

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd



**VYUŽITÍ METODY RNA INTERFERENCE PRO
CÍLENOU INHIBICI EXPRESE GENŮ NA ÚROVNI mRNA**

Disertační práce

Mgr. Hana Radilová

Obor: Patobiochemie a xenobiochemie

Školitel: Prof. RNDr. Eva Kvasničková, CSc.

Hradec Králové 2009

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména RNDr. Martinovi Bunčekovi, PhD. za předání praktických rad a zkušeností z oboru molekulární biologie a jeho cenné podněty po celou dobu mého studia.

Taktéž bych ráda poděkovala PharmDr. Radovanovi Haluzovi, PhD. za poskytnutí laboratorního zázemí a možnosti zdokonalení se v tomto zajímavém oboru.

Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu GENERI BIOTECH s.r.o. za vytvoření příjemného pracovního prostředí a mnohým z nich za pomoc při některých experimentech, jmenovitě především PharmDr. Antonínovi Librovi, PhD., PharmDr. Šárce Holasové, PhD. a Věře Dvořáčkové.

SEZNAM ZKRATEK

AA	arachidonová kyselina; „arachidonic acid“
ABC	„ATP-binding cassette“
ABCC4	gen kódující transportér MRP4; „ATP-binding cassette, sub-family C, member 4“
ALOX5	5-lipoxygenáza
ALOX5AP	arachidonát 5-lipoxygenázu-aktivující protein
ANOVA	analýza variance; „analysis of variance“
ATCC	„American Type Culture Collection“
B2 M	beta-2-mikroglobulin
BHQ1	zhášec; „quencher“
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
bp	pár bazí; „base pair“
BSA	bovinní sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CARD	„Caspase recruitment domain“
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
COX	cyklooxygenáza
COX-1	cyklooxygenáza 1
COX-2	cyklooxygenáza 2
COX-3	cyklooxygenáza 3
cPGES	cytosolická prostaglandin E syntáza (= PTGES3)
Dicer	RNáza III štěpící dsRNA na siRNA
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
DSE	„Distal sequence element“
dsRNA	dvouřetězcová RNA; „double stranded RNA“
ECACC	„European Collection of Cell Cultures“
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina; „ethylenediaminetetraacetic acid“
ELISA	„Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“
FAM	fluorescein
FLAP	arachidonát 5-lipoxygenázu-aktivující protein
Hep2	buněčná linie karcinomu děložního čípku

HETE	hydroxyeikosatetraenová kyselina
HpETE	hydroperoxyeikosatetraenová kyselina
HPRT1	hypoxantin fosforibosyltransferáza 1
IFN	interferon
IRF	„Interferon regulatory factor“
kDa	kilodalton
LT	leukotrien
MAVS	„Mitochondrial anti-viral signaling protein“
miRNA	mikroRNA
M-MuLV	„Moloney Murine Leukemia Virus“
mPGES-1	mikrozomální prostaglandin E syntáza 1 (= PTGES)
mPGES-2	mikrozomální prostaglandin E syntáza 2 (= PTGES2)
MRP4	„Multidrug resistance protein 4“
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
NEAA	„Non Essential Amino Acids“
NEB	„New England Biolabs“
NF- κ B	„Nuclear factor-kappaB“
NSA	nesteroidní antiflogistika
NSAIDs	nesteroidní antiflogistika; „nonsteroidal anti-inflammatory drugs“
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS	„phosphate buffered saline“
PBST	PBS pufr obsahující Tween 20
PCR	polymerázová řetězová reakce; „polymerase chain reaction“
PG	prostaglandin
PGDS	hematopoetická (krvetvorná) prostaglandin D ₂ syntáza
PGES	prostaglandin E syntáza
pre-miRNA	prekurzor mikroRNA
PTGDS	lipokalinová (cerebrální, mozková) prostaglandin D ₂ syntáza
PTGES	prostaglandin E syntáza (= mPGES-1)
PTGES2	prostaglandin E syntáza 2 (= mPGES-2)
PTGES3	prostaglandin E syntáza 3 (= cPGES)
PTGIS	prostaglandin I ₂ syntáza
PTGS1	prostaglandin endoperoxid syntáza 1 (= COX-1)
PTGS2	prostaglandin endoperoxid syntáza 2 (= COX-2)

PVDF	polyvinyliden difluorid
RIG-I	„Retinoic acid inducible gene I“
RISC	„RNA-induced silencing complex“
RNAi	RNA interference
RNáza	ribonukleáza
SDS	dodecylsírán sodný
SEM	směrodatná odchylka průměru rozdílů; „standard error of the mean“
shRNA	krátká vlásenková RNA; „short hairpin RNA“
siRNA	krátká interferující RNA; „small interfering RNA“
STR	krátká tandemová repetice; „short tandem repeat“
SURF1	„surfeit 1“
Taq	„ <i>Thermus aquaticus</i> “
TBXAS1	tromboxan A syntáza 1
TLR	„Toll-like receptor“
T _m	teplota tání; „melting temperature“
TX	tromboxan

OBSAH

1.	Abstrakt.....	9
2.	Úvod.....	10
3.	Přehled literárních poznatků.....	11
3.1.	RNA interference	11
3.1.1.	<i>Mechanismus RNA interference.....</i>	<i>11</i>
3.1.2.	<i>siRNA a shRNA sekvence.....</i>	<i>13</i>
3.1.3.	<i>Nespecifická imunitní odpověď buňky.....</i>	<i>13</i>
3.2.	Metabolismus arachidonové kyseliny	16
3.3.	Vybrané geny metabolismu arachidonové kyseliny.....	18
3.3.1.	<i>Cyklooxygenáza</i>	<i>18</i>
3.3.2.	<i>Prostaglandin E syntázy.....</i>	<i>22</i>
3.3.3.	<i>Tromboxan A syntáza 1 a prostaglandin I₂ (prostacyklin) syntáza</i>	<i>23</i>
3.3.4.	<i>Prostaglandin D₂ syntázy</i>	<i>23</i>
3.3.5.	<i>Arachidonát 5-lipoxygenáza a arachidonát 5-lipoxygenázu-aktivující protein</i>	<i>24</i>
3.4.	MRP4/ABCC4.....	25
3.4.1.	<i>Zapojení MRP4/ABCC4 do metabolismu arachidonové kyseliny</i>	<i>25</i>
4.	Cíle práce.....	26
5.	Experimentální část	27
5.1.	Materiál	27
5.1.1.	<i>Použitý materiál.....</i>	<i>27</i>
5.1.2.	<i>Bakteriální a buněčné kultury.....</i>	<i>28</i>
5.1.3.	<i>Přístroje a počítačové programy</i>	<i>30</i>
5.2.	Metody	31
5.2.1.	<i>Návrh shRNA sekvencí</i>	<i>31</i>

5.2.2.	<i>Molekulární klonování</i>	36
5.2.3.	<i>Práce s eukaryotickými buněčnými kulturami</i>	40
5.2.4.	<i>Real-time PCR</i>	44
5.2.5.	<i>Detekce exprese cyklooxygenázy na proteinové úrovni</i>	47
5.2.6.	<i>Detekce PGE₂</i>	49
5.2.7.	<i>Test změny stability mRNA</i>	49
5.2.8.	<i>Test vlivu exogenního PGE₂ na expresi MRP4/ABCC4</i>	50
6.	Výsledky	51
6.1.	Příprava modelové buněčné linie se specificky sníženou expresí COX-1/COX-2	51
6.1.1.	<i>Výběr parentní buněčné linie</i>	51
6.1.2.	<i>Měření exprese COX pomocí real-time PCR po transfekci shRNA a selekci antibiotikem</i>	53
6.1.3.	<i>Příprava klonů vybrané buněčné linie a ověření exprese COX na různých úrovních</i>	56
6.1.4.	<i>Využití syntetických siRNA pro snížení exprese cyklooxygenázy</i>	61
6.2.	Analýza vztahů mezi geny metabolismu arachidonové kyseliny a ABCC4	68
6.2.1.	<i>Měření exprese mRNA pomocí real-time PCR</i>	68
6.2.2.	<i>Test změny stability mRNA</i>	70
6.2.3.	<i>Test vlivu exogenního PGE₂ na expresi ABCC4</i>	74
7.	Diskuze	75
8.	Souhrn	81
9.	Summary	83
10.	Literatura	85
11.	Přílohy	93

1. Abstrakt

Cyklooxygenáza (COX) je klíčovým enzymem v metabolismu arachidonové kyseliny (AA). Přeměňuje AA na prostaglandin H_2 , který je dále metabolizován různými enzymy na biologicky aktivní prostanoidy. Tato práce byla zaměřena na studium vztahů mezi geny souvisejícími s metabolismem AA. Pomocí RNA interference byla specificky snižována exprese vždy jedné z izoform COX v buněčné linii rakoviny děložního čípku (Hep2). Cyklooxygenáza 1 (COX-1) byla úspěšně inhibována jak pomocí siRNA („small interfering RNA“), tak shRNA („short hairpin RNA“) sekvencí. Pro snížení exprese cyklooxygenázy 2 (COX-2) se nepodařilo získat výrazně účinnou sekvenci shRNA. Bylo připraveno několik klonů buněčné linie Hep2 se specificky a stabilně inhibovanou expresí COX-1 (Hep2_shRNA1), které byly využity pro další studie. Snížení COX-1 bylo potvrzeno na úrovni mRNA pomocí real-time PCR, na úrovni proteinů pomocí Westernu blotu a na funkční úrovni metodou ELISA. Specifická a stabilní inhibice exprese COX-1 způsobila výrazné snížení mikrozomální prostaglandin E syntázy 1 (mPGES-1). Dále bylo v linii Hep2_shRNA1 nalezeno významné zvýšení hladiny mRNA genu ABCC4 („ATP-binding cassette, sub-family C, member 4“). Tento gen kóduje transportér MRP4 („Multidrug resistance protein 4“), který je přenašečem některých cytostatik, antivirotik a prostanoidů. Výše uvedené výsledky ukazují, že mPGES-1, která je považována za izoformu přednostně se párující s COX-2, může být transkripčně spojena také s COX-1. Zvýšení exprese genu ABCC4 přináší další důkaz, že je MRP4 zapojen do transportu prostanoidů. Tento náález může mít také velký klinický význam při léčbě rakoviny při kombinovaném užívání cytostatik a nesteroidních antiflogistik.

2. Úvod

Cyklooxygenáza (COX) je klíčovým enzymem v metabolismu arachidonové kyseliny (AA). Pomocí COX je AA přeměňována na nestabilní meziprodukt, prostaglandin H_2 , který je dalšími enzymy metabolizován na množství různých biologicky aktivních látek, tzv. prostanoidů. Prostanoidy mají důležitou regulační funkci v řadě fyziologických a patofyziologických procesů jako je například ochrana žaludeční sliznice, srážlivost krve, horečka, bolest, zánět a mnoho dalších.

V posledních desetiletích bylo dosaženo velkého pokroku v pochopení role COX v různých procesech. V současnosti jsou známy dvě hlavní izoformy tohoto enzymu kódované různými geny. Cyklooxygenáza 1 (COX-1) je exprimovaná převážně konstitutivně a uplatňuje se zejména ve fyziologických procesech. V roce 1991 byla objevena druhá izoforma, cyklooxygenáza 2 (COX-2), která je zodpovědná především za vznik horečky, bolesti a zánětu. Existuje mnoho prací ukazujících na zapojení COX-2 také do procesu karcinogeneze. Kromě informací o dvou výše uvedených základních izoformách se objevují i důkazy o existenci dalších variant, zejména sestřihové varianty COX-1, tzv. cyklooxygenázy 3.

Cyklooxygenázy jsou z klinického hlediska velmi důležitými enzymy, neboť zejména na jejich inhibici je založený mechanismus účinku nesteroidních antiflogistik (NSA). NSA jsou jedny z nejpoužívanějších léků na světě pro léčbu bolesti, zánětu a horečky. Bohužel při jejich dlouhodobém užívání může dojít ke vzniku nepříznivých vedlejších účinků, jejichž povaha a rozsah je závislá mimo jiné i na volbě léčiva z této skupiny. Přesný mechanismus účinku NSA zatím není zcela známý. Hlubší pochopení funkce jednotlivých izoform COX by mohlo pomoci více objasnit původ těchto nežádoucích příznaků a přispět tak k vývoji bezpečnějších léků.

Cílem této práce bylo prohloubit znalosti o vzájemných vztazích mezi geny kódujícími cyklooxygenázy a geny blízce či vzdáleně souvisejícími s metabolismem AA. K tomuto účelu bylo využito tzv. RNA interference, která je v současné době jedním z nejvíce využívaných přístupů pro cílenou inhibici exprese genů. Cílem bylo připravit modelovou buněčnou linii se specificky sníženou expresí vždy jedné z izoform COX a využít ji pro studium vztahů mezi jednotlivými geny metabolismu AA na úrovni mRNA.

3. Přehled literárních poznatků

3.1. RNA interference

V posledním desetiletí se pro specifické snižování exprese genů na úrovni mRNA začalo hojně využívat tzv. RNA interference (RNAi), která se zdá být například ve srovnání s „antisense“ oligonukleotidy účinnější (Bertrand et al. 2002). RNAi je přirozený posttranskripční mechanismus, při kterém dochází ke specifickému štěpení komplementární mRNA a její následné degradaci. Jedním z důvodů vyšší efektivity RNAi může být možnost opakovaného využití jedné molekuly siRNA („small interfering RNA“) pro degradaci více molekul mRNA (Hutvagner and Zamore 2002). Pozitivní vliv na účinnost může mít také inkorporace „antisense“ řetězce do RISC komplexu („RNA-induced silencing complex“, kapitola 3.1.1.), kde je chráněn před endogenními RNázami (Dykxhoorn, Palliser, and Lieberman 2006).

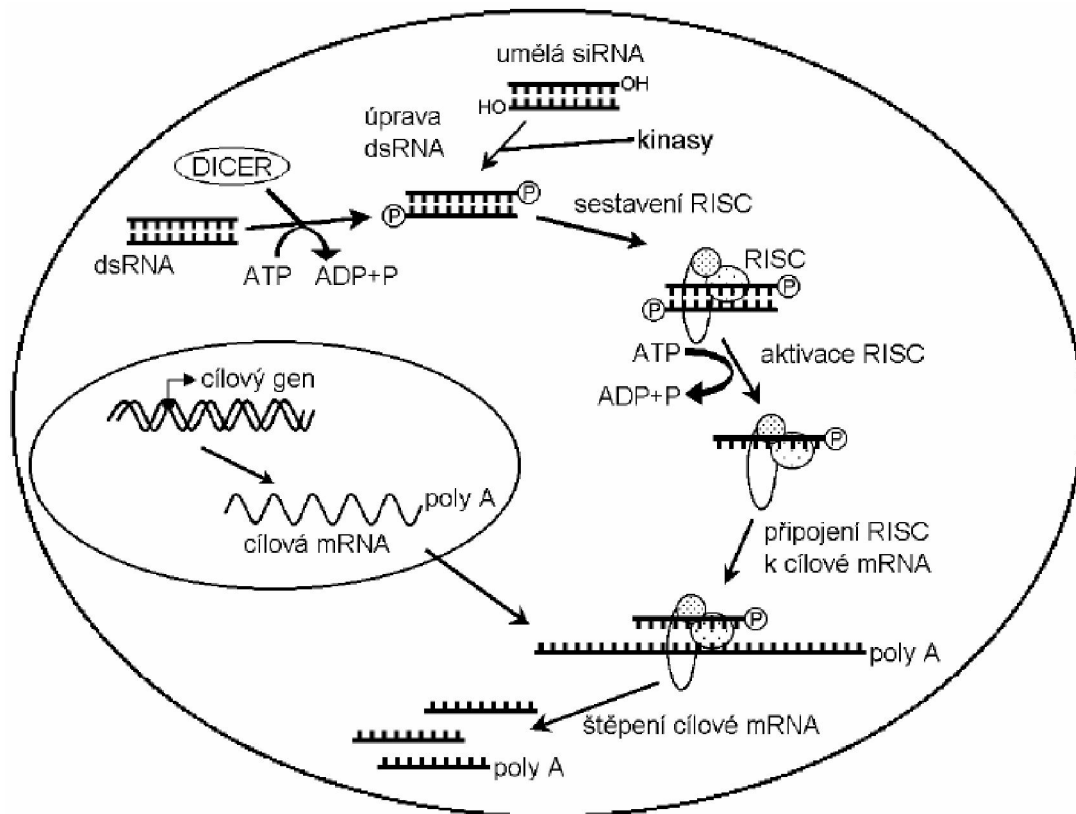
První zmínky o procesu utlumování až umlčování genů, později známému jako RNAi, se objevily koncem 80. let 20. století u rostlin (Napoli, Lemieux, and Jorgensen 1990; van der Krol et al. 1990). Proces RNAi byl popsán v roce 1998 u hlístice *Caenorhabditis elegans* (Fire et al. 1998). Za tento objev získali koncem roku 2006 Andrew Z. Fire a Craig C. Mello Nobelovu cenu za lékařství a fyziologii. Kromě rostlin a hlístů se RNAi vyskytuje také u hub, prvoků a vyšších eukaryot (Struncova et al. 2005).

RNAi slouží k regulaci genové exprese a jako obranný mechanismus buňky proti virům a transpozónům (Hammond et al. 2000; Dykxhoorn, Palliser, and Lieberman 2006). Možnost specificky utlumit expresi určitého genu má rozsáhlé praktické využití. RNAi se stala účinným nástrojem k charakterizaci genů ve funkční genomice. Dále je potenciálně využitelná pro vývoj nových terapeutik, například antivirotik.

3.1.1. Mechanismus RNA interference

Při RNAi je nejprve v prvním kroku RNázou III nazvanou Dicer (Bernstein et al. 2001) štěpena dlouhá dvouřetězcová molekula RNA (dsRNA; „double stranded RNA“) na tzv. siRNA molekuly (Zamore et al. 2000; Elbashir, Lendeckel, and Tuschl 2001). Molekuly siRNA jsou dlouhé okolo 21 nukleotidů s dvounukleotidovými přečnávajícími 3' konci (Elbashir, Lendeckel, and Tuschl 2001) a mohou být do buňky dodány také uměle.

V druhém kroku jsou molekuly siRNA včleněny do multiproteinového komplexu, tzv. RISC (Hammond et al. 2000). V tomto komplexu se nachází helikáza, která odvine jeden z řetězců RNA, zatímco zbylý z řetězců zůstává v RISC za vzniku tzv. aktivovaného RISC komplexu (Nykanen, Haley, and Zamore 2001). Funkcí tohoto řetězce je specificky zaměřovat cílovou sekvenci. Pomocí proteinů s nukleázovou aktivitou, které jsou také součástí RISC, dochází po navázání sekvencně specifické siRNA ke štěpení cílové mRNA, čímž se zahájí její degradace buněčnými RNázami (Gong et al. 2005). Mechanismus RNAi je znázorněn na obr.1.



Obr.1: Mechanismus RNA interference. Převzato od Štruncová a kol. (Struncova et al. 2005).

Zkratky: ADP = adenosindifosfát; ATP = adenosin trifosfát; P = fosfát; poly A = polyadenylovaný.

3.1.2. siRNA a shRNA sekvence

Pro snížení exprese genů pomocí RNAi může být použito dvou základních strategií. V prvním přístupu jsou do cytoplazmy vpravovány dvouřetězcové siRNA. Druhou možností je použití plazmidů nebo virových vektorů obsahujících DNA sekvenci kódující RNA o vlásenkové struktuře (shRNA; „short hairpin RNA“), ze které Dicer vyštěpí fragment siRNA duplexu, analogicky jako u endogenních miRNA (mikroRNA) (Bartel 2004; Pillai 2005). Každá z těchto dvou strategií má své výhody a nevýhody.

Použití syntetických siRNA je relativně časově méně náročné. Díky tomu je možné v krátkém časovém úseku vyselektovat účinné sekvence ze široké palety siRNA navržených pro daný gen. Při této metodě je nutné dosáhnout vysoké účinnosti transfekce, neboť neúspěšně transfekované buňky již není možné dále selektovat pomocí antibiotika. Další nevýhodou této metody je fakt, že snížení exprese genu pomocí syntetických siRNA je pouze dočasné, neboť koncentrace siRNA se po několika buněčných děleních naředí a navíc jsou siRNA sekvence v buňce degradovány RNázami. Doba trvání účinku syntetických siRNA se pohybuje od několika dní po 4 týdny, přičemž limitujícím faktorem je zejména rychlost dělení daného typu buněk (Bartlett and Davis 2006). Pro nové experimenty je tedy nutné připravovat „stejnou“ linii stále znovu, čímž se ale nezajistí úplně shodné vlastnosti dané linie a navíc se tak zvyšuje cenová náročnost metody.

Nespornou výhodou druhého přístupu je možnost trvalého snížení exprese genů. Pomocí shRNA je získána linie se stabilním fenotypem, kterou můžeme uchovat a používat pro různé experimenty. Nevýhodou je časová náročnost přípravy těchto linií zahrnující zaklonování shRNA do expresních plazmidů, selekci pomocí antibiotika a přípravu jednotlivých klonů. Další nevýhodou je možné ovlivnění dané linie samotným procesem vnesení plazmidu (plazmid se může začlenit kdekoliv do genomu a ovlivnit další geny), dále selekcí antibiotikem a rozklonováním buněčné linie. Pro snížení pravděpodobnosti zkreslení výsledků experimentu je vhodné testovat vždy více klonů dané linie.

3.1.3. Nespecifická imunitní odpověď buňky

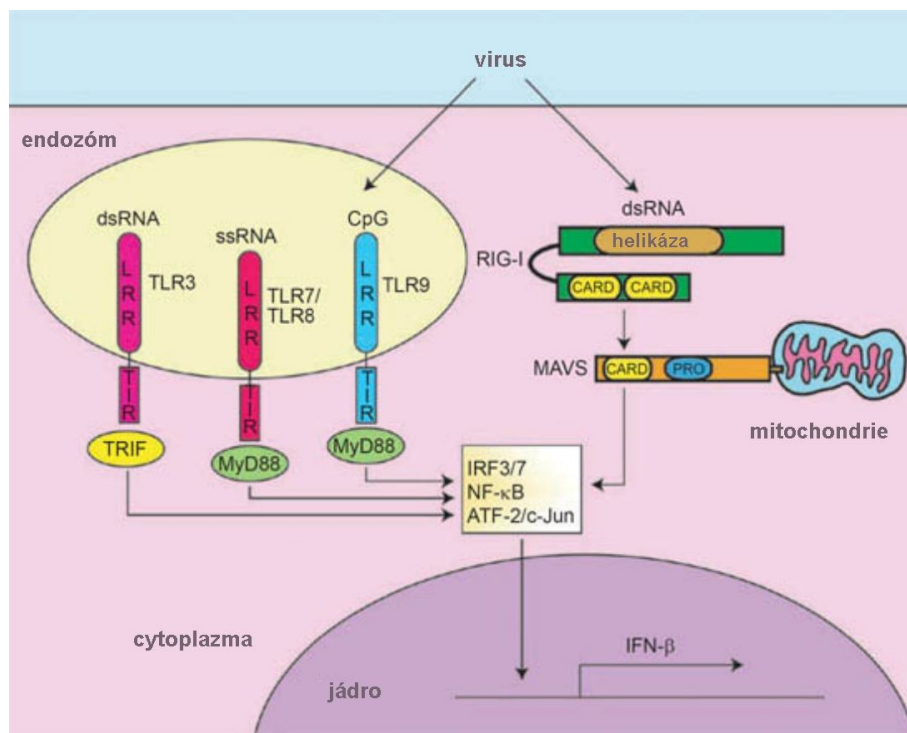
Dlouhá dsRNA indukuje v buňce nespecifickou (interferonovou, antivirovou) imunitní odpověď, která obvykle vede spíše k apoptóze než ke specifickému umlčování genů (Stark et al. 1998). Krátké dsRNA (méně než 30 nukleotidů) ve většině případů interferonovou odpověď neaktivují (Elbashir et al. 2001). K aktivaci může dojít zejména ve velmi citlivých

buňkách a při vysoké koncentraci použité siRNA (Bridge et al. 2003; Sledz et al. 2003; Dorsett and Tuschl 2004; Persengiev, Zhu, and Green 2004), nicméně ve většině studií nebyl tento problém pozorován (Dykxhoorn, Palliser, and Lieberman 2006).

Nespecifická imunitní odpověď slouží zejména k ochraně buňky proti virové infekci. Klíčovým jevem antivirové imunitní odpovědi je syntéza a sekrece interferonů (IFN) typu I, například IFN- α a IFN- β , které vykazují antiproliferativní a imunomodulační účinky (Honda et al. 2005).

Při antivirové odpovědi nejprve dochází systémem receptorů k odhalení viru v buňce a následně k iniciaci kaskády proteinových signálů regulujících syntézu interferonů (Seth, Sun, and Chen 2006). Byly objeveny dvě signální dráhy aktivující vnitřní imunitní odpověď proti virové infekci v hostitelské buňce (Seth, Sun, and Chen 2006).

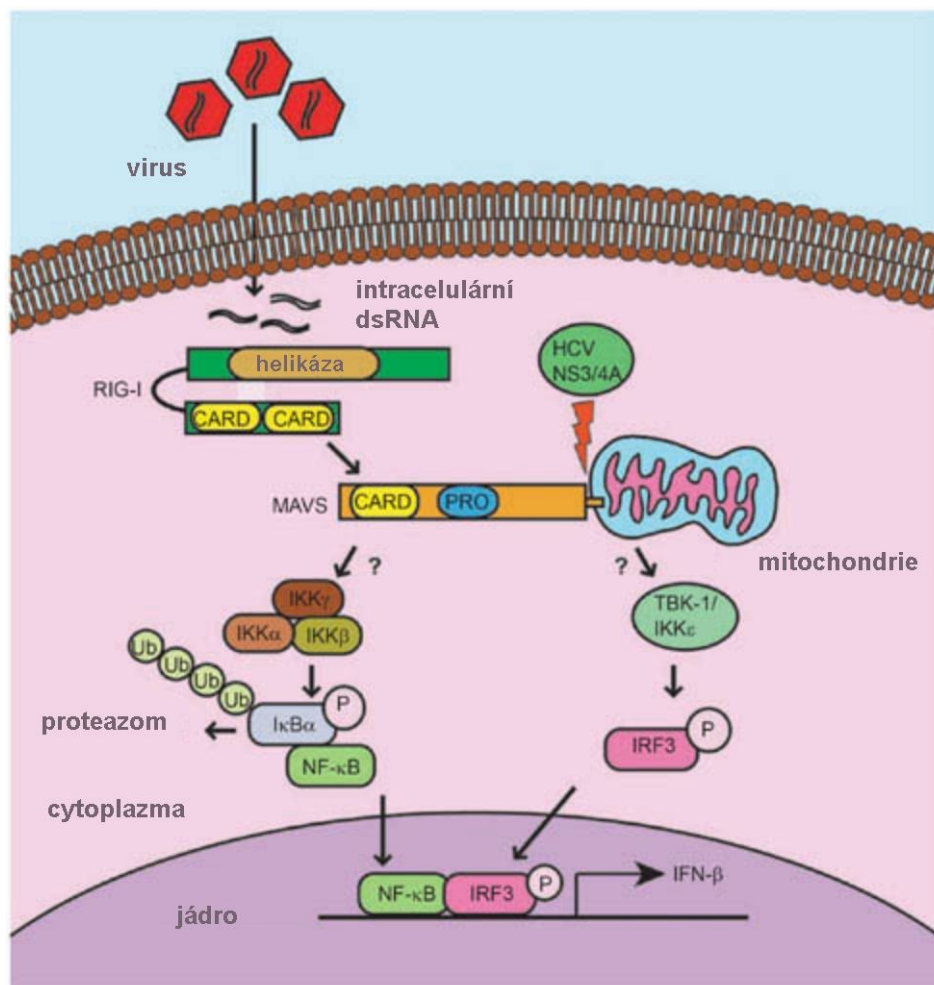
Jedna z drah využívá členů rodiny TLR („Toll-like receptor“) (Akira and Takeda 2004), které detekují viry po vstupu do buňky endocytózou. Dráha „TLR“ indukuje produkci interferonů prostřednictvím několika signálních proteinů, které nakonec vedou k aktivaci transkripčních faktorů NF- κ B, IRF3 a IRF7 (Obr.2).



Obr.2: Dráha „TLR“ antivirové imunitní odpovědi buňky. Převzato od Seth a kol. (Seth, Sun, and Chen 2006), upraveno.

Zkratky: ATF-2 = „activating transcription factor 2“; c-Jun = „jun oncogene“; CpG = krátké opakující se sekvence DNA bohaté na cytosiny a guaniny; LRR = „leucine rich repeats“; MyD88 = „myeloid differentiation primary response gene (88)“; PRO = „proline-rich region“; ssRNA = jednořetězcová RNA; TIR = „Toll/IL-1 receptor“; TRIF = „toll-like receptor adaptor molecule 1“.

Druhá dráha využívá jako receptoru pro intracelulární virovou dsRNA cytosolického proteinu RIG-I („Retinoic acid inducible gene I“) (Yoneyama et al. 2004). RIG-I obsahuje C-terminální RNA helikázovou doménu, která se váže k virové dsRNA a dvě N-terminální domény CARD („Caspase recruitment domain“). Navázání dsRNA na helikázovou doménu pravděpodobně způsobí konformační změny, které aktivují domény CARD (Seth, Sun, and Chen 2006). CARD spustí signální dráhy aktivující NF- κ B a IRF prostřednictvím adaptorového proteinu MAVS („Mitochondrial anti-viral signaling protein“) (Seth et al. 2005), který se nachází na mitochondriální membráně (Obr.3).



Obr.3: Dráha „RIG-I“ antivirové imunitní odpovědi buňky. Převzato od Seth a kol. (Seth, Sun, and Chen 2006), upraveno.

Zkratky: HCV NS3/4A = serinová proteáza viru hepatitidy C; IKK = „conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase“; P = fosfát; PRO = „proline-rich region“; Ub = ubiquitin; TBK-1 = „TANK-binding kinase 1“.

3.2. Metabolismus arachidonové kyseliny

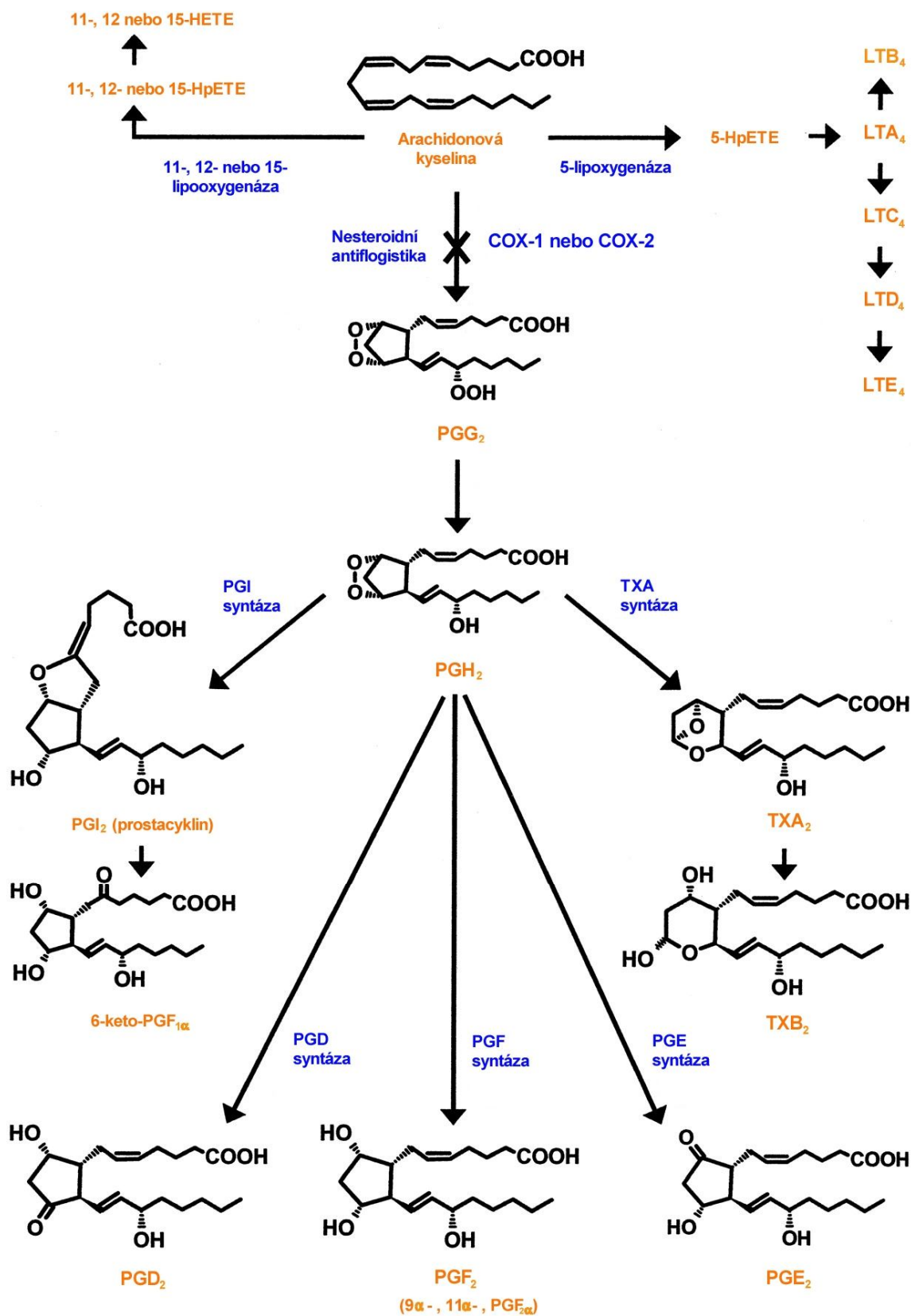
Arachidonová kyselina (AA) je esenciální mastná kyselina s dvaceti uhlíkovými atomy a 4 *cis* dvojnými vazbami. Je uvolňována z membránově vázaných fosfolipidů působením fosfolipázy A₂. V buňkách je přeměňována pomocí několika enzymatických systémů na biologicky aktivní molekuly, které se souhrnně nazývají eikosanoidy.

Jedním z nejdůležitějších enzymatických systémů je prostaglandinsyntetázový komplex s klíčovým enzymem **cyklooxygenázou** (kapitola 3.3.1.). Pomocí cyklooxygenázové aktivity katalyzuje tento enzym přeměnu AA na nestabilní meziprodukt, prostaglandin (PG) G₂, který je dále přeměněn peroxidázovou aktivitou na PGH₂. PGH₂ je metabolizován dalšími enzymy, izomerázami a oxidoreduktázami, na různé biologicky aktivní prostaglandiny a tromboxany (souhrnně nazývané *prostanoidy*), například PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ (prostacyklin) a tromboxan (TX) A₂. PGD₂ může být dále přeměněn na PGJ₂ (Pettipher, Hansel, and Armer 2007). Produkce prostanoidů je tkáňově specifická, závisí na hladinách jednotlivých enzymů v dané tkáni (Dubois et al. 1998; Smith, DeWitt, and Garavito 2000).

Dále může být AA metabolizována lipoxygenázovou drahou. Enzym **5-lipoxygenáza** přetváří arachidonovou kyselinu na *leukotrieny* (LT) (Romano and Claria 2003), které se uplatňují zejména jako mediátory alergických reakcí, při anafylaxi a astmatu a působí silně bronchokonstrikčně. Pomocí **12-** nebo **15-lipoxygenázy** mohou vznikat *lipoxiny*, které zastavují prozánětlivý signál a zahajují opravu zánětem poškozené tkáně nebo *12-* a *15-hydroxyeikosatetraenové kyseliny* (12-HETE a 15-HETE), které se podílí na regulaci angiotenzinového systému v ledvinách.

Další možností je zpracování AA pomocí enzymů **cytochromu P450**, **epoxygenáz** na *epoxyeikosatrienové kyseliny* a **hydroxyláz** na *hydroxyeikosatetraenové kyseliny*. Tyto látky ovlivňují například buněčnou proliferaci, zánět, hemostázu, působí vazodilatačně nebo vazokonstrikčně a uplatňují se při regulaci transportu iontů (Kroetz and Zeldin 2002).

Základní cesty metabolismu AA znázorňuje obr.4.



Obr.4: Metabolismus arachidonové kyseliny (Simmons, Botting, and Hla 2004), upraveno.

3.3. Vybrané geny metabolismu arachidonové kyseliny

3.3.1. Cyklooxygenáza

Enzym cyklooxygenáza (COX), známá také pod názvem prostaglandin endoperoxid syntáza (E.C. 1.14.99.1), je členem nadrodiny myeloperoxidáz. COX se vyskytuje minimálně ve dvou izoformách, první je cyklooxygenáza 1 (COX-1), druhou cyklooxygenáza 2 (COX-2). Obě izoformy patří mezi membránově vázané proteiny, které se nachází zejména v endoplazmatickém retikulu. Ačkoli je každá z těchto izoforem kódována samostatným genem, jejich sekvence aminokyselin je homologní z 60-65 % (Chandrasekharan and Simmons 2004) a katalytická doména obsahující peroxidázové a cyklooxygenázové aktivní místo je téměř shodná (Warner and Mitchell 2004).

3.3.1.1. Cyklooxygenáza 1

COX-1 je enzym o molekulové hmotnosti 67 kDa, který je kódován genem o velikosti 22 kb ležícím na chromozómu 9. Nachází se v lumen endoplazmatického retikula a v jaderné membráně. COX-1 je konstitutivně exprimována ve většině savčích buněk a tkáních, ve velkém množství se může nacházet i v nádorech (Hwang et al. 1998; Kirschenbaum et al. 2000; Sales et al. 2002). Je zodpovědná za produkci prostanoidů uplatňujících se zejména ve fyziologických funkcích, například PGE₂ a PGI₂ v žaludeční a střevní sliznici, kde mají ochrannou funkci. Za určitých podmínek může být indukována externími podněty (Hamasaki et al. 1993).

3.3.1.2. Cyklooxygenáza 2

Velkým posunem vpřed byl v roce 1991 objev druhé izoformy COX, COX-2 (Xie et al. 1991). Molekulová hmotnost COX-2 je 72 kDa a je kódována genem o velikosti 8,3 kb nacházejícím se na chromozómu 1. COX-2 je indukována stimulanty jako jsou mitogeny, cytokiny a růstové faktory. Tato izoforma se uplatňuje především v patofyziologických procesech (zejména v zánětu, horečce a bolesti), méně již v procesech fyziologických, například při udržování rovnováhy tekutin v ledvinách (Khan et al. 2002).

Bylo publikováno mnoho prací, ve kterých byl popsán výskyt zvýšené konstitutivní exprese COX-2 v solidních nádorech, například v nádoru tlustého střeva (Maekawa et al. 1998), prostaty (Gupta et al. 2000), prsou a také pankreatu a močového měchýře (Gasparini et

al. 2003). U některých typů rakoviny míra exprese COX-2 jasně koreluje s mírou přežití pacientů. Vztah mezi expresí COX-2 a vznikem a vývojem nádoru byl potvrzen i genetickými studiemi (Oshima et al. 1996; Williams et al. 1996). Obecně je exprese COX-2 vyšší u dobře diferencovaných tumorů a v metastázích.

3.3.1.3. Nesteroidní antiflogistika

Na inhibici cyklooxygenáz je založený mechanismus účinku **nesteroidních antiflogistik (NSA)**. Tato skutečnost byla poprvé popsána v roce 1971 (Vane 1971). Nicméně, mnoho studií také ukázalo, že například protizánětlivé a antiproliferativní účinky některých NSA nejsou způsobeny pouze inhibicí COX, ale částečně jsou na tomto enzymu nezávislé (Tegeder, Pfeilschifter, and Geisslinger 2001; Denkert et al. 2003; Maier et al. 2004).

NSA patří na světě k nejvíce používaným terapeutickým agens pro léčbu bolesti, zánětu a horečky. Jsou využívány v různých formách již více než 3 500 let. Před více než stoletím byla izolována a modifikována sloučenina z vrby (*salix alba*) a nabídnuta k prodeji jako „aspirin“. Následně z ní bylo odvozeno množství podobných sloučenin.

Dle míry selektivity k jednotlivým izoformám COX lze NSA rozdělit do tří skupin (Lincova et al. 2002).

- a) **Neselektivní inhibitory COX:** ovlivňují COX-1 i COX-2. Patří sem většina používaných NSA, například aspirin, indometacin, naproxen, ibuprofen a mnoho dalších.
- b) **Preferenční inhibitory** (meloxikam, nimesulid): mají přibližně 2-100 násobně vyšší selektivitu ke COX-2.
- c) **Selektivní inhibitory COX-2 (koxiby):** v terapeutických dávkách *in vivo* neovlivňují COX-1. Mezi nejznámější koxiby patří rofecoxib a celecoxib.

Při dlouhodobém užívání NSA se u některých pacientů projevují vedlejší nežádoucí účinky. U neselektivních NSA jde zejména o nepříznivý vliv na gastrointestinální trakt, například vznik žaludečních vředů (Graham et al. 1993), což je pravděpodobně způsobeno inhibicí COX-1. Naproti tomu dlouhodobé užívání koxibů je spojeno se zvýšeným rizikem výskytu kardiovaskulárních příhod (Wright 2002; Kwong 2004; Kearney et al. 2006).

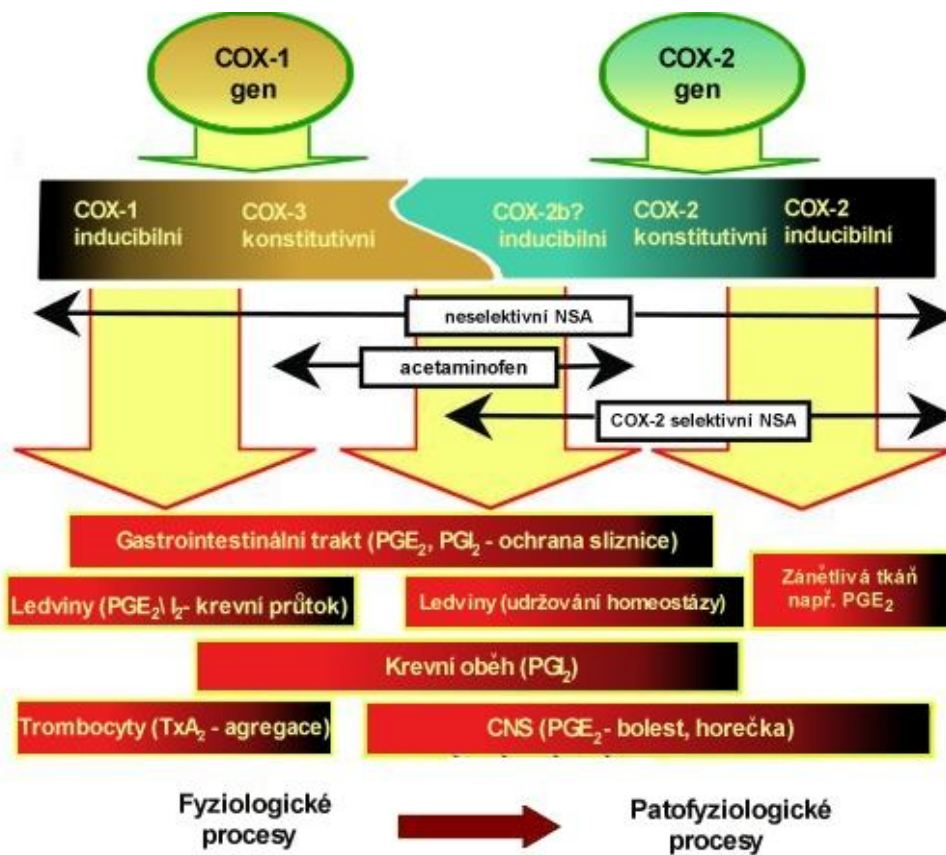
Na druhou stranu, použití NSA s sebou může nést i mnoho příznivých účinků, například ochranné účinky proti rakovině (Rao et al. 1995; Reddy, Rao, and Seibert 1996; Steinbach et al. 2000) nebo oddálení a prevence Alzheimerovy choroby (Sastre, Klockgether, and Heneka 2006).

3.3.1.4. Další izoformy cyklooxygenáz

Kromě dvou výše uvedených byla objevena ještě třetí izoforma cyklooxygenázy (Chandrasekharan et al. 2002). Tento enzym byl nazván cyklooxygenáza 3 (COX-3), později také COX-1b nebo COX-1v (Hersh, Lally, and Moore 2005). COX-3 je kódována stejným genem jako COX-1, ale na rozdíl od této izoformy si při sestřihu mRNA ponechává intron 1 (Chandrasekharan et al. 2002; Hersh, Lally, and Moore 2005). COX-3 byla poprvé nalezena ve tkáni psí mozkové kůry, u lidí se COX-3 nachází v největším množství v mozkové kůře a srdci (Chandrasekharan et al. 2002).

Počáteční studie týkající se psí formy COX-3 ukázaly, že tato izoforma je selektivně inhibována jak NSA, tak i léky ze skupiny **analgetika-antipyretika** (například acetaminofenem, fenacetinem, antipyrinem a dipyronem), které postrádají protizánětlivé účinky (Chandrasekharan et al. 2002). Na základě tohoto poznatku se začalo předpokládat, že inhibice COX-3 by mohla být mechanismem, kterým tyto léky snižují bolest a potenciálně i horečku. Bohužel psí a krysí/lidská izoforma COX-3 se ve své sekvenci liší v počtu nukleotidů v intronu 1, což vede k posunutí čtecího rámce a u krysí/lidské formy ke vzniku katalyticky neaktivního enzymu (Hersh, Lally, and Moore 2005; Kis, Snipes, and Busija 2005; Snipes et al. 2005).

Objevily se také publikace zmiňující existenci dalších sestřihových variant COX. Některé z nich například upozorňují na různou citlivost COX-2 k acetaminofenu (Simmons et al. 1999; Botting 2000), ale neexistují dostatečné důkazy, že byl tento jev způsoben přítomností více izoform COX-2. Nicméně, teorie, že by ze dvou genů kódujících enzym cyklooxygenázu (COX-1 a COX-2) mohlo být odvozeno více izoform vyskytujících se v různých tkáních (Obr.5), by mohla alespoň zčásti vysvětlovat zatím ne zcela objasněné rozdíly mezi účinky různých NSA a léků patřících do skupiny analgetika-antipyretika (Warner and Mitchell 2002).



Obr.5: Návrh různých izoforem COX vznikajících z genů kódujících COX-1 a COX-2. Dva oddělené geny pro COX-1 a COX-2 mohou dát vznik řadě konstitutivních a inducibilních proteinů COX s překrývajícími se funkcemi (Warner and Mitchell 2002), upraveno. Zkratky: CNS = centrální nervová soustava.

3.3.2. Prostaglandin E syntázy

PGE₂ je hlavním metabolitem aktivovaného enzymu COX (Horton et al. 1999). Je mediátorem horečky a zánětu a kromě toho hraje také důležitou roli v normální fyziologii tkání, např. epitelových tkání gastrointestinálního traktu (Chandrasekharan et al. 2005; Samuelsson, Morgenstern, and Jakobsson 2007; Yang 2007). PGE₂ vzniká izomerací PGH₂ pomocí enzymu prostaglandin E syntázy (PGES).

V současné době jsou popsány nejméně 3 izoformy prostaglandin E syntázy s odlišnými enzymatickými vlastnostmi a lokalizací v buňce (Murakami et al. 2002; Murakami et al. 2003; Chandrasekharan et al. 2005). Mikrozomální prostaglandin E syntáza 1 (mPGES-1 neboli prostaglandin E syntáza; PTGES) a mikrozomální prostaglandin E syntáza 2 (mPGES-2 neboli prostaglandin E syntáza 2; PTGES2) jsou membránově vázané enzymy. mPGES-1 je členem nadrodiny MAPEG („Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism“) a jejím esenciálním kofaktorem je glutathion. Tato izoforma je silně indukována prozánětlivými a mitogenními faktory, nicméně v některých tkáních (např. plicích, slezině a ledvinách) může být exprimována konstitutivně. mPGES-1 je inhibována glukokortikoidy. Druhá membránově vázaná PGES, mPGES-2, je konstitutivně exprimována v různých tkáních a na rozdíl od mPGES-1 není indukována prozánětlivými signály. Třetí izoformou PGES je cytosolická prostaglandin E syntáza (cPGES neboli prostaglandin E syntáza 3; PTGES3). Je spojena s proteinem Hsp90 („Heat-shock protein 90“) a je konstitutivně exprimována v mnoha typech buněk a tkání.

Každá z výše jmenovaných izoform prostaglandin E syntázy „spolupracuje“ různou měrou s jednotlivými izoformami cyklooxygenázy. mPGES-1 je přednostně spojena s COX-2, zatímco cPGES s COX-1. Poslední izoforma, mPGES-2, je schopná se „párovat“ při syntéze PGE₂ s oběma izoformami COX, s mírnou preferencí ke COX-2 (Murakami et al. 2002; Murakami et al. 2003; Chandrasekharan et al. 2005). Nicméně, „párování“ terminálních PGES s jednotlivými izoformami COX a jejich přínos pro syntézu PGE₂ nejsou ještě plně objasněny a tento problém je třeba ještě více prostudovat.

3.3.3. Tromboxan A syntáza 1 a prostaglandin I₂ (prostacyklin) syntáza

Dalšími důležitými enzymy patřícími do metabolismu AA jsou tromboxan A syntáza 1 (TBXAS1) a prostaglandin I₂ syntáza (PTGIS). Oba tyto enzymy jsou členy nadrodiny enzymů cytochromu P450, do které patří spíše na základě podobnosti sekvence než podobnosti funkční. Tyto membránově vázané proteiny se nachází v endoplazmatickém retikulu.

TBXAS1 katalyzuje izomeraci PGH₂ na TXA₂ (Wang and Kulmacz 2002) a její aktivita byla poprvé popsána v krevních destičkách (Needleman et al. 1976). TXA₂ je silným vazokonstriktorem, zprostředkovává aktivaci trombocytů a jejich agregaci (Ogletree 1987; Pradono et al. 2002). TXB₂ je produktem neenzymatické přeměny TXA₂, který je za fyziologických podmínek vysoce nestabilní (Castelli et al. 1989).

PTGIS katalyzuje přeměnu PGH₂ na PGI₂ (prostacyklin). PGI₂ je hlavním produktem metabolismu AA v cévách a je antagonistou TXA₂. Jeho účinky spočívají zejména v silné indukci vazodilatace v plicním i systémovém oběhu a inhibici agregace a adheze trombocytů. Je pravděpodobné, že prostacyklin působí antiproliferačně a brání remodelaci cév (Pradono et al., 2002; Kajita et al., 2005; Poole et al., 2006).

Jak již vyplývá z funkcí jejich produktů, oba tyto enzymy hrají důležitou roli v některých fyziologických a patofyziologických procesech, například v hemostáze a při rozvoji chorob kardiovaskulárního systému. Nerovnováha mezi hladinami PGI₂ a TXA₂ může přispívat ke vzniku aterosklerózy, infarktu myokardu a cévních mozkových příhod.

3.3.4. Prostaglandin D₂ syntázy

Prostaglandin D₂ syntáza je izomeráza přeměňující PGH₂ na PGD₂. Existují nejméně dvě formy tohoto enzymu, lipokalinová prostaglandin D₂ syntáza a hematopoetická prostaglandin D₂ syntáza (Pettipher, Hansel, and Armer 2007).

Lipokalinová (cerebrální, mozková) prostaglandin D₂ syntáza (PTGDS) je exprimována zejména v centrálním nervovém systému, dále v mužských pohlavních orgánech a srdci a je sekretována do mozkomíšního moku, seminální plazmy a krevní plazmy. Sledování koncentrace PTGDS v těchto tělních tekutinách je možné využít pro diagnostiku některých neurologických onemocnění, dysfunkce tvorby spermií a kardiovaskulárních a ledvinných chorob (Chen, Huang, and Zhou 2004).

Hematopoetická (krvetvorná) prostaglandin D₂ syntáza (PGDS) je cytosolický enzym, který pro svou funkci vyžaduje přítomnost glutathionu (Kanaoka and Urade 2003). Tato forma produkuje PGD₂ v žírných buňkách, v antigen prezentujících buňkách a Th2 buňkách (Kanaoka and Urade 2003).

PGD₂ se uplatňuje při vazodilataci, bronchokonstrikci a inhibici agregace krevních destiček (Kanaoka and Urade 2003). Dále se může podílet na regulaci spánku (Urade and Hayaishi 1999) a vnímání bolesti (Eguchi et al. 1999). Je převládajícím prostaglandinem nacházejícím se v místě alergických zánětů (Pettipher, Hansel, and Armer 2007).

3.3.5. Arachidonát 5-lipoxygenáza a arachidonát 5-lipoxygenázu-aktivující protein

Existuje několik lipoxygenáz nacházejících se v různých tkáních, z nichž nejdůležitější je 5-lipoxygenáza (ALOX5). Tento enzym katalyzuje oxygenaci a následnou dehydrataci AA za vzniku nestabilního LTA₄ (Peters-Golden and Brock 2003). Aktivita ALOX5 byla poprvé popsána v roce 1976 (Borgeat, Hamberg, and Samuelsson 1976). U lidí je exprimována v buňkách myeloidní linie, B-lymfocytech a endoteliálních buňkách plicní artérie (Romano and Claria 2003). Pro svou aktivaci vyžaduje ALOX5 pomocný protein, arachidonát 5-lipoxygenázu-aktivující protein (ALOX5AP, FLAP) (Peters-Golden and Brock 2003), na který se ukotvuje při translokaci do plazmatické membrány. V případě inhibice ALOX5AP dochází k zabránění translokace ALOX5 do buněčné membrány a inhibici její aktivity.

LTA₄ může být dále hydrolyzován pomocí LTA₄ hydrolázy na LTB₄ nebo metabolizován pomocí LTC₄ syntázy na LTC₄ (Folco and Murphy 2006). LTC₄ může být dále modifikován na LTD₄ a dále LTE₄. LTC₄, LTD₄ a LTE₄ patří do skupiny tzv. cysteinylových leukotrienů, dříve známých jako SRS-A („Slow Reacting Substance of Anafylaxis“) (Peters-Golden and Brock 2003). Vysoká hladina cysteinylových LT může způsobit anafylaktický šok.

Název leukotrieny vznikl spojením slov „leukocyty“, ve kterých se LT nejčastěji tvoří, a „trieny“, protože ve své struktuře obsahují tři konjugované dvojně vazby. Leukotrieny jsou tvořeny zejména v leukocytech a uplatňují se zejména v astmatu a alergických nemocech. (Peters-Golden and Brock 2003).

3.4. MRP4/ABCC4

MRP4 („Multidrug resistance protein 4“) patří do rodiny tzv. ABC transportérů, podrodiny C (z toho je také odvozeno označení genu kódujícího tento protein - ABCC4; „ATP-binding cassette, sub-family C, member 4“). MRP4 zprostředkovává ATP-dependentní transport různých organických aniontů, například cyklických nukleotidů cAMP a cGMP (Zhou et al. 2008), glutathionu (Lai and Tan 2002), folátu (Chen, Lee, and Kruh 2001; Chen et al. 2002) a steroidních konjugátů (Zeng et al. 2000). Mezi substráty MRP4 patří také antivirová agens, např. gancyclovir (Adachi et al. 2002), azidothymidin monofosfát (Sampath et al. 2002), 6-merkaptopurin a 6-tioguanin (Chen, Lee, and Kruh 2001) a dále léky podávané při léčbě rakoviny, jako například topotekan (Leggas et al. 2004), irinotekan a jeho aktivní metabolit SN-38 (Leggas et al. 2004; Tian et al. 2005), leukovorin (Chen et al. 2002) a metotrexát (Kool et al. 1999; Lee, Klein-Szanto, and Kruh 2000; Chen et al. 2002).

3.4.1. Zapojení MRP4/ABCC4 do metabolismu arachidonové kyseliny

Některé publikace přinášejí důkazy, že se MRP4 uplatňuje při transportu prostanoidů (Reid et al. 2003; Rius et al. 2005; Lin et al. 2008). S tímto je v souladu i fakt, že se MRP4 vyskytuje v mnoha tkáních a je silně exprimován zejména v ledvinách a prostatě, orgánech spojených s produkcí vysokých hladin prostanoidů (Kool et al. 1997; Reid et al. 2003; Warner and Mitchell 2003).

V souvislosti zapojení MRP4/ABCC4 do metabolismu COX je také zajímavé, že NSA, kromě inhibice vlastní syntézy prostanoidů (kapitola 3.3.1.3.), inhibují také jejich aktivní transport z buněk, ve kterých vznikají. Byla nalezena závislost mezi chemickou strukturou jednotlivých NSA a jejich schopností inhibovat přenos prostanoidů pomocí MRP4. Například flurbiprofen, ibuprofen, indoprofen, ketoprofen (patřící k derivátům kyseliny propionové) nebo indometacin (skupina indolových/indenových derivátů kyseliny octové) jsou v terapeutických koncentracích silnými inhibitory MRP4, zatímco diklofenak (heteroaryl deriváty kyseliny octové) nebo celecoxib a rofecoxib (diaryl heterocyklické deriváty) jsou spíše neúčinné (Reid et al. 2003; Warner and Mitchell 2003).

Některé NSA inhibují transport i dalších potvrzených substrátů MRP4, například metotrexátu (El-Sheikh et al. 2007).

4. Cíle práce

Tato práce byla zaměřena zejména na studium genů metabolismu AA, především enzymu COX. K tomuto účelu bylo využito zejména cílené inhibice exprese genů pomocí RNAi.

V této práci byly vytyčeny následující cíle:

1) Příprava modelové buněčné linie se stabilně sníženou expresí vždy jedné s izoformou COX (COX-1/COX-2) prostřednictvím RNAi. Tento cíl se skládal z těchto dílčích cílů:

- a) Návrh a syntéza sekvencí shRNA specifických vždy pro jednu z izoformou COX.
- b) Konstrukce vhodného vektoru pro expresi shRNA sekvencí v eukaryotických buněčných liniích, zaklonování shRNA sekvencí.
- c) Transfekce plazmidů se zaklonovanými shRNA sekvencemi do vhodné lidské buněčné linie, selekce úspěšně transfekovaných buněk pomocí antibiotika.
- d) Výběr buněčné linie s významně sníženou expresí COX pomocí metody real-time PCR.
- e) Potvrzení snížení exprese COX na úrovni proteinů metodou Western blot.
- f) Potvrzení snížení exprese COX na funkční úrovni pomocí metody ELISA.

2) Analýza vybraných genů metabolismu AA na připravených buněčných liniích se sníženou expresí vždy jedné s izoformou COX. Tento cíl se skládal z těchto dílčích cílů:

- a) Návrh a syntéza systémů primerů a sond pro real-time PCR pro vybrané geny metabolismu AA.
- b) Sledování změn exprese těchto genů pomocí real-time PCR v závislosti na změně exprese COX.

5. Experimentální část

5.1. Materiál

5.1.1. Použitý materiál

1x TrueStart™ Taq buffer; Fermentas, Kanada
3,3'-Diaminobenzidine (DAB) Peroxidase Substrate System; Amresco Inc., USA
Actinomycin D; Sigma-Aldrich, USA
AmpF ℓ STR® Identifiler® PCR Amplification Kit; Applied Biosystems Inc, USA
arachidonová kyselina; Sigma-Aldrich, USA
BSA, bovinní sérový albumin; Amresco Inc., USA
Cell counting Kit-8; ALEXIS Corporation, Švýcarsko
DC Protein Assay; Bio-Rad Laboratories, USA
dNTP; Fermentas, Kanada
EDTA disodium; Serva, Německo
ELISA assay kit; Cayman Chemical Company, USA
Ethanol; Merck, Německo
fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); Sigma-Aldrich, USA
Glycin; Lachema, Česká republika
Goat-anti-Mouse-HRP conjugated secondary antibody; Bio-rad Laboratories, USA
HPRT-S1 DS Positive Control; Integrated DNA technologies, Inc., USA
INTERFERin™; Polyplus-transfection Inc., USA
KCl; Serva, Německo
KH₂PO₄; Lachema, Česká republika
MgCl₂; Fermentas, Kanada
Millex-HV Syringe Driven Filter Unit, 0,45 μ M, PVDF; Millipore, Irsko
M-MuLV Reverse Transcriptase, RNase H⁻; Finnzymes, Finsko
MONOCLONAL ANTI-COX-I, CLONE AS70; Sigma-Aldrich, USA
MONOCLONAL ANTI- β -ACTIN, CLONE AC-15; Sigma-Aldrich, USA
Na₂HPO₄·7H₂O; Sigma-Aldrich, USA
NaCl; Serva, Německo
Nanofectin siRNA; PAA Laboratories GmbH, Rakousko

Nonidet P40; Fluka, Švýcarsko
Oligonukleotidy (shRNA, primery, sondy); GENERI BIOTECH s.r.o., Česká republika
Opti-4CN™ Substrate Kit; Bio-Rad Laboratories, USA
Perstained Protein Marker; New England Biolabs, USA
PGE₂; Sigma-Aldrich, USA
Plasmid Midi Kit; Qiagen, Německo
pUB-Bsd; Invitrogen, USA
pUC131; ÚHKT, Česká republika
PVDF (polyvinyliden difluorid) membrána; Amresco Inc., USA
Restrikční enzymy (*Bam*HI, *Hind*III, *Age*I, *Bgl*III, *Xba*I); New England Biolabs, USA
SDS, sodium dodecyl sulfát; Serva, Německo
Silencer® Select Pre-designed (Inventoried) siRNA, siRNA ID #: s336; Ambion, USA
SYBR Green I; Invitrogen, USA
T4 DNA ligáza; Fermentas, Kanada
TaKaRa RECOCHIP; TaKaRa, Japonsko
TOPO XL PCR Cloning Kit; Invitrogen, USA
TRI REAGENT®; Molecular Research Center, Inc., USA
Tris (hydroxymethyl) aminomethan; Lachema, Česká republika
TrueStart™ Taq DNA Polymerase; Fermentas, Kanada
Tween 20; Serva, Německo
TYE™ 563 DS Transfection Control; Integrated DNA technologies, Inc., USA
Western Blotting Luminol Reagent; Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing; Invitrogen, USA

5.1.2. Bakteriální a buněčné kultury

5.1.2.1. Bakteriální kultury

Bakteriální kmen *Escherichia coli* DH5 α ; Clontech Laboratories, USA

Genotyp: F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR 17(rk⁻, mk⁺), phoA, supE 44, λ ⁻, thi -1, gyrA96, relA1, dam⁺, dcm⁻.

Kultivace při 37° C v LB médiu. Buňky umožňují modrobílou selekci.

5.1.2.2. Buněčné eukaryotické kultury

Růstová média, chemikálie a materiál pro kultivaci eukaryotických buněk:

10 x phosphate buffered saline (PBS); Cambrex, USA

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM); Cambrex, USA

Effectene® Transfection Reagent; Qiagen, Německo

fetální bovinní sérum (FBS); PAA Laboratories GmbH, Rakousko

gentamicin; Sigma-Aldrich, USA

Ham's F12 with L-Glutamine (Ham's F12); Cambrex, USA

MEM Eagle with EBSS with L-Glutamine (EMEM); Cambrex, USA

Non Essential Amino Acids (NEAA); PAA Laboratories GmbH, Rakousko

Trypsin EDTA (1:250) 10x Concentrate; PAA Laboratories GmbH, Rakousko

Tab.1: Jednotlivé buněčné linie

Buněčná linie*	Tkáň	Kultivační médium
A2780	karcinom vaječnicků	DMEM+ 1 x NEAA + 10% FBS
BeWo	choriokarcinom	Ham's F12 + 10% FBS
CACO-2	adenokarcinom tlustého střeva	EMEM + 1x NEAA+ 10% FBS
HCT-8	ileocekální adenokarcinom	DMEM + 1 x NEAA + 10% FBS
HeLa	karcinom děložního čípku	DMEM + 10% FBS
Hep G2	hepatocelulární karcinom	DMEM + 1x NEAA+ 10% FBS
Hep2	karcinom děložního čípku	DMEM + 10% FBS
HL60	promyelocytická leukémie	DMEM + 1 x NEAA + 10% FBS
HMCB	melanom	DMEM + 1x NEAA+ 10% FBS
HOS	osteosarkom	EMEM + 1x NEAA+ 10% FBS
HT29	adenokarcinom tlustého střeva	Ham's F12 + 10% FBS
Chang liver	játra (kontaminace HeLa)	DMEM + 10% FBS
IMR 32	neuroblastom	EMEM + 1x NEAA+ 10% FBS
JEG3	choriocarcinom	DMEM + 1x NEAA+ 10% FBS
MCF7	adenokarcinom prsu	DMEM + 1x NEAA+ 10% FBS
MG-63	osteosarcom	EMEM + 1x NEAA+ 10% FBS

* Všechny buněčné linie pocházejí z lidských tkání a s výjimkou linie HMCB byly získány z „European Collection of Cell Cultures“ (ECACC; Anglie). Linie HMCB pochází z „American Type Culture Collection“ (ATCC; USA).

5.1.3. Přístroje a počítačové programy

5.1.3.1. Přístroje

Vybavení laboratoře molekulární biologie a laboratoře buněčných kultur (vybavení pro elektroforézu, transiluminátor, mrazicí boxy, chladničky, centrifugy, laboratorní váhy, laminární box, CO₂ inkubátory, třepací inkubátor)

Hoefer miniVE Blot Module; Hoefer Scientific instruments, USA

iCycler; Bio-Rad Laboratories, USA

Inverzní fluorescenční mikroskop ECLIPSE TE300; Nikon, Japonsko

Rotor Gene RG – 3000; Corbett Research, Austrálie

sekvenátor ABI PRISM 3100; Applied Biosystems, USA

světelný mikroskop; Olympus, Japonsko

termocyklér My Cycler™; Bio-Rad Laboratories, USA

termocyklér PTC 200 Peltier Thermal Cycler; MJ Research, USA

UV-Vis Spectrophotometer ND-100; NanoDrop Technologies, USA

5.1.3.2. Software

Clone Manager 5; Scientific & Educational Software, USA

Rotor Gene verze 6; Corbett Research, Austrálie

Plasmid Map Enhancer version 3.0; Scientific & Educational Software, USA

Vector NTI Advance 9.0; Invitrogen, USA

5.2. Metody

5.2.1. Návrh shRNA sekvencí

5.2.1.1. Návrh shRNA sekvencí specifických pro cyklooxygenázu 1

Lidská COX-1 má dvě transkripční varianty. Všechny dále uvedené shRNA sekvence specifické pro tuto izoformu byly navrženy na transkripční variantu 1 (NM_000962), nicméně jsou specifické i pro transkripční variantu 2 (NM_080591). Vlastní sekvence siRNA byly navrženy podle následujících kritérií (vycházejících zejména z našich zkušeností získaných při navrhování primerů):

- délka sekvence je 19 bází
- „sense“ siRNA sekvence začíná na 5' konci GATCC, ATCC nebo TCC
- obsah GC bází se pohybuje mezi 35-60 %
- T_m je v rozmezí od 50-60° C
- sekvence nesmí obsahovat žádný známý sekvenční polymorfismus
- sekvence nesmí tvořit výrazné sekundární struktury
- sekvence nesmí být homologní s žádnou jinou lidskou RNA sekvencí
- sekvence nesmí obsahovat úseky s více než 3 G nebo C nukleotidy

Obecné schéma navržených shRNA sekvencí je znázorněno na obr.6.

shRNA2 +	GATCCCTGCCCTTCTCAAGTTCAAGAGACTTGAGAAGGGCAGGGATCTTTTTTGG A
shRNA2 -	AGCTTCCAAAAAAGATCCCTGCCCTTCTCAAGTCTCTTGAAGTTGAGAAGGGCAGG
<u>Vysvětlivky:</u>	
GATCCCTGCCCTTCTCAAG	„sense“ siRNA sekvence (obsahuje restriční místo pro <i>BamHI</i>)
CTTGAGAAGGGCAGGGATC	„antisense“ siRNA sekvence
TCAAGAGA	sekvence LOOP
TTTTTTGG	STOP sekvence pro RNA polymerázu III

Obr.6: Obecné schéma shRNA sekvencí navržených pro COX-1

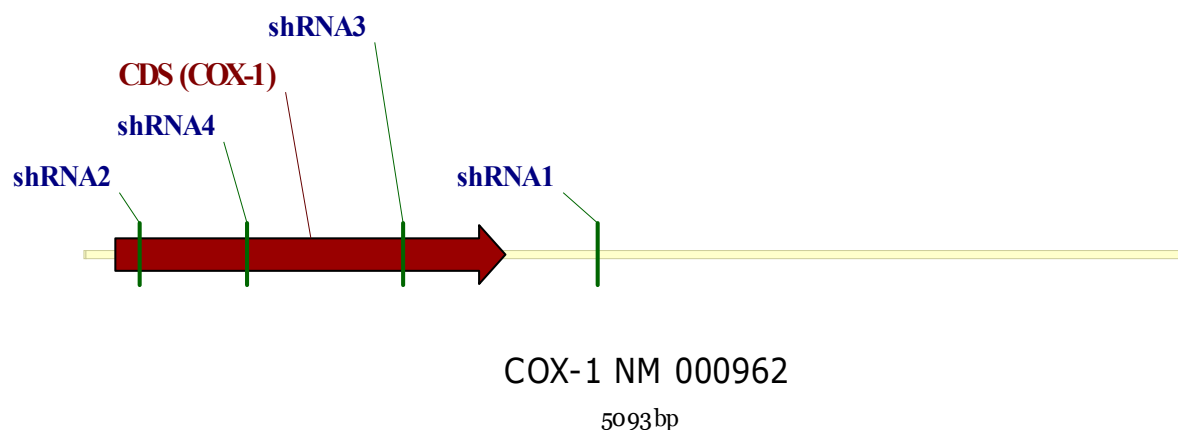
Všechny navržené sekvence byly podrobeny BLAST analýze a byly vybrány pouze ty, které neměli významnou homologii se sekvencemi v aktuální databázi. Celkem byly pro další testování vybrány čtyři různé sekvence siRNA specifické pro COX-1 (Tab.2).

Tab.2: Navržené shRNA sekvence pro COX-1

Název shRNA	Sekvence	Cílová sekvence ^a
shRNA1	5' -GATCCAGAACAGTGGCTCGTTCAAGAGACGAGCCACTGTTCTGGATCTTTTTTGGGA-3'	2358-2376
shRNA2	5' -GATCCATGCCAGCACCAGGGTTCAAGAGACCCTGGTGCATGGATTTTTTTGGGA-3'	248-266
shRNA3	5' -GATCCTGCATGTGGCTGTGGTTCAAGAGACCACAGCCACATGCAGGATTTTTTTGGGA-3'	1462-1480
shRNA4	5' GATCCACTTCACCCACCAGTTCTTCATAGAGATAAGAAGTGGTGGGTGAAGTGTTTTTTGGGA-3'	742-761

^a Lokalizace cílové sekvence shRNA v lidské transkripční variantě 1 izoformy COX-1 (NM_000962)

Cílové sekvence pro shRNA2, shRNA3 a shRNA4 leží v kódující oblasti genu COX-1. Jediná cílová sekvence, pro shRNA1, leží mimo kódující oblast tohoto genu (Obr.7).



Obr.7: Umístění cílových sekvencí pro jednotlivé shRNA v sekvenci genu COX-1 (program Vector NTI Advance 9.0; Invitrogen).
Zkratky: CDS = kódující sekvence.

5.2.1.2. Návrh shRNA specifických pro cyklooxygenázu 2

Lidská COX-2 má jednu transkripční variantu (NM_000963). Pro tuto izoformu byly sekvence shRNA navrženy zejména využitím kritérií podle Yiu a kol. (Yiu et al. 2005) a softwaru Sfold. Yui a kol. srovnali řadu již existujících přístupů pro návrh siRNA sekvencí a vytvořili algoritmus zohledňující také sekundární strukturu cílové mRNA pro účinnější „odfiltrování“ nefunkčních siRNA sekvencí (<http://i.cs.hku.hk/~sirna/software/sirna.php>). Sfold je volně přístupný software pro návrh mimo jiné i siRNA sekvencí (<http://sfold.wadsworth.org/index.pl>). Předpovídá pravděpodobnou sekundární strukturu RNA a vyhodnocuje přístupnost cílové sekvence.

Všechny navržené sekvence byly podrobeny BLAST analýze a byly vybrány pouze ty, které neměly významnou homologii se sekvencemi v aktuální databázi.

Obecné schéma shRNA sekvencí navržených pro COX-2 je znázorněno na obr.8.

COX2_1 +	CCGGACACAGTGCCTACATACTTTCAAGAGAAGTATGTAGTGCCTGTGTTTTTTGG
COX2_1 -	TGTGTCACGTGATGTATGAAAGTTCTCTTCATACATCACGTGACACAAAAAACCTCGA
<u>Vysvětlivky:</u>	
CCGG	přečnívajícím koncem pro zaklonování do vektoru štěpeného <i>AgeI</i>
ACACAGTGCCTACATACT	„sense“ siRNA sekvence (obsahuje restriční místo pro <i>AgeI</i>)
AGTATGTAGTGCCTGTG	„antisense“ siRNA sekvence
TTCAAGAGA	sekvence LOOP
TTTTTTGG	STOP sekvence pro RNA polymerázu III

Obr.8: Obecné schéma shRNA sekvencí navržených pro COX-2

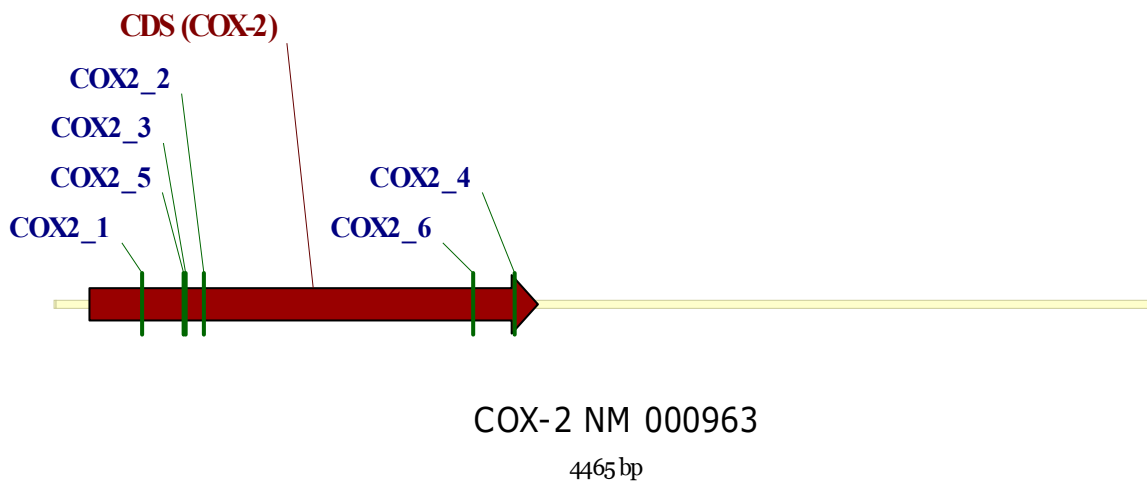
Celkem bylo pro další testování vybráno 6 různých sekvencí shRNA specifických pro COX-2 (Tab.3).

Tab.3: Navržené shRNA sekvence pro COX-2

Název shRNA	Sekvence	Cílová sekvence ^a
COX2_1	5´-CCGGACACAGTGCACCTACATACTTTCAAGAGAAGTATGTAGTGCACCTGTGTTTTTTTTGG-3´	349-367
COX2_2	5´-CCGGAGCAGCTTCCTGATTCAAATTCAAGAGATTTGAATCAGGAAGCTGCTTTTTTTGG-3´	598-616
COX2_3	5´-CCGGCCTCTCCTATTATACTAGATTCAAGAGATCTAGTATAATAGGAGAGGTTTTTTGG-3´	524-542
COX2_4	5´-CCGGTAAAAACAGTCACCATCAATTCAAGAGATTTGATGGTACTGTTTTAATTTTTTTGG-3´	1855-1873
COX2_5	5´-CCGGTCTAACCTCTCCTATTATATTCAAGAGATATAATAGGAGAGGTTAGATTTTTTTGG-3´	519-537
COX2_6	5´-CCGGGGACTTATGGGTAATGTTATTCAAGAGATAACATTACCCATAAGTCCTTTTTTTGG-3´	1689-1707

^a Lokalizace cílové sekvence shRNA v lidské COX-2 (NM_000963)

Umístění cílových sekvencí pro jednotlivé shRNA navržené pro COX-2 je znázorněno na obr.9.



Obr.9: Umístění cílových sekvencí pro jednotlivé shRNA v sekvenci genu COX-2 (program Vector NTI Advance 9.0; Invitrogen).
Zkratky: CDS = kódující sekvence.

5.2.1.3. Návrh shRNA pro přípravu negativních kontrol

Pro experimenty s nejučinnější ze všech navržených shRNA sekvencí uvedených v této práci (shRNA1 specifickou pro COX-1, kapitola 6.1.2.1.) byly připraveny další buněčné linie sloužící jako negativní kontroly.

Pro „nespecifickou“ negativní kontrolu byla navržena shRNA proti genu kódujícímu enzym luciferázu (**shRNA-luc**, tab.4). Pro „scrambled“ negativní kontrolu byla navržena „scrambled“ shRNA, jejíž sekvence se od původní shRNA1 liší záměnou několika nukleotidů (**shRNA1S**, tab.4). Obě shRNA, stejně jako shRNA1, byly navrženy tak, aby mohly být zaklonovány do plazmidu psiRNA_U6.

Tab.4: Navržené shRNA sekvence pro přípravu negativních kontrol

Název shRNA	Sekvence
shRNA-luc	5´-GATCCGTCGATGTACACGTTTCGTCCTTCAAGAGAGACGAACTGTACATCGACTTTTTTGGGA-3´
shRNA1S	5´-GATCCACAAACAGTGCCTCGTTCAAGAGACGAGGCACTGTTGTGGATCTTTTTTGGGA-3´

5.2.2. Molekulární klonování

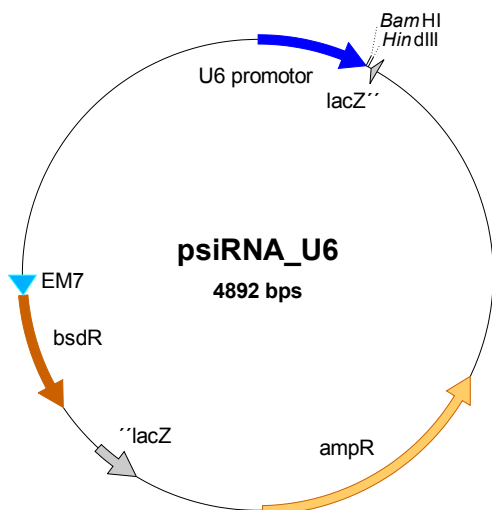
5.2.2.1. Příprava vektoru psiRNA U6 a psiRNA U6(Age)

Pro vnesení navržených a nasyntetizovaných shRNA sekvencí do eukaryotických buněčných kultur byly zkonstruovány expresní vektory psiRNA_U6 a psiRNA_U6(Age).

Pro přípravu těchto vektorů byly použity dva výchozí plazmidy, pUC131 (ÚHKT) o velikosti 2 738 bp a pUB-Bsd (Invitrogen) o velikosti 4 245 bp. Plazmid pUC131 je běžný sub-klonovací plazmid. Plazmid pUB-Bsd nese gen pro rezistenci k blasticidinu (bsdR), který slouží k selekci úspěšně transfekovaných eukaryotických buněk. Oba tyto plazmidy obsahují gen pro rezistenci k ampicilinu (ampR).

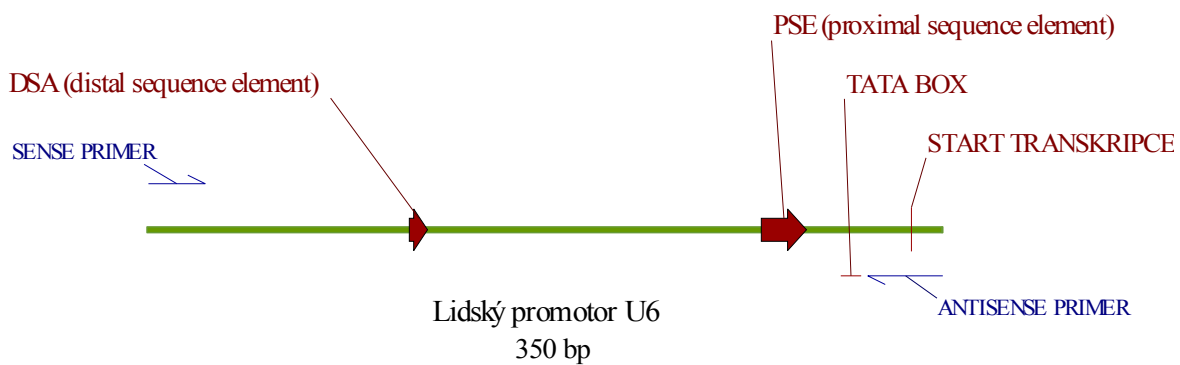
Z plazmidu pUB-Bsd byl pomocí enzymů *EcoRI* a *BglIII* vyštěpen fragment o velikosti 1 860 bp (obsahující bsdR), který byl vyizolován z agarózového gelu pomocí TaKaRa RECOCHIP (TaKaRa) a vklonován do plazmidu pUC131 naštěpeného enzymy *EcoRI* a *BamHI*. Tím vznikl plazmid pUC131-Bsd o velikosti 4 580 bp. Vektor byl transformován do chemicky kompetentních bakterií *Escherichia coli* a namnožen pod selekčním tlakem ampicilinu. Z jednotlivých kolonií byly vyizolovány plazmidy, u kterých byla ověřena sekvenací zejména bezchybnost sekvence genu pro rezistenci k antibiotiku blasticidinu.

Ze sekvence genu pro U6 snRNA z lidské genomové DNA byl pomocí PCR namnožen promotor U6 pro RNA polymerázu III, ze kterého jsou exprimovány shRNA sekvence. Pomocí primerů byla vnesena restriční místa sloužící ke vklonování fragmentu U6 promotoru do pUC131-Bsd (*BglIII*, *XbaI*) a k vnášení shRNA sekvencí po jejich hybridizaci (*BamHI*, *HindIII* v případě psiRNA_U6 a *AgeI*, *HindIII* v případě psiRNA_U6(Age)). PCR produkt byl naštěpen enzymy *BglIII* a *XbaI* a vklonován do pUC131-Bsd naštěpeného stejnými enzymy. Tím vznikl výsledný plazmid psiRNA_U6 (Obr.10) nebo psiRNA_U6(Age). Vektor byl transformován do chemicky kompetentních bakterií *Escherichia coli* a namnožen pod selekčním tlakem ampicilinu. Z jednotlivých kolonií byly vyizolovány plazmidy, které byly ověřeny sekvenací. Ověřována byla sekvence namnoženého U6 promotoru, zejména v oblastech PSE („proximal sequence element“), TATA boxu a motivu oktameru (DSE; „distal sequence element“). Schéma lidského promotoru U6 je znázorněno na obr.11.



Obr.10: Mapa vektoru psiRNA_U6.

Zkratky: ampR = gen pro rezistenci k ampicilinu; bsdR = gen pro rezistenci k blasticidinu; EM7 = bakteriální promotor; lacZ = gen kódující beta-galaktosidázu.



Obr.11: Schéma promotoru U6 (program Vector NTI Advance 9.0; Invitrogen).

5.2.2.2. Zaklonování shRNA do vektoru a ověření inzertu

Všechny sekvence shRNA byly syntetizovány v GENERI BIOTECH s.r.o. Pro konstrukci každé shRNA byly připraveny dva komplementární oligonukleotidy (velikost 56-74 nukleotidů), které byly navrženy tak, aby se po jejich hybridizaci vytvořilo na 5' konci vzniklého dvouřetězce restrikční místo pro enzym *BamHI* (u shRNA specifických pro COX-1 nebo kontrolních shRNA) nebo *AgeI* (u shRNA specifických pro COX-2) a na 3' konci restrikční místo pro enzym *HindIII* kvůli možnosti zaklonování sekvence do expresního vektoru.

Komplementární oligonukleotidy byly nejprve hybridizovány a následně ligovány s odpovídajícím naštěpeným vektorem. Postup hybridizace a ligace byl prováděn dvěma různými způsoby, které byly mezi sebou porovnány:

1. způsob

Tento způsob byl použitý u klonování všech shRNA. Nejprve byla provedena hybridizace komplementárních oligonukleotidů jednotlivých shRNA smícháním 30 μ l každého z hybridizovaných oligonukleotidů o koncentraci 100 pmol/ μ l. Na směs se působilo teplotou 80° C po dobu 2 minut a poté byla směs ponechána přes noc při pokojové teplotě. Vektor psiRNA_U6 / psiRNA_U6(Age) byl naštěpen enzymy *BamHI* / *AgeI* a *HindIII* a ligován s hybridizovanými shRNA pomocí T4 DNA ligázy (Fermentas).

2. způsob

Tento způsob byl použitý u části později navržených shRNA specifických pro COX-2. Nejprve byla provedena hybridizace komplementárních oligonukleotidů jednotlivých shRNA smícháním 2 μ l od každého z oligonukleotidů o koncentraci 100 pmol/ μ l s 46 μ l deionizované vody. Směs byla vystavena v cykleru následujícímu teplotnímu programu:

1. 90° C, 3 min
2. 70° C, 1 min
3. teplotní gradient se snižující teplotou o 0,1° C/s na 50° C
4. 50° C, 30 min
5. teplotní gradient se snižující teplotou o 0,1° C/s na 37° C
6. 37° C, 30 min

Po hybridizaci byla směs 10 x naředěna deionizovanou vodou. Vektor psiRNA_U6 (Age) byl postupně štěpen naštěpen enzymy *HindIII* a *AgeI* a ligován se zhybridizovanými shRNA pomocí T4 DNA ligázy (Fermentas). Do 20 μ l ligační směsi se přidávalo 0,7 μ l naředěné směsi zhybridizovaných oligonukleotidů.

Ligační směs byla transformována do bakterií *Escherichia coli* kmene *DH5 α* (Clontech Laboratories), které jsou vhodné pro běžné klonování. Jednotlivé kolonie byly testovány pomocí PCR na přítomnost inzertu.

Plazmidy, u kterých byla pomocí PCR potvrzena přítomnost inzertu, se následně ověřovaly sekvenací. Byly vybrány kolonie s plazmidy obsahujícími shRNA sekvence naprosto se shodujícími s navrženými sekvencemi.

Nebyl zaznamenán žádný výrazný rozdíl v úspěšnosti klonování při použití způsobu 1 nebo 2 pro hybridizaci a ligaci shRNA sekvencí.

Příklad zaklonování sekvence shRNA do plazmidu je znázorněn v příloze „Schéma zaklonování shRNA1 do plazmidu psiRNA_U6“.

Připravené plazmidy byly namnoženy v bakteriální kultuře a vyizolovány pomocí kitu *Plasmid Midi Kit* (Qiagen) v koncentraci (minimálně 100 ng/ μ l) a čistotě (minimálně 1,8) vhodné pro transfekci do eukaryotických buněk použitým transfekčním reagens.

5.2.3. Práce s eukaryotickými buněčnými kulturami

5.2.3.1. Výběr buněčné linie a její kultivace

Pro plánované experimenty bylo třeba vybrat buněčnou linii s relativně vysokou expresí obou izoform enzymu cyklooxygenáza. Jak již bylo zmíněno dříve, exprese COX je tkáňově specifická (kapitola 3.2.). Z tohoto důvodu byl pomocí námi navržených systémů pro real-time PCR (Tab.6) proveden screening exprese COX-1 a COX-2 u lidských buněčných linií. Podrobnější informace k původu vybraných buněčných linií a používaným kultivačním médiím jsou shrnuty v tab.1. Všechny buněčné linie byly po rozmrazení z kapalného dusíku 14 dní kultivovány v uvedených kultivačních médiích při teplotě 37° C a 5% CO₂ a poté byly sklizeny buňky na izolaci RNA. Postupy izolace RNA, syntézy cDNA a měření pomocí real-time PCR jsou popsány v kapitole 5.2.4.

Pro naše experimenty byla vybrána buněčná linie Hep2 (buňky rakoviny cervixu). Buňky Hep2 byly kultivovány v médiu DMEM (Cambrex) s L-glutaminem a 4,5 g/l glukózy obohaceným o 10% fetální bovinní sérum (PAA Laboratories) a gentamicin (50 µg/ml média; Sigma-Aldrich).

U všech linií byl proveden test na přítomnost mykoplazmat, který byl negativní.

5.2.3.2. Transfekce, selekce a rozklonování

Transfekce byla provedena pomocí transfekčního reagens *Effectene® Transfection Reagent* (Qiagen) dle v naší laboratoři již dlouho používaných optimalizovaných podmínek, při kterých je dosahováno úspěšnosti transfekce 40 %.

Den před transfekcí byly buňky nasazeny do 24-jamkových destiček o hustotě 6×10^4 buněk na jamku. V době transfekce buňky pokrývaly 50 % plochy kultivačních jamek. Na transfekci bylo použito 400 ng DNA, 3,2 µl Enhanceru (reagens kondenzující DNA v definovaném pufru) a 4 µl Effectene Reagent (reagens tvořící micely s kondenzovanou DNA). Po 7 hodinách působení byl Effectene Reagent odstraněn, buňky byly promyty sterilním pufrům 1 x PBS (Cambrex) a do jamek se vneslo nové kultivační médium. 30 hodin po transfekci bylo nasazeno selekční antibiotikum blasticidin ve finální koncentraci 4 µg/ml média. Selekční médium bylo vyměňováno třikrát týdně, celková doba selekce byla 10 dní.

Metoda rozklonování buněk:

Po trypsinizaci byly buňky nasazeny do 96-jamkových destiček o teoretické hustotě 4 buňky na jamku. Buňky byly pěstovány v kultivačním médiu obohaceném o kondiciované médium v poměru 2 díly čerstvého média : 1 díl kondiciovaného média. Kondiciované médium bylo získáno metabolizováním standardního kultivačního média shodnou buněčnou kulturou po dobu 48 hodin při minimální konfluenci buněčné kultury 80% v den sklizně média. Sklizené kondiciované médium bylo stočeno při 5 000 g po dobu 15 min při laboratorní teplotě a následně přefiltrováno přes PVDF filtr *Millex-HV Syringe Driven Filter Unit* (Millipore) o velikosti pórů 45 µm pro odstranění eukaryotických buněk z média.

Kolonie se nechaly rozrůst a byla změřena exprese COX pomocí metody real-time PCR.

5.2.3.3. Příprava kontrolních buněčných linií pro pokusy s shRNA

Pro analýzu exprese genů pomocí real-time PCR, případně Western blotu a metody ELISA, byly používány 4 různé kontrolní buněčné linie.

První kontrolou byly **neovlivněné parentní buňky Hep2**. Šlo o základní kontrolu, která sloužila jako standard, ke kterému byly vztahovány všechny další kontrolní linie a vzorky. Tato kontrola byla připravena pěstováním parentní linie Hep2 za shodných kultivačních podmínek jako zbytek kontrolních linií a vzorků při použití shodného postupu sběru buněk a izolace RNA.

Druhou používanou kontrolou byla tzv. „**mock**“ kontrola. „Mock“ kontrola slouží k odhalení účinků, které mohl mít na buňky samotný proces vnášení siRNA/shRNA (například transfekce), případně proces selekce antibiotikem při použití vektoru se zaklonovanou shRNA. Tato kontrolní linie byla připravena transfekcí buněk Hep2 plazmidem psiRNA_U6 bez zaklonované shRNA a následnou selekcí pomocí antibiotika.

Třetí kontrolou byla tzv. **nespecifická kontrola**. Tato kontrola pomáhá odlišit specifické účinky shRNA od účinků nespecifických. Pro tuto kontrolu se používá shRNA navržená pro gen, který není v dané buňce exprimován. V našem případě byla navržena shRNA specifická pro enzym luciferázu (shRNA-luc, kapitola 5.2.1.3.). Kontrolní linie byla připravena transfekcí buněk Hep2 plazmidem psiRNA_U6 se zaklonovanou sekvencí shRNA-luc a následnou selekcí pomocí antibiotika.

Čtvrtou kontrolou byla tzv. „**scrambled**“ kontrola. Pro přípravu této kontrolní buněčné linie byla navržena „scrambled“ shRNA (shRNA1S) (kapitola 5.2.1.3.). „Scrambled“ shRNA obsahuje téměř shodnou sekvenci s původní shRNA, nicméně tato sekvence je neúčinná díky záměně několika nukleotidů. Proto tato kontrola také pomáhá odlišit specifické účinky shRNA od účinků nespecifických. Kontrolní linie byla připravena transfekcí buněk Hep2 plazmidem psiRNA_U6 se zaklonovanou sekvencí shRNA1S a následnou selekcí pomocí antibiotika.

Transfekce a selekce jednotlivých kontrolních buněčných linií byla provedena použitím postupu popsaného v kapitole 5.2.3.2.

5.2.3.4. Optimalizace transfekce a snižování exprese cyklooxygenázy pomocí syntetických siRNA

Za účelem specifického snížení exprese COX byl testován také přístup využívající syntetických siRNA.

Nejprve byla provedena optimalizace transfekce. Byla testována dvě různá transfekčních reagens, INTERFERin™ (Polyplus transfection Inc.) a Nanofectin siRNA (PAA Laboratories GmbH). Pro optimalizaci byla použita siRNA **TYE™ 563 DS Transfection Control** (Integrated DNA technologies, Inc.) značená fluorescenční barvičkou TYE™ 563 (Ex. 549, Em. 563). Optimalizace probíhala dle následujícího protokolu:

Buňky Hep2 byly pěstovány za standardních kultivačních podmínek uvedených v kapitole 5.2.3.1. Den před transfekcí byly buňky nasazeny do 96-jamkových destiček o hustotě 1×10^4 buněk na jamku. Konfluence buněk v době transfekce byla 50 %. Objem kultivačního média bez séra pro tvorbu komplexů byl 50 μ l a objem kompletního média přidaného k buňkám byl 125 μ l, dle protokolu výrobce. 24 hodin po transfekci byla odečtena účinnost transfekce u jednotlivých použitých poměrů (kapitola 6.1.4.1, Tab.7 a 8).

Optimalizované poměry (v tab.7 a 8 značené červeně) byly dále testovány pomocí validované siRNA **HPRT-S1 DS Positive Control** (Integrated DNA technologies, Inc., tab.5) specifické pro „housekeepingový“ gen hypoxantin fosforibosyltransferázu 1 (HPRT1) dle protokolu:

Den před transfekcí byly buňky nasazeny do 6-jamkových destiček o hustotě 2×10^5 buněk na jamku. V den transfekce byly buňky porostlé 50 %. 24 hodin po transfekci byly buňky sklizeny na RNA. Izolace RNA, syntéza cDNA a měření pomocí real-time PCR byly provedeny podle postupů uvedených v kapitole 5.2.4.

Transfekce siRNA specifické pro COX-1 (**Silencer® Select Pre-designed (Iventoried) siRNA**, siRNA ID #: s336; Ambion, tab.5) byla provedena s využitím výsledků získaných z optimalizace transfekce pomocí siRNA specifické pro HPRT1.

Tab.5: Sekvence použitých syntetických siRNA specifických pro geny HPRT1 a COX-1

siRNA	„Sense“ řetězec	„Antisense“ řetězec	Délka (počet bazí)
HPRT-S1 DS Positive Control	GCCAGACUUUGUUGGAUUUGAAATT	AAUUUCAAAUCCAACAAAGUCUGGCUU	25
Silencer® Select Pre-designed (Iventoried) siRNA, siRNA ID #: s336 (COX-1)	GAAACGAUGAAAUAAGAUATT	UAUCUUUUUCAUCGUUUCCT	21

5.2.4. Real-time PCR

5.2.4.1. Izolace RNA a syntéza cDNA

Buňky byly v triplicátech (2×10^5 buněk/jamku) nasazeny na 6-jamkové destičky. Při dosažení konfluence 70 % byly buňky sklizeny pomocí TRI REAGENT[®] (Molecular Research Center, Inc.). Pro reverzní transkripci enzymem M-MuLV Reverse Transcriptase, RNase H⁻ (Finnzymes) byly použity 2 μ g RNA.

5.2.4.2. Návrh a optimalizace real-time PCR systémů

Pro kvantifikaci exprese mRNA sledovaných genů byly navrženy real-time PCR systémy (dále systémy) fungující na principu hydrolyzačních sond (TaqMan[®]). Jejich seznam je shrnutý v tab.6.

Systémy byly navrženy podle sekvencí z NCBI (uvedeny v tab.6) pomocí programu Vector NTI Advance 9.0 (Invitrogen) s ohledem na jejich funkčnost při níže uvedených reakčních podmínkách. Primery a duálně značené hydrolyzační sondy (pomocí BHQ1-FAM) byly syntetizovány v GENERI BIOTECH s.r.o.

Optimální reakční podmínky pro každý systém byly ověřeny pomocí real-time PCR a agarózové elektroforézy (vyhodnocení nástupu a nárůstu fluorescence, přítomnost PCR produktu a nespecifit). Specifita primerů byla testována s 3 a 5mM hořčíkem při teplotě „annealingu“ 60 a 65° C (s fluorescenčním barvivem SYBR Green I), funkčnost sond byla ověřena s 3 a 5mM hořčíkem za teploty 60° C. Systémy byly navrženy na překryv exonů, aby při PCR reakci nedocházelo k nežádoucímu množení genomové DNA, což bylo při optimalizaci také ověřeno. Konkrétní exony obsažené v množené oblasti jednotlivých genů jsou uvedeny v tab.6. Optimalizace real-time PCR probíhala v cyklerech iQ5 Real-Time Cycller (BioRad Laboratories) a Rotor Gene RG 3000 (Corbett Research).

5.2.4.3. Reakční podmínky a vyhodnocení dat

Real-time PCR byla prováděna dle následujícího postupu:

Pomocí 0,5 U TrueStart™ Taq DNA Polymerázy (Fermentas) bylo amplifikováno 20 ng RNA v konečném objemu reakce 20 μ l. Reakční směs obsahovala následující složky (uvedena konečná koncentrace): 1x TrueStart™ Taq buffer (Fermentas), 0,2 mM dNTP (Fermentas), 3-5 mM MgCl₂ (Fermentas), 0,3 μ M „forward“ primer, 0,3 μ M „reverse“ primer a 0,1 μ M sonda.

Používaný teplotní profil byl následující:

1. 95° C, 3 min
2. 95° C, 10 s 50 x
60° C, 40 s

Zaklonováním PCR produktů obsahujících detekovanou oblast genu do plazmidu byly připraveny standardy pro kvantifikaci exprese genů pomocí real-time PCR. K zaklonování byly použity kity „Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing“ a „TOPO XL PCR Cloning Kit“ od firmy Invitrogen. Tyto standardy sloužily ke generování kalibrační křivky při absolutní kvantifikaci nebo pro výpočet efektivity při kvantifikaci relativní.

Pro normalizaci dat při relativní kvantifikaci byly vybrány 3 referenční geny: beta-2-mikroglobulin (B2 M), hypoxantin fosforibosyltransferáza 1 (HPRT1) a surfait 1 (SURF1). Experimenty byly prováděny v biologických triplikátech (3 samostatné jamky kultivační destičky). Každý ze vzorků byl měřen v triplikátu PCR reakce. Průměr Ct („threshold cycle“) hodnot byl transformován do relativních hodnot exprese pomocí rovnice od Pfaffla (Pfaffl 2001). Data byla normalizována geometrickým průměrem všech tří vybraných referenčních genů. Nakonec byla normalizovaná exprese každého genu porovnána s průměrem exprese v parentních buňkách Hep2.

Výsledky jsou vyjádřeny u jednotlivých experimentů jako průměr měřených hodnot \pm SEM. Statistická významnost výsledků byla analyzována pomocí testu ANOVA a Bonferroniho srovnávacího testu nebo pomocí párového t-testu.

Tab.6: Real-time PCR systémy pro měření exprese jednotlivých genů

Oficiální symbol genu	Celý oficiální název genu	NCBI sekvence	Exony zahrnuté v množené sekvenci genu
<i>Referenční geny</i>			
B2 M	„beta-2-microglobulin“	NM_004048	exon2 / exon4
GUSB	„glucuronidase, beta“	NM_000181	exon8 / exon9
HMBS	„hydroxymethylbilane synthase“	NM_000190	exon6 / exon8
HPRT1	„hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1“	NM_000194	exon4 / exon5
POLR2A	„polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa“	NM_000937	exon21 / exon23
SURF1	„surfeit 1“	NM_003172	exon7 / exon9
TBP	„TATA box binding protein“	NM_003194	exon3 / exon6
NUP54	„nucleoporin 54kDa“	NM_017426	exon10 / exon12
<i>Geny uplatňující se v nespecifické imunitní odpovědi</i>			
EIF2AK2	„eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2“	NM_002759	exon14 / exon15
IFIT1	„interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, tr.v. 1,2“	NM_001001887	exon1 / exon2
IRF1	„interferon regulatory factor 1“	NM_002198	exon7 / exon9
IRF3	„interferon regulatory factor 3“	NM_001571	exon2 / exon3
OAS1	„2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa“	NM_002534	exon2 / exon3
OAS2	„2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa“	NM_016816	exon7 / exon8
OAS3	„2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa“	NM_006187	exon14 / exon16
RNASEL	„ribonuclease L (2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent)“	NM_021133	exon1 / exon3
<i>Geny uplatňující se v metabolismu arachidonové kyseliny a transportu prostanoidů</i>			
ALOX5	„arachidonate 5-lipoxygenase“	NM_000698	exon7 / exon8
PGDS	„prostaglandin D2 synthase, hematopoietic“	NM_014485.2	exon2 / exon4
PTGDS	„prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)“	NM_000954	exon4 / exon7
PTGIS	„prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase“	NM_000961	exon8 / exon9
ALOX5AP	„arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein“	NM_001629	exon2 / exon5
PTGS1	„prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)“	NM_000962	exon6 / exon8
PTGS2	„prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)“	NM_000963	exon9 / exon10
PTGES	„prostaglandin E synthase“	NM_198797	exon3 / exon4
PTGES2	„prostaglandin E synthase 2“	NM_025072	exon6 / exon7
PTGES3	„prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)“	NM_006601	exon6 / exon8
TBXAS1	„thromboxane A synthase 1 (platelet, cytochrome P450, family 5, subfamily A)“	NM_001061	exon8 / exon9
ABCC4	„ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4“	NM_005845	exon23 / exon24

5.2.5. Detekce exprese cyklooxygenázy na proteinové úrovni

Metoda detekce COX na proteinové úrovni pomocí Western blotu byla optimalizována a provedena pro obě izoformy tohoto enzymu. Jelikož významného snížení exprese mRNA prostřednictvím RNA interference bylo dosaženo pouze u COX-1, bude popis provedení metody dále zaměřen na tuto izoformu.

5.2.5.1. Příprava buněčných lyzátů a SDS-PAGE

Buněčné lyzáty byly připraveny pomocí lyzačního pufru LP1 (0,02 M Tris (hydroxymethyl) aminomethan; 1% Nonidet P40; 137,5 mM NaCl; 50 μ M EDTA disodium; pH 7,4) s 1 mM proteázovým inhibitorem fenylmethylsulfonylfluoridem (PMSF; Sigma-Aldrich). Celková koncentrace proteinů ve vzorku byla měřena pomocí kitu DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories).

Vzorky byly separovány na 10% polyakrylamidovém gelu. Na gel bylo po denuraci nanášeno vždy množství buněčného lyzátu obsahující 120 μ g celkového proteinu a 15 μ l proteinového markeru (Perstained Protein Marker; New England Biolabs). Vlastní separace proteinů probíhala v elektroforetické vaně v 1 x SDS pufru (0,3% Tris (hydroxymethyl) aminomethan; 1,44% Glycin; 0,1% SDS) při 18 mA po dobu 2 hodin.

5.2.5.2. Western blot a detekce proteinů

Po elektroforetické separaci na gelu byly vzorky transferovány na PVDF membránu (Amresco Inc.). Pro Western blot byl použit *Hoefler miniVE Blot Module* (Hoefler Scientific instruments). Transfer byl proveden dle manuálu při 20 W po dobu 2,5 hodiny.

Proužky byly vizualizovány pomocí kitu *Opti-4CNTM Substrate Kit* (Bio-Rad Laboratories) dle manuálu. Pro blokaci membrány byl používán roztok 5% BSA (Amresco Inc.) rozpuštěného v PBST (PBS pufr obsahující Tween 20).

Pro kontrolu nanesení stejného množství celkového proteinu do jednotlivých k sobě porovnávaných jamek PAGE gelu byl ve vzorcích buněčných lyzátů kromě COX detekován také „housekeepingový“ protein β -aktin. Pro detekci testovaných proteinů byly zvoleny tyto protilátky:

- myší monoklonální protilátka proti cyklooxygenáze 1 (MONOCLONAL ANTI-COX I; Sigma-Aldrich)
- myší monoklonální protilátka proti „housekeepingovému“ genu β -aktinu (MONOCLONAL ANTI- β -ACTIN; Sigma-Aldrich)
- anti-myší sekundární protilátka konjugovaná s peroxidázou, GAM-HRP (Goat-anti-Mouse-HRP conjugated secondary antibody; Bio-rad Laboratories)

Pro jednotlivé protilátky byla provedena titrace tečkovací metodou a bylo určeno jejich ředění pro další použití. U kombinace monoklonální protilátky anti-COX1 a sekundární GAM-HRP bylo pro obě protilátky používáno ředění 5 000 x, u kombinace anti- β -actin a GAM-HRP byly zvoleny ředění 10 000 x a 1 000 x.

Kromě tohoto substrátu byly testovány další dva substráty, chromogenní *3,3'-Diaminobenzidine (DAB) Peroxidase Substrate System* (Amresco Inc.) a chemiluminiscenční substrát *Western blotting Luminol Reagent* (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Byl dodržen doporučený postup dle pokynů výrobce. Při použití těchto dvou substrátů se bohužel ani u jednoho nepodařilo detekovat žádné proužky.

5.2.5.3. Roztoky použité při detekci proteinů

1 x PBS

0,8% NaCl
0,02% KCl
0,115% Na₂HPO₄ · 7H₂O
0,02% KH₂PO₄

PBST

(0,1% Tween 20 v 1x PBS pufru)

5.2.6. Detekce PGE₂

Detekce hlavního metabolitu aktivované COX, PGE₂, byla provedena pomocí metody ELISA.

Testované buněčné linie byly nasazeny v triplicátech na 96-jamkovou kultivační destičku v hustotě $1,2 \times 10^4$ buněk/jamku. 24 hodin po nasazení buněk bylo kultivační médium vyměněno za 200 μ l shodného kultivačního média obsahujícího arachidonovou kyselinu (Sigma-Aldrich) o konečné koncentraci v médiu 20 μ M. Po jednohodinové inkubaci bylo kultivační médium z buněk sebráno a stočeno v centrifuze pro odstranění buněk ze supernatantů. Poté byla změřena koncentrace PGE₂ vyprodukovaného do média. změřena pomocí kitu *ELISA assay kit* (Cayman Chemical Company). Přesné množství buněk bylo určeno pomocí kitu *Cell counting Kit-8* (ALEXIS Corporation).

5.2.7. Test změny stability mRNA

Při testování vlivu snížení exprese COX na další geny související s metabolismem AA byla u některých genů detekována významná změna hladiny mRNA. K tomu mohlo dojít dvěma různými mechanismy, buď změnou samotné míry exprese mRNA nebo stabilizací/snížením stability mRNA daných genů.

Aby bylo možné lépe zhodnotit mechanismus, kterým ke změně došlo, byl proveden test s aktinomycinem D. Aktinomycin D je antineoplastické antibiotikum původem z bakterií rodu *Streptomyces*, které výrazně působí na rychle se dělící buňky. Tvoří stabilní komplex s DNA (vsouvá se mezi páry bazí) a již v nízkých koncentracích blokuje pohyb DNA-dependentní RNA polymerázy, čímž zabraňuje transkripci.

Použitý postup vycházel z publikace Degousee a kol. (Degousee et al. 2006). Buňky byly nasazeny na 6-jamkové kultivační destičky o koncentraci $1,8 \times 10^5$ buněk na jamku, v triplicátech pro každý odebíraný čas inkubace. Následující den bylo kultivační médium odstraněno a vyměněno za médium s aktinomycinem D (Sigma-Aldrich) o konečné koncentraci v médiu 5 μ g/ml. Pro izolaci RNA byly buňky sklizeny 0; 1; 2; 4; 6; 8 a 12 hodin po přidání aktinomycinu D. Postupy izolace RNA, syntézy cDNA a měření pomocí real-time PCR jsou popsány v kapitole 5.2.4.

5.2.8. Test vlivu exogenního PGE₂ na expresi MRP4/ABCC4

Existují důkazy, že MRP4 může přenášet prostanoidy (kapitola 3.4.1.), mezi nimi i PGE₂ (Reid et al. 2003), který je hlavním produktem při aktivaci enzymu COX (Horton et al. 1999). V této práci byl proveden experiment testující, zda dojde ke změně exprese ABCC4 po přidání PGE₂ jako jeho vlastního substrátu.

Testované buněčné linie byly nasazeny na 6-jamkové destičky o koncentraci $1,9 \times 10^5$ buněk/jamku, v triplicátech pro každou kombinaci časového intervalu a koncentrace PGE₂. 24 hodin po nasazení buněk bylo kultivační médium vyměněno za médium obohacené o PGE₂ (Sigma-Aldrich). Konečné používané koncentrace PGE₂ v kultivačním médiu byly 50 nM a 300 nM. Buňky byly sbírány po 6, 12 a 24 hodinách. Kontroly (buňky pěstované v médiu bez přidaného PGE₂) byly sbírány v čase a 24 hodin po přidání PGE₂ k buňkám. Postupy izolace RNA, syntézy cDNA a měření pomocí real-time PCR jsou popsány v kapitole 5.2.4.

6. Výsledky

6.1. Příprava modelové buněčné linie se specificky sníženou expresí COX-1/COX-2

6.1.1. Výběr parentní buněčné linie

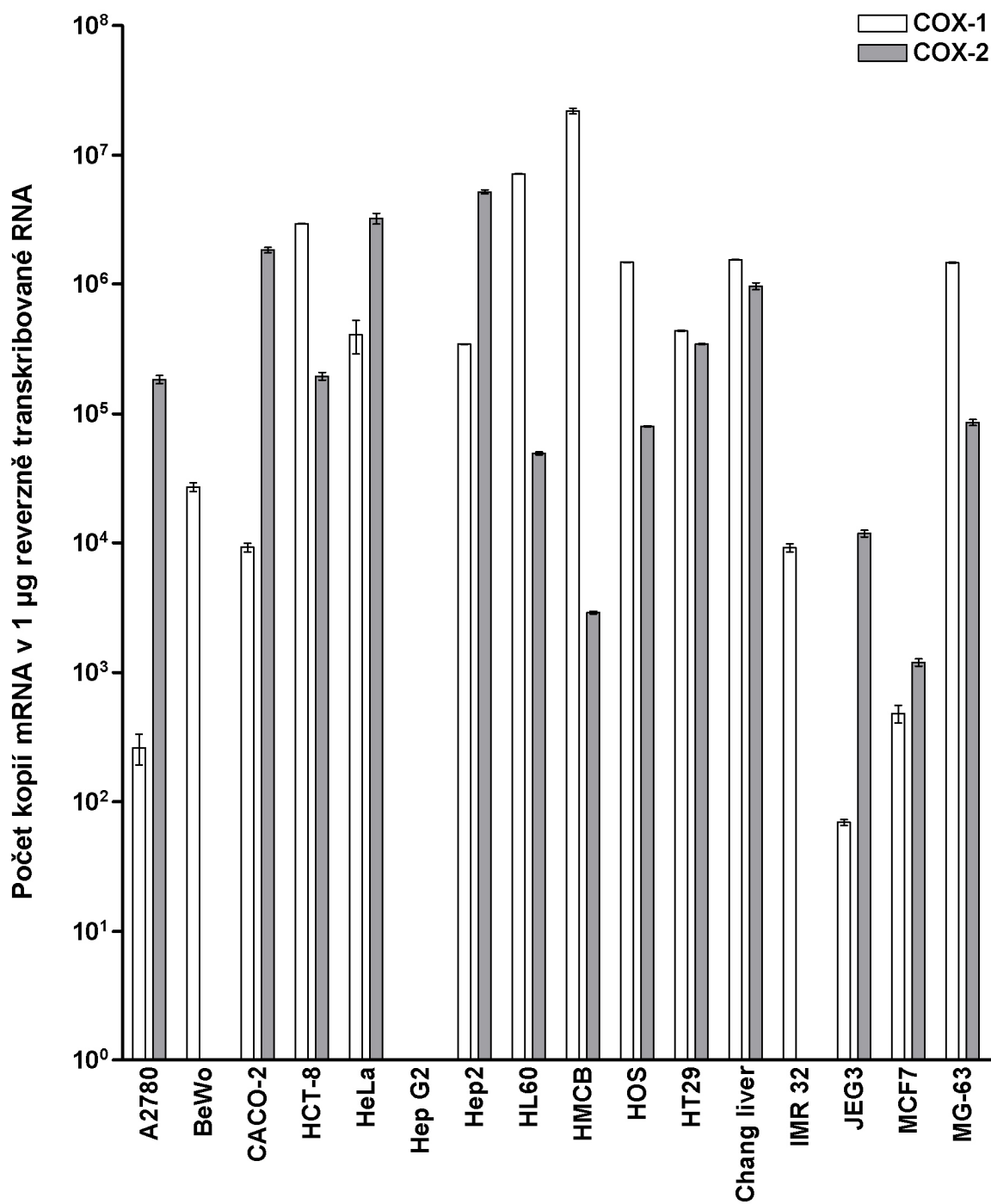
Výběr vhodné parentní buněčné linie pro studium vlivu specifické inhibice COX-1/COX-2 na další geny byl proveden celkem z 16 lidských buněčných linií. Informace ke všem liniím (tkáňový původ a použitá kultivační média) jsou shrnuty v tab.1.

U jednotlivých linií byla provedena absolutní kvantifikace mRNA obou izoform COX. Expresí COX byla měřena po čtrnáctidenní standardní kultivaci po nasazení buněčných štoků z kapalného dusíku, kde byly buňky dlouhodobě uchovávány. Výsledky kvantifikace jsou znázorněny v grafu na obr.12.

Téměř všechny buněčné linie exprimovaly obě izoformy COX. Výjimkou byla linie HepG2 (buňky hepatocelulárního karcinomu), kde nebyla detekována exprese mRNA ani jedné z izoform. V buněčných liniích IMR32 (buňky neuroblastomu) a BeWo (buňky choriokarcinomu) nebyla detekována exprese COX-2.

Z hlediska relativně vysoké exprese obou izoform byly zajímavé tyto linie: HCT-8 (buňky ileocekálního adenokarcinomu), HeLa (buňky karcinomu děložního čípku), Hep2 (původem buňky rakoviny hrtanu, u kterých byla prokázána kontaminace HeLa buňkami), HT29 (buňky adenokarcinomu tlustého střeva) a Chang liver (původem buňky jater, u kterých byla prokázána kontaminace HeLa).

Pro další experimenty byla vybrána buněčná linie Hep2. Nemalou výhodou použití této linie byly naše bohaté zkušenosti s její kultivací, která je velmi snadná a bezproblémová. Navíc jsou tyto buňky relativně snadno transfekovatelné pomocí námi dosud testovaných transfekčních reagens, včetně *Effectene® Transfection Reagent* (Qiagen), který byl v této práci používán. Původ buněčné linie Hep2 (karcinom děložního čípku) byl potvrzen i v naší laboratoři provedením STR („short tandem repeat“; krátká tandemová repetice) analýzy testováním 16 standardních markerů prostřednictvím kitu *AmpF ℓ STR® Identifier® PCR Amplification Kit* (Applied Biosystems Inc).



Obr.12: Expres COX-1 a COX-2 ve vybraných lidských buněčných liniích. Výsledky jsou prezentovány jako průměr hodnot ze tří nezávislých experimentů \pm SEM. Statistická významnost výsledků je analyzována pomocí testu ANOVA a Bonferroniho srovnávacího testu.

6.1.2. Měření exprese COX pomocí real-time PCR po transfekci shRNA a selekci antibiotikem

Buněčná linie Hep2 byla transfekována plazmidy psiRNA_U6 a psiRNA_U6(Age) se zaklonovanými shRNA sekvencemi. Postup návrhu shRNA sekvencí specifických pro COX-1 nebo COX-2 je uveden v kapitole 5.2.1., postup přípravy expresních plazmidů a zaklonování shRNA sekvencí v kapitole 5.2.2.

Transfekce byla provedena pomocí *Effectene® Transfection Reagent* (Qiagen) dle postupu uvedeného v kapitole 5.2.3.2. Po transfekci byly vyselektovány úspěšně transfekované buňky pomocí blasticidinu (kapitola 5.2.3.2.). Po vysazení blasticidinu byly buňky pěstovány dalších 14 dní za standardních kultivačních podmínek a poté sklizeny na izolaci RNA. Postupy izolace RNA, syntézy cDNA, měření exprese mRNA příslušné izoformy COX pomocí real-time PCR a vyhodnocení dat (relativní kvantifikace genu) jsou uvedeny v kapitole 5.2.4.

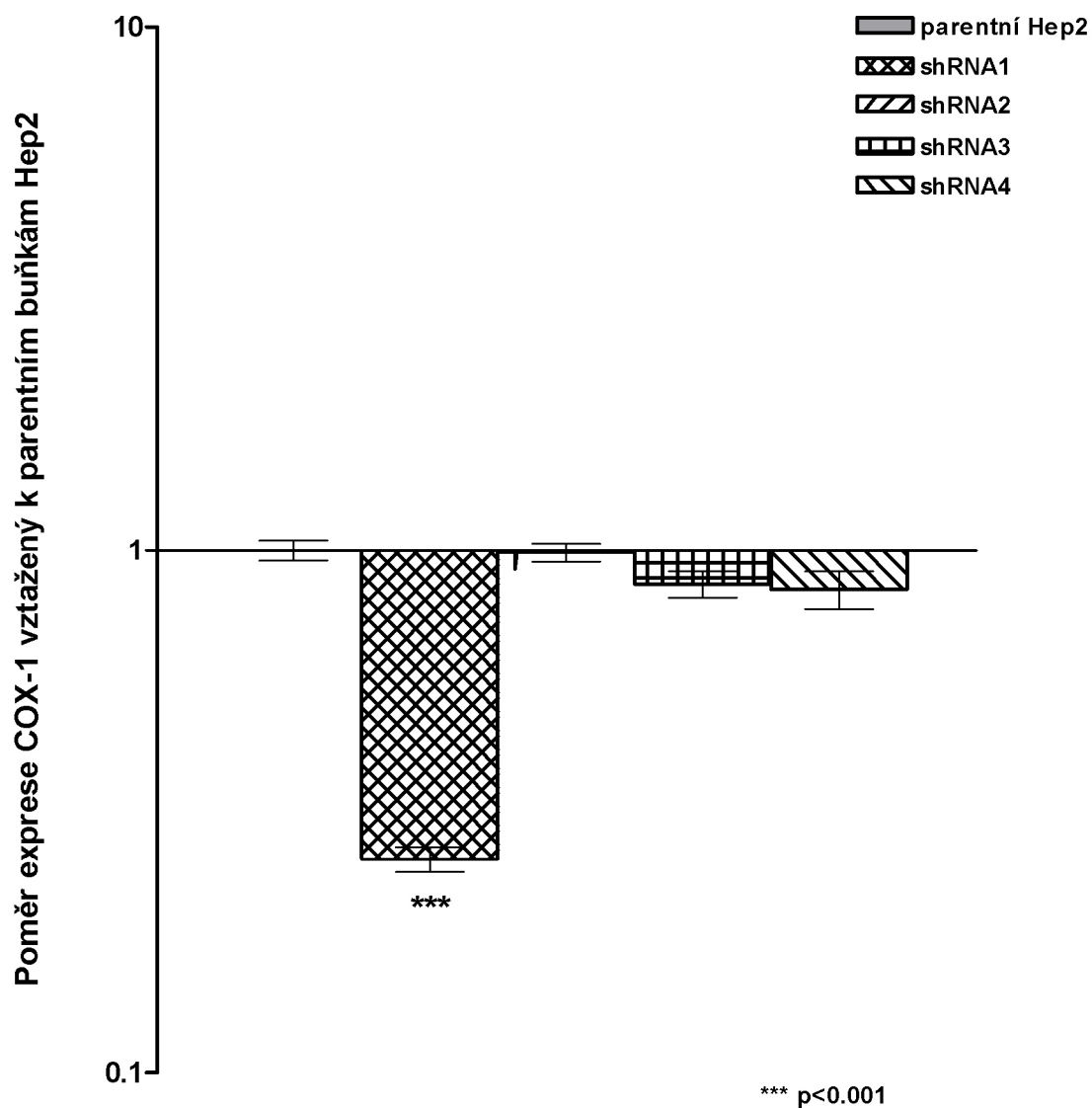
6.1.2.1. Hep2 transfekované shRNA specifickými pro cyklooxygenázu 1

Byly testovány celkem čtyři různé shRNA sekvence specifické pro izoformu COX-1 (Tab.2).

Sekvence shRNA2, shRNA3 a shRNA4 nevykazovaly významné snížení exprese COX-1 ve srovnání s bazální expresí v parentních Hep2.

Sekvence shRNA1 se projevila jako vysoce účinná. Po čtrnáctidenní standardní kultivaci po vysazení blasticidinu bylo u linie transfekované touto sekvencí detekováno statisticky významné ($p < 0,001$) snížení exprese mRNA genu COX-1 na ~25,6 % bazální exprese v parentních Hep2. Tato linie byla vybrána pro další studie.

Výsledky jsou znázorněny v grafu na obr.13.



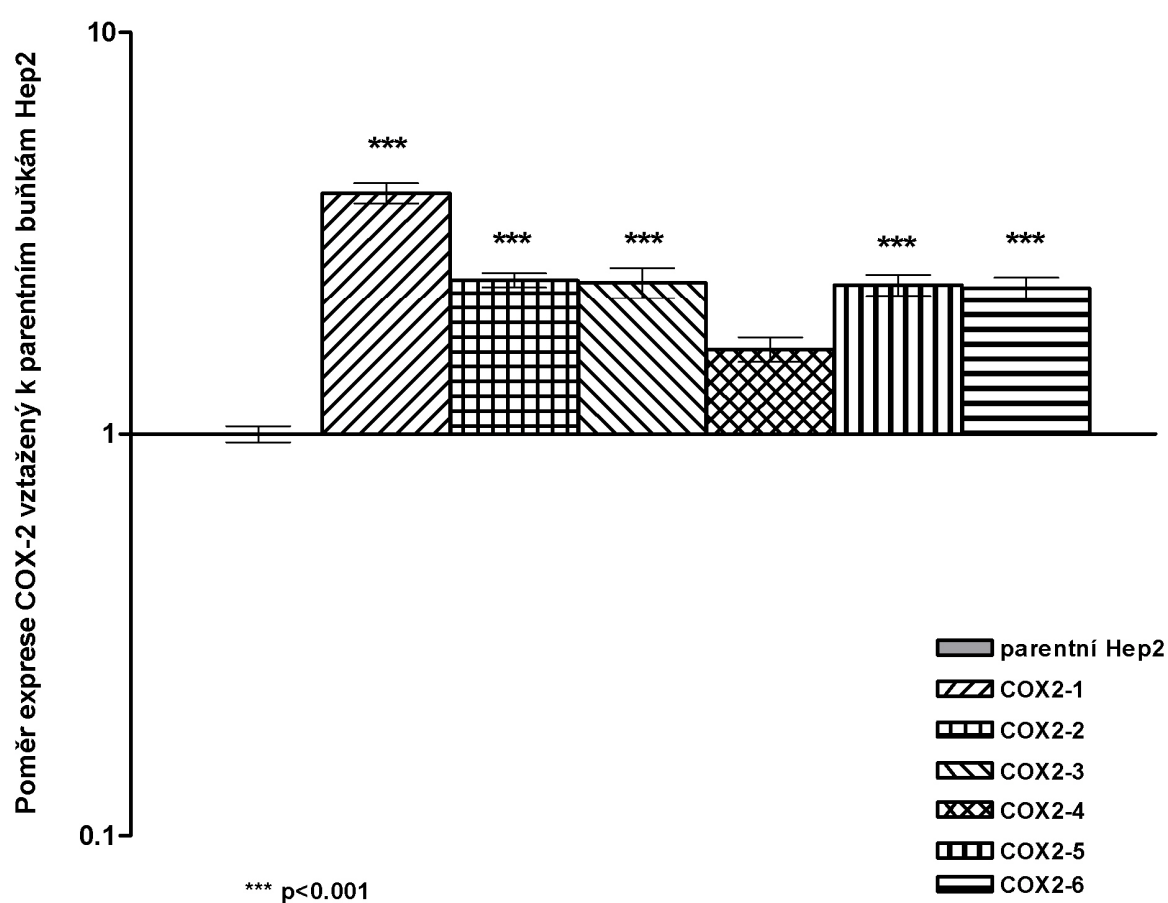
Obr.13: Expese mRNA genu COX-1 po transfekci shRNA a selekci antibiotikem. Výsledky jsou prezentovány jako průměr hodnot ze tří nezávislých experimentů ± SEM. Statistická významnost výsledků je analyzována pomocí testu ANOVA a Bonferroniho srovnávacího testu.

6.1.2.2. Hep2 transfekované shRNA specifickými pro cyklooxygenázu 2

Bylo testováno celkem šest shRNA sekvencí specifických pro izoformu COX-2 (Tab.3).

Žádná ze sekvencí nezpůsobovala snížení exprese genu COX-2, naopak u všech byla oproti předpokladu detekována zvýšená exprese této izoformy, u 5 z nich (s výjimkou sekvence COX2-4) bylo zvýšení statisticky významné ($p < 0,001$).

Výsledky jsou znázorněny v grafu na obr.14.



Obr.14: Exprese mRNA genu COX-2 po transfekci shRNA a selekci antibiotikem. Výsledky jsou prezentovány jako průměr hodnot ze tří nezávislých experimentů \pm SEM. Statistická významnost výsledků je analyzována pomocí testu ANOVA a Bonferroniho srovnávacího testu.

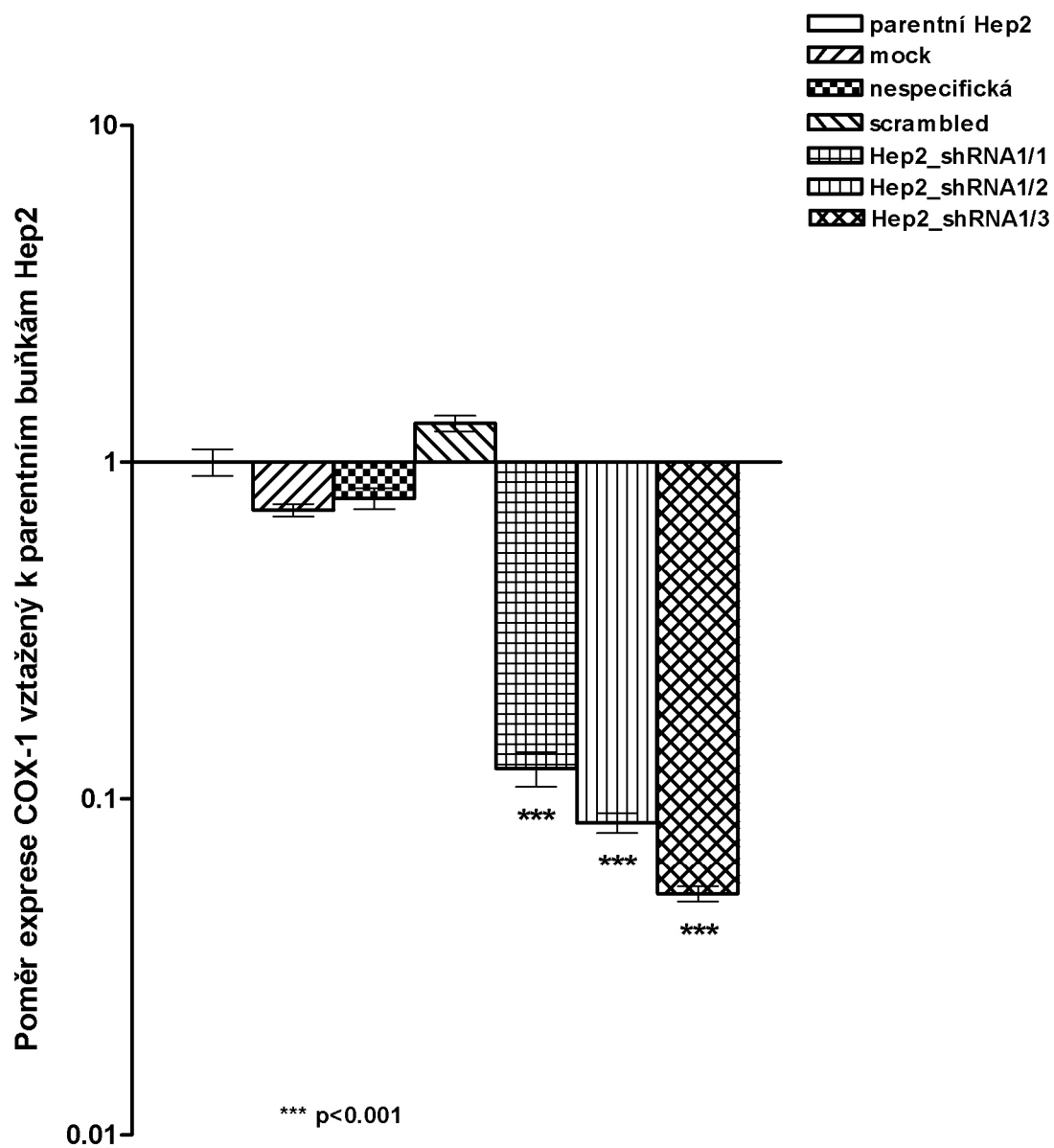
6.1.3. Příprava klonů vybrané buněčné linie a ověření exprese COX na různých úrovních

Na základě předchozích výsledků byla pro další experimenty vybrána buněčná linie Hep2 transfekovaná zaklonovanou sekvencí shRNA1. Tato linie byla nazvána Hep2_shRNA1.

Jelikož jsou buněčné linie po transfekci a selekci antibiotikem obecně heterogenní, čili jednotlivé buňky vykazují různý stupeň dané vlastnosti, byla linie Hep2_shRNA1 dále rozdělena na jednotlivé klony metodou rozklonování v 96-jamkových kultivačních destičkách. Použitý postup rozklonování je popsán v kapitole 5.2.3.2.

6.1.3.1. Výběr klonů pomocí real-time PCR

Metodou rozklonování bylo připraveno 45 klonů. U všech klonů byla změřena exprese mRNA genu COX-1. Exprese COX-1 v jednotlivých klonech byla velmi různorodá, pohybovala se v rozmezí ~5,2-78,4 %. Pro studium exprese genů přímo či vzdáleně souvisejících s metabolismem AA byly vybrány tři klony buněčné linie Hep2 s nejvýrazněji sníženou expresí COX-1. Exprese COX-1 u těchto klonů je znázorněna v grafu na obr.15. Klon označený jako Hep2_shRNA1/1 byl snížený na ~12,3 %, klon Hep2_shRNA1/2 na ~8,5 % a klon Hep2_shRNA1/3 na ~5,2 % bazální exprese COX-1 v buňkách Hep2. Vlastnosti a příprava použitých kontrolních buněčných linií jsou rozebrány v kapitole 5.2.3.3.



Obr.15: Klony se sníženou expresí COX-1 vybrané pro další experimenty. Výsledky jsou prezentovány jako průměr hodnot ze tří nezávislých experimentů \pm SEM. Statistická významnost výsledků je analyzována pomocí testu ANOVA a Bonferroniho srovnávacího testu.

6.1.3.2. Sledování exprese genů interferonové odpovědi

Při transfekci shRNA sekvencemi může dojít k vyvolání nespecifické imunitní odpovědi buňky. Z tohoto důvodu jsme vybrali a změřili 8 genů zahrnutých v interferonové imunitní odpovědi buňky (Tab.6) v buněčných liniích transfekovaných shRNA sekvencemi (tj. v klonech Hep2 se sníženou expresí COX-1 a některých kontrolních buněčných liniích). V těchto buněčných liniích nedošlo u žádného z měřených genů ke statisticky významné změně exprese mRNA oproti parentním buňkám. Vyvolání nespecifické imunitní odpovědi buňky prostřednictvím shRNA nebylo tedy potvrzeno.

6.1.3.3. Ověření exprese cyklooxygenázy na proteinové úrovni

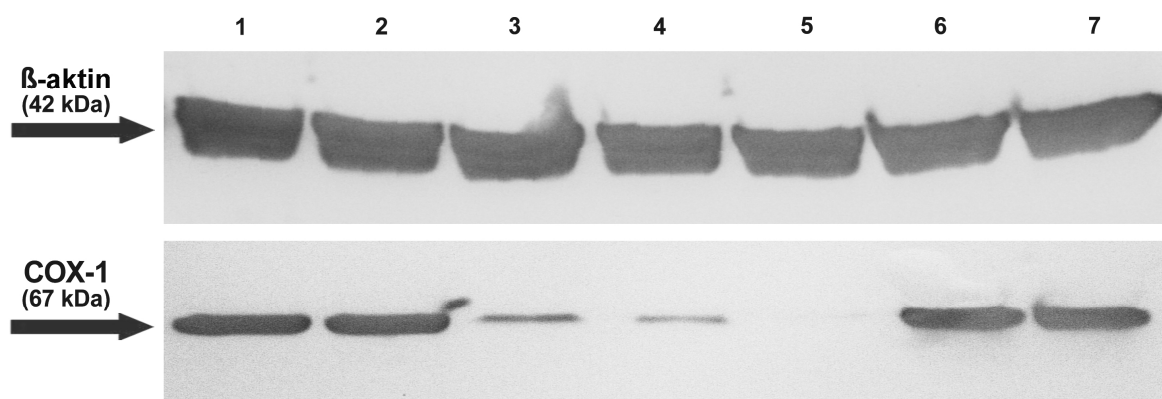
Biologická aktivita shRNA1 byla potvrzena také na proteinové úrovni pomocí metody Western blot.

Rovnoměrné nanesení jednotlivých buněčných lyzátů do jamek gelu bylo potvrzeno pomocí specifické protilátky proti β -aktinu.

U všech tří klonů (označených jako Hep2_shRNA1/1; Hep2_shRNA1/2 a Hep2_shRNA1/3), ve shodě s výsledky získanými pomocí real-time PCR, bylo detekováno výrazné snížení exprese proteinu COX-1.

Stejně jako při měření exprese mRNA genu COX-1 pomocí metody real-time PCR byly opět použity čtyři kontrolní buněčné linie, jejichž vlastnosti a příprava jsou rozebrány v kapitole 5.2.3.3. V žádné z kontrolních buněčných linií nedošlo ve srovnání s parentní linií Hep2 k významnému snížení exprese proteinu.

Výsledek detekce proteinu COX-1 je znázorněn na obr.16.



Obr.16: Detekce COX-1 na proteinové úrovni pomocí Western blotu.

Do jednotlivých jamek SDS-PAGE gelu byly nanášeny lyzáty získané z těchto buněčných linií: 1. parentní Hep2; 2. „mock“ kontrola; 3. Hep2_shRNA1/1; 4. Hep2_shRNA1/2; 5. Hep2_shRNA1/3; 6. nespecifická kontrola; 7. „scrambled“ kontrola.

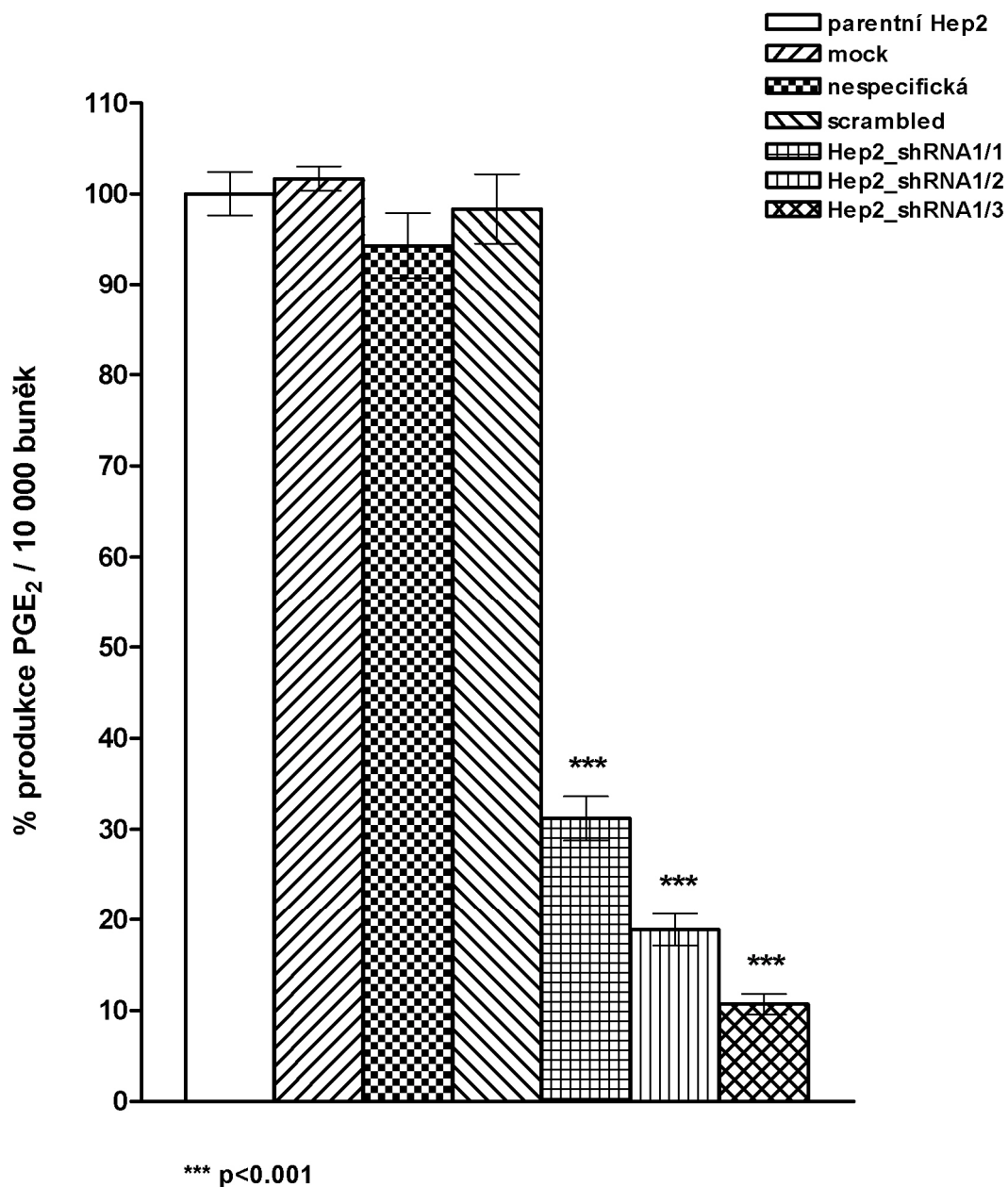
6.1.3.4. ELISA

Snížení enzymu COX-1 ve všech třech dále testovaných klonech bylo potvrzeno i na funkční úrovni pomocí metody ELISA měřením produkce PGE₂.

U sledovaných klonů došlo k významnému snížení syntézy PGE₂: u klonu Hep2_shRNA1/1 na ~31,2 %; u klonu Hep2_shRNA1/2 na ~18,9 % a u klonu Hep2_shRNA1/3 na ~10,7 % ve srovnání s původní expresí v parentní linii Hep2.

Byly použity shodné kontrolní buněčné linie jako při měření pomocí real-time PCR a Western blotu. Produkce PGE₂ se ve srovnání s parentní linií Hep2 významně nezměnila u žádné z nich.

Výsledky měření jsou znázorněny v grafu na obr.17.



Obr.17: Produkce PGE₂ ve vybraných kloněch se sníženou COX-1 měřená pomocí metody ELISA. Výsledky jsou prezentovány jako průměr hodnot ze tří nezávislých experimentů ± SEM. Hodnoty vyjadřují procento produkce PGE₂ produkované 10 000 buňkami ve srovnání s parentní linií Hep2. Statistická významnost výsledků je analyzována pomocí testu ANOVA a Bonferroniho srovnávacího testu.

6.1.4. Využití syntetických siRNA pro snížení exprese cyklooxygenázy

6.1.4.1. Optimalizace transfekce pomocí různých transfekčních reagens

Pomocí fluorescenčně značené siRNA TYE™ 563 DS Transfection Control (Integrated DNA technologies, Inc.) byla provedena optimalizace transfekce dvěma transfekčními reagens, Nanofectinu siRNA (PAA Laboratories GmbH) a INTERFERinu™ (Polyplus transfection).

Výsledky optimalizace transfekce jsou shrnuty v tab.7 a 8. Nejúčinnější kombinace koncentrace siRNA v kultivačním médiu a množství transfekčního reagens, které byly použity pro další optimalizace, jsou v příslušných tabulkách vyznačeny červeným podbarvením. Při vyhodnocování výsledků optimalizace byla odečítána zejména účinnost transfekce (procento úspěšně transfekovaných buněk). Dále byla sledována intenzita fluorescence a viabilita buněk ve srovnání s buňkami pěstovanými pouze v kultivačním médiu bez přidaných transfekčních reagensů (Kontrola_2). Výsledky byly odečítány 24 hodin po transfekci.

Tab. 7: Výsledky optimalizace transfekce Hep2 po použití Nanofectinu siRNA

c (siRNA) [nM]	Nanofectin siRNA [μl]	Účinnost transfekce [%]	Fluorescence ^a	Viabilita buněk ^b
5	0,11	90	1	***
5	0,14	90	1-2	***
5	0,21	95	2-3	***
10	0,14	95	2	***
10	0,19	95	2-3	***
10	0,41	100	3	*
15	0,21	100	3	***
15	0,29	100	3	**
15	0,62	100	3	*
20	0,28	100	2-3	**
20	0,39	100	3	*
20	0,83	100	3	*
Kontrola 1	0,83	-	-	***
Kontrola 2	-	-	-	***

Pozn: ^aFluorescence: 1 - slabá; 2 - intenzivní; 3 - velmi intenzivní

^bViabilita buněk ve srovnání s Kontrolou_2: ***100 %; **90 % a více;
*méně než 90 %.

Tab.8: Výsledky optimalizace transfekce Hep2 po použití INTERFERinu™

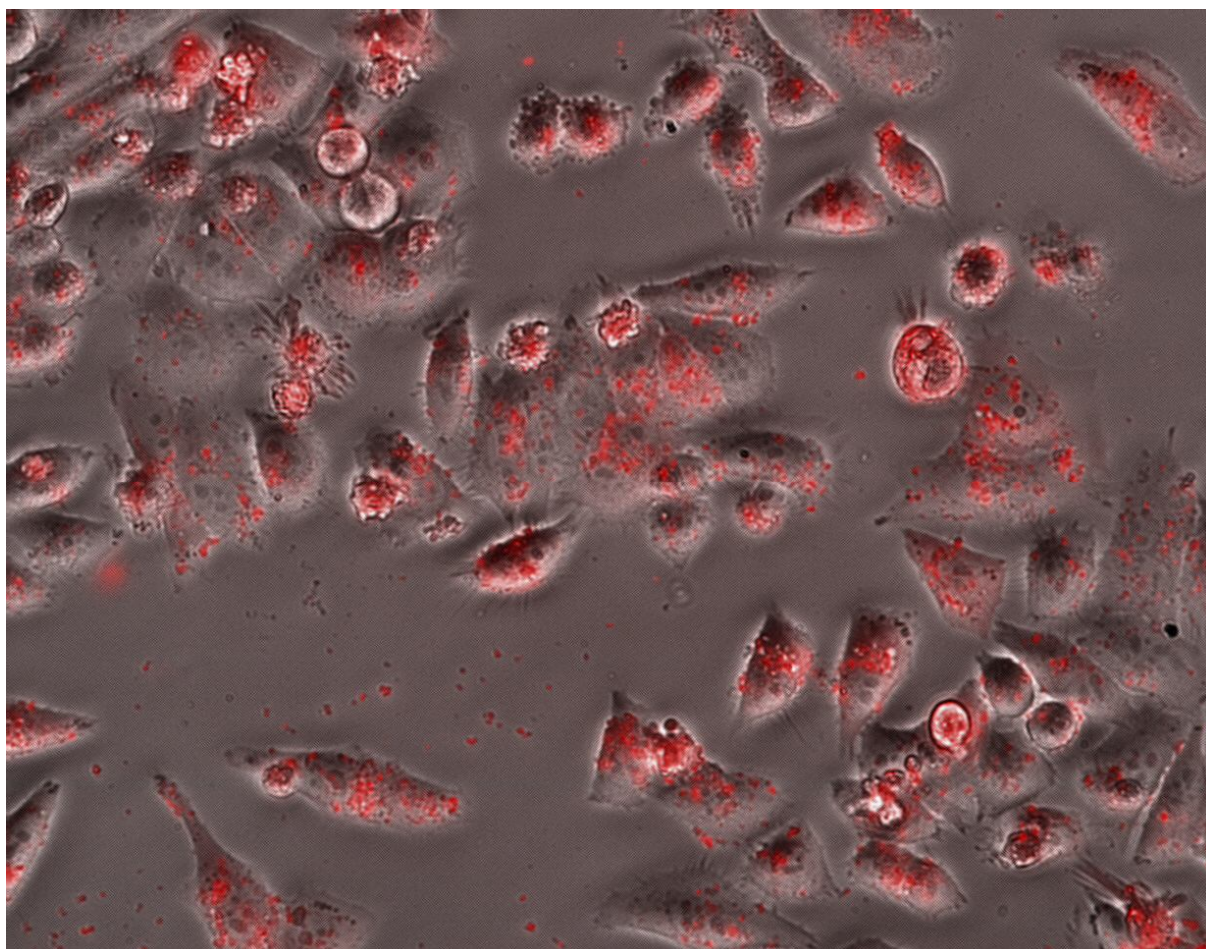
c (siRNA) [nM]	INTERFERin™ [μl]	Účinnost transfekce [%]	Fluorescence ^a	Viabilita buněk ^b
0,5	0,75	5	1	***
1	0,75	15	1	***
2,5	0,75	25	1	***
5	0,75	50	1	***
10	0,5	95	1	***
10	1,5	95	2	***
10	2,5	90	1	***
15	0,5	95	3	***
15	1,5	95	2	***
15	2,5	90	2	**
20	1,5	95	3	**
Kontrola_1	2,5	-	-	***
Kontrola_2	-	-	-	***

Pozn: ^aFluorescence: 1 - slabá; 2 - intenzivní; 3 - velmi intenzivní

^bViabilita buněk ve srovnání s Kontrolou_2: ***100 %; **90 % a více;

*méně než 90 %.

Na obr.18 je zobrazena fluorescence buněk Hep2 24 hodin po transfekci provedené v 96-jamkové kultivační destičce pomocí 0,21 μ l transfekčního reagens Nanofectinu siRNA a siRNA TYETM 563 DS Transfection Control o konečné koncentraci 15 nM.



Obr.18: Fluorescence buněk Hep2 po transfekci siRNA TYETM 563 DS Transfection Control (15 nM) transfekčním reagens Nanofectin siRNA (0,21 μ l) v 96-jamkové destičce, 24 hodin po transfekci (zvětšení 200x).

6.1.4.2. Optimalizace pomocí siRNA specifické pro HPRT1

Jelikož nejnižší dostatečně účinná koncentrace siRNA může být pod hladinou detekovatelnosti fluorescenčního mikroskopu, byly neúčinnější kombinace koncentrace siRNA v kultivačním médiu a množství transfekčního reagens dále testovány pomocí validované siRNA **HPRT-S1 DS Positive Control** (Integrated DNA technologies, Inc.) specifické pro „housekeepingový“ gen HPRT1.

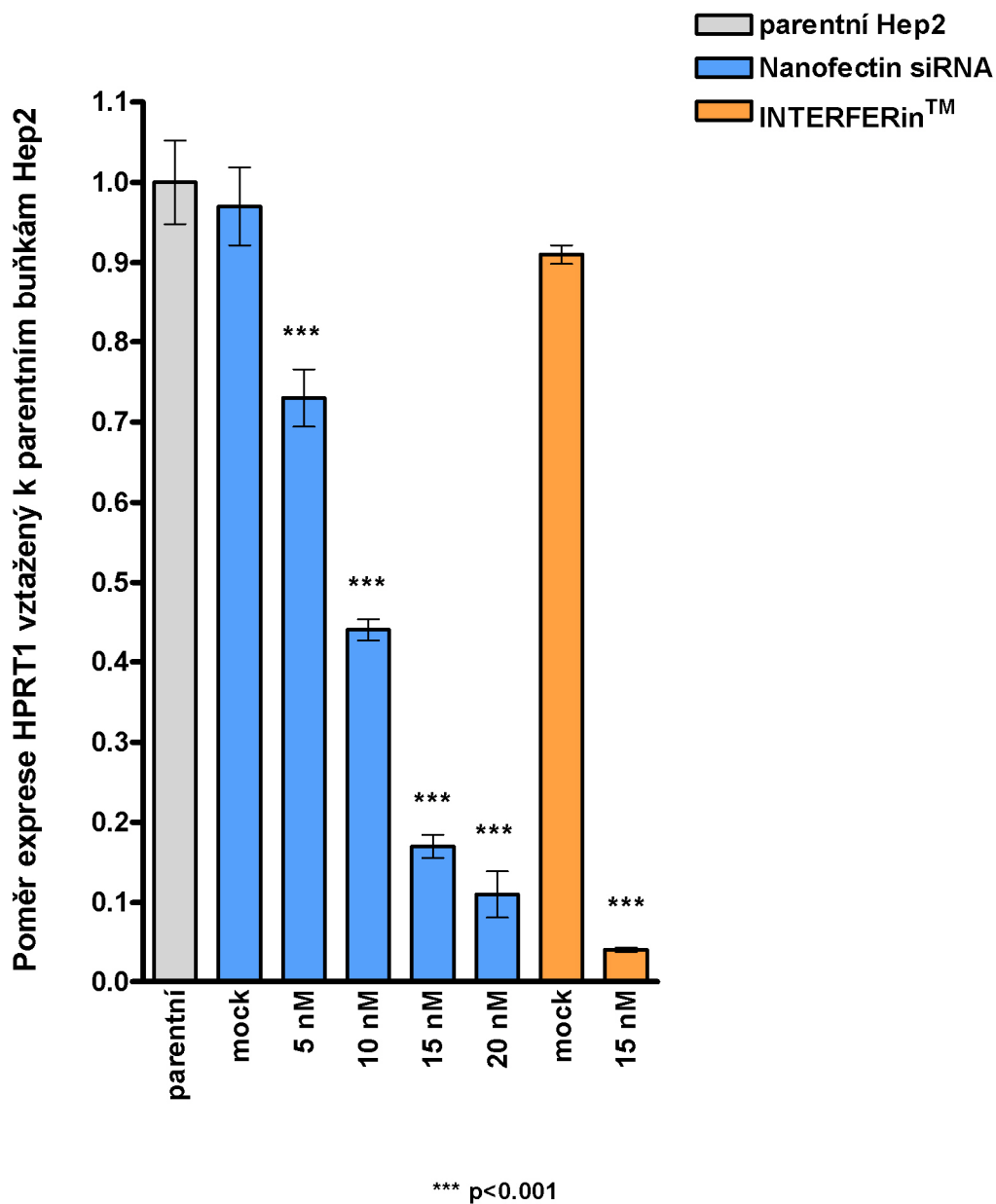
Byly použity tyto kontroly: parentní buněčná linie Hep2 a tzv. „mock kontrola“ (buněčná linie „ovlivněná“ samotným transfekčním reagens bez přidané siRNA; kapitola 5.2.3.3). V tab.9 jsou znázorněny jednotlivé použité kombinace koncentrací siRNA a množství příslušného transfekčního reagens pro transfekci v 6-jamkových kultivačních destičkách.

Tab.9: Použité kombinace koncentrace siRNA a množství transfekčního reagens pro optimalizaci transfekce pomocí siRNA specifického pro HPRT1

Reagens *	Označení na ose x	c (siRNA) [nM]	Nanofectin siRNA / INTERFERin™ [μl]
-	parentní	-	-
NAN *	mock	-	0,39
	5 nM	5	0,21
	10 nM	10	0,19
	15 nM	15	0,21
	20 nM	20	0,39
INT *	mock	-	0,5
	15 nM	15	0,5

* Reagens = transfekční reagens, NAN = Nanofectin siRNA, INT = INTERFERin™

Z obr.19 je zřejmé, že úspěšnost inhibice daného genu silně závisí na koncentraci použité siRNA. Účinnost siRNA je také závislá na použitém transfekčním reagens. Z použitých poměrů byla neúčinnější transfekce INTERFERinem™ při použití koncentrace 15 nM, kdy bylo dosaženo snížení HPRT1 na ~4 % a dále transfekce Nanofectinem siRNA při použití koncentrace siRNA 20 nM při dosažení inhibice COX-1 na ~11 % ve srovnání s bazální expresí HPRT1 v parentních Hep2.



Obr.19: Snížení exprese mRNA genu *HPRT1* po transfekci siRNA sekvence specifické pro *HPRT1*. Výsledky jsou prezentovány jako průměr hodnot ze tří nezávislých experimentů \pm SEM. Statistická významnost výsledků je analyzována pomocí testu ANOVA a Bonferroniho srovnávacího testu.

6.1.4.3. Snížení exprese cyklooxygenázy 1 pomocí syntetické siRNA

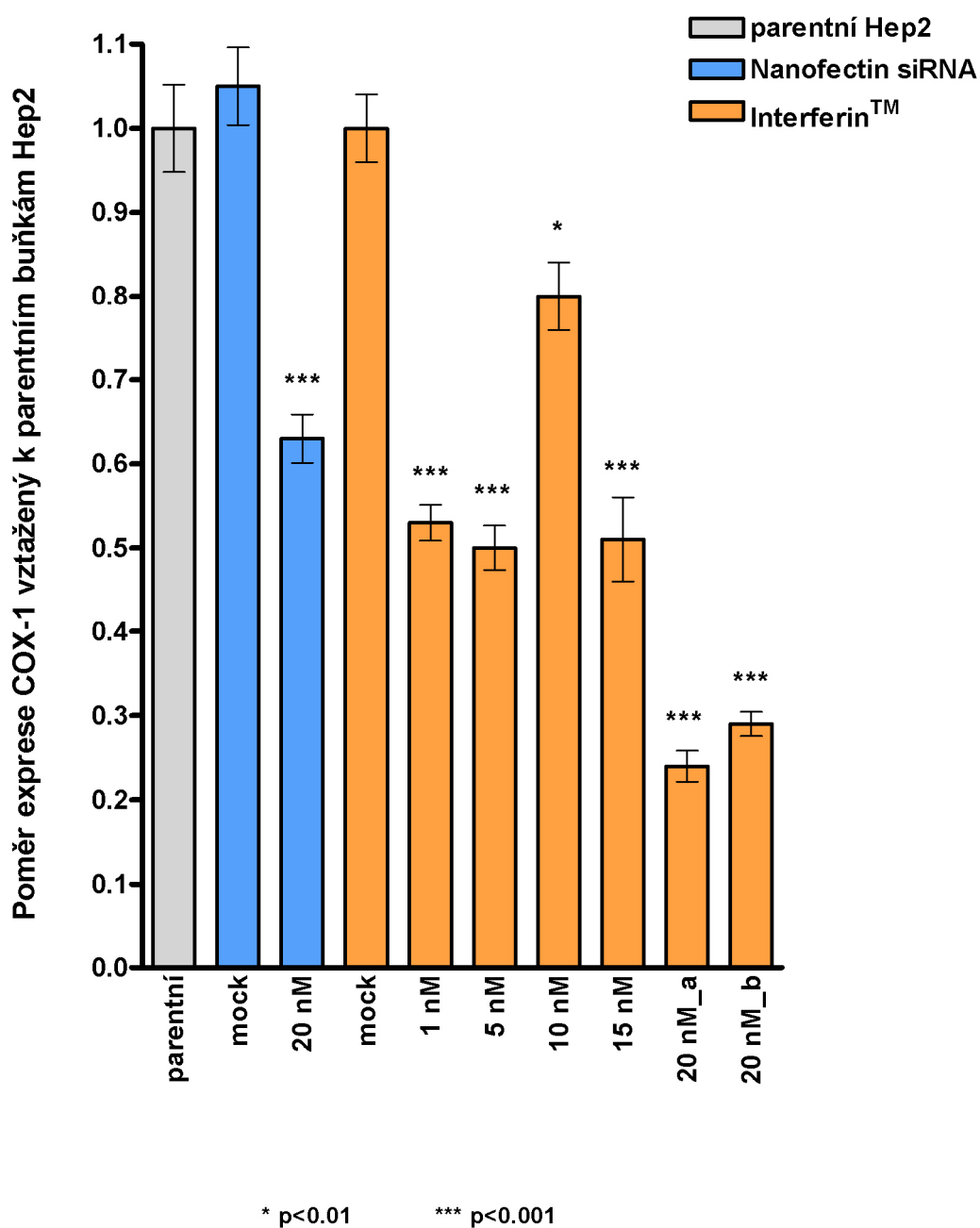
Na základě předchozích výsledků optimalizace byly pro snižování exprese COX-1 pomocí syntetické siRNA navržené na sekvenci genu COX-1 (Silencer® Select Pre-designed (Inventoried) siRNA, siRNA ID #: s336; Ambion) použity v 6-jamkových kultivačních destičkách kombinace koncentrace siRNA a množství transfekčního reagens uvedené v tab.10.

Tab.10: Použité kombinace koncentrace siRNA a množství transfekčního reagens pro transfekci pomocí siRNA specifické pro COX-1

Reagens *	Označení na ose x	c (siRNA) [nM]	Nanofectin siRNA / INTERFERin™ [μl]
-	parentní	-	-
NAN *	mock	-	2,1
	20 nM	20	2,1
INT *	mock	-	6
	1 nM	1	4
	5 nM	5	4
	10 nM	10	6
	15 nM	15	4
	20 nM_a	20	4
	20 nM_b	20	6

* Reagens = transfekční reagens, NAN = Nanofectin siRNA, INT = INTERFERin™

Výsledky jsou zobrazeny v grafu na obr.20. Nejúčinněji se podařilo snížit expresi COX-1 pomocí INTERFERinu™ při použití koncentrace siRNA 20 nM, a to při použití kombinace „a“ na ~24 %, při použití kombinace „b“ na ~29 % ve srovnání s bazální expresí COX-1 v parentních buňkách Hep2.



Obr.20: Snížení exprese mRNA genu COX-1 po transfekci siRNA sekvence specifické pro COX-1. Výsledky jsou prezentovány jako průměr hodnot ze tří nezávislých experimentů ± SEM. Statistická významnost výsledků je analyzována pomocí testu ANOVA a Bonferroniho srovnávacího testu.

6.2. Analýza vztahů mezi geny metabolismu arachidonové kyseliny a ABCC4

6.2.1. Měření exprese mRNA pomocí real-time PCR

Nejprve byla v parentních buňkách Hep2 analyzována bazální exprese vybraných genů metabolismu AA pomocí systémů primerů a sond navržených a nasyntetizovaných pro jednotlivé geny. Seznam měřených genů a zároveň seznam systémů je uveden v tab.6 (kapitola 5.2.4.3.) v části „Geny uplatňující se v metabolismu arachidonové kyseliny a transportu prostanoidů“.

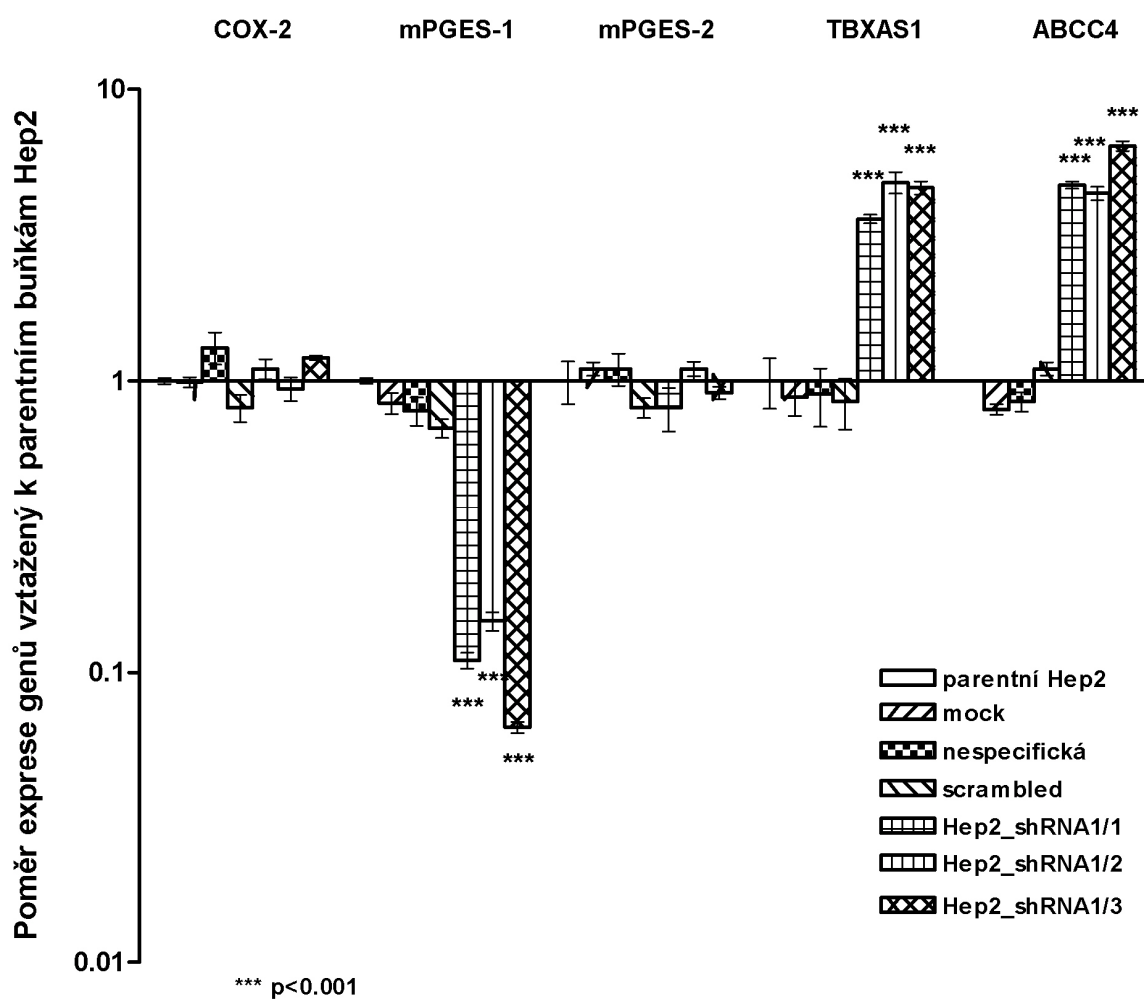
V buňkách Hep2 nebyla pomocí real-time PCR detekována bazální exprese těchto genů: hematopoetické prostaglandin D₂ syntázy (PGDS), cerebrální prostaglandin D₂ syntázy (PTGDS), prostaglandin I₂ syntázy (PTGIS) a arachidonát 5-lipoxygenázy (ALOX5). Velmi málo (Ct>32) byly v těchto buňkách exprimovány arachidonát 5-lipoxygenázu aktivující protein (ALOX5AP) a cytosolická prostaglandin E syntáza (cPGES neboli prostaglandin E syntáza 3; PTGES3). Expres mRNA všech těchto jmenovaných genů se v buňkách Hep2 se sníženou COX-1 statisticky významně neměnila ve srovnání s expresí v parentních buňkách.

V grafu na obr.21 je shrnutá exprese měřených genů ve třech vybraných klonech s výrazně sníženou expresí COX-1 ve srovnání s parentní buněčnou linií Hep2.

V klonech se sníženou expresí COX-1 se statisticky významně neměnila ani exprese COX-2. Dále nedošlo ani k významné změně exprese mikrozomální prostaglandin E syntázy 2 (mPGES-2 neboli prostaglandin E syntázy 2; PTGES2).

Statisticky významně ($p < 0.001$) se změnila exprese 3 měřených genů – mikrozomální prostaglandin E syntázy 1 (mPGES-1 neboli prostaglandin E syntázy; PTGES), tromboxan A syntázy 1 (TBXAS1) a ABCC4. Expres mRNA genu mPGES-1 byla významně snížena (na ~6,5-15 % bazální exprese v parentních buňkách Hep2, dle konkrétního klonu) a TBXAS1 zvýšena (~3,6-4,8 x vyšší než bazální exprese v parentních buňkách Hep2, dle konkrétního klonu) po snížení COX-1 ve srovnání s parentními buňkami. ABCC4 vykazoval statisticky významně zvýšenou expresi mRNA (~4,4-6,4 x vyšší než bazální exprese v parentních buňkách Hep2, dle konkrétního klonu).

Expres mRNA všech měřených genů ve všech kontrolních buněčných liniích nevykazovala žádné statisticky významné změny oproti parentním buňkám. Vlastnosti a příprava použitých kontrolních buněčných linií jsou rozebrány v kapitole 5.2.3.3.



Obr.21: *Expese jednotlivých genů metabolismu AA a ABCC4 po trvalém snížení COX-1 v parentních buňkách Hep2 a kontrolních buněčných liniích. Výsledky jsou prezentovány jako průměr hodnot ze tří nezávislých experimentů ± SEM. Statistická významnost výsledků je analyzována pomocí testu ANOVA a Bonferroniho srovnávacího testu.*

6.2.2. Test změny stability mRNA

Po specifickém a trvalém snížení exprese COX-1 v parentní linii Hep2 došlo k výrazné změně hladiny mRNA zejména u dvou genů, a to k inhibici mPGES-1 a zvýšení ABCC4.

Změna hladiny mRNA může být regulována různými mechanismy, buď samotnou změnou míry exprese mRNA nebo změnou stability mRNA. Z důvodu bližšího studia mechanismu regulace změny hladiny mRNA u těchto genů bylo provedeno srovnání stability jejich mRNA v parentních buňkách a buňkách se sníženou expresí COX-1 pomocí aktinomycinu D (Sigma-Aldrich). Provedení experimentu je popsáno v kapitole 5.2.7.

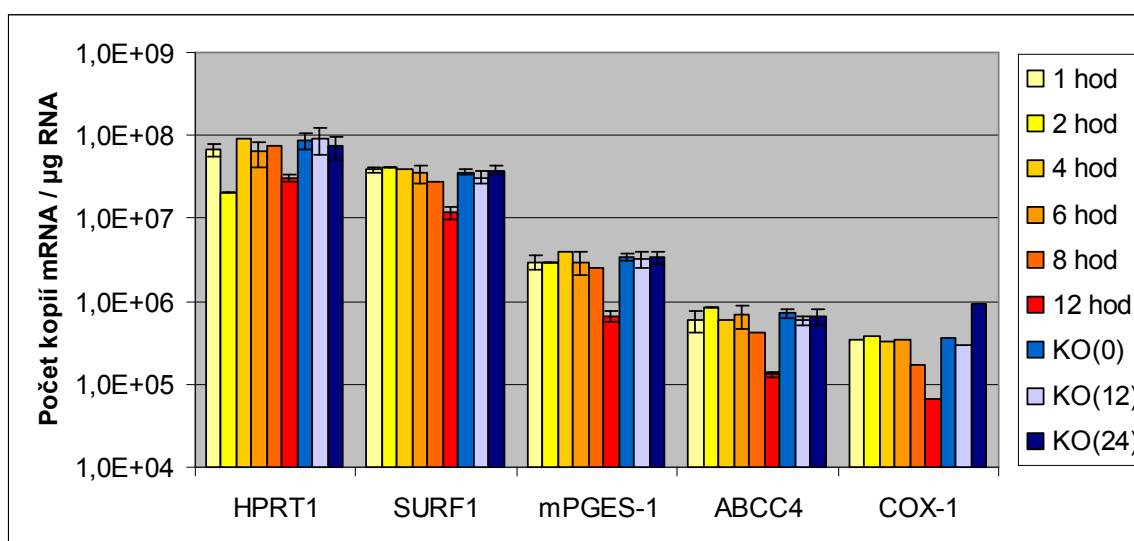
V každém čase odběru byla před sklizní buněk mikroskopicky vyhodnocena změna jejich úmrtnosti. Po 6 hodinách se začaly projevovat toxické účinky aktinomycinu D. Buňky se sníženou expresí COX-1 (Hep2_shRNA1/3) se oproti parentním Hep2 projevily vůči tomuto antibiotiku jako citlivější. Po 24 hodinách působení aktinomycinu D již přežívalo pouze několik malých kolonií u parentní linie, linie Hep2_shRNA1/3 byla již vyhynulá. V tab.11 je shrnutý stav buněk v jednotlivých časech odběru buněk na izolaci RNA.

*Tab.11: Úmrtnost buněk v jednotlivých časech odběru**

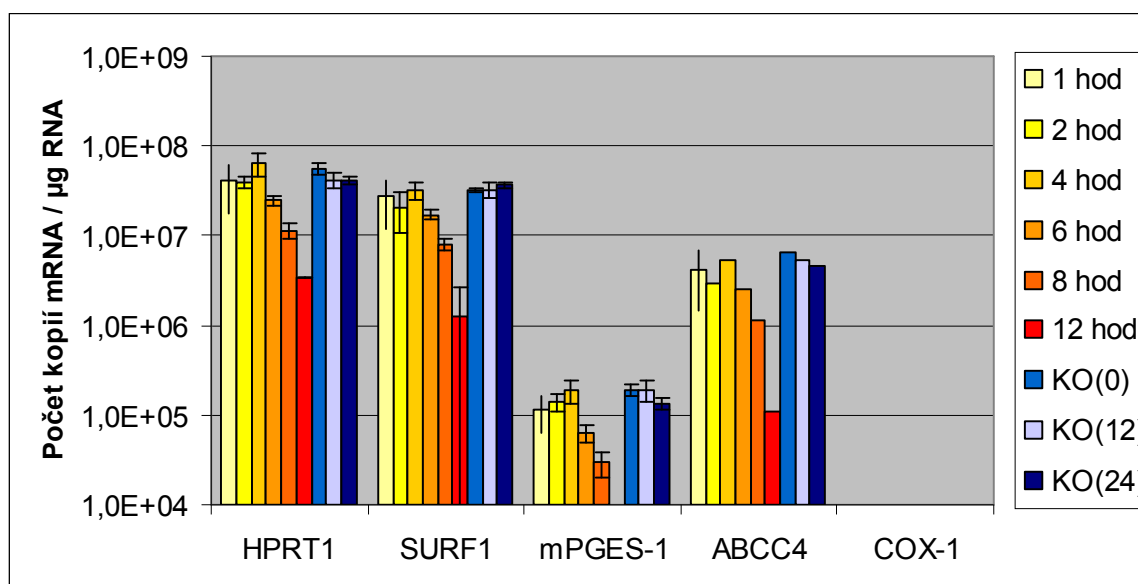
Čas odběru [hod]	Hep2 [% živých buněk]	Hep2_shRNA1/3 [% živých buněk]
0	100	100
1	100	100
2	100	100
4	100	100
6	90	75
8	70	50
12	50	20
24	5	0

**Pozn.: Úmrtnost buněk je vyjádřena jako % živých buněk ve srovnání s kontrolou. Jako kontrola sloužila linie Hep2 / Hep2_shRNA1/3 neovlivněná aktinomycinem D, odečtená ve stejném čase jako ovlivněné buňky.*

Grafy na obr.22 a 23 vyjadřují absolutní kvantifikaci mRNA jednotlivých vybraných genů v parentní linii Hep2 a linii Hep2_shRNA1/3 v jednotlivých časech odběru po začátku působení aktinomycinu D. Časy odběru jsou v grafech odlišeny barevně. Byla měřena exprese dvou „housekeepingových“ genů (HPRT1, SURF1; tab.6), dále genu COX-1 a dvou testovaných genů, mPGES-1 a ABCC4. V grafech jsou znázorněny celkem 3 kontroly sebrané v čase 0 (KO(0)), v čase 12 hod (KO(12)) a čase 24 hod (KO(24)) po nasazení aktinomycinu D.



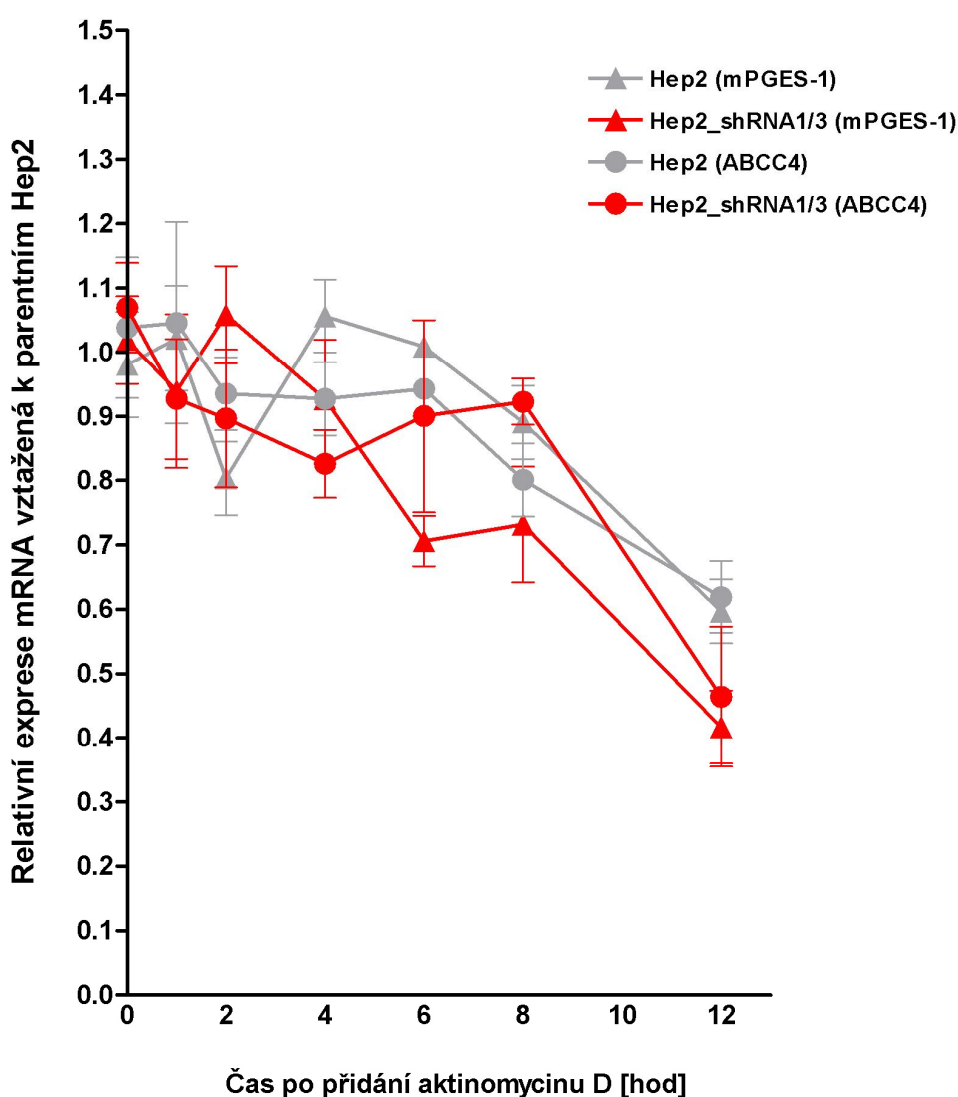
Obr.22: Absolutní kvantifikace exprese genů v parentní linii Hep2. Výsledky jsou prezentovány jako průměr hodnot ze tří nezávislých experimentů \pm SEM.



Obr.23: Absolutní kvantifikace exprese genů v linii Hep2_shRNA1/3. Výsledky jsou prezentovány jako průměr hodnot ze tří nezávislých experimentů \pm SEM.

Z grafů je zřetelné, že se výraznější degradace mRNA všech měřených genů začala projevovat 8 hodin po nasazení aktinomycinu D. K degradaci docházelo rychleji u linie se sníženou expresí COX-1, což by odpovídalo její zvýšené citlivosti (rychlejšímu úhynu) k danému antibiotiku. Důležitý byl fakt, že ke zvýšené degradaci došlo u všech genů stejnoměrně, včetně „housekeepingových“ genů.

V grafu na obr.24 je vyjádřena relativní kvantifikace mRNA genů mPGES-1 a ABCC4 v parentní buněčné linii Hep2 a linii se sníženou expresí COX-1 (Hep2_shRNA1/3).



Obr.24: Relativní kvantifikace exprese genů v čase po zastavení transkripce pomocí aktinomycinu. Výsledky jsou prezentovány jako průměr hodnot ze tří nezávislých experimentů \pm SEM. Porovnání statistické významnosti rozdílů mezi výsledky získanými v parentních Hep2 a linii Hep2_shRNA1/3 bylo provedeno pomocí párového t-testu.

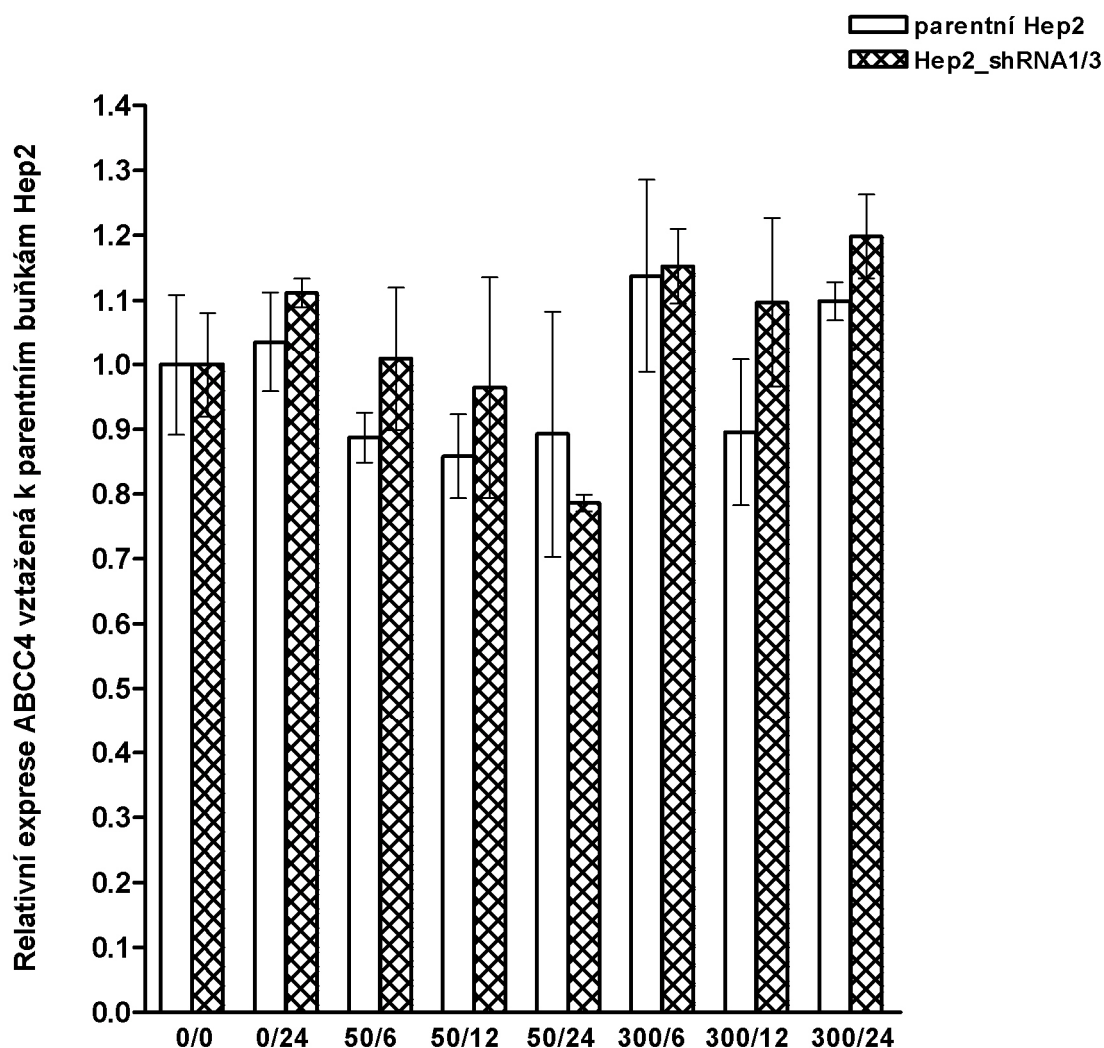
Expres je vztažena ke dvěma „housekeepingovým“ genům a průměru 3 kontrol (buněk pěstovaných v kultivačním médiu bez aktinomycinu) sebraných na izolaci RNA ve třech různých časech. V grafu je jako první hodnota vyjádřena kontrola v čase 0.

Z grafu vyplývá, že křivky vyjadřující degradaci mRNA obou genů v parentní linii a linii Hep2_shRNA1/3 vykazují shodný trend s mírně zvýšenou rychlostí degradace u linie Hep2_shRNA1/3, která odpovídá zvýšenému úhynu těchto buněk po aplikaci aktinomycinu D.

Výše uvedené experimenty ukazují, že ke změně hladiny mRNA genů mPGES-1 a ABCC4 po trvalém snížení COX-1 nedochází změnou stability jejich mRNA. Daným mechanismem bude tedy s vysokou pravděpodobností změna míry exprese jejich mRNA.

6.2.3. Test vlivu exogenního PGE₂ na expresi ABCC4

Výsledky testu vlivu exogenního PGE₂ na expresi ABCC4 jsou znázorněny na obr.25. Byly sledovány dvě koncentrace PGE₂ a buňky byly sbírány ve třech časových intervalech po přidání PGE₂. Nedošlo k žádným statisticky významným změnám exprese ABCC4 po přidání exogenního PGE₂.



Obr.25: Vliv exogenního PGE₂ na expresi genu ABCC4. Byly sledovány dvě koncentrace PGE₂; 50 nM (vzorky 50/6; 50/12 a 50/24) a 300 nM (vzorky 300/6; 300/12 a 300/24). Buňky byly sklizeny v časových intervalech po 6 (vzorky 50/6; 300/6), 12 (vzorky 50/12; 300/12) a 24 hodinách (vzorky 50/24; 300/24) po přidání PGE₂. Kontroly (buňky bez přidaného PGE₂) byly sbírány v čase přidání PGE₂ a 24 hodin po přidání PGE₂.

7. Diskuze

Cyklooxygenáza (COX) je z klinického hlediska velmi důležitým enzymem, neboť je cílem nesteroidních antiflogistik (NSA) (Vane 1971), léčiv pro snižování horečky, bolesti a zánětu. NSA jsou jednou z nejvíce předepisovaných lékových skupin v celosvětovém měřítku (Suchy and Reichel 2003). Hlavním problémem při dlouhodobém užívání těchto terapeutik je výskyt nežádoucích vedlejších účinků. Mezi nejzávažnější patří například vznik vředů v trávicím traktu v souvislosti s užíváním tzv. tradičních NSA (Graham et al. 1993) nebo výskyt kardiovaskulárních příhod při léčbě koxiby (Wright 2002). Původ těchto nepříznivých účinků není dosud dostatečně objasněn. K jeho většímu pochopení by mohlo napomoci právě bližší studium funkce enzymu COX.

COX existuje minimálně ve dvou základních izoformách, jednou z nich je cyklooxygenáza 1 (COX-1), druhou cyklooxygenáza 2 (COX-2) (Smith and Dewitt 1996). Je klíčovým enzymem v metabolismu arachidonové kyseliny (AA), kterou přeměňuje na nestabilní meziprodukt prostaglandin (PG) H₂. Ten je metabolizován dalšími enzymy za vzniku různých prostanoidů, látek uplatňujících se v řadě fyziologických a patofyziologických procesů.

Cílem této práce bylo studovat vztahy mezi jednotlivými geny přímo či vzdáleně souvisejícími s metabolismem AA. Pro dané experimenty byla vybrána lidská buněčná linie rakoviny cervixu (Hep2), ve které byla specificky snížena exprese COX pomocí mechanismu tzv. RNA interference (RNAi).

Byly testovány obě strategie využívající RNAi, tzn. jak přístup používající shRNA („short hairpin RNA“) sekvencí, tak přístup se syntetickými siRNA („small interfering RNA“). Pomocí siRNA se podařilo snížit expresi mRNA genu COX-1 až na ~24 % bazální exprese v parentní linii (Obr.20), což ovšem nedosahovalo výsledků získaných prostřednictvím shRNA. Nevýhodou použití siRNA je nemožnost dosáhnout výraznějšího snížení mRNA navazujícími procesy (např. rozklonováním již transfekované buněčné linie), jelikož efekt inhibice je pouze dočasný.

Jako efektivnější se tedy jevil přístup využívající shRNA sekvencí, který umožňuje získat buněčnou linii s trvale sníženou expresí genu. Jedna z shRNA navržených pro COX-1, nazvaná shRNA1, byla velmi účinná. Po transfekci buněk Hep2 zaklonovanou shRNA1 sekvencí a selekci antibiotikem došlo k inhibici exprese mRNA genu COX-1 na ~25,6 %

bazální exprese v parentních Hep2 (Obr.13). Vzniklá linie dostala název Hep2_shRNA1. Bylo získáno několik klonů této buněčné linie s významně sníženou expresí COX-1, z nichž nejvýraznějšího snížení bylo dosaženo u klonu Hep2_shRNA1/3 (na ~5,2 % bazální exprese v parentních Hep2) (Obr.15). Snížení exprese COX-1 bylo u vybraných klonů potvrzeno nejen na úrovni mRNA pomocí real-time PCR, ale i na úrovni proteinů pomocí Western blotu (Obr.16) a na úrovni funkční měření změny produkce PGE₂ pomocí metody ELISA (Obr.17).

Nečekané výsledky přinesly experimenty s shRNA navrženými pro COX-2. Po aplikaci těchto shRNA došlo v buňkách Hep2 místo očekávaného snížení ke zvýšení exprese tohoto genu. U pěti ze šesti testovaných sekvencí bylo zvýšení statisticky významné (Obr.14). Důvod tohoto jevu není zcela jasný. Jedním z možných vysvětlení by mohla být saturace exportinu 5, který se uplatňuje při přenosu molekul pre-miRNA (prekurzor mikroRNA) nebo shRNA z jádra do cytoplazmy (Yi et al. 2005). „Zahlcením“ exportinu 5 molekulami shRNA mohlo dojít k inhibici přirozeného odbourávání COX-2 pomocí miRNA (mikroRNA). V případě, že by dané shRNA byly méně účinné než přirozené miRNA, došlo by ke zvýšení hladiny mRNA genu COX-2 v buňce.

Pro další experimenty zaměřující se na studium vztahů mezi geny souvisejícími s metabolismem AA byly vybrány tři klony linie Hep2_shRNA1 se stabilně sníženou expresí COX-1 (Obr.15).

Jedním z úskalí využití shRNA sekvencí je případná indukce nespecifické imunitní odpovědi buňky (Bridge et al. 2003), která může ovlivnit průběh prováděných experimentů. V příslušných třech klonech linie Hep2_shRNA1 a kontrolních (nespecifické a „scrambled“) buněčných liniích byla provedena analýza exprese osmi vybraných genů uplatňujících se v procesu vnitřní imunitní odpovědi buňky (Tab.6). U žádného z těchto genů nedošlo ke statisticky významné změně exprese ve srovnání s parentní linií Hep2. Vyvolání imunitní odpovědi buňky nebylo tedy potvrzeno.

Expresa jednotlivých genů metabolismu AA je tkáňově specifická (Dubois et al. 1998; Smith, DeWitt, and Garavito 2000). Z tohoto důvodu byla nejprve v parentní linii Hep2 provedena analýza exprese vybraných genů. Jejich seznam se nachází v tab.6 v části „Geny uplatňující se v metabolismu arachidonové kyseliny a transportu prostanoidů“. Bazální exprese některých genů byla velmi nízká, proto se jí nepodařilo pomocí real-time PCR detekovat. Šlo o hematopoetickou prostaglandin D₂ syntázu (PGDS), cerebrální prostaglandin D₂ syntázu (PTGDS), prostaglandin I₂ syntázu (PTGIS) a arachidonát

5-lipoxygenázu (ALOX5). Velmi málo (Ct>32) byly v těchto buňkách exprimovány arachidonát 5-lipoxygenázu aktivující protein (ALOX5AP) a cytosolická prostaglandin E syntáza (cPGES neboli prostaglandin E syntáza 3; PTGES3). Exprese mRNA všech těchto genů se v klonech buněčné linie Hep2_shRNA1 významně neměnila ve srovnání s expresí v parentních Hep2.

Enzymy COX-1 a COX-2 jsou z hlediska sekvence aminokyselin shodné z 60-65 % (Chandrasekharan and Simmons 2004). Z důvodu otestování možnosti ovlivnění i druhé izoformy COX sekvencí shRNA1 byla v klonech linie Hep2_shRNA1 změřena i exprese COX-2. Ve srovnání s parentní linií Hep2 nebyla v měřených klonech nalezena žádná statisticky významná změna exprese mRNA genu COX-2 (Obr.21). Z toho vyplývá, že shRNA1 nemá na tuto izoformu vliv a je specifická pouze pro COX-1.

Zajímavé výsledky přineslo studium vztahů na úrovni mRNA mezi geny kódujícími COX-1 a prostaglandin E syntázy (PGES). Tyto enzymy se společně podílejí na syntéze PGE₂, nicméně dosud nebylo dostatečně objasněno funkční spojení terminálních PGES s izoformami COX a přínos jednotlivých izoform pro bazální nebo indukovanou syntézu PGE₂.

Mikrozomální prostaglandin E syntáza 1 (mPGES-1) je považována za inducibilní enzym přednostně se párující s COX-2 (Murakami et al. 2002; Samuelsson, Morgenstern, and Jakobsson 2007; Yang 2007). Po specifické inhibici COX-1 v buněčné linii Hep2 došlo k významnému snížení mRNA genu mPGES-1 (Obr.21), což ukazuje na možné spojení této izoformy s COX-1. Tento výsledek je v souladu s publikovaným spojením mPGES-1 a COX-1 v ledvinách (Schneider et al. 2004; Francois et al. 2007). Společné zapojení mPGES-1 a COX-1 do syntézy PGE₂ bylo nalezeno kromě ledvin i v mozku, žaludku, slezině (Boulet et al. 2004) a mléčné žláze myši (Chandrasekharan et al. 2005).

Exprese mRNA další izoformy PGES, mikrozomální prostaglandin E syntázy 2 (mPGES-2), se v klonech Hep2_shRNA1 výrazně neměnila ve srovnání s parentní linií Hep2 (Obr.21). Dle literatury je mPGES-2 konstitutivně exprimovaný enzym, který se může párovat s oběma izoformami COX, přičemž zatím není jasné, kterou z těchto izoform mPGES-2 preferuje (Murakami et al. 2002; Ivanov and Romanovsky 2004). O zapojení mPGES-2 do procesu horečky a zánětu dosud neexistuje mnoho informací. Výsledky získané v linii Hep2 pomocí specifického snížení COX-1 ukazují, že mPGES-2 by mohla být přednostně spojena s inducibilní COX-2. Pro potvrzení tohoto závěru by měla být provedena analýza exprese mRNA genu mPGES-2 také po specifické inhibici COX-2. Navíc, exprese

COX-1 nebyla v buňkách Hep2 inhibována úplně (Obr.15) a je možné, že pro statisticky významnou změnu exprese mPGES-2 by bylo potřeba snížit hladinu mRNA genu COX-1 na méně než ~5,2 %.

Uvádí se, že cPGES, stejně jako COX-1, je konstitutivně exprimovaná v celé řadě různých tkání (Murakami et al. 2002; Yang 2007). Navíc jsou oba tyto enzymy společně lokalizovány v cytoplazmě, což podporuje předpoklad, že cPGES a COX-1 jsou funkčně spojeny (Yang 2007). Han a kol. (Han and Smith 2002), v rozporu s touto představou, nicméně uvádí i možnost párování cPGES a COX-2 v buňkách exprimujících COX-2 konstitutivně. Analýza exprese mRNA v parentní linii Hep2 ukázala, že cPGES je v těchto buňkách exprimována velmi slabě ($Ct > 32$) a trvalé snížení exprese COX-1 expresi cPGES významně nezměnilo. Tyto výsledky naznačují, že cPGES není v buňkách Hep2 spojena s COX-1, ale pravděpodobně s COX-2, která je v těchto buňkách konstitutivně exprimována.

mPGES-1 byla jedinou ze všech tří izoform PGES, jejíž exprese se po inhibici COX-1 výrazně změnila. Proto snížení produkce PGE_2 potvrzené metodou ELISA (Obr.17) naznačuje, že mPGES-1 významně přispívá k bazální syntéze PGE_2 závislé na COX-1.

Dalším z genů, u kterého se výrazně změnila hladina mRNA po stabilním snížení COX-1, byl gen kódující tromboxan A syntázu 1 (TBXAS1). Expresse mRNA tohoto enzymu byla v měřených klonech linie Hep2_shRNA1 významně zvýšena (Obr.21). Expresse druhé izoformy cyklooxygenázy, COX-2, zůstala po inhibici COX-1 v buňkách Hep2 nezměněna (Obr.21), což mohlo napomoci k udržení dostatečné hladiny PGH_2 . Zároveň v linii Hep2_shRNA1 došlo k inhibici dráhy pro syntézu PGE_2 , která se projevila výrazným snížením mPGES-1 (Obr.21) a zejména PGE_2 jako finálního produktu (Obr.17). Z toho vyplývající menší spotřeba PGH_2 mohla způsobit akumulaci tohoto meziprojektu (Boulet et al. 2004). Nahromaděný PGH_2 mohl být poté metabolizován dalšími enzymy metabolismu AA, např. TBXAS1. Je tedy možné, že zvýšená exprese TBXAS1 byla reakcí na akumulaci PGH_2 v důsledku významného snížení exprese mPGES-1.

Tento výsledek také ukazuje na možný vztah mezi snížením exprese COX a vznikem nepříznivých kardiovaskulárních účinků při užívání NSA.

Kromě genů kódujících enzymy souvisejícími s metabolismem AA přímo byl také sledován gen ABCC4 ("ATP-binding cassette, sub-family C, member 4"). Produkt tohoto genu, transportér MRP4 („Multidrug resistance protein“), je kromě jiných substrátů přenašečem i některých cytostatik (Leggas et al. 2004; Tian et al. 2005) a antivirotik (Chen,

Lee, and Kruh 2001; Adachi et al. 2002; Sampath et al. 2002). V této práci byl ABCC4/MRP4 studován v souvislosti s metabolismem COX zejména pro své zapojení do přenosu prostanoidů (Reid et al. 2003; Rius et al. 2005; Lin et al. 2008) a svůj klinický význam při kombinovaném využití NSA a cytostatik při léčbě rakoviny (viz níže).

Jak je zřejmé z grafu na obr.21, exprese mRNA genu ABCC4 byla v buněčné linii Hep2_shRNA1 významně zvýšena ve srovnání s neovlivněnou parentní linií Hep2. Tento výsledek naznačuje, že regulace genu ABCC4 na úrovni mRNA je zřejmě úzce spojena s metabolismem COX. Dále tento nálezn podporuje tvrzení, že ABCC4/MRP4 hraje roli v transportu prostanoidů.

Zvýšení exprese ABCC4/MRP4 po inhibici COX může mít velký klinický význam. Svoji stěžejní roli zde hrají NSA, léčiva, jejichž hlavním mechanismem účinku je právě inhibice tohoto enzymu (kapitola 3.3.1.3.). Snaha zapojit NSA do léčby rakoviny je založena na četných studiích ukazujících, že NSA sami o sobě mohou inhibovat růst rakovinných buněk, redukovat angiogenezi a zvyšovat citlivost rakovinných buněk k apoptóze vyvolané ozářením (Raju et al. 2002; Kim et al. 2004; Nakata et al. 2004).

Existuje také mnoho studií, které se zabývají využitím NSA v kombinaci s chemoterapeutiky, případně radioterapií, ke zefektivnění léčby různých typů rakoviny, včetně karcinomu děložního čípku. Výsledky těchto studií nejsou vůbec jednoznačné. Byly například provedeny dvě klinické studie hodnotící účinek celecoxibu v kombinaci s ozařováním a cytostatiky, a to cisplatinou (Herrera et al. 2007) nebo cisplatinou s 5-fluorouracilem (Gaffney et al. 2007), při léčbě pokročilého stadia rakoviny děložního čípku. Navzdory očekávání byly výsledky zklamáním. Obě studie odhalily, že celecoxib zvyšuje toxicitu léčby s absencí jakéhokoliv většího klinického prospěchu. Klinické studie provedené u kolorektální rakoviny také neprokázaly žádný prospěch z kombinování celecoxibu se standardní chemoterapií (Maiello et al. 2006; El-Rayes et al. 2008). Někteří autoři dokonce publikovali, že přidání celecoxibu k určitým chemoterapeutikům při léčbě rakoviny tlustého střeva zhoršovalo odpověď na léčbu (Andre et al. 2007). Negativní vliv celecoxibu kombinovaného s 5-fluorouracilem byl popsán také *in vitro* u buněčné linie kolorektální rakoviny (Lim et al. 2007). Klinické studie kombinující NSA se standardní chemoterapií při léčbě rakoviny plic ukazují rozporuplné výsledky (Altorki et al. 2003; Krysan et al. 2006; Lilenbaum et al. 2006).

Na základě těchto výsledků se dá předpokládat existence určitých farmakokinetických interakcí mezi některými NSA a určitými cytostatiky. Jedním z možných mechanismů může být zvýšení exprese transportéru přenášející dané cytostatikum z buňky. V případě MRP4 jde

například o cytostatika irinotekan (Norris et al. 2005) a topotekan (Leggas et al. 2004). Některými studii bylo již potvrzeno, že zvýšení exprese ABCC4/MRP4 je způsobeno ze skupiny NSA například celecoxibem. Gradilone a kol. studovali indukci ABCC4/MRP4 způsobenou celecoxibem v buněčné linii rakoviny plic (Gradilone et al. 2007) a rakoviny tlustého střeva (Gradilone et al. 2008). V obou studiích způsoboval celecoxib zvýšení exprese ABCC4/MRP4. Přesný mechanismus indukce ABCC4 celecoxibem není úplně známý. Celecoxib, obzvláště ve vyšších koncentracích ovlivňuje kromě COX-2 a velmi slabě COX-1 také jiné geny a může způsobovat inhibici buněčného cyklu a apoptózu (Bock et al. 2007). Výsledky experimentů s shRNA1 v buňkách Hep2 podporují teorii, že zvýšení ABCC4 pomocí NSA je způsobeno specifickou inhibicí COX.

Výsledný efekt chemoterapie kombinované s NSA může být ovlivněn mnoha faktory. Kromě již výše diskutovaného ovlivnění exprese transportérů zvyšující přenos cytostatik z buňky může mít vliv typ použitého NSA (různé NSA mohou inhibovat ABCC4 různou měrou (Reid et al. 2003)) nebo míra exprese COX-2 v nádorové tkáni (Edelman et al. 2008). Nicméně, z klinického hlediska je velmi důležité sledovat zvýšenou expresi ABCC4 způsobenou NSA a vyhnout se tak kombinování NSA zvyšujícího expresi transportéru s cytostatikem, které je substrátem daného přenašeče.

Ke změně hladiny mRNA může dojít více mechanismy. Jedním z nich je samotná změna míry exprese mRNA a dalším je změna stability mRNA. Za účelem bližšího prostudování mechanismu, kterým došlo ke změně hladiny mRNA genů mPGES-1 a ABCC4 po dlouhotrvající inhibici COX-1, byl proveden test změny stability mRNA těchto dvou genů v parentní linii Hep2 a linii Hep2_shRNA1/3. Nebyla zjištěna žádná statisticky významná změna ve stabilitě mRNA v Hep2_shRNA1/3 ve srovnání s parentními Hep2 (Obr.24). Změna hladiny mRNA těchto dvou genů nebyla tedy způsobena změnou její stability a daný regulační mechanismus pravděpodobně probíhá na transkripční úrovni.

Byl studován vliv PGE₂, jako jednoho ze substrátů MRP4, na expresi mRNA genu ABCC4. Byla sledována změna exprese ABCC4 v různých časových intervalech po přidání exogenního PGE₂ do kultivačního média u parentní linie Hep2 a linie Hep2_shRNA1/3. Analýza pomocí real-time PCR ukázala, že ke statisticky významné změně exprese mRNA genu ABCC4 nedošlo ani v jedné z testovaných buněčných linií (Obr.25). Tyto výsledky ukazují, že exprese mRNA genu ABCC4 není ovlivněna svým substrátem PGE₂, což je dalším důkazem že regulace mezi ABCC4 a COX-1 by měla probíhat na úrovni transkripce.

8. Souhrn

Tato práce byla zaměřena na studium vztahů mezi COX a dalšími geny souvisejícími s metabolismem AA pomocí RNA interference. Výsledky lze shrnout do následujících bodů:

1. Pro přípravu modelové buněčné linie byly navrženy 4 sekvence shRNA specifické pro COX-1 a 6 sekvencí shRNA pro COX-2, které byly zaklonovány do expresních vektorů. Tyto vektory byly transfekovány do buněčné linie rakoviny cervixu (Hep2) a selektovány pomocí blasticidinu. Z shRNA specifických pro COX-1 byla identifikována jedna vysoce účinná sekvence (shRNA1; snížení na ~25,6 % bazální exprese COX-1 v parentních buňkách Hep2). Sekvence specifické pro COX-2 překvapivě zvyšovaly expresi tohoto genu. Tento jev může být vysvětlen saturací exportinu 5, která způsobila inhibici přirozeného odbourávání COX-2 pomocí miRNA.

2. Pro snížení exprese COX-1 bylo využito také syntetických siRNA, pomocí nichž se podařilo snížit expresi mRNA tohoto enzymu na ~24 % bazální exprese mRNA v parentních buňkách Hep2. Vzhledem k tomu, že při použití tohoto přístupu je snížení exprese genu pouze dočasné a není možné dosáhnout výraznějšího snížení navazujícími postupy, například rozklonováním dané linie, jevil se pro další účely přístup využívající shRNA jako výhodnější.

3. Z linie transfekované zaklonovanou shRNA1 sekvencí bylo metodou rozklonování připraveno několik klonů s výrazně a stabilně sníženou COX-1. Inhibice exprese COX-1 v těchto klonech byla potvrzena na úrovni mRNA pomocí real-time PCR (snížení až na ~5,2 % bazální exprese v parentních buňkách), na úrovni proteinů pomocí Western blotu a na úrovni funkční pomocí metody ELISA.

4. Vybrané klony byly použity pro analýzu vztahů mezi COX a dalšími geny souvisejícími s metabolismem AA, pro které byly navrženy a optimalizovány systémy primerů a sond pro real-time PCR. Byla sledována změna hladiny mRNA těchto genů v závislosti na inhibici COX-1. Byly získány tyto nejvýznamnější výsledky:

- a) Po trvalé inhibici COX-1 došlo k významné změně hladiny mRNA (snížení) u jedné ze tří izoform enzymu PGES, mPGES-1, a zároveň ke snížení produkce PGE₂. mPGES-1 je považována za inducibilní enzym spolupracující s COX-2, bylo ale publikováno i její

spojení s COX-1. Výsledky v buněčné linii Hep2 přináší další důkazy, že se mPGES-1 může párovat s izoformou COX-1 a být zapojená do bazální produkce PGE₂. U dalších izoform, cPGES a mPGES-2, nebylo na úrovni transkripce prokázáno spojení s COX-1. Tyto enzymy se tedy pravděpodobně párují v linii Hep2 s izoformou COX-2, nicméně pro potvrzení tohoto závěru by bylo potřeba provést analýzu exprese těchto genů také po specifickém snížení COX-2.

- b) Po trvalé inhibici exprese COX-1 došlo k významnému zvýšení hladiny mRNA genu ABCC4 kódujícího transportér MRP4. Tento výsledek poskytuje další důkaz, že MRP4 je zapojen do přenosu prostanoidů. Jelikož je tento transportér zároveň přenašečem i některých cytostatik, může mít tento nález velký klinický význam při léčbě rakoviny při kombinovaném využití chemoterapie s NSA (léků inhibujících COX). Další výzkum zaměřený na studium vlivu jednotlivých NSA na expresi ABCC4/MRP4 a s tím související studium substrátové specifity MRP4 k cytostatikům může velmi napomoci k eliminaci použití nevhodné kombinace NSA/cytostatikum.
- c) Po snížení exprese COX-1 došlo k významnému zvýšení hladiny mRNA genu TBXAS1, z čehož vyplývá, že TBXAS1 může být spojena s COX-1.
- d) Byl blíže studován mechanismus změny hladiny mRNA genů mPGES-1 a ABCC4 po stabilní inhibici COX-1. Bylo zjištěno, že snížení mRNA genu COX-1 nemá významný vliv na stabilitu mRNA těchto dvou genů. Tento výsledek naznačuje, že mPGES-1 a ABCC4 mají s COX-1 společné regulační mechanismy na úrovni transkripce.
- e) Byl testován vliv PGE₂ na expresi genu ABCC4. Bylo zjištěno, že PGE₂ neovlivňuje hladinu mRNA genu ABCC4, což je dalším důkazem, že regulace ABCC4 ve vztahu ke COX-1 pravděpodobně probíhá na úrovni transkripce.

Navazující studie by bylo vhodné zaměřit na:

1. Studium vztahů mezi COX-2 a vybranými geny souvisejícími s metabolismem AA, zejména PGES a ABCC4.
2. Studium změn exprese genů metabolismu AA a ABCC4 po aplikaci NSA a porovnání těchto výsledků s výsledky získanými po specifickém snížení exprese COX.
3. Studium vlivu jednotlivých NSA na expresi ABCC4/MRP4, případně dalších transportérů (např. ABCC5/MRP5).

9. Summary

This study investigated the relationship between COX and chosen AA metabolism-related genes by means of RNA interference. The results are summarized below.

1. In order to prepare a model cell line, four shRNAs against COX-1 and six shRNAs against COX-2 were designed and cloned into expression vectors. The vectors were transfected into Hep2 (cervix carcinoma) cell line and selected with blasticidine. From the set of COX-1-specific shRNA sequences, shRNA1 was a highly effective one (suppressing COX-1 mRNA to ~25.6 % of the basal expression in parent cells). Surprisingly, all COX-2-specific shRNAs enhanced COX-2 mRNA expression. This could be explained by the saturation of exportin 5 that inhibited a natural COX-2 mRNA degradation by miRNA.

2. In addition, synthetic siRNAs were used to inhibit COX-1 mRNA and the down-regulation of ~24 % compared to the basal expression in parent cells was reached. However, siRNA-mediated mRNA suppression is just transient and for that reason it is not possible to reach more significant inhibition by additional procedures, e.g. cell cloning method. Therefore, the strategy using shRNAs was more suitable for further experiments.

3. A few clones with significantly and stable down-regulated COX-1 were prepared by the cell cloning method using the shRNA1-transfected cell line. The COX-1 inhibition was confirmed by real-time PCR on the mRNA level (suppression to ~5.2 % of the basal expression in parent cells), by Western blot on the protein level and by PGE₂-ELISA on the functional level.

4. The sets of primers and probes were designed and optimized for selected genes involved in AA metabolism and the influence of COX-1 inhibition on individual gene expression has been evaluated in chosen COX-1-suppressed clones. The most important findings are summarized below.

- a) After the permanent COX-1 inhibition, mPGES-1 was the only isoform from the three PGESs in which mRNA level was significantly changed (down-regulated). Simultaneously, PGE₂ synthesis was suppressed. mPGES-1 is believed to be an inducible

enzyme preferentially coupled with COX-2, less often with COX-1. The results obtained in Hep2 cell line brought further evidence that mPGES-1 could pair with COX-1 and be involved in basal PGE₂ synthesis. mPGES-2 and cPGES exhibited no transcriptional dependence on COX-1 which indicates that these PGES isoforms may be preferentially coupled with the inducible COX-2 in Hep2 cells. However, this assumption should be further confirmed by mPGES-2 mRNA expression analysis after a specific COX-2 suppression.

- b) After the long-term COX-1 suppression, ABCC4 (encoding MRP4 transporter) was significantly up-regulated. This result supports the suggestion that MRP4 has a role in prostanoid transport. Because MRP4 can also mediate the transport of some cytotoxic drugs, this finding could be clinically very important for the combined use of cytostatics and NSAIDs (COX inhibiting drugs) in cancer therapy. Further investigation examining MRP4 substrate specificity to cytostatics and also the influence of individual NSAIDs on ABCC4/MRP4 expression could be helpful for elimination of the use of inappropriate drug (NSAID/cytostatic) combination.
- c) After the permanent COX-1 inhibition, TBXAS1 mRNA was significantly enhanced. This result indicates that TBXAS1 could be co-regulated with COX-1 at the mRNA level.
- d) The mechanism of the change of mPGES-1 and ABCC4 mRNA levels after COX-1 suppression was specified. It was revealed that COX-1 mRNA inhibition has no influence on mPGES-1 and ABCC4 mRNA stability. These results indicate that mPGES-1 and ABCC4 could share some of the transcriptional regulatory mechanisms with COX-1.
- e) The influence of PGE₂ on ABCC4 gene expression was evaluated. It was found that PGE₂ alone does not affect ABCC4 mRNA level, which is further evidence that the ABCC4 regulation in relation to COX-1 takes place at the transcriptional level.

The following studies could be aimed at:

1. Analysis of the relationship between COX-2 and chosen downstream genes, especially PGESs and ABCC4.
2. Analysis of the influence of NSAIDs on AA metabolism-related genes expression. The comparison of these results with results get after specific COX inhibition.
3. Analysis of the influence of NSAIDs on the expression of ABCC4/MRP4, eventually other transporters (e.g. ABCC5/MRP5).

10. Literatura

- Adachi, M., J. Sampath, L. B. Lan, D. Sun, P. Hargrove, R. Flatley, A. Tatum, M. Z. Edwards, M. Wezeman, L. Matherly, R. Drake, and J. Schuetz. 2002. Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing. *J Biol Chem* **277**:38998-39004.
- Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**:499-511.
- Altorki, N. K., R. S. Keresztes, J. L. Port, D. M. Libby, R. J. Korst, D. B. Flieder, C. A. Ferrara, D. F. Yankelevitz, K. Subbaramaiah, M. W. Pasmantier, and A. J. Dannenberg. 2003. Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **21**:2645-2650.
- Andre, T., C. Tournigand, L. Mineur, R. Fellague-Chebra, M. Flesch, M. Mabro, M. Hebbar, S. Postel Vinay, F. C. Bidard, C. Louvet, and A. de Gramont. 2007. Phase II study of an optimized 5-fluorouracil-oxaliplatin strategy (OPTIMOX2) with celecoxib in metastatic colorectal cancer: a GERCOR study. *Ann Oncol* **18**:77-81.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**:281-297.
- Bartlett, D. W., and M. E. Davis. 2006. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res* **34**:322-333.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**:363-366.
- Bertrand, J. R., M. Pottier, A. Vekris, P. Opolon, A. Maksimenko, and C. Malvy. 2002. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **296**:1000-1004.
- Bock, J. M., S. G. Menon, L. L. Sinclair, N. S. Bedford, P. C. Goswami, F. E. Domann, and D. K. Trask. 2007. Celecoxib toxicity is cell cycle phase specific. *Cancer Res* **67**:3801-3808.
- Borgeat, P., M. Hamberg, and B. Samuelsson. 1976. Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases. *J Biol Chem* **251**:7816-7820.
- Botting, R. 2000. Paracetamol-inhibitable COX-2. *J Physiol Pharmacol* **51**:609-618.
- Boulet, L., M. Ouellet, K. P. Bateman, D. Ethier, M. D. Percival, D. Riendeau, J. A. Mancini, and N. Methot. 2004. Deletion of microsomal prostaglandin E2 (PGE2) synthase-1 reduces inducible and basal PGE2 production and alters the gastric prostanoid profile. *J Biol Chem* **279**:23229-23237.
- Bridge, A. J., S. Pebernard, A. Ducraux, A. L. Nicoulaz, and R. Iggo. 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* **34**:263-264.
- Castelli, M. G., C. Chiabrando, R. Fanelli, L. Martelli, G. Butti, P. Gaetani, and P. Paoletti. 1989. Prostaglandin and thromboxane synthesis by human intracranial tumors. *Cancer Res* **49**:1505-1508.
- Degousee, N., D. Angoulvant, S. Fazel, E. Stefanski, S. Saha, K. Iliescu, T. F. Lindsay, J. E. Fish, P. A. Marsden, R. K. Li, L. P. Audoly, P. J. Jakobsson, and B. B. Rubin. 2006. c-Jun N-terminal kinase-mediated stabilization of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 mRNA regulates delayed microsomal prostaglandin E2 synthase-1 expression and prostaglandin E2 biosynthesis by cardiomyocytes. *J Biol Chem* **281**:16443-16452.

- Denkert, C., A. Furstenberg, P. T. Daniel, I. Koch, M. Kobel, W. Weichert, A. Siegert, and S. Hauptmann. 2003. Induction of G0/G1 cell cycle arrest in ovarian carcinoma cells by the anti-inflammatory drug NS-398, but not by COX-2-specific RNA interference. *Oncogene* **22**:8653-8661.
- Dorsett, Y., and T. Tuschl. 2004. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **3**:318-329.
- Dubois, R. N., S. B. Abramson, L. Crofford, R. A. Gupta, L. S. Simon, L. B. Van De Putte, and P. E. Lipsky. 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J* **12**:1063-1073.
- Dykxhoorn, D. M., D. Palliser, and J. Lieberman. 2006. The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene Ther* **13**:541-552.
- Edelman, M. J., D. Watson, X. Wang, C. Morrison, R. A. Kratzke, S. Jewell, L. Hodgson, A. M. Mauer, A. Gajra, G. A. Masters, M. Bedor, E. E. Vokes, and M. J. Green. 2008. Eicosanoid modulation in advanced lung cancer: cyclooxygenase-2 expression is a positive predictive factor for celecoxib + chemotherapy--Cancer and Leukemia Group B Trial 30203. *J Clin Oncol* **26**:848-855.
- Eguchi, N., T. Minami, N. Shirafuji, Y. Kanaoka, T. Tanaka, A. Nagata, N. Yoshida, Y. Urade, S. Ito, and O. Hayaishi. 1999. Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:726-730.
- El-Rayes, B. F., M. M. Zalupski, S. G. Manza, B. Rusin, A. M. Ferris, U. Vaishampayan, L. K. Heilbrun, R. Venkatramanamoorthy, A. F. Shields, and P. A. Philip. 2008. Phase-II study of dose attenuated schedule of irinotecan, capecitabine, and celecoxib in advanced colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **61**:283-289.
- El-Sheikh, A. A., J. J. van den Heuvel, J. B. Koenderink, and F. G. Russel. 2007. Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-mediated methotrexate transport. *J Pharmacol Exp Ther* **320**:229-235.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494-498.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel, and T. Tuschl. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**:188-200.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806-811.
- Folco, G., and R. C. Murphy. 2006. Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses. *Pharmacol Rev* **58**:375-388.
- Francois, H., C. Facemire, A. Kumar, L. Audoly, B. Koller, and T. Coffman. 2007. Role of microsomal prostaglandin E synthase 1 in the kidney. *J Am Soc Nephrol* **18**:1466-1475.
- Gaffney, D. K., K. Winter, A. P. Dicker, B. Miller, P. J. Eifel, J. Ryu, V. Avizonis, M. Fromm, and K. Greven. 2007. A Phase II study of acute toxicity for Celebrex (celecoxib) and chemoradiation in patients with locally advanced cervical cancer: primary endpoint analysis of RTOG 0128. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **67**:104-109.
- Gasparini, G., R. Longo, R. Sarmiento, and A. Morabito. 2003. Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents? *Lancet Oncol* **4**:605-615.
- Gong, H., C. M. Liu, D. P. Liu, and C. C. Liang. 2005. The role of small RNAs in human diseases: potential troublemaker and therapeutic tools. *Med Res Rev* **25**:361-381.

- Gradilone, A., F. M. Pulcinelli, L. V. Lotti, S. Martino, T. Mattiello, L. Frati, A. M. Agliano, and P. Gazzaniga. 2007. Celecoxib induces MRP-4 in lung cancer cells: therapeutic implications. *J Clin Oncol* **25**:4318-4320; author reply 4320.
- Gradilone, A., F. M. Pulcinelli, L. V. Lotti, E. Trifiro, S. Martino, O. Gandini, W. Gianni, L. Frati, A. M. Agliano, and P. Gazzaniga. 2008. Celecoxib upregulates multidrug resistance proteins in colon cancer: lack of synergy with standard chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets* **8**:414-420.
- Graham, D. Y., R. H. White, L. W. Moreland, T. T. Schubert, R. Katz, R. Jaszewski, E. Tindall, G. Triadafilopoulos, S. C. Stromatt, and L. S. Teoh. 1993. Duodenal and gastric ulcer prevention with misoprostol in arthritis patients taking NSAIDs. Misoprostol Study Group. *Ann Intern Med* **119**:257-262.
- Gupta, S., M. Srivastava, N. Ahmad, D. G. Bostwick, and H. Mukhtar. 2000. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* **42**:73-78.
- Hamasaki, Y., J. Kitzler, R. Hardman, P. Nettesheim, and T. E. Eling. 1993. Phorbol ester and epidermal growth factor enhance the expression of two inducible prostaglandin H synthase genes in rat tracheal epithelial cells. *Arch Biochem Biophys* **304**:226-234.
- Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach, and G. J. Hannon. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**:293-296.
- Han, R., and T. J. Smith. 2002. Cytoplasmic prostaglandin E2 synthase is dominantly expressed in cultured KAT-50 thyrocytes, cells that express constitutive prostaglandin-endoperoxide H synthase-2. Basis for low prostaglandin E2 production. *J Biol Chem* **277**:36897-36903.
- Herrera, F. G., P. Chan, C. Doll, M. Milosevic, A. Oza, A. Syed, M. Pintilie, W. Levin, L. Manchul, and A. Fyles. 2007. A prospective phase I-II trial of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib in patients with carcinoma of the cervix with biomarker assessment of the tumor microenvironment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **67**:97-103.
- Hersh, E. V., E. T. Lally, and P. A. Moore. 2005. Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? *Curr Med Res Opin* **21**:1217-1226.
- Honda, K., H. Yanai, A. Takaoka, and T. Taniguchi. 2005. Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int Immunol* **17**:1367-1378.
- Horton, J. K., A. S. Williams, Z. Smith-Phillips, R. C. Martin, and G. O'Beirne. 1999. Intracellular measurement of prostaglandin E2: effect of anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity and prostanoid expression. *Anal Biochem* **271**:18-28.
- Hutvagner, G., and P. D. Zamore. 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**:2056-2060.
- Hwang, D., D. Scollard, J. Byrne, and E. Levine. 1998. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **90**:455-460.
- Chandrasekharan, N. V., H. Dai, K. L. Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton, and D. L. Simmons. 2002. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13926-13931.
- Chandrasekharan, N. V., and D. L. Simmons. 2004. The cyclooxygenases. *Genome Biol* **5**:241.
- Chandrasekharan, S., N. A. Foley, L. Jania, P. Clark, L. P. Audoly, and B. H. Koller. 2005. Coupling of COX-1 to mPGES1 for prostaglandin E2 biosynthesis in the murine mammary gland. *J Lipid Res* **46**:2636-2648.
- Chen, D., Y. Huang, and K. Zhou. 2004. [Structure, localization and characterization of lipocalin-type prostaglandin D synthase]. *Zhonghua Nan Ke Xue* **10**:134-138.

- Chen, Z. S., K. Lee, and G. D. Kruh. 2001. Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem* **276**:33747-33754.
- Chen, Z. S., K. Lee, S. Walther, R. B. Raftogianis, M. Kuwano, H. Zeng, and G. D. Kruh. 2002. Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res* **62**:3144-3150.
- Ivanov, A. I., and A. A. Romanovsky. 2004. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci* **9**:1977-1993.
- Kanaoka, Y., and Y. Urade. 2003. Hematopoietic prostaglandin D synthase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **69**:163-167.
- Kearney, P. M., C. Baigent, J. Godwin, H. Halls, J. R. Emberson, and C. Patrono. 2006. Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *Bmj* **332**:1302-1308.
- Khan, K. N., S. K. Paulson, K. M. Verburg, J. B. Lefkowitz, and T. J. Maziasz. 2002. Pharmacology of cyclooxygenase-2 inhibition in the kidney. *Kidney Int* **61**:1210-1219.
- Kim, S. H., S. H. Song, S. G. Kim, K. S. Chun, S. Y. Lim, H. K. Na, J. W. Kim, Y. J. Surh, Y. J. Bang, and Y. S. Song. 2004. Celecoxib induces apoptosis in cervical cancer cells independent of cyclooxygenase using NF-kappaB as a possible target. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**:551-560.
- Kirschenbaum, A., A. P. Klausner, R. Lee, P. Unger, S. Yao, X. H. Liu, and A. C. Levine. 2000. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human prostate. *Urology* **56**:671-676.
- Kis, B., J. A. Snipes, and D. W. Busija. 2005. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther* **315**:1-7.
- Kool, M., M. de Haas, G. L. Scheffer, R. J. Scheper, M. J. van Eijk, J. A. Juijn, F. Baas, and P. Borst. 1997. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* **57**:3537-3547.
- Kool, M., M. van der Linden, M. de Haas, G. L. Scheffer, J. M. de Vree, A. J. Smith, G. Jansen, G. J. Peters, N. Ponne, R. J. Scheper, R. P. Elferink, F. Baas, and P. Borst. 1999. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:6914-6919.
- Kroetz, D. L., and D. C. Zeldin. 2002. Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* **13**:273-283.
- Krysan, K., K. L. Reckamp, S. Sharma, and S. M. Dubinett. 2006. The potential and rationale for COX-2 inhibitors in lung cancer. *Anticancer Agents Med Chem* **6**:209-220.
- Kwong, M. F. 2004. Have Cox2 inhibitors lived up to expectations? *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18 Suppl**:13-16.
- Lai, L., and T. M. Tan. 2002. Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)-mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues. *Biochem J* **361**:497-503.
- Lee, K., A. J. Klein-Szanto, and G. D. Kruh. 2000. Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. *J Natl Cancer Inst* **92**:1934-1940.
- Leggas, M., M. Adachi, G. L. Scheffer, D. Sun, P. Wielinga, G. Du, K. E. Mercer, Y. Zhuang, J. C. Panetta, B. Johnston, R. J. Scheper, C. F. Stewart, and J. D. Schuetz. 2004. MRP4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. *Mol Cell Biol* **24**:7612-7621.

- Lilenbaum, R., M. A. Socinski, N. K. Altorki, L. L. Hart, R. S. Keresztes, S. Hariharan, M. E. Morrison, R. Fayyad, and P. Bonomi. 2006. Randomized phase II trial of docetaxel/irinotecan and gemcitabine/irinotecan with or without celecoxib in the second-line treatment of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **24**:4825-4832.
- Lim, Y. J., J. C. Rhee, Y. M. Bae, and W. J. Chun. 2007. Celecoxib attenuates 5-fluorouracil-induced apoptosis in HCT-15 and HT-29 human colon cancer cells. *World J Gastroenterol* **13**:1947-1952.
- Lin, Z. P., Y. L. Zhu, D. R. Johnson, K. P. Rice, T. Nottoli, B. C. Hains, J. McGrath, S. G. Waxman, and A. C. Sartorelli. 2008. Disruption of cAMP and prostaglandin E2 transport by multidrug resistance protein 4 deficiency alters cAMP-mediated signaling and nociceptive response. *Mol Pharmacol* **73**:243-251.
- Lincová, D., H. Farghalli a kol. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 1. vyd. Nakladatel: Galén, 2002. 601 s. ISBN 80-7262-168-8.
- Maekawa, M., K. Sugano, H. Sano, S. Miyazaki, M. Ushiyama, S. Fujita, T. Gotoda, T. Yokota, H. Ohkura, T. Kakizoe, and T. Sekiya. 1998. Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. *Jpn J Clin Oncol* **28**:421-426.
- Maiello, E., F. Giuliani, V. Gebbia, N. Di Renzo, G. Pezzella, S. Romito, R. Mallamaci, M. Lopez, and G. Colucci. 2006. FOLFIRI with or without celecoxib in advanced colorectal cancer: a randomized phase II study of the Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM). *Ann Oncol* **17 Suppl 7**:vii55-59.
- Maier, T. J., K. Schilling, R. Schmidt, G. Geisslinger, and S. Grosch. 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* **67**:1469-1478.
- Murakami, M., K. Nakashima, D. Kamei, S. Masuda, Y. Ishikawa, T. Ishii, Y. Ohmiya, K. Watanabe, and I. Kudo. 2003. Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem* **278**:37937-37947.
- Murakami, M., Y. Nakatani, T. Tanioka, and I. Kudo. 2002. Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:383-399.
- Nakata, E., K. A. Mason, N. Hunter, A. Husain, U. Raju, Z. Liao, K. K. Ang, and L. Milas. 2004. Potentiation of tumor response to radiation or chemoradiation by selective cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**:369-375.
- Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**:279-289.
- Needleman, P., S. Moncada, S. Bunting, J. R. Vane, M. Hamberg, and B. Samuelsson. 1976. Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A2 from prostaglandin endoperoxides. *Nature* **261**:558-560.
- Norris, M. D., J. Smith, K. Tanabe, P. Tobin, C. Flemming, G. L. Scheffer, P. Wielinga, S. L. Cohn, W. B. London, G. M. Marshall, J. D. Allen, and M. Haber. 2005. Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro. *Mol Cancer Ther* **4**:547-553.
- Nykanen, A., B. Haley, and P. D. Zamore. 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* **107**:309-321.
- Ogletree, M. L. 1987. Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A2. *Fed Proc* **46**:133-138.
- Oshima, M., J. E. Dinchuk, S. L. Kargman, H. Oshima, B. Hancock, E. Kwong, J. M. Trzaskos, J. F. Evans, and M. M. Taketo. 1996. Suppression of intestinal polyposis in

- Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* **87**:803-809.
- Persengiev, S. P., X. Zhu, and M. R. Green. 2004. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* **10**:12-18.
- Peters-Golden, M., and T. G. Brock. 2003. 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **69**:99-109.
- Pettipher, R., T. T. Hansel, and R. Armer. 2007. Antagonism of the prostaglandin D2 receptors DP1 and CRTH2 as an approach to treat allergic diseases. *Nat Rev Drug Discov* **6**:313-325.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:e45.
- Pillai, R. S. 2005. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* **11**:1753-1761.
- Pradono, P., R. Tazawa, M. Maemondo, M. Tanaka, K. Usui, Y. Saijo, K. Hagiwara, and T. Nukiwa. 2002. Gene transfer of thromboxane A(2) synthase and prostaglandin I(2) synthase antithetically altered tumor angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* **62**:63-66.
- Raju, U., E. Nakata, P. Yang, R. A. Newman, K. K. Ang, and L. Milas. 2002. In vitro enhancement of tumor cell radiosensitivity by a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme: mechanistic considerations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **54**:886-894.
- Rao, C. V., A. Rivenson, B. Simi, E. Zang, G. Kelloff, V. Steele, and B. S. Reddy. 1995. Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Cancer Res* **55**:1464-1472.
- Reddy, B. S., C. V. Rao, and K. Seibert. 1996. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. *Cancer Res* **56**:4566-4569.
- Reid, G., P. Wielinga, N. Zelcer, I. van der Heijden, A. Kuil, M. de Haas, J. Wijnholds, and P. Borst. 2003. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9244-9249.
- Rius, M., W. F. Thon, D. Keppler, and A. T. Nies. 2005. Prostanoid transport by multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) localized in tissues of the human urogenital tract. *J Urol* **174**:2409-2414.
- Romano, M., and J. Claria. 2003. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *Faseb J* **17**:1986-1995.
- Sales, K. J., A. A. Katz, B. Howard, R. P. Soeters, R. P. Millar, and H. N. Jabbour. 2002. Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1. *Cancer Res* **62**:424-432.
- Sampath, J., M. Adachi, S. Hatse, L. Naesens, J. Balzarini, R. M. Flatley, L. H. Matherly, and J. D. Schuetz. 2002. Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci* **4**:E14.
- Samuelsson, B., R. Morgenstern, and P. J. Jakobsson. 2007. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev* **59**:207-224.
- Sastre, M., T. Klockgether, and M. T. Heneka. 2006. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci* **24**:167-176.

- Seth, R. B., L. Sun, C. K. Ea, and Z. J. Chen. 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**:669-682.
- Seth, R. B., L. Sun, and Z. J. Chen. 2006. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res* **16**:141-147.
- Schneider, A., Y. Zhang, M. Zhang, W. J. Lu, R. Rao, X. Fan, R. Redha, L. Davis, R. M. Breyer, R. Harris, Y. Guan, and M. D. Breyer. 2004. Membrane-associated PGE synthase-1 (mPGES-1) is coexpressed with both COX-1 and COX-2 in the kidney. *Kidney Int* **65**:1205-1213.
- Simmons, D. L., R. M. Botting, and T. Hla. 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* **56**:387-437.
- Simmons, D. L., R. M. Botting, P. M. Robertson, M. L. Madsen, and J. R. Vane. 1999. Induction of an acetaminophen-sensitive cyclooxygenase with reduced sensitivity to nonsteroid antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:3275-3280.
- Sledz, C. A., M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, and B. R. Williams. 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* **5**:834-839.
- Smith, W. L., and D. L. Dewitt. 1996. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* **62**:167-215.
- Smith, W. L., D. L. DeWitt, and R. M. Garavito. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **69**:145-182.
- Snipes, J. A., B. Kis, G. S. Shelness, J. A. Hewett, and D. W. Busija. 2005. Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative cyclooxygenase-3) in rat. *J Pharmacol Exp Ther* **313**:668-676.
- Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**:227-264.
- Steinbach, G., P. M. Lynch, R. K. Phillips, M. H. Wallace, E. Hawk, G. B. Gordon, N. Wakabayashi, B. Saunders, Y. Shen, T. Fujimura, L. K. Su, and B. Levin. 2000. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* **342**:1946-1952.
- Suchý, D., and M. Reichl. 2003. Moderní nesteroidní antirevmatika: klady a zápory. *Klin Farmakol Farm* **17**: 166-169.
- Štruncová, S., R. Borská, B. Kusenda, P. Mejstřík, D. Dvořáková, J. Mayer, and Š. Pospíšilová. 2005. RNA interference - účinný nástroj regulace genové exprese. *Biologické listy* **70(3)**: 231-247.
- Tegeder, I., J. Pfeilschifter, and G. Geisslinger. 2001. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *Faseb J* **15**:2057-2072.
- Tian, Q., J. Zhang, T. M. Tan, E. Chan, W. Duan, S. Y. Chan, U. A. Boelsterli, P. C. Ho, H. Yang, J. S. Bian, M. Huang, Y. Z. Zhu, W. Xiong, X. Li, and S. Zhou. 2005. Human multidrug resistance associated protein 4 confers resistance to camptothecins. *Pharm Res* **22**:1837-1853.
- Urade, Y., and O. Hayaishi. 1999. Prostaglandin D2 and sleep regulation. *Biochim Biophys Acta* **1436**:606-615.
- van der Krol, A. R., L. A. Mur, M. Beld, J. N. Mol, and A. R. Stuitje. 1990. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**:291-299.
- Vane, J. R. 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* **231**:232-235.
- Wang, L. H., and R. J. Kulmacz. 2002. Thromboxane synthase: structure and function of protein and gene. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:409-422.

- Warner, T. D., and J. A. Mitchell. 2004. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *Faseb J* **18**:790-804.
- Warner, T. D., and J. A. Mitchell. 2002. Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13371-13373.
- Warner, T. D., and J. A. Mitchell. 2003. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibiting prostanoid efflux: as easy as ABC? *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9108-9110.
- Williams, C. S., C. Luongo, A. Radhika, T. Zhang, L. W. Lamps, L. B. Nanney, R. D. Beauchamp, and R. N. DuBois. 1996. Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas. *Gastroenterology* **111**:1134-1140.
- Wright, J. M. 2002. The double-edged sword of COX-2 selective NSAIDs. *CMAJ* **167**:1131-1137.
- Xie, W. L., J. G. Chipman, D. L. Robertson, R. L. Erikson, and D. L. Simmons. 1991. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:2692-2696.
- Yang, T. 2007. Microsomal prostaglandin E synthase-1 and blood pressure regulation. *Kidney Int* **72**:274-278.
- Yi, R., B. P. Doehle, Y. Qin, I. G. Macara, and B. R. Cullen. 2005. Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA* **11**:220-226.
- Yiu, S. M., P. W. Wong, T. W. Lam, Y. C. Mui, H. F. Kung, M. Lin, and Y. T. Cheung. 2005. Filtering of ineffective siRNAs and improved siRNA design tool. *Bioinformatics* **21**:144-151.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**:730-737.
- Zamore, P. D., T. Tuschl, P. A. Sharp, and D. P. Bartel. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**:25-33.
- Zeng, H., G. Liu, P. A. Rea, and G. D. Kruh. 2000. Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer Res* **60**:4779-4784.
- Zhou, S. F., L. L. Wang, Y. M. Di, C. C. Xue, W. Duan, C. G. Li, and Y. Li. 2008. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr Med Chem* **15**:1981-2039.

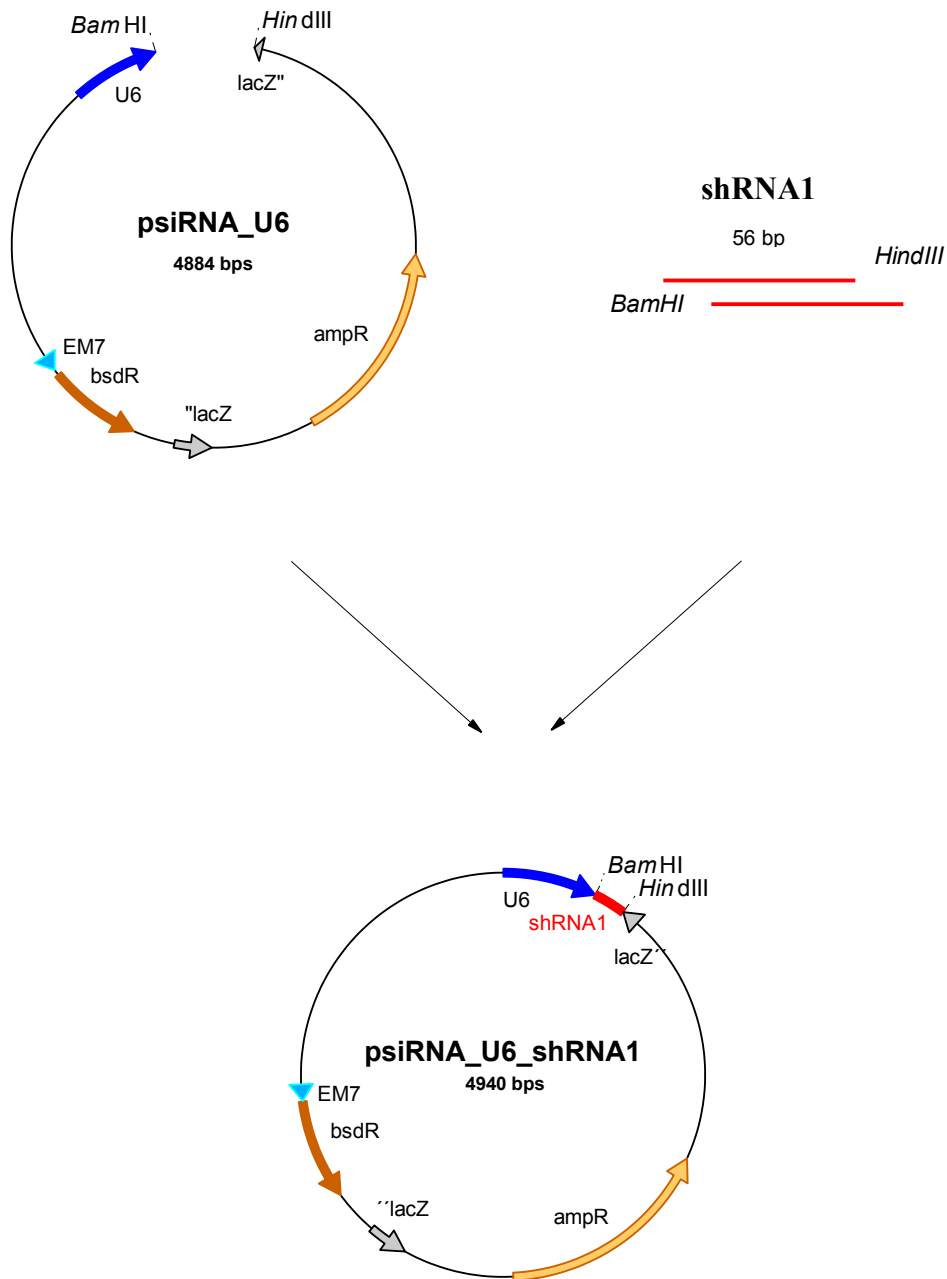
11. Přílohy

Schéma zaklonování shRNA1 do plazmidu psiRNA_U6

Curriculum vitae

Publikace a prezentace

Schéma zaklonování shRNA1 do plazmidu psiRNA U6



Zkratky: *ampR* = gen pro rezistenci k ampicilinu; *bsdR* = gen pro rezistenci k blasticidinu; *EM7* = bakteriální promotor; *lacZ* = gen kódující beta-galaktosidázu.

Curriculum Vitae

Mgr. Hana Radilová

Narozena 21.5. 1977 v Pardubicích, Česká republika

Vzdělání:

- 1995-1996 Univerzita Pardubice, Chemicko-technologická fakulta
obor: Klinická biologie a chemie
- 1996-2001 Masarykova univerzita v Brně, PřF, obor: Molekulární biologie a
genetika
- 2001 Ukončení studia na PřF MU v Brně, získání titulu Magistra
- od 2001 Postgraduální studium na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy
v Hradci Králové, Katedra biochemických věd, obor Patobiochemie a
xenobiochemie

Praxe:

- 1999-2001 Laboratoř molekulární cytogenetiky, Oddělení lékařské genetiky,
Fakultní nemocnice, Černopolní, 662 63 Brno,
předdiplomová praxe a diplomová práce zaměřená na aplikaci techniky
FISH a molekulárně genetických metod při diagnostice pacientů
s Prader-Williho/Angelmanovým syndromem
- od 2001 Molekulárně-biologická laboratoř firmy GENERI BIOTECH s.r.o.

Pedagogická činnost:

- 2003 –2005 Výuka Molekulární genetiky, FafUK
- 2006 Vydání skript k výuce Molekulární genetiky:
HOLASOVÁ, Šárka, RADILOVÁ, Hana, BUNČEK, Martin. *Praktická
cvičení z molekulární genetiky*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 2006. 47 s.
ISBN 80-246-1072-8.

Granty:

- 2003 Řešitelka grantu FRVŠ č. 2982: TFO jako genová terapeutika: testování vazebné specifity v buněčné kultuře
- Spoluřešitelka grantu FRVŠ č. 2974: Testování vstupu modifikovaných oligonukleotidů do buněk
- 2004 Řešitelka grantu FRVŠ č. 954: Využití retrovirového systému pro získání stabilních buněčných linií
- Spoluřešitelka grantu FRVŠ č. 946: Zavedení praktické výuky v předmětu Molekulární genetik
- 2005-2008 Spoluřešitelka grantu MZ ČR č. 1A8696-4/2005: In-vitro studie molekulárně-genetických příčin buněčné rezistence vůči vybraným léčivům
- 2006-2008 Spoluřešitelka grantu MO ČR č. 0601 5 9120 S: Multiplexní systém molekulární detekce vysoce nebezpečných mikroorganismů použitelný v poli
- od 2006 Spoluřešitelka grantu MZ ČR č. NR8760-4/2006: Cyklooxygenázy: down-regulace a ovlivnění genové exprese
- od 2006 Spoluřešitelka grantu AV ČR č. KAN401770651: Molekulární nanosystémy a nanosoučástky: elektrické transportní vlastnosti

Patenty:

- č. 295 463: Univerzální buněčný systém pro testování vazebných schopností triplex tvořících oligonukleotidů (přijatý Úřadem průmyslového vlastnictví dne 17.8.2005)

Publikace a prezentace

Publikace:

- Radilova, H., A. Libra, S. Holasova, M. Safarova, A. Viskova, F. Kunc, and M. Buncek. 2009. COX-1 is coupled with mPGES-1 and ABCC4 in human cervix cancer cells. *Mol Cell Biochem* (accepted).
- Vondracek, J., P. Krcmar, J. Prochazkova, L. Trilecova, M. Gavelova, L. Skalova, B. Szotakova, M. Buncek, H. Radilova, A. Kozubik, and M. Machala. 2009. The role of aryl hydrocarbon receptor in regulation of enzymes involved in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a model of rat liver progenitor cells. *Chem Biol Interact* **180**:226-237.
- Ceckova, M., Z. Vackova, H. Radilova, A. Libra, M. Buncek, and F. Staud. 2008. Effect of ABCG2 on cytotoxicity of platinum drugs: interference of EGFP. *Toxicol In Vitro* **22**:1846-1852.
- Jiroutova, A., R. Slavkovsky, M. Cermakova, L. Majdiakova, I. Hanovcova, R. Bolehovska, M. Hajzlerova, H. Radilova, E. Ruzsova, and J. Kanta. 2007. Expression of mRNAs related to connective tissue metabolism in rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Exp Toxicol Pathol* **58**:263-273.
- HOLASOVÁ, Šárka, RADILOVÁ, Hana, BUNČEK, Martin. *Praktická cvičení z molekulární genetiky*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 2006. 47 s. ISBN 80-246-1072-8.
- Buncek, M., V. Backovska, S. Holasova, H. Radilova, M. Safarova, F. Kunc, and R. Haluza. 2006. Unusual chromatographic behavior of oligonucleotide sequence isomers on two different anion exchange HPLC columns. *Anal Biochem* **348**:300-306.
- Buněk M., Bačkovská V., Holasová Š., Radilová H., Šafářová M., Kunc F., Haluza R.: Retention behavior of oligonucleotide samples on glycidyl methacrylate based DEAE modified stationary phase, *Chromatographia*, <http://dx.doi.org/10.1365/s10337-005-0620-x>, 2005.
- Holasova, S., M. Mojzisek, M. Buncek, D. Vokurkova, H. Radilova, M. Safarova, M. Cervinka, and R. Haluza. 2005. Cholesterol conjugated oligonucleotide and LNA: a comparison of cellular and nuclear uptake by Hep2 cells enhanced by streptolysin-O. *Mol Cell Biochem* **276**:61-69.

Prezentace:

- Kuglík P., Radilová H., Gaillyová R.: Molekulárně-cytogenetická diagnostika Prader-Willi/Angelmanova syndromu, I. Teyschlův pediatrický den, 12.2.2000. Přednáška
- Gaillyová R., Kuglík P., Radilová H.: Molekulárně cytogenetická diagnostika Prader-Willi/Angelmanova syndromu. Abstrakt přednášky přednesené na Kongresu MEFA „Pokroky v lékařství a farmacii“ 7.-10.11. 2000 v Brně. Sborník abstrakt, 2000 (číslo VZ neuvedeno)
- Radilová, H. (2003) Využití TFO v genové terapii: testování vazebných schopností TFO v buněčné kultuře. Konference PGS, Faf UK Hradec Králové, 3.4.2003. Přednáška
- Radilová, H., Mikolajská, Š., Bunčec, M. (2003) Zkušenosti s využitím luciferázy při přípravě modelového systému pro testování TFO. Konference O buňkách a lidech, GeneTica, Praha, 9.10.2003. Přednáška
- Mikolajská, Š., Radilová, H., Bunčec, M. (2003) Zkušenosti a využití GFP a retrovirového systému. Konference O buňkách a lidech, GeneTica, Praha, 9.10.2003. Přednáška
- Hana Radilová, Šárka Mikolajská and Martin Bunčec (2004) Gene Therapy: The Use of the Retroviral Gene Transfer Technology for the Development of TFO Binding Affinity Testing System. XIX. Biochemický sjezd, Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii a Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu pri SAV, Olomouc, 31.8.-3.9. 2004. Book of abstracts 129
- Šárka Mikolajská, Hana Radilová and Martin Bunčec (2004) Cell system for gene therapy using EGFP-NLS Fusion Protein Expression: Testing of Oligonucleotide Nuclear Uptake. XIX. Biochemický sjezd, Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii a Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu pri SAV, Olomouc, 31.8.-3.9. 2004. Book of abstracts 111
- Radilová Hana, Mikolajská Š, Bunčec M (2004) Antigene strategy in gene therapy: the use of retroviral gene transfer technology in development of the TFO binding affinity testing system. 3. Celostátní konference o genové a buněčné terapii, Praha, 2.12. 2004. Přednáška
- Mikolajská Šárka, Mojžíšek M, Bunčec M, Radilová H, Šafářová M (2004) Cell system for gene therapy: testing of oligonucleotide nuclear uptake. 3. Celostátní konference o genové a buněčné terapii, Praha, 2.12. 2004. Přednáška
- Š. Holasová, M. Šafářová, H. Radilová, A. Libra and M. Bunčec (2005) Cyclooxygenase 1 shRNA silencing and monitoring of RNAi side effect. Konference: Sondy (nejen) v reálném čase & SSCP jinak, Generi Biotech, Praha, 7.11.2005. Poster
- Bunčec M., Radilová H., Holasová Š., Šafářová M., Libra A.: Cyclooxygenase 1 shRNA silencing and monitoring of RNAi side effect; RNA Club, Praha, 21.9.2006. Přednáška s abstraktem ve sborníku

- H. Radilová: Trvalé snížení exprese PTGS1 pomocí shRNA; Konference: OLI²GO WITH BRAIN, Generi Biotech, Praha, 6.11.2006. Přednáška
- H. Radilová: Snížení exprese lidské cyklooxygenasy 1 pomocí RNA interference prostřednictvím shRNA; Startovací seminář klastru Nanomedic, Litomyšl, 25.-26.10.2007. Přednáška
- H. Radilová: Exprese genů metabolismu arachidonové kyseliny po snížení exprese COX1 pomocí RNAi; odborný seminář „Vývoj přípravků pro genovou terapii“, Nanomedic, Jablonné nad Orlicí, 9.4.2008. Přednáška
- H. Radilová: RNA interference: snížení exprese cyklooxygenázy vs. nespecifická odpověď; I. výroční setkání řešitelů projektů klastru Nanomedic, Nanomedic, Špindlerův mlýn, 12.-13.6.2008. Přednáška
- H. Radilová: Účinnost syntetických siRNA při snižování genové exprese - naše zkušenosti; seminář klastru Nanomedic „Vývoj nosičů pro cílenou distribuci léčiv, biodistribuce hyaluronanu, genová terapie“, Nanomedic, Choceň, 14.11.2008. Přednáška
- H. Radilová: Studium exprese a stability mRNA genů metabolismu arachidonové kyseliny; odborný seminář „Nosiče na bázi biopolymerů a jejich derivátů, biodistribuce hyaluronanu, genová terapie, vývoj rekombinantních proteinů“, Nanomedic, Jablonné nad Orlicí, 13.5.2009. Přednáška

Zahraniční prezentace:

- Kuglík P., Gaillyová R., Radilová H.: A molecular cytogenetic and clinical study of patients with the Prader-Willi and Angelman syndromes. 10th International Congress of Human Genetics, Austria Center Vienna, Rakousko, 15.-19.5.2001. Abstrakt
- Táborská, S., Radilová, H., Bunček, M., Fiedler, Z. (2003) Gene therapy: the use of the luciferase reporter system for gene expression studies in human cells. Dresden Chemiluminescence Days, Dresden, May 14-17, 2003. Clin. Lab. 9+10/2003 (49): 551 and Book of abstracts
- Radilová, H., Bunček, M., Fiedler, Z. (2003) The use of the luciferase reporter system for gene expression studies in gene therapy. Xenobiochemické sympozium, Smolenice, Slovensko, 9.-11.6. 2003. Book of abstracts 170
- Radilová, H., Víšková, A., Kunc, F., Libra, A., Šafařová, M., Bunček, M. (2007) Cyclooxygenase-1 knockdown by shRNA in cell culture: a model system for gene expression studies. Xenobiochemické sympozium, Liptovský Ján, Slovensko, 22.5. – 24.5. 2007. Book of abstracts 73
- Zimčík, Miletín, Švec, Radilová: Cationic pyrazinoporphyrazines and quinoxalinoporphyrazines as water-soluble photosensitizers for PDT. In: Book of Abstracts, Fifth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines. Rusko, Society of Porphyrins & Phthalocyanines, 2008, s. 634-634. Granty: GP203/07/P445, KAN200100801.