

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismu



Matěj Běhounek

Buněčnou smrt regulující microRNA a jejich role ve vývoji a patologických procesech
Cell death-regulating micro-RNAs and their role in the development and pathological
processes

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ladislav Anděra, Csc.

Praha, 2013

Poděkování: Děkuji svému školiteli RNDr. Ladislavu Anděrovi, Csc. za cenné rady a především za obrovskou trpělivost a věnovaný čas. Dále děkuji své rodině a přátelům za to, že mne podrželi a věřili mi nejen při psaní bakalářské práce.

Prohlášení:

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

V Praze, 22.8. 2013

Matěj Běhounek

Abstrakt

MikroRNA jsou malé protein nekódující dsRNA dlouhé ~22 nukleotidů. Jejich hlavní úlohou je potlačovat genovou expresi pomocí odstranění/destabilizace mRNA či její degradace. Tyto malé RNA hrají významnou roli v regulaci mnoha buněčných procesů a bylo zjištěno, že ovlivňují expresi více než 30 % lidských genů. Mezi procesy, na které mají vliv, patří i programovaná buněčná smrt. Třebaže je tato práce zaměřena zejména na analýzu a charakterizaci role miRNA v regulaci apoptotické buněčné smrti, miRNA se mohou účastnit regulace i autofagické buněčné smrti či programované nekrózy. MiRNA mohou zvyšovat citlivost buněk k apoptóze potlačením exprese genů receptorů smrti, ale mohou také působit přímo pro-apoptoticky regulací exprese např. anti-apoptotického proteinu Bcl-2. V mnoha různých organismech jsou popsány tisíce miRNA a desítky z nich se účastní regulace buněčné smrti. Špatná, či narušená funkce miRNA, a s tím související změna signálů v apoptóze, vede k mnoha patologickým procesům, například k tumorigenezi či špatnému vývoji a homeostázi tkání. Pochopení, jak miRNA funguje v buněčné smrti, a případná praktická aplikace těchto znalostí by mohlo vést k významnému pokroku v léčení rakoviny, infarktu myokardu nebo jiných patologických stavů.

Klíčová slova: miRNA, apoptóza, genová exprese, translace, buněčná smrt, rakovina

Abstract

MicroRNAs are small protein non-coding, ~ 22 nucleotides long dsRNAs. Their main task is suppression of gene expression via removal/destabilization of mRNA or its targeting to degradation. These small molecules play an important role in the regulation of many cellular processes and have been found to affect expression of more than 30% of human genes. Among the processes affected or regulated by miRNAa belongs also programmed cell death. Although this work is mainly focused on the analysis and characterization a role of distinct miRNAs in the regulation of apoptotic cell death, miRNAs can also participate in the regulation of autophagic cell death or programmed necrosis. MiRNA can enhance cellular sensitivity to apoptosis by suppressing the expression of death receptor genes, but can also drive cells to apoptosis by regulating expression of anti-apoptotic protein Bcl-2. In many different organisms were already discovered and described thousands of micro RNAs anddozens of them participate in the regulation of cell death. Poor or impaired function of miRNAs and related disturbance in apoptotic signaling could lead to a number of pathological processes as tumorigenesis or disturbances in tissue development and homeostasis. . Understanding how miRNA functions in cell death and possible practical applications of these findings could bring substantial advancements in treating cancer, myocardial infarction, or other pathological conditions.

Key words: miRNA, apoptosis, gene expression, translation, cell death, cancer

Seznam zkratek

(d)ATP	(deoxy)Adenosine-5'-triphosphate
3'UTR, 5'UTR	3' a 5' Untranslated region, nepřekládaná oblast
Ago2	Argonaut 2
AIF	Apoptosis inducing factor
AKT	Protein kinase B
AML	Acute myeloid leukemia
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BH3	Bcl-2 homology 3 doména
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
Bik	Bcl-2-interacting killer
Bmf	Bcl-2-modifying factor
bp	Base pair, pár báží
CAD	Caspase-activated DNase
CARD	Caspase activation and recruitment domain
c-FLIP	Cellular FLICE-inhibitory protein
CLL	Chronic lymphocytic leukemia
CMPC	cardiomyocyte progenitor cell
DAG	Diacylglycerol
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region Gene 8
DISC	Death-inducing signaling complex
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
EndoG	Endonukleáza G
FADD	Fas-associated death domain
FAP-1	Fas-associated phosphatase-1
GJA1	Gap junction alpha-1 protein; Konexin 43
GLUL	Glutamate-ammonia ligase
Hrk	Activator of apoptosis harakiri
HSP60/70	Heat shock protein 60/70
HtrA2	High temperature requirement protein A2
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
ICAD	Inhibitor of caspase-activated DNase
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IKK	I κ B kinase
KCNJ2	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2
LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain3
Mcl-1	Myeloid cell leukemia-1
miR, miRNA	microRNA
miRISC	miRNA navázaná na komplex RISC

mPTP	Mitochondrial Permeability Transition
mTOR	Mammalian target of rapamycin
Noxa	Latinsky "poškození"
NPC	nasopharyngeal carcinoma
nt	nuklotid
PPARδ	Peroxisome proliferator-activated receptor delta
pre-miRNA	Prekurzorová miRNA
pri-miRNA	Primární miRNA
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
PYGL	Glycogen phosphorylase
RIP1/3	Receptor-interacting protein
RISC	RNA-induced silencing complex
ROS	Reactive oxygen species
SIRT1	NAD-dependent deacetylase sirtuin-1
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pl
ssRNA, dsRNA	Single stranded, double stranded RNA
TAB2/3	TAK1 binding protein 2 or 3
TAG	Triacylglycerol
TAK1	Transforming growth factor- β -activated kinase-1
tBid	Truncated Bid, zkrácený Bid
TBP	TATA-binding protein
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TNFα, β	Tumor necrosis factor α , β
TRADD	TNFR-associated death domain
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
TRAILR	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor
TSA	Trichostatin
WT1	Wilms tumor protein
XIAP	X-linked IAP

Obsah

1. Úvod.....	9
2. miRNA.....	9
2.1. Biosyntéza miRNA – jaderné zpracování	9
2.2. Biosyntéza miRNA – cytoplazmatické zpracování	11
2.3. Mechanismus aktivity miRNA.....	11
2.4. Značení miRNA.....	12
3. Buněčná smrt.....	13
3.1. Apoptóza	13
3.1.1. Tumor supresor p53	14
3.1.2. Vnější dráha apoptózy	14
3.1.3. Vnitřní dráha apoptózy.....	15
3.1.4. Kaspázy	17
4. miRNA v apoptóze	19
4.1. miRNA u <i>Caenorhabditis elegans</i> a <i>Drosophila melanogaster</i>	19
4.1.1. Role miRNA u <i>Caenorhabditis elegans</i> , prvně objevené miRNA	19
4.1.2. Role miRNA u <i>Drosophila melanogaster</i>	20
4.2. miRNA u savců, především u člověka a myši.....	21
4.2.1. Pro-apoptotické miRNA	21
4.2.1.1. miR-1	21
4.2.1.2. miR-15, miR-16-1 klastr.....	22
4.2.1.3. miR-15	24
4.2.1.4. miR-34a	24
4.2.1.5. miR-200c.....	25
4.2.1.6. miR-133	25
4.2.2. Anti-apoptotické miRNA	26
4.2.2.1. miR-17-92 klastr	26
4.2.2.2. miR-106-25 klastr.....	27
4.2.3. miRNA s pro- i anti-apoptotickou funkcí.....	28
4.2.3.1. miR-181	28
5. miRNA v některých dalších typech buněčné smrti.....	29
5.1. miRNA v nekrotické buněčné smrti.....	29

5.1.1.	Signální kaskáda programované nekrózy	29
5.1.2.	Programovaná nekróza a miRNA	30
5.2.	miRNA v autofagické buněčné smrti	30
5.2.1.	Regulace autofagické buněčné smrti	31
5.2.2.	Autofagická buněčná smrt a miRNA	31
6.	Viry, miRNA a apoptotická signalizace	32
7.	Diskuze a závěr	32
8.	Použitá literatura	34

1. Úvod

Relativně nedávno objevené protein nekódující malé dsRNA (~22 nt) nazývané mikroRNA (miRNA, miR) hrají důležitou roli v regulaci buněčných procesů. Jejich hlavní úlohou je potlačovat genovou expresi na úrovni dostupnosti mRNA pro translaci. Mikro RNA se podílí na vývoji, přežití, proliferaci a buněčné smrti buňky. Deregulace jejich exprese může přispívat k mnohým patologickým projevům, jako například nádorové transformaci či proliferaci, nebo špatnému vývoji tkání. Od roku 1993, kdy byly poprvé objeveny u *Caenorhabditis elegans*, se jejich počet rozrostl na stovky objevených miRNA v mnoha organismech, z nichž desítky miRNA participují v regulaci buněčné smrti. Tato práce přehledně nastiňuje problematiku buněčnou smrt regulujících miRNA. Tyto miRNA buď přímo ovlivňují expresi proteinů účastnících se apoptotické signalizace v lidských či myších buňkách, nebo mají nepřímý vliv skrze regulaci exprese různých transkripčních faktorů nebo jiných proteinů dále ovlivňujících buněčnou smrt.

2. miRNA

Vlastní funkční miRNA jsou 18-24 nukleotidů (nt) dlouhé jedno-řetězcové molekuly nekódující RNA, které regulují expresi genů na post-transkripční úrovni. Hrají velice důležitou roli v regulaci buněčných procesů, ať se jedná o přežití, růst, diferenciaci nebo její buněčnou smrt. Naváže na základě částečné komplementarity na vazebná místa na mRNA a několika mechanismy může zabránit jejich překlada na protein. Dle bioinformatických předpovědí mohou savčí miRNA regulovat kolem 30 % - 60 % všech kódujících genů (Filipowicz *et al.* 2008, Friedman *et al.* 2009). miRNA se častěji účastní regulace těch genů, jejichž transkripce je ovlivněna více transkripčními faktory (Cui *et al.* 2007).

2.1. Biosyntéza miRNA – jaderné zpracování

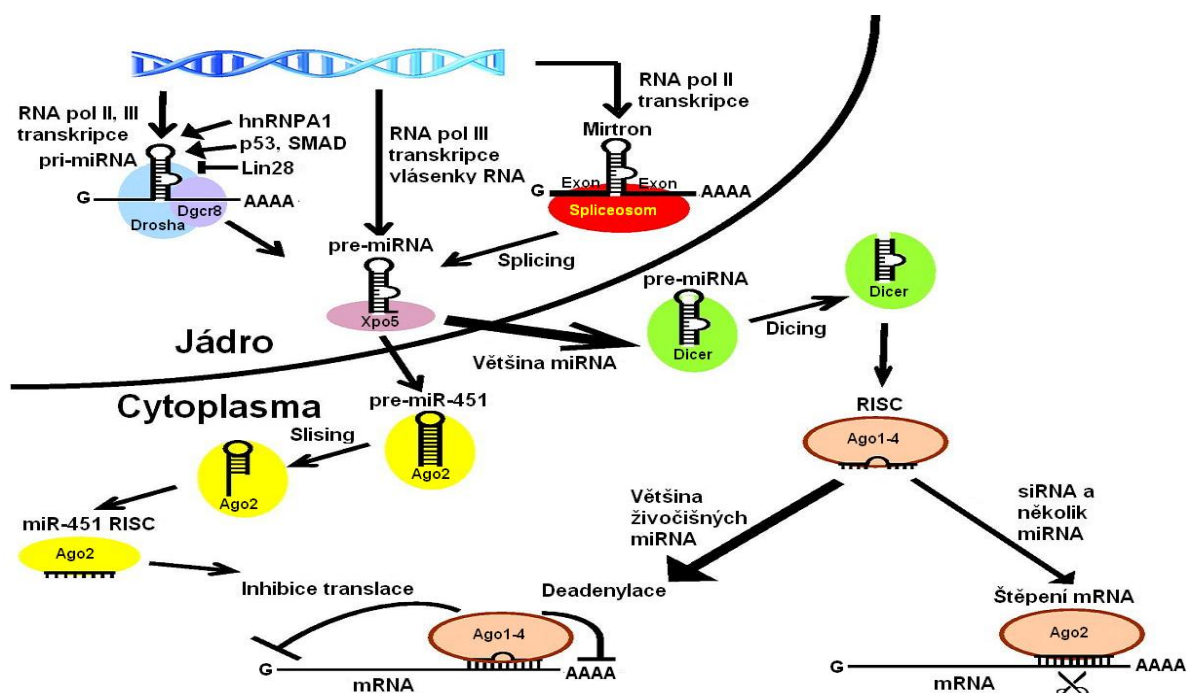
Geny pro miRNA jsou umístěné ve všech částech genomu. Vyskytují se samostatně mezi protein kódujícími geny, pak je označujeme jako intergenické miRNA, nebo jsou na genomu umístěny uvnitř protein kódujícího genu – nazývané intragenické. Intragenické miRNA mohou být kódovány v intronu, v exonu, dokonce i v 3' a 5' nepřekládaných oblastech (3'-, 5'UTR). Dle recentních analýz patří většina miRNA do intergenických (42 %) a do intronických (44 %) (Wang 2010, Olga *et al.* 2011). V srpnu roku 2012 bylo na stránce <http://www.mirbase.org> uváděno 1600 prekurzorových a 2042 maturovaných lidských miRNA. miRNA ležící uprostřed genu mají stejnou regulaci jako příslušný gen, v němž leží. Geny pro miRNA mohou být transkribovány jako jednotlivé geny (vznikají monocistronní transkripty), nebo se gen jedné miRNA vyskytuje blízko genu pro jinou miRNA a vznikají polycistronní transkripty. Často se takto společně transkribované miRNA označují pojmem „cluster“ (klastr) (Lee *et al.* 2002). Například gen pro *miR-17-92* klastr, u člověka na chromozomu 13, kóduje šest různých miRNA.

Geny miRNA jsou v největší míře transkribovány RNA polymerázou II (Lee *et al.* 2004). Našly se ale také miRNA, které jsou přepisovány RNA polymerázou III. Jejich geny leží u lidí poblíž genů pro tRNA nebo jsou obklopeny Alu sekvencemi či jinými sekvencemi transkribovanými RNA polymerázou III (Borchert *et al.* 2006).

Primární transkript miRNA vzniklý RNA polymerázou II se označuje pri-miRNA. Vzniklé transkribované vlákno RNA je jako jiné produkty RNA polymerázy II opatřeno čepičkou, poly(A) koncem a je také sestřiháváno. Tato pre-miRNA dosahuje velikosti až několik stovek nukleotidů. Budoucí miRNA se nachází uvnitř 60-80 nt dlouhé sekvence, která se složila do podoby vlásenky s terminální smyčkou, dvěma nestrukturovanými jedno-řetězcovými konci a dvou-řetězcovým úsekem (obvykle ~33 páru bází), který je rozdělen helikázovou smyčkou na ~11 bp a ~22 bp (Kim 2005). Pri-miRNA je dále zpracována mikroprocesorovým komplexem. Hlavními komponenty komplexu jsou Drosha, patřící do rodiny RNáz III, a DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8 (DGCR8/Pasha). DGCR8 rozezná a vytvoří spojení s ssRNA-dsRNA na pri-miRNA. Zároveň se ukotví na ~33 bp dlouhý úsek. Poté se do komplexu zapojí Drosha protein, který sám neumí rozpoznat RNA. Štěpení molekuly pri-miRNA je navedeno pozicí DGCR8. Dochází k němu ~11 bp od rozhraní ssRNA-dsRNA. Po štěpení vzniká prekurzorová miRNA (pre-miRNA), molekula dlouhá ~65 nt s 2 nt přesahem na 3'konci (Han *et al.* 2006) – viz Obr.1.

Intronové miRNA, též zvané mirtrony získávají charakteristiky pre-miRNA po vystřížení z primárního transkriptu, odstranění místa větvení z lariátové struktury a následném sbalení a obcházejí tak úpravu enzymem Drosha (Ruby *et al.* 2007).

Vzniklé pre-miRNA jsou z jádra do cytoplazmy exportovány Exportinem-5 ve spolupráci s RanGTP (Lund *et al.* 2004).



Obr. 1. miRNA biogeneze. Názorné zobrazení zpracování miRNA od transkripce po umlčení translace. (Převzato a přeloženo z (Yi & E. Fuchs 2011).

2.2. Biosyntéza miRNA – cytoplazmatické zpracování

Vlásenka pre-miRNA je k dalšímu zpracování v cytoplazmě rozeznána dalším enzymem z rodiny RNáz III zvaným Dicer. Dicer obsahuje několik domén. Nejdůležitější pro rozeznání a následné štěpení pre-miRNA jsou PAZ doména, dvě sousedící RNáz III-like domény (RIIIa a RIIIb) a dsRNA vazebná doména (dsRBD). RIIIa a RIIIb společně vytvářejí dimerické katalycké centrum. dsRBD doména rozpoznává nespecificky dsRNA. Nejdůležitější ve zpracování pre-miRNA Dicerem se ukazuje PAZ doména. Fragment diceru (obsahující RIIIa, RIIIb a dsRBD domény) bez této domény nevykazoval žádnou štěpnou aktivitu. PAZ doména (též důležitá u proteinu Argonaut (Ago)) rozeznává konce substrátu s 3' přesahy. Dicer štěpí pre-miRNA molekulu 18-22 nt od 3' konce. Odstraní terminální smyčku (Zhang *et al.* 2004, Soifer *et al.* 2008). Vzniká 22 nt dlouhý miRNA/miRNA* duplex s 2 nt přesahy na 3' koncích. Obě vlákna spolu nepárují zcela dokonale a to vede k jejich nestabilitě.

Jedno vlákno miRNA z duplexu miRNA/miRNA* je zabudováno do komplexu RISC (RNA-induced silencing complex). Vznikne tak výkonný multienzymový komplex miRISC, který následně umlčuje, či degraduje cílovou mRNA. Hlavními komponentami miRISC jsou Dicer, upravující vlákno pre-miRNA; TRBP, dsRNA vázající protein, který navádí protein Ago-2 na miRNA vázanou na Diceru; a Ago protein, který vykazuje endonukleázovou aktivitu a je výkonnou částí miRISC komplexu v umlčování, či degradaci vlákna mRNA. Ago protein má stejně jako Dicer PAZ doménu, která rozpoznává miRNA díky 2 nt přesahům na 3' koncích a obsahuje PIWI doménu, která rozpoznává 5' konec malých RNA. miRNA v miRISC slouží k navádění na cílové mRNA. Jaké vlákno z duplexu miRNA/miRNA* bude zabudováno do RISC, souvisí s nedokonalým párováním. Vlákno miRNA, které má na 5' konci méně stabilní párování bude zabudováno do komplexu. Toto vlákno se nazývá „guide“. Druhé vlákno, označované „passenger“ nebo značené „*“ je následně v buňce degradováno (Gregory *et al.* 2005, Chendrimada *et al.* 2005, Du & Zamore 2005) – viz Obr.1.

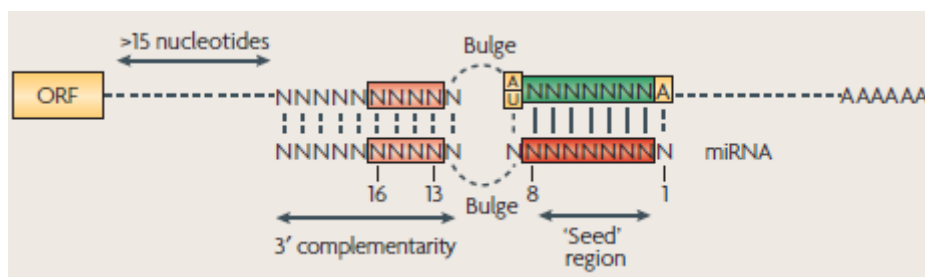
U miR-451 bylo pozorováno, že snížení exprese Diceru nemělo vliv na množství a aktivitu této mRNA. Tato mikroRNA je zabudována a štěpena rovnou Ago proteinem, a poté se tak stává součástí funkčního RISC komplexu (Cheloufi *et al.* 2010). Z hlediska normálního zpracování miRNA se tedy dnes jedná o nestandardní jev.

2.3. Mechanismus aktivity miRNA

Úlohou maturované miRNA zabudované ve struktuře miRISC je navést komplex na konkrétní mRNA, aby mohl inhibovat její translaci, nebo iniciovat její degradaci. Na 5' konci vlákna miRNA se nalézají tzv. „seed“ sekvence. Obvykle je to úsek zahrnující 2 – 8 nukleotidů. Vlákno miRNA se právě touto sekvencí váže na vazebná místa na mRNA – viz Obr. 2. Často se i váže dalšími nukleotidy (Lewis *et al.* 2003). miRNA se naváže na cílovou sekvenci obvykle na 3'UTR. Ovšem v některých případech se tato sekvence vyskytuje v 5'UTR, či dokonce v kódující oblasti. I v takových

případech dochází k represí. Cílová sekvence bývá na mRNA v několika repetitivních kopiích, čímž se zvyšuje efektivita umlčení.

Po navázání miRISC na mRNA dochází k zastavení translace. Ve většině případů je pouze zastavena translace při iniciaci, či elongaci a vlákno mRNA není degradováno (Filipowicz *et al.* 2008). Ale v některých případech dochází k následné deadenylaci, odstranění čepičky a degradaci vlákna mRNA (Standart & Jackson 2007). Děje se tak ve strukturách P-bodies (processing bodies) obsahujících vysokou koncentraci enzymů a faktorů ovlivňujících obrat mRNA a její translační represí (Chan & Slack 2006). Protože je seed sekvence celkem krátká a může v ní docházet k jednonukleotidovým polymorfismům, může mít jedna miRNA za cíl stovky mRNA a jedna mRNA může být cílená několika miRNA (Sun *et al.* 2009, Lim *et al.* 2005). Za určitých okolností může miRNA zvyšovat translaci. Děje se tak u lidské miR-369-3 a mRNA *TNF α* (tumor necrosis factor α) během zastavení buněčného cyklu. Navázání seed sekvence na mRNA *TNF α* je podmínkou pro navedení komplexu Ago2-FXR1, který následně pomáhá zvýšení translace (Vasudevan *et al.* 2007).



Obr. 2. Princip mikroRNA-mRNA interakce. Na obrázku vidíme mikroRNA navázanou na mRNA pomocí své seed sekvence na 5' konci (převzato a upraveno z Filipowicz *et al.* 2008).

K predikci hlavních cílů miRNA lze použít programy The Pictar (<http://www.pictar.org>), TargetScan (<http://targetscan.org>) a MiRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>). Ovšem je nutné je poté prakticky ověřit. Seznam dosud známých miRNA lze dohledat na <http://www.mirbase.org>.

2.4. Značení miRNA

Označení miRNA dává více informací, než pouze jméno. Máme-li lidskou miR-101. Její celé označení je hsa-miR-101. Předpona ukazuje, u jakého organismu ji najdeme (např. hsa – *Homo sapiens*, dme – *Drosophila melanogaster*...). Pokud máme stejnou miRNA u myši a člověka: hsa-miR-101 a mmu-miR-101, lze o nich říct, že jsou ortologní. Stejně tak můžeme rozpoznat dle přípony paralogní sekvence lišící se v jedné až dvou pozicích: mmu-miR-10a a mmu-miR-10b u myši. Některé miRNA jsou označena za názvem příponou -3p, -5p, příkladem u miR-17-5p a 17-3p, která znamená, že dvě různé maturované miRNA vznikly ze sekvencí na 5' a 3' raménkách jedné prekurzorové miRNA (Griffiths-Jones *et al.* 2006).

3. Buněčná smrt

Buněčná smrt je nedílnou součástí života. Pomáhá tělu ve vývoji. Usmrcení buněk je důležité při vývoji, při vytváření prstů, slinných žláz, odstranění ocasu u žab, při vývoji buněk imunitního systému, při vývoji orgánů, ve chvíli, kdy je buňka napadena virem nebo bakterií. Důležité je také usmrtit buňku, která je poškozená v důsledku různých fyzikálních a chemických vlivů (UV rážení, radiace, toxiny...) vyvolávajících v buňce defekty. Taková buňka by mohla být nebezpečná pro okolní tkáň a je nutné se jí zbavit. Poruchy regulace buněčné smrti vedoucí k nežádoucí buněčné smrti, nebo naopak vedoucí k neschopnosti buňky aktivovat buněčnou smrt, jsou spojeny s mnoha patologickými stavy, jako jsou nádorová onemocnění, autoimunitní onemocnění, virové infekce, sepse, ischemie, neurodegenerativní onemocnění, špatné hojení a regenerace tkání (Fuchs & Steller 2011, Abud 2004).

Existuje několik typů buněčné smrti. Často se setkáme s rozdělením na tři typy programované buněčné smrti. Typ I je označován jako apoptóza, typ II jako autofagická buněčná smrt a typ III jako nekrotická buněčná smrt (nekróza).

3.1. Apoptóza

Apoptóza byla poprvé pojmenována a její charakteristiky poprvé shrnuty v roce 1972 (Wide & Kinetics 1972). I když první zmínka o tomto fenoménu pochází z roku 1842 (Lawen 2003, dle Vogt 1842). Název pochází ze starořeckého výrazu *ἀπόπτωσις* (apó – z, od + ptosis – padání) užívaného pro pojmenování padání listů ze stromů. Apoptóza se vyznačuje tvorbou malých kulatých fragmentů cytoplasmy s membránou obsahující zbytky jádra – takzvaná apoptotická tělíška. Ta jsou následně fagocytována ostatními buňkami. Tomu předchází kondenzace cytoplasmy a organel, chromatin se shlukuje na jadernou membránu a jádro je fragmentováno. Kondenzace chromatinu a tvorba apoptotických tělíšek je pro apoptózu charakteristická (Wide & Kinetics 1972) .

Rozeznáváme dvě hlavní dráhy, kterými je apoptóza řízena a aktivována: vnější a vnitřní dráhu. Vnější dráha zprostředkovává signály smrti přicházející ze stimulů vně buňky a v savcích buňkách je například zprostředkována tzv. receptory smrti. Po jejich aktivaci ligandem dochází ke spuštění signální sekvence vedoucí k aktivaci specifických proteáz – kaspáz a následnému štěpení buněčných komponent a kompartmentů a smrti buňky. Takové ligandy (například FasL, TNF- α a jiné) produkují např. buňky imunitního systému reagující na virovou infekci (Ashkenazi & Dixit 1998). Vnitřní dráha reaguje na vnitřní stav buňky. Hlavní úlohu v ní hrají mitochondrie a s ní spojené proteiny, jako jsou proteiny rodiny Bcl-2, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF (Apoptosis-inducing factor) a jiné. Také reaguje na absenci pro přežití nezbytných signálů, na radiaci, toxiny, hypoxii, překrvení, virovou infekci a volné radikály (Elmore 2007).

3.1.1. Tumor supresor p53

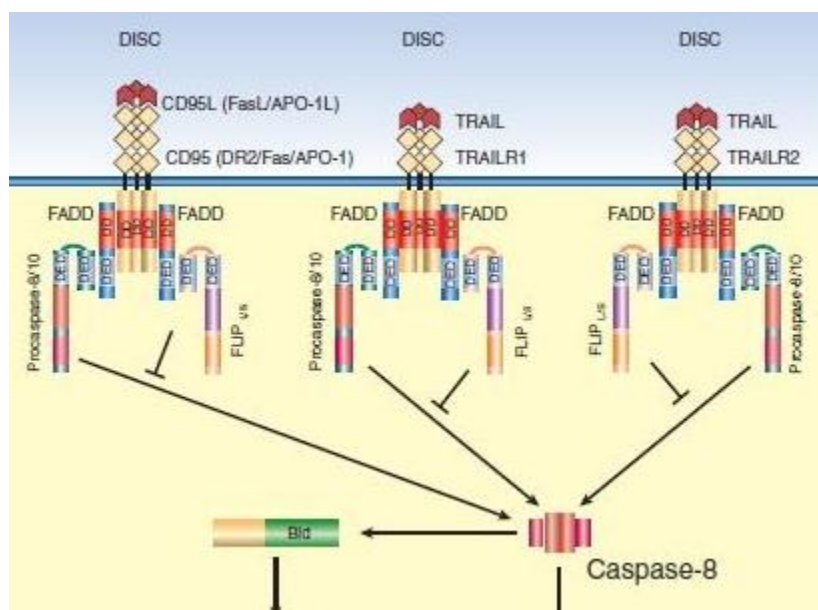
p53 je transkripční faktor, který ovlivňuje expresi mnoha genů. Buď sám vystupuje jako transkripční faktor, nebo ovlivňuje jiné transkripční faktory fungující u jiných genů. Existuje mnoho stresů, které vedou k jeho aktivaci, mezi nimi například ROS (Reactive oxygen species), nízké extracelulární pH, teplota a hypoxie. Důležitou roli hraje p53 v buněčném cyklu při kontrole, zda je DNA nepoškozená. Poškozená DNA je signál vedoucí k zastavení buněčného cyklu a v závislosti na míře poškození DNA může p53 vedle zástavy buněčného cyklu aktivovat i apoptózu. P53 je jedním z nejdůležitějších nádorových supresorů a je mutován či inaktivován u téměř všech nádorových onemocnění (Junttila & Evan 2009).

Jako transkripční faktor aktivuje expresi mnoha pro-apoptotických proteinů, mezi které zejména patří BH3-obsahující proteiny Puma a Noxa, pak také Bax, CD95, DR5, ApaF1 a další (Benchimol 2001).

Apoptózu ovlivňuje i tak, že aktivuje některé miRNA, které dále ovlivňují signalizaci v apoptóze snad na všech úrovních. p53 může některé miRNA aktivovat přímo jako jsou miR-34a (Raver-Shapira *et al.* 2007), miR-17-92 klastr (Yan *et al.* 2009) a některé aktivuje působením na proteiny nutné k maturaci miRNA (let-7, miR-143, miR-145 miR-16 a jiné) (Boominathan 2010).

3.1.2. Vnější dráha apoptózy

Vnější dráha apoptózy začíná aktivací receptorů smrti navázáním ligandu. Receptory smrti jsou homotrimerní transmembránové proteiny patřící do proteinové rodiny značené TNFR (Tumor necrosis factor receptors) a mají za úkol zprostředkovat přenos apoptotického signálu z vnějšího prostředí dovnitř buňky. U všech nalezneme N-terminální extracelulární domény bohaté na cystein. Ligand se nejčastěji váže na druhou a třetí cystein bohatou doménu (Locksley *et al.* 2001). V cytosolické části membrány se pak nachází doména smrti (DD, Death domain) (Ashkenazi & Dixit 1998).



Obr. 3. Vnější dráha apoptózy. Aktivace receptorů smrti vede k aktivování kaspázy-8 (převzato a upraveno z Lavrik *et al.* 2005).

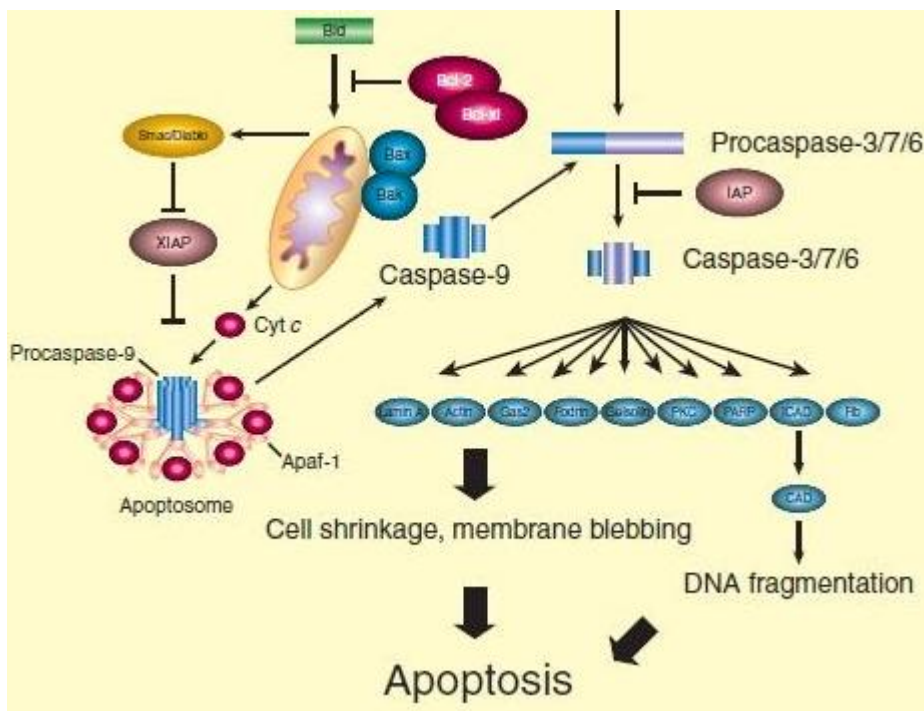
Existují dva způsoby přenosu signálu dovnitř do buňky pomocí receptorů smrti. První z nich zahrnuje DISC (Death-inducing signaling complex) formovaný na CD95 receptoru nebo TRAILR1/R2. Navázání ligandu (FasL, respektive TRAIL) způsobí trimerizaci DD receptorů, na které se svou DD váže adaptorový protein FADD (Fas-associated death domain). FADD má dále ještě další doménu – DED (Death effector domain). Stejnou doménu nese prokaspáza-8 a prokaspáza-10. Právě touto doménou se k sobě naváží prokaspázy a FADD. Celý tento komplex je nazýván DISC. Zvýšená lokální koncentrace prokaspáz-8 vede k autoproteolytickému štěpení, z kterého nakonec vyjde aktivovaná iniciační kaspáza-8. Stejně tak vzniká ze své neaktivní formy kaspáza-10. Kaspáza-8 pak buď přímo aktivuje efektorovou kaspázu-3, nebo dochází ke štěpení proteinu Bid na zkrácený (truncated, t) tBid. tBid vede signál vedoucí až k uvolnění cytochromu c z mitochondrie, formování apoptozomu. Apoptozom aktivuje kaspázu 9, která může následně aktivovat efektorové kaspázy (Lavrik *et al.* 2005).

Druhý způsob nalezneme u TNFR a DR3 signalizace. Po navázání ligandu (TNF, respektive Apo3L) opět dochází k trimerizaci DD receptoru. Ovšem naváže se adaptorový protein TRADD (TNFR-associated death domain). TRADD je schopný zprostředkovat vazbu s TRAF2 (TNFR-associated factor-2) a RIP1 (Receptor-interacting protein kináza), které dále stimulují dráhy vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů NF- κ B a JNK/AP-1. (Ashkenazi & Dixit 1998). V případě blokované kanonické NF- κ B signalizace může vzniknout tzv. sekundární DISC obsahující RIP1, TRADD, FADD a prokaspázu 8 a obdobně jako u receptorového DISCu umožnit autoproteolytickou aktivaci kaspázy-8 a -10 (Wang *et al.* 2008).

3.1.3. Vnitřní dráha apoptózy

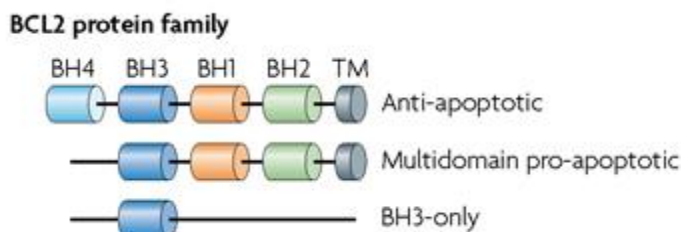
Vnitřní apoptotická dráha je aktivována zejména stresovými podněty (poškození DNA, organel, oxidativní prostředí apod.) a hlavní roli při její aktivaci hrají mitochondrie. Jsou to právě tyto organely, které reagují na mnoho stresů a přímo se účastní smrti uvnitř buňky (Liu *et al.* 1996). Aktivace této vnitřní apoptotické signalizace je zejména spojena s permeabilizací vnější mitochondriální membrány (mitochondria outer membrane permeabilization, MOMP) a s uvolněním pro-apoptotických proteinů - cytochromu c, proteinů Smac/DIABLO, htrA2/Omi, AIF, EndoG, CAD z mezimembránového prostoru. Nejvýznamnějšími proteiny ovlivňující MOMP jsou proteiny rodiny Bcl-2.

Všechny proteiny rodiny Bcl-2 obsahují jednu až čtyři různé BH domény, sloužící zejména k jejich vzájemné interakci. Můžeme je rozdělit na multidoménové anti-apoptotické a pro-apoptotické a BH3-only proteiny. Mezi anti-apoptotické patří Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1. Do pro-apoptotických řadíme vícedoménové Bax, Bak a Bok a BH3-only proteiny Bim, Puma, Noxa, Bik, Bmf, Hrk, Bid. Úloha BH3 proteinů je přenos apoptotických signálů a to kompetitivní inaktivací antiapoptotických a aktivací proapoptotických proteinů Bak, Bax a vytvořením póru ve vnější mitochondriální membráně (Giam *et al.* 2008).



Obr. 4. Vnější dráha apoptózy. Na obrázku vidíme mitochondrii, apoptotické proteiny, apoptozom, cíle kaspáz (převzato a upraveno z Lavrik et al. 2005).

Cytoplasmatický Bak a na mitochondriální membráně umístěný Bax jsou proteiny schopné po aktivaci vytvořit v membráně póry nutné k uvolnění mnoha dalších pro-apoptických proteinů z mezimembránového prostoru. Oba jsou běžně inhibovány anti-apoptickými členy Bcl-2. Ty se na ně vážou a znemožňují tak jejich aktivaci a vytváření poru ve vnější mitochondriální membráně. BH3-only proteiny působí i tak, že dokážou vyvádat pro-apoptické Bak a Bax z jejich inhibitorů. Například Noxa se váže na Mcl-1; Hrk na Bcl-x_L; Bim, Bid a Puma se mohou vázat na všechny anti-apoptické Bcl-2 členy (Brunelle & Letai 2009). jedním ze signálů pro aktivaci vnitřní apoptotické signalizace je také ztráta signálu pro přežití zprostředkovaného např. některými cytokiny (Wang et al. 2004).



Obr. 5. Grafické znázornění BH3 domén Bcl-2 proteinové rodiny (zdroj http://www.nature.com/nrm/journal/v9/n5/box/nrm2393_BX1.html)

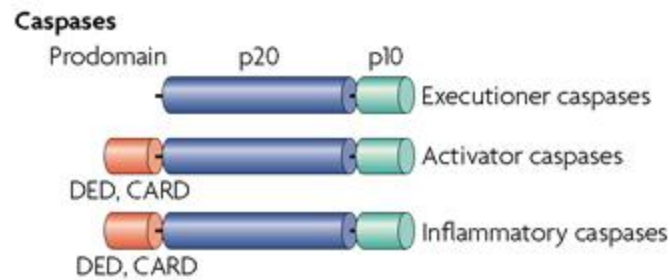
Ve chvíli, kdy dojde k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány u všech či většiny mitochondrií, není možné buněčnou smrt zastavit. Z mitochondrie se uvolní cytochrom c, který aktivuje vznik apoptozomu a následnou aktivaci kaspázy 9 následovanou aktivací efektorových kaspáz

(např. kaspázy 3). Kromě cytochromu c se z mitochondrií uvolňují i další proteiny. Mezi nimi je Smac/DIABLO a HtrA2/Omi, proteiny, které mohou blokovat funkci tzv. inhibitorů kaspáz z IAP rodiny (např. XIAP) a tím a tím umožnit hladký průběh apoptózy. Mezi další proteiny uvolňované v průběhu apoptózy z mitochondrií dále patří AIF (Apoptosis inducing factor) a endonukleáza G (EndoG), které po translokaci do buněčného jádra způsobují kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA (Shiozaki & Y. Shi 2004).

3.1.4. Kaspázy

Kaspázy jsou vysoce efektivní cysteinové proteázy, které hrají významnou roli jak v počátečních tak i v pozdějších a závěrečných fázích apoptózy a jsou součástí její vnitřní i vnější dráhy. Aktivované kaspázy cíleně štěpí a aktivují, či inaktivují plejádu buněčných proteinů včetně dalších proteáz. Jejich název je odvozen z jejich funkce, z anglického „Cystein-dependent aspartate-directed proteases“ – Caspases. Kaspázy štěpí substrát za aspartátem aktivním místem obsahujícím cystein. Všechny kaspázy jsou syntetizované ve formě zymogenu nazývaného prokaspáza. Prokaspázy (30-50 kD) obsahují tři domény – NH₂ terminální doménu, velkou (~20 kD) a malou (~10 kD) podjednotku. Aktivace na funkční kaspázu zahrnuje proteolytickou úpravu mezi doménami, následovanou asociací velké a malé podjednotky, které vytvoří heterodimer. Dojde tak k odhalení katalytického místa kaspázy. Aktivní např. efektorová kaspáza 3 je tetramer složený ze dvou malých a dvou velkých podjednotek a obsahující dvě katalytická místa (Thornberry & Lazebnik 1998). Kaspázy nebo jejich homology nacházíme u všech studovaných mnohobuněčných organismů. Ortology kaspáz – metakaspázy se vyskytují i v kvasinkách či v rostlinných buňkách (Shiozaki & Y. Shi 2004).

První homolog kaspázy byl nalezeny u *C. elegans*. Jedná se o cysteinové proteázy CED-3, mající stejnou funkci jako kaspázy u člověka. Kaspázy důležité v apoptóze jsou rozděleny do dvou kategorií: iniciační a efektorové. Mezi iniciační kaspázy patří kaspáza-2, -8, -9 a -10. Tyto prokaspázy s funkční pro-doménou jsou aktivované autokatalyticky a/nebo se aktivují vzájemně v komplexech jako je DISC nebo apoptozom, a jejich hlavním údělem je aktivovat efektorové kaspázy. Jejich rozšířená N-terminální prodoména (>90 aminokyselin) obsahuje motivy nutné k navázání k dalším proteinům. U kaspázy-8 a -10 jsou tímto motivem DED doména sloužící k navázání na FADD a u kaspázy-2 a -9 CARD doména, která například u kaspázy-9 slouží k navázání do apoptozomu na CARD doménu proteinu Apaf-1. Efektorové jsou kaspáza-3, -6 a -7. Jejich krátká N-koncová prodoména obsahuje 20-30 aminokyselin (Shi 2002).



Obr. 6. Kaspázy se znázorněnými doménami. (zdroj http://www.nature.com/nrm/journal/v9/n5/box/nrm2393_BX1.html)

Efektorové kaspázy mohou být aktivovány i jinak, než iniciátorovými kaspázami. Například granzymem B, což je serin-threonin proteáza vpravená do buňky cytotoxickými T-lymfocyty a NK buňkami pomocí perforinu. Ty takto často reagují na virově napadené buňky. Nejenže může aktivovat kaspázy, ale rozeznává i některé jejich substráty, jako je například DNA-PK, či ICAD. Aktivované efektorové kaspázy štěpí buněčné struktury (aktin, nebo jaderna lamina), regulační proteiny (DNA dependentní protein kináza – DNA-PK), inhibitory deoxyribonukleáz (ICAD - inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease), a jiné proteiny a kaspázy. Odstraněním inhibitoru může CAD fragmentovat DNA a mnoho dalších proteinů účastnících se rozebírání buňky a jádra. Ve výsledku dochází k destrukci jádra, kondenzaci chromozomů a rozpad buňky do apoptotických tělísek (Shi 2002, Robertson *et al.* 2000).

4. miRNA v apoptóze

4.1. miRNA u *Caenorhabditis elegans* a *Drosophila melanogaster*

4.1.1. Role miRNA u *Caenorhabditis elegans*, prvně objevené miRNA

První miRNA byla objevena při výzkumu háďátka *C. elegans* roku 1993. Jedná se o miRNA *lin-4*. Již dříve se vědělo, že *lin-4* gen je důležitý při časném larválním vývoji. Háďátka se ztrátou jeho funkce, nebo mutací tohoto genu vykazovala poruchy ve vývojových stádiích. I během pozdních larválních stádií se exprimovaly geny typické pro L1 fázi larválního vývoje – vysoká aktivita či exprese *lin-14* je esenciální pro korektní průběh L1 fáze. *Lin-4*, který snižuje expresi transkripčního faktoru *lin-14*, který je exprimován v L1 fázi a jeho exprese je potlačena v L2 fázi. Postupně se zjistilo, že 3'UTR *lin-14* je nutný pro negativní regulaci. Stejně tak je nutná aktivita *lin-4* genu, který neznámým způsobem inhibuje translaci *lin-14* a vyžaduje při tom 3'UTR. V následných experimentech bylo zjištěno, že nekóduje protein ale malou RNA s transkripty 22 a 61 nt. Tyto jsou pak komplementární k repetitivní sekvenci na 3'UTR *lin-14*. To podporovalo model, ve kterém *lin-4* RNA může regulovat translaci *lin-14* antisense mechanismem (Lee *et al.* 1993).

Druhou objevenou *C. elegans* miRNA je *let-7*, která hraje roli v přechodu z L4 stádia v dospělého jedince. U háďátek s mutovaným genem *let-7* nedocházelo k vytvoření kutikulární alae, struktury vzniklé zastavením buněčného cyklu a splynutím hypodermálních buněk. Tyto buňky se dělily dál, jako tomu je u larválních stádií. Aktivací transkripce *let-7* vedlo k zastavení buněčného cyklu a přechodu *C. elegans* do dospělého stádia. *let-7* ovlivňuje expresi genu *lin-29*. Protein *lin-29* je nalezen u L4 a dospělých stádií u hypodermálních buněk (Pasquinelli *et al.* 2000). *Lin-29* hraje důležitou roli během buněčné smrti spojovacích „linker“ buněk, zvláště při regulaci zajišťující plodnost samců. Mutace v *lin-29* a *let-7* vede k selhání formování struktur samčího reprodukčního systému. Je důležité, aby buňky zemřeli ve správném místě ve správném vývojovém stupni. Spolu s *lin-29* musí existovat ještě další geny, které pomáhají vyvolat buněčnou smrt těchto buněk (Abraham *et al.* 2007).

Dalším příkladem miRNA nalezené u *C. elegans* je miR-34. Vyšší exprese této miRNA se začíná objevovat v L1 stádiu a trvá až stádia dospělého v tkáních jako je hltaň a střevo. Ve vulvě se objevuje miR-34 až ve stádiu dospělosti. Avšak exprimovaná miR-34 se ve vulvě téměř morfologicky neprojevila. Později se zjistilo, že miR-34 může ovlivňovat schopnost odolat ozáření *in vivo*. Vyvolává dva efekty. A to v buňkách zárodečné linie po vystavení ozáření dochází k apoptóze, zatímco v linii s mutovanou miR-34 bylo pozorováno menší množství apoptotických tělísek. Naproti tomu v buňkách vulvy ozáření vyvolalo neapoptotickou reprodukční buněčnou smrt v případě, že je miR-34 přítomná. miR-34 tedy hraje velmi důležitou roli v odpovědi na ozáření *in vivo* (Kato *et al.* 2009).

4.1.2. Role miRNA u *Drosophila melanogaster*

miRNA hraje důležitou roli ve vývoji a regulaci apoptózy u *D. melanogaster*. Existuje několik miRNA, které během vývoje účastní regulace apoptózy. U octomilky existuje několik pro-apoptotických proteinů z RHG rodiny, například *hid*, *reaper*, *grim*, které potlačují expresi inhibitorů kaspáz z rodiny IAP, zejména pak DIAP1/2 a umožňují tak aktivaci apoptotické signalizace. Hid je ale transkribován ale není exprimován na proteinové úrovni i u buněk, které nepodléhají apoptóze. Následně bylo zjištěno, že proteinová exprese *hid* je regulována pomocí miRNA *bantam*, která se váže na 3'UTR *hid*. Exprese *bantam* miRNA je důležitá pro vývoj imaginálních disků, prekursorů orgánů, jako jsou křídla a oči (Brennecke *et al.* 2003). Jeho expresi podporují geny jako je *Yki*. Ten blokuje pro-apoptotický *hid* a tak chrání buňky před apoptózou (Peng *et al.* 2009). Exprese *Bantam* miRNA byla zjištěna také v gliových buňkách (Ying & Padgett 2012).

miR-14 je další miRNA, která u octomilky reguluje buněčnou smrt. Jedinci, kteří postrádají *miR-14*, mají kratší délku života a jsou více citlivé na stresové podněty. *miR-14* také reguluje stabilitu mRNA pro *reaper* a umožňuje tak apoptózu vyvolanou tímto proteinem. U *mir-14* mutantních jedinců byla také více exprimovaná kaspáza Drice. Zajímavé je také spojení mezi *miR-14* a množstvím triacylglycerolu (TAG) a diacylglycerolu (DAG). Delece *miR-14* způsobila zvýšení jejich intracelulární koncentrace, funkční *miR-14* naopak jejich snížení. DAG je důležitým druhým poslem v mnoha signálních drahách a může se také podílet i na indukci apoptózy. Odstranění *miR-14* a některých dalších genů, může být důvodem k DAG zprostředkované buněčné smrti (Xu *et al.* 2003).

U *D. melanogaster* nacházíme i další miRNA podílející se na buněčné smrti. Mezi nimi například u embryí exprimované *miR-6* a *miR-11*, patřící do seed rodiny miR-2. Také tyto dvě miRNA ovlivňují expresi pro-apoptotických genů *rpr*, *grim*, *shl*, *hid*. U mutantních jedinců postrádajících obě tyto miRNA dochází ke značné embryonální letalitě a defektům nervové soustavy (Ge *et al.* 2011).

4.2. miRNA u savců, především u člověka a myši

miRNA lze podle aktivity rozdělit na pro-apoptické a anti-apoptické dle toho, jak působí na expresi iniciačních, efektorových a signalizačních proteinů účastnících se apoptózy. Toto rozdělení může být různé v rámci buněčných typů, v kterých se miRNA nachází. Proto některé miRNA vykazují obě aktivity.

4.2.1. Pro-apoptické miRNA

4.2.1.1. miR-1

miR-1 a miR-133a jsou svalově specifické miRNA. Lidský *miR-1*, *mi-133a* klastř leží na chromozomu 18q11.2 (zdroj: <http://www.ensembl.org>). Je ve velké míře transkribován ve všech typech svalových tkání. Jeho nesprávná exprese vede k poruchám ve vývoji svalů. Velmi usilovně je zkoumán vliv miR-1 ve vývoji a poruchách srdeční tkáně.

Během vývoje kardiomyocytů je miR-1, miR-133 klastř regulován SRF transkripčním faktorem (Serum response factor). Jeho role je vyvažování mezi proliferací a diferenciací buněk během kardiogeneze. Cílem miR-1 je zde gen *Hand2*. Pokud je nedostatek Hand2 proteinu, dochází k selhání rozšiřování ventrikulárních kardiomyocytů a špatnému vývoji srdce (Zhao *et al.* 2005). Nadprodukovaná *miR-1* také zvyšuje v srdci možnost vyvolání arytmie. V některých případech vede zvýšená exprese *miR-1* k post-transkripčnímu potlačení genů *KCNJ2* (kódující podjednotku K_{ir}2.1 K⁺ kanálu) a *GJA1* (kódující konexin 43), to vyvolá zpomalení srdeční činnosti s možností rozvoje arytmie (Yang *et al.* 2007).

Infarkt myokardu je jednou z příčin zvýšení exprese *miR-1* u myších kardiomyocytů. Společně s miR-206 inhibovala translaci IGF-1 (Insulin-like growth faktor 1). V buněčné linii H9C2, ve kterých byla zvýšená hladina miR-1 a v H9C2, ve kterých byl umlčen gen *IGF-1*, byla pozorována vyšší aktivita kaspázy 3. Ovšem kaspáza 3 nemá vazebné místo pro miR-1. Je možné, že miR-1 nepřímo aktivuje kaspázu 3 přes snížení hladiny IGF-1 (Shan *et al.* 2009). Protein IGF-1 hraje také důležitou roli v apoptóze vyvolané dlouhotrvajícím vystavením buněk vysoké hladině glukózy. miR-1 a miR-206 je v důsledku několikahodinové hyperglykemie znatelně transkribovaná a potlačovaly tak expresi proteinů IGF-1 a Hsp60. Hsp60 je anti-apoptický protein, který může reagovat s proteiny Bax, Bak a Bcl-xS a zabránit tak jejich oligomerizaci a následnému uvolnění cytochromu c z mitochondrie (Shan *et al.* 2010, Yu *et al.* 2008).

Na krysím modelu I/R poškození byl nalezen další buněčný cíl miR-1. Vystavení kardiomyocytů oxidativnímu stresu, vyvolaném zvyšující se koncentrací peroxidu vodíku, vedlo k výraznému nárůstu exprese miR-1. To mělo za následek pokles hladiny anti-apoptického proteinu Bcl-2 a vyvolání apoptózy. Na mRNA Bcl-2 se vyskytuje vazebné místo na tuto mRNA (Tang *et al.* 2009).

Stejně jako jiné miRNA regulující apoptózu, nalézáme změněnou expresi *miR-1* u různých nádorových onemocnění. Expze *miR-1* je snížena například v buňkách rakoviny plic (Nasser *et al.* 2008), jater (Datta *et al.* 2008) a nosohltanu (Wu *et al.* 2011).

Exogenní *miR-1* vyvolala apoptózu po transfekci do buněk karcinomu nosohltanu (NPC), stejně tak v buněčných liniích HeLa, Cal-27 a KYSE30, které mají sníženou expresi *miR-1*. Naproti tomu v některých buněčných liniích, které již exprimovali endogenní *miR-1*, transfekce apoptózu nevyvolala. V NPC je buněčným cílem protein PTMA, který se váže na Apaf-1 a znemožňuje tak jeho funkci. PTMA jako cíl *miR-1* byl potvrzen i v dalších buněčných liniích, zahrnujících HeLa, Cal-27 i KYSE30. Samotné inhibování PTMA nevyvolává v buňce apoptózu. Ovšem odstranění tohoto inhibitoru pomocí *miR-1* umožnilo buňkám formaci apoptosomu, kde hraje protein Apaf-1 důležitou roli (Wu *et al.* 2011).

V buněčných liniích rakovin plic bylo jedním z důvodů potlačení expze *miR-1* potlačení transkripčního faktoru C/EBP α . Vazebné místo pro C/EBP α bylo nalezeno v promotoru genů *miR-1-1* i *miR-1-2*. Jedním z buněčných cílů *miR-1* je MET kináza, která hraje roli v prvních krocích vývoje metastáz a FoxP1. Nízká hladina *miR-1* tak přispívá k rozvoji metastáz. (Nasser *et al.* 2008). Dalším mechanismem, kterým v rakovinách plic dochází k potlačení *miR-1* je hypoacetylace histonů, zatímco methylace v této rakovině neměla velkou roli na změnu expze *miR-1*. Po léčbě rakovinných buněk doxorubicinem dochází k opětovné expresi *miR-1* a ve výsledku to způsobuje vyčerpání antiapoptotického proteinu Mcl-1 v buňce a umožňuje buňce spustit apoptózu. Mechanismus, jak *miR-1* působí na Mcl-1 v rakovinných buňkách však zatím není znám (Nasser *et al.* 2008).

Stejně jako v rakovině plic, jsou jedny z cílů *miR-1* u hepatocelulárních karcinomů MEK a FoxP1. Expze *miR-1* vede ke snížení jejich hladiny v buňce a tak potlačuje vývoj a invazivitu karcinomu. Navíc vyvolaná expze *miR-1* v těchto buňkách vede k zastavení buněčného cyklu a následně k aktivaci apoptotické dráhy. Je znám také jeden z mechanismů, který vede k potlačení expze *miR-1* - CpG metylace tohoto genu realizovaná DNA metyltransferázou 1 (Datta *et al.* 2008). *miR-1* je dobrým příkladem různé de/regulace v rámci konkrétní buněčné tkáně.

4.2.1.2. miR-15, miR-16-1 klastr

U většiny pacientů s chronickou lymfocytickou leukémií (CLL) byla nalezena nízká hladina *miR-15a*, *miR-16-1*. Navíc je expze těchto miRNA potlačena i u více než 80% nádorů prostaty (Calin *et al.* 2002). Klastr exprimující tyto miRNA je lokalizován na chromozomu 13q14, přičemž tato část chromozomu je u CLL cílem častých delecí či mutací.

Cimmino *et al.* v roce 2005 zjistili, že hladina *miR-15a* a *miR-16-1* nepřímo souvisí s expresí *Bcl-2* v CLL buňkách. Analýzou homologie mezi těmito dvěma miRNA a *Bcl-2* mRNA sekvencí objevili, že prvních devět nukleotidů z 5' konce obou miRNA (obsahuje seed sekvenci) je komplementárních k *Bcl-2*. Pro ověření této domnělé interakce porovnali hladinu expze *miR-15a* a *miR-16-1* s hladinou proteinu *Bcl-2* u CLL buněk a u zdravých CD5⁺ lymfocytů. Zjistili,

že ve zdravých CD5⁺ lymfoidních buňkách byla hladina obou miRNA vysoká a protein Bcl-2 byl přítomen v malém množství, ve většině CLL buněk tomu bylo naopak. Pro ověření funkce obou miRNA byla MEG-01 buněčná linie s vysokou expresí Bcl-2 stabilně transfekována prázdným vektorem a vektorem exprimujícím obě miRNA. Po vnesení vektoru s oběma miRNA došlo k redukcí hladiny Bcl-2 na zhruba 7 % normální hodnoty. Kontrolní buňky vykazovaly pořád stejnou hladinu Bcl-2. Lze tedy konstatovat, že miR-15a a miR-16-1 přímo umlčují translaci tohoto anti-apoptického proteinu.

Tumor supresorovou funkce související s inhibicí exprese anti-apoptického Bcl-2 proteinu těchto miRNA u CLL byla také ověřena *in vivo*. Deset milionů životaschopných MEG-01 (buňky leukemie) exprimujících *miR-15a*, *16-1* bylo implantováno do myši. Po 28 dnech byl růst nádoru kompletně potlačen u tří z pěti myši (60 %) s vektorem nesoucím *miR-15a*, *16-1* (Calin *et al.* 2008). Obě miRNA - miR-15a a 16-1 byly také ektopicky exprimovány v nádorových buňkách tračnicku, kde obdobně u MEG-01 buněk potlačovaly jejich růst *in vivo* (Dai *et al.* 2012).

Vedle potlačování exprese Bcl-2 miR-15a a miR-16-1 také snižují množství WT1 protoonkogenu, aniž by interagovali s jeho mRNA. Tyto miRNA ale také neinteragují ani s 3' oblastí transkripčních faktorů GATA-1 a Sp1 regulujících expresi genu *WT1*. Každopádně tato skupina prokázala, že pokud byly miR-15a a miR-16-1 přítomny v buňkách k562 a HL-60, které používali, tak se snížila hladina WT1. Po snížení hladiny WT1 docházelo k potlačení růstu leukemických buněk a navíc u nich byla rychle vyvolávána apoptóza (Gao *et al.* 2011, Gao *et al.* (2012). Pochopení mechanismu, kterým miR-15a a 16-1 nepřímo ovlivňují hladinu WT1, by mohlo být eventuálně využito v protinádorové terapii

miR-15b a miR-16 se také podílí na vývoji multidrogové rezistence u lidských gastrointestinálních nádorů (Xia *et al.*, 2008). Běžně je exprese těchto dvou miRNA v nádorových buňkách potlačena. A tak léčba medikamenty nezabírá. Správnou modulací jejich exprese by se mohla zlepšit citlivost těchto buněk na léčbu chemoterapií. Stejně jako miR-15a a miR-16-1, snižuje miR-15b a miR-16 hladinu anti-apoptického proteinu Bcl-2, který zajišťuje rezistenci proti chemoterapeutické léčbě (Xia *et al.*, 2008).

Expese miR-15 a miR-16 může být regulována transkripčními faktory E2F1 a p53, které jsou důležité v kontrole buněčného cyklu. E2F1 transkripčním faktorem zvýšená hladina miR-15 a miR-16 vede k inhibici exprese *cyklinu E* nutného pro postup buněčného cyklu buňky z fáze G1 do fáze S. Zastavení buněčného cyklu vyvolává buněčnou smrt. (Ofir *et al.* 2011). p53 také reguluje expresi klíčových komponent nezbytných pro maturaci miRNA. p53 společně s p73 a p63 ovlivňují expresi DGCR8, Dicer-TRBP3 a Argonaut (Suzuki *et al.* 2009, Boominathan 2010).

4.2.1.3. miR-15

miR-15a,b není důležitá pouze regulaci kancerogeneze, ale hraje roli i při srdeční či mozkové ischemii (Hullinger *et al.* 2011, Liu *et al.* 2012, Yin *et al.* 2010). Ztráta buněčné tkáně po ischemii, vedoucí k infarktu myokardu, zapříčiňuje patologickou remodelaci srdeční tkáně (Xiao *et al.* 2011). Bylo prokázáno, že při ischemii/reperfuzi srdeční tkáně dochází v kardiomyocytech k vysoké expresi *miR-15* rodiny a následné apoptóze. Potlačení exprese *miR-15* u myší či prasat vedla ke zvýšení exprese anti-apoptického proteinu Bcl-2, což mělo za následek lepší přežívání kardiomyocytů při navození ischemie a k redukci rozsahu infarktu myokardu (Hullinger *et al.* 2011, Liu *et al.* 2012).

Obdobně jako u kardiomyocytů potlačení exprese *miR-15* v neuronech vedlo ke zvýšení exprese Bcl-2 a k vyššímu přežívání buněk při experimentálně navozené mozkové ischemii u myší (Yin *et al.* 2010). Jedním z faktorů regulujících intracelulární hladinu *miR-15* je transkripční faktor PPAR δ , který inhibuje transkripci *miR-15*. PPAR δ (Peroxisome proliferator-activated receptor δ) je důležitý ve vaskulární remodelaci, angiogenezi a ochraně vaskulární a neurální tkáně. Ale při ischemickém poškození je jeho hladina snížena a tak se může exprimovat gen pro *miR-15a*, což vede k odblokování apoptotické dráhy. Ektopická exprese PPAR δ vedla k potlačení apoptózy neuronů a k jejich regeneraci (Yin *et al.* 2010).

4.2.1.4. miR-34a

Expese *miR-34* rodiny je aktivována pro-apoptickým transkripčním faktorem p53 (Raver-Shapira *et al.* 2007) a hraje roli při p53 indukované apoptóze. *MiR34a* blokuje expresi Bcl-2, Mcl-1 a regulátorů buněčného cyklu (E2F1, p21, Cyklin D1) expese této mikro RNA je snížena (také v souvislosti s nefunkčním p53) u většiny nádorových buněk (Mraz *et al.* 2009).

Expese *miR-34a* je aktivována např. poškozením DNA či jinými stresovými podněty jako např. působením arsenidu sodného na lymfocyty či tamoxifenu na hepatocyty (Tazawa *et al.* 2007). Dalším důležitým cílem *miR-34a* je onkogen MYCN. MYCN a jeho homolog MYC jsou rozpoznány v mnoha maligních nádorech člověka. Potlačení MYCN dochází k potlačení růstu v neuroblastomu (Wei *et al.* 2008).

Nízká expese *miR34a* je typická např. v nádorových buňkách prostaty a tračnicku. V těchto buňkách se na regulaci exprese této mikro RNA podílí protein SIRT1 (Silent mating type information regulation 2 homolog 1), což je NAD-závislá histone/protein deacetyláza. SIRT1 deacetyluje pro-apoptický protein p53 a tím umožní buňce přežít při genotoxických a oxidativních stresech. *miR-34a* u tohoto typu rakoviny ovlivňuje SIRT1 pravděpodobně na transkripční úrovni. Pokud je gen *miR-34a* exprimován, je expese *SIRT1* ovlivněna sníženou hladinou E2F1, která pramení ze snížené produkce E2F3. Expese E2F3 je *miR-34a* přímo post-translačně suprimována (Fujita *et al.* 2008).

Jiná skupina objevila u rakoviny tračnicku, že *SIRT1* je inhibován díky 3'UTR vazebnému místu pro *miR-34a*. V tu chvíli je umožněna acetylace p53, který může indukovat apoptózu přes proteiny p21 a Puma. Dále bylo pozorováno, že se v této buněčné linii *miR-34a* exprimuje na

dostatečné úrovni, ale přesto zcela nepotlačuje *SIRT1*. Možné vysvětlení je, že miR-34a nemusí úplně párovat s vazebným místem na *SIRT1* mRNA, nebo existuje i *SIRT1* s vazebným místem, které miR-34a nerozpoznává (Yamakuchi *et al.* 2008).

Svou roli hraje miR-34a také v Alzheimerově chorobě. Alzheimerova choroba je neurodegenerativní porucha, charakteristická ztrátou synapsí a neuronů v hippocampu a kůře mozkové vedoucí k demenci. Jedním z proteinů, který chrání neurony před buněčnou smrtí je anti-apoptotický protein Bcl-2. U Alzheimerovy choroby bylo pozorováno, že hladina tohoto proteinu je v buňce malá v důsledku zvýšené exprese *miR-34a*. Zvýšená exprese miRNA vede tedy nakonec k apoptóze, která je nežádoucí a dochází tak k neurodegenerativnímu poškození (Wang *et al.* 2009b). Zatím není znám mechanismus, který vede buňky k tomu, aby exprimovali *miR-34a* a zahájili tak smrt neuronů. Pochopení tohoto procesu by mohlo přispět k léčbě tohoto závažného neurodegenerativního onemocnění.

4.2.1.5. miR-200c

Během analýzy příčin rezistence na chemoterapii u rakoviny plic a žaludku bylo zjištěno, že exprese miR-200c značně snížena což mělo za následek zvýšení anti-apoptotických proteinů Bcl-2 a XIAP. Bcl-2 blokuje vznik póru na vnější mitochondriální membráně, XIAP je savčím inhibitorem kaspáz (Zhu *et al.* 2012). Rezistence proti lékům je velký problém a tak může pomoci jakákoliv informace, jak funguje.

MiR-200c také potlačuje expresi FAP-1 (Fas-associated phosphatase-1), negativního regulátoru transportu death receptoru CD95 na povrch buněk. Ektopická exprese *miR-200c* vede ke zvýšení citlivosti buněk k Fas/CD95 indukované apoptóze (Schickel *et al.* 2010).

Kromě toho, že zvýšená exprese miR-200 může výrazně snížit mobilitu rakoviny vaječníků, zabraňuje i rozvoji metastáz cílením genů k tomu nutných. Navíc klastr 200b-429 může v budoucnu sloužit jako biomarker rakoviny vaječníků a tak umožnit optimální léčbu pacienta (Hu *et al.* 2009).

4.2.1.6. miR-133

Během vývoje kardiomyocytů aktivuje transkripční faktor SRF i transkripci *miR-133*. Je velmi důležitým během vývoje. U mutovaných jedinců postrádajících miR-133 dochází k letálním ventrikárně-septálním (poruchy srdeční komory a přepážky) defektům u embryí nebo novorozených myší. Myši, které přesto dosáhnou dospělosti, podléhají rozsáhlým kardiomyopatiím a selháním srdce (Liu *et al.* 2008).

miR-133 hraje roli v ochraně srdeční tkáně před vývojem hypertrofie. *In vivo* inhibice miR-133 antagomírem (anti-miRNA) způsobilo značnou hypertrofii srdce. Byly identifikovány specifické cíle miR-133 v tomto procesu a to: *RhoA*, GDP-GTP výměnný faktor regulující hypertrofii; *Cdc42* přenašeč signálu v hypertrofii; a *Nelf-A/WHSC2*, jaderný faktor účastnící se hypertrofie. K hypertrofii srdečních myocytů dochází při stresu vyvolaném vně buňky. Například cytokininy, nebo při zvýšeném

tlaku. Tyto signály vyvolají změnu genové exprese v srdci a aktivují geny vedoucí k hypertrofii. Vpravení miR-133 do myších novorozených myší s hypertrofií srdce vedlo k inhibici znaků hypertrofie, jako jsou zvětšení buněk, zvýšená proteosyntéza a exprese fetálních genů. Tato studie tak má obrovský klinický dopad, protože *in vivo* snížená hladina miR-133 není pouze u myších modelů, ale také u člověka (Carè *et al.* 2007).

Expresí miR-133b je velmi potlačena v adenokarcinomu plic. Vyvolaná exprese této miRNA v buněčné linii H2009 vedla ke snížení anti-apoptotických proteinů Mcl-1 a Bcl-w. Poprvé se tak ukazuje *miR-133b* jako důležitý gen v rozvoji rakoviny plic (Crawford *et al.* 2009). Dalším příkladem rakoviny, v které je velmi snížená exprese miR-133, je rakovina močového měchýře (BC). Transfekce miR-133a do linie buněk z BC vedla ke snížení životaschopnosti buněk a apoptóze. Po transfekci došlo k výraznému snížení GSTP1 (S-transferase $\pi 1$), který má anti-apoptotické účinky. GSTP1 byl také předpovězen TargetScan programem jako možný cíl miR-133. To bylo také potvrzeno, když se našla na 3'UTR mRNA GSTP1 vazebná sekvence pro miR-133a (Uchida *et al.* 2011). Zvýšená exprese GSTP1 pravděpodobně souvisí se zvýšenou aktivitou anti-apoptotických proteinů Bcl-2 a tak v BC dochází k přežívání (Pljesa-Ercegovac *et al.* 2011).

miR-133a má schopnost zvyšovat citlivost death receptorů a jejich schopnost převést signál na aktivaci apoptotické dráhy. Příkladem je stimulace HeLa buněk TNF α . TNF α vede k uvolnění transkripčního faktoru NF- κ B z jeho inhibitoru. Ten pak může vyvolat expresi anti-apoptotických molekul. Ovšem v buňkách, ve kterých byla transfektována miR-133b, mohlo dojít po stimulaci death receptoru k aktivaci jiné dráhy, aktivaci kaspáz-8 a -3 a buněčné smrti (Patron *et al.* 2012).

4.2.2. Anti-apoptotické miRNA

4.2.2.1. miR-17-92 klastr

Prekursorový transkript miR-17-92 klastru kóduje šest miRNA: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 a miR-92a (v některé literatuře sedm, prekursor miR-17 obsahuje dvě miRNA: miR-17-5p a miR-17-3p, vzniká z nich maturovaná miR-17). MiR-17-92 je první miRNA klast, který byl popsán ve vývoji mnoha nádorů. Také se označuje jako „oncomir-1“. Pojem oncomir značí miRNA asociovanou s rakovinou (konkrétně při c-myc indukovaném vývoji lymfomu u myší) (He *et al.* 2005).

miR-92a hraje důležitou roli ve vývoji kolorektálního karcinomu. U tohoto typu nádoru bylo zjištěno, že gen *miR-92a* je exprimován více, než ostatních pět miRNA s tohoto klastru. Navíc přímo váže mRNA pro anti-apoptotický Bcl-2-interacting mediator of cell death (Bim). Pro ověření role proteinu Bim v apoptóze kolorektálních nádorových buněk SW480 byly tyto buňky infikovány retrovirem kódujícím *Bim* a to vedlo tyto buňky k apoptóze. Vyšší exprese *miR-92a* souvisela s metastázami v lymfatických uzlinách (Tsuchida *et al.* 2011). Již dříve bylo ukázáno, že miR-17-92 se podílí na snížení expres Bim u lymfatických zhoubných nádorů T buněk. U myší linie WEH17.2

lymfomu T-buněk potlačili expresi tohoto klastru použitím glukokortikoidů, což vedlo k výraznému nárůstu hladiny Bim a Bim dependentní indukci apoptózy těchto buněk (Molitoris *et al.* 2011).

MiR-19, další miRNA z klastru, má zásadní význam při vývoji B-buněčného lymfomu. miR-19 interaguje se dvěma vazebnými místy v3'UTR nádorového supresoru PTEN a snižuje tak jeho expresi. V důsledku potlačení exprese PTEN dochází k hyperaktivaci anti-apoptotické a pro-proliferaci kinázy Akt mající za následek přežití buňky a maligní transformaci. Dalším důsledkem aktivace Akt je i další zvýšení exprese miR-19 aktivovatelné AKT-mTOR signální dráhou (Olive *et al.* 2009). Kromě Akt aktivované dráhy je transkripce klastru miR-17-92 také aktivována transkripčním faktorem a protoonkogenem c-myc (Rinaldi *et al.* 2007, Wong *et al.* 2010). Ovšem se tak neděje pouze u různých typů leukemií, ale i u kolorektálního adenomu a dá se předpokládat, že c-myc jej aktivuje i v dalších typech rakoviny (Diosdado *et al.* 2009).

Zajímavá je korelace mezi c-myc, E2F1 transkripčním faktorem a miR-17-92 klastrem. c-myc přímo aktivuje transkripci jak klastru, tak E2F1, ovšem dvě miR z klastru, miR-17-5p a miR-20a negativně regulují hladinu E2F1 přímým vázáním na jeho mRNA. Příliš vysoká exprese E2F1 vede až k indukovaní apoptózy. Deregulace miR-17-92 klastrem tak umožňuje větší šanci na přežití buňky, pokud k tomu dojde (O'Donnell *et al.* 2005). Tyto práce ukazují významnou plasticitu miR-17-92 klastru, který hraje významnou roli v mnoha nádorových onemocněních. Další transkripční faktor, který je schopen řídit expresi klastru, je p53. Hypoxie navozená v buněčné linii Lovo z rakoviny tlustého střeva, vedla ke zvýšení aktivity transkripčního proteinu p53. Vazebné místo pro TATA-binding protein (TBP) a p53 se nachází uvnitř promotoru pro klastr. TBP a p53 se nemohou navázat na vazebné místo promotoru současně a tudíž je interakce TBP s promotorem inhibována zvyšujícím se množstvím p53 (Yan *et al.* 2009).

Delece miR-17-92 klastru vede k letalitě novorozenech myší a ke specifickým defektům ve vývoji srdce, plic a B buněk. U plic dochází k závažné hypoplasii neslučitelné se životem. Na druhou stranu výrazné zesílení exprese klastru naopak vede k rozvoji rakoviny. Výzkum ukázal důležitou roli miR-17-92 klastru ve vývoji B buněk, ovšem úzce související s přechodem ve vývoj lymfomu. Klastr hraje roli u B buněk při přechodu stádií pro-B (progenitor) na pre-B (precursor) (Ventura *et al.* 2008) a při vývoji makrofágů (Pospisil *et al.* 2011).

4.2.2.2. miR-106-25 klastr

miR-106b-25 klast se nachází v intronu 13 genu *Mcm7* na chromozomu 7q22. *Mcm7* hraje důležitou roli v přechodu G1/S fáze buněčného cyklu. Klastr zahrnuje miR-106b, miR-93 a mir-25. Přílišná exprese *Mcm7* je spjata s možností rozvoje rakoviny (Petrocca 2008a, Kan *et al.* 2009). To může být spojeno s tím, že se tak současně transkribuje klastr miR-106b-25, který je značně homologní k miR-17-92 klastru (viz. obr.7) (He *et al.* 2005). miR-17-92 a miR-106b-25 klastry vykazovaly podobné expresní vzory v buňkách dospělých myší (Ventura *et al.* 2008). Lze tak usuzovat, že i miR-106b-25 klastr bude jako miR-17-92 značně onkogenní.



Obr. 7. Genomická organizace pěti paralogních skupin lokalizovaných na třech homologních klastrech (žluté boxy – pre-miRNA; fialové boxy – maturované miRNA) (převzato a upraveno z He *et al.* 2005).

Klastr miR-106b-25 je nadprodukován v mnoha gastrointestinálních nádorech, kde negativně ovlivňuje expresi pro-apoptotického proteinu Bim a regulátoru buněčného cyklu proteinu p21, což vede k rozvoji nádoru (Petrocca *et al.* 2008a, Kan *et al.* 2009). Stejně buněčné cíle má klastr i v endometriálním karcinomu. Tato buněčná linie byla experimentálně léčena histon deacetylázou trichostatinem (TSA). Konkrétně v této buněčné linii má TSA za následek potlačení *Myc* a jeho cílových genů *Mcm7* společně s *miR-106b-25*. Klastr tak přestává deregulovat bim a p21, takže může dojít k zastavení buněčného cyklu a apoptóze (Zhao *et al.* 2012). Navíc protein E2F1 může také přímo aktivovat expresi *Mcm7* a klastru. *E2F1* je přímo deregulován maturovanou miR-106b a miR-93. Vytváří se tak negativní zpětná vazba (Petrocca *et al.* 2008b).

miR-25 chrání buňky rakoviny vaječníku před apoptózu deregulací pro-apoptotického proteinu Bim (Zhang *et al.* 2012). Ten je častým cílem miR-106b-25 klastru. Ovšem při zkoumání, jakým způsobem chrání miR-25 buňky z maligního cholangiokarcinomu před TRAIL vyvolanou apoptózou, nebyla nalezena spojitost mezi expresí *miR-25a* hladinou proteinu Bim. miR-25, jehož exprese je zde zčásti řízena Hedgehog signalizací, nakonec ovlivňuje Death receptor 4 (DR4) a může tak bránit buněčné smrti. Po ošetření buněk anti-miR-25 dochází ke zvýšení hladiny DR4. Ovšem není zcela jasné, jakým způsobem se miR-25 váže na mRNA DR4 (Razumilava *et al.* 2012).

4.2.3. miRNA s pro- i anti-apoptotickou funkcí

4.2.3.1. miR-181

miR-181 je značně exprimována v lymfoidní, mozkové a plicní tkáni (Chen *et al.* 2004). V myším modelu astrocytů exprimovaná miR-181 potlačuje expresi anti-apoptotických proteinů *Bcl-2*, *Mcl-1* a také pro-apoptotického *Bim*. Tyto tři členové BCL-2 rodiny byly nalezeny bioinformatickou předpovědí a následně experimentálně potvrzeny. Velmi zvláštní je, že jedna miRNA kontroluje najednou pro- a anti-apoptotické proteiny v jedné tkáni. Redukce množství této miRNA v astrocytech je spojeno s potlačením buněčné smrti (Ouyang *et al.* 2012).

Expese *Bcl-2* a *Mcl-1* byla miR-181 suprimována i u CLL, kde potlačovala expresi dalšího anti-apoptotického proteinu XIAP. A v budoucnu se bude zkoumat možná zpětná vazba s proteinem p53 (Xia *et al.* 2012). Pro-apoptotický protein Bim jako možný cíl této mikroRNA byl potvrzen u

lymfomu folikulárních dendritických buněk a její zvýšená exprese byla jednou z příčin rezistence těchto buněk k chemoterapii (Lwin *et al.* 2010).

U žaludečních a plicních nádorů či maligních gliomů exprimovaná miR-181 zvyšuje citlivost na protirakovinné léky tím, že potlačuje expresi Bcl-2 proteinu (Zhu *et al.* 2010, Chen *et al.* 2010). Z těchto poznatků vyplývá, že *miR-181* funguje jako onkogen i jako tumor supresor na základě kontextu buňky.

5. miRNA v některých dalších typech buněčné smrti

5.1. miRNA v nekrotické buněčné smrti

Nekróza se vyznačuje dysfunkcí mitochondrií, produkcí ROS mitochondriemi, vyčerpáním ATP, ztrátou gradientu Ca^{2+} , proteolýzou zprostředkovanou kalpainy a kathepsiny a časným rozrušením plasmatické membrány a vylití obsahu buňky s následným zánětem (Golstein & Kroemer 2007). Na rozdíl od apoptózy dochází k pozdní a nedokonalé fragmentaci DNA a jádra (Proskuryakov *et al.* 2003). V posledních letech se změnil pohled na nekrózu jako na striktně neorganizovaný proces. Dnes víme, že i tento proces může mít své regulační procesy a může využívat proteiny z jiných buněčných kaskád. Například protein Bax podílející se na vzniku MOMP může být v některých případech důležitý při formování mPTP (mitochondrial permeability transition pore) na vnitřní mitochondriální membráně. Jeho otevření vede k zkratování gradientu nutného k tvorbě ATP a dochází i k masivnímu průniku vody do mitochondrie. Ovšem nedochází k uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru mitochondrie do cytoplasmy (Whelan *et al.* 2012). Začíná se tak objevovat pojem nekroptóza neboli programovaná nekróza

5.1.1. Signální kaskáda programované nekrozy

Rip 1 kináza je pleiotropický protein, který se podílí na signalizacích jak v drahách vedoucích k buněčnému přežití, tak k buněčné smrti. Aktivace TNFR1 a následné shromáždění cytosolických proteinů vede k nedegradativní polyubikvitinaci proteinu RIP1. Dochází k aktivaci IKK, který fosforyluje inhibitor transkripčního faktoru NF- κ B – I κ B α . NF- κ B je translokován do jádra buňky, kde řídí transkripci survival signálů, jako je cFLIP, Bcl-2 (O'Donnell *et al.* 2012).

Při blokované kanonické NF- κ B signalizace (například deubikvitinací RIP1 proteinem CYLD) (Sun 2008) může být aktivována na kaspázách závislá apoptóza (Wang *et al.* 2008). Apoptóza na rozdíl od nekrozy nezpůsobuje zánět a poškození, a proto je v případě aktivní apoptotické kaskády žádoucí, aby se nerozběhla nekrotická buněčná smrt. K tomu využívá buňka aktivní kaspázu 8, která štěpí a tím i inaktivuje RIP1 (Chan *et al.* 2003) a RIP3 (Feng *et al.* 2007) kinázy. Pokud jsou kaspázy neaktivní, může RIP1 asociovat s RIP3 přes RHIM (homotypický interagující motiv) domény, které

mají oba proteiny (Sun *et al.* 2002) za vzniku tzv. nekrozomu, obsahujícího fosforylovanou formu RIP1 a kinázu RIP3 (Declercq *et al.* 2009).

Nekrozom aktivuje struktury, které mají za následek vzrůstající produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které následně poškozují struktury buňky (RIP1 aktivuje například NADPH oxidázu 1 (Nox-1) (Kim *et al.* 2007), RIP3 aktivuje například glykogen fosforylázu (PYGL), glutamát amonia ligázu (GLUL), či glutamát dehydrogenázu 1 (GLUD1) (Zhang *et al.* 2009).

5.1.2. Programovaná nekróza a miRNA

Ve vývoji srdeční tkáně hrají mimo jiných důležitou roli kmenové progenitorní buňky kardiomyocytů (CMPCs). Pokud jsou tyto buňky transplantované do poškozené srdeční tkáně, tak mohou přispět ke vzniku kardiomyocytů a potenciální regeneraci této tkáně. Ovšem většina takto transplantovaných buněk do 48 hodin hyne kvůli nepříznivým podmínkám v ischemické tkáni a to především nekrotickou smrtí (Liu *et al.* 2011). Liu *et al.* zjistili, že zvýšením exprese miR-155 došlo k inhibici nekrózy a lepšímu přežívání transplantovaných CMPCs bez ovlivnění jejich schopnosti diferencovat do kardiomyocytů. miR-155 účinně zabraňuje nekrotické buněčné smrti, protože přímo snižuje hladinu RIP1 proteinu důležitého v signalizaci programované nekrózy (Liu *et al.* 2011).

Zatímco miR-155 zabraňuje nekrotické buněčné smrti, miR-874 ji vyvolává (Wang *et al.* 2013). Během infarktu myokardu, nebo působením peroxidu vodíku dochází ke zvýšení exprese miR-874, jejímž výsledkem je snížení hladiny kaspázy – 8. Zablokovaná kaspáza-8 tak nemůže inhibovat RIP1 a RIP3 a může se formovat a aktivovat nekrozóm. Exprese miR-874 je regulována transkripčním faktorem Foxo3, který potlačuje expresi miR-874 a tak brání nekróze. Po vystavení buněk peroxidu vodíku je ale exprese Foxo3a snižena a miR-874 může podporovat nekrózu (Wang *et al.* 2013).

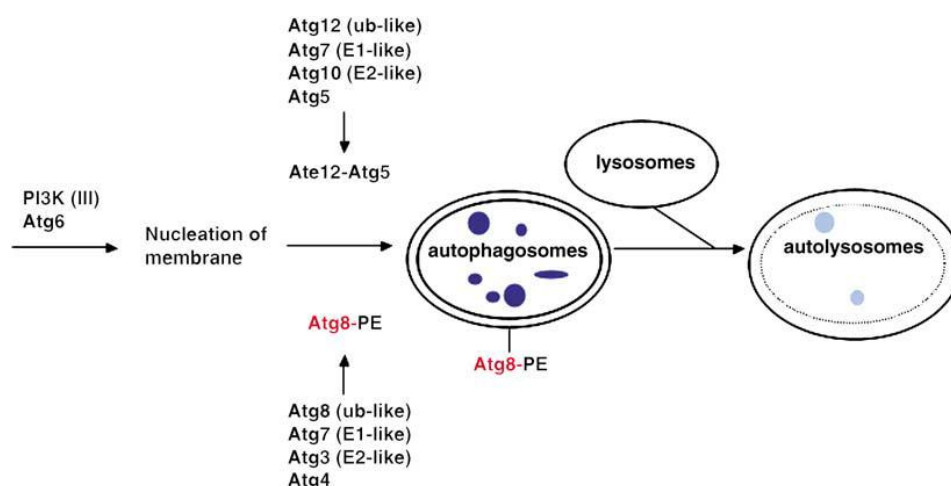
5.2. miRNA v autofagické buněčné smrti

Autofagie je buněčný proces nezbytný pro recyklaci poškozených organel či mobilizaci zdrojů při stresových situacích, například při hladovění. Autofagie se také uplatňuje při destrukci intracelulárních parazitických bakterií. Autofagická buněčná smrt postrádá kondenzaci chromatinu, ale dochází při ní k rozsáhlé autofagické vakuolizaci cytoplazmy. Autofagosomy jsou dvoumembránové váčky, které mohou pohltit buněčné části, včetně organel. Autogafosom se spojí s lyzozomem a vznikne autolyzozom, kde se štěpí obsahy váček. Hlavní úlohu ve tvorbě autofagosomu hrají *Atg* geny, které jsou konzervované napříč druhy (Tsujimoto & S. Shimizu 2005).

5.2.1. Regulace autofagické buněčné smrti

Významným regulátorem aktivace autofagie je mTOR (target of rapamycin) kináza. TOR kináza je aktivní, pokud jsou přítomny růstové faktory a dostatek živin. Aktivní TOR fosforyluje Atg 13 a tím blokuje formování Atg-1 komplexu (Atg1/13/17). V případě nedostatku živin, dochází k rychlé defosforylaci Atg 13 v důsledku neaktivní TOR kinázy a může dojít k zformování komplexu, zvýšení Atg 1 kinázové aktivity a indukci autofagie. Atg 1 komplex aktivuje například Atg6/Beclin1 (Kamada *et al.* 2000).

Aktivní Atg6/Beclin-1 s PI3K kinázou indukuje formaci autofagosomu. Pro zvětšování váčku jsou důležité dva ubiquitin-like systémy, které produkují spojení Atg12-Atg5 a Atg8 (LC3) -PE (phosphatidylethanolamine). Během formace autofagosomu dochází ke změně rozpuštěného LC3 (LC3-I) na formu asociovanou s autofagickým vesiklem (LC3-II) (Tsujiimoto & S. Shimizu 2005). Další důležitý komplex je Atg 9 komplex (Atg2/9/18), který je po splynutí lysozomu a autofagosomu nutný k recyklaci a vyhledávání autofagických proteinů (Kamada *et al.* 2000).



Obr. 8. Grafické znázornění autofagie. PI3 kináza/Atg6 a dva ubiquitin-like konjugační systémy účastnící se formace autofagosomu. PE: fosfatidylethanolamin; ub: ubiquitin. (Převzato z Tsujimoto & Shimizu 2005).

5.2.2. Autofagická buněčná smrt a miRNA

Expres klastru miR-290-295 je pozorována během časně embryogeneze myších zárodečných kmenových buněk, kde hraje roli během buněčné proliferace a ochrany proti genotoxickým stresům. Ovšem během diferenciaci jeho hladina klesá (Chen *et al.* 2012). Vysoká exprese tohoto klastru byla zjištěna v šesti buněčných liniích B16F1 myších melanomů. V těchto buňkách nebylo pozorováno, že by klastr miR-290-295 měl vliv na proliferaci, emigraci nebo růst nádoru. Ovšem bylo pozorováno, že tento klastr uděluje buňkám schopnost přežít během chronického nedostatku glukózy. Deprivace živin aktivuje u melanomových buněk autofagickou buněčnou smrt. Avšak klastr miR-290-295 zastavuje rozvoj autofagie. Analýzou buněčných cílů klastru bylo nalezeno, že se váže na většinu esenciálních genů důležitých v autofagii. Klastr miR-290-295 tak pomáhá buňce se vyrovnat s nedostatkem glukózy, který by vedla buňku k autofagické buněčné smrti (Chen *et al.* 2012).

I/R poškození vede v kardiomyocytech ke snížení hladiny miR-204 se současným zvýšením hladiny LC3-II nutného pro zvětšování autofagozomu a umožňuje tak autofagickou buněčnou smrt. Když byla exogenní miR-204 vložena do kardiomyocytů podléhajících autofagii, došlo ke snížení hladiny LC3-II. Přidání inhibitoru miR-204 vedlo ke zvýšení množství proteinu LC3-II a opětovnému spuštění autofagie. Jakým způsobem I/R poškození dereguluje miR-204 není známo (Xiao *et al.* 2011).

6. Viry, miRNA a apoptotická signalizace

Infekce lidským papillomavirem typu 16 (HPV16) a 18 (HPV18) může vyvolat karcinom děložního hrdla, či jiné anogenitální rakoviny. Virus HPV si vyvinul celkem zajímavou strategii a snad poprvé se setkáváme u virového onkoproteinu s tím, že ovlivňuje nekódující gen. Virový protein E6 destabilizuje tumor supresor p53, který je transkripčním faktorem tumor supresorové pro-apoptotické miR-34a. Virus se tak brání apoptotické buněčné smrti v buňkách, v kterých se vyskytuje a tak pomáhá přežít i rakovině (Wang *et al.* 2009a).

Další zajímavostí je Epstein-Barr virus (EBV). Tento herpesvirus je spojován s rakovinou nosohltanu (Nasopharyngeal carcinoma, NPC) a rakovinou žaludku (GC) a jinými malignitami. Jedná se o první virus, u kterého byla nalezena exprese *miRNA*. EBV exprimuje *miR-BART5*. Jehož hlavním cílem je protein p53 up-regulated modulator of apoptosis (Puma). Puma je pro-apoptotický protein, jehož syntéza je značně snížena u zhruba 60 % NPC. Kódováním miRNA zvyšuje virus schopnost přežít hostitelské buňce, tedy i sobě (Choy *et al.* 2008).

7. Diskuze a závěr

Výzkum miRNA zejména ve vztahu k buněčné smrti může v budoucnu aplikačně využít k novým směrům v terapii rakoviny, ischemickým poškození srdce a mozku či v Alzheimerově nemoci. Pochopení principů, podle kterých tyto miRNA regulují smrt buňky v konkrétních onemocněních a situacích, má tak bezesporu značný význam. Významným pokrokem by byla možnost selektivní regulace exprese vybrané miRNA například v nádorových tkáních. Příkladem toho jsou experimenty s miR-15a, miR-16-1 klastrem, kdy CLL buňky exprimující tyto miRNA byly implantovány do myši a jejich aktivita tak mohla být pozorována *in vivo* (Calin *et al.* 2008). V 60 % dokázal tento klastr zabránit rozvoji nádoru a uchránily tak myši před rakovinou. Stejný úspěch byl zaznamenán při pokusech *in vitro* na buněčných liniích rakovin, ve kterých je potlačena exprese miR-1. Vnesená exogenní miR-1 vyvolala u buněčných linií jako jsou Hela, Cal-27 apoptózu (Wu *et al.* 2011).

Obdobně se cílená regulace exprese miRNA může uplatnit při terapii Alzheimerovy choroby. Toto neurodegenerativní onemocnění spojené se ztrátou synapsí a neuronů v hippocampu a kůře mozkové vedoucí k demenci. Jedním z mechanismů, kterým umírají neurony je zvýšená aktivita miR-

34a, která zablokovává anti-apoptický protein Bcl-2 a vede apoptóze těchto neuronů. Zatím není známa příčina, kvůli které dochází k nežádoucímu zvýšení exprese *miR-34a* (Wang *et al.* 2009b), ale pochopení tohoto procesu by mohlo být velmi přínosné v léčení této závažné choroby.

Další slibnou oblastí, v které by regulace exprese miRNA mohlo být přínosné, je regenerace srdeční a mozkové tkáni po IR poškození. Mozkové a srdeční buňky velmi obtížně regenerují a IR poškození často vede k indukci některého z buněčných smrtí. Pomocí miRNA lze buněčnou smrt oddálily natolik, že tyto buňky stačí zregenerovat. Případně může miRNA pomoci v případě transplantace progenitorních buněk do ischemicky poškozených tkání a umožnit tak jejich lepší hojení.

Cílem této práce bylo nastínit problematiku miRNA ve třech typech programované buněčné smrti. Mikro RNA reguluje genovou expresi na úrovni mRNA. Ztráta funkce, nízká, nebo naopak vysoká exprese miRNA může vést až k patologiím jako je rozvoj rakoviny, špatný vývoj a funkce tkání nebo neurodegenerativním poruchám. Správná funkce chrání buňku před maligními transformacemi a vede ji zdárně k buněčné smrti, nebo jí naopak zabraňuje, není-li žádoucí. V mnoha případech není přesně znám mechanismus, jakým daná miRNA ovlivňuje konkrétně dráhu buněčné smrti. V některých případech můžeme počítat se vzájemným ovlivňováním buněčných procesů různými miRNA. Velmi často jsou buněčné cíle miRNA předpovídány na základě počítačových programů jako je TargetScan. Tyto cíle však musí být experimentálně dokázány. To v některých případech může být obtížné, jelikož záleží i na kontextu a typu dané buňky či tkáně. Pokud například ošetříme buněčnou linii kardiomyocytů peroxidem vodíku, může se rozběhnout jak apoptóza, tak nekróza v závislosti na použité koncentraci peroxidu vodíku a intenzitě tím vyvolaného IR poškození. Jedním z předmětů klinického zájmu je otázka, jak zajistit *in vivo* některé funkce miRNA, které jsme schopni vyvolat *in vitro*. V mnohých případech nádorových transformací by to znamenal další krok k jejich možnému úspěšnému léčení.

8. Použitá literatura

- Abraham, M.C., Lu, Yun & Shaham, S., 2007. A morphologically conserved nonapoptotic program promotes linker cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental cell*, 12(1), pp.73–86.
- Abud, H.E., 2004. Shaping developing tissues by apoptosis. *Cell death and differentiation*, 11(8), pp.797–9.
- Ashkenazi, a & Dixit, V M, 1998. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*, 281(5381), pp.1305–1308.
- Benchimol, S., 2001. P53-Dependent Pathways of Apoptosis. *Cell death and differentiation*, 8(11), pp.1049–51.
- Boominathan, L., 2010. The Tumor Suppressors p53, p63, and p73 Are Regulators of MicroRNA Processing Complex Array, ed. *PLoS ONE*, 5(5), p.13.
- Borchert, G.M., Lanier, W. & Davidson, B.L., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(12), pp.1097–1101.
- Brennecke, J. et al., 2003. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 113(1), pp.25–36.
- Brunelle, J.K. & Letai, A., 2009. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *Journal of cell science*, 122(Pt 4), pp.437–41.
- Calin, G. et al., 2008. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(13), pp.5166–5171.
- Calin, G.A. et al., 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), pp.15524–9..
- Carè, A. et al., 2007. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature medicine*, 13(5), pp.613–8.
- Cimmino, A. et al., 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 10.1073/pnas.0506654102. *Pnas*, 102(39), pp.13944–13949.
- Crawford Melissa, Kara Batte, Lianbo Yu, PhD2, Xin Wu, PhD3, Gerard J. Nuovo, MD4, C. & B. Marsh, MD1, Gregory A. Otterson, MD3, and Serge P. Nana-Sinkam, M., 2009. microRNA 133B targets prosurvival molecules MCL-1 and BCL2L2 in lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388, pp.483–489.
- Cui, Q. et al., 2007. MicroRNAs preferentially target the genes with high transcriptional regulation complexity. *Biochemical and biophysical research communications*, 352(3), pp.733–8.
- Dai, Lixia et al., 2012. Vector-based miR-15a/16-1 plasmid inhibits colon cancer growth in vivo. *Cell Biology International*, 36(8), pp.765–70.
- Datta, J. et al., 2008. Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer research*, 68(13), pp.5049–58.

- Declercq, W., Vanden Berghe, T. & Vandenabeele, P., 2009. RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell*, 138(2), pp.229–32.
- Diosdado, B. et al., 2009. MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression. *British Journal of Cancer*, 101(4), pp.707–714.
- Du, T. & Zamore, P.D., 2005. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development Cambridge England*, 132(21), pp.4645–4652.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), pp.495–516.
- Feng, S. et al., 2007. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cellular signalling*, 19(10), pp.2056–67.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. & Sonenberg, N., 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, 9(2), pp.102–14.
- Friedman, R.C. et al., 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*, 19(1), pp.92–105.
- Fuchs, Y. & Steller, H., 2011. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147(4), pp.742–58.
- Fujita, Y. et al., 2008. Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(1), pp.114–119.
- Gao, S. et al., 2011. miR-15a and miR-16-1 inhibit the proliferation of leukemic cells by down-regulating WT1 protein level. *Journal of experimental clinical cancer research CR*, 30(1), p.110.
- Gao, S.-M. et al., 2012. Pure curcumin decreases the expression of WT1 by upregulation of miR-15a and miR-16-1 in leukemic cells. *Journal of experimental clinical cancer research CR*, 31(1), p.27.
- Ge, W. et al., 2011. Overlapping functions of microRNAs in control of apoptosis during *Drosophila* embryogenesis. *Cell Death and Differentiation*, 19(5), pp.1–8.
- Giam, M., Huang, D.C.S. & Bouillet, P., 2008. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene*, 27 Suppl 1(S1), pp.S128–36.
- Golstein, P. & Kroemer, G., 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), pp.37–43.
- Gregory, R.I. et al., 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4), pp.631–40.
- Griffiths-Jones, S. et al., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), pp.D140–4.
- Han, Jinju et al., 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125(5), pp.887–901.

- He, L. et al., 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435(7043), pp.828–33.
- Hu, X. et al., 2009. A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 114(3), pp.457–64.
- Hullinger, T.G. et al., 2011. Inhibition of miR-15 Protects Against Cardiac Ischemic Injury. *Circulation Research*, 110(1), pp.71–81.
- Chan, F.K.-M. et al., 2003. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *The Journal of biological chemistry*, 278(51), pp.51613–21.
- Chan, S. & Slack, Frank J, 2006. microRNA-Mediated Silencing Inside P-Bodies ND ES SC. , (September), pp.97–100.
- Cheloufi, S. et al., 2010. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, 465(7298), pp.584–9.
- Chen, C.-Z. et al., 2004. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5654), pp.83–6.
- Chen, Gong et al., 2010. MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2. *Oncology Reports*, 23(4), pp.997–1003.
- Chen, Yong, Liersch, R. & Detmar, M., 2012. The miR-290-295 cluster suppresses autophagic cell death of melanoma cells. *Scientific reports*, 2, p.808.
- Chendrimada, T.P. et al., 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051), pp.740–744.
- Choy, E.Y.-W. et al., 2008. An Epstein-Barr virus–encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(11), pp.2551–2560.
- Junttila, M.R. & Evan, G.I., 2009. p53--a Jack of all trades but master of none. *Nature Reviews Cancer*, 9(11), pp.821–829.
- Kamada, Y. et al., 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *The Journal of cell biology*, 150(6), pp.1507–13.
- Kan Takatsugu, Fumiaki Sato, Tetsuo Ito, Nobutoshi Matsumura, Stefan David, Yulan Cheng, Rachana Agarwal, Bogdan C. Paun, Zhe Jin, Alexandru V. Olaru, Florin M. Selaru, James P. Hamilton, Jian Yang, John M. Abraham, Yuriko Mori, and Stephen J. Meltzer1, 2009. The miR-106b-25 polycistron, activated by genomic amplification, functions as an oncogene by suppressing p21 and Bim. *Gastroenterology*, 136, pp.1689–1700.
- Kato, M. et al., 2009. The mir-34 microRNA is required for the DNA damage response in vivo in *C. elegans* and in vitro in human breast cancer cells. *Oncogene*, 28(25), pp.2419–2424.
- Kim, V.N., 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(5), pp.376–85.
- Kim, Y.-S. et al., 2007. TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Molecular cell*, 26(5), pp.675–87.

- Lavrik, I., Golks, A. & Krammer, P.H., 2005. Death receptor signaling. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 2), pp.265–7.
- * Lawen, A., 2003. Apoptosis-an introduction. *BioEssays*: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, 25(9), pp.888–96.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V., 1993. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), pp.843–854.
- Lee, Y. et al., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), pp.4051–60.
- Lee, Y. et al., 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*, 21(17), pp.4663–70..
- Lewis, B.P. et al., 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7), pp.787–798.
- Lim, L.P. et al., 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027), pp.769–73.
- Liu, Jia et al., 2011. MicroRNA-155 prevents necrotic cell death in human cardiomyocyte progenitor cells via targeting RIP1. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(7), pp.1474–82.
- Liu, L.-F. et al., 2012. MicroRNA-15a/b are up-regulated in response to myocardial ischemia/reperfusion injury. *Journal of geriatric cardiology*: JGC, 9(1), pp.28–32.
- Liu, N. et al., 2008. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes & Development*, 22(23), pp.3242–3254.
- Liu, X. et al., 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86(1), pp.147–57.
- Locksley, R.M., Killeen, N. & Lenardo, M J, 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), pp.487–501.
- Lund, E. et al., 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654), pp.95–98.
- Lwin, T. et al., 2010. Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. *Blood*, 116(24), pp.5228–36.
- Molitoris, J.K., McColl, K.S. & Distelhorst, C.W., 2011. Glucocorticoid-mediated repression of the oncogenic microRNA cluster miR-17~92 contributes to the induction of Bim and initiation of apoptosis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 25(3), pp.409–20.
- Mraz, M. et al., 2009. miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 23(6), pp.1159–63.
- Nasser, M.W. et al., 2008. Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *The Journal of biological chemistry*, 283(48), pp.33394–405.

- O'Donnell, K. a et al., 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435(7043), pp.839–843.
- O'Donnell, M.A. et al., 2012. NEMO inhibits programmed necrosis in an NFκB-independent manner by restraining RIP1. *PLoS one*, 7(7), p.e41238.
- Ofir, M., Hacohen, D. & Ginsberg, D., 2011. miR-15 and miR-16 Are direct transcriptional targets of E2F1 that limit E2F-induced proliferation by targeting cyclin E. *Molecular cancer research MCR*, 9(4), pp.440–447.
- Olga A. Berillo, Assel S. Issabekova, Mireille Regnier, A.T.I., 2011. Characteristics of binding sites of intergenic, intronic and exonic miRNAs with mRNAs oncogenes coding in-miRNAs Olga A. Berillo 1 , Assel S. Issabekova 1 , Mireille Regnier 2 , Anatoliy T. Ivashchenko.
- Olive, V. et al., 2009. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes & Development*, 23(24), pp.2839–2849.
- Ouyang, Y.-B. et al., 2012. miR-181 targets multiple Bcl-2 family members and influences apoptosis and mitochondrial function in astrocytes. *Mitochondrion*, 12(2), pp.213–9.
- Pasquinelli, a E. et al., 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6808), pp.86–9.
- Patron, J.P. et al., 2012. MiR-133b targets antiapoptotic genes and enhances death receptor-induced apoptosis. *PLoS one*, 7(4), p.e35345.
- Peng, H.W., Slattery, M. & Mann, R.S., 2009. Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA bantam in the progenitor domain of the Drosophila eye imaginal disc. *Genes & development*, 23(19), pp.2307–19.
- Petrocca, F., Visone, R., et al., 2008a. E2F1-regulated microRNAs impair TGFβ-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell*, 13(3), pp.272–286.
- Petrocca, F., Vecchione, A. & Croce, C.M., 2008b. Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling. *Cancer research*, 68(20), pp.8191–4.
- Pljesa-Ercegovac, M. et al., 2011. Enhanced GSTP1 expression in transitional cell carcinoma of urinary bladder is associated with altered apoptotic pathways. *Urologic oncology*, 29(1), pp.70–7.
- Pospisił, V. et al., 2011. Epigenetic silencing of the oncogenic miR-17-92 cluster during PU.1-directed macrophage differentiation. *the The European Molecular Biology Organization Journal*, 30(21), pp.4450–64.
- Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G. & Gabai, V.L., 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research*, 283(1), pp.1–16.
- Raver-Shapira, N. et al., 2007. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Molecular Cell*, 26(5), pp.731–743.
- Razumilava, N. et al., 2012. miR-25 Targets TRAIL Death Receptor-4 and Promotes Apoptosis Resistance in Cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 55(2), pp.465–475.
- Rinaldi, A. et al., 2007. Concomitant MYC and microRNA cluster miR-17-92 (C13orf25) amplification in human mantle cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*, 48(2), pp.410–2.

- Robertson, J.D., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B., 2000. Review: nuclear events in apoptosis. *Journal of structural biology*, 129(2-3), pp.346–58.
- Ruby, J., Jan, C. & Bartel, D., 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149), pp.83–86.
- Shan, Z.-X. et al., 2010. miR-1/miR-206 regulate Hsp60 expression contributing to glucose-mediated apoptosis in cardiomyocytes. *FEBS letters*, 584(16), pp.3592–600.
- Shan, Z.-X. et al., 2009. Upregulated expression of miR-1/miR-206 in a rat model of myocardial infarction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(4), pp.597–601.
- Shi, Y., 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis Caspases are central components of the machinery. , 9, pp.459–470.
- Shiozaki, E.N. & Shi, Y., 2004. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends in biochemical sciences*, 29(9), pp.486–94.
- Schickel Robert, Sun-Mi Park, Andrea E. Murmann*, and M.E.P., 2010. mir-200c Regulates Induction of Apoptosis through CD95 by Targeting FAP-1. *Molecular Cell*, 38, pp.908–915.
- Soifer, H.S. et al., 2008. A role for the Dicer helicase domain in the processing of thermodynamically unstable hairpin RNAs. *Nucleic Acids Research*, 36(20), pp.6511–6522.
- Standart, N. & Jackson, R.J., 2007. MicroRNAs repress translation of m⁷ Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation. , pp.1975–1982.
- Sun, G. et al., 2009. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(9), pp.1640–51.
- Sun, S.-C., 2008. Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nature reviews. Immunology*, 8(7), pp.501–11.
- Sun, X. et al., 2002. Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3. *The Journal of biological chemistry*, 277(11), pp.9505–11.
- Suzuki, H.I. et al., 2009. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, 460(7254), pp.529–33.
- Tang, Yehua et al., 2009. MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2. *International heart journal*, 50(3), pp.377–87.
- Tazawa, H. et al., 2007. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Pnas*, 104(39), pp.2–7.
- Thornberry, N. a & Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), pp.1312–6.
- Tsuchida, A. et al., 2011. miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Science*, 102(12), pp.2264–71.
- Tsujimoto, Y. & Shimizu, S., 2005. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell death and differentiation*, 12 Suppl 2, pp.1528–34.

- Uchida, Y. et al., 2011. MiR-133a induces apoptosis through direct regulation of GSTP1 in bladder cancer cell lines. *Urologic Oncology*, In press, pp.1–9.
- Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J. a, 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318(5858), pp.1931–1934.
- Ventura, A. et al., 2008. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*, 132(5), pp.875–86.
- Vogt, C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (Alytes bstetricians). (ed. Jent und Gassman) Solothurn, Switzerland.
- Wang, K. et al., 2013. miR-874 regulates myocardial necrosis by targeting caspase-8. *Cell death & disease*, 4, p.e709.
- Wang, Lai, Du, F. & Wang, Xiaodong, 2008. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, 133(4), pp.693–703.
- Wang, P., Gilmore, A.P. & Streuli, C.H., 2004. Bim is an apoptosis sensor that responds to loss of survival signals delivered by epidermal growth factor but not those provided by integrins. *The Journal of biological chemistry*, 279(40), pp.41280–5.
- Wang, Xiaohong et al., 2009a. Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6. *Rna New York Ny*, 15(4), pp.637–647.
- Wang, Xiaoying et al., 2009b. 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), pp.268–73.
- Wang, Zhiguo, 2010. MicroRNA: A matter of life or death. *World journal of biological chemistry*, 1(4), pp.41–54.
- Wei, J.S. et al., 2008. The MYCN oncogene is a direct target of miR-34a. *Oncogene*, 27(39), pp.5204–5213.
- Whelan, R.S. et al., 2012. Bax regulates primary necrosis through mitochondrial dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(17), pp.6566–71.
- Wide, W. & Kinetics, I.N.T., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide
- Wong, P. et al., 2010. The miR-17-92 microRNA polycistron regulates MLL leukemia stem cell potential by modulating p21 expression. *Cancer Research*, 70(9), pp.3833–3842.
- Wu, C.-D. et al., 2011. MicroRNA-1 induces apoptosis by targeting prothymosin alpha in nasopharyngeal carcinoma cells. *Journal of biomedical science*, 18(1), p.80.
- Xia, L. et al., 2008. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 123(2), pp.372–379.
- Xia Dan, Z. et al., 2012. miR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes. *Carcinogenesis*, 33(7), pp.1294–301.

- Xiao, Jian et al., 2011. MiR-204 regulates cardiomyocyte autophagy induced by ischemia-reperfusion through LC3-II. *Journal of Biomedical Science*, 18(1), p.35.
- Xu, P. et al., 2003. The Drosophila MicroRNA Mir-14 Suppresses Cell Death and Is Required for Normal Fat Metabolism. , 13(2), pp.790–795.
- Yamakuchi, M., Ferlito, M. & Lowenstein, C.J., 2008. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), pp.13421–13426.
- Yan, H. et al., 2009. Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis. *the The European Molecular Biology Organization Journal*, 28(18), pp.2719–2732.
- Yang, B. et al., 2007. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature medicine*, 13(4), pp.486–91.
- Yi, R. & Fuchs, E., 2011. MicroRNAs and their roles in mammalian stem cells. *Journal of cell science*, 124(Pt 11), pp.1775–83.
- Yin, K.-J. et al., 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulation of miR-15a in ischemia-induced cerebral vascular endothelial injury. *The Journal of neuroscience* □: the official journal of the Society for Neuroscience, 30(18), pp.6398–408.
- Ying, Li & Padgett, R.W., 2012. Bantam Is Required for Optic Lobe Development and Glial Cell Proliferation. *PLoS ONE*, 7(3), p.e32910.
- Yu, X.-Y. et al., 2008. Glucose induces apoptosis of cardiomyocytes via microRNA-1 and IGF-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(3), pp.548–552.
- Zhang, D.-W. et al., 2009. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5938), pp.332–6.
- Zhang, Haidi et al., 2004. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 118(1), pp.57–68.
- Zhang, Haiyan et al., 2012. MiR-25 regulates apoptosis by targeting Bim in human ovarian cancer. *Oncology reports*, 27(2), pp.594–8.
- Zhao, Y., Samal, E. & Srivastava, D., 2005. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 436(7048), pp.214–20.
- Zhao, Z.-N. et al., 2012. TSA suppresses miR-106b-93-25 cluster expression through downregulation of MYC and inhibits proliferation and induces apoptosis in human EMC. *PloS one*, 7(9), p.e45133.
- Zhu, W. et al., 2010. miR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 127(11), pp.2520–2529.
- Zhu, W. et al., 2012. miR-200bc/429 cluster modulates multidrug resistance of human cancer cell lines by targeting BCL2 and XIAP. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 69(3), pp.723–31.