemocné s CLL. V kombinaci s ostatními cytostatiky ještě nebyl dostatečně testován (Papajík et al., 2010).

Rituximab (chimerická anti-CD20 monoklonální protilátka) je obvykle velmi dobře tolerována a lze ji použít jak v monoterapii, tak v kombinaci s dalšími cytostatiky. Antigen CD20 je fosfoprotein vyskytující se na povrchu B-lymfocytů, reguluje vápníkový kanál a podílí se také na regulaci apoptosy (Deans et al., 2002). Protilátka efektivně váže C1g složku komplementu, čímž aktivuje komplementem zprostředkovanou lýzu B-buněk, a efektorové buňky imunitního systému, které dále ničí cílové buňky (Grillo-Lopez et al., 1999). Rituximab byl zkoumán v kombinaci s fludarabinem, přičemž došlo k prodloužení celkového přežití nemocných, aniž by došlo k navýšení toxicity léčby, či závažným infekcím (Byrd et al., 2005). Ještě úspěšnější byl v kombinaci s fludarabinem a cyklofosfamidem, kdy počet léčebných odpovědí dosáhl 95 % a šestileté přežití 51% (Tam et al., 2008).

### 2.7.2 Radioterapie

Radioterapie se uplatňuje v terapii CLL ve specifických situacích, zejména v symptomatické a paliativní oblasti. Radioterapie je indikována u symptomatické splenomegalie a lymfadenopatie, kde může přinést pacientům velkou úlevu a zvýšit kvalitu života (Kozák, 2010a).

### 2.7.3 Transplantace hematopoetických kmenových buněk

#### 2.7.3.1 Autologní transplantace

Vysokodávková chemoterapie s následnou transplantací autologních (vlastních) krvetvorných buněk představuje účinnou metodu léčby CLL, u které bohužel často dochází k relapsu onemocnění. Ve snaze minimalizovat množství leukemických buněk jsou zkoušeny různé techniky „čištění“ např. použití monoklonálních protilátek, komplementu nebo imunomagnetických kuliček. Dosud nebyly provedeny randomizované studie potvrzující pozitivní vliv „čištění“ a zároveň může docházet k výrazným ztrátám kmenových buněk (Válková & Cetkovský, 2010).

#### 2.7.3.2 Alogenní transplantace

Alogenní transplantace je v současnosti považována za jedinou potenciálně kurativní metodu léčby CLL. Oproti cytotoxickému efektu nabízí jednak štěp nádorem nekontaminovaných buněk, ale také imunologicky zprostředkované reakce štěpu proti leukemii – pomocí dárcovských T-lymfocytů namířených na antigeny exprimované nádorovými buňkami. Problémem této léčby však zůstává vysoká morbidita a mortalita, proto je doporučována pouze pacientům s rizikovou CLL (Válková & Cetkovský, 2010).

### 3. MIKRO RNA

Relativně nedávno byla objevena velká skupina malých nekódujících RNA nazvaných mikroRNA nebo miRNA. Tento zprvu bezvýznamný objev odstartoval vlnu výzkumů zabývajících se těmito malými molekulami a přinesl nečekaný výsledek udělující těmto krátkým RNA roli významných regulátorů genové exprese.

#### 3.1 Historie miRNA

Prvními objevenými miRNA byly lin-4 a let-7 u *Caenorhabditis elegans*. Genetická analýza potvrdila jejich významný vliv na přechod mezi jednotlivými stádii živočicha (Lee et al., 1993). Přechod z prvního do druhého stádia larvy vyžaduje 22 nukleotidů dlouhou lin-4 RNA, která se specificky váže na 3'UTR mRNA lin-14 a lin-28, tím inhibuje jejich translaci a umožňuje tak přechod do vyššího stádia larvy. Přechod z pozdního stádia larvy na dospělého jedince vyžaduje 21 nukleotidů dlouhou let-7 RNA, která se obdobně váže na 3'UTR lin-41 a hbl-1 (Reinhart et al., 2000). Let-7 byla objevena také v celé řadě živočišných druhů včetně obratlovců, měkkýšů, kroužkovců a členovců, ale nebyla nalezena u žahavců, několika druhů hub, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* nebo *Arabidopsis* (Pasquinelli et al., 2000). Mezi dalšími prvotními objevy byla miRNA bantam v *Drosophila melanogaster*, která má anti-apoptotický účinek a stimuluje proliferaci buněk. Zvýšená exprese bantam vedla k nadměrnému růstu křídel a oční tkáně (Brennecke et al., 2003). Tyto a další objevy potvrzují domněnku, že se miRNA významnou měrou podílí na diferenciaci, proliferaci, apoptose a dalších důležitých procesech v živých organismech.

#### 3.2 Výskyt miRNA

MiRNA byla objevena téměř u všech živých organismů včetně živočichů, rostlin a virů. V současnosti je u člověka identifikováno cca 1048 miRNA, 176 u *Drosophila melanogaster*, 175 u *Caenorhabditis elegans*, 213 u *Arabidopsis thaliana* a jejich počty se s novými objevy neustále zvyšují (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl>). Bohužel u většiny z nich stále neznáme jejich biologickou funkci a cílové geny. Všechny informace jako označení, sekvence, cílové geny a další, jsou shromažďovány v databázi miRBase, která je volně dostupná na <http://www.mirbase.org/>.

## Pravidla nomenklatury miRNA

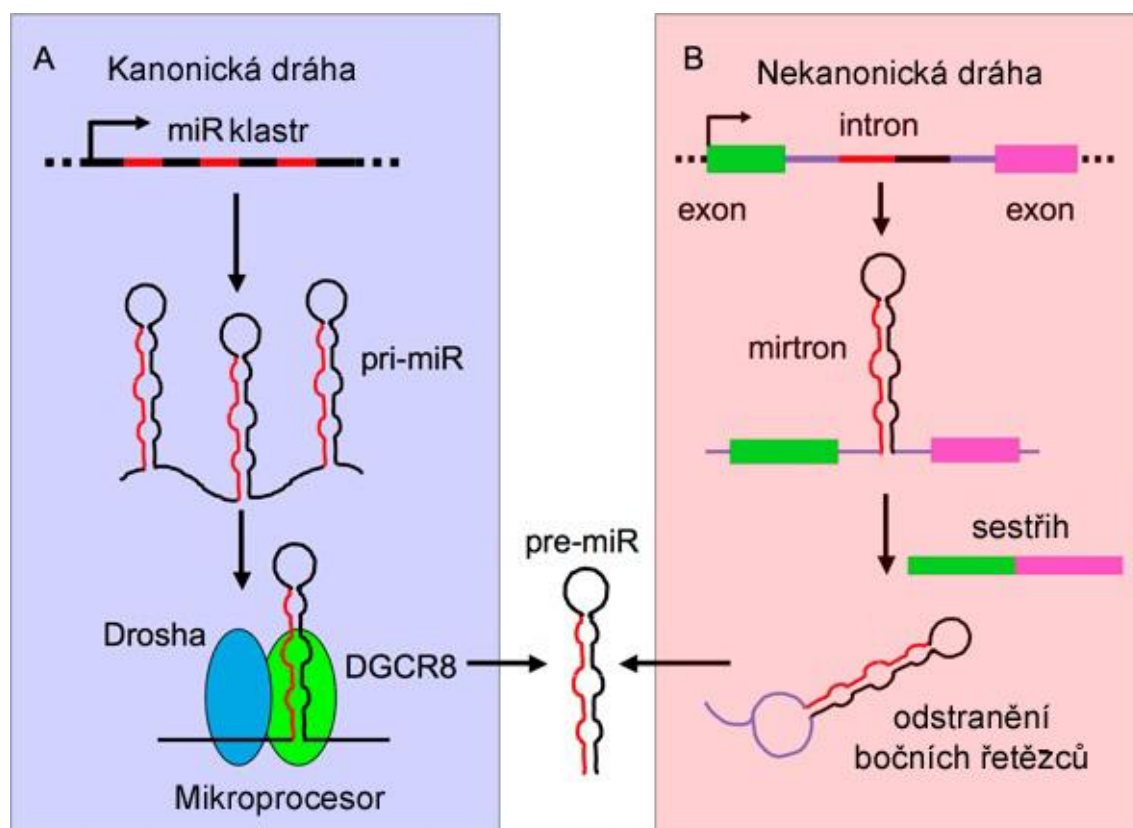
- název se skládá z předpony, která označuje daný organismus, střed - miR a číselné přípony, rozlišující jednotlivé miRNA (hsa-miR-17, homo sapiens miR-17)
- z různých vlásenkových struktur, může vzniknout identická zralá miRNA, která se rozlišuje čísly na konci (hsa-miR-16-1)
- příbuzné vlásenkové struktury exprimující miRNA o podobné sekvenci se rozlišují malými písmeny na konci (hsa-miR-29a)
- rostlinné miRNA se označují ath-MIR166a, číselné přípony se nepoužívají
- názvy virových miRNA se tvoří z názvu lokusu, ze kterého pocházejí (ebv-mir-BART1 z Epstein Barr viru BART lokusu)

(Griffiths-Jones et al., 2008)

Je však nutné poznamenat, že zkrácený název nám vždy neposkytuje komplexní informace, jako například orthologii a paralogii mezi jednotlivými miRNA. Dnes je již zřejmý výskyt stejných miRNA u více živočišných druhů, udává se například, že 60% lidských miRNA se nachází také v myším genomu. Ale není výjimkou, vyskytuje-li se specifická miRNA jen v určitém konkrétním druhu (Griffiths-Jones et al., 2008).

### 3.2.1 Výskyt miRNA v genomu

Lidský gen je identifikován jako specifická oblast DNA kódující daný protein. Tato oblast se skládá z exonů a intronů, exon kóduje proteinovou sekvenci, zatímco intron je vystřiháván jako odpadní produkt (Ying & Lin, 2006). MiRNA mohou být kódovány z různých oblastí genomu, podle kterých je dělíme na intronové miRNA a intergenové miRNA. Intronová miRNA sdílí stejný promotor s příslušným kódujícím genem, je vystřižena z transkriptu a dále sestřihávána na zralou miRNA. Intergenová miRNA je kódována v genomu mezi oblastmi genů a má vlastní promotor (Felekis et al., 2010). Intergenová miRNA je zpracovávána tzv. „kanonickou cestou“, kdy RNA polymerasa II. přepisuje geny a zakončuje pri-miRNA 5' čepičkou a 3' poly(A) koncem. Pri-miRNA je rozpoznána mikroprocesorovým komplexem a sestřihnuta na pre-miRNA. Některé intronové miRNA nacházející se mezi exony obchází proces zpracování mikroprocesorovým komplexem a místo toho je pre-miRNA vystřižena pomocí spliceosomu a následně dojde k opětovnému spojení exonů (Tiscornia & Izpisua Belmonte, 2010). Tento proces je znázorněn na obrázku 3. Nicméně nedávno bylo objeveno, že většina miRNA se nachází v intronové oblasti (Kim & Kim, 2007). MiRNA bývají také často shlukovány v klastry tvořící polycistronní transkript. V jednom klastru jsou obvykle 2 nebo 3 miRNA. Největší shluk v lidském genomu byl identifikován u hsa-miR-17 skládající se ze 6 miRNA, tyto byly objeveny také u jiných savců. U *D. melanogaster* byl identifikován dokonce klastr s 8 miRNA. MiRNA v klastrech mívají podobnou sekvenci, ale mohou být také úplně rozdílné (Altuvia et al., 2005).



**Obrázek 3** Zpracování pri-miRNA. (A) Kanonická cesta využívající mikroprocesorový komplex. (B) Nekanonická cesta obcházející zpracování mikroprocesorovým komplexem alternativní cestou sestřihu (Tiscornia & Izpisua Belmonte, 2010).

### 3.3 Biogeneze miRNA

Několika kroková cesta biogeneze miRNA začíná transkripcí, přepisem z DNA do RNA. Většina lidské miRNA je tvořena z intronů, což je nekódující oblast genomu (Rodriguez et al., 2004). Intron, asi 400 nukleotidů dlouhý, je vystřižen z primárního transkriptu a tvoří primární miRNA (pri-miRNA) (Hammond, 2006).

Původní hypotéza říkala, že transkripce miRNA je zprostředkována pomocí RNA polymerasy III, která přepisuje většinu krátkých RNA jako tRNA a U6 snRNA. Nicméně v roce 2004 byly předloženy důkazy o tom, že je miRNA přepisována RNA polymerasou II (Lee et al., 2004). Pri-miRNA nese na jednom konci čepičkovou (cap) strukturu a na druhé straně poly(A) konec, což je unikátní vlastnost transkriptů II. třídy. Další experiment potvrdil účast RNA polymerasy II. Lidské buňky byly ošetřeny  $\alpha$ -amanitinem, který snížil hladinu pri-miRNA v koncentraci, která selektivně inhibuje aktivitu RNA polymerasy II. Chromatin imunoprecipitační analýza ukázala, že je RNA polymerasa II asociována s miRNA promotorem. Nicméně výsledky také ukazují, že značné množství pri-miRNA nenese 5' čepičku nebo poly(A) konec. U těchto miRNA může být zapojena také jiná polymerasa nebo došlo k jejich ztrátě při sestřihu intronů, jako je tomu například u miR-15a a miR-16-1. Vystává zde zajímavá otázka,

zdali dochází ještě k jiným doposud nezjištěným mechanismům před tím, než přijde na řadu protein Drosha (Lee et al., 2004). Zároveň však byla provedena genetická analýza miRNA klastrů na 19. chromozomu, která odhaluje častý výskyt Alu repeticí. Alu je retrotranspozon, nejčastěji se vyskytující mobilní element v lidském genomu, který je kódován RNA polymerasou III. Častý výskyt Alu na 19. chromozomu tudíž vede k myšlence, že miRNA jsou kódovány také RNA polymerasou III. Tato myšlenka byla potvrzena chromatin imunoprecipitační analýzou, může však být specifická pouze pro oblast 19. chromozomu. Nicméně otázka, která polymerasa se podílí na tvorbě miRNA, zůstává nadále otevřená (Borchert et al., 2006).

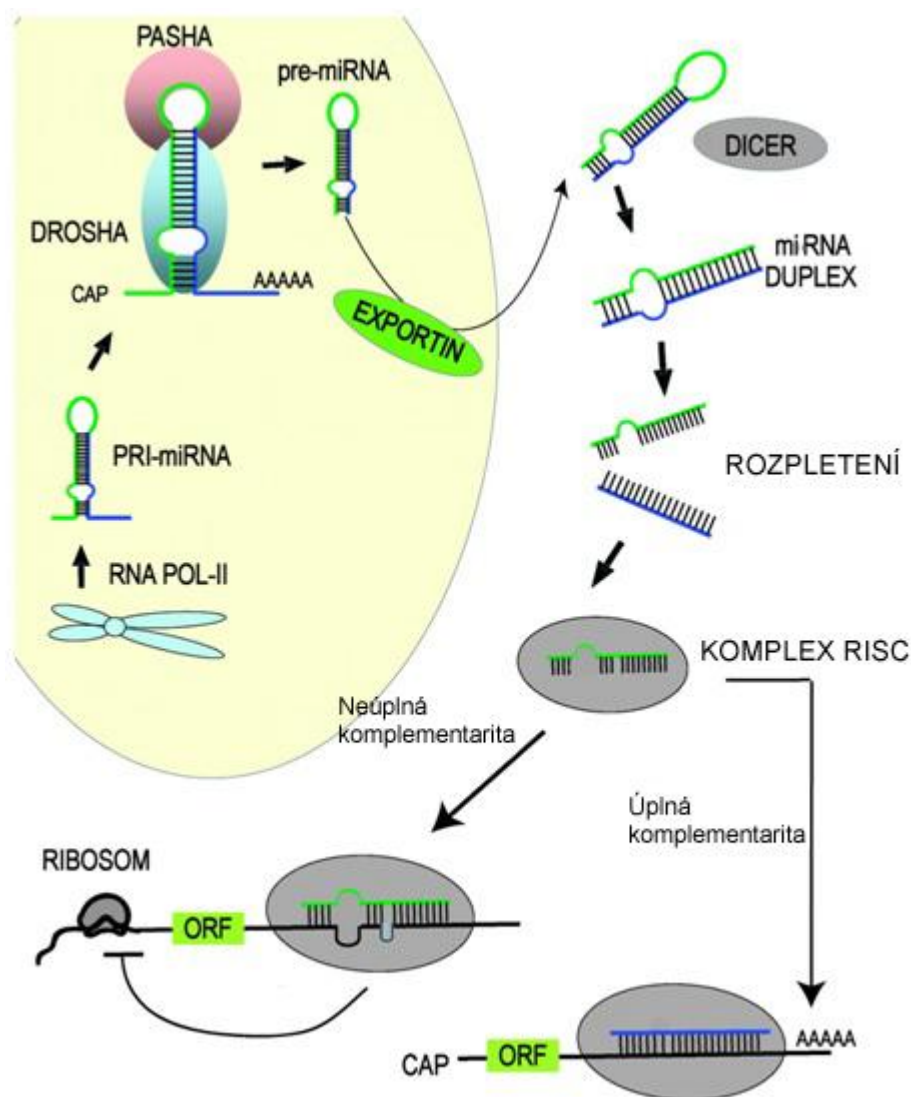
Typická pri-miRNA je složena z terminální smyčky, na ni navazující 33 nukleotidů dlouhý dvouvláknový kmen, a dvou volných jednovláknových konců (Liu et al., 2008). Pri-miRNA je sestříhána na 70 nukleotidů krátkou pre-miRNA tvořící typickou vlásenkovitou strukturu. Sestřih je zajištěn proteinovým komplexem známým jako mikroprocesorový komplex, který se skládá z ribonukleasy Drosha (Cullen, 2004) a RNA vázajícího proteinu DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8 gene) zvaný také Pasha (Denli et al., 2004, Liu et al., 2008).

Sestřih pri-miRNA mikroprocesorem začíná rozpoznáním ssRNA-dsRNA spojení pomocí DGCR8. Přisedne Drosha a sestříhne pri-miRNA ve vzdálenosti 11 nukleotidů od jednovláknových konců (22 nukleotidů od smyčky). Vznikne pre-miRNA nesoucí monofosfát na 5'konci a 2 nukleotidy přesahující jednovláknový konec na 3'konci. Tento systém je dostačující pro sestřih *in vitro*, *in vivo* jsou však potřeba další proteiny, jako RNA vazebný protein hnRNP A1, p68 a p72 RNA helikasa (Liu et al., 2008).

Potom co je pre-miRNA dokončena v jádře, je transportována do cytoplazmy jaderným proteinem Ran-GTP a jaderným transportním receptorem Exportinem-5. Ran-GTP je hydrolyzován pomocí Ran-GAP na Ran-GDP a pre-miRNA je uvolněna z Exportinu-5. Exportin-5 je důležitý také jako stabilizátor pre-miRNA v jádře, chráníci před její degradací (Liu et al., 2008).

Pre-miRNA je v cytoplazmě štěpena RNasou III endonukleasou zvanou Dicer na krátké RNA duplexy. RNA duplex se skládá ze dvou vláken, zralé miRNA a k ní komplementární RNA, označené symbolem hvězdičkou (miRNA\*). Savčí Dicer má N-koncovou ATPasovou/helikasovou doménu, PAZ doménu, 2 RNasa III katalytickou doménu a C-koncovou dsRNA vazebnou doménu (dsRBD) (Cullen, 2004). Biochemickým experimentem bylo zjištěno, že PAZ a dsRBD domény jsou esenciální pro interakci Diceru s pre-miRNA. PAZ doména rozpoznává a váže 3' přesahující konec pre-miRNA (Liu et al., 2008). Dvě RNasové domény Diceru dimerizují a tvoří jedno aktivní centrum, kterým odstříhne 22 nukleotidů dlouhý duplex z pre-miRNA. Po sestřihu je miRNA duplex rozpleten neznámou helikasou a zralá miRNA se váže na protein Argonaut (Ago) tvořící RNP komplex. MiRNA\* je degradována.

Které vlákno bude degradováno a které se naváže na Ago je určováno termodynamickou asymetrií miRNA duplexu. RNA vlákno, které je méně stabilní, se váže na Ago protein a tvoří zralou miRNA (Liu et al., 2008). RNP komplex, například multiproteinový komplex RISC (RNA-induced silencing complex), je nezbytný pro rozpoznání a navázání se na cílovou mRNA. Centrum RNP komplexu je složeno ze členů Argonaut/Piwi proteinové rodiny, které na sebe vážou miRNA. Jedna část obsahuje N-koncovou PAZ doménu zodpovědnou za navázání 3' konce miRNA, druhá část obsahuje MID-doménu zodpovědnou za navázání 5' fosfátu cílové RNA a RNasu H endonukleasovou doménu známou také jako PIWI doménu (Farazi et al., 2008). RNP komplex naváže miRNA na cílovou mRNA a v závislosti na míře komplementarity vazeb vede buď k potlačení translace, nebo degradace cílové mRNA. Proces biogeneze je znázorněn na obrázku 4.



**Obrázek 4** Biogeneze a funkce miRNA. Pri-miRNA je v jádře zpracována mikroprocesorovým komplexem skládajícím se z enzymu Drosha a Pasha na 70 nukleotidů dlouhou pre-miRNA, ta je transportována pomocí Exportinu do cytoplazmy, kde je dále sestřížena enzymem Dicer na miRNA duplex, ten se po rozpletení připojí do multiproteinového komplexu RISC, který se váže na cílovou mRNA a tím potlačí translaci (neúplná komplementarita) nebo degraduje cílovou mRNA (úplná komplementarita) (Menon & Khan, 2009).

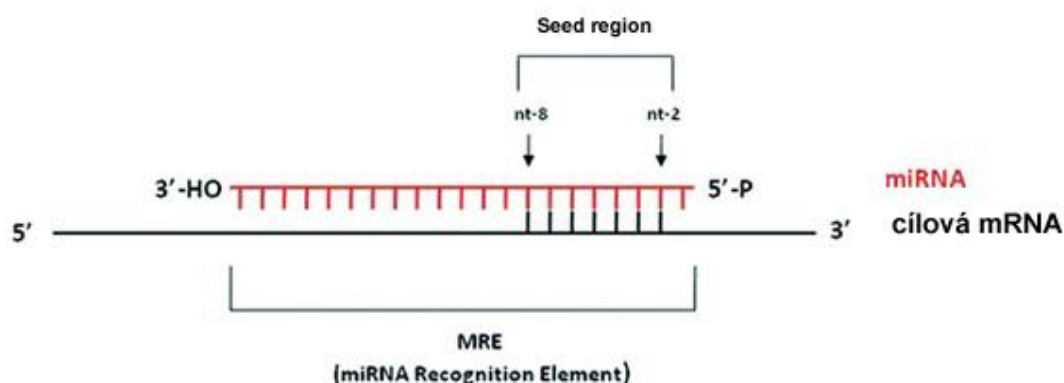
### 3.4 Funkce miRNA

Každá miRNA může regulovat expresi mnoha genů. Regulace na post-transkripční úrovni může měnit expresi 20-30% savčích genů (Lewis et al., 2005). Několik skupin vědců ověřilo, že miRNA je klíčovým regulátorem v procesech rozmanitého vývoje embrya, buněčné proliferaci, buněčného růstu, tkáňové diferenciaci a apoptosy. Nedávné studie našly miRNA také v buněčné signalizaci, mezidruhově variabilní genové expresi a koregulaci s transkripčními faktory. Následné mutace v miRNA, dysfunkce biogeneze miRNA a disregulace mohou mít za následek široké spektrum onemocnění. Složky potřebné pro miRNA procesy jsou zapojeny v mnoha různých onemocněních, jakými jsou např. syndrom fragilního X chromozomu,

DiGeorge syndrom a snad ve všech typech zhoubných nádorových onemocnění. Aktuálně je vedeno 70 onemocnění spojených s miRNA (Lu et al., 2008, Wienholds & Plasterk, 2005).

### 3.5 Cíle miRNA a mechanismy působení

Zralá miRNA se váže na miRNA rozpoznávací prvek (MRE, miRNA recognition elements) umístěný v 3' UTR oblasti cílové mRNA. Část, kterou se miRNA připojí k MRE, se nazývá „seed region“ a zahrnuje 2-8 nukleotidů nacházejících se na 5'konci miRNA. 5'konec je více komplementární k cílové RNA, než 3'konec. Párování sedmi nebo více bazí je dostačující pro úspěšnou regulaci. Nachází-li se více MRE pro stejné nebo různé miRNA v 3'UTR oblasti, mohou spolupracovat a zvyšovat represi genu. Vazbu na RNA ovlivňují také sekvence a sekundární struktura 3'UTR mezi MRE oblastmi, které mohou znemožnit nasednutí miRNP a tím zabránit navázání miRNA (Chen et al., 2008, Rodriguez et al., 2004). Vazba miRNA na cílovou mRNA je znázorněna na obrázku 5.



**Obrázek 5** Vazba miRNA na cílovou mRNA (Felekis et al., 2010).

Post-transkripční regulace miRNA je uskutečňována jedním ze dvou mechanismů v závislosti na míře komplementarity miRNA s cílovou sekvencí. Při úplné nebo téměř úplné komplementaritě dochází k jevu označovanému RNA interference (Slabý et al., 2008). RNA interference je forma post-transkripčního tlumení genu, ve kterém dsRNA indukuje degradaci homologní mRNA, čímž dochází k redukci respektive ztrátě genové aktivity (He & Hannon, 2004). Tento mechanismus působí převážně u rostlin. Živočišné buňky využívají rozdílného mechanismu, který není spojen s degradací cílové mRNA. Regulační účinek je uskutečňován vazbou na nedokonale komplementární sekvence 3'UTR cílových mRNA a exprese genu je post-transkripčně regulována tak, že je znemožněna jejich translace. Druhý mechanismus je proto doprovázen poklesem hladiny proteinového produktu, zatímco hladina cílové mRNA není ovlivněna (Esquela-Kerscher & Slack, 2006).

Expresí velkého množství předpovídaných miRNA již byla potvrzena, avšak mnoho predikovaných cílových genů stále čeká na identifikaci a ověření. Pro úspěšnou regulaci specifických genů pomocí miRNA musí být alespoň částečná komplementarita s cílovou mRNA hlavně v 3'UTR oblasti. Nicméně teoretická komplementarita sekvencí miRNA s mRNA není spolehlivý prediktor skutečného cílového genu. Je nutno brát v potaz také energii potřebnou pro překonání sekundární struktury mRNA. Několik skupin vyvinulo algoritmus pro identifikaci mRNA sekvencí, které mohou sloužit jako cílové geny pro známé miRNA. Je to například MiRanda, PicTar a TargetScan (Rodriguez et al., 2004). Algoritmus je zaměřený hlavně na 5'konec miRNA, 3'UTR oblast mRNA, volnou energii RNA-RNA duplexu a stupeň zachování miRNA cílů u příbuzných organismů. Doporučuje se využít všechny programy, jelikož dávají rozdílné výsledky (Chen et al., 2008).

V miRNA se mohou objevovat také jednonukleotidové polymorfismy (SNP, single-nucleotide polymorphisms), což jsou odchylky jednotlivých nukleotidů v DNA. Jelikož pro rozpoznání miRNA s cílovou mRNA jsou přísné požadavky, mohou SNP v „seed regionu“ miRNA (mirSNP) rozrušit miRNA-mRNA vazbu, a tím změnit expresi cílového genu. Výskyt SNP v pre-miRNA je relativně vzácné, v lidské miRNA je dokumentováno 10% SNP, z toho méně než 1% se nachází v „seed regionu“ miRNA. V PolymiRTS, což je databáze polymorfismů miRNA cílových genů, je již 15791 záznamů, které byly spatřeny v lidském genomu. SNP může eliminovat vazbu na cílový gen nebo naopak zvýšit vazebnost zdokonalením komplementarity mRNA, které normálně neasociují s miRNA. Tento efekt může vést k výrazné změně proteinové exprese. Navíc může SNP snížit stabilitu pri-miRNA a tím narušit proces tvorby zralé miRNA (Felekis & Deltas, 2006).

### **3.6 Význam miRNA v patogenezi nádorových onemocnění**

MikroRNA se podílí na regulaci řady základních buněčných procesů, jako je regulace buněčného cyklu, odpověď na buněčný stres, zánět, diferenciace, apoptosa, invazivita a jiné. Díky tomu jsou velice často spojovány s tvorbou nádorových onemocnění, u kterých dochází právě k poruchám v těchto drahách. MiRNA se může chovat jako nádorový supresor nebo jako onkogen v závislosti na cílové mRNA a drahách, které reguluje.

Rozdíly mezi zdravou a nádorovou tkání jsou často přisuzovány lokalizaci miRNA v nestabilních oblastech chromosomu, kde často dochází k amplifikaci, translokaci, delecí nebo chromosomovým zlomům. 52,5 % miRNA genů se nachází v oblastech spojovaných s rakovinou nebo na fragilních místech (Calin et al., 2004b). Nejznámější je klastér miRNA 15a/16-1, který je lokalizován v často deletované oblasti u chronické lymfocytární leukemie (Calin et al., 2002). Jiné příklady zahrnují například delecí let-7g/miR-135-1u několika lidských

malignit (Calin et al., 2004b), translokaci miR-17-92 u akutní lymfoblastické leukemie (Mavrakis et al., 2010) a amplifikaci miR-26a u glioblastomu (Huse et al., 2009).

Některé samostatně exprimované miRNA geny mají promotor, který jim umožňuje vysokou hladinu exprese, pokud ale dojde k translokaci, může zvyšovat také hladinu onkogenu, který zde byl translokován. Příkladem je miR-142 gen, marker hematopoetických buněk, který je lokalizován na chromosomu 17 a byl nalezen v oblasti t(8;17) translokace. Souvisí s agresivním průběhem CLL díky silné pozitivní regulaci translokováného MYC genu stejným promotorem (Etiemble et al., 1989).

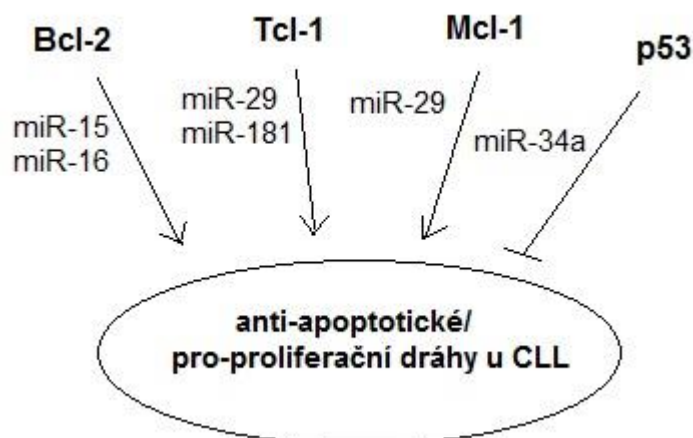
Deregulace miRNA je také spojována se změnami v epigenetické regulaci, jako je methylace miRNA genů, které vedou ke změnám jejich exprese (Han et al., 2007). Příklad methylované miRNA je třeba miR-9-1 u karcinomu prsu (Lehmann et al., 2008).

Změny hladiny miRNA mohou nastat také poruchami v biogenezi miRNA, chybí-li některé komponenty nebo nesprávnou RNA editací či terminální modifikací (Krol et al., 2010).

Schopnost miRNA regulovat geny ovlivňující řadu onemocnění by mohla být využita také k léčbě těchto nemocí. Antisense oligonukleotidy byly již zkoumány při pokusech na myších a primátech a potvrdili možnost manipulovat s hladinami miRNA (Krutzfeldt et al., 2005). Tyto objevy podporují budoucí terapeutický potenciál miRNA potlačovat nádorové bujení. Nadměrná exprese miRNA fungující jako nádorový supresor může být také příznivá strategie kontroly růstu nádorů, proliferace a apoptosy (Takamizawa et al., 2004).

## **4. MIRNA U CLL**

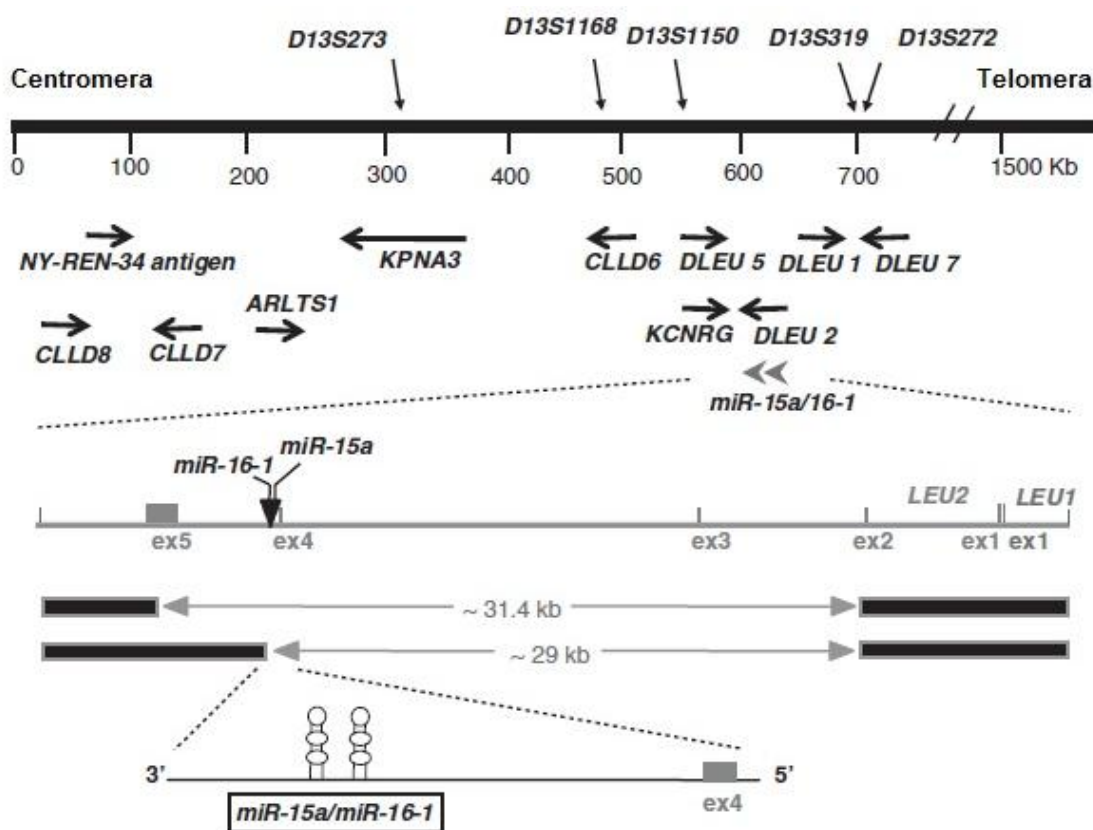
Vzhledem k variabilnímu průběhu chronické lymfocytární leukemie a stále neznámým příčinám jejího vzniku byla v poslední době velká pozornost zaměřena na profilování exprese miRNA u pacientů s CLL. Jelikož se hladiny exprimovaných miRNA významně liší u CLL pacientů od zdravých jedinců, mohly by miRNA hrát roli nových biomarkerů, které napomohou pochopit jádro tohoto závažného onemocnění. V souvislosti s přítomností ZAP-70 a IgVH mutačním stavem bylo nalezeno 13 miRNA, podle kterých se dají rozlišit jednotlivé prognózy a doba zahájení léčby pacientů. Mezi identifikované miRNA patří miR-15a, miR-195, miR-221, miR-23b, miR-155, miR-223, miR-29a, miR-24-1, miR-29b-2, miR-146, miR-16-1, miR-16-2 a miR-29c (Calin et al., 2005). Nejvýznamnější miRNA kterými se zabýváme v této práci jsou miR-15a, miR-16-1 a rodina miR-29 (obrázek 6).



**Obrázek 6** MiRNA v regulaci proliferace a apoptosy u CLL buněk (Mráz et al., 2010b).

#### 4.1 MiR-15a a miR-16-1

První studie odhalující funkci miRNA v nádorových procesech byla uskutečněna na pacientech s CLL (Calin et al., 2002). Delece 13q14.3 oblasti se vyskytuje u 50 % nemocných s CLL, ale také u jiných malignit jako je mnohočetný myelom, lymfom z plášťových buněk a karcinom prostaty (Dong et al., 2001). Tato a další pozorování naznačují, že se v místě 13q14.3 nachází nádorové supresory, jejichž delece je důležitá v patogenezi několika nádorových onemocnění. Ačkoli bylo provedeno sekvenování celé oblasti a charakterizace několika genů, stále nebylo jasné, který gen je zapojen do rozvoje CLL. Až kompletní osekvenování 790 kb dlouhé oblasti nazvané minimální deletovaná oblast (MDR, minimally-deleted region) odhalilo výskyt DLEU2 (delece v lymfocytární leukemii 2) a miR-15a/miR-16-1 klastru. Kompletní schéma 13q14.3 s cílovými geny je znázorněno na obrázku 7. Obě tyto miRNA vykazují vysokou úroveň exprese v normálních CD5+ B-lymfocytech a podílí se na B-buněčné homeostázi (Calin et al., 2002). Byla objevena také mutace v miR-16-1 u pacientů s CLL, způsobující snížení hladiny její exprese (Calin et al., 2005).



**Obrázek 7** Schématický diagram zobrazuje 13q14.3 delece v CLL. V této oblasti bylo identifikováno 11 genů. Zvětšená oblast znázorňuje MDR oblast, na níž se vyskutejuje miR-15a/miR-16-1 klast (Aqeilan et al., 2010).

Po zjištění, že je hladina miR15a a miR-16-1 snížena nebo úplně negativní v CLL buňkách, vznikla hypotéza, že tyto miRNA mohou regulovat nějaký onkogen nezbytný pro vývoj CLL. Pomocí bioinformatických analýz bylo zjištěno, že prvních devět nukleotidů od 5'konce obou miRNA má komplementární sekvenci k anti-apoptotickému proteinu Bcl-2. Cílovým proteinem miR-15a a miR-16-1 je tedy zřejmě Bcl-2. Bcl-2 hraje významnou roli v inhibici buněčné smrti a je u mnoha nádorových onemocnění, včetně CLL, nadměrně exprimován (Cimmino et al., 2005).

Teorie, že je delece miR-15a a miR-16-1 zodpovědná za patogenezi CLL byla ověřena experimentem vědců Klein a kol., kteří vyvinuli transgenní myši s delecí MDR (obsahuje miR-15a/miR-16-1 a DLEU2) a s delecí pouze miR-15a/miR-16-1. Po 15-18 měsících se u 5 % myší vyvinula monoklonální B-lymfocytosa (MBL), prekursor CLL. U čtvrtiny se vyvinuly klinické znaky podobné CLL, u 9 % s MDR a u 2 % s delecí miR-15a/miR-16-1 došlo k rozvoji agresivního difuzního velkobuněčného lymfomu (DLBCL). Myši s delecí pouze miR-15a/miR-16-1 souvisely s indolentnějším průběhem onemocnění než myši s MDR delecí. Vysvětlení proč delece těchto miRNA vede ke klonální B-lymfoproliferaci může být odůvodněno tím, že buňky s delecí začnou syntetizovat DNA dříve než normální buňky pravděpodobně tak, že zvýší expresi několika proteinů asociovaných s proliferací (CDK4, CDK6), které hrají důležitou roli

v přechodu z G<sub>0</sub> do G<sub>1</sub>-S fáze buněčného cyklu. Tato zjištění podporují roli miR-15a/miR-16-1 jako modulátorů proliferace více než zapojení do přežití přes regulaci Bcl-2 (Klein et al., 2010).

MiRNA mohou regulovat více než jeden cílový gen, u miR-15a a miR-16-1 byli nalezeny vedle Bcl-2 také CCND1 (cyklin D1) a WNT3A mRNA, kteří podporují přežití, proliferaci a invazivitu u karcinomu prostaty (Bonci et al., 2008).

Co se týče prognostického významu miR-15a a miR-16-1, jejich delece nebo snížená hladina je asociována s lepší prognózou u CLL (Calin et al., 2005).

## 4.2 Rodina miR-29

MiR-29 se vyskytuje ve třech izoformách – miR-29a, miR-29b a miR-29c. MiR-29a se nachází v oblasti 7q32.3 a miR-29c leží v oblasti 1q32.2. MiR-29b-1 leží spolu s miR-29a a miR-29b-2 leží ve stejné oblasti jako miR-29c, ačkoli leží každý na jiném chromozomu, jejich sekvence je identická (obrázek 8). MiR-29 je popisována jako nádorový supresor regulující několik onkogenů (Tcl-1, Mcl-1, CDK6) (Mott et al., 2007, Pekarsky et al., 2006, Zhao et al., 2010).



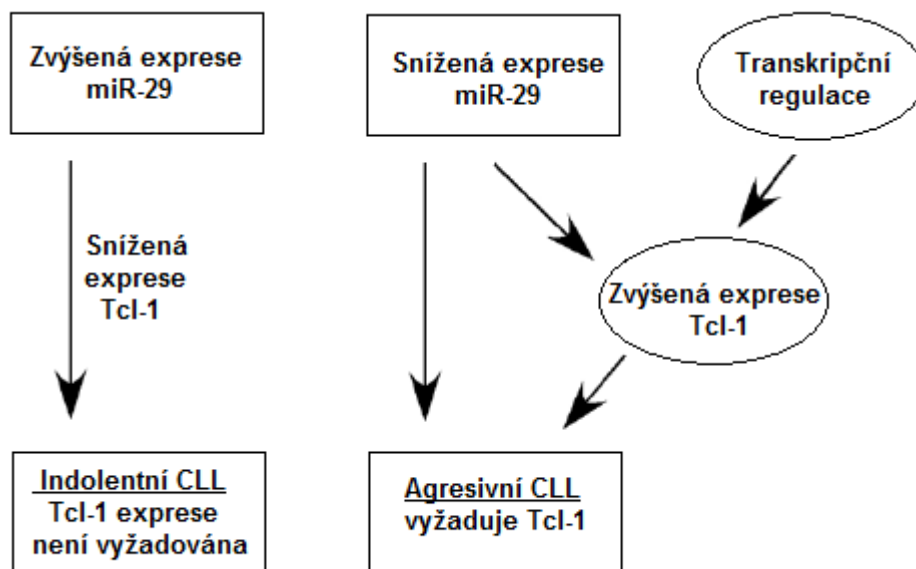
**Obrázek 8** Poloha jednotlivých miR-29 na chromozomu 7 a 1. Převzato z [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) (10.04.2011).

### 4.2.1 MiR-29 jako regulátor *Tcl-1*

Tcl-1 je kritická molekula v patogenezi CLL (Pekarsky et al., 2008). Myší model se zvýšenou hladinou Tcl-1 se velmi podobá agresivní formě CLL s nemutovaným IgVH (Yan et al., 2006). Tcl-1 je pravděpodobně cílovou molekulou miR-29 a miR-181 (Pekarsky et al., 2006). Při studiu rozlišujícím agresivní CLL od indolentní byly nalezeny čtyři miRNA se sníženou expresí, tři z nich byly miR-29, tento fakt silně podporuje, že miR-29 a Tcl-1 hrají důležitou roli v patogenezi agresivní CLL (Calin et al., 2004a). MiR-29 regulující Tcl-1, kritický onkogen v agresivní CLL, signalizuje, že zde miR-29 funguje jako nádorový supresor (Pekarsky et al., 2006).

Pro objasnění role miR-29 v CLL byly vytvořeny transgenní myši se zvýšenou expresí miR-29. Ve věku 12-24 měsíců došlo k významnému rozšíření CD5 B-lymfocytů u 85 %

transgenních myší. Polovina myší překročila hranici přežití 24-26 měsíců a pouze u 20 % se vyvinula leukemie, na kterou zemřely. Jelikož většina transgenních myší měla CD5+CD19+IgM+ B-lymfocyty a jen 20 % se vyvinulo v leukemii, podobá se tento vývoj indolentní lidské CLL (Santanam et al., 2010). Schéma objasňující funkci miR-29 a Tcl-1 je na obrázku 9.



**Obrázek 9** Zvýšená exprese miR-29 vede ke snížení hladiny Tcl-1 a k indolentnímu charakteru CLL. Naopak snížená hladina miR-29 umožňuje exprimovat vysokou hladinu Tcl-1 a vést k agresivnímu průběhu CLL (Pekarsky & Croce, 2010).

#### 4.2.2 MiR-29 jako regulátor Mcl-1

Pomocí počítačové analýzy bylo nalezeno pět miRNA, které by mohly mít za potenciální cílovou molekulu Mcl-1. Nicméně pokusy na nemaligních buňkách ukázaly, že pouze miR-29 byla hojně exprimována v souvislosti s nižší hladinou Mcl-1. Všechny tři izoformy miR-29 (a, b, c) sdílí, až na malé odlišnosti, komplementární sekvenci devíti nukleotidů s cílovou Mcl-1 molekulou. MiR-29b má dokonalou komplementaritu (Mott et al., 2007).

Mcl-1 je anti-apoptotický protein z Bcl-2 rodiny schopný inhibovat BH3 pro-apoptotické proteiny Bim, Bid, Bik, Noxa, Puma a Bak (Chen et al., 2005b). Jeho regulace je nezbytná jelikož nedostatek Mcl-1 způsobuje buněčnou smrt a naopak jeho nadměrná exprese může vést k nádorové transformaci (Opferman et al., 2003).

Transfekce miR-29 do buněk vede ke zvýšení jejich citlivosti vůči TRAIL-indukované apoptose. Naopak vložení blokátoru miR-29 (LNA – locked nucleic acid) zvyšuje hladinu exprese Mcl-1 a tím chrání buňku před TRAIL cytotoxicitou. Tyto data potvrzují, že zvýšená hladina miR-29 snižuje hladinu Mcl-1 a tím umožňuje navodit apoptosu (Mott et al., 2007).

#### 4.2.3 MiR-29 jako regulátor DNA methyltransferas

Methylace je forma epigenetické regulace DNA, kdy dojde k umlčení genu přenosem methylové skupiny z S-adenosylmethioniu na cytosin v poloze 5' DNA methyltransferasou (DNMT). DNMT se vyskytuje v několika formách, DNMT1 přednostně methyluje podle již existujících methylovaných vzorů, zatímco DNMT3A a 3B odpovídají za de novo metylaci (Jones & Baylin, 2002). Umlčování nádorových supresorů abnormální DNA metylací bylo nalezeno u akutní myeloidní leukemie (AML), kde byla zjištěna zvýšená exprese DNMT (Toyota et al., 2001).

V roce 2007 bylo zjištěno, že miRNA může regulovat DNA methyltransferasu. Komplementární sekvence k DNMT3A a 3B byla nalezena u členů rodiny miR-29 u karcinomu plic. Zvýšená hladina DNMT3A a 3B souvisí s horší prognózou karcinomu plic. Zvýšením hladiny miR-29 byla deregulována hladina DNMT3A a 3B, což vedlo k obnovení exprese metylací potlačených nádorových supresorů například FHIT a WWOX a k inhibici tvorby tumoru (Fabbri et al., 2007).

Testování miR-29 u AML odhalilo, že miR-29 nereguluje DNMT3A a 3B, ale snižuje hladinu DNMT1 nepřímo přes negativní regulaci Sp1 proteinu, známého aktivátoru DNMT1. Sp1 je mimo jiné také transkripční faktor ve formě zinkového prstu, který reguluje velké množství genů zapojených v buněčném cyklu, proliferaci, apoptose a maligní transformaci. Tyto výsledky podporují možné využití miR-29 v budoucí DNA hypomethylační léčbě (Garzon et al., 2009).

#### 4.2.4 MiR-29 jako regulátor CDK6

MiRNA profilování lymfomu z plášťových buněk (MCL – mantle cell lymphoma) odhalilo významně sníženou hladinu miR-29. Hledáním v databázích bylo nalezeno, že 3'UTR cyklin dependentní kinasa 6 (CDK6) je dokonale komplementární se „seed regionem“ miR-29. CDK4 a CDK6 jsou aktivovány navázáním molekuly cyklin D1, což vede ke spuštění G<sub>1</sub>-S fáze buněčného cyklu. Snížení hladiny miR-29 vede ke zvýšení CDK6, což podporuje progresi buněčného cyklu v MCL. MiR-29 je negativním regulátorem CDK6 a její snížená hladina souvisí s kratším celkovým přežitím, mohla by být tedy v budoucnu využita jako prognostický faktor (Zhao et al., 2010).

### 4.3 MiR-34

Rodina miR-34 je zapojena v několika solidních a hematologických malignitách včetně CLL. Bylo zjištěno, že hladina miR-34 koreluje se stavem nádorového supresoru p53 a pacienti s mutací p53 nebo delecí 17p13.1 mají sníženou její hladinu. Tito pacienti mají obvykle velice špatnou odpověď na léčbu, jelikož nelze navodit apoptosu přes apoptotickou dráhu p53. Při

zvýšené expresi p53 se zvýší také hladina miR-34, což navodí senescenci, apoptosu nebo zastavení buněčného cyklu. Hladina miR-34 může být využita jako prognostický faktor predikující odpověď na léčbu (Merkel et al., 2010).

## 5. FUNKCE VYBRANÝCH XENOBIOTIK

Některé miRNA mohou přímo nebo nepřímo regulovat enzymy ovlivňující metabolizaci léčiv nebo jejich přenašeče, či jaderné receptory. Následkem toho ovlivňují kapacitu a distribuci léčiv odrážející se v pozměněné citlivosti buněk k toxinům (Yu, 2009). Zároveň mohou toxiny interferovat s biogenezí a expresí miRNA, čímž mohou ovlivňovat jejich hladinu a tím zároveň i dráhy, které regulují (Choudhuri, 2010). Proto jsme se v této práci zaměřili na studium vybraných xenobiotik v souvislosti s miR-29. Většina z vybraných xenobiotik se využívá k léčbě CLL, ale i jiných nádorových onemocnění a to převážně v kombinacích. Vzorce vybraných xenobiotik jsou na obrázku 10.

### 5.1 Cytarabin

Cytarabin (cytosin  $\beta$ -D-arabinofuranosid) je chemický analog cytidinu, od kterého se liší v sacharidové části, kde je deoxyribosa nahrazena arabinosou. Cytarabin proniká do buňky aktivním transportem spolu s deoxycytidinem, kde je část molekuly deaminována na netoxickou sloučeninu uracilarabinosid a část fosforylována na cytosin-arabinosidtrifosfát. Ten inhibuje vazby fyziologického metabolitu na DNA-polymerasu, čímž zastaví syntézu a opravy DNA. Cytosin-arabinosidtrifosfát je částečně začleněn do DNA, kde způsobuje defektní vazby a syntézu nekompletních fragmentů (Mayer & Starý, 2002). Využívá se k léčbě leukemie a maligních lymfomů.

### 5.2 Azacytidin

Azacytidin (5-azacytidin) je analogem přirozeného nukleosidu cytidinu, kde místo pyrimidinového skeletu obsahuje triazinový skelet – 5-azacytosin. Po vstupu do buňky je fosforylován až na 5-azacytidin-5'-trifosfát, který je substrátem pro RNA-polymerasu a je inkorporován do RNA. Tento zásah do metabolismu RNA vede k inhibici syntézy ribosomů a bílkovin. Další studium mechanismu účinku odhalilo, že je redukován ribonukleotidreduktasou na 5-aza-2'-deoxycytidin-5'-trifosfát a inkorporován do DNA, což vede k inhibici její syntézy (Čihák & Veselý, 1978). Zásadní význam ovšem měl objev hypometylačního efektu azacytidinu. Inkorporace azacytidinu do DNA způsobuje kovalentní vazbu DNA methyltransferasy na DNA, čímž je omezena methylace například nádorových supresorů, které

následně způsobují indukci diferenciaci a zástavu proliferace (Jones & Taylor, 1980). Dnes se azacytidin využívá převážně k léčbě AML.

### **5.3 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 malobuněčného karcinomu plic, non-Hodgkinova lymfomu a špatně rozlišitelných karcinomů, ale také v léčbě akutní leukemie, nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu vaječníků, Hodgkinovy lymfomu a několika dětských malignitách. Účinky má podobné jako podofylotoxin, tj. inhibuje polymerizaci tubulinu, což vede k destrukci mitotického vřeténka. Hlavním mechanismem je ale inhibice DNA topoisomerasy II, která způsobuje reverzibilní rozštěpení DNA bez možnosti opětovného spojení. Stále ale není přesně jasné, jak tento efekt způsobí buněčnou smrt a předpokládá se, že etoposid vykazuje další, zatím neznámé mechanismy cytotoxicity (Hainsworth & Greco, 1995).

### **5.4 Dexamethason**

Dexamethason je syntetický aktivátor glukokortikoidního receptoru, který se často využívá v kombinacích s jinými léčivy, neboť má široké spektrum účinků. Brzdí infiltraci zánětlivé tkáně neutrofily, přesunuje neutrofily z depot do oběhu, ovlivňuje četné zánětlivé cytokiny (brzdí tvorbu interleukinu 6) a omezuje imunitní odpověď. Hlavním důvodem proč se používá v kombinací léčbě leukemie je jeho silný lymfolytický efekt. Způsobuje atrofii lymfatické tkáně a snižuje počet lymfocytů indukci jejich apoptotické smrti, což vede v relativně krátkém čase k ústupu lymfadenopatie a splenomegalie (Mayer & Starý, 2002).

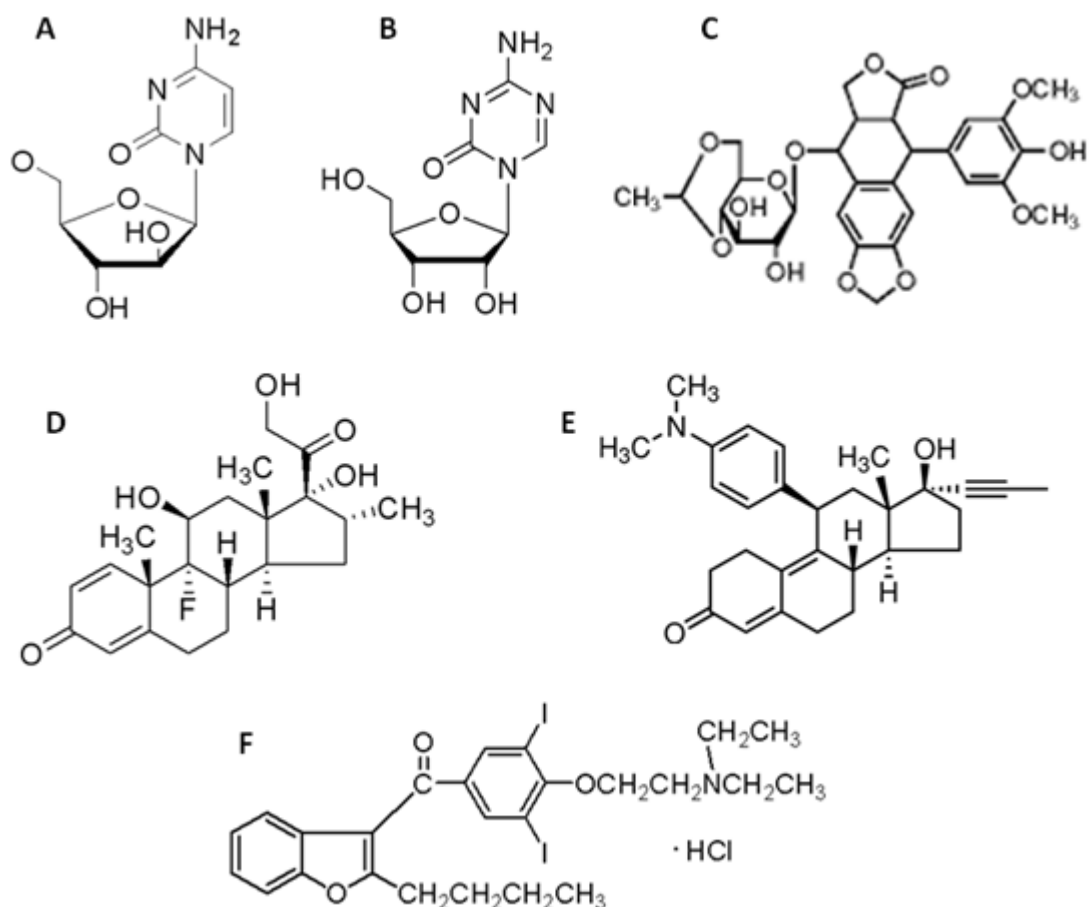
### **5.5 Mifepriston**

Mifepriston, neboli RU486, je syntetický inhibitor jak progesteronového, tak glukokortikoidního receptoru. Efekt inhibice progesteronového receptoru je využíván jako abortivum, prostředek pro chemickou interrupci. V experimentech na buňkách se používá jako antagonist dexamethasonu, ale jako léčivo se nevyužívá (Kimura et al., 2011).

### **5.6 Amiodaron**

Amiodaron je chemický derivát benzofuranu. Je antiarytmikem vhodným k léčbě supraventrikulárních a komorových dysrytmií. Je indikován po akutním infarktu myokardu, u vysokého rizika náhlé smrti srdeční a poruše systolické funkce levé komory srdeční. Amiodaron a jeho metabolit diethylamiodaron vykazují výrazný účinek na blokádu draslíkových kanálů, ve

střední kvantitě blokují alfa- a beta-adrenergní receptory, mírně blokují  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  kanály, tím prodlužují délku trvání akčního potenciálu (Hrčková et al., 2005). Amiodaron má také hypothyroidní efekt, který je způsoben inhibicí T3 thyroidního receptor alfa-1 a beta-1 a ovlivňuje expresi T3 dependentních genů (Wiersinga, 2008).



**Obrázek 10** Vzorce vybraných xenobiotik: A) cytarabin; B) azacytidin; C) etoposid; D) dexamethason; E) mifepriston; F) amiodaron. Struktury byly převzaty z materiálů poskytovaných výrobcem (Sigma-Aldrich).

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 6. MATERIÁL

### 6.1 Biologický materiál

#### 6.1.1 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 se souhlasem etické komise FN Olomouc. Soubor pacientů s diagnostickými parametry je shrnut v tabulce 3.

**Tabulka 3** Klinické parametry sledovaných pacientů. Celkové přežití uváděno v měsících, m - muž, ž - žena, P - pozitivní, N - negativní, UM - nemutovaný, M - mutovaný, - parametr nestanoven.

|    | Po<br>hla<br>ví | Diagnóza | Věk v<br>době<br>diagnózy | Stádium<br>onem.<br>(Binet) | Celkové<br>přežití | del 13q |       | ZAP-70 | Mutace<br>IgVH | Klon<br>(%) |
|----|-----------------|----------|---------------------------|-----------------------------|--------------------|---------|-------|--------|----------------|-------------|
|    |                 |          |                           |                             |                    | monoal. | bial. |        |                |             |
| 1  | m               | B-CLL    | 51                        | A                           | 90,94              | 75%     |       | P      | UM             | 90          |
| 2  | ž               | B-CLL    | 83                        | A                           | 21,22              |         | 70%   | P      | M              | 40          |
| 3  | m               | B-CLL    | 34                        | C                           | 37,06              | 97%     |       | P      | UM             | 90          |
| 4  | m               | B-CLL    | 72                        | A                           | 51,45              | 64%     | 28%   | N      | M              | 80          |
| 5  | m               | B-CLL    | 74                        | B                           | 18,60              | 93%     |       | P      | UM             | 90          |
| 6  | m               | B-CLL    | 50                        | B                           | 49,12              | 75%     | 6%    | P      | M              | 70          |
| 7  | ž               | B-CLL    | 61                        | B                           | 70,57              |         | 96%   | P      | M              | 45          |
| 8  | m               | B-CLL    | 46                        | B                           | 23,66              | 86%     |       | P      | UM             | 70          |
| 9  | ž               | B-CLL    | 60                        | A                           | 30,62              | 54%     | 40%   | P      | M              | 70          |
| 10 | m               | B-CLL    | 76                        | A                           | 38,41              | 66%     | 22%   | P      | M              | 70          |
| 11 | m               | B-CLL    | 70                        | A                           | 54,80              |         | 96%   | N      | UM             | 70          |
| 12 | m               | B-CLL    | 61                        | C                           | 28,98              | 81%     | 7%    | P      | UM             | 70          |
| 13 | m               | B-CLL    | 70                        | C                           | 28,88              | 91%     |       | -      | UM             | 80          |
| 14 | ž               | B-CLL    | 41                        | A                           | 115,68             | 91%     | 3%    | N      | M              | 90          |
| 15 | m               | B-CLL    | 57                        | C                           | 143,11             | 96%     |       | P      | UM             | 90          |
| 16 | m               | B-CLL    | 50                        | A                           | 69,06              |         | 93%   | -      | UM             | 60          |
| 17 | m               | B-CLL    | 57                        | A                           | 50,79              | 48%     |       | P      | M              | 60          |
| 18 | m               | B-CLL    | 78                        | A                           | 30,62              |         | 78%   | P      | M              | 40          |
| 19 | m               | B-CLL    | 56                        | B                           | 90,05              | 63%     | 35%   | P      | UM/M           | 90          |
| 20 | m               | B-CLL    | 59                        | A                           | 12,81              | 76%     |       | N      | UM             | 60          |
| 21 | ž               | B-CLL    | 63                        | B                           | 21,59              | 87%     |       | P      | UM             | 80          |
| 22 | ž               | B-CLL    | 57                        | C                           | 77,24              | 69%     | 69%   | P      | UM             | 70          |
| 23 | m               | B-CLL    | 53                        | B                           | 20,70              | 77%     | 17%   | P      | UM             | 90          |
| 24 | m               | B-CLL    | 68                        | B                           | 16,72              | 97%     |       | -      | UM             | 90          |
| 25 | m               | B-CLL    | 60                        | C                           | 68,11              | 4%      | 77%   | -      | UM             | -           |

|    |   |       |    |   |        |     |     |   |      |    |
|----|---|-------|----|---|--------|-----|-----|---|------|----|
| 26 | m | B-CLL | 58 | B | 26,61  | 88% |     | P | UM   | 90 |
| 27 | m | B-CLL | 47 | B | 37,36  | 77% |     | P | UM   | 90 |
| 28 | ž | B-CLL | 52 | B | 200,97 | 30% | 62% | P | M    | 80 |
| 29 | m | B-CLL | 63 | C | 96,30  | -   | -   | - | M    | -  |
| 30 | m | B-CLL | 73 | A | 25,10  | 43% |     | P | M    | 40 |
| 31 | m | B-CLL | 60 | C | 79,84  | 84% |     | P | UM   | 70 |
| 32 | ž | B-CLL | 59 | C | 89,63  |     | 95% | P | UM/M | 80 |
| 33 | m | B-CLL | 74 | A | 24,61  | 66% |     | P | UM   | 60 |
| 34 | m | B-CLL | 61 | A | 11,99  | 82% |     | N | UM   | 60 |
| 35 | m | B-CLL | 46 | B | 11,07  | 81% |     | N | UM   | 70 |
| 36 | m | B-CLL | 44 | B | 54,57  | 39% |     | N | UM   | 70 |
| 37 | m | B-CLL | 50 | A | 23,59  | 53% |     | P | UM   | 85 |
| 38 | m | B-CLL | 60 | A | 119,69 | 45% |     | P | UM   | 80 |
| 39 | m | B-CLL | 65 | C | 16,99  |     | 0%  | N | UM   | 70 |
| 40 | m | B-CLL | 59 | C | 22,14  |     | 0%  | P | UM   | 73 |
| 41 | ž | B-CLL | 71 | A | 21,72  |     | 0%  | N | UM   | 60 |
| 42 | ž | B-CLL | 69 | C | 88,15  |     | 0%  | - | M    | 80 |
| 43 | m | B-CLL | 53 | A | 23,43  |     | 0%  | P | UM   | 75 |
| 44 | m | B-CLL | 67 | A | 24,05  |     | 0%  | - | UM   | 50 |
| 45 | ž | B-CLL | 62 | A | 21,65  |     | 0%  | P | M    | 80 |
| 46 | ž | B-CLL | 64 | A | 14,59  |     | 0%  | P | UM   | 60 |
| 47 | ž | B-CLL | 51 | B | 11,96  |     | 0%  | P | UM   | 50 |
|    |   |       |    |   |        |     |     |   |      |    |
| 48 | m | CML   | 74 | - | 11,73  | -   | -   | - | -    | -  |
| 49 | ž | CML   | 63 | - | 10,25  | -   | -   | - | -    | -  |
| 50 | m | CML   | 21 | - | 19,75  | -   | -   | - | -    | -  |
| 51 | m | CML   | 28 | - | 8,15   | -   | -   | - | -    | -  |
| 52 | m | CML   | 53 | - | 11,96  | -   | -   | - | -    | -  |
| 53 | ž | CML   | 62 | - | 19,65  | -   | -   | - | -    | -  |
| 54 | m | CML   | -  | - | -      | -   | -   | - | -    | -  |

### 6.1.2 Buněčný materiál

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

T-REx™ HeLa buněčná linie je lidská buněčná linie odvozená od karcinomu děložního čípku a schopná stabilně exprimovat tetracyklinový represor (Invitrogen, R714-07).

## 6.2 Kultivační média

Pro HepG2 buněčnou linii bylo použito Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen™) s L-glutaminem a 4500 mg.l<sup>-1</sup> D-glukosou doplněným o 10 % FBS (fetální telecí sérum), 10 mg.ml<sup>-1</sup> penicilin/streptomycin a neesenciální aminokyseliny.

Pro HeLa buněčnou linii bylo použito Minimum Essential Medium (MEM, Invitrogen™) s Earleho solemi a neesenciálními aminokyselinami doplněné o 10 % FBS, 10 mg.ml<sup>-1</sup> penicilin/streptomycin a L-glutamin (2 mmol.l<sup>-1</sup>).

### 6.3 Ostatní materiál

#### 6.3.1 Transfekce

Transfekční činidla:

- X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche)
- Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™)
- DNA Transfection: jetPRIME™ (Polyplus transfection™)

Pre-miRNA:

- Pre-miR™ miRNA Precursor Molecules (Applied Biosystems)
  - Negative Control #1 (AM17110)
  - hsa-miR-29a (AM17100)
  - hsa-miR-29b (AM17100)
  - hsa-miR-29c (AM17100)

#### 6.3.2 Stanovení miRNA

- TaqMan® MicroRNA Transcription Kit (Applied Biosystems)
- TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems)
  - hsa-miR-15a (TM 389)
  - hsa-miR-16-1 (TM 391)
  - hsa-miR-29a (TM 2112)
  - hsa-miR-29b (TM 413)
  - hsa-miR-29c (TM 587)
  - RNU6B (TM 1093)

#### 6.3.3 Xenobiotika

- Cytarabin (Cytosin β-D-arabinofuranosid, C1768, Sigma)
- 5-Azacytidin (A2385, Sigma)
- Etoposid (E1383, Sigma)
- Dexamethason (D1756, Sigma)
- Mifepriston – RU486 (M8046, Sigma)
- Amiodaron hydrochlorid (A8423, Sigma)

## 7. METODY

### 7.1 Kultivace buněčných linií

Buňky byly kultivovány v kultivační lahvi o objemu 75 cm<sup>2</sup> v inkubátoru nasyceném vodními parami při 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>. Médium bylo měněno každých 24 – 72 hodin. Jakmile bylo dosaženo přibližně 80% konfluence, byly buňky pasážovány trypsinizací. Buňky byly 2x opláchnuty sterilním PBS (5ml), aby nedocházelo k inhibici trypsinu sérem, uvolnění adherentní vrstvy bylo dosaženo po 2-3 minutové inkubaci s 0,25% roztokem trypsinu s EDTA (1ml; 37 °C) a následně byly resuspendovány v 10 ml kultivačního média obsahujícího sérum, které inhibuje působení trypsinu. Počet buněk byl stanoven pomocí barvení trypanovou modří. Dle daného pokusu byly buňky vysety na jednotlivé desky. Pokud není uvedeno jinak, na 96 jamkovou desku bylo vyseto 20 000 buněk v objemu 200 µl na jamku, na 24 jamkovou desku 70 000 buněk v 500 µl na jamku a na 6 jamkovou desku 450 000 buněk ve 2 ml na jamku.

### 7.2 Stanovení počtu buněk

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

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

### 7.3 Transfekce syntetickou pre-miRNA

Transfekcí syntetickou pre-miRNA rozumíme vnesení příslušné pre-miRNA, v našem případě pre-miR 29a, pre-miR-29b, pre-miR-29c a pre-miRNA kontrolní, do HepG2 nebo HeLa buněčné linie, vedoucí k následnému zvýšení exprese daných miRNA. Kontrolní miRNA je krátký úsek RNA složený z náhodného pořadí nukleotidů nepodobající se žádné dosud identifikované miRNA, neměl by se tudíž v buňkách vyskytovat, ani zde zastávat jakoukoli funkci. Transfekce byla provedena metodou lipofekce, kdy směs lipidů a dalších komponent (v 80% ethanolu) tvoří komplexy s pre-miRNA a transportuje ji do savčích buněk, kde je přirozeně sestřihávána na zralou miRNA. Transfekce byla provedena třemi různými lipofekčními činidly: X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent, Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 a DNA Transfection: jetPRIME<sup>TM</sup>.

#### 7.3.1 Transfekce HepG2 buněčné linie pomocí X-tremeGENE siRNA Transfection Reagentu

Transfekce na 24 jamkové desce: Ve sterilní zkumavce bylo smícháno 47,5 µl Opti-MEM média s 2,5 µl X-tremeGENE siRNA Transfection Reagentem a ve druhé zkumavce bylo smícháno 49 µl Opti-MEM média s 1 µl příslušné pre-miRNA (finální koncentrace 40 pmol.µl<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>). Směs Opti-MEMu s transfekčním činidlem byla přepipetována do zkumavky s Opti-MEMem a pre-miRNA, krátce promíchána a inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Mezitím bylo na 24 jamkové desky napipetováno příslušné množství zahřátého média bez séra a antibiotik (doplnění do 500  $\mu$ l). Po inkubaci byla do zkumavek přidána buněčná suspenze ( $7 \times 10^4$  buněk/jamku) a všechny objemy byly napipetovány do přichystaného média na jamkách. Transfekce jednotlivých pre-miRNA byla vždy v tripletech. Po 24 hodinách byla provedena výměna média za médium se sérem a antibiotiky, po 24 hodinách od transfekce bylo přidáno xenobiotikum a po dalších 24 hodinách byla změřena viabilita buněk pomocí MTT testu.

Transfekce na 6 jamkovou desku: Byla provedena dle stejného postupu, ale ve zkumavce bylo smícháno 90  $\mu$ l Opti-MEM média s 10  $\mu$ l X-tremeGENE siRNA Transfection Reagentem a ve druhé zkumavce bylo smícháno 94  $\mu$ l Opti-MEM média s 4  $\mu$ l příslušné pre-miRNA (finální koncentrace  $160 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ). Na jamky bylo napipetováno množství média do celkového objemu 1500  $\mu$ l a množství buněk na jamku bylo  $4,5 \times 10^5$ . Transfekce byla provedena v dubletech. Po 48 hodinové transfekci byla izolována RNA a ověřena transfekce pomocí real-time PCR.

### 7.3.2 Transfekce HepG2 buněčné linie pomocí Lipofectaminu<sup>TM</sup> 2000

Transfekce byla provedena dle stejného postupu jako u X-tremeGENE siRNA Transfection Reagentu, ale bylo použito jiné množství látek.

Transfekce na 24 jamkovou desku: Ve zkumavce bylo smícháno 49  $\mu$ l Opti-MEM média s 1  $\mu$ l Lipofectaminu<sup>TM</sup> 2000 a ve druhé zkumavce bylo smícháno 49,5  $\mu$ l Opti-MEM média s 0,5  $\mu$ l příslušné pre-miRNA (finální koncentrace  $20 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ). Na jamky bylo napipetováno množství média do celkového objemu 500  $\mu$ l a množství buněk na jamku bylo  $7 \times 10^4$ .

Transfekce na 6 jamkovou desku: Ve zkumavce bylo smícháno 245  $\mu$ l Opti-MEM média s 5  $\mu$ l Lipofectaminu<sup>TM</sup> 2000 a ve druhé zkumavce bylo smícháno 247,5  $\mu$ l Opti-MEM média s 2,5  $\mu$ l příslušné pre-miRNA (finální koncentrace  $100 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ). Na jamky bylo napipetováno množství média do celkového objemu 1500  $\mu$ l a množství buněk na jamku bylo  $4,5 \times 10^5$ .

### 7.3.3 Transfekce HepG2 a T-REX HeLa buněčných linií pomocí DNA Transfection: jetPRIME<sup>TM</sup>

Transfekce na 24 jamkovou desku: Buňky byly vysety na 24 jamkovou desku v množství  $3 \times 10^4$  a inkubovány 24 hodin při 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>, aby došlo k jejich stabilizaci. Při transfekci jsme postupovali takto: do zkumavky bylo napipetováno 49,5  $\mu$ l jetPRIME<sup>TM</sup> pufru a 0,5  $\mu$ l pre-miRNA (finální koncentrace  $20 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ). Následně bylo přidáno 2  $\mu$ l jetPRIME<sup>TM</sup> reagentu, jemně vortexováno a krátce centrifugováno. Poté jsme celkovou směs o objemu 52  $\mu$ l přidali na buňky, u kterých bylo vyměněno čerstvé médium.

Transfekce na 6 jamkovou desku: Buňky byly vysety na 6 jamkovou desku v množství  $1,2 \times 10^5$  a inkubovány s 2 ml média na jamku 24 hodin při 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>. Do zkumavky bylo napipetováno 198 µl jetPRIME™ pufru a 2 µl pre-miRNA (finální koncentrace 80 pmol.µl<sup>-1</sup>). Následně bylo přidáno 4 µl jetPRIME™ reagentu, jemně vortexováno a krátce centrifugováno. Poté jsme celkovou směs o objemu 204 µl přidali na buňky, u kterých bylo vyměněno čerstvé médium.

#### 7.4 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) v odpovídajícím množství a ponechány přes noc v inkubátoru ke stabilizaci (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Následující den bylo z jamek odsáto médium a aplikována směs média s xenobiotikem. Buňky byly inkubovány 24 nebo 48 hodin, dle pokusu a následně byla změřena viabilita MTT testem.

#### 7.5 Stanovení buněčného poškození MTT testem

Stanovení působení xenobiotik na buňky bylo prováděno pomocí MTT testu, kterým zjišťujeme viabilitu buněk. MTT neboli žlutá tetrazoliová sůl (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu) (obrázek 11), je redukována mitochondriálními dehydrogenasami metabolicky aktivních buněk na nerozpustné fialové formazanové barvivo, jehož koncentrace je po rozpuštění v organickém rozpouštědle stanovena spektrofotometricky při 540 nm (obrázek 11) (Siewewerts et al., 1995).

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 % CO<sub>2</sub>), 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.

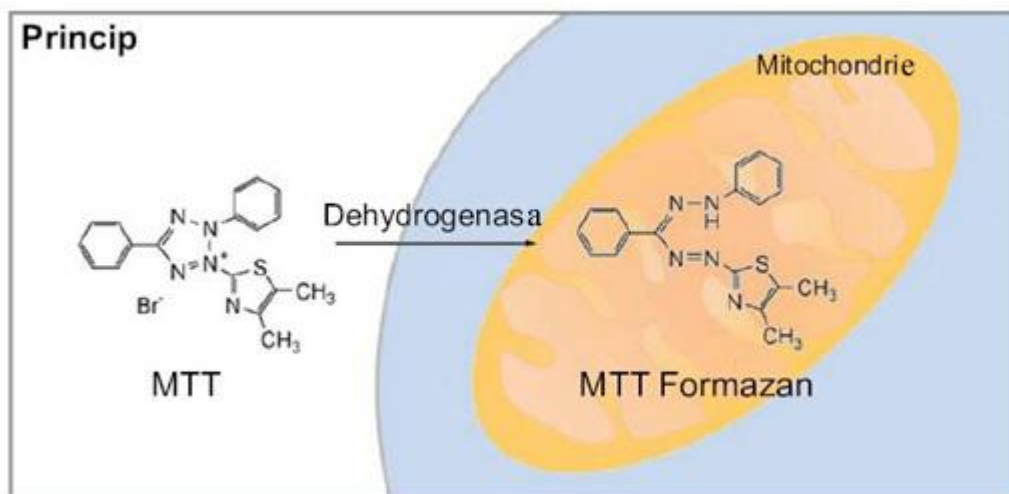
Životnost buněk byla počítána dle vztahu:

$$\text{Životnost (\%)} = 100 * ((A_v - A_p)/(A_k - A_p))$$

A<sub>p</sub>      absorbance pozadí (buňky inkubované s Tritonem X-100)

A<sub>v</sub>      absorbance vzorku (buňky inkubované s xenobiotiky)

A<sub>k</sub>      absorbance kontroly (buňky neovlivněné žádnou látkou)



**Obrázek 11** Princip MTT testu.

Zdroj: [http://www.dojindo.com/home/index.php?page=shop.product\\_details&flypage=flypage.tpl&product\\_id=504&category\\_id=29&option=com\\_virtuemart&Itemid=58](http://www.dojindo.com/home/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=504&category_id=29&option=com_virtuemart&Itemid=58) (staženo: 01.04.2011)

## 7.6 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O.

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.

## 7.7 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. $\mu$ l<sup>-1</sup>, přičemž do

reakce bylo použito 5  $\mu\text{l}$ , výsledná koncentrace byla tedy 20  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Během postupu byly všechny komponenty uchovávány na ledu.

Příprava reakční směsi (množství ( $\mu\text{l}$ ) na jednu 15  $\mu\text{l}$  reakci):

|                                                       |      |
|-------------------------------------------------------|------|
| dNTPs mix (100mM total)                               | 0,15 |
| MultiScribe™ RT (50 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) | 1,00 |
| 10X RT Buffer                                         | 1,50 |
| RNase inhibitor                                       | 0,19 |
| Nuclease Free Water                                   | 4,16 |
| RT Primer                                             | 3,00 |
| RNA (4 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ )             | 5,00 |

Zkumavky byly krátce centrifugovány a poté vloženy do termocykleru nastaveného na následující program. Vytvořená cDNA byla uchovávána při  $-20^{\circ}\text{C}$ .

|          |                      |
|----------|----------------------|
| 30 min   | $16^{\circ}\text{C}$ |
| 30 min   | $42^{\circ}\text{C}$ |
| 5min     | $85^{\circ}\text{C}$ |
| $\infty$ | $4^{\circ}\text{C}$  |

## 7.8 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  $\mu\text{l}$ )

|                                                   |                     |
|---------------------------------------------------|---------------------|
| TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG | 10,00 $\mu\text{l}$ |
| TaqMan MicroRNA assays (primer)                   | 1,00 $\mu\text{l}$  |
| Nuclease Free Water                               | 7,67 $\mu\text{l}$  |
| cDNA                                              | 1,33 $\mu\text{l}$  |

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  |        |       |

### 7.8.1 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 (Pfaffl, 2001). 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.

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

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

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

## 7.9 Statistické vyhodnocení

Všechny experimenty byly provedeny ve třech nezávislých opakováních, pokud není uvedeno jinak. Výsledky byly vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD (MS Excel 2007, Microsoft, USA).

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.

Statistické vyhodnocení buněčných experimentů bylo provedeno pomocí ANOVA (Analysis of variance, analýza rozptylu) a Tukeyho testu v programu Statistica na hladině významnosti 0,05.

## 8. VÝSLEDKY

### 8.1 Změny exprese miRNA u pacientů s CLL

Pomocí metody real-time PCR byla stanovena hladina miR-15a a miR-16-1, miR29 (a, b, c) u 54 pacientů (15 žen, 39 mužů). 38 pacientů s CLL mělo monoalelickou nebo bialelickou delecí 13. chromozomu, 9 pacientů mělo 0 % delecí 13q, 7 pacientů trpělo chronickou myeloidní leukémií (CML). Průměrný věk v době diagnózy byl 60 let. Jako kontrolu jsme zvolili pool krve 10 zdravých dárců transfúzní stanice. Hladiny miRNA byly porovnávány s jednotlivými diagnostickými parametry pacientů, jako je například delecí 13q, mutační status IgVH, přítomnost ZAP-70, patologickým klonem, klinickým stádiem dle Bineta a celkovým přežitím pacientů. Výsledky naměřených normalizovaných hodnot jednotlivých miRNA jsou shrnuty v tabulce 4.

Ve skupině sledovaných pacientů nebyla prokázána signifikantní závislost mezi normalizovanými hodnotami miR-15a, miR-16-1 a jejich podílem a monoalelickou delecí, mutačním stavem IgVH, ZAP-70, stádiem onemocnění dle Bineta, výskytem exitů a klonalitou. Signifikantně vyšší hodnoty normalizované miR-15a byly zjištěny u pacientů bez bialelické delecí 13q ( $p=0,045$ ). Slabá negativní korelace byla zjištěna mezi normalizovanou miR-16-1 a bialelickou delecí 13q (obrázek 12). Středně silná negativní korelace byla zjištěna mezi hodnotami normalizované miR-15a a věkem pacientů v době odběru (obrázek 13). Slabá negativní korelace byla nalezena mezi normalizovanou miR-16-1 a věkem pacientů v době odběru (obrázek 14).

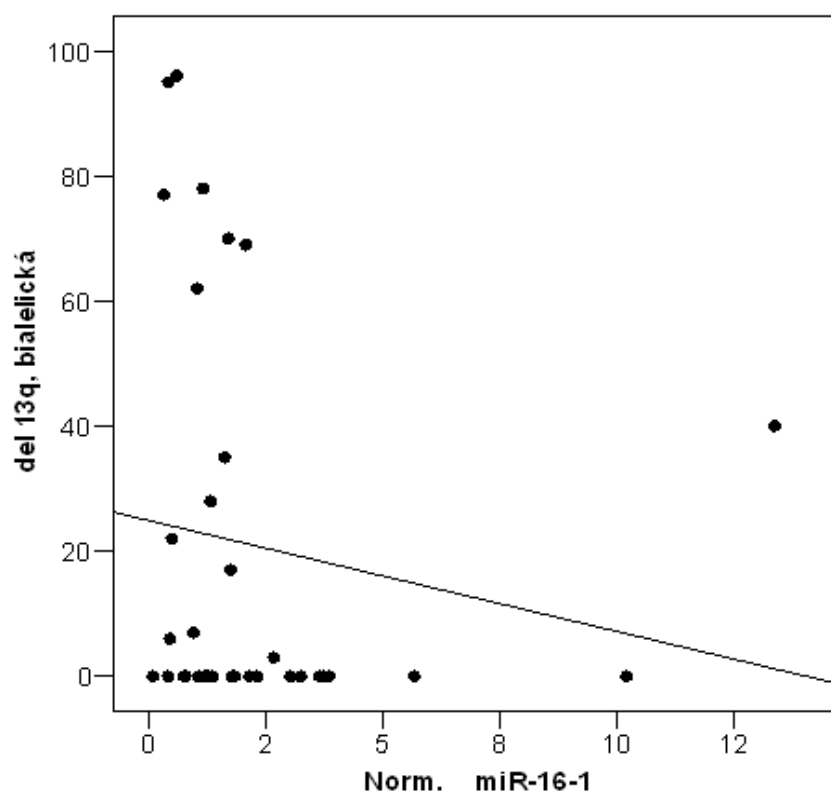
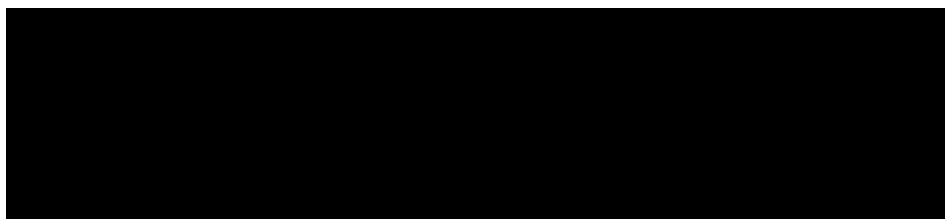
Nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi pacienty s delecí 13q a pacienty bez delecí v pohlaví, věku, normalizovaných hodnotách miR-15a, miR-16-1, ve stádiu onemocnění dle Bineta, ZAP-70, mutačním statusu IgVH a klonalitě. V souboru pacientů s delecí 13q byly zjištěny signifikantně vyšší hodnoty poměru miR-15a/miR-16-1 oproti pacientům bez delecí (obrázek 15).

Nebyla prokázána signifikantní závislost mezi normalizovanými hodnotami miR-29a, miR-29b, miR-29c a podílem miR-29a/c a monoalelickou delecí, bialelickou delecí, mutačním stavem IgVH, ZAP-70, stádiem onemocnění dle Bineta, věkem, pohlavím, výskytem exitů a klonalitou. Dále nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi skupinami CLL, CLL 0 % delecí a CML v pohlaví, věku a podílu exitů.

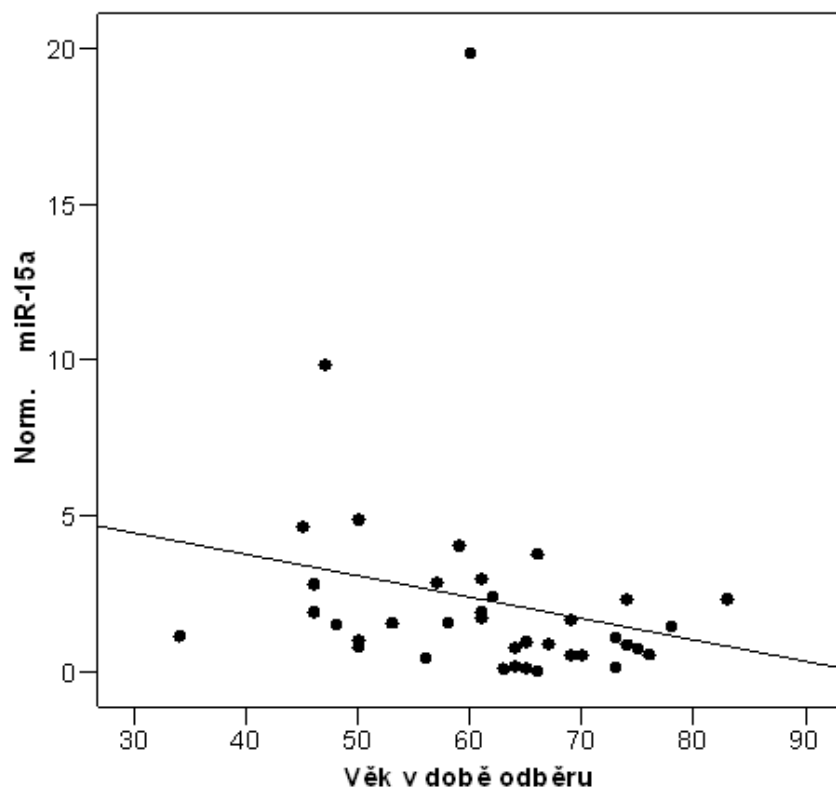
Nebyl prokázán rozdíl mezi skupinami CLL a CLL 0 % delecí ve stádiu onemocnění dle Bineta, ZAP-70 a klonalitě.

**Tabulka 4** Výsledné normalizované hodnoty miR-15a, miR-16-1 a miR-29 (a, b, c) naměřené u pacientů.

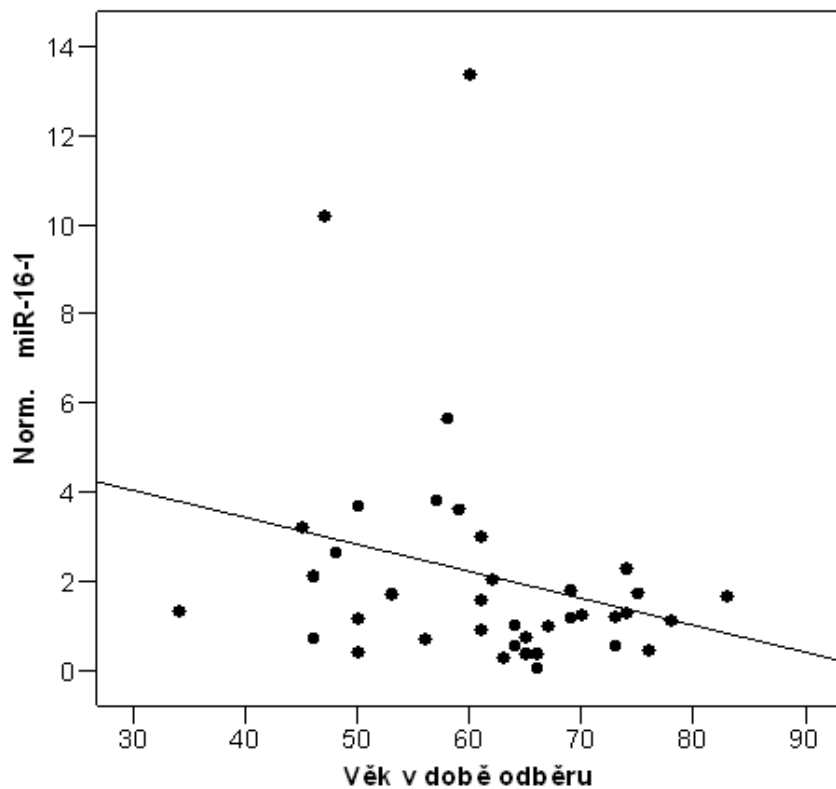
|    | Diagnóza | Norm.<br>miR-15a | Norm.<br>miR-16-1 | Norm.<br>miR-29a | Norm.<br>miR-29b | Norm.<br>miR-29c |
|----|----------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1  | B-CLL    | 0,463            | 0,727             | 0,747            | 0,599            | 0,599            |
| 2  | B-CLL    | 2,349            | 1,682             | 4,478            | 2,311            | 2,56             |
| 3  | B-CLL    | 1,165            | 1,347             | 4,734            | 3,429            | 1,121            |
| 4  | B-CLL    | 0,895            | 1,301             | 2,578            | 1,203            | 2,112            |
| 5  | B-CLL    | 2,346            | 2,297             | 4,272            | 2,030            | 2,357            |
| 6  | B-CLL    | 1,021            | 0,432             | 1,440            | 0,234            | 0,871            |
| 7  | B-CLL    | 0,196            | 0,582             | 2,789            | 1,834            | 1,886            |
| 8  | B-CLL    | 1,932            | 0,742             | 1,926            | 0,795            | 1,112            |
| 9  | B-CLL    | 19,835           | 13,361            | 4,792            | 2,260            | 76,208           |
| 10 | B-CLL    | 0,566            | 0,473             | 1,137            | 0,296            | 0,427            |
| 11 | B-CLL    | 0,163            | 0,570             | 3,817            | 2,908            | 1,952            |
| 12 | B-CLL    | 1,741            | 0,933             | 1,241            | 0,409            | 1,217            |
| 13 | B-CLL    | 0,551            | 1,262             | 1,092            | 1,087            | 0,921            |
| 14 | B-CLL    | 1,537            | 2,657             | 3,499            | 2,439            | 1,769            |
| 15 | B-CLL    | 0,790            | 1,042             | 0,792            | 2,095            | 0,973            |
| 16 | B-CLL    | 0,203            | 0,252             | 0,446            | 0,545            | 0,242            |
| 17 | B-CLL    | 2,868            | 3,837             | 2,392            | 0,619            | 3,372            |
| 18 | B-CLL    | 1,464            | 1,141             | 1,569            | 1,216            | 9,19             |
| 19 | B-CLL    | 2,990            | 1,602             | 6,135            | 0,350            | 2,355            |
| 20 | B-CLL    | 4,056            | 3,630             | 6,764            | 2,357            | 1,874            |
| 21 | B-CLL    | 0,979            | 0,758             | 1,272            | 1,132            | 0,431            |
| 22 | B-CLL    | 2,433            | 2,056             | 3,139            | 3,668            | 1,294            |
| 23 | B-CLL    | 1,580            | 1,729             | 2,395            | 1,558            | 0,577            |
| 24 | B-CLL    | 1,682            | 1,815             | 4,606            | 1,868            | 9,246            |
| 25 | B-CLL    | 0,117            | 0,297             | 1,803            | 0,257            | 0,562            |
| 26 | B-CLL    | 1,591            | 5,657             | 7,635            | 4,983            | 2,454            |
| 27 | B-CLL    | 9,849            | 10,196            | 23,606           | 11,949           | 3,854            |
| 28 | B-CLL    | 0,908            | 1,014             | 4,429            | 2,212            | 2,075            |
| 29 | B-CLL    | 0,559            | 1,197             | 5,653            | 4,810            | 1,032            |
| 30 | B-CLL    | 1,125            | 1,214             | 2,697            | 1,897            | 2,758            |
| 31 | B-CLL    | 3,784            | 0,395             | 2,002            | 0,518            | 0,974            |
| 32 | B-CLL    | 0,129            | 0,395             | 5,730            | 2,532            | 2,002            |
| 33 | B-CLL    | 0,758            | 1,753             | 2,753            | 1,807            | 1,268            |
| 34 | B-CLL    | 1,945            | 3,010             | 9,046            | 4,295            | 2,03             |
| 35 | B-CLL    | 2,828            | 2,129             | 3,899            | 1,027            | 2,559            |
| 36 | B-CLL    | 4,659            | 3,227             | 11,191           | 5,140            | 1,542            |
| 37 | B-CLL    | 4,891            | 3,706             | 4,387            | 3,174            | 2,766            |
| 38 | B-CLL    | 0,049            | 0,066             | 0,127            | 0,102            | 0,012            |
| 39 | B-CLL    | 3,249            | 3,095             | 2,375            | 2,617            | 0,794            |
| 40 | B-CLL    | 0,818            | 2,603             | 2,677            | 3,304            | 7,368            |
| 41 | B-CLL    | 0,92             | 1,625             | 2,159            | 3,016            | 1,007            |
| 42 | B-CLL    | 1,042            | 1,474             | 1,42             | 0,844            | 3,932            |
| 43 | B-CLL    | 2,378            | 3,864             | 6,738            | 4,768            | 1,857            |
| 44 | B-CLL    | 0,835            | 2,549             | 2,24             | 2,701            | 4,534            |
| 45 | B-CLL    | 1,189            | 2,071             | 5,507            | 4,531            | 17,446           |
| 46 | B-CLL    | 0,266            | 0,323             | 0,226            | 0,246            | 0,317            |
| 47 | B-CLL    | 1,165            | 1,705             | 1,569            | 2,018            | 0,523            |
|    |          |                  |                   |                  |                  |                  |
|    |          |                  |                   |                  |                  |                  |



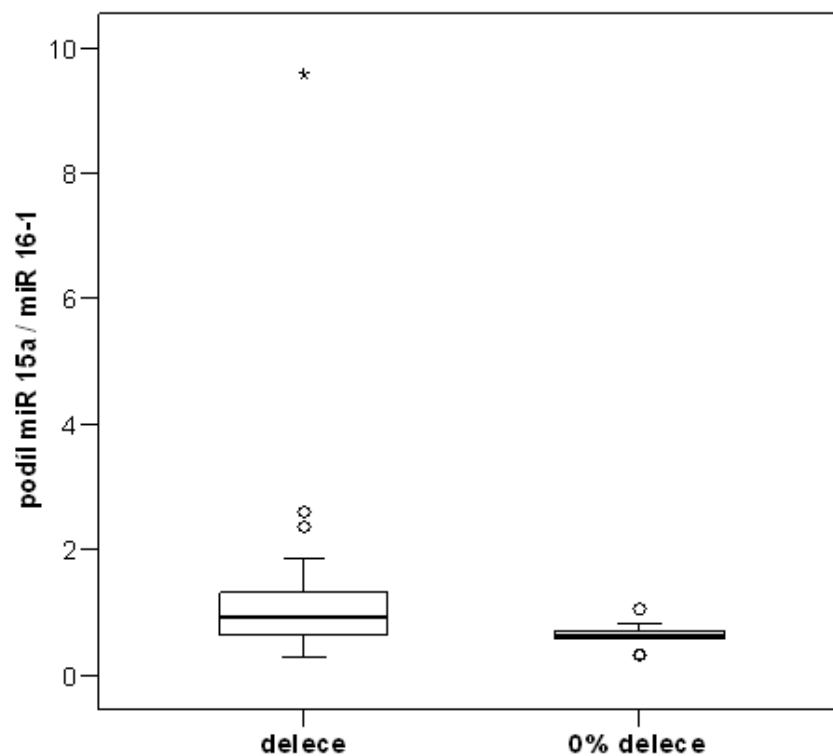
**Obrázek 12** Slabá negativní korelace mezi norm. miR-16-1 a bialeickou delecí 13q. Spearmanova korelační analýza,  $p < 0,05$ .



**Obrázek 13** Středně silná negativní korelace mezi norm. miR-15a a věkem pacientů v době odběru. Spearmanova korelační analýza,  $p < 0,05$ .



**Obrázek 14** Slabá negativní korelace mezi norm. miR-16-1 a věkem pacientů v době odběru. Spearmanova korelační analýza,  $p < 0,05$ .

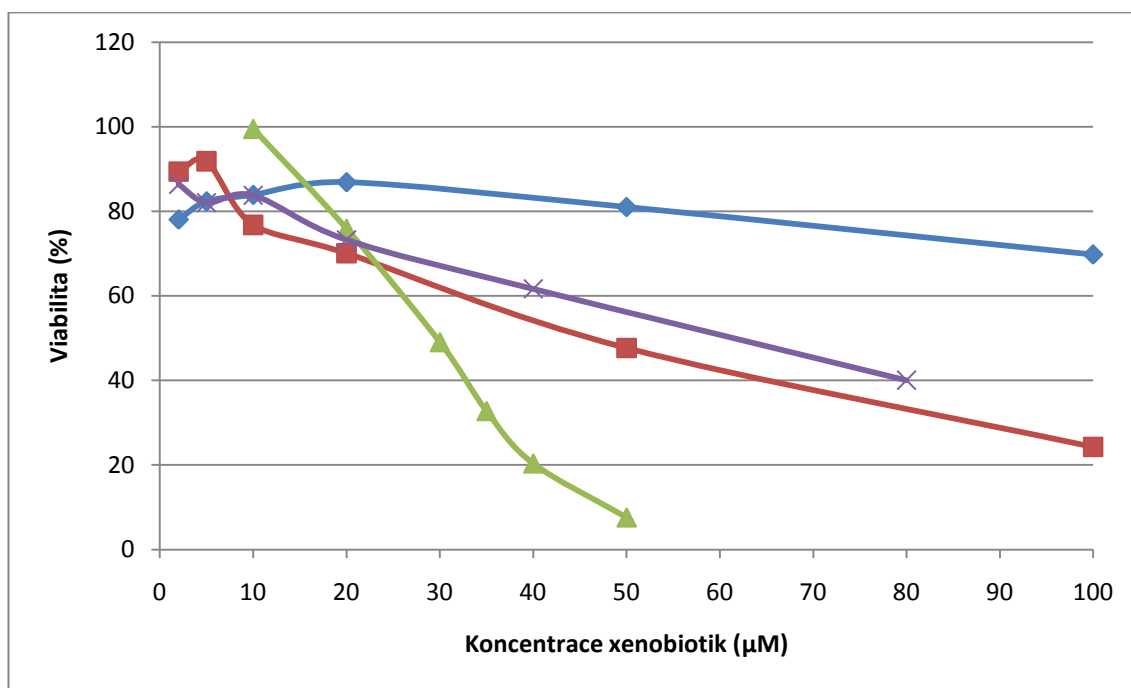


**Obrázek 15** Signifikantně vyšší hodnoty poměru miR-15a/miR-16-1 pacientů s delecí oproti pacientům bez delece. Mann-Whitney test,  $p=0,035$ .

## 8.2 Stanovení toxicity vybraných xenobiotik na HepG2 a HeLa buněčné linii

Abychom mohli sledovat vliv miR-29 na toxicitu vybraných xenobiotik, bylo důležité nejprve stanovit jejich toxicitu na buňkách. Proto byly stanoveny koncentrační řady

jednotlivých xenobiotik na HepG2 a HeLa buněčné linii. Buňky byly vystaveny působení xenobiotik po dobu 24 hodin. Pokus byl prováděn na 96 jamkové desce. V koncentracích 2, 5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{M}$  byl stanoven cytarabin a azacytidin, v koncentracích 2, 5, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$  byl stanoven etoposid a v koncentracích 10, 20, 30, 35, 40, 50  $\mu\text{M}$  byl stanoven amiodaron (obrázek 17). Výsledné křivky byly proloženy spojnicí trendu a z rovnice regrese byla vypočítána hodnota  $\text{IC}_{50}$ , která odpovídá koncentraci látky poškozující 50 % buněk (tabulka 5). Amiodaron jsme vzhledem k jeho vysoké toxicitě použili jako pozitivní kontrolu a k dalším pokusům již nebyl využíván. Cytarabin při aplikaci na HepG2 buňky nevykazoval cytotoxicitu ani genotoxicitu při použití 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  ani 100  $\mu\text{M}$  koncentrace (Severin et al., 2003), což se v případě toxicity potvrdilo i v našem experimentu. Azacytidin a etoposid vykazovaly poměrně dobrou toxicitu jak u HepG2, tak u HeLa buněk, proto jsme se rozhodli je dále používat. Ačkoli byli hodnoty  $\text{IC}_{50}$  azacytidinu 42  $\mu\text{M}$  a pro etoposid 60  $\mu\text{M}$ , rozhodli jsme se v dalších pokusech používat vyšší koncentraci pro lepší účinnost a to 60  $\mu\text{M}$  azacytidin a 80  $\mu\text{M}$  etoposid.



**Obrázek 16** Toxicita sledovaných xenobiotik na buněčné linii HepG2. Srovnatelné křivky byly naměřeny také u HeLa buněk. Data jsou průměrem ze 4 nezávislých experimentů, z důvodu přehlednosti zde nejsou znázorněny směrodatné odchylky. Rozlišení křivek: modrá-cytarabin; fialová-etoposid; červená-azacytidin; zelená-amiodaron.

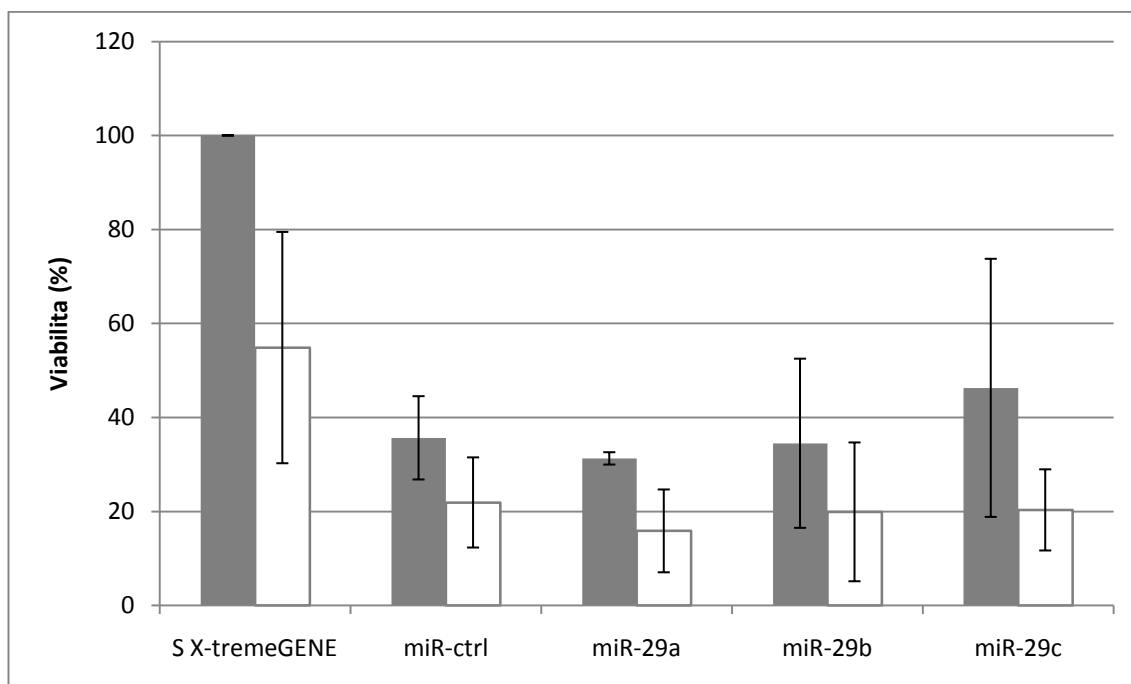
**Tabulka 5** Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  pro jednotlivá xenobiotika pro HepG2 a HeLa buňky.

| Xenobiotikum | $\text{IC}_{50}$   |
|--------------|--------------------|
| Cytarabin    | >100 $\mu\text{M}$ |
| Azacytidin   | 42 $\mu\text{M}$   |
| Amiodaron    | 28 $\mu\text{M}$   |

### 8.3 Vliv syntetické miR-29 transfekované do HepG2 buněk na toxicitu etoposidu

Výchozím bodem pro tento pokus byl výsledek experimentu Lucie Kubienové, která prokázala, že miR-29b signifikantně navyšuje toxicitu etoposidu v HeLa buňkách (Kubienová, 2009). My jsme se pokusili ověřit, zda je tato aktivita syntetické miR-29 detekovatelná i na HepG2 buňkách.

HepG2 buňky byly transfekovány jednotlivými členy rodiny miR-29 za použití lipofekčního činidla X-tremeGENE. Stabilizace buněk po transfekci probíhala 48 hodin a následně byl přidán etoposid (80  $\mu$ M) na 24 hodin. Transfekce byla prováděna na 24 jamkové desce, časový interval 48 hodin pro stabilizaci byl používán, protože po tomto čase způsobuje syntetická miR-29 snížení exprese cílových genů. Z důvodu vysoké toxicity transfekčního činidla rapidně klesla viabilita buněk, proto zde výsledky vztahujeme k buňkám s X-tremeGENE a ne pouze k buňkám. Navíc vložení jakékoli krátké RNA, byť jen kontrolní, která neplní v buňce žádnou funkci, způsobilo ještě výraznější pokles viability. Proto nelze z těchto výsledků získat žádné signifikantní závěry (obrázek 18). Pro ověření transfekce jsme transfekovali buňky na 6 jamkové desce. Po 48 hodinách byla izolována RNA, změřena její koncentrace a stanovena hladina exprese jednotlivých miR-29 pomocí real-time PCR. Transfekce pomocí X-tremeGENE měla velice dobrou účinnost, vykazovala však vysokou toxicitu činidla (tabulka 6).



**Obrázek 17** Viabilita transfekovaných HepG2 buněk po působení etoposidem. Transfekce pomocí X-tremeGENE činidla. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů  $\pm$  SD. S X-tremeGENE - kontrolní buňky vystavené

působení pouze transfekčního činidla; miR-ctrl – buňky transfekované kontrolní miRNA; miR-29a,b,c – buňky transfekované uvedenou syntetickou miRNA. Tmavé sloupce - bez etoposidu; prázdné - s etoposidem.

**Tabulka 6** Kontrola účinnosti transfekce pomocí X-tremeGENE. S X-tremeGENE - kontrolní buňky vystavené působení pouze transfekčního činidla; CTRL – buňky transfekované kontrolní miRNA; transf-29a,b,c – buňky transfekované uvedenou syntetickou miRNA.

| Vzorek RNA        | miRNA          | Exprese         |
|-------------------|----------------|-----------------|
| S X-tremeGENE     | miR-29a        | 1,00            |
| CTRL              | miR-29a        | 0,84            |
| <b>transf-29a</b> | <b>miR-29a</b> | <b>893,81</b>   |
| S X-tremeGENE     | miR-29b        | 1,00            |
| CTRL              | miR-29b        | 0,31            |
| <b>transf-29b</b> | <b>miR-29b</b> | <b>6218,66</b>  |
| S X-tremeGENE     | miR-29c        | 1,00            |
| CTRL              | miR-29c        | 1,32            |
| <b>transf-29c</b> | <b>miR-29c</b> | <b>78433,71</b> |

#### 8.4 Sledování vlivu dexamethasonu a mifepristonu na expresi miR-29 u HeLa a HepG2 buněk

Z předchozích pokusů vyplynulo, že miR-29b navyšuje toxicitu v HeLa buňkách, nikoli však v HepG2. Rozdíl mezi těmito buňkami je mimo jiné v transkripční aktivitě glukokortikoidního receptoru (GR). Přestože je GR detekovatelný v HepG2 buňkách, vykazuje velmi nízkou citlivost na stimulaci dexamethasonem (Dvořák et al., 2008). V případě ko-transfekce plasmidy zajišťujícími expresi funkčního GR a reportérového genu lze pozorovat až 600-násobné zvýšení aktivity po stimulaci dexamethasonem (Fruchter et al., 2005). Proto jsme se rozhodli sledovat vliv dexamethasonu a mifepristonu, což je aktivátor, respektive inhibitor GR, na hladinu exprese miR-29 v HeLa a HepG2 buňkách.

Buňky byly vystaveny 24 hodinovému působení dexamethasonu, mifepristonu a jejich kombinací na 6 jamkových deskách. Koncentrace dexamethasonu byla 100 nM, mifepristonu 10  $\mu$ M. Následně byla izolována RNA, stanovena její koncentrace, provedena reverzní transkripce a pomocí real-time PCR stanovena hladina exprese miR-29. Výsledná exprese miR-29 u HeLa buněk je zobrazena v tabulce 7. Hladina miR-29a byla nedetekovatelná, miR-29c byla působením dexamethasonu mírně navýšena. MiR-29b byla po působení dexamethasonu mnohonásobně vyšší. V kombinaci s mifepristonem, což je látka používaná jako antagonist dexamethasonu, bylo navýšení miR-29b nižší.

Totéž bylo provedeno na HepG2 buňkách (tabulka8), kde ale dexamethason nenavýšoval expresi žádné miR-29, pouze mifepriston mírně navýšoval miR-29b, ale vykazoval značný rozptyl hodnot.

**Tabulka 7** Expresí miR-29 u HeLa buněk po působení dexamethasonu (Dex) a mifepristonu (RU486). Kontrolní buňky jsou označeny UT. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů.

|           | Expresí miR-29b | SD   | Expresí miR-29c | SD   |
|-----------|-----------------|------|-----------------|------|
| Dex       | <b>27,24</b>    | 5,13 | <b>5,70</b>     | 0,87 |
| Dex+RU486 | <b>18,89</b>    | 5,04 | <b>5,70</b>     | 2,01 |
| RU486     | <b>4,30</b>     | 1,44 | <b>3,89</b>     | 2,68 |
| UT        | <b>1,00</b>     | 0,00 | <b>1,00</b>     | 0,00 |

**Tabulka 8** Expresí miR-29 u HepG2 buněk po působení dexamethasonu (Dex) a mifepristonu (RU486). Kontrolní buňky jsou označeny UT. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů.

|           | Expresí miR-29a | SD   | Expresí miR-29b | SD   | Expresí miR-29c | SD   |
|-----------|-----------------|------|-----------------|------|-----------------|------|
| Dex       | <b>1,07</b>     | 0,23 | <b>1,60</b>     | 1,37 | <b>1,67</b>     | 0,48 |
| Dex+RU486 | <b>1,57</b>     | 0,69 | <b>2,21</b>     | 1,54 | <b>1,90</b>     | 0,93 |
| RU486     | <b>2,17</b>     | 0,85 | <b>7,73</b>     | 6,79 | <b>3,01</b>     | 1,41 |
| UT        | <b>1,00</b>     | 0,00 | <b>1,00</b>     | 0,00 | <b>1,00</b>     | 0,00 |

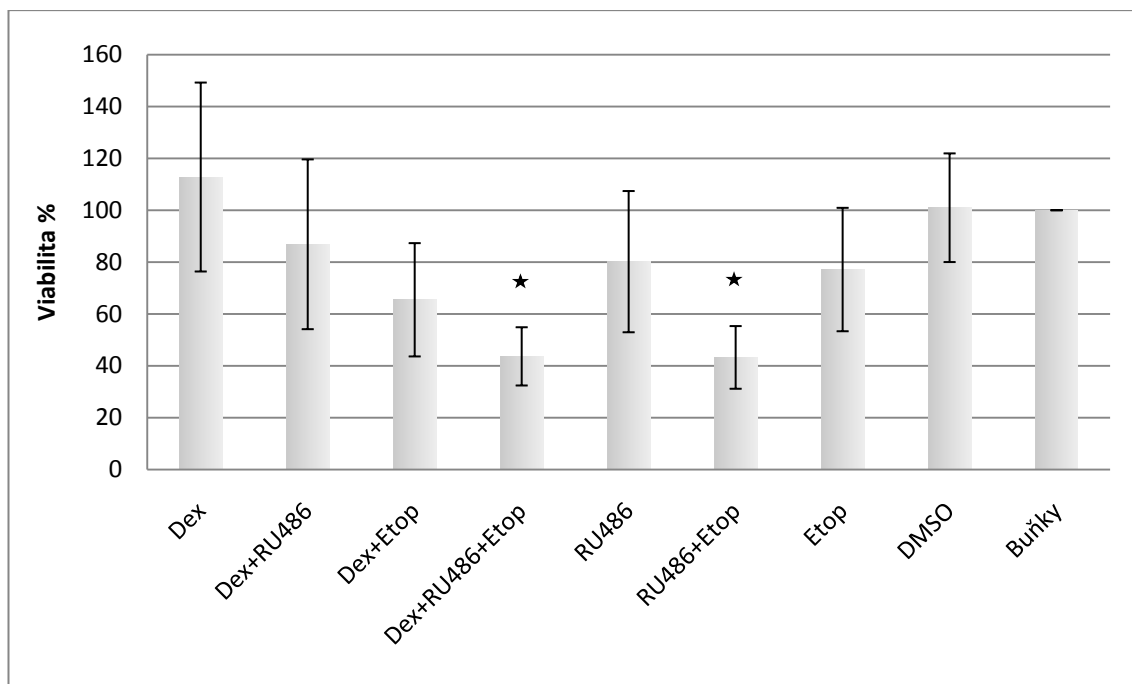
## 8.5 Srovnání toxicity kombinací xenobiotik – etoposid, dexamethason, mifepriston na HepG2 a HeLa buňkách

Jelikož dexamethason prokazatelně navýšoval expresi miR-29b v HeLa buňkách a stejně tak miR-29b navýšovala toxicitu etoposidu v HeLa buňkách, proto jsme testovali účinek dexamethasonu na toxicitu etoposidu jak na HeLa, tak na HepG2 buňkách.

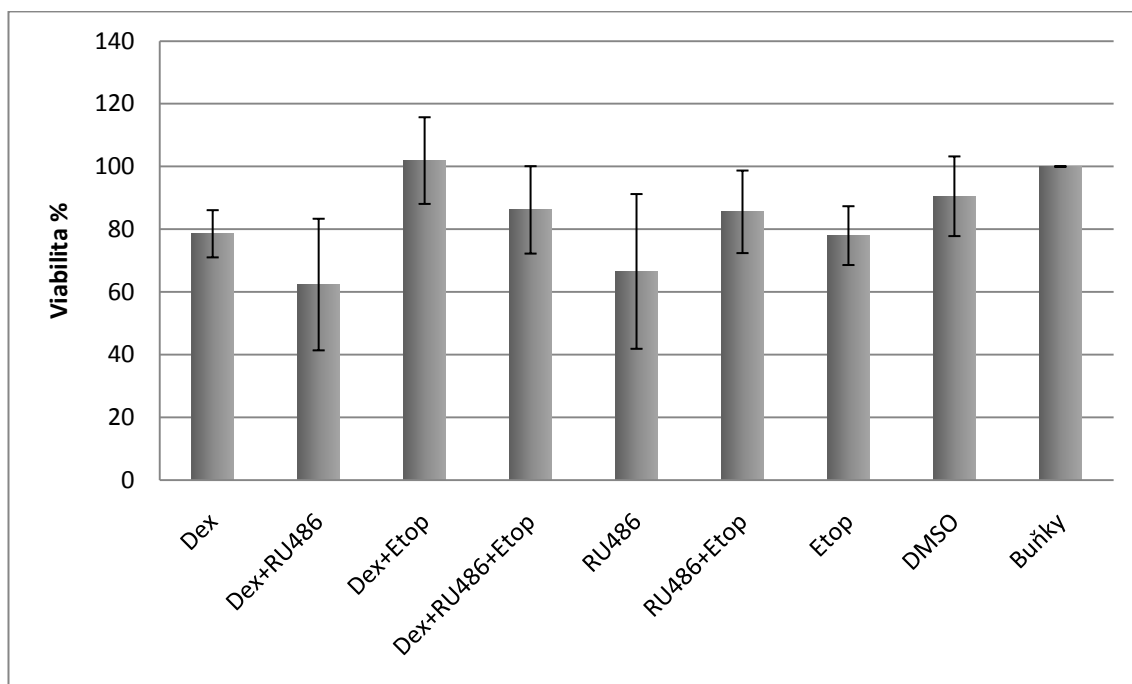
Nejprve byly na buňky aplikovány dexamethason (100 nM) a mifepriston (10  $\mu$ M) a inkubovány 24 hodin. Následně byl k buňkám přidán etoposid (80  $\mu$ M) na 24 hodin. Pokus byl prováděn na 96 jamkové desce.

U HepG2 buněk jsme očekávali, že by se neměl účinek dexamethasonu ani mifepristonu projevit, z důvodu velmi nízké transkripční aktivity GR. Nicméně kombinace mifepristonu s etoposidem vykazovala signifikantně vyšší toxicitu. Jiné signifikantní závislosti nebyly u HepG2 buněk nalezeny (obrázek 19).

U HeLa buněk jsme díky přítomnosti glukokortikoidního receptoru očekávali účinek dexamethasonu a mifepristonu, kdy dexamethason by mohl navýšovat toxicitu etoposidu. Žádná signifikantní závislost u HeLa buněk však nebyla nalezena (obrázek 20).



**Obrázek 18** Toxicita na HepG2 buňkách: kombinace s etoposidem. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů  $\pm$  SD. Statistické hodnocení provedeno jako ANOVA s post hoc Tukeyho testem na hladině  $p < 0,05$  (označeno \*). Dex - dexamethason; RU486 - mifepriston; Etop - etoposid.



**Obrázek 19** Toxicita na HeLa buňkách: kombinace s etoposidem. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů  $\pm$  SD. Statistické hodnocení provedeno jako ANOVA s post hoc Tukeyho testem na hladině  $p < 0,05$  (označeno \*). Dex - dexamethason; RU486 - mifepriston; Etop - etoposid.

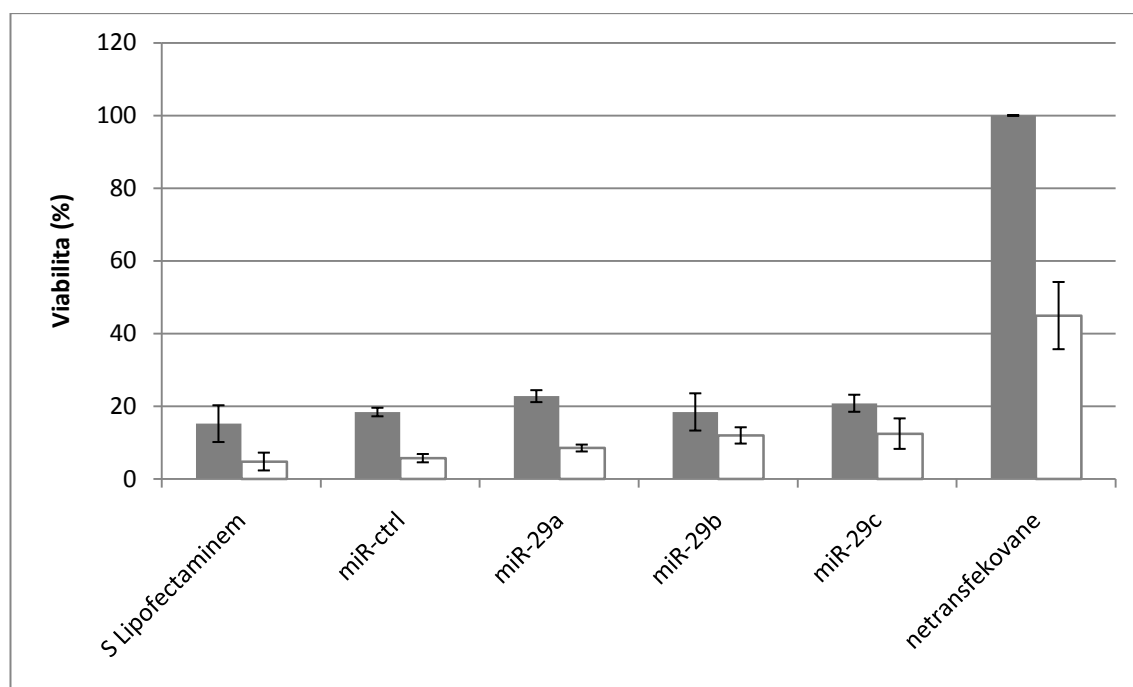
## 8.6 Vliv transfekovaných miR-29 na toxicitu azacytidinu v HepG2 a HeLa buňkách

Dalším xenobiotikem, které jsme se rozhodli používat, byl azacytidin, jelikož má stejný inhibiční efekt na DNA methyltransferasu jako miR-29. Lze tedy očekávat synergický efekt, kdy azacytidin inhibuje existující DNMT a zároveň dochází k potlačení exprese DNMT syntetickou miR-29.

HepG2 buňky byly transfekovány jednotlivými miR-29 pomocí Lipofectaminu 2000. Stabilizace buněk po transfekci probíhala 48 hodin a následně byl aplikován azacytidin (60  $\mu$ M) po dobu 24 hodin. Lipofectamin 2000 vykazoval vysokou toxicitu na HepG2 buňkách (obrázek 21). Nicméně transfekce byla ověřena a ukázala se jako účinná (tabulka 9).

Z důvodů vysoké toxicity X-tremeGENE a Lipofectaminu 2000 jsme zvolili třetí transfekční činidlo – jetPRIME. Transfekce proběhla jako v předchozích postupech na 24 jamkové desce. Použití jetPRIME činidla tentokrát nevedlo ke snížené viabilitě buněk, není tudíž pro buňky toxické. Následné působení azacytidinu způsobilo snížení viability HepG2 buněk, avšak nebyl zaznamenán žádný signifikantní vliv syntetické miR-29 na toxicitu azacytidinu (obrázek 22). Transfekce byla ověřena pomocí real-time PCR a oproti X-tremeGENE a Lipofectaminu 2000 vykazovala mnohem nižší účinnost (tabulka 10).

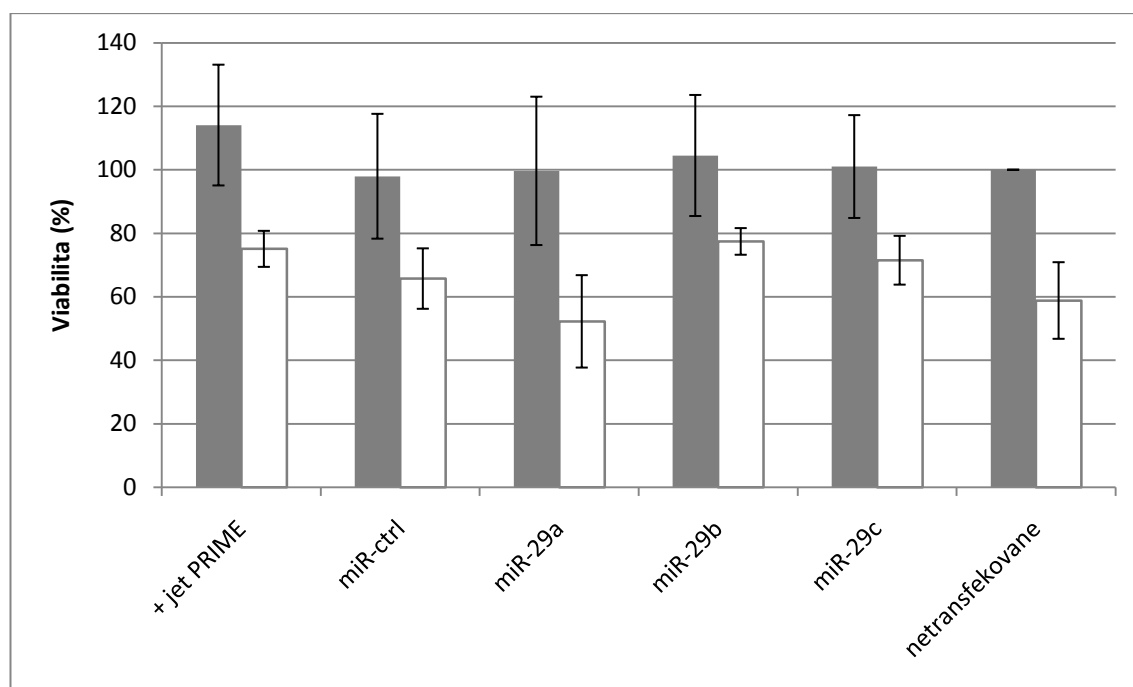
Jelikož jetPRIME nevykazoval vysokou toxicitu na HepG2 buňky, použili jsme ho také na HeLa buňky. Vložení krátké RNA do HeLa buněk vedlo k mírnému poklesu viability. Použitím azacytidinu viabilita také klesla, nebyl zde však zjištěn žádný signifikantní vliv syntetické miR-29 na toxicitu azacytidinu (obrázek 23). Účinnost transfekce jetPRIME činidlem byla lepší než u HepG2 buněk (tabulka 11).



**Obrázek 20** Viabilita transfekovaných HepG2 buněk po působení azacytidinu. Transfekce provedena pomocí Lipofectaminu 2000. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů  $\pm$  SD. Tmavé sloupce - bez azacytidinu; prázdné sloupce - s azacytidinem.

**Tabulka 9** Kontrola účinnosti transfekce pomocí Lipofectaminu 2000.

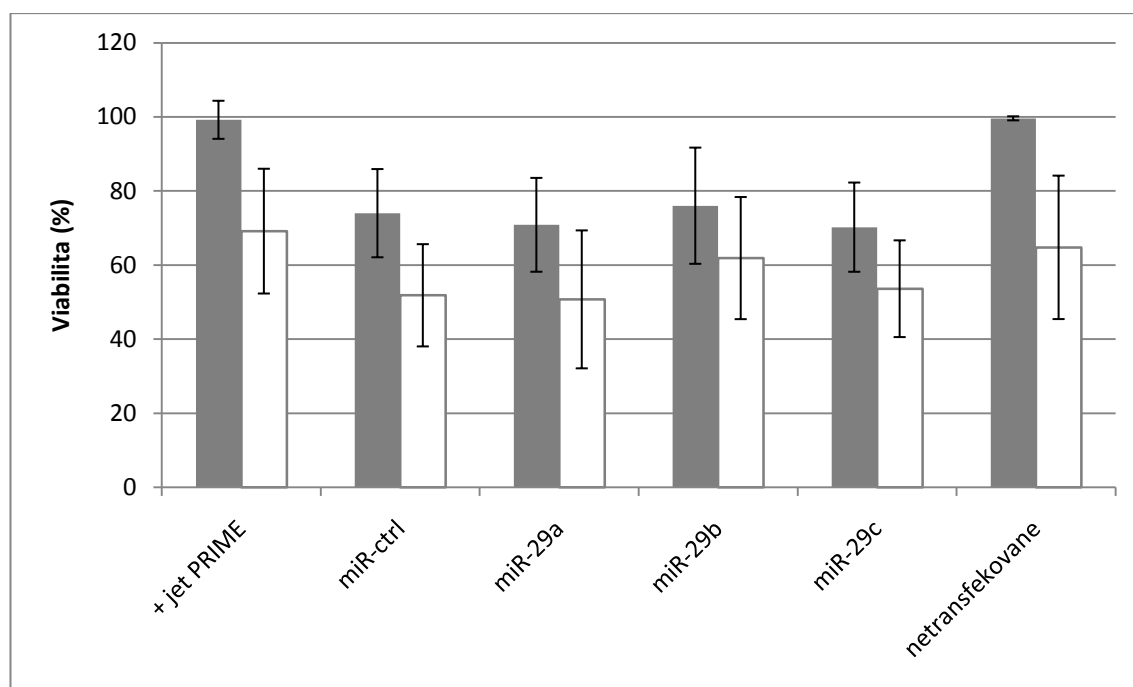
| Vzorek RNA        | miRNA          | Expres         |
|-------------------|----------------|----------------|
| S Lipofectaminem  | miR-29a        | 1,00           |
| CTRL              | miR-29a        | 0,63           |
| <b>transf-29a</b> | <b>miR-29a</b> | <b>2104,84</b> |
| S Lipofectaminem  | miR-29b        | 1,00           |
| CTRL              | miR-29b        | 0,28           |
| <b>transf-29b</b> | <b>miR-29b</b> | <b>5897,20</b> |
| S Lipofectaminem  | miR-29c        | 1,00           |
| CTRL              | miR-29c        | 0,45           |
| <b>transf-29c</b> | <b>miR-29c</b> | <b>757,37</b>  |



**Obrázek 21** Viabilita transfekovaných HepG2 buněk po působení azacytidinem. Transfekce pomocí jetPRIME činidla. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů  $\pm$  SD. Tmavé sloupce - bez azacytidinu; prázdné sloupce - s azacytidinem.

**Tabulka 10** Kontrola účinnosti transfekce pomocí jetPRIME na HepG2 buňkách.

| Vzorek RNA        | miRNA          | Expese       |
|-------------------|----------------|--------------|
| S jetPRIME        | miR-29a        | 1,00         |
| CTRL              | miR-29a        | 1,09         |
| <b>transf-29a</b> | <b>miR-29a</b> | <b>14,35</b> |
| S jetPRIME        | miR-29b        | 1,00         |
| CTRL              | miR-29b        | 1,44         |
| <b>transf-29b</b> | <b>miR-29b</b> | <b>77,92</b> |
| S jetPRIME        | miR-29c        | 1,00         |
| CTRL              | miR-29c        | 1,16         |
| <b>transf-29c</b> | <b>miR-29c</b> | <b>22,47</b> |



**Obrázek 22** Viabilita transfekovaných HeLa buněk po působení azacytidinu. Transfekce pomocí jetPRIME činidla. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů  $\pm$  SD. Tmavé sloupce - bez azacytidinu; světlé sloupce - s azacytidinem.

**Tabulka 11** Kontrola účinnosti transfekce pomocí jetPRIME na HeLa buňkách.

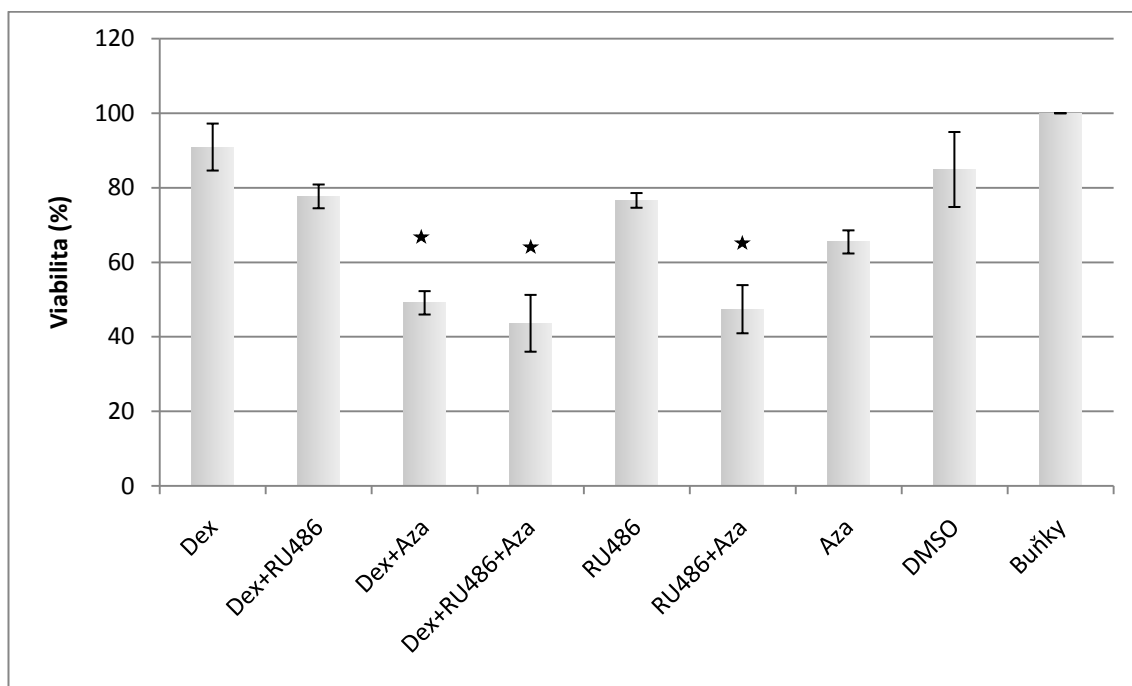
| Vzorek RNA        | miRNA          | Expres        |
|-------------------|----------------|---------------|
| S jetPRIME        | miR-29a        | 1,00          |
| CTRL              | miR-29a        | 0,71          |
| <b>transf-29a</b> | <b>miR-29a</b> | <b>48,13</b>  |
| S jetPRIME        | miR-29b        | 1,00          |
| CTRL              | miR-29b        | 0,56          |
| <b>transf-29b</b> | <b>miR-29b</b> | <b>110,33</b> |
| S jetPRIME        | miR-29c        | 1,00          |
| CTRL              | miR-29c        | 0,55          |
| <b>transf-29c</b> | <b>miR-29c</b> | <b>129,89</b> |

### 8.7 Srovnání toxicity kombinací xenobiotik – azacytidin, dexamethason, mifepriston na HepG2 a HeLa buňkách

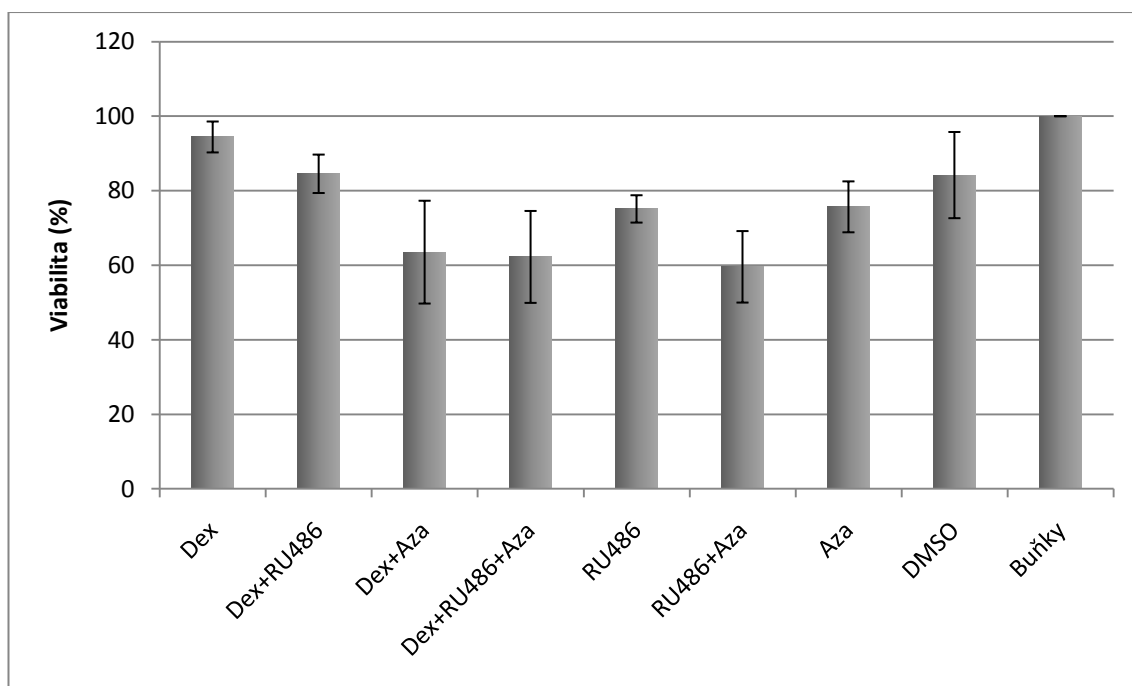
Stejně jako v experimentu s etoposidem, jsme testovali kombinaci azacytidinu, dexamethasonu a mifepristonu.

Tyto experimenty byly provedeny analogicky jako předchozí pokusy, etoposid však byl zaměněn za azacytidin (60  $\mu$ M). Zde došlo k signifikantnímu snížení viability HepG2 buněk působením kombinací dexamethasonu a mifepristonu s azacytidinem (obrázek 24).

U HeLa buněk opět nebyla nalezena žádná signifikantní závislost (obrázek 25).



**Obrázek 23** Toxicita na HepG2 buňkách: kombinace s azacytidinem. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů  $\pm$  SD. Statistické hodnocení provedeno jako ANOVA s post hoc Tukeyho testem na hladině  $p < 0,05$  (označeno \*). Dex - dexamethason; RU486 - mifepriston; Aza - azacytidin.



**Obrázek 24** Toxicita na HeLa buňkách kombinace s azacytidinem. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů  $\pm$  SD. Dex - dexamethason; RU486 - mifepriston; Aza - azacytidin.

## DISKUSE

V souvislosti s chronickou lymfocytární leukemií a mikroRNA bylo publikováno již mnoho studií. Řada z nich již prokázala významné postavení několika miRNA v patogenezi tohoto závažného onemocnění. Cílem této práce bylo nejen potvrdit již známé skutečnosti, ale také nalézt nové spojitosti mezi miR-15a, miR-16-1 a rodinou miR-29 a CLL.

Bylo zjištěno, že miR-15a a miR-16-1 leží v malé oblasti chromosomu 13q14, která je u více než 50 % pacientů s CLL deletována a alelická ztráta v této oblasti signifikantně koreluje se sníženou hladinou exprese miR-15a a miR-16-1 (Calin et al., 2002). Cílovým genem těchto miRNA je pravděpodobně anti-apoptotický protein Bcl-2, jehož hladina je u většiny pacientů s CLL navýšena. Tyto poznatky ukazují, že miR-15a a miR-16-1 mají vlastnost nádorového supresoru (Cimmino et al., 2005). V našem souboru pacientů nebyla tato teorie vyvrácena, byla však potvrzena pouze u pacientů s bialelickou delecí. Mezi normalizovanou hodnotou miR-16-1 a bialelickou delecí 13q byla zjištěna slabá negativní korelace. Slabá korelace mohla být ovlivněna statistikou, jelikož pro statistické vyhodnocení byli pacienti s monoalelickou delecí označeni jako 0 % bialelická delece, ačkoli se u nich delece vyskytla. Pokud by pacienti s monoalelickou delecí nebyli zahrnuti do tohoto srovnání, mohla být korelace mezi bialelickou delecí 13q a sníženou hladinou miR-16-1 vyhodnocena jako silná. Otázkou však zůstává, zda selekce uvnitř skupiny pacientů nevnaší do statistického hodnocení nevhodný bias, který zkresluje celkový výsledek. U pacientů bez bialelické delece 13q byly zjištěny signifikantně vyšší hodnoty miR-15a. Z těchto výsledků vyplývá, že miR-16-1 je v obou případech, tedy bez bialelické delece i s touto delecí, hůře exprimována než miR-15a. Dále jsme se pokusili korelovat hladiny miR-15a a miR-16-1 s jednotlivými diagnostickými parametry pacientů, avšak mezi mutačním stavem IgVH, ZAP-70, stádiem onemocnění dle Bineta, výskytem exitů ani patologickou klonalitou nebyla prokázána signifikantní závislost. Středně silná negativní korelace však byla zjištěna mezi hodnotami miR-15a a věkem pacientů v době odběru a slabá negativní korelace byla také mezi miR-16-1 a věkem pacientů. Tento výsledek naznačuje, že se vzrůstajícím věkem a rozvojem onemocnění se hladina těchto miRNA snižuje, z čehož vyplývá, že se hladina jejich exprese může v průběhu onemocnění měnit. Pro další statistické hodnocení jsme použili poměr miR-15a/miR-16-1, tedy relativní hodnotu exprese tohoto tandemu miRNA. Jelikož obě miRNA leží ve stejné oblasti chromozomu, delece v této oblasti by měly ovlivnit expresi obou miRNA stejnou měrou. Ukázalo se, že v souboru pacientů s jakoukoli delecí 13q byly zjištěny signifikantně vyšší hodnoty poměru miR-15a/miR-16-1 než v souboru pacientů s 0 % delecí. Tento výsledek naznačuje, že u pacientů bez delece dochází k rovnoměrné expresi obou miRNA, zatímco delece, ať už monoalelická nebo bialelická, nezahrnuje vždy identický úsek chromosomu a nevyskytuje se ve všech B-buňkách. Takto může nastat situace, že je

vyřazena z provozu pouze některá z těchto miRNA, zatímco druhá je bez problémů exprimována, a tak jsou jejich hladiny rozdílné.

Další důležitá molekula související s CLL je proto-onkogen Tcl-1. Tcl-1 je asociován s nepříznivou prognózou onemocnění a s výskytem ZAP-70, což je negativní prognostický faktor. Bylo zjištěno, že rodina miR-29 negativně reguluje Tcl-1 a jejich snížená exprese je tedy asociována s horší prognózou (Pekarsky & Croce, 2010). Malý soubor pacientů CLL, který měla k dispozici Lucie Kubienová poukázal na možnou asociaci miR-29 se ZAP-70 (Kubienová, 2009). Tuto asociaci jsme se rozhodli prověřit na mnohem větším souboru pacientů s CLL, a proto jsme kromě výše uvedených miR-15a a miR-16-1 stanovili hladiny všech miR-29 a porovnali je s diagnostickými parametry pacientů. Korelace mezi miR-29a, miR-29b, miR-29c, podílem miR-29a/c a delecí 13q, mutačním stavem IgVH, ZAP-70, stádiem onemocnění dle Bineta, věkem, pohlavím, výskytem exitů ani patologickou klonalitou neprokázala žádnou signifikantní závislost. Nebyla tedy potvrzena teorie, že miR-29 souvisí s přítomností ZAP-70. Pokud bychom chtěli srovnat hladiny miR-29 s agresivním nebo indolentním průběhem onemocnění, museli bychom si srovnávat skupiny pacientů s nemutovaným IgVH a přítomností ZAP-70 jako agresivní prognózu a pacienty s mutovaným IgVH, bez ZAP-70 jako indolentní prognózu. Bohužel v našem souboru jsme neměli dostatečné zastoupení pacientů s indolentní prognózou, abychom mohli porovnat miR-29 s průběhem onemocnění.

[REDACTED]

Druhou částí této diplomové práce bylo osvětlit vzájemné vztahy mezi miR-29 a vybranými xenobiotiky. V roce 2010 byla publikována zajímavá studie ukazující vliv miR-29b na odpověď léčby decitabinem (5-aza-2'-deoxycytidin) u pacientů s akutní myeloidní leukemií. Před léčbou byly stanoveny hladiny miR-29b, následně byla aplikována 10 denní léčba decitabinem a stanovena odpověď na tuto léčbu. Vysoká hladina miR-29b byla asociována s lepší odpovědí na léčbu decitabinem. Protože vyšší hladina exprese miR-29b negativně reguluje DNA methyltransferasu a vede k hypomethylaci, může takto navyšovat citlivost buněk k decitabinu. MiR-29b by v tomto případě mohla být významným prediktorem odpovědi na léčbu decitabinem nebo případně použita pro selektivní hypomethylační léčbu AML (Blum et al., 2010). Také pokus Lucie Kubienové ukázal, že miR-29 a některá xenobiotika se mohou navzájem ovlivňovat, konkrétně miR-29 navyšoval toxicitu etoposidu na HeLa buňkách (Kubienová, 2009). Proto jsme se rozhodli ověřit, zda bude stejný efekt nalezen také v jiné buněčné linii. Použili jsme HepG2 buňky, což je buněčná linie odvozená od hepatologické malignity. V HepG2 buňkách nebyl efekt navýšení toxicity etoposidu v přítomnosti syntetické

miR-29b potvrzen, což může souviset s rozdílnou expresí či funkcí některého z nukleárních receptorů u obou testovaných buněčných linií. Zaměřili jsme se na glukokortikoidní receptor, který je plně funkční v HeLa buňkách, v linii HepG2 je sice exprimován, avšak není plně funkční. Pro stimulaci buněk jsme použili dexamethason, syntetický aktivátor glukokortikoidního receptoru, a mifepriston, který je používán jako antagonist dexamethasonu, sám však vykazuje slabý aktivační účinek. V HeLa buňkách dexamethason signifikantně navýšoval hladinu miR-29b, v HepG2 buňkách se tento efekt neprojevil. Možné zapojení glukokortikoidního receptoru do exprese miR-29b však podporují i zbývající výsledky. Mifepriston v kombinaci s dexamethasonem působil v HeLa buňkách jako antagonist, tedy snižoval efekt dexamethasonu, použitý samostatně však vyvolal mírné navýšení exprese miR-29b. Při použití obou látek v HepG2 buňkách jsme zaznamenali navýšení exprese miR-29b, které však nebylo statisticky signifikantní kvůli velkému rozptylu dat. V jednotlivých experimentech jsme však pozorovali slabý účinek dexamethasonu podobně jako další autoři (Dvořák et al., 2008).

Protože naše výsledky naznačují, že ve změnách hladiny miR-29b hraje roli glukokortikoidní receptor, rozhodli jsme se vyzkoušet kombinaci těchto xenobiotik na HeLa i HepG2 buněčné linii. V HeLa buněčné linii, kde je plně funkční glukokortikoidní receptor, jsme očekávali, že dexamethason bude navýšovat toxicitu etoposidu. Tento efekt však nebyl potvrzen a nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl mezi toxicitou těchto xenobiotik, respektive jejich kombinacemi v HeLa buňkách. Jedním z možných vysvětlení je, že navýšení exprese miR-29b vyvolané dexamethasonem je výrazně nižší než hodnoty, kterých jsme dosahovali při transfekci syntetickou miRNA. V HepG2 buněčné linii dexamethason rovněž nenavýšoval toxicitu etoposidu. Nicméně očekávali jsme, že by se zde neměl efekt dexamethasonu ani mifepristonu nijak projevit, jelikož v této linii není plně funkční glukokortikoidní receptor. Ukázalo se však, že mifepriston signifikantně navýšoval toxicitu etoposidu v HepG2 buňkách. Protože mifepriston navýšoval expresi miR-29b v HepG2 buňkách, nabízí se hypotéza vyšší citlivosti HepG2 buněk na aditivní efekt etoposidu + mifepriston s návazností na miR-29b. Ovšem použití syntetických miR-29 nezvyšoval toxicitu etoposidu v HepG2 buňkách. Jako pravděpodobnější vysvětlení se jeví, že mifepriston zřejmě ovlivňuje HepG2 buňky také jiným mechanismem než přes glukokortikoidní receptor a tím může navýšovat toxicitu xenobiotik. Závěrem můžeme říct, že navýšení toxicity etoposidu na HeLa buňkách působením miR-29b nelze vyvolat použitím dexamethasonu, přestože dexamethason navýšuje hladinu miR-29b. V *in vivo* podmínkách však může být zcela jiná situace, protože kromě aktivace glukokortikoidního receptoru mohou spolupůsobit i další faktory, které v našich *in vitro* experimentech chybí. Těmito dalšími faktory mohou být růstové faktory, hormony, či jiné signální molekuly.

Analogické experimenty jsme provedli také s azacytidinem namísto etoposidu. Azacytidin má stejně jako miR-29 inhibiční efekt na DNA methyltransferasu, jejich kombinací

jsme očekávali synergický efekt. U pacientů s AML byla potvrzena souvislost mezi miR-29b a odpovědí na léčbu decitabinem, avšak mezi miR-29b a azacytidinem nalezena nebyla (Soriano et al., 2007). My jsme transfekovali HepG2 buňky jednotlivými miR-29 a následně na ně aplikovali azacytidin. MiR-29 nenavýšovala toxicitu azacytidinu na HepG2 ani HeLa buňkách. Na HepG2 buňkách byl vidět spíše opačný trend, jako by miR-29 toxicitu azacytidinu snižovala. Zde mohlo dojít k hypomethylaci anti-apoptotických molekul, které umožňují buňkám lépe přežít a nevstupovat do apoptosy. Tento efekt nebyl statisticky signifikantní, jelikož bylo velice obtížné opakovatelně a reprodukovatelně dosáhnout 50 % toxicity na netransfekovaných buňkách, pravděpodobně z důvodu nízké stability azacytidinu. Protože v úvodních experimentech, kde byly provedeny koncentrační řady pro zjištění  $IC_{50}$  a dosahovali jsme reprodukovatelných výsledků, jsme měli k dispozici jinou šarži azacytidinu, je otázkou, zda důvod později rozkolísaných výsledků pramenil z nevhodné manipulace s azacytidinem. U HeLa buněk jsem pozorovali podobný efekt snižování toxicity azacytidinu vlivem miR-29, v souboru experimentů se však ukázal jako neprokazatelný. Přestože jsem nezaznamenali navýšování toxicity azacytidinu vlivem miR-29b, provedli jsme stejnou řadu experimentů s dexamethasonem v kombinaci s azacytidinem. Na HepG2 buňkách bylo možno pozorovat signifikantně navýšenou toxicitu v kombinacích dexamethason a mifepriston s azacytidinem. Tento výsledek naznačuje, že HepG2 buňky potřebují větší dávku xenobiotik, aby se toxicita azacytidinu projevila. Tento výsledek jsme interpretovali jako kumulativní efekt stresu xenobiotiky spíše než cílený efekt dexamethasonu a mifepristonu na určitou signální dráhu. Na HeLa buňkách se žádné signifikantní změny neprojeví, tyto buňky zřejmě dokážou dobře metabolizovat použítá xenobiotika.

## ZÁVĚR

V této práci byly stanoveny hladiny exprese miR-15a a miR-16-1 u pacientů s CLL. U pacientů s bialelickou delecí 13q byla potvrzena skutečnost, že se jejich hladina signifikantně snižuje. Dále byla nalezena negativní korelace mezi těmito miRNA a věkem pacientů, avšak souvislost s jinými diagnostickými parametry nebyla nalezena. U pacientů s delecí 13q byly zjištěny vyšší hodnoty poměru miR-15a/miR-16-1 než u pacientů bez delecce.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Prokázali jsme, že dexamethason navyšuje hladinu exprese miR-29b v HeLa buňkách, tento účinek však nemá vliv na toxicitu etoposidu ani azacytidinu. Dexamethason a mifepriston navyšoval toxicitu etoposidu a azacytidinu na HepG2 buňkách, avšak z důvodu velmi nízké aktivity glukokortikoidního receptoru v této buněčné linii jde spíše o kumulativní efekt stresu xenobiotiky.

## LITERATURA

Adam Z., Krejčí M., Vorlíček J. (2008) Hematologie - Přehled maligních hematologických nemocí 2., doplněné a zcela přepracované vydání, pp. 177-196, GRADA Publishing, Praha, ČR.

Altuvia Y., Landgraf P., Lithwick G., Elefant N., Pfeffer S., Aravin A., Brownstein M. J., Tuschl T., Margalit H. (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res* **33**, 2697-2706.

American Cancer Society (2010) Cancer Facts & Figures 2010

Aqeilan R. I., Calin G. A., Croce C. M. (2010) miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ* **17**, 215-220.

Austen B., Skowronska A., Baker C., Powell J. E., Gardiner A., Oscier D., Majid A., Dyer M., Siebert R., Taylor A. M., Moss P. A., Stankovic T. (2007) Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol* **25**, 5448-5457.

Berková A., Michalová K. (2010) Cytogenetické nálezy u chronické lymfocytární leukemie (CLL). *Transfuze Hematol dnes* **16**, 52-55.

Blum K. A., Advani A., Fernandez L., Van Der Jagt R., Brandwein J., Kambhampati S., Kassis J., Davis M., Bonfils C., Dubay M., Dumouchel J., Drouin M., Lucas D. M., Martell R. E., Byrd J. C. (2009) Phase II study of the histone deacetylase inhibitor MGCD0103 in patients with previously treated chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **147**, 507-514.

Blum W., Garzon R., Klisovic R. B., Schwind S., Walker A., Geyer S., Liu S., Havelange V., Becker H., Schaaf L., Mickle J., Devine H., Kefauver C., Devine S. M., Chan K. K., Heerema N. A., Bloomfield C. D., Grever M. R., Byrd J. C., Villalona-Calero M., Croce C. M., Marcucci G. (2010) Clinical response and miR-29b predictive significance in older AML patients treated with a 10-day schedule of decitabine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 7473-7478.

Bonci D., Coppola V., Musumeci M., Addario A., Giuffrida R., Memeo L., D'Urso L., Pagliuca A., Biffoni M., Labbaye C., Bartucci M., Muto G., Peschle C., De Maria R. (2008) The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* **14**, 1271-1277.

Borchert G. M., Lanier W., Davidson B. L. (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 1097-1101.

Brejcha M. (2010) Normální a klonální B lymfocyty, monoklonální B lymfocytóza. *Transfuze Hematol dnes* **16**, 21-23.

Brennecke J., Hipfner D. R., Stark A., Russell R. B., Cohen S. M. (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell* **113**, 25-36.

Burger J. A., Kipps T. J. (2006) CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* **107**, 1761-1767.

Byrd J. C., Rai K., Peterson B. L., Appelbaum F. R., Morrison V. A., Kolitz J. E., Shepherd L., Hines J. D., Schiffer C. A., Larson R. A. (2005) Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011. *Blood* **105**, 49-53.

Calin G. A., Dumitru C. D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C. M. (2002) 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* **99**, 15524-15529.

Calin G. A., Ferracin M., Cimmino A., Di Leva G., Shimizu M., Wojcik S. E., Iorio M. V., Visone R., Sever N. I., Fabbri M., Iuliano R., Palumbo T., Pichiorri F., Roldo C., Garzon R., Sevignani C., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C. G., Kipps T. J., Negrini M., Croce C. M. (2005) A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **353**, 1793-1801.

Calin G. A., Liu C. G., Sevignani C., Ferracin M., Felli N., Dumitru C. D., Shimizu M., Cimmino A., Zupo S., Dono M., Dell'Aquila M. L., Alder H., Rassenti L., Kipps T. J., Bullrich F., Negrini M., Croce C. M. (2004a) MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11755-11760.

Calin G. A., Sevignani C., Dumitru C. D., Hyslop T., Noch E., Yendamuri S., Shimizu M., Rattan S., Bullrich F., Negrini M., Croce C. M. (2004b) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2999-3004.

Cimmino A., Calin G. A., Fabbri M., Iorio M. V., Ferracin M., Shimizu M., Wojcik S. E., Aqeilan R. I., Zupo S., Dono M., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C. G., Kipps T. J., Negrini M., Croce C. M. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13944-13949.

Cullen B. R. (2004) Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* **16**, 861-865.

Čihák A., Veselý J. (1978) Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on DNA synthesis in mouse lymphatic tissues. *Neoplasma* **25**, 385-393.

Deaglio S., Vaisitti T., Aydin S., Bergui L., D'Arena G., Bonello L., Omede P., Scatolini M., Jaksic O., Chiorino G., Efremov D., Malavasi F. (2007) CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* **110**, 4012-4021.

Deans J. P., Li H., Polyak M. J. (2002) CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology* **107**, 176-182.

Del Gaizo Moore V., Brown J. R., Certo M., Love T. M., Novina C. D., Letai A. (2007) Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest* **117**, 112-121.

Del Principe M. I., Del Poeta G., Buccisano F., Maurillo L., Venditti A., Zucchetto A., Marini R., Niscola P., Consalvo M. A., Mazzone C., Ottaviani L., Panetta P., Bruno A., Bomben R., Suppo G., Degan M., Gattei V., de Fabritiis P., Cantonetti M., Lo Coco F., Del Principe D., Amadori S. (2006) Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **108**, 853-861.

- Denli A. M., Tops B. B., Plasterk R. H., Ketting R. F., Hannon G. J. (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231-235.
- Dohner H., Pilz T., Fischer K., Cabot G., Diehl D., Fink T., Stilgenbauer S., Bentz M., Lichter P. (1994) Molecular cytogenetic analysis of RB-1 deletions in chronic B-cell leukemias. *Leuk Lymphoma* **16**, 97-103.
- Dong J. T., Boyd J. C., Frierson H. F., Jr. (2001) Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *Prostate* **49**, 166-171.
- Dvořák Z., Vrzal R., Pávek P., Ulrichová J. (2008) An evidence for regulatory cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor in HepG2 cells. *Physiol Res* **57**, 427-435.
- Eichhorst B. F., Busch R., Hopfinger G., Pasold R., Hensel M., Steinbrecher C., Siehl S., Jager U., Bergmann M., Stilgenbauer S., Schweighofer C., Wendtner C. M., Dohner H., Brittinger G., Emmerich B., Hallek M. (2006) Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **107**, 885-891.
- Esquela-Kerscher A., Slack F. J. (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 259-269.
- Etiemble J., Moroy T., Jacquemin E., Tiollais P., Buendia M. A. (1989) Fused transcripts of c-myc and a new cellular locus, hcr in a primary liver tumor. *Oncogene* **4**, 51-57.
- Fabbri M., Garzon R., Cimmino A., Liu Z., Zanesi N., Callegari E., Liu S., Alder H., Costinean S., Fernandez-Cymering C., Volinia S., Guler G., Morrison C. D., Chan K. K., Marcucci G., Calin G. A., Huebner K., Croce C. M. (2007) MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 15805-15810.
- Farazi T. A., Juranek S. A., Tuschl T. (2008) The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development* **135**, 1201-1214.
- Felekis K., Deltas C. (2006) RNA Interference: a powerful laboratory tool and its therapeutic implications. *Hippokratia* **10**, 112-115.
- Felekis K., Touvana E., Stefanou C., Deltas C. (2010) microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia* **14**, 236-240.
- Flynn J. M., Byrd J. C. (2000) Campath-1H monoclonal antibody therapy. *Curr Opin Oncol* **12**, 574-581.
- Fruchter O., Kino T., Zoumakis E., Alesci S., De Martino M., Chrousos G., Hochberg Z. (2005) The human glucocorticoid receptor (GR) isoform  $\beta$  differentially suppresses GR $\alpha$ -induced transactivation stimulated by synthetic glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 3505-3509.
- Garzon R., Liu S., Fabbri M., Liu Z., Heaphy C. E., Callegari E., Schwind S., Pang J., Yu J., Muthusamy N., Havelange V., Volinia S., Blum W., Rush L. J., Perrotti D., Andreeff M., Bloomfield C. D., Byrd J. C., Chan K., Wu L. C., Croce C. M., Marcucci G. (2009) 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* **113**, 6411-6418.

Ghia P., Guida G., Stella S., Gottardi D., Geuna M., Strola G., Scielzo C., Caligaris-Cappio F. (2003) The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood* **101**, 1262-1269.

Gobessi S., Laurenti L., Longo P. G., Carsetti L., Berno V., Sica S., Leone G., Efremov D. G. (2009) Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* **23**, 686-697.

Gobessi S., Laurenti L., Longo P. G., Sica S., Leone G., Efremov D. G. (2007) ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood* **109**, 2032-2039.

Griffiths-Jones S., Saini H. K., van Dongen S., Enright A. J. (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* **36**, D154-158.

Grillo-Lopez A. J., White C. A., Varns C., Shen D., Wei A., McClure A., Dallaire B. K. (1999) Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Semin Oncol* **26**, 66-73.

Hainsworth J. D., Greco F. A. (1995) Etoposide: twenty years later. *Ann Oncol* **6**, 325-341.

Hamblin T. J. (1997) Trisomy 12 in CLL revisited. *Leuk Res* **21**, 1025-1026.

Hamblin T. J., Davis Z., Gardiner A., Oscier D. G., Stevenson F. K. (1999) Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1848-1854.

Hamblin T. J., Orchard J. A., Gardiner A., Oscier D. G., Davis Z., Stevenson F. K. (2000) Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood* **95**, 2455-2457.

Hammond S. M. (2006) MicroRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 4-9.

Han L., Witmer P. D., Casey E., Valle D., Sukumar S. (2007) DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol Ther* **6**, 1284-1288.

Hanada M., Delia D., Aiello A., Stadtmauer E., Reed J. C. (1993) bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **82**, 1820-1828.

He L., Hannon G. J. (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* **5**, 522-531.

Herling M., Patel K. A., Khalili J., Schlette E., Kobayashi R., Medeiros L. J., Jones D. (2006) TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia* **20**, 280-285.

Hrčková Y., Šarapatková H., Lukl J. (2005) Vedlejší účinky amiodaronu. *Interni Med pro praxi* **6**, 288-290.

Huse J. T., Brennan C., Hambarzumyan D., Wee B., Pena J., Rouhanifard S. H., Sohn-Lee C., le Sage C., Agami R., Tuschl T., Holland E. C. (2009) The PTEN-regulating microRNA miR-

26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev* **23**, 1327-1337.

Chen K., Song F., Calin G. A., Wei Q., Hao X., Zhang W. (2008) Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. *Carcinogenesis* **29**, 1306-1311.

Chen L., Apgar J., Huynh L., Dicker F., Giago-McGahan T., Rassenti L., Weiss A., Kipps T. J. (2005a) ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **105**, 2036-2041.

Chen L., Widhopf G., Huynh L., Rassenti L., Rai K. R., Weiss A., Kipps T. J. (2002) Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **100**, 4609-4614.

Chen L., Willis S. N., Wei A., Smith B. J., Fletcher J. I., Hinds M. G., Colman P. M., Day C. L., Adams J. M., Huang D. C. (2005b) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* **17**, 393-403.

Chena C., Avalos J. S., Bezares R. F., Arrossagaray G., Turdo K., Bistmans A., Slavutsky I. (2008) Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies. *Eur J Haematol* **81**, 94-99.

Chiorazzi N., Rai K. R., Ferrarini M. (2005) Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **352**, 804-815.

Choudhuri S. (2010) Small noncoding RNAs: biogenesis, function, and emerging significance in toxicology. *J Biochem Mol Toxicol* **24**, 195-216.

Jemal A., Clegg L. X., Ward E., Ries L. A., Wu X., Jamison P. M., Wingo P. A., Howe H. L., Anderson R. N., Edwards B. K. (2004) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer* **101**, 3-27.

Jones P. A., Baylin S. B. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **3**, 415-428.

Jones P. A., Taylor S. M. (1980) Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* **20**, 85-93.

Keating M. J., O'Brien S., Albitar M., Lerner S., Plunkett W., Giles F., Andreeff M., Cortes J., Faderl S., Thomas D., Koller C., Wierda W., Detry M. A., Lynn A., Kantarjian H. (2005) Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* **23**, 4079-4088.

Kim Y. K., Kim V. N. (2007) Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* **26**, 775-783.

Kimura M., Moteki H., Ogihara M. (2011) Inhibitory effects of dexamethasone on hepatocyte growth factor-induced DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes. *J Pharmacol Sci* **115**, 390-398.

Kitada S., Andersen J., Akar S., Zapata J. M., Takayama S., Krajewski S., Wang H. G., Zhang X., Bullrich F., Croce C. M., Rai K., Hines J., Reed J. C. (1998) Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* **91**, 3379-3389.

Klein U., Lia M., Crespo M., Siegel R., Shen Q., Mo T., Ambesi-Impiombato A., Califano A., Migliazza A., Bhagat G., Dalla-Favera R. (2010) The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* **17**, 28-40.

Klein U., Tu Y., Stolovitzky G. A., Mattioli M., Cattoretti G., Husson H., Freedman A., Inghirami G., Cro L., Baldini L., Neri A., Califano A., Dalla-Favera R. (2001) Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* **194**, 1625-1638.

Kozák T. (2010a) Chemoterapie, radioterapie a chirurgická léčba v terapii chronické lymfocytární leukemie (CLL). *Transfuze Hematol dnes* **16**, 70-73.

Kozák T. (2010b) Prognostické faktory chronické lymfocytární leukemie. *Transfuze Hematol dnes* **16**, 56-61.

Krol J., Loedige I., Filipowicz W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* **11**, 597-610.

Krutzfeldt J., Rajewsky N., Braich R., Rajeev K. G., Tuschl T., Manoharan M., Stoffel M. (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* **438**, 685-689.

Kubienová L. (2009) Vliv hsa-miR-29 na toxicitu vybraných xenobiotik, Diplomová práce PřF UP.

Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854.

Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K. H., Lee S., Baek S. H., Kim V. N. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **23**, 4051-4060.

Lehmann U., Hasemeier B., Christgen M., Muller M., Romermann D., Langer F., Kreipe H. (2008) Epigenetic inactivation of microRNA gene *hsa-mir-9-1* in human breast cancer. *J Pathol* **214**, 17-24.

Lewis B. P., Burge C. B., Bartel D. P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15-20.

Liu X., Fortin K., Mourelatos Z. (2008) MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol* **18**, 113-121.

Lu M., Zhang Q., Deng M., Miao J., Guo Y., Gao W., Cui Q. (2008) An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS One* **3**, e3420.

Malčíková J., Šmardová J., Peková S., Cejková S., Kotasková J., Tichý B., Francová H., Doubek M., Brychtová Y., Janek D., Pospíšilová S., Mayer J., Dvořáková D., Trbusek M. (2008) Identification of somatic hypermutations in the TP53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mol Immunol* **45**, 1525-1529.

Malčíková J., Šmardová J., Rocnová L., Tichý B., Kuglik P., Vránová V., Čejková S., Svitáková M., Skuhrová Francová H., Brychtová Y., Doubek M., Brejcha M., Klabusay M., Mayer J., Pospíšilová S., Trbusek M. (2009) Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* **114**, 5307-5314.

Mavrakis K. J., Wolfe A. L., Oricchio E., Palomero T., de Keersmaecker K., McJunkin K., Zuber J., James T., Khan A. A., Leslie C. S., Parker J. S., Paddison P. J., Tam W., Ferrando A., Wendel H. G. (2010) Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Cell Biol* **12**, 372-379.

Mayer J., Starý J. (2002) Leukemie, pp. 314-335, GRADA Publishing, Praha, ČR.

Menon M. P., Khan A. (2009) Micro-RNAs in thyroid neoplasms: molecular, diagnostic and therapeutic implications. *J Clin Pathol* **62**, 978-985.

Merkel O., Asslaber D., Pinon J. D., Egle A., Greil R. (2010) Interdependent regulation of p53 and miR-34a in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Cycle* **9**, 2764-2768.

Molica S. (2006) Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma* **47**, 1477-1480.

Molica S., Brugiattelli M., Callea V., Morabito F., Levato D., Nobile F., Alberti A. (1994) Comparison of younger versus older B-cell chronic lymphocytic leukemia patients for clinical presentation and prognosis. A retrospective study of 53 cases. *Eur J Haematol* **52**, 216-221.

Mott J. L., Kobayashi S., Bronk S. F., Gores G. J. (2007) mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* **26**, 6133-6140.

Mráz M., Pavlová Š., Malčíková J., Plevová K., Mayer J., Pospíšilová Š. (2010a) Molekulární patogeneze chronické lymfocytární leukemie. *Transfúze Hematol dnes* **16**, 16-20.

Mráz M., Pospíšilová Š., Mayer J. (2010b) MicroRNA v patogenezi chronické lymfocytární leukemie a jejich prognostický význam. *transfúze Hematol dnes* **16**, 33-35.

Murray F., Darzentas N., Hadzidimitriou A., Tobin G., Boudjogra M., Scielzo C., Laoutaris N., Karlsson K., Baran-Marzsak F., Tsaftaris A., Moreno C., Anagnostopoulos A., Caligaris-Cappio F., Vaur D., Ouzounis C., Belessi C., Ghia P., Davi F., Rosenquist R., Stamatopoulos K. (2008) Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* **111**, 1524-1533.

Nihiro H., Clark E. A. (2002) Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* **2**, 945-956.

Nilsen H., An Q., Lindahl T. (2005) Mutation frequencies and AID activation state in B-cell lymphomas from Ung-deficient mice. *Oncogene* **24**, 3063-3066.

Opferman J. T., Letai A., Beard C., Sorcinelli M. D., Ong C. C., Korsmeyer S. J. (2003) Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* **426**, 671-676.

Panovská A., Doubek M., Brychtová Y., Mayer J. (2010) Chronic lymphocytic leukemia and focusing on epidemiology and management in everyday hematologic practice: recent data from the Czech Leukemia Study Group for Life (CELL). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **10**, 297-300.

Papajík T., Urbanová R., Procházka V. (2010) Monoklonální protilátky v léčbě chronické lymfocytární leukemie. *Transfúze Hematol dnes* **16**, 74-80.

Pasquinelli A. E., Reinhart B. J., Slack F., Martindale M. Q., Kuroda M. I., Maller B., Hayward D. C., Ball E. E., Degan B., Muller P., Spring J., Srinivasan A., Fishman M., Finnerty J., Corbo J., Levine M., Leahy P., Davidson E., Ruvkun G. (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**, 86-89.

Pekarsky Y., Croce C. M. (2010) Is miR-29 an oncogene or tumor suppressor in CLL? *Oncotarget* **1**, 224-227.

Pekarsky Y., Palamarchuk A., Maximov V., Efanov A., Nazaryan N., Santanam U., Rassenti L., Kipps T., Croce C. M. (2008) Tcl1 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 19643-19648.

Pekarsky Y., Santanam U., Cimmino A., Palamarchuk A., Efanov A., Maximov V., Volinia S., Alder H., Liu C. G., Rassenti L., Calin G. A., Hagan J. P., Kipps T., Croce C. M. (2006) Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* **66**, 11590-11593.

Pettitt A. R., Sherrington P. D., Stewart G., Cawley J. C., Taylor A. M., Stankovic T. (2001) p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood* **98**, 814-822.

Pfaffl M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.

Pleyer L., Egle A., Hartmann T. N., Greil R. (2009) Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol* **6**, 405-418.

Rassenti L. Z., Kipps T. J. (2000) Expression of Ig-beta (CD79b) by chronic lymphocytic leukemia B cells that lack immunoglobulin heavy-chain allelic exclusion. *Blood* **95**, 2725-2727.

Redaelli A., Laskin B. L., Stephens J. M., Botteman M. F., Pashos C. L. (2004) The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (Engl)* **13**, 279-287.

Reinhart B. J., Slack F. J., Basson M., Pasquinelli A. E., Bettinger J. C., Rougvie A. E., Horvitz H. R., Ruvkun G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901-906.

Robak T., Blonski J. Z., Gora-Tybor J., Jamrozak K., Dwilewicz-Trojaczek J., Tomaszewska A., Konopka L., Ceglarek B., Dmoszynska A., Kowal M., Kloczko J., Stella-Holowiecka B., Sulek K., Calbecka M., Zawilska K., Kuliczowski K., Skotnicki A. B., Warzocha K., Kasznicki M. (2006) Cladribine alone and in combination with cyclophosphamide or cyclophosphamide plus mitoxantrone in the treatment of progressive chronic lymphocytic leukemia: report of a prospective, multicenter, randomized trial of the Polish Adult Leukemia Group (PALG CLL2). *Blood* **108**, 473-479.

Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J. L., Bradley A. (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* **14**, 1902-1910.

Roue G., Lopez-Guerra M., Milpied P., Perez-Galan P., Villamor N., Montserrat E., Campo E., Colomer D. (2008) Bendamustine is effective in p53-deficient B-cell neoplasms and requires oxidative stress and caspase-independent signaling. *Clin Cancer Res* **14**, 6907-6915.

- Santanam U., Zanesi N., Efanov A., Costinean S., Palamarchuk A., Hagan J. P., Volinia S., Alder H., Rassenti L., Kipps T., Croce C. M., Pekarsky Y. (2010) Chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted miR-29 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12210-12215.
- Scielzo C., Camporeale A., Geuna M., Alessio M., Poggi A., Zocchi M. R., Chilosi M., Caligaris-Cappio F., Ghia P. (2006) ZAP-70 is expressed by normal and malignant human B-cell subsets of different maturational stage. *Leukemia* **20**, 689-695.
- Severin I., Padieu M., Lhuguenot J. C., Chagnon M. C. (2003) Toxic interaction between hydroxyurea and 1-beta-D-arabino-furanosylcytosine on the DNA of a human hepatoma cell line (HEPG2). *Toxicol Lett* **145**, 303-311.
- Shanafelt T. D., Geyer S. M., Kay N. E. (2004) Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* **103**, 1202-1210.
- Sieuwerts A. M., Klijn J. G., Peters H. A., Foekens J. A. (1995) 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* **33**, 813-823.
- Slabý O., Krekáč D., Hrstka R., Svoboda M., Vyzula R. (2008) Involvement of microRNAs in cancer biology and possibilities of their application to diagnostic and predictive oncology. *Cas Lek Cesk* **147**, 25-31.
- Smolej L. (2010) Význam mikroprostředí u chronické lymfocytární leukemie. *Transfuzie Hematol dnes* **16**, 24-28.
- Soriano A. O., Yang H., Faderl S., Estrov Z., Giles F., Ravandi F., Cortes J., Wierda W. G., Ouzounian S., Quezada A., Pierce S., Estey E. H., Issa J. P., Kantarjian H. M., Garcia-Manero G. (2007) Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* **110**, 2302-2308.
- Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K., Tomida S., Osada H., Endoh H., Harano T., Yatabe Y., Nagino M., Nimura Y., Mitsudomi T., Takahashi T. (2004) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* **64**, 3753-3756.
- Tam C. S., O'Brien S., Wierda W., Kantarjian H., Wen S., Do K. A., Thomas D. A., Cortes J., Lerner S., Keating M. J. (2008) Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **112**, 975-980.
- Thomas A., El Roubi S., Reed J. C., Krajewski S., Silber R., Potmesil M., Newcomb E. W. (1996) Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene* **12**, 1055-1062.
- Tiscornia G., Izpisua Belmonte J. C. (2010) MicroRNAs in embryonic stem cell function and fate. *Genes Dev* **24**, 2732-2741.
- Toyota M., Kopecky K. J., Toyota M. O., Jair K. W., Willman C. L., Issa J. P. (2001) Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* **97**, 2823-2829.

Válková V., Cetkovský P. (2010) Současná role transplantace hematopoetických kmenových buněk v léčbě chronické lymfocytární leukemie. *transfuze Hematol dnes* **16**, 81-87.

von Bergwelt-Baildon M., Maecker B., Schultze J., Gribben J. G. (2004) CD40 activation: potential for specific immunotherapy in B-CLL. *Ann Oncol* **15**, 853-857.

Wienholds E., Plasterk R. H. (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* **579**, 5911-5922.

Wiersinga W. M. (2008) The role of thyroid hormone nuclear receptors in the heart: evidence from pharmacological approaches. *Heart Fail Rev* **15**, 121-124.

Yan X. J., Albesiano E., Zanesi N., Yancopoulos S., Sawyer A., Romano E., Petlickovski A., Efremov D. G., Croce C. M., Chiorazzi N. (2006) B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11713-11718.

Ying S. Y., Lin S. L. (2006) Current perspectives in intronic micro RNAs (miRNAs). *J Biomed Sci* **13**, 5-15.

Yu A. M. (2009) Role of microRNAs in the regulation of drug metabolism and disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **5**, 1513-1528.

Zenz T., Krober A., Scherer K., Habe S., Buhler A., Benner A., Denzel T., Winkler D., Edelmann J., Schwanen C., Dohner H., Stilgenbauer S. (2008) Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* **112**, 3322-3329.

Zhao J. J., Lin J., Lwin T., Yang H., Guo J., Kong W., Dessureault S., Moscinski L. C., Rezaia D., Dalton W. S., Sotomayor E., Tao J., Cheng J. Q. (2010) microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood* **115**, 2630-2639.

Zucchetto A., Benedetti D., Tripodo C., Bomben R., Dal Bo M., Marconi D., Bossi F., Lorenzon D., Degan M., Rossi F. M., Rossi D., Bulian P., Franco V., Del Poeta G., Deaglio S., Gaidano G., Tedesco F., Malavasi F., Gattei V. (2009) CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* **69**, 4001-4009.

Zupo S., Isnardi L., Megna M., Massara R., Malavasi F., Dono M., Cosulich E., Ferrarini M. (1996) CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood* **88**, 1365-1374.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|        |                                                                             |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------|
| AID    | aktivací indukovaná cytidin deaminasa                                       |
| AKT    | serin/threonin protein kinasa                                               |
| AML    | akutní myeloidní leukemie                                                   |
| ANOVA  | statistika - analýza rozptylu                                               |
| ATM    | kinasa aktivující p53                                                       |
| Bak    | pro-apoptotický protein                                                     |
| Bax    | pro-apoptotický protein                                                     |
| Bcl-2  | rodina apoptotických regulátorů/anti-apoptotický protein (B-cell lymphoma2) |
| BCL6   | gen pro transkripční faktor, (B-cell lymphoma 6)                            |
| B-CLL  | chronická B-lymfocytární leukemie                                           |
| BCR    | B-buněčný receptor                                                          |
| bFGF   | bazický růstový faktor pro fibroblasty                                      |
| Bid    | pro-apoptotický protein                                                     |
| Bik    | pro-apoptotický protein                                                     |
| Bim    | pro-apoptotický protein                                                     |
| CC     | kombinace kladribin, cyklofosamid                                           |
| CCM    | kombinace kladribin, cyklofosamid, mitoxantron                              |
| CCND1  | cyklin D1                                                                   |
| CD..   | povrchový antigen                                                           |
| CD49d  | povrchová adhezní molekula ligand VCAM-1                                    |
| CDK    | cyklin dependentí kinasa                                                    |
| cDNA   | komplementární DNA                                                          |
| CLL    | chronická lymfocytární leukemie                                             |
| CML    | chronická myeloidní leukemie                                                |
| C-MYC  | gen pro transkripční faktor                                                 |
| CNS    | centrální nervová soustava                                                  |
| COP    | kombinace vinkristin, cyklofosamid, prednison                               |
| CXC4R  | receptor B-lymfocytů CLL                                                    |
| CXCL12 | ligand CXC4R                                                                |
| DAPK1  | smrt asociující protein kinasa 1                                            |
| DGCR8  | DiGeorge syndrom kritická oblast genu 8                                     |
| DLBCL  | difuzní velkobuněčný lymfom                                                 |
| DLEU2  | delece v lymfocytární leukemii 2                                            |
| DMEM   | Dulbeccovo modifikované Eagle medium                                        |
| DMSO   | dimethylsulfoxid                                                            |
| DNMT   | DNA methyltransferasa                                                       |
| DNMT1  | DNA methyltransferasa 1                                                     |
| DNMT3A | DNA methyltransferasa 3A                                                    |
| DNMT3B | DNA methyltransferasa 3B                                                    |
| dNTP   | deoxyribonukleotidtrifosfát                                                 |
| dsRBD  | dvouvláknová RNA vazebná doména                                             |
| dsRNA  | dvouvláknová RNA                                                            |
| EDTA   | ethylendiamintetraoctová kyselina                                           |
| ERK    | extracelulárním signálem regulovaná kinasa                                  |

|                  |                                                                        |
|------------------|------------------------------------------------------------------------|
| FC               | kombinace fludarabin, cyklofosfamid                                    |
| Fc               | receptor buněk imunitního systému                                      |
| FHIT             | nádorový supresor                                                      |
| FMC7             | monoklonální protilátka detekující CD20                                |
| GR               | glukokortikoidní receptor                                              |
| HCDR3            | komplementární oblast těžkého řetězce 3                                |
| HeLa             | buněčná linie odvozená od karcinomu děložního hrdla                    |
| HepG2            | buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu                  |
| hnRNP A1         | heterogenní jaderný ribonukleoprotein                                  |
| CHOP             | kombinace vinkristin, adriamycin, cyklofosfamid, prednison s akronymem |
| IC <sub>50</sub> | koncentrace způsobující toxicitu 50 % buněk                            |
| IgE, M, D        | imunoglobulin E, M, D                                                  |
| IgVH             | variabilní oblast těžkého řetězce B-buněčného receptoru                |
| LAK              | aktivované NK buňky                                                    |
| LDH              | laktátdehydrogenasa                                                    |
| LDT              | zdvojovací čas lymfocytů                                               |
| LNA              | blokátor nukleové kyseliny                                             |
| Lyn              | tyrosin kinasa exprimovaná na hematopoetických buňkách                 |
| M                | mutovaný                                                               |
| MAPK             | mitogenem aktivovaná protein kinasa                                    |
| MBL              | monoklonální B-lymfocytosa                                             |
| MCL              | lymfom z plášťových buněk                                              |
| Mcl-1            | anti-apoptotický protein (myeloid cell leukemia 1)                     |
| MDM-2            | inhibitor p53                                                          |
| MDR              | minimální deletovaný oblast                                            |
| MEM              | Minimum Essential Medium                                               |
| MID              | doména rozpoznávající 5' konec RNA                                     |
| miRNA            | mikroRNA                                                               |
| MMP-9            | matrix metaloproteinasy 9                                              |
| MRE              | miRNA rozpoznávací prvek                                               |
| MTT              | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid             |
| MYC              | transkripční faktor                                                    |
| NF-κB            | jaderný faktoru kappa B                                                |
| NK               | natural killer - přirozný zabíječ buněk                                |
| Noxa             | pro-apoptotický protein                                                |
| ORF              | otevřený čtecí rámec                                                   |
| p53              | nádorový supresor                                                      |
| p68              | RNA helikasa                                                           |
| p72              | RNA helikasa                                                           |
| PAZ              | doména rozpoznávající přesahující konce RNA                            |
| PBS              | fyzilogický roztok upravený fosfátem na pH 7,4                         |
| PCR              | polynukleasová řetězová reakce                                         |
| PI3K             | fosfatidylinositol-3-kinasa                                            |
| PIP <sub>3</sub> | fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát                                     |
| PIWI             | RNasa H endonukleasová doména                                          |
| PKC              | protein kinasa C                                                       |

|             |                                                          |
|-------------|----------------------------------------------------------|
| PLC         | fosfolipasa C                                            |
| PolymiRTS   | database polymorfismů miRNA cílových genů                |
| Puma        | pro-apoptotický protein                                  |
| Ran-GAP     | jaderný protein příbuzný RAS-aktivační protein GTP       |
| Ran-GDP     | jaderný protein příbuzný RAS-guanosindifosfát            |
| Ran-GTP     | jaderný protein příbuzný RAS-guanosintrifosfát           |
| RAS         | signální molekula, GTPasa                                |
| RISC        | komplex indukující tlumení RNA                           |
| RNP         | ribonukleoprotein                                        |
| RNU6B       | malá jaderná RNA U6                                      |
| RT          | reverzní transkripce                                     |
| RU486       | mifepriston                                              |
| SD          | směrodatná odchylka                                      |
| siRNA       | syntetická pre-miRNA                                     |
| SNP         | jednonukleotidové polymorfismy                           |
| Sp1         | aktivátor DNMT1                                          |
| ssRNA       | jednovláknová RNA                                        |
| Syk         | tyrosin kinasa, signální molekula hematopoetických buněk |
| Tcl-1       | proto-onkogen (T cell lymphoma 1)                        |
| TGF $\beta$ | transformující růstový faktor $\beta$                    |
| TK          | thymidinkinasa                                           |
| TRAIL       | apoptosu indukující ligand                               |
| U6 snRNA    | malá jaderná RNA U6                                      |
| UM          | nemutovaný                                               |
| UT          | neošetřené buňky                                         |
| UTR         | netranslatovaná oblast RNA                               |
| VCAM-1      | adhezní molekula 1 cévních buněk                         |
| VEGF        | cévní endotelový růstový faktor                          |
| WNT3A       | Winglessův typ protein 3A                                |
| WWOX        | nádorový supresor                                        |
| ZAP-70      | 70-kDa zeta-asociovaný protein                           |
| $\beta_2$ M | $\beta_2$ mikroglobulin                                  |