

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Tereza Kaslová

Úloha specifických miRNA v regulaci apoptózy během fyziologických a patofyziologických procesů v CNS.

The role of a specific miRNAs in the regulation of apoptosis during physiological and pathophysiological processes in the CNS

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Nataliya Romanyuk, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22. 4, 2023

Tereza Kaslová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Nataliyi Romanyuk, Ph.D. za cenné rady, vstřícný přístup a veškerý čas a ochotu při vedení mé bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala své rodině, blízkým a přátelům, že to se mnou vydrželi a byli mi oporou. Děkuji.

Abstrakt

MicroRNA jsou malá nekódující RNA o velikosti 20 až 24 nukleotidů, která jsou svou vazbou na mRNA schopna posttranskripčně regulovat genovou expresi. Tato práce se zabývá tím, jak tyto microRNA vznikají a jakým způsobem jsou schopna regulace na úrovni proteinů účastnících se programované buněčné smrti – apoptózy. Jakými mechanismy k apoptóze dochází, jaké proteiny se jí účastní a jakým změnám buňka podléhá, je dále předmětem této práce. Přesný vliv této posttranskripční regulace je představen na vybraných microRNA, která ovlivňují apoptózu v rámci vývoje centrální nervové soustavy, a také během a následkem neurodegenerativních onemocnění a poškozeních, která ji mohou postihnout. V neposlední řadě také představí využití microRNA jako potenciálních biomarkerů díky změnám v jejich hladinách, které se pojí s různými onemocněními, a také jako přímých terapeutických cílů.

Klíčová slova

Apoptóza, microRNA, buněčná smrt, centrální nervový systém, neurodegenerativní onemocnění, regulace genové expres

Abstract

MicroRNAs are small non-coding RNAs of 20 to 24 nucleotides in size that are able to post-transcriptionally regulate gene expression by binding to mRNA. This paper focuses on how these microRNAs are generated and how they are able to regulate at the level of proteins involved in programmed cell death - apoptosis. By what mechanisms apoptosis occurs, what proteins are involved and what changes the cell undergoes are further discussed in this thesis. The precise influence of this post-transcriptional regulation is presented by using selected microRNAs that influence apoptosis during the development of the central nervous system, as well as during and as a consequence of the neurodegenerative diseases and damage that can affect it. Finally, it will also introduce the use of microRNAs as potential biomarkers, due to changes in their levels associated with various diseases, and as direct therapeutic targets.

Keywords

Apoptosis, microRNA, cell death, central nervous system, neurodegenerative diseases, gene expression regulation

Seznam použitých zkratek

3'UTR	nepřekládaná oblast na 3' konci mRNA (untranslated region)
Apaf-1	faktor aktivující apoptotické proteázy 1 (apoptotic protease activating factor 1)
APC	anafázi podporující komplex (anaphase promoting complex)
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
AXIN1	protein regulující Wnt signalizační dráhu (axis inhibition protein 1)
Bad	proapoptotický protein rodiny Bcl-2 (Bcl-2-associated death promoter)
Bak	proapoptotický protein rodiny Bcl-2 (Bcl-2 homologous antagonist killer)
Bax	proapoptotický protein rodiny Bcl-2 (Bcl-2-associated X protein)
Bcl-2	antiapoptotický protein dávající jméno proteinové rodině Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukaemia 2 protein)
Bcl2L2	antiapoptotický protein rodiny Bcl-2 (Bcl-2-like protein 2)
Bcl-w	antiapoptotický protein rodiny Bcl-2 (Bcl-2-like protein 2)
Bcl-x_L	antiapoptotický protein rodiny Bcl-2 (B-cell lymphoma extra large)
Bid	proapoptotický protein rodiny Bcl-2 (BH3-interacting domain death agonist)
Bim	proapoptotický protein rodiny Bcl-2 (Bcl-2-like protein 11)
CARD doména	proteinová doména vyskytující se u kaspáz (caspase recruitment domain)
Cdh1	adaptorový protein pro APC v buněčném cyklu (cdc20 homolog 1)
dATP	deoxyadenosintrifosfát (deoxyadenosine triphosphate)
DED doména	proteinová doména vyskytující se u kaspáz (death effector domain)
DGCR8	podjednotka enzymatického komplexu (DiGeorge syndrome critical region 8)
DISC	signalizační komplex účastnící se apoptózy (death-inducing signalling complex)
FADD/MORT1	adaptorový protein (Fas-associated death domain protein)
FoxO3a	transkripční faktor schopný aktivace apoptózy (forkhead box class O 3a)

GRASP65	protein účastnící se apoptózy endoplasmatického retikula (Golgi reassembly-stacking protein of 65 kDa)
GTP	guanosintrifosfát (guanosine triphosphate)
Hsp70	typ chaperonu (heat shock protein 70)
HtrA2/Omi	serinová proteáza účastnící se apoptózy (HTRA serine peptidase 2)
JAK/STAT3	signalizační dráha (Janus kinase 1/signal transducer and activator of transcription 3)
Mcl-1	antiapoptotický protein rodiny Bcl-2 (myeloid cell leukaemia sequence 1)
mRNA	mediátorová RNA vznikající RNA polymerázou (messenger RNA)
Ngn1	transkripční faktor neurogenin 1
Ngn2	transkripční faktor neurogenin 2
NK buňky	buňky imunitního systému (natural killer cells)
PDCD4	protein hrající roli v apoptóze (programmed cell death protein 4)
PIDD	součást proteinového komplexu aktivující kaspázu-2 (p53-induced protein with death domain)
Piwi	regulační proteiny v diferenciaci kmenových/zárodečných buněk
PP1CA	fosfatáza (serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit)
pre-miRNA	prekurzorová miRNA
pri-miRNA	primární miRNA
PTEN	fosfatáza regulována miR-21 (phosphatase and tensin homolog)
Puma	proapoptotický protein rodiny Bcl-2 (p53-upregulated modulator of apoptosis)
RAID	součást proteinového komplexu aktivující kaspázu-2 (RIP-associated ICH1 / CED3-homologous protein with death domain)
RISC	komplex proteinů se sncRNA (RNA-induced silencing complex)
RNáza III	ribonukleáza působící na dvouvláknovou RNA

Smac/DIABLO	mitochondriální protein účastnící se apoptózy (second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein of low PI)
Tau	protein vážící mikrotubuly (tubulin-associated unit)
TNF receptor	buněčný receptor (tumour necrosis factor receptor)
TRAIL-R1	membránový receptor (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1)
TRAIL-R2	membránový receptor (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2)
Trp35inp1	protein aktivovaný proteinem p53 (tumor protein p53-inducible nuclear protein 1)
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
XIAP	protein inhibující kaspázy (X-linked inhibitor of apoptosis protein)

Obsah

1. ÚVOD	1
2. APOPTÓZA	1
2.1 KASPÁZY.....	2
2.1.1 Iniciační kaspázy	3
2.1.2 Efektorové kaspázy	4
2.2 AKTIVACE APOPTÓZY	5
2.2.1 Vnitřní dráha	5
2.2.2 Vnější dráha.....	6
2.2.3 Dráha s využitím granzymu-B	7
3. NEKÓDUJÍCÍ RNA	7
4. MICRORNA	8
4.1 FUNKCE.....	8
4.2 HISTORIE.....	9
4.3 BIOGENEZE.....	9
5. MICRORNA REGULUJÍCÍ APOPTÓZU V CNS	10
5.1 miR – 20A	11
5.2 miR-21	12
5.3 miR-29B.....	13
5.4 miR-34A.....	14
5.5 miR-128.....	14
5.6 miR-355-5p.....	15
5.7 miR-125B.....	15
5.8 miR-124.....	15
5.9 miR-24A.....	16
5.10 miR-9	17
6. VYUŽITÍ MICRORNA	17
7. ZÁVĚR	18
8. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	20

1. Úvod

Poškození centrální nervové soustavy jsou vůbec jednou z nejčastějších příčin úmrtí. I případy, které nejsou přímo fatální, s sebou často nesou trvalé následky mající dopad na kvalitu života. Zdraví naší centrální nervové soustavy a všeho s ní spojeného je důležité do co nejvyššího věku. Stejně důležitý je i její zdárný ontogenetický vývoj. Během těchto procesů hraje roli programovaná buněčná smrt – apoptóza a skupina malých nekódujících RNA – microRNA.

Tato práce se v první části zabývá nastíněním, co to je a jak funguje apoptóza. Toto téma by pro svou komplexnost dalo na celou samostatnou práci. Zde na ní tedy bude nahlíženo poměrně obecně tak, aby bylo čtenáři umožněno pochopit základní princip a následně získat porozumění o jejím vlivu v centrální nervové soustavě ve spojitosti s microRNA. Ta v posledních letech dostávají velkou pozornost ze strany vědecké obce, a to právě díky jejich účasti v mnoha buněčných procesech, od vývoje až po nejruznější onemocnění. Velký význam je jim dáván v rámci studia rakoviny, kde je jejich role mnohokrát prokázána a neustále zkoumaná.

Následně bude představen mechanismus, jak dochází ke vzniku microRNA a jakým mechanismem jsou schopna posttranskripčně regulovat genovou expresi. K tomu bylo vybráno 10 konkrétních microRNA účastnících se procesů, během nichž k programované buněčné smrti dochází. Takovým procesem je už samotný vývoj centrální nervové soustavy, ale také nejruznější patologie jako například míšní poranění, následky cévní mozkové příhody či neurodegenerativní onemocnění. Závěrem bude nastíněno jejich využití jako potenciální terapie a biomarkery pro jinak těžko detekovaná onemocnění.

2. Apoptóza

Apoptóza je jedním z nejnáměšších procesů programované buněčné smrti. Jedná se o komplexní a striktně regulovaný proces, který je zásadní pro běžnou obnovu buněk, stárnutí, embryonální vývoj či správnou funkci imunitního systému (Elmore, 2007). Spouštěčem apoptózy mohou být nejruznější stimuly pocházející z vnějšího či vnitřního prostředí buňky, jako jsou na příklad toxiny, jedy, viry, reaktivní kyslíkové radikály, radiace či nedostatek růstových faktorů (D'Arcy, 2019). Problém nastává v případech, kdy je regulace apoptózy jakýmkoliv způsobem narušena či zastavena. Poruchy apoptózy jsou podstatným faktorem v mnoha neurodegenerativních onemocněních, autoimunitních onemocněních či u některých druhů rakoviny (Elmore, 2007).

K apoptóze dochází u všech mnohobuněčných eukaryot (Kaczanowski, 2016). U jednobuněčných organismů, jako jsou na příklad parazitičtí prvoci rodů *Leishmania* a *Trypanosoma*, bylo pozorováno regulované odumírání buněk nápadně připomínající apoptózu. Tento mechanismus však nepodléhá tak rigidní regulaci, jako je tomu u mnohobuněčných organismů, a zdá se, že je alespoň

částečně náhodný (Proto et al., 2013). Další výzkum, jak přesně k umírání buněk u těchto parazitů dochází by se mohl projevit jako zajímavý terapeutický cíl.

Tato práce bude zmiňovat jen a pouze mechanismy programované buněčné smrti u mnohobuněčných, které byly a jsou intenzivně zkoumány. Zde se jedná o komplexní proces skládající se z několika kroků, který je regulován systémem antiapoptotických a proapoptotických proteinů, které samy podléhají dalším regulačním mechanismům.

Typickým fenotypovým projevem buňky procházející apoptózou je postupné snižování jejího objemu. Současně dochází k unikání cytochromu c z mitochondrií. Díky tomu dochází k následné aktivaci několika druhů kaspáz. Zároveň se v buňce fragmentuje DNA a kondenzuje chromatin (Proto et al., 2013). Mimo fragmentaci mitochondrií a jádra dochází v menší míře k fragmentaci dalších organel jako je endoplasmatické retikulum a Golgiho aparát (Proto et al., 2013). Například u Golgiho aparátu dochází ke štěpení specifického proteinu GRASP65, který je esenciální pro organizaci jednotlivých vezikulů aparátu, kaspázou-3. Očekává se, že tento protein není v Golgiho aparátu jediným, který prochází změnami během apoptózy, a s největší pravděpodobností účinkuje v tomto mechanismu více potenciálních aktérů (Lane et al., 2002).

Aktivované kaspázy mění proteiny cytoskeletu, což vede ke změnám plasmatické membrány, které jsou v anglické literatuře nazývány jako *blebbing*. Jde o tvorbu asymetrických výrůstků, které na svém povrchu prezentují fosfolipid fosfatidylserin sloužící jako signál pro fagocyty (Proto et al., 2013). Tyto výrůstky se odškrcují a dávají za vznik apoptotickým tělíškům, která jsou následně fagocytována (Adrain & Martin, 2001). Právě z fragmentujících se mitochondrií uniká cytochrom c, který je za normálního stavu asociován s vnitřní mitochondriální membránou. Uniklý cytochrom c váže a aktivuje protein Apaf-1. Společně za přítomnosti ATP či dATP tvoří cytoplasmatický komplex zvaný apoptozom, jenž aktivuje ireverzibilní kaskádu kaspáz, počínajíc kaspázou-9 (Riedl & Salvesen, 2007).

Užitečným markerem pro identifikaci a kvantifikaci buněk vstupujících do procesu apoptózy je protein annexin V, který se v přítomnosti vápenatých iontů váže s vysokou afinitou k fosfatidylserinu, který se dostává v apoptotizujících buňkách na vnější stranu plasmatické membrány (Logue et al., 2009).

V následující části této kapitoly bude blíže představena funkce kaspáz a tři dráhy aktivace apoptózy – vnější dráha, vnitřní dráha a dráha využívající granzym-B, a také supramolekulární komplexy, které se během nich tvoří.

2.1 Kaspázy

Kaskádovitá aktivace kaspáz je výsledkem dále popsané vnitřní i vnější dráhy apoptózy. Některé druhy kaspáz, jako na příklad kaspáza-1, hrají důležitou roli během imunitní odpovědi. Za běžného stavu se tyto enzymy patřící do rodiny cysteinových proteáz vyskytují ve formě tak zvaných

zymogenů neboli prokaspáz (McIlwain et al., 2013) – tedy neaktivních prekurzorů enzymů. K jejich aktivaci dochází autoproteolýzou vlastních aspartátů. Aspartátový motiv je také místem, které je rozpoznáváno u všech dalších proteinů, které jsou kaspázami štěpeny (Creagh et al., 2003). Standardně dochází k rozdělení těch, které se účastní programované buněčné smrti na kaspázy iniciační a efektorové (Elmore, 2007).

2.1.1 Iniciační kaspázy

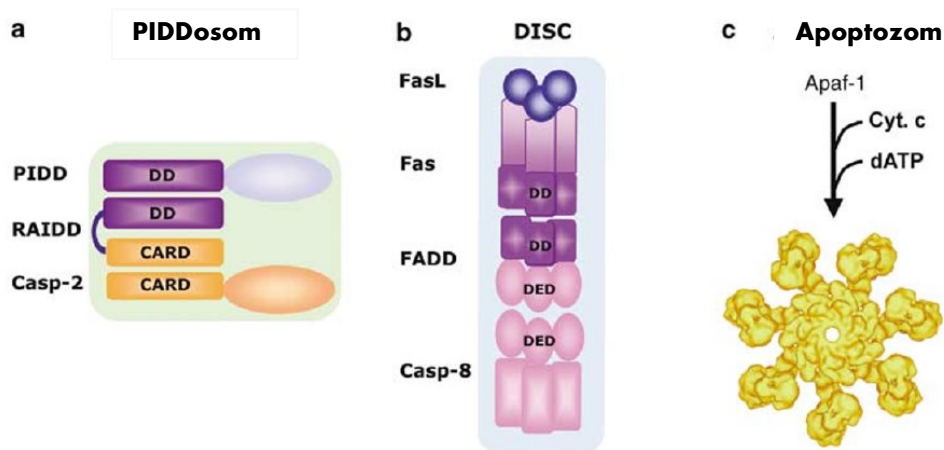
Iniciační kaspázy, jak už z názvu vyplývá, jsou první, které jsou aktivovány a které dále aktivují kaspázy efektorové dokonávající buněčnou smrt. Do této skupiny spadá kaspáza-2, kaspáza-8, kaspáza-9 a kaspáza-10 (Bao & Shi, 2007).

Typickým znakem této skupiny jsou specifické dlouhé domény na jejich N-koncích (Fuentes-Prior & Salvesen, 2004). Kaspáza-8 a kaspáza-10 se vyznačují přítomností DED domény, která těmto dvěma umožňuje interakci s adaptorovými proteiny obsahující domény smrti FADD/MORT1 a TRADD (Ernshaw et al., 1999). Proteiny s těmito doménami jsou aktivní při vnější dráze apoptózy (McIlwain et al., 2013). Kaspáza-2 a kaspáza-9 obsahují doménu CARD, díky níž interagují s dalšími kaspázami a jinými proteiny (Ernshaw et al., 1999).

K jejich aktivaci dochází složitým procesem za pomoci adaptorových proteinových komplexů, jako je na příklad již zmíněný apoptozom (Bao & Shi, 2007). Způsob, jakým apoptozom přímo aktivuje kaspázu-9, není do detailu prozkoumán. Je však známo, že indukuje dimerizaci monomerů prokaspázy do aktivní iniciační kaspázy. A to prostřednictvím interakce mezi CARD doménami prokaspázy a proteinu Apaf-1 (Chou et al., 1998) (viz. Obr. 1). Dimerizace je následovaná autokatalytickým štěpením, které zajišťuje stabilitu vzniklého dimeru (McIlwain et al., 2013).

U kaspázy-2 je tomu jinak než u zmíněné kaspázy-9. K její aktivaci dochází pomocí proteinového komplexu nazývaného PIDDosom (viz. Obr. 1). Tento se skládá ze samotné kaspázy, adaptorového proteinu RAIDD obsahujícího taktéž na svém N-konci obsahuje CARD doménu (Baliga et al., 2004), a proteinu PIDD obsahujícího doménu smrti, s níž kaspáza-2 interaguje pomocí své CARD domény. Takto aktivovaná kaspáza-2 hraje roli v apoptóze indukované buněčným stresem (Tinel & Tschopp, 2004).

V případě kaspázy-8 a kaspázy-10 (Walczak & Sprick, 2001) se setkáváme s dalším mechanismem aktivace, a to pomocí komplexu adaptorových proteinů zvaného DISC (Bao & Shi, 2007) (viz. Obr. 1). Jedná se o membránový komplex skládající se z receptoru Fas obsahujícího doménu smrti a patřícího do rodiny TNF receptorů. Na doménu smrti receptoru se pomocí vlastní domény smrti váže adaptorový protein FADD/MORT1. Ten obsahuje zároveň i doménu DED, díky níž váže prokaspázy (Walczak & Sprick, 2001), které se v tento moment mohou začít autokatalyticky štěpit (Martin, 2014).



Obr. 1: Komplexy adaptorových proteinů účastnící se aktivace iniciačních kaspáz: a) PIDDosom aktivující kaspázu-2, b) DISC komplex aktivující kaspázu-8, c) Apoptozom aktivující kaspázu-9; převzato a upraveno podle (Bao & Shi, 2007)

Mutace kaspázy-8 jsou asociovány s některými typy rakoviny, kterým je například neuroblastom. V tomto případě často dochází k delecím v genu pro kaspázu-8 či zabránění expresi výsledného enzymu, což představuje problém, jelikož právě tato kaspáza v neporušeném stavu aktivuje apoptózu rakovinných buněk neuroblastomu (Stupack et al., 2006). Nadto jsou podobné mutace spojovány i s dalšími typy rakovin jako je na příklad kolorektální karcinom či hepatocelulární karcinom (McIlwain et al., 2013). Stejně jako kaspáza-8 jsou s různými typy rakovin asociovány i defekty ostatních iniciátorových kaspáz (McIlwain et al., 2013).

2.1.2 Efektorové kaspázy

Efektorové kaspázy, mezi něž spadá kaspáza-3, kaspáza-6 a kaspáza-7 (Baliga et al., 2004), se na rozdíl od iniciačních žádnou specifickou doménou nevyznačují a jejich N-konce se od sebe liší v závislosti na jejich cílovém substrátu (Fuentes-Prior & Salvesen, 2004). Ve stavu prokaspáz se vyskytují jako neaktivní dimery, k jejichž aktivaci dochází díky štěpení iniciačními kaspázami (Baliga et al., 2004).

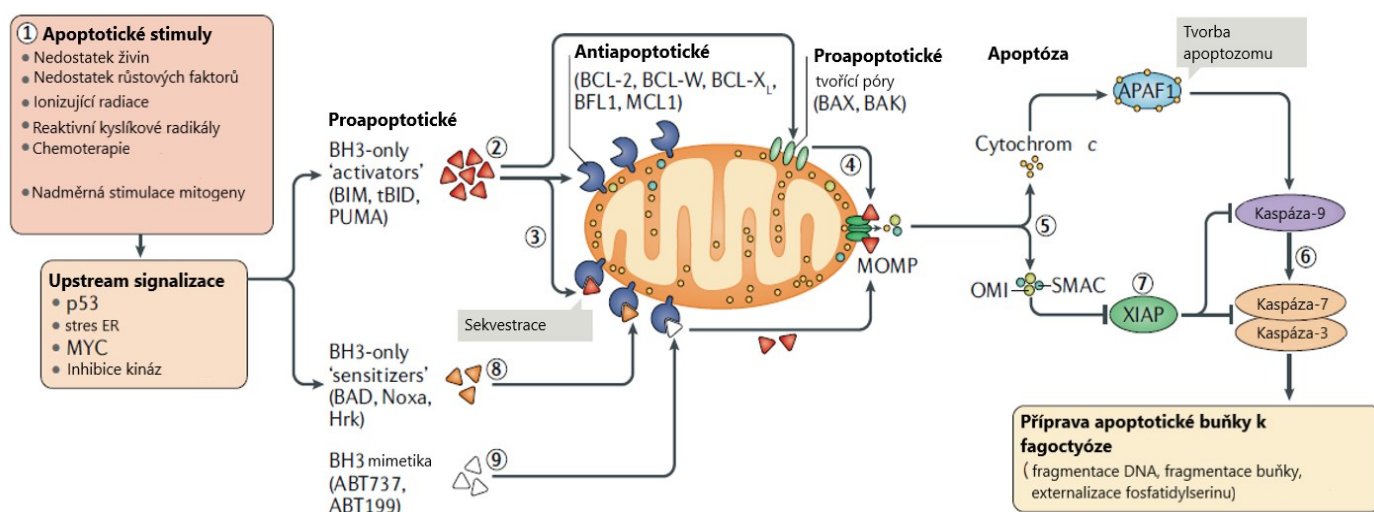
Mezi cílové substráty těchto kaspáz patří například proteiny účastnící se apoptózy, složky aktinového cytoskeletu, intermediárních filament, adhesních spojů, jaderné laminy, proteiny účastnící se opravy DNA, proteinkinázy či proteiny účastnící se buněčné signalizace a proliferace (Ernshaw et al., 1999). Stejně, jako je tomu u iniciačních kaspáz, jsou efektorové kaspázy a jejich deregulace spojovány s různými onemocněními (McIlwain et al., 2013). Jednou z takových je opět rakovina, kde může docházet buďto k narušení kaspázové aktivity či zvýšení koncentrace jejich inhibitorů. V takovém případě nedochází k dostatečné buněčné smrti nádorových buněk a onemocnění se dále rozvíjí (Philchenkov et al., 2004). Mimo rakovinu hrají kaspázy, primárně kaspáza-3, roli i v dalších

onemocněních jako je Alzheimerova choroba, u níž jsou spojovány se zvýšenou mírou apoptózy v mozku. Tím se stávají potenciálním terapeutickým cílem (Rohn & Head, 2009).

2.2 Aktivace apoptózy

2.2.1 Vnitřní dráha

Vnitřní dráha apoptózy (viz. Obr. 2), v některé literatuře se lze setkat i s označením mitochondriální (D'Arcy, 2019), je jednou ze tří možných apoptotických drah. Jak už z názvu vyplývá, jedná se o dráhu závislou právě na mitochondriích a signalizaci pomocí proapoptotických či antiapoptotických proteinů rodiny Bcl-2 (Singh et al., 2019). Ty reagují na signály pocházející z vnitřního prostředí buňky (Elmore, 2007). Mezi proapoptotické patří proteiny Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Puma a Noxa (Willis et al., 2005). Mezi antiapoptotické jsou řazeny proteiny Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 a další (Eskes et al., 2000).



Obr. 2: Schematické zobrazení vnitřní dráhy apoptózy; schéma zobrazuje možné spouštěče vnitřní dráhy apoptózy a následnou kaskádu proapoptotických a antiapoptotických proteinů vedoucí přes aktivaci kaspáz až k fagocytóze apoptotické buňky; převzato a upraveno podle (Singh et al., 2019)

Pro proteiny této rodiny jsou typické čtyři vysoce konzervované motivy zvané BH (BH1 -BH4), přičemž právě doména BH3 je typická pro ty proapoptotické (Adams & Cory, 1998). Klíčová pro regulaci apoptózy je jejich schopnost homodimerizace i heterodimerizace (Eskes et al., 1998). Tyto vazby jsou oním rozhodujícím krokem, zda buňka podstoupí apoptózu či nikoliv (Oltval et al., 1993). To si lze představit na příkladu proapoptotického proteinu Bax, který se v normální buňce nachází asociován s vnější mitochondriální membránou. Po signálu k apoptóze dochází k interakci s proteinem Bid, který indukuje homodimerizaci proteinu Bax, a tak může následně dojít k translokaci proapoptotického dimeru skrze mitochondriální membránu (Eskes et al., 2000). V té vytváří póry, čímž dochází k narušení membránového potenciálu (Eskes et al., 1998), a následné produkci reaktivních kyslíkových radikálů (Gross et al., 1998). Jak už bylo zmíněno, tyto proteiny mohou vytvářet

heterodimery i mezi proapoptotickými a antiapoptotickými členy této rodiny, a tím regulovat buněčný osud. Tak je tomu i v případě proteinu Bax, jehož dimerizace je inhibována antiapoptotickým Bcl-x_L (Eskes et al., 2000) nebo Bcl-2 (Gross et al., 1998). Za zmínku stojí i role proteinu Bax v případě apoptózy aktivované proteinem p53, jenž zvyšuje transkripci proteinu Bax, a tím ještě více směřuje osud buňky ke smrti (Toshiyuki & Reed, 1995).

Na dimerizaci je založena i funkce ostatních proteinů rodiny Bcl-2 (Oltval et al., 1993). Z mitochondrie se skrze póry dostává cytochrom c, jenž umožňuje konformační změnu Apaf-1 tak, že dojde k odhalení vazebných míst pro dATP či ATP a následně i CARD domény. Takový komplex je nazýván, jak už bylo zmiňováno, apoptozom, díky němuž následně dochází k aktivaci prvního kroku signalizační kaskády – prokaspázy-9, a to na základě již zmíněné interakce jejich CARD domén (Cain et al., 2002). Tato aktivace se zdá být regulována za pomoci chaperonu Hsp70, který má s největší pravděpodobností schopnost interakce právě s CARD doménou Apaf-1, čímž by bylo bráněno vazbě prokaspázy-9, a tím její aktivaci (Beere & Green, 2001). Kormě efluxu cytochromu c dochází i k uvolnění proteinu Smac/DIABLO a serinové proteázy HtrA2/Omi (Elmore, 2007).

Smac/DIABLO stejně jako HtrA2/Omi figuruje v regulaci apoptózy díky své schopnosti vázat pomocí specifických vazebných motivů cytoplasmatický protein XIAP inhibující svou vazbou aktivitu iniciační kaspázy-9 (Maas et al., 2010) a také efektorové kaspázy-3 a kaspázy-8 (Suzuki et al., 2001). Tyto dva proteiny jsou schopny uvolnit XIAP z kaspázy a umožnit tak jejich aktivaci a úspěšné dokončení vnitřní dráhy apoptózy (Suzuki et al., 2001).

2.2.2 Vnější dráha

Vnější apoptotická dráha, v některé literatuře označována také jako dráha receptorů smrti, reaguje na rozdíl od té vnitřní na stimuly pocházející z vnějšího prostředí buňky (D'Arcy, 2019). Za touto dráhou stojí receptory smrti jako je receptor Fas (v některé literatuře je využíváno alternativní označení CD95 či APO-1), TRAIL-R1 nebo TRAIL-R2 obsahující doménu smrti a patřící do proteinové rodiny TNF. Dále se s touto dráhou pojí také jim náležící specifické ligandy (Igney & Krammer, 2002) a adaptorové proteiny jako FADD/MORT1, TRADD nebo RIP (Sprick et al., 2000), které obsahují jak doménu smrti pro interakci s receptory, tak domény DED pro interakci s prokaspázou-8. V důsledku pečlivé souhry všech zmíněných aktérů dochází k tvorbě komplexu DISC (Medema et al., 1997), jenž umožňuje autoproteolytické štěpení prokaspázy-8 a následné uvolnění aktivní kaspázy-8 do cytosolu, kde aktivuje celou signalizační kaskádu počínající kaspázou-3.

Stejně, jako je tomu u vnitřní dráhy, i u dráhy vnější může docházet k inhibici pomocí proteinu XIAP, kde působí přímo na kaspázu-8, čímž je zabráněno plné aktivaci kaspázy-3 (Deveraux et al., 1997). Na úrovni kaspázy-8 dochází pomocí aktivace proapoptotického proteinu Bid a následné aktivace vnitřní dráhy k propojení s vnitřní dráhou (Li et al., 1998).

2.2.3 Dráha s využitím granzymu-B

Další možnost, jak apoptózu indukovat, využívají cytotoxické T-lymfocyty a NK buňky imunitního systému, a to za skrze eflux enzymů zvaných perforiny a granzymy z cytoplasmatických granulí. Funkcí perforinů je tvorba transmembránového póru do cílové buňky. Pro samotnou indukci apoptózy je toto nedostatečné. Právě k tomu slouží serinové proteázy granzymy, které existují ve dvou typech A a B. Granzym-B je však častější a hrající významnou roli právě v indukci apoptózy (Smyth & Trapani, 1995).

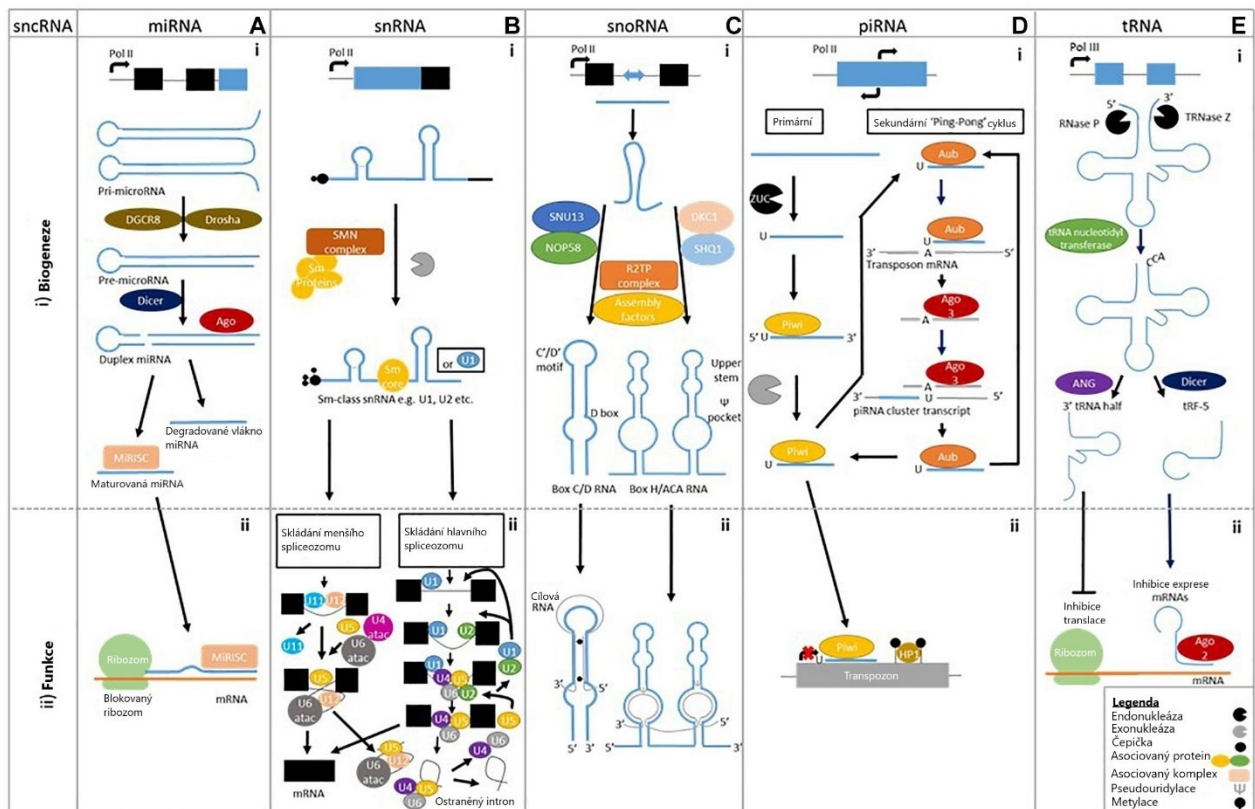
Zajímavostí této dráhy je její nezávislost na iniciačních kaspázách pro její aktivaci. Tu může mít na svědomí právě granzym-B, který je podobně jako kaspázy proteázou, jenž štěpí v oblasti aspartátů cílových proteinů. Těmi mohou být samotné kaspázy nebo jiné proteiny stojící za změnami, kterým buňka v době své smrti podléhá (Trapani et al., 1998). Mimo přímou aktivaci kaspáz je granzym-B schopen aktivovat i výše zmiňovanou vnitřní dráhu apoptózy, a to přes štěpení proteinu Bid a vytvoření společného aktivního fragmentu. Ten je schopen translokace do mitochondrie, kde přes heterodimerizace s proteinem Bax umožňuje uvolnění cytochromu c vedoucího k programované buněčné smrti nezávislé na kaspázách (Heibein et al., 2000).

Nelze opomenout zmínku o příbuzném granzymu-A. Ten funguje v souhře s granzymem-B a má na svědomí narušení membránového potenciálu mitochondrie a tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů. Vedle toho se také podílí na aktivaci komplexu zvaného SET schopného transportu do jádra, kde slouží k opravě DNA v reakci na vzniklý oxidativní stres buňky (Martinvalet et al., 2005).

3. Nekódující RNA

Nekódující RNA (ncRNA) jsou molekuly RNA nacházející se u většiny druhů. Jen v genomu savců dochází k expresi desítek tisíc transkriptů ncRNA (Mattick, 2005). Ty se dělí do dvou významných skupin, a to dlouhá nekódující RNA (lncRNA) a krátká nekódující RNA (sncRNA). První zmíněná skupina s délkou transkriptů přesahující 200 nukleotidů je k nalezení jak u prokaryotických, tak u eukaryotických organismů. Oproti lncRNA se sncRNA nacházejí pouze u organismů eukaryotních, kde dosahují délky mezi 18 a 200 nukleotidy (C. N. Watson et al., 2019).

Dlouhá nekódující RNA jsou významná díky jejich zásadnímu pozitivnímu či negativnímu efektu na genovou expresi. Na genovou expresi působí taktéž sncRNA, mezi něž se řadí například miRNA, RNA reagující na piwi (piRNA), malá interferující RNA (siRNA) a malá jadéřková RNA (snoRNA) (viz. Obr. 3). K jejich působení může docházet jak na úrovni transkripce, sestřihu, exportu, tak i na úrovni udržení stability genových produktů (Brosnan & Voinnet, 2009).



Obr. 3: Biogeneze a funkce vybraných ncRNA; převzato a upraveno podle (C. N. Watson et al., 2019)

4. MicroRNA

4.1 Funkce

Jakožto microRNA (miRNA) se označují nekódující RNA o délce mezi 20 až 24 nukleotidy, které jsou schopné RNA interference, v důsledku čehož dochází ke snižování či inhibici translace mRNA (Esquela-Kerscher & Slack, 2006). Předpokládá se, že miRNA jsou kódovány téměř 1% všech genů (Yekta et al., 2004). Jedna miRNA je schopna cílit na několik různých částečně komplementárních mRNA (Bhalala et al., 2013).

K jejich expresi dochází konstitutivně, specificky v daných etapách vývoje či pouze tkáňově specificky (Zeng & Cullen, 2003). Svoji funkci zastávají v nejrůznějších tkáních a buněčných typech. V současné době nabývají čím dál tím více na významu díky možnosti využívat je jako terapeutický cíl či biomarkery, a to při řadě patologií jako například při neurodegenerativních onemocněních (C. N. Watson et al., 2019), cévních mozkových příhodách (Bhalala et al., 2013), úrazových poškozeních míchy (Nieto-Diaz et al., 2014), rakovině (Anastasiadou et al., 2017) nebo třeba endometrióze (Bjorkman & Taylor, 2019). Nadto jsou esenciální pro správný vývoj a funkci centrální nervové soustavy.

4.2 Historie

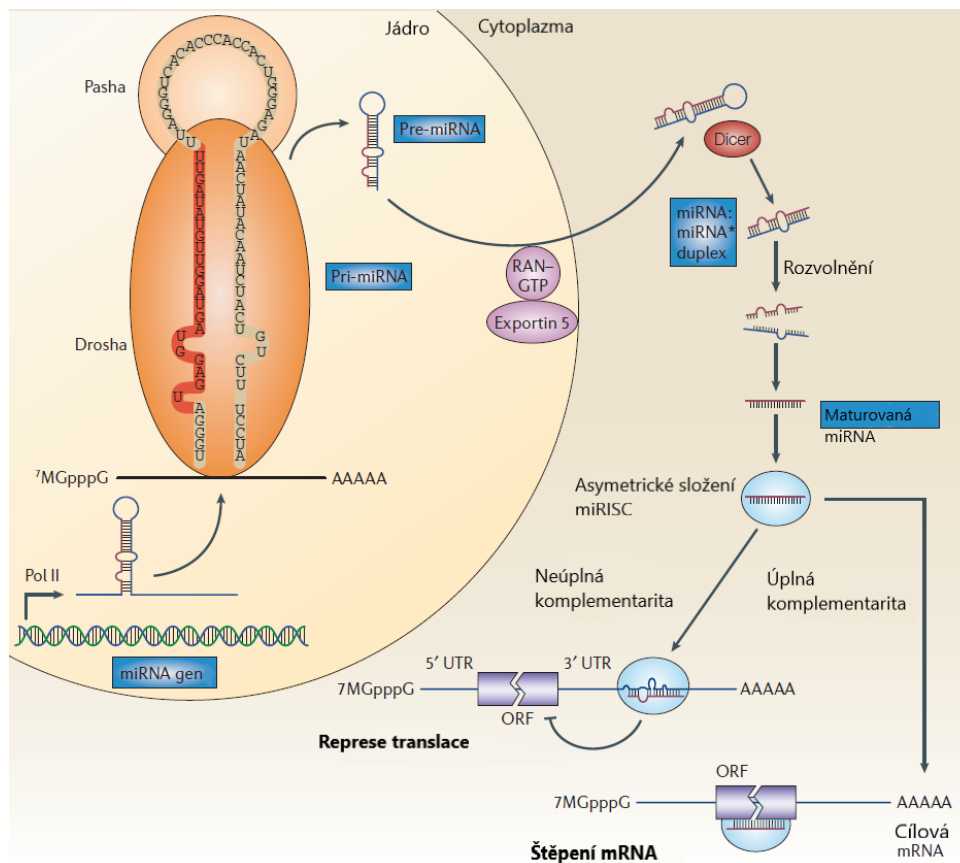
K objevu první miRNA došlo v roce 1993 na hlístici *Caenorhabditis elegans* (Feinbaum et al., 2004). Jednalo se o nápadně malé produkty genu *lin-4* komplementární se 3'UTR sekvencí genu *lin-14*, jenž je zásadní pro počáteční fáze larválního vývoje - pro přechod mezi larválními instary L1 a L2 (Almeida et al., 2011). Pakliže došlo k poškození *lin-4*, hlístice vykazovaly fenotyp, který byl pro dospělé nestandardní. Zůstaly jim totiž zachovány některé larvální znaky a buněčné typy (R. Lee et al., 2004).

Druhá miRNA byla identifikována v roce 2000 jakožto produkt genu *let-7* taktéž u *Caenorhabditis elegans*. Vzniklý transkript vykazoval komplementaritu s 3'UTR několika různých genů ovlivňujících přechod z larválního instaru L4 v dospělého jedince (Reinhart et al., 2000).

K pochopení biogeneze miRNA přispěla předchozí znalost mechanismu RNA interference siRNA. Při něm dochází stejně jako u miRNA k posttranskripčnímu umlčení genů prostřednictvím krátkých segmentů RNA, jež jsou v RNA-proteinovém komplexu schopny vazby na mRNA (Grishok et al., 2001). Při objasňování mechanismu fungování již zmiňovaných nově objevených 22 nukleotidů dlouhých miRNA u *Caenorhabditis elegans* bylo zjištěno, že každému z nich předchází přibližně 70 nukleotidů dlouhý segment. Toto zjištění nasvědčovalo představě vzniku miRNA z větších prekurzorů vlásenkového typu, jako tomu bylo u již známého mechanismu siRNA (Grishok et al., 2001). Propojením několika výzkumů, na jedné straně na hlísticích, na druhé straně na siRNA (J. Watson et al., 2001), byl objasněn přesný proces maturace miRNA.

4.3 Biogeneze

Ke vzniku miRNA dochází přes přepis jaderné DNA v několika krocích odehrávajících se jak v jádře, tak v cytoplasmě. DNA je přepisována RNA polymerázou II (Esquela-Kerscher & Slack, 2006) na velmi dlouhé pri-miRNA tvořící sekundární vlásenkové struktury (Bhalala et al., 2013). Pri-miRNA ve své sekvenci obsahuje invertované repetice rozeznávané enzymatickým komplexem, tak zvaným „mikroprocesorem“ (Suster & Feng, 2021) složeným z ribonukleázy Drosha a strukturního proteinu, který u lidí nalezneme pod názvem DGCR8 a u mušek *Drosophila melanogaster* pod názvem Pasha (Valencia-Sanchez et al., 2006). Takto vzniklá 65 až 75 nukleotidů dlouhá pre-miRNA mající tvar vlásenky (Y. Lee et al., 2003) je přes exportin-5 GTP-dependentně (Fabbri et al., 2008) exportována do cytoplasmy za účasti proteinu Ran (Fabbri et al., 2008). Tam je procesována pomocí RNázy III zvané Dicer. Po zpracování pomocí proteinu Dicer vzniká maturovaná dvouvláknová miRNA, kdy jedno vlákno zůstává biologicky aktivní. Druhé komplementární vlákno je degradováno (Lau, 2001). Vzniklá jednovláknová miRNA spolu s proteiny rodiny Argonaut vytváří komplex RISC umožňující vazbu na mRNA (Esquela-Kerscher & Slack, 2006) (viz Obr. 4).



Obr. 4: Biogeneze miRNA; schematické zobrazení biogeneze miRNA počínající syntézou při-miRNA a pre-miRNA v jádře. Po exportu z jádra dochází k vytvoření maturované miRNA, která váže 3'UTR oblasti mRNA a reguluje tak expresi; převzato a upraveno (Esquela-Kerscher & Slack, 2006)

Výsledná miRNA obsahuje tak zvanou „seed“ sekvenci nacházející se mezi 2 až 7 nukleotidem. V závislosti na podobnosti této sekvence se miRNA dělí do několika rodin. Expresí přibližně třetiny všech mRNA je ovlivněná miRNA (Esquela-Kerscher & Slack, 2006), mimo jiné se miRNA na základě homologie „seed“ sekvence klasifikují a dělí do přibližně 90 vysoce konzervovaných rodin (McGeary et al., 2019).

5. MicroRNA regulující apoptózu v CNS

miRNA figurují v nejrůznějších oblastech fyziologických a patofyziologických procesů probíhajících v centrální nervové soustavě počínaje její ontogenezí a konče jejími defekty, jako jsou například Alzheimerova choroba, syndrom fragilního X (Srinivasan et al., 2013), schizofrenie a jiná psychická onemocnění, Huntingtonova choroba, Parkinsonova choroba (Kocerha et al., 2009) či následky mechanických poranění. Tato práce se v následující části zaměří na vybraná miRNA, která v těchto procesech hrají roli.

5.1 miR – 20a

Pro správnou neurogenezi je potřebná přísná regulace proliferace a diferenciace. Regulace obou procesů je velmi složitá a působí během ní množství regulačních mechanismů. Jedním z nich je regulace množstvím miRNA, mezi nimi i miR-20a. O vlivu této miRNA je toho známo nejvíce, jelikož je jednou nejprostudovanějších, a to právě díky její roli v mnoha patologických procesech, kterými se zabývá tato podkapitola.

Exprese miR-20a je v postnatálních neurálních kmenových buňkách zvyšována transkripčním faktorem Nanog. To umožňuje vazbu miR-20a na mRNA proteinu Trp53inp1, který je tak inhibován, a tím je buňkám umožněno proliferovat. V momentě, kdy nedochází k inhibici pomocí miR-20a, je Trp53inp1 aktivován tumor supresorovým proteinem p53, čímž může docházet k zabránění proliferaci díky zastavení buněčného cyklu a případnému nastartování apoptózy (Garg et al., 2013). Indukce apoptózy pomocí p53 probíhá na úrovni proapoptotických proteinů Puma a Noxa, jejichž transkripce je jím přímo zvyšována (Aubrey et al., 2018). Stejně jako je zvyšována transkripce proteinu Bax (Toshiyuki & Reed, 1995).

Tato miRNA je zapojena i v případě míšního poranění. To sestává ze dvou po sobě následujících fází, a to fáze primární, během níž dochází k samotnému mechanickému či patologickému poškození míchy a fáze sekundární. Ta sestává z fáze akutní, subakutní a intermediární, trvající od několika hodin do půl roku od poranění. V poslední řadě zahrnuje i fázi chronickou, trvající léta a nesoucí s sebou problémy, jako jsou poruchy mobility a chronické bolesti spojené se zhoršenou remyelinizací axonů. Během obou z nich se setkáváme kromě buněčných změn spojených s permeabilizací membrán a okamžitou zánětlivou odpovědí také s intenzivní mírou apoptózy a nekrózy neuronů i gliových buněk (Ahuja et al., 2017).

Při zjišťování funkce miR-20a za použití myšního modelu mechanického poškození míchy bylo potvrzeno zvýšení její exprese. Tou miR-20a nabývá vyšší schopnosti negativně regulovat proteiny účastníci se neurogeneze jako je transkripční faktor neurogenin Ngn1 či Ngn2 a další. V případě represe Ngn1 dochází k indukci apoptózy přes aktivaci kaspázy-3 za současného navýšení exprese proapoptotického proteinu Bax a cytochromu c. Při inhibici miR-20a docházelo k nižší úmrtnosti buněk právě díky snížené proapoptotické signalizaci, a také díky zvýšené hladině antiapoptotického proteinu Bcl-2 a neurogeninu Ngn1 podporujícího obnovu buněk přes signální dráhu JAK/STAT3. To vše vedlo až ke zlepšení regenerace motorických neuronů a alespoň částečné obnově motoriky zadních končetin (Jee et al., 2012). V dalším experimentu týkajícím se míšního poranění provedeném na kultuře Neuro-2A myších buněk neuroblastomu byla znovu potvrzena účast miR-20a na apoptóze skrze zvyšování exprese proapoptotických proteinů. U tohoto výzkumu se jednalo konkrétně o proapoptotický protein Mcl-1 (Liu et al., 2015).

Dalším z procesů, na nějž má vliv tato miRNA, a který je zkoumán na myším modelu, je cévní mozková příhoda. Následkem je narušení krevního zásobování zastižené oblasti mozku, kde dochází k četným změnám. Mezi nimi je na příklad nesprávná funkce pericytů, jenž jsou součástí hematoencefalické bariéry, zánětlivá odpověď, narušení standardních hladin glukózy a vápníku, a také oxidativní stres (Campbell et al., 2019). Právě snížení hladin glukózy a kyslíku vede k apoptotické smrti neuronů. V oněch postižených neuronech dochází ke zvýšení hladiny histon deacetylázy 9, jenž je exprimována v mnoha buněčných typech od makrofágů, dendritických buněk přes mikroglie až po neurony čichového laloku a hipokampu. Tato histon deacetyláza 9 je schopna regulovat apoptózu přes vazbu na promotorovou oblast miRNA-20a, čímž dochází ke snížení její hladiny vedoucí k apoptóze. Pokud je však histon acetyláza 9 inhibována, miRNA-20a je standardně exprimována a naopak dochází k zabránění apoptózy. Navržení účinných inhibitorů histon acetylázy 9 tak představuje velký terapeutický potenciál ve směru zmírnění následků cévní mozkové příhody (Zhong et al., 2021).

Na potkanech provedený experiment, který se také zabýval touto miRNA ve spojení s cévní mozkovou příhodou, nastínil spojitost mezi miR-20a a proteinem Cdh1 (C. chun Yang et al., 2021). Ten je esenciální pro bezchybný buněčný cyklus, kde slouží jako adaptorový protein pro APC - anafází podporující komplex. To však není jediná společná role APC a Cdh1, a to díky jejich přítomnosti i v diferenciovaných postmitotických buňkách, jmenovitě právě v neuronech (Gieffers et al., 1999). V těch následkem poškození dochází ke zvýšení hladin miR-20a, která je schopna inhibovat Cdh1, což má za následek apoptózu neuronů. Když však došlo ke snížení hladiny miR-20a, a tím pádem uvolnění Cdh1, došlo také k zabránění apoptóze. Přesný mechanismus je však i nadále předmětem zkoumání (C. chun Yang et al., 2021).

Na této miRNA je vidět rozdílná funkce v odlišných buněčných typech. Její zvýšení během neurogeneze neurálních kmenových buněk má antiapoptotický účinek (Garg et al., 2013), kdežto zvýšení po prodělaném míšním poranění účinek proapoptotický (Jee et al., 2012 a Liu et al., 2015). Naopak po cévní mozkové příhodě je dle jedné studie snížení hladiny miR-20a tím, co buňku vede k apoptóze (Zhong et al., 2021). Dle druhé zmiňované je to však její zvýšení, které podporuje apoptózu (C. chun Yang et al., 2021). (Zhong et al., 2021). Tato miRNA je tedy názorným příkladem toho, že stejná miRNA může mít diametrálně odlišný účinek v rámci jiné tkáně jiného buněčného typu, ale nejpravděpodobněji i rámci stejného buněčného typu, jako je tomu u neuronů poškozených cévní mozkovou příhodou. Je však nutné tímto tématem se i nadále pečlivě zabývat, aby mohlo být potvrzeno, či je tomu opravdu tak, a poznatky se mohly dále využít pro případné terapie či diagnostiku.

5.2 miR-21

Traumatické poranění mozku se dělí do kategorií od lehké po těžké a vede k apoptóze neuronů a celkovému narušení homeostáze mozku (Pietro et al., 2018). Nejčastěji dochází k lehkému poranění jako jsou lehké otřesy mozku. Zde je problémem jeho časté zanedbání ze strany pacienta, u některých

vedoucí až k přetrvávajícím kognitivním i behaviorálním problémům i v řádu několika let od úrazu. Právě tato lehká poranění mohou být hůře zachytitelná pomocí magnetické rezonance, která je navíc poměrně nákladnou technikou. miRNA představují velký potenciál jako nové biomarkery umožňující přesnou a včasnou diagnostiku (Bhomia et al., 2016).

Jednou z těchto nových nadějí je miR-21, jejíž exprese se po poranění zvyšuje. V důsledku toho dochází k inhibici apoptózy přes zvýšení hladiny antiapoptotického proteinu Bcl-2 a snížení proapoptotického proteinu Bax a kaspázy-3. To vše napomáhá k udržení integrity hematoencefalické bariéry a podpoře aktivní angiogeneze, jelikož miR-21 má také schopnost zvyšovat expresi růstového faktoru VEGF, který je aktivátorem angiogeneze (Ge et al., 2014).

Při zkoumání dopadu zvýšené hladiny miR-21 na přežívání neuronů v prostředí chudém na kyslík a glukózu, které je typické pro oblasti po prodělané cévní mozkové příhodě, byl u potkanů potvrzen její antiapoptotický účinek. Zajímavý je mechanismus, jak k inhibici apoptózy dochází. miR-21 totiž snižuje množství Fas ligandu, který interaguje s receptorem smrti Fas vedoucím k aktivaci vnější dráhy apoptózy, a jehož exprese je po poranění zvýšená (Buller et al., 2010).

Stejně jako u miR-20a dochází po poranění míchy ke zvýšení hladiny i této miRNA, což má opět antiapoptotický účinek, jak bylo ověřeno na potkaním modelu. Na něm byly jako cíl negativní regulace stanoveny proapoptotické proteiny, Fas ligand, a dále také proteiny PTEN a PDCD4 (Hu et al., 2013). Aktivace apoptózy pomocí PDCD4 nejspíše vede přes proapoptotický protein Bax, cytochrom c a aktivaci kaspáz, avšak přesný mechanismus není doposud do detailu jasný (Matsushashi et al., 2019). Aktivace přes PTEN probíhá přes blokaci signální dráhy PI3K/Akt, která hraje roli v regulaci buněčného cyklu (Weng et al., 2001).

5.3 miR-29b

Následkem míšního poranění dochází ke změnám exprese i této miRNA, a to konkrétně v tomto případě ke snížení. K výzkumu byla použita stejná linie myších buněk neuroblastomu – Neuro-2A, jako tomu bylo u miR-20a. miR-29b svojí vazbou na mRNA podporuje expresi proapoptotických proteinů Bad, Bim, Noxa a Puma. Též je schopna ovlivňovat aktivitu kaspázy-3. Apoptóza takto zasažených neuronů je tedy výsledkem souhry účinku jak miR-29b, tak miR-20a (Liu et al., 2015).

miR-29b hraje roli v indukci buněčné smrti po prodělané cévní mozkové příhodě, kde dochází k jejímu zvýšení. Cílovým mRNA je v tomto případě ta patřící dalšímu z antiapoptotických proteinů - Bcl2L2. miRNA-29b však její translaci inhibuje, čímž podporuje aktivaci apoptózy a umírání neuronů (Shi et al., 2012). V druhém experimentu spojujícím tuto miRNA s cévní mozkovou příhodou byla použita linie myších buněk Neuro-2A. Na ní byla identifikována schopnost miR-29b inhibovat antiapoptotický protein Mcl-1 a naopak indukovat kaspázu-3, tedy působit proapoptoticky (Huang et al., 2018).

U této miRNA vidíme stejně jako u miR-20a protichůdný efekt v závislosti na lokalizaci. V míše po poranění dochází k snížení její exprese a tedy ke snížení jejího v standardních hladinách apoptotického efektu (Liu et al., 2015). Možnost, jak její expresi podpořit, se tedy jeví jako část cesty ke zlepšení prognózy osob trpících následky takového poranění. Naopak v mozku dochází po cévní mozkové příhodě ke zvyšování a podpoře apoptózy (Shi et al., 2012 a Huang et al., 2018). Jedná se tedy o další zdárný příklad tkáňové specifity miRNA.

5.4 miR-34a

Tato miRNA účinkuje v rámci zde dosud nezmiňovaného onemocnění. Tím je Alzheimerova choroba, kterou trpí přes 6 miliónů osob, a je tak nejčastějším neurodegenerativním onemocněním (Alzheimer's Association, 2022). V souvislosti s tímto onemocněním jsou miRNA taktéž zkoumána. K ověření, zda a jak působí miR-34a na regulaci a progresi Alzheimerovy choroby, byly použity transgenické myši APP^{swe}/PSΔE9 exprimující zvýšené množství amyloidu beta, jehož akumulace je jedním z průvodních jevů tohoto onemocnění. Hlavním cílem regulační aktivity miR-34a, jehož exprese je zvýšená, je 3'UTR oblast mRNA proteinu Bcl-2, který je schopen inhibovat kaspázu-3 i kaspázu-9 a působit tak antiapoptoticky. Mimo miR-34a byla zjištěna změna exprese dalších 36 miRNA z 299 analyzovaných ve spojitosti s touto patologií. (Wang et al., 2009) Inhibice proapoptoticky působící miR-34a by tak mohla být dobrým cílem dalších experimentů s ohledem na zmírnění úmrtnosti neuronů či astrocytů při tomto onemocnění.

5.5 miR-128

Parkinsonova choroba je jedním z nejčastějších neurodegenerativních onemocnění, během nichž taktéž dochází ke deregulaci standardních hladin miRNA. U myší trpících tímto onemocněním bylo zjištěno zvýšené množství miR-128. Ta je schopna negativně regulovat translaci proteinu AXIN1 (Zhou et al., 2018), který přes degradaci β -kateninu funguje jako inhibitor Wnt/ β -kateninové signální dráhy (MacDonald et al., 2009). Bylo zjištěno, že v dopaminergních neuronech miRNA-128 je inhibice proteinu AXIN1 spojená s inhibicí exprese kaspázy-3. Jak však tento antiapoptotický mechanismus do detailu funguje a jak významná je tato spojitost, není přesně jasné (Zhou et al., 2018).

Inovativním přístupem je analýza exprese této miRNA ne v samotných neuronech, ale v extracelulárních váčcích – exosomech získaných z plazmy pacientů trpících Parkinsonovou chorobou. V nich je možné detekovat snížené hladiny této miRNA. Ke snížení dochází i v buněčných kulturách lidských buněk neuroblastomové linie SH-SY5Y i potkaní linie PC12. Ty byly modifikovány tak, aby svými vlastnostmi připomínaly právě dopaminergní neurony a mohl na ně být použit 6-hydroxydopamin chovající se jako antagonist k dopaminu, a zároveň aby prezentovaly vyšší než standardní množství miR-128. Toto umělé zvýšení zde působí antiapoptoticky, avšak úplně jinou cestou, než byla výše zmíněna. Tou je zabránění aktivace transkripčního faktoru FoxO3a, který jinak funguje právě jakožto aktivátor apoptózy přes navyšování exprese proapoptotického proteinu Puma

a FasL, sloužícího jako ligand pro Fas receptor. Zároveň je tato miRNA schopna regulovat aktivaci kaspáz. Představuje tak obrovský diagnostický i terapeutický potenciál. (Bhattacharyya et al., 2023).

5.6 miR-355-5p

Tato miRNA hraje roli v průběhu amyotrofické laterální sklerózy, která je velmi závažným a rychle postupujícím neurodegenerativním onemocněním. Její snížení bylo pozorováno ve vzorcích séra pacientů a na kultuře lidských buněk SH-SY5Y. Experimentální inhibice miR-355-5p má vliv na morfologii mitochondrií a zároveň je schopna při své patologicky snížené expresi aktivovat kaspázu-7 a dále tak zpečetit osud buňky (De Luna et al., 2020).

5.7 miR-125b

miRNA nefungují jen a pouze v rámci nejrůznějších patofyziologických procesů, ale jsou také esenciální součástí správného fyziologického vývoje centrální nervové soustavy. Jejich přesná funkce a role ve vývoji je však v mnoha případech nepříliš jasná. I přes to jejich význam však nelze zanedbat.

Jednou z takových navrhovaných je miR-125b. Jako modelový organismus pro tento výzkum byla použita embrya ryby *Danio rerio*. Po navýšení hladiny miR-125b došlo během vývoje ke snížení apoptózy indukované proteinem p53. Avšak množství miR-125b není v celé vyvíjející se nervové soustavě konstantní. V rámci vývoje míchy je její množství stále stejné, kdežto s postupujícím vývojem mozku se její hladina neustále zvyšuje, s čímž koreluje současné snižování p53, kterého je z počátku více než miR-125b. V rámci experimentu byla tato miRNA inhibována. To mělo za následek zvýšené množství mrtvých buněk v mozku vedoucí ke špatnému vývoji axonálních spojení, narušenému vývoji hlavy a abnormálního chování z těchto embryí vzniklých larev. Jelikož miRNA jsou dosti konzervované napříč druhy, je pravděpodobné, že podobný mechanismus funguje i u dalších obratlovců (Le et al., 2009).

Mimo tento fyziologický účinek je miR-125b také jednou z dalších, jejíž exprese je zvýšená při probíhající Alzheimerově chorobě. To bylo potvrzeno za použití myšího modelu, a také na vzorcích lidské mozkové tkáně osob, které zemřely v důsledku této choroby. Velice zajímavý je dopad zvýšené hladiny této miRNA na snižování aktivity tau fosfatázy PP1CA, což má za následek zvýšenou hyperfosforylaci proteinu Tau, jehož akumulace jsou považovány za známku postupující progresse tohoto onemocnění. Mimo to má vysoce pravděpodobně dopad i na apoptózu. Snižuje totiž expresi antiapoptotického proteinu Bcl-w. Významnost tohoto vlivu je však zapotřebí podrobit dalšímu studiu. (Banzhaf-Strathmann et al., 2014)

5.8 miR-124

Ve spojitosti s vývojem centrální nervové soustavy je další zkoumanou miR-124, jejíž množství je mozku znatelně vyšší než v jakýchkoli jiných tkáních (Sempere et al., 2004). Díky tomu je mezi vědci velká snaha o poznání její role.

Její hlavní funkcí je nejspíše regulace alternativního sestřihu během diferenciací vznikajících neuronů. V rámci experimentu s myšimi embryi byl metodou genetického knockoutu vyřazen z funkce protein Dicer, klíčový pro biogenezi miRNA. Tím došlo k absenci miR-124 a dalších miRNA vedoucí ke vzniku embryí se zmenšeným předním mozkem způsobených neregulovanou apoptózou. Toto zjištění podporuje představu, že miRNA jsou zásadní pro regulaci apoptózy ve vznikajícím mozku (Makeyev et al., 2007).

Jestli je tomu opravdu tak a miR-124 hraje roli v regulaci apoptózy během neurogeneze, není zcela jasné. Jedna z realizovaných studií byla provedena na vyvíjející se neurální trubici kuřete, kdy bylo zjištěno, že hladina této miRNA se v diferencujících neurálních buňkách zvyšuje, kdežto v samotných progenitorových buňkách je nízká. Z toho důvodu se dalo očekávat, že miR-124 slouží k podpoře diferenciací. Když však došlo jak k její inhibici, tak ke zvýšení její exprese, nedošlo ke změnám v postupujícím vývoji buněk. Zvýšení exprese však vedlo ke zvýšené apoptóze. Přesný mechanismus, jak k ovlivnění apoptózy dochází, není jasný (Cao et al., 2007).

Jak je vidět, názory o významu této miRNA v regulaci apoptózy během vývoje jsou protichůdné. Je tedy potřeba další výzkum, aby bylo jasné, jak, za jakých podmínek a jestli vůbec miR-124 reguluje apoptózu během vývoje centrální nervové soustavy.

Mimo období vývoje působí miR-124 také jako regulátor apoptózy následkem cévní mozkové příhody. Jak bylo zjištěno na potkaním modelu, v takovém případě slouží miR-124 jako negativní regulátor proteinu Ku70 (Zhu et al., 2014). Ku70 je podstatnou součástí mechanismu opravy DNA spojováním nehomologických konců. Mimo to se však také působí antiapoptoticky, a to skrze regulaci proapoptotického proteinu Bax tak, že je Ku70 schopen vychytávat volný protein Bax z cytosolu a zabránit mu ve vstupu do mitochondrie a následně aktivaci apoptotické kaskády (Amsel et al., 2008). Během experimentu byla miR-124 zablokována, čímž došlo k zmírnění apoptózy neuronů. Díky tomu se jeví jako další z možných terapeutických cílů při léčbě následků cévní mozkové příhody (Zhu et al., 2014).

5.9 miR-24a

Na modelovém organismu – žábě *Xenopus laevis* – byla zkoumána možná funkce miR-24a ve vývoji retiny. V ní dochází k masivnímu umírání buněk do té doby, než je ustanovena její finální morfologie. Zdá se, že právě za negativní regulací takového umírání stojí miR-24a, a to právě díky její schopnosti regulace proteinu Apaf1 spojeného s tvorbou apoptozomu, a také schopnosti ovlivňovat kaspázu-9. Následkem inhibice miR-24a bylo navýšení apoptózy a z toho vyplývající morfologické abnormality retiny, což potvrzuje předpokládaný význam miR-24a v embryonálním vývoji retiny (Walker et al., 2009).

5.10 miR-9

Jedním z nejzákladnějších fyziologických procesů embryonálního vývoje centrální nervové soustavy je samotná neurogeneze probíhající v předním mozku, kde je apoptoticky ovlivňována miR-9 a jí regulovaným proteinem p53. Nedostatek miR-9 se projevoval zvýšením apoptózy progenitorových buněk v předním mozku pro tento experiment použité žáby *Xenopus tropicalis* a ve výsledku i snížením počtu vzniklých neuronů. Zároveň tato miRNA snižuje množství produktu genu *hairy1*, který působí jako represor transkripce. Touto regulací podporuje neurogenezi i v jiných oblastech vznikajícího mozku, kdežto vliv na apoptózu je spojován jenom s předním mozkiem (Bonev et al., 2011).

6. Využití microRNA

V rámci teoretického terapeutického využití existují dva přístupy. Tak zvaná miRNA mimetika (miRNA mimics), kdy se jedná o administraci připravených miRNA přímo jako léčivý přípravek (Rupaimoole & Slack, 2017). Druhým případem je situace, kdy by miRNA byla cílem jiného léčivého přípravku, čímž by došlo k její inhibici. Takový přípravek by byl pak nazýván antagomir (Krützfeldt et al., 2005).

miRNA jsou ve fázi základního výzkumu intenzivně zkoumána nejen jako potenciální cesta terapie nejrůznějších onemocnění, ale hlavně jako slibně vypadající biomarkery, a to i díky jejich schopnosti ovlivňovat několik buněčných procesů zároveň (Rupaimoole & Slack, 2017). To však představuje hlavní překážku, kterou je třeba před zavedením klinické terapie překonat. Díky širokému spektru svého působení by totiž takovéto látky mohly interagovat i s jinými mRNA, než je jejich primární terapeutický cíl. To by mohlo vést k signifikantním vedlejším účinkům. Problém navíc vždy představuje administrace čehokoliv skrze hematoencefalickou bariéru (Hutchison et al., 2009).

Jednou z oblastí využití miRNA jako biomarkery je míšní poranění, kde by mohly sloužit k brzkému určení, zda k poranění došlo a k určení míry závažnosti. Ve studii, která analyzovala cirkulující miRNA v krvi myši, které míšní poranění prodělaly, bylo identifikováno několik miRNA. Konkrétně miR-9, miR-219 a miR-384-5p byly vybrány jako ty, které by v budoucnu mohly sloužit jako biomarkery, a to díky velkým změnám v jejich expresi (Hachisuka et al., 2014). Další studie se zabývala stanovením závažnosti poškození ze séra 44 pacientů během prvních tří dnů od úrazu. Mezi miRNA, u kterých došlo k změnám v expresi a které by tedy byly nejvhodnějšími kandidáty na biomarkery, patřily miR-9, miR-21, miR-219, miR-133 a další. Stanovení biomarkerů korelujících se závažností poškození by mohlo sloužit pro predikci následků poranění. Pro jednoznačné určení takových miRNA a jejich potenciální klinické využití je potřeba více studií s větším vzorkem pacientů (Tigchelaar et al., 2019).

Dále by miRNA mohla být cestou k včasné detekci neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova či Parkinsonova choroba, k jejichž diagnóze často dochází až s nástupem symptomů.

V případě Alzheimerovy choroby byly v rámci studie využity vzorky séra 7 pacientů. Ve všech vzorcích byla zjištěna snížená hladina určitých miRNA oproti kontrolním vzorkům séra zdravých osob, mezi nimi miR-9, miR-29, miR-29b a další. Ta by tak mohla sloužit pro neinvazivní diagnostiku (Geekiyange et al., 2012).

Dalším příkladem, kde by se miRNA dala takto využít, jsou případy traumatického poškození mozku. V provedené studii bylo zjištěno zvýšení hladin miR-93, miR-191 a miR-499 do 24 hodin po úrazu v séru 76 pacientů. Tyto hladiny byly zvýšené pouze u pacientů, a ne u zdravé kontroly. Zvýšení hladin těchto miRNA reflektovalo závažnost poranění, a to v tom smyslu, že vyšší hladiny prezentovali pacienti s horšími následky než ti s menšími následky poškození (T. Yang et al., 2016).

V poslední letech proběhlo a současně stále probíhá několik klinických studií cílící na analýzu změn miRNA a jejich možnosti využití jako biomarkery pro včasnou diagnostiku u pacientů trpících nejrůznějšími typy rakovin, aterosklerózou, inzulinovou rezistencí nebo endometriózou. V rámci centrální nervové soustavy byla v tomto ohledu zkoumána také například roztroušená skleróza, farmakorezistentní epilepsie, Parkinsonova choroba, migrény, deprese, autismus a další. Všechny tyto studie jsou k nalezení v databázi Národní knihovny medicíny Spojených států amerických (<https://clinicaltrials.gov>).

7. Závěr

Tato bakalářská práce si dala za cíl představit několik vybraných miRNA v kontextu apoptotické buněčné smrti, kterou z velké míry regulují. A to konkrétně během procesů v centrální nervové soustavě.

Nejprve bylo vysvětleno, co je to apoptóza, která probíhá už od samotného počátku vývoje, reguluje homeostázu, je průvodcem nejrůznějších onemocnění a její regulace je dlouhodobým předmětem intenzivního studia. Detailněji byl popsán molekulární mechanismus aktivace apoptózy přes vnitřní dráhu závislou na mitochondriích a spojenou se signalizací přes proapoptotické a antiapoptotické proteiny a následnou kaskádovitou aktivací kaspáz. Dále byl vysvětlen mechanismus vnější dráhy vedoucí přes receptory smrti a taktéž kaspázy. V poslední řadě byla zmíněna i dráha nezávislá na kaspázách.

Zbytek práce se věnoval microRNA od jejich biogeneze až propojení jejich regulačních schopností s apoptózou v centrální nervové soustavě. K tomu bylo vybráno několik konkrétních miRNA účinkujících ve fyziologických procesech neurogeneze, vývoje mozku a retiny, a také vybraných patofyziologických procesech. Těmi byly míšní poranění, cévní mozková příhoda, traumatické poranění mozku a neurodegenerativní onemocnění – amyotrofická laterální skleróza a Alzheimerova a Parkinsonova choroba.

I přes intenzivní zkoumání jsou některé výsledky stále nedostatečné a přesné mechanismy, jak miRNA apoptózu regulují a za jakých podmínek k tomu dochází, nejsou doposud jednoznačně objasněné. Těchto regulačních miRNA je samozřejmě podstatně větší množství, než kolik umožňoval rozsah této práce. Nadto jsou neustále objevovány nové a nové funkce a dopady jejich aktivity či inhibice na nejrůznější buněčné procesy.

Ač je diagnostický a terapeutický potenciál miRNA s ohledem na zmiňované patofyziologické procesy v centrální nervové soustavě zřejmý, bohužel není tato oblast dostatečně prozkoumána, aby bylo možné předpokládat takto založenou léčbu ve velmi blízké budoucnosti. Stále je potřeba zajistit větší výzkumné vzorky, analýzu vzorků v delším časovém měřítku a prozkoumání možných interakcí s léky a jinými metodami léčby s hladinami miRNA. Překážkou je i samotné nedostatečné objasnění, co je spouštěčem onemocněních jako je třeba Alzheimerova choroba. Pro případné terapeutické využití je potřeba zajistit opravdu selektivní působení a správnou cestu administrace do jinak těžko dostupné oblasti mozku.

Možnosti jsou tedy obrovské a diagnostika a terapie založené na miRNA mají bezesporu velký potenciál. I nadále je však potřeba extenzivní základní výzkum.

8. Přehled použité literatury

- Adams, J. M., & Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*, 281(5381), 1322–1326. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1322>
- Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome *c*. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(6), 390–397. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01844-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01844-8)
- Ahuja, C. S., Wilson, J. R., Nori, S., Kotter, M. R. N., Druschel, C., Curt, A., & Fehlings, M. G. (2017). Traumatic spinal cord injury. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.18>
- Almeida, M. I., Reis, R. M., & Calin, G. A. (2011). MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 717(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009>
- Amsel, A. D., Rathaus, M., Kronman, N., & Cohen, H. Y. (2008). Regulation of the proapoptotic factor Bax by Ku70-dependent deubiquitylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(13), 5117–5122. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706700105>
- Anastasiadou, E., Jacob, L. S., & Slack, F. J. (2017). Non-coding RNA networks in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(1), 5–18. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.99>
- Association, A. (2022). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 18, 1–122.
- Aubrey, B. J., Kelly, G. L., Janic, A., Herold, M. J., & Strasser, A. (2018). How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 104–113. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>
- Baliga, B. C., Read, S. H., & Kumar, S. (2004). The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death and Differentiation*, 11(11), 1234–1241. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401492>
- Banzhaf-Strathmann, J., Benito, E., May, S., Arzberger, T., Tahirovic, S., Kretzschmar, H., Fischer, A., & Edbauer, D. (2014). MicroRNA -125b induces tau hyperphosphorylation and cognitive deficits in Alzheimer's disease. *The EMBO Journal*, 33(15), 1667–1680. <https://doi.org/10.15252/emj.201387576>
- Bao, Q., & Shi, Y. (2007). Apoptosome: A platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death and Differentiation*, 14(1), 56–65. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402028>
- Beere, H. M., & Green, D. R. (2001). Stress management - Heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 11(1), 6–10. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01874-2](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01874-2)

- Bhalala, O. G., Srikanth, M., & Kessler, J. A. (2013). The emerging roles of microRNAs in CNS injuries. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 9, Issue 6, pp. 328–339). <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.67>
- Bhattacharyya, P., Biswas, A., & Biswas, S. C. (2023). Brain-enriched miR-128: Reduced in exosomes from Parkinson's patient plasma, improves synaptic integrity, and prevents 6-OHDA mediated neuronal apoptosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *16*(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.1037903>
- Bhomia, M., Balakathiresan, N. S., Wang, K. K., Papa, L., & Maheshwari, R. K. (2016). A panel of serum miRNA biomarkers for the diagnosis of severe to mild traumatic brain injury in humans. *Scientific Reports*, *6*(January), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep28148>
- Bjorkman, S., & Taylor, H. S. (2019). MicroRNAs in endometriosis: Biological function and emerging biomarker candidates. *Biology of Reproduction*, *100*(5), 1135–1146. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox014>
- Bonev, B., Pisco, A., & Papalopulu, N. (2011). MicroRNA-9 reveals regional diversity of neural progenitors along the anterior-posterior axis. *Developmental Cell*, *20*(1), 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.11.018>
- Brosnan, C. A., & Voinnet, O. (2009). The long and the short of noncoding RNAs. *Current Opinion in Cell Biology*, *21*, 426–425. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.04.001>
- Buller, B., Liu, X., Wang, X., Zhang, R. L., Zhang, L., Hozeska-Solgot, A., Chopp, M., & Zhang, Z. G. (2010). MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death. *FEBS Journal*, *277*(20), 4299–4307. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07818.x>
- Cain, K., Bratton, S. B., & Cohen, G. M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: A large caspase-activating complex. *Biochimie*, *84*(2–3), 203–214. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01376-7](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01376-7)
- Campbell, B. C. V., De Silva, D. A., Macleod, M. R., Coutts, S. B., Schwamm, L. H., Davis, S. M., & Donnan, G. A. (2019). Ischaemic stroke. *Nature Reviews Disease Primers*, *5*(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>
- Cao, X., Pfaff, S. L., & Gage, F. H. (2007). A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes and Development*, *21*(5), 531–536. <https://doi.org/10.1101/gad.1519207>
- Chou, J. J., Matsuo, H., Duan, H., & Wagner, G. (1998). Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell*, *94*(2), 171–180. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81417-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81417-8)
- Creagh, E. M., Conroy, H., & Martin, S. J. (2003). Caspase-activation pathways in apoptosis and

- immunity. *Immunological Reviews*, 193, 10–21. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00048.x>
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- De Luna, N., Turon-Sans, J., Cortes-Vicente, E., Carrasco-Rozas, A., Illán-Gala, I., Dols-Icardo, O., Clarimón, J., Lleó, A., Gallardo, E., Illa, I., & Rojas-García, R. (2020). Downregulation of miR-335-5P in amyotrophic lateral sclerosis can contribute to neuronal mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61246-1>
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., & Reed, J. C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388(July), 300–304.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Ernshaw, W. C., Martins, L. M., & Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: Structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*, 382–424.
- Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A., & Martinou, J. C. (1998). Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *Journal of Cell Biology*, 143(1), 217–224. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.1.217>
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., & Martinou, J.-C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Molecular and Cellular Biology*, 20(3), 929–935. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.3.929-935.2000>
- Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(4), 259–269. <https://doi.org/10.1038/nrc1840>
- Fabbri, M., Garzon, R., Andreeff, M., Kantarjian, H. M., Garcia-Manero, G., & Calin, G. A. (2008). MicroRNAs and noncoding RNAs in hematological malignancies: Molecular, clinical and therapeutic implications. *Leukemia*, 22(6), 1095–1105. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.30>
- Feinbaum, R., Ambros, V., & Lee, R. (2004). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 116(116), 843–854.
- Fuentes-Prior, P., & Salvesen, G. S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemical Journal*, 384(2), 201–232. <https://doi.org/10.1042/BJ20041142>
- Garg, N., Po, A., Miele, E., Campese, A. F., Begalli, F., Silvano, M., Infante, P., Capalbo, C., De

- Smaele, E., Canettieri, G., Di Marcotullio, L., Screpanti, I., Ferretti, E., & Gulino, A. (2013). MicroRNA-17-92 cluster is a direct Nanog target and controls neural stem cell through Trp53inp1. *EMBO Journal*, *32*(21), 2819–2832. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.214>
- Ge, X. T., Lei, P., Wang, H. C., Zhang, A. L., Han, Z. L., Chen, X., Li, S. H., Jiang, R. C., Kang, C. S., & Zhang, J. N. (2014). MiR-21 improves the neurological outcome after traumatic brain injury in rats. *Scientific Reports*, *4*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep06718>
- Geekiyana, H., Jicha, G. A., Nelson, P. T., & Chan, C. (2012). Blood serum miRNA: Non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, *235*(2), 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.026>
- Gieffers, C., Peters, B. H., Kramer, E. R., Dotti, C. G., & Peters, J. M. (1999). Expression of the CDH1-associated form of the anaphase-promoting complex in postmitotic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(20), 11317–11322. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11317>
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., & Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, *106*(1), 23–34. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00431-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00431-7)
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., & Korsmeyer, S. J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO Journal*, *17*(14), 3878–3885. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.3878>
- Hachisuka, S., Kamei, N., Ujigo, S., Miyaki, S., Yasunaga, Y., & Ochi, M. (2014). Circulating microRNAs as biomarkers for evaluating the severity of acute spinal cord injury. *Spinal Cord*, *52*(8), 596–600. <https://doi.org/10.1038/sc.2014.86>
- Heibein, J. A., Goping, I. S., Barry, M., Pinkoski, M. J., Shore, G. C., Green, D. R., & Bleackley, R. C. (2000). Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members Bid and Bax. *Journal of Experimental Medicine*, *192*(10), 1391–1401. <https://doi.org/10.1084/jem.192.10.1391>
- Hu, J. Z., Huang, J. H., Zeng, L., Wang, G., Cao, M., & Lu, H. Bin. (2013). Anti-apoptotic effect of MicroRNA-21 after contusion spinal cord injury in rats. *Journal of Neurotrauma*, *30*(15), 1349–1360. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2748>
- Huang, Z., Lu, L., Jiang, T., Zhang, S., Shen, Y., Zheng, Z., Zhao, A., Gao, R., Li, R., Zhou, S., & Liu, J. (2018). MiR-29b affects neurocyte apoptosis by targeting MCL-1 during cerebral ischemia/reperfusion injury. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *16*(4), 3399–3404.

<https://doi.org/10.3892/etm.2018.6622>

- Hutchison, E. R., Okun, E., & Mattson, M. P. (2009). The therapeutic potential of microRNAs in nervous system damage, degeneration, and repair. *Neuromolecular Medicine*, *11*(3), 153–161. <https://doi.org/10.1007/s12017-009-8086-x>
- Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, *2*(4), 277–288. <https://doi.org/10.1038/nrc776>
- Jee, M. K., Jung, J. S., Im, Y. Bin, Jung, S. J., & Kang, S. K. (2012). Silencing of miR20a is crucial for ngn1-mediated neuroprotection in injured spinal cord. *Human Gene Therapy*, *23*(5), 508–520. <https://doi.org/10.1089/hum.2011.121>
- Kaczanowski, S. (2016). Apoptosis: Its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Physical Biology*, *13*(3), 1–14. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/13/3/031001>
- Kocerha, J., Kauppinen, S., & Wahlestedt, C. (2009). microRNAs in CNS disorders. *Neuromolecular Medicine*, *11*(3), 162–172. <https://doi.org/10.1007/s12017-009-8066-1>
- Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M., & Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs.” *Nature*, *438*(7068), 685–689. <https://doi.org/10.1038/nature04303>
- Lane, J. D., Lucocq, J., Pryde, J., Barr, F. A., Woodman, P. G., Allan, V. J., & Lowe, M. (2002). Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *Journal of Cell Biology*, *156*(3), 495–509. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110007>
- Lau, N. C. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *294*(5543), 858–862. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1065062>
- Le, M. T. N., Teh, C., Shyh-Chang, N., Xie, H., Zhou, B., Korzh, V., Lodish, H. F., & Lim, B. (2009). MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes & Development*, *C*, 1–9. <https://doi.org/10.1101/gad.1767609.stability>
- Lee, R., Feinbaum, R., & Ambros, V. (2004). A short history of a short RNA. *Cell*, *116*(2 Suppl), 89–92. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00035-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00035-2)
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, *425*(6956), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, *94*(4), 491–501. <https://doi.org/10.1016/S0092->

- Liu, X. J., Zheng, X. P., Zhang, R., Guo, Y. L., & Wang, J. H. (2015). Combinatorial effects of miR-20a and miR-29b on neuronal apoptosis induced by spinal cord injury. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *8*(4), 3811–3818.
- Logue, S. E., Elgendy, M., & Martin, S. J. (2009). Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. *Nature Protocols*, *4*(9), 1383–1395. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.143>
- Maas, C., Verbrugge, I., De Vries, E., Savich, G., Van De Kooij, L. W., Tait, S. W. G., & Borst, J. (2010). Smac/DIABLO release from mitochondria and XIAP inhibition are essential to limit clonogenicity of Type I tumor cells after TRAIL receptor stimulation. *Cell Death and Differentiation*, *17*(10), 1613–1623. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.39>
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell*, *17*(1), 9–26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
- Makeyev, E. V., Zhang, J., Carrasco, M. A., & Maniatis, T. (2007). The microRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Molecular Cell*, *27*(3), 435–448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.015>
- Martin, S. J. (2014). Caspases: Executioners of apoptosis. *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*, *16*, 145–152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.01411-8>
- Martinvalet, D., Zhu, P., & Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, *22*(3), 355–370. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.02.004>
- Matsuhashi, S., Manirujjaman, M., Hamajima, H., & Ozaki, I. (2019). Control mechanisms of the tumor suppressor PDCD4: Expression and functions. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(9), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms20092304>
- Mattick, J. S. (2005). The functional genomics of noncoding RNA. *Science*, *309*(5740), 1527–1528. <https://doi.org/10.1126/science.1117806>
- McGeary, S. E., Lin, K. S., Shi, C. Y., Pham, T. M., Bisaria, N., Kelley, G. M., & Bartel, D. P. (2019). The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science*, *366*(6472), 1–20. <https://doi.org/10.1126/science.aav1741>
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(4), 1–28. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>

- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO Journal*, *16*(10), 2794–2804. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2794>
- Nieto-Diaz, M., Esteban, F. J., Reigada, D., Muñoz-Galdeano, T., Yunta, M., Caballero-López, M., Navarro-Ruiz, R., del Águila, Á., & Maza, R. M. (2014). MicroRNA dysregulation in spinal cord injury: Causes, consequences, and therapeutics. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 8, Issue FEB). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00053>
- Oltval, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, *74*(4), 609–619. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90509-O](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90509-O)
- Philchenkov, A., Zavelevich, M., Krocak, T. J., & Los, M. (2004). Caspases and cancer: Mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Experimental Oncology*, *26*(2), 82–97.
- Pietro, V. Di, Yakoub, K. M., Scarpa, U., Di Pietro, C., & Belli, A. (2018). MicroRNA signature of traumatic brain injury: From the biomarker discovery to the point-of-care. *Frontiers in Neurology*, *9*(JUN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00429>
- Proto, W. R., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (2013). Cell death in parasitic protozoa: Regulated or incidental? *Nature Reviews Microbiology*, *11*(1), 58–66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2929>
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquienelll, A. E., Bettlnger, J. C., Rougvle, A. E., Horvitz, H. R., & Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *403*(6772), 901–906. <https://doi.org/10.1038/35002607>
- Riedl, S. J., & Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(5), 405–413. <https://doi.org/10.1038/nrm2153>
- Rohn, T. T., & Head, E. (2009). Caspases as therapeutic targets in Alzheimer’s disease: Is it time to “Cut” to the chase? *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *2*(2), 108–118.
- Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, *16*(3), 203–221. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>
- Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., & Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biology*, *5*(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-3-r13>

- Shi, G., Liu, Y., Liu, T., Yan, W., Liu, X., Wang, Y., Shi, J., & Jia, L. (2012). Upregulated miR-29b promotes neuronal cell death by inhibiting Bcl2L2 after ischemic brain injury. *Experimental Brain Research*, 216(2), 225–230. <https://doi.org/10.1007/s00221-011-2925-3>
- Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 175–193. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
- Smyth, M. J., & Trapani, J. A. (1995). Granzymes: exogenous proteases that induce target cell apoptosis. *Immunology Today*, 16(4), 202–206. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80122-7](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80122-7)
- Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H., & Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, 12, 599–609. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80211-3](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80211-3)
- Srinivasan, S., Selvan, S. T., Archunan, G., Gulyas, B., & Padmanabhan, P. (2013). MicroRNAs -the next generation therapeutic targets in human diseases. *Theranostics*, 3(12), 930–942. <https://doi.org/10.7150/thno.7026>
- Stupack, D. G., Teitz, T., Potter, M. D., Mikolon, D., Houghton, P. J., Kidd, V. J., Lahti, J. M., & Cheresch, D. A. (2006). Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature*, 439(7072), 95–99. <https://doi.org/10.1038/nature04323>
- Suster, I., & Feng, Y. (2021). Multifaceted regulation of microRNA biogenesis: Essential roles and functional integration in neuronal and glial development. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13). <https://doi.org/10.3390/ijms22136765>
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., & Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Molecular Cell*, 8(3), 613–621. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00341-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00341-0)
- Tigchelaar, S., Gupta, R., Shannon, C. P., Streijger, F., Sinha, S., Flibotte, S., Rizzuto, M. A., Street, J., Paquette, S., Ailon, T., Charest-Morin, R., Dea, N., Fisher, C., Dvorak, M. F., Dhall, S., Mac-Thiong, J. M., Parent, S., Bailey, C., Christie, S., ... Kwon, B. K. (2019). MicroRNA biomarkers in cerebrospinal fluid and serum reflect injury severity in human acute traumatic spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 36(15), 2358–2371. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.6256>
- Tinel, A., & Tschopp, J. (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*, 304(5672), 843–846. <https://doi.org/10.1126/science.1095432>

- Toshiyuki, M., & Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, *80*(2), 293–299. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90412-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90412-3)
- Trapani, J. A., Jans, D. A., Jans, P. J., Smyth, M. J., Browne, K. A., & Sutton, V. R. (1998). Efficient nuclear targeting of granzyme B and the nuclear consequences of apoptosis induced by granzyme B and perforin are caspase-dependent, but cell death is caspase-independent. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(43), 27934–27938. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.27934>
- Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J., & Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes and Development*, *20*(5), 515–524. <https://doi.org/10.1101/gad.1399806>
- Walczak, H., & Sprick, M. R. (2001). Biochemistry and function of the DISC. *TRENDS in Biochemical Sciences*, *26*(452–453). [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01895-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01895-3)
- Walker, J. C., Harland, R. M., & Dev, G. (2009). microRNA-24a is required to repress apoptosis in the developing neural retina Email alerting service microRNA-24a is required to repress apoptosis in the developing neural retina. *Genes & Development*, *510*, 1046–1051. <https://doi.org/10.1101/gad.1777709.1046>
- Wang, X., Liu, P., Zhu, H., Xu, Y., Ma, C., Dai, X., Huang, L., Liu, Y., Zhang, L., & Qin, C. (2009). miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation. *Brain Research Bulletin*, *80*(4–5), 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.08.006>
- Watson, C. N., Belli, A., & Di Pietro, V. (2019). Small non-coding RNAs: New class of biomarkers and potential therapeutic targets in neurodegenerative disease. *Frontiers in Genetics*, *10*(APR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00364>
- Watson, J., Khaled, A. R., Wyllie, A. H., Zha, J., Vanderheiden, M. G., Liu, A., Nielsen, B. S., Liu, Q., Johnson, D. E., Blalock, W. L., Devireddy, L. R., Rock, K., Czech, M., Corvera, S., & Zapp, M. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, *293*(August), 834–838. <https://doi.org/10.1126/science.1062961>
- Weng, L. P., Brown, J. L., & Eng, C. (2001). PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways. *Human Molecular Genetics*, *10*(3), 237–242. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.3.237>
- Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M., & Huang, D. C. S. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes and Development*, *19*(11), 1294–1305.

<https://doi.org/10.1101/gad.1304105>

- Yang, C. chun, Wei, X. pin, Fu, X. ming, Qian, L. tao, Xie, L. jun, Liu, H. bo, Li, G., Li, X. gang, & Zeng, X. wei. (2021). Down-regulating microRNA-20a regulates CDH1 to protect against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Cell Cycle*, *20*(1), 54–64. <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1856498>
- Yang, T., Song, J., Bu, X., Wang, C., Wu, J., Cai, J., Wan, S., Fan, C., Zhang, C., & Wang, J. (2016). Elevated serum miR-93, miR-191, and miR-499 are noninvasive biomarkers for the presence and progression of traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry*, *137*(1), 122–129. <https://doi.org/10.1111/jnc.13534>
- Yekta, S., Shih, I. H., & Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, *304*(5670), 594–596. <https://doi.org/10.1126/science.1097434>
- Zeng, Y., & Cullen, B. R. (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *Rna*, *9*(1), 112–123. <https://doi.org/10.1261/rna.2780503>
- Zhong, L., Yan, J., Li, H., & Meng, L. (2021). HDAC9 silencing exerts neuroprotection against ischemic brain injury via miR-20a-dependent downregulation of NeuroD1. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.544285>
- Zhou, L., Yang, L., Li, Y. J., Mei, R., Yu, H. L., Gong, Y., Du, M. Y., & Wang, F. (2018). MicroRNA-128 protects dopamine neurons from apoptosis and upregulates the expression of excitatory amino acid transporter 4 in Parkinson's disease by binding to AXIN1. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *51*(5), 2275–2289. <https://doi.org/10.1159/000495872>
- Zhu, F., Liu, J., Li, J., & Xiao, F. (2014). MicroRNA-124 (miR-124) regulates Ku70 expression and is Correlated with Neuronal Death Induced by Ischemia / Reperfusion. *Journal of Molecular Neuroscience*, *124*(52), 148–155. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0155-9>