

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Ing. Barbara Feriančíková

**Epigeneticky podmíněná chemorezistence nádorových buněk**

**Epigenetically based chemoresistance of cancer cells**

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Konzultant závěrečné práce: RNDr. Michaela Moserová, Ph.D.

Praha 2018

**PROHLÁŠENÍ:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele prof. MUDr. Tomáše Eckschlagera, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne.....

.....

Ing. Barbara Feriančíková

## **PODĚKOVÁNÍ:**

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Tomášovi Eckschlagerovi, CSc., za vedení diplomové práce, ochotu, vstřícnost a čas, který si na mě vždy našel a rád mi ho věnoval. Moje obrovské děkuji patří také MVDr. Janu Hrabětovi, PhD. za pomoc s plánováním experimentů, se sepisováním diplomové práce a podporu během výzkumu. V neposlední řadě bych ráda poděkovala kolektivu Laboratoře biologie solidních nádorů na Klinice dětské hematologie a onkologie ve FN Motol za velmi příjemné a přátelské pracovní prostředí.

Také bych na tomto místě ráda poděkovala své mamince za obrovskou podporu a důvěru během mého studia. Děkuji.

## **ABSTRAKT:**

Nádorová onemocnění jsou i přes významné pokroky v diagnostice a léčbě druhou nejčastější příčinou úmrtí v ekonomicky vyspělých státech. Hlavním důvodem selhání protinádorové terapie je rozvoj chemorezistence, která může být buď vnitřní, nebo získaná, a je primárně zprostředkována aktivací různých klíčových regulátorů (např. MDR, PI3K/Akt apod.). Na aktivaci těchto drah se podílejí genetické a epigenetické mechanismy. Mezi významné epigenetické mechanismy, které se mohou účastnit na vzniku chemorezistence, patří regulace genové exprese prostřednictvím mikroRNA (miRNA) a dlouhých nekódujících RNA (lncRNA). Deregulovaná exprese těchto nekódujících RNA byla pozorována v mnoha onemocněních a byl prokázán jejich podíl na vzniku a progresi zhoubných nádorů.

V práci jsme sledovali expresi dlouhé nekódující RNA MIAT v hypoxii (1% O<sub>2</sub>) u chemosenzitivních a chemorezistentních buněčných linií neuroblastomu (NBL), neboť hypoxie je významným negativním prognostickým faktorem řady nádorů a podílí se právě na chemorezistenci. Relativní exprese MIAT byla ovlivněna počtem kultivovaných buněk, kdy se zvyšovala její exprese s kultivací většího počtu buněk. Exprese MIAT byla také signifikantně zvýšena již po 6 h kultivace NBL linie UKF-NB-4 v hypoxických podmínkách a maxima dosahovala po 48 h s následným mírným snížením. Pro ozřejnění souvislosti MIAT a chemorezistence jsme stanovili její expresi na panelu NBL linií chemosenzitivních a chemorezistentních k cisplatině a některým dalším cytostatikům. Chemorezistenci použitých linií jsme si ověřili stanovením IC<sub>50</sub>. Prokázali jsme signifikantní zvýšení exprese MIAT u NBL linií rezistentních k cisplatině UKF-NB-4<sup>CDDP</sup> a SK-N-AS<sup>CDDP</sup>. U linií rezistentních k ellipticinu, doxorubicin a vinkristinu jsme prokázali signifikantní snížení exprese MIAT. Ověřili jsme vliv hypoxie a souvislost chemorezistence k cisplatině na indukci exprese MIAT, tyto souvislosti nebyly doposud popsány. Pro potvrzení významu lncRNA MIAT v adaptaci na hypoxické podmínky NBL a její význam v rezistenci k cisplatině je nutné provést další experimenty, zejména studie s knock-down MIAT.

(In Czech)

**Klíčová slova:** chemorezistence, lncRNA, hypoxie, neuroblastom

## **ABSTRACT:**

Cancer, despite significant advances in diagnosis and treatment, is the second most common cause of death in economically advanced countries. The main reason for the failure of anticancer therapy is the development of chemoresistance, which can be either internal or acquired, and is primarily mediated by the activation of various key regulators (eg MDR, PI3K/Akt, etc.). Genetic and epigenetic mechanisms are involved in activating these pathways. Significant epigenetic mechanisms that can participate in chemoresistance include regulation of gene expression by microRNA (miRNA) and long noncoding RNA (lncRNA). Deregulated expression of these non-coding RNAs has been observed in many diseases and their involvement in the initiation and progression of malignant tumors has been demonstrated.

In this study, we investigated the expression of long non-coding RNA MIAT in hypoxia (1% O<sub>2</sub>) in chemosensitive and chemoresistant neuroblastoma cell lines (NBL), as hypoxia is a significant negative prognostic factor of many tumors and is involved in chemoresistance. Relative expression of MIAT was influenced by the number of cultured cells, where expression was increased by culturing more cells. MIAT expression was also significantly increased after 6 hours of NBL culture UKF-NB-4 in hypoxic conditions, and maximum reached 48 h followed by a slight decrease. To elucidate the context of MIAT and chemoresistance, we determined its expression in the NBL cell line panel of chemosensitive cells and cells chemoresistant to cisplatin and some other cytostatics. The chemoresistance of the used lines was verified by IC<sub>50</sub> determination. We have demonstrated a significant increase in MIAT expression in the cisplatin-resistant NBL line UKF-NB-4<sup>CDDP</sup> and SK-N-AS<sup>CDDP</sup>. In the lines resistant to ellipticin, doxorubicin and vincristine, we have shown a significant decrease in MIAT expression. We verified the effect of hypoxia in the context of chemoresistance to cisplatin on induction of MIAT expression, these contexts have not been described so far. In order to confirm the importance of MIAT lncRNA in adapting to the hypoxic conditions of NBL and its impact in cisplatin resistance, further experiments, especially MIAT knock-down studies, are required.

Keywords: chemoresistance, lncRNA, hypoxia, neuroblastoma

# Obsah

1. Úvod .....	10
1.1. Nádorový proces .....	10
1.1.1. Karcinogeneze .....	11
1.1.2. Léčba nádorových onemocnění .....	12
1.1.3. Chemorezistence .....	14
1.1.4. Chemorezistence a epigenetika .....	16
1.2. Hypoxie .....	17
1.3. Epigenetické modifikace .....	19
1.3.1. Methylace DNA .....	19
1.3.2. Post-translační modifikace histonů .....	19
1.3.3. Nekódující RNA .....	21
1.4. Dlouhé nekódující RNA .....	23
1.4.1. Myocardial infarction-associated transcript .....	26
2. Cíl práce .....	28
3. Experimentální část .....	29
3.1. Materiál a chemikálie .....	29
3.2. Metody .....	29
3.2.1. Kultivace buněčných linií .....	29
3.2.2. Příprava kondiciovaného média .....	30
3.2.3. Příprava vzorků pro analýzu RT-qPCR .....	30
3.2.4. Izolace RNA z analyzovaných buněk neuroblastomových linií .....	31
3.2.5. Reverzní transkripce RNA .....	31
3.2.6. Kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (RT-qPCR) pro gen MIAT .....	32
3.2.7. Test cytotoxicity a stanovení IC <sub>50</sub> .....	33
4. Výsledky .....	34
4.1. Účinnost kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase .....	34
4.2. Expres MIAT v senzitivní neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 v hypoxii (1% O <sub>2</sub> ) při různém počtu kultivovaných buněk .....	35
4.3. Expres MIAT v senzitivní neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 při kultivaci v kondiciovaném médiu .....	37
4.4. Dynamika exprese MIAT v senzitivní neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 v hypoxii (1% O <sub>2</sub> ) .....	38
4.5. Stanovení IC <sub>50</sub> u buněčných linií UKF-NB-4, UKF-NB-4 <sup>CDDP</sup> , UKF-NB-3, UKF-NB-3 <sup>CDDP</sup> , SK-N-AS a SK-N-AS <sup>CDDP</sup> .....	40

4.6. Exprese MIAT v chemorezistentních neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4, UKF-NB-3 a SK-N-AS v normoxii .....	43
5. Diskuze .....	45
6. Závěr .....	48

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>A<sub>260</sub></b>	absorbance při 260 nm
<b>A<sub>280</sub></b>	absorbance při 280 nm
<b>ADP</b>	adenosin difosfát
<b>ATB</b>	antibiotikum
<b>ATP</b>	adenosin trifosfát
<b>Akt</b>	protein kinasa B
<b>BCL-2</b>	B-buněčný lymfom 2
<b>BCL-XL</b>	B-buněčný lymfom extra velký
<b>CBP</b>	"CREB-binding protein"
<b>CDDP</b>	cisplatina
<b>CLL</b>	chronická lymfocytární leukémie
<b>CpG</b>	cytosin před guanosem
<b>C<sub>t</sub></b>	threshold
<b>COLDAIR</b>	"cold assisted intronic noncoding RNA"
<b>Dot1</b>	"disruptor of telomeric silencing1"
<b>DOXO</b>	doxorubicin
<b>ELLI</b>	ellipticin
<b>EMT</b>	epiteliálně-mesenchymální transice
<b>FBS</b>	telecí sérum
<b>FLC</b>	"Flowering Locus C"
<b>HDAC</b>	histondeacetylasy
<b>HIF</b>	hypoxií indukované faktory
<b>HMT</b>	histonmethyltransferasy
<b>HSF1</b>	faktor tepelného šoku 1
<b>HRE</b>	hypoxické responzivní elementy
<b>HOTAIR</b>	"HOX antisense intergenic RNA"
<b>HULC</b>	"Highly Upregulated in Liver Cancer"
<b>IMDM</b>	kultivační medium "Iscove's Modified Dulbeccos Medium"
<b>JSNP</b>	databáze "Japanese Single Nucleotide Polymorphism"
<b>lincRNA</b>	dlouhé mezigenové RNA
<b>lncRNA</b>	dlouhé nekódující RNA
<b>MAPK</b>	"Mitogen-activated protein kinases"



<b>MDR</b>	"multidrug resistance protein"
<b>MIAT</b>	"Myocardial infarction-associated transcript"
<b>miRNA</b>	mikroRNA
<b>NBL</b>	neuroblastom
<b>Noxa</b>	"Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1" <i>PMAIP1 gen</i> , též známý jako Noxa (latinsky poškození)
<b>nt</b>	nukleotid
<b>OCT4</b>	"octamer-binding transcription factor 4"
<b>p300</b>	histon acetyltransferasa
<b>PAS</b>	Per-Arnt-Sim
<b>p.a.</b>	pro analýzu
<b>PBS</b>	sodno-fosfátový pufr s obsahem NaCl ("phosphate-buffered saline")
<b>PI3K</b>	"Phosphoinositide 3-kinase"
<b>Puma</b>	"p53 upregulated modulator of apoptosis"
<b>pVHL</b>	von Hippel-Lindau protein
<b>RCF</b>	relativní centrifugační síla ("relative centrifugal force")
<b>Ref-1</b>	"redox-factor 1"
<b>RISC</b>	"RNA-induced silencing complex"
<b>ROS</b>	aktivní formy kyslíku
<b>RT-qPCR</b>	kvantitativní polymerasová řetězová reakce s reverzní transkripcí ("real time reverse transcription polymerase chain reaction")
<b>SRA</b>	steroid receptor RNA activator
<b>SET</b>	"Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax"
<b>SNP</b>	"single nucleotide polymorphism"
<b>SRC-1</b>	"steroid receptor coactivator-1"
<b>SUMO</b>	"small ubiquitin-related modifier"
<b>Tif2</b>	"Transcriptional intermediary factor 2"
<b>TRBP</b>	"TAR RNA Binding Protein"
<b>VCR</b>	vinkristin
<b>xIAP/cIAP</b>	spojený inhibitor apoptózy proteínu/buněčného inhibitoru apoptózy

# 1. Úvod

V současnosti jsou nádorová onemocnění v ekonomicky vyspělých státech druhou nejčastější příčinou úmrtí a jejich incidence vzrůstá. Hlavními důvody růstu incidence nádorových onemocnění je zejména zvýšení onkogenní zátěže lidí, tzn. působení vnějších faktorů jako, polutanty životního prostředí, životní styl dnešní společnosti a prodloužení průměrné délky života (Slíva a Votava, 2010).

V České republice je každý rok diagnostikováno více než 77 000 pacientů se zhoubným nádorem. Je možné říci, že každému třetímu obyvateli České republiky je v průběhu života diagnostikováno nádorové onemocnění a každý čtvrtý na něj zemře. U mužů jsou nejčastějšími nádorovými nemocemi karcinom prostaty, tlustého střeva, konečníku a plic. U žen se nejčastěji vyskytují karcinomy prsu, plic, dělohy, tlustého střeva a konečníku. U těchto onemocnění ročně stoupá incidence o 2 až 4 % a prevalence o 5 až 7 % (Národní onkologický program [online], 2014).

V současné době je však možné pomocí metod protinádorové léčby, pacientům významně prodloužit život, zlepšit kvalitu života a v mnoha případech je i vyléčit. Nejvíce využívanými metodami jsou chirurgická léčba, chemoterapie, radioterapie a cílená (biologická) léčba, které se často kombinují (Klener, 2013).

## 1.1. Nádorový proces

Mnohastupňový proces, při kterém se kumulují mutace určitých genů a chromozomální aberace, vedoucí k narušení funkce a exprese jimi kódovaných proteinů se nazývá **karcinogeneze**. Nejčastěji se jedná o poruchu genů podílejících se na regulaci dělení, buněčné smrti, opravách DNA a na diferenciaci buňky. Mutace v kritických genech vedou k transformaci zdravé buňky v buňku nádorovou, což zpravidla vyústí ve vznik nádoru (Stratil et al., 2004). Geny, jejichž mutace vedou ke vzniku nádorového procesu, dělíme na dvě skupiny: **protoonkogeny** a **tumor supresorové geny** (antionkogeny). Protoonkogeny jsou geny kódující proteiny, které se zapojují do regulace diferenciaci a buněčného cyklu jako jsou např. růstové faktory, transkripční faktory a proteinkinasy. Většina proteinů kódovaných protoonkogeny podporuje růst a dediferenciaci buňek nebo inhibuje apoptózu. Tumor supresorové geny kódují proteiny, které naopak tlumí proliferaci normálních somatických buněk, indukují jejich diferenciaci nebo mají proapoptotické účinky (Stiborová a Mikšanová, 1999). Nádory vznikají z buněk, které jsou tělu vlastní, avšak rostou bez oh-

ledu na potřeby organismu a vyznačují se funkční a tvarovou odlišností (Hampl et al, 2007). Během karcinogeneze mohou vznikat dva typy nádorů - **benigní** nebo **maligní**. Benigní nádor roste zpravidla pomalu, netvoří metastázy a je ohraničený od normální tkáně. Maligní - zhoubný nádor často roste rychle, neohraničeně prorůstá do okolních tkání a metastazuje.

Na procesu karcinogeneze se podílejí různé faktory - **vnitřní** a **vnější**. Mezi vnější faktory se řadí faktory fyzikální např. UV záření, chemické např. polutanty životního prostředí, aflatoxin, biologické např. některé bakterie a hlavně viry. Mezi vnitřní faktory zase patří reaktivní formy kyslíku, či dusíku a zvláště genetické faktory (Loeb, 1989).

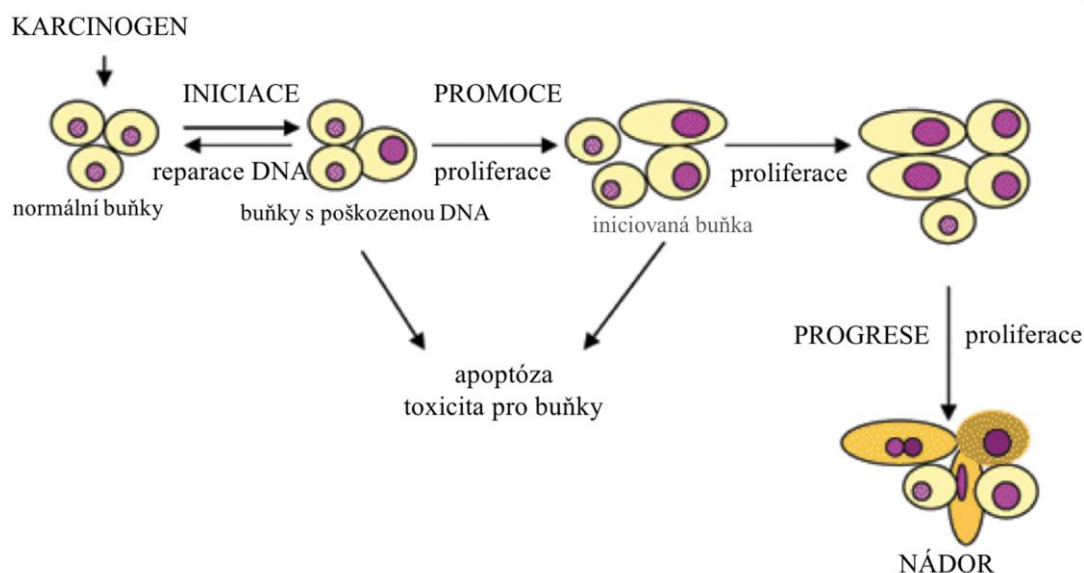
### 1.1.1. Karcinogeneze

Karcinogeneze je mnohastupňový proces transformace normální buňky v buňku nádorovou. Dělí se na tři fáze: **iniciace**, **promoce** a **progrese** (obrázek 1, str. 12).

**Iniciace** zahrnuje změnu nebo mutaci genů vznikajících spontánně - působením vnitřních faktorů nebo vyvolaných expozicí karcinogennímu vlivu. Častou modifikací DNA je vznik kovalentních aduktů s karcinogeny, vázajícími se na báze nebo deoxyribosu DNA. Také radiace může způsobovat modifikace DNA jako je tvorba pyrimidinových dimerů, apurinace a apyrimidinace. Mezi další modifikace DNA patří také tvorba hydroxyderivátů bází DNA, které se vytváří působením radikálových forem kyslíku nebo tvorba cyklických aduktů tvořených z bifunkčních genotoxických činidel. Poškození DNA může být opraveno reparačními mechanismy, nebo jsou takto poškozené buňky eliminovány imunitním systémem. Genetické změny mohou vést k dysregulaci biochemických cest souvisejících s buněčnou proliferací, přežíváním a diferenciací. Změna genetické informace zdravé buňky vede k aktivaci onkogenů a k deaktivaci tumor-supresorových genů a tím vzniká tzv. iniciovaná buňka, její fenotyp je podobný normálním buňkám. V této fázi mohou iniciované buňky zůstat latentní po dobu týdnů, měsíců nebo let, nebo mohou autonomně a klonálně růst. Pokud nedojde k opravě DNA, nebo zlikvidování poškozených buněk, může v další fázi vznikat zhoubný nádor.

**Promoční fáze** se považuje za poměrně dlouhý a reverzibilní proces, při kterém se akumulují aktivně proliferující preneoplastické buňky. Promoce je fáze mezi premaligní lézí a vývojem invazivního nádoru. Klíčovými faktory promoční fáze jsou aktivity protein-kinas a fosfatas a jejich regulace.

**Progrese** je konečná fáze neoplastické transformace, kdy dochází ke genetickým a fenotypovým změnám a nekontrolované proliferaci buněk. To zahrnuje rychlé zvýšení velikosti nádoru, kde buňky mohou podstoupit další mutace s invazivním a metastatickým potenciálem. Nádorové buňky se krevním nebo lymfatickým řečištěm mohou dostávat do různých tkání a orgánů a vznikají metastázy. Tento proces je již nevratný. Metastáza představuje šíření nádorových buněk z primárního místa do jiných částí těla krví nebo lymfatickým systémem, kde buňky mohou podstoupit další mutace, které dále zvyšují jejich invazivní a metastatický potenciál (Oliviera et al., 2007; Stiborová a Mikšanová, 1999; Stiborová, 2004).



**Obrázek 1:** Fáze karcinogeneze (upraveno podle Oliviera et. al, 2007).

### 1.1.2. Léčba nádorových onemocnění

Cílem léčby nádorových onemocnění je vyléčení, případně alespoň prodloužení a zlepšení kvality života nemocných. V současné době již lze vyléčit mnoho nádorových chorob, nebo dlouhodobě nemoc stabilizovat. V léčbě nádorových onemocnění se používá kombinace tří základních metod: **chirurgická léčba**, **radioterapie** a **chemoterapie** v poslední době se ještě možnosti rozšiřují o **léčbu cílenou** (biologickou) a **imunoterapii**. Chirurgická léčba je vhodná pouze u lokalizovaných nádorů, v jiném případě se kombinuje s jinými metodami. Radioterapie je léčba ionizujícím zářením. V některých případech

se může uplatňovat rovněž imunoterapie, která obnovuje funkci protinádorové imunity a napomáhá tak léčbě nádorového onemocnění. Cílená terapie, někdy ne zcela správně nazývaná biologická, je zaměřená proti struktuře, která je více či méně specifická pro nádorovou buňku. V posledních desetiletích je studována i genová terapie, tedy oprava genetického defektu nádorové buňky (Klener, 1996; 2011).

### ***1.1.2.1. Chemoterapie***

Chemoterapie je léčba nádorového onemocnění využívající chemické látky (cytostatika). **Cytostatika** jsou chemické látky, které zastavují růst a dělení a/nebo navozují smrt rychle proliferujících, zvláště nádorových buněk. Citlivost na cytostatika se však značně liší pro různá nádorová onemocnění, proto se pro dosažení optimálního výsledku většinou kombinuje s dalšími terapeutickými postupy (Hynie, 2001; 2011).

#### ***1.1.2.1.1. Vedlejší účinky chemoterapie***

Vedlejší účinky léčby cytostatiky jsou časté a mnohdy i velmi závažné. Nežádoucí účinky vyplývají z faktu, že cytostatika působí neselektivně a jejich antiproliferační účinek se projevuje nejen v nádorových, ale i v proliferujících zdravých buňkách. Proto působí zejména na buňky kostní dřeně, vlasové folikuly, vyvíjející se plod apod. Mezi vedlejší účinky projevující se bezprostředně po podání cytostatik patří nevolnost a zvracení, hyperurikémie způsobená rychlým rozpadem nádorových buněk vysoce citlivých k cytostatiku, záněty žil a poškození podkoží při paravazaci. Mezi oddálenější patří poškození krvetvorby způsobující leukopenii, anémii a trombocytopenii, hepatocelulární léze, průjem, po některých cytostaticích pak poškození ledvin, plic nebo srdečního svalu. Pozdní vedlejší účinky, které se projeví až po mnoha měsících či letech jsou sterilita a hypogonadismus, chronické postižení jater, plic a vznik sekundárních maligních nádorů. Kvůli těmto mnohým a závažným vedlejším účinkům cytostatik jsou při léčbě podávány i pomocné látky jako vitamíny, látky stimulující krvetvorbu, antiemetika apod. (Klener, 2011; Slíva a Votava, 2010).

#### ***1.1.2.1.2. Mechanismus účinku cytostatik***

Cytostatika působí na struktury buňky, které jsou esenciální pro dělení buňky a potřebné pro její přežití. Jsou to zejména DNA a mitotické vřeténko, výsledkem je tedy zastavení

růstu buňky nebo indukce programované buněčné smrti (apoptózy). Mechanismy účinku cytostatik jsou:

- a) **Poškození struktury a funkce nukleových kyselin** - štěpení DNA, inhibice topoisomerasy, alkylace a interkalace, které mají za následek zastavení nebo nesprávné čtení genetické informace.
- b) **Porucha syntézy DNA a RNA** - pomocí strukturních analogů metabolitů (antimetabolity) dochází k inhibici enzymů metabolismu DNA a RNA, nebo může dojít k jejich zabudování do vlákna DNA, či RNA.
- c) **Poškození mitotického vřeténka** - inhibice polymerace tubulinových podjednotek na mikrotubuly nebo naopak inhibice jejich depolymerace vedou k poškození mitózy.
- d) **Inhibice proteosyntézy**
- e) **Poškození buněčné membrány** (Klener 1996; 2011).

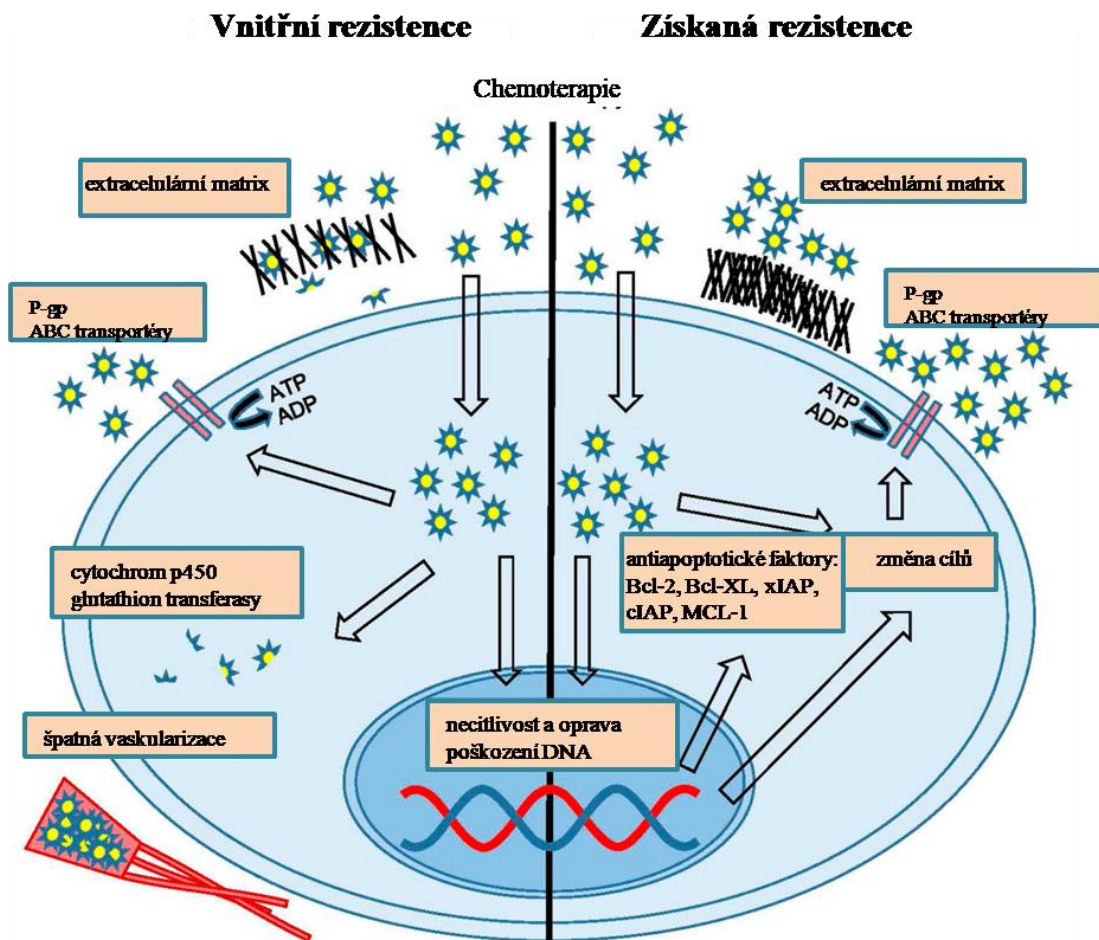
### 1.1.3. Chemorezistence

Rezistence k cytostatikům, kdy buňky vytváří obranné mechanismy umožňující odolávat cytostatikům, významně omezuje jejich účinnost a je jednou z hlavních příčin selhání protinádorové léčby. Způsobuje recidivu nádorových onemocnění, zabraňuje zlepšení klinických výsledků u pacientů s nádorovými chorobami a představuje hlavní překážku léčby nádorových onemocnění (Klener, 1996). Historicky první významné zprávy, které se setkaly se získanou rezistencí na léčbu, byly klinické studie v roce 1965 u dětských leukemií (Frei et al., 1965). Rezistenci k cytostatikům lze rozdělit na vnitřní (primární) a získanou (sekundární), ačkoli toto rozlišování může být někdy obtížné. Vnitřní rezistence je vrozená schopnost nádorových buněk tolerovat léčebné dávky cytostatik a je zodpovědná za selhání terapie v první fázi, kdy dané léčivo na takové buňky není schopno účinkovat. Ze znalostí o primární rezistenci a senzitivě k cytostatikům vychází léčebné protokoly pro jednotlivé nádory. Naopak sekundární rezistence se vyvíjí během terapie, buňky na terapii zpočátku reagují a rezistence se vyvíjí až v průběhu léčby nebo po jejím ukončení (Abdullah et al., 2013; Ling et al., 2005; Tapia et al., 2013).

Vnitřní schopnost buněk přežít chemoterapii může být zprostředkována několika odlišnými mechanismy. Efluxní pumpy (transportéry adenosin trifosfátové (ATP) vazebné kazety (ABC)) snižují koncentrace léku v buňkách (Gottesman et al., 2002; 2015). Terapeutická činidla mohou být biochemicky degradována detoxikačními enzymy jako je cy-

tochrom P450 a glutathion transferasa (Rodriguez-Antona, 2006; Sueyoshi, 2001). Špatná vaskularizace a extracelulární matrix (ECM) může vést ke snížení koncentrace léčiva v místě nádoru (Minchinton et al., 2006; Saggar et al., 2013). Dysregulace apoptózy může přispívat nejen k rozvoji nádoru, ale také může způsobit rezistenci vůči léčbě chemoterapeutiky či radiaci. Individuální schopnost oprav DNA také představuje primární, tedy geneticky danou, chemorezistenci. V průběhu chemoterapie může dojít k zefektivnění oprav DNA a tím se léčba stává neúčinnou (Longley et al., 2005). Dalším možným mechanismem chemorezistence může být změna cílové dráhy nebo cílové struktury pro cytostatikum. Tyto vnitřní mechanismy rezistence jsou rozhodující pro stanovení počáteční odpovědi na léčbu a mohou ovlivnit následné výsledky, které vedou k získané rezistenci (obrázek 2, str. 16).

Dosud se převážně předpokládá, že získaná rezistence se rozvíjí selekcí buněk nesoucích změny poskytující výhodu přežití (Lin et al., 2001). Ty mohou zahrnovat modulaci exprese genů s antiapoptotickými účinky (tj. X-spojený inhibitor proteinu apoptózy/buněčného inhibitoru proteinu apoptózy (xIAP / cIAP), B-buněčný lymfom 2 (BCL-2) (BCL-XL) a myeloidní buněčné leukémie 1 (MCL-1)), schopnost opravit poškozenou DNA a tolerovat genetické poškození (Patch et al., 2015; Yap et al., 2009). U buněk může také docházet ke změně cílů léčiva, která může být zprostředkována několika mechanismy (Groenendijk et al., 2014; Orr et al., 2003), nebo v případě některých cílených terapií aktivací alternativní cesty (Cree et al., 2017; Kavallaris et al., 1997). Mnohé nádory jsou charakterizovány značnou intratumorální heterogenitou. Inherentní genetická nestabilita, která vedla ke vzniku nádorových buněk, jim dává schopnost rychle reagovat na změny ve svém lokálním molekulárním mikroprostředí. To dává nádorům schopnost vícenásobné kombinace těchto adaptivních vnitřních a získaných mechanismů rezistence.



**Obrázek 2:** Vnitřní versus získaná rezistence. Mechanismy vnitřní a/nebo získané chemorezistence zahrnují extracelulární matrixové proteiny, P-glykoproteinové (P-gp) efluxní pumpy a transportéry ATP vazební kazety (ABC), cytochrom P450 a glutathion transferasa, špatná vaskularizace, necitlivost a oprava poškození DNA a zvýšenou regulaci antiapoptotických faktorů (upraveno podle Cornelison et al., 2017).

#### 1.1.4. Chemorezistence a epigenetika

S nárůstem cílených lékových terapií je stále více zřejmé, že genetické mutace jsou rozhodující součástí získané rezistence vůči protinádorovým lékům. Genetické změny však nejsou postačující k vysvětlení vzniku rychlé a reverzibilní lékové rezistence a epigenetický příspěvek k rezistenci naznačuje řada pozorování. Za prvé, častý výskyt rezistence vůči lékům napovídá, že se nemůže jednat pouze o mutační změny. Za druhé, reverzibilita získané rezistence byla popsána v *in vitro* experimentech, ale i u pacientů úspěšně léčených stejnými léky pro recidivu. Za třetí, značný počet rezistentních nádorů neobsahuje mutace v lékových cílech nebo aktivovaných drahách. Pro epigenetické základy rezistence k lékům



tak svědčí rychlá kinetika, reverzibilita získané rezistence vůči léku a absence genetických mutací (Wilting et al., 2012).

Navzdory předpokladu, že nádory vznikají klonální expanzí buněk, které získaly genetické změny výhodné pro proliferaci, přežití a metastazování (Hanahan a Weinberg, 2011), existuje velká variabilita malignity a rezistence jednotlivých buněk na léčivo (Gupta et al., 2011, Shipitsin et al., 2007). Základ pro tuto variabilitu lze nalézt v různých transkripčních stavech produkovaných stejným nádorovým genomem. Epigenetické mechanismy, prostřednictvím reverzibilních histonových modifikací a metylace DNA, vytvářejí různé transkripční stavy vedoucí k dynamické heterogenní populaci nádorových buněk (Chang et al., 2008). V důsledku toho podporují přežití v přítomnosti léčiva, např. aberantní transkripce transportérů léčiv, enzymů na opravu DNA a apoptotických faktorů. Cytostatika a cílená léčiva se tak stávají neúčinná (Brock et al., 2009; Gupta et al., 2011). Pokroky v mapování genomů nádorových buněk ukazují význam epigenetické regulace při vzniku a vývoji nádorových onemocnění, což může vést k získání dalších (epi)genetických modifikací vedoucích k rezistenci vůči lékům (Fraga et al., 2005, Seligson et al., 2005).

## 1.2. Hypoxie

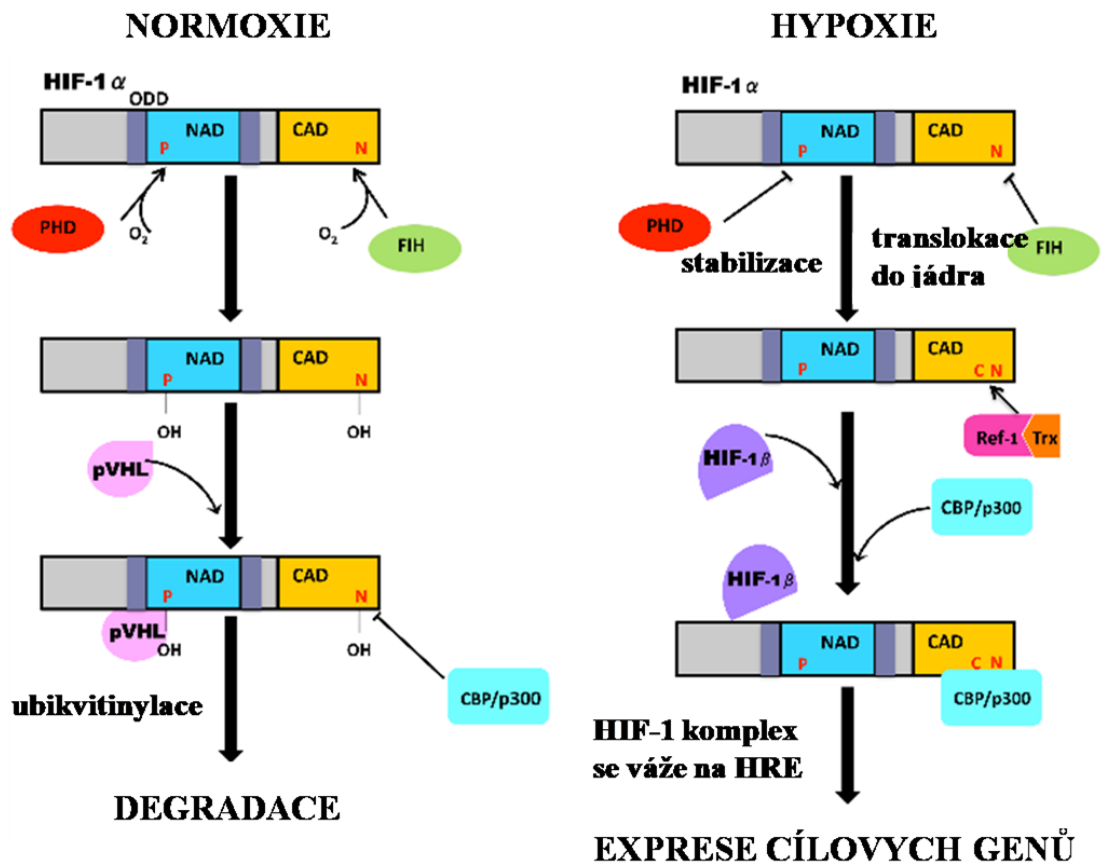
Hypoxie je patologický stav charakterizovaný snížením parciálního tlaku kyslíku pod fyziologickou hodnotu dané tkáně. U hypoxických nádorů jí způsobuje zejména vysoká proliferativní aktivita nádorových buněk a jejich nedostatečné zásobování krví (Lord et al., 1993). Přizpůsobení nádorových buněk hypoxickým podmínkám vyvolává změny jejich metabolismu. Tyto změny vedou ke zvýšené invazivitě, metastazování a rezistenci k chemoterapii a radioterapii, což může způsobit selhání léčby a zvýšení mortality (Déry et al., 2005; Noguera et al., 2009).

Odpovědí buňky na hypoxický stres je aktivace specifických transkripčních faktorů nazývaných hypoxií indukované faktory (HIF) (Azabal et al., 2012). HIF-1 je heterodimerní transkripční faktor sestávající z konstitutivně exprimované  $\beta$ -podjednotky a  $\alpha$ -podjednotky regulované kyslíkem. Oba proteiny HIF-1 $\alpha$  a HIF-1 $\beta$  obsahují základní motivy helix-loop-helix, které vážou DNA a obsahují také doménu Per-Arnt-Sim (PAS), která způsobí dimerizaci podjednotek (Chapman-Smith et al., 2004; Wang et al., 1995; Yang et al., 2005).

Přítomnost kyslíku za podmínek normoxie umožňuje aktivitu hydroxylas, které hydroxylují prolinové zbytky u HIF-1 $\alpha$  a HIF-2 $\alpha$  (Pro<sup>402</sup> a Pro<sup>564</sup> v lidském HIF-1 $\alpha$ ). Následně

se váže na von Hippel-Lindau tumor supresorový protein, který zprostředkovává ubikvitinylaci HIF-1 $\alpha$  a tím jej označuje pro 26S-proteasomální degradaci (Covello et al., 2004).

V hypoxii jsou enzymy hydroxylas v důsledku nízké hladiny O<sub>2</sub> inaktivovány, což má za následek stabilizaci podjednotky HIF-1 $\alpha$ , její dimerizaci s podjednotkou HIF-1 $\beta$  a translokaci do jádra. Takto vytvořený komplex HIF-1 se spolu s ko-aktivátory (CBP/p300, Ref-1, SRC-1, TIF2) váže na hypoxické responzivní elementy (HRE-hypoxie response element; 5'-G/ACGTG-3') nacházející se v promotorových oblastech jednotlivých hypoxií-regulovaných cílových genů a spouští jejich transkripci (obrázek 3). Nejznámější cílové geny jsou zahrnuty ve více významných procesech, jakými jsou například glykolýza, erythropoéza a angiogeneze (Gílání et al., 2010; Semenza, 2001; Wang et al., 1995; Wenger, 2002).



**Obrázek 3:** Regulace HIF-1 $\alpha$  v průběhu normoxie a hypoxie (upraveno podle Bhatia et al., 2013).

## 1.3. Epigenetické modifikace

Epigenetika studuje změny v genové expresi, které nejsou způsobeny změnou sekvence v DNA (Rédei, 2008). Mezi epigenetické mechanismy regulace genové exprese patří zejména: methylace DNA, post-translační modifikace histonů, regulace nekódujícími RNA (mikroRNA a dlouhé nekódující RNA (lncRNA)).

### 1.3.1. Methylace DNA

DNA methylace znamená přenos methylové skupiny na pyrimidin cytosinu před guanosem (CpG). Tato část DNA je následně nepřístupná pro RNA polymerasu, a tedy informace kódovaná na tomto úseku nemůže být exprimována. Samotný přenos methylové skupiny zajišťuje skupina enzymů nazývaná DNA methyltransferasy. Tyto enzymy využívají jako substrát a tedy jako donor methylové skupiny S-adenozyl-L-methionin. Místo a způsob DNA methylace závisí zejména na metylaci v rodičovských buňkách, a je tedy děděna. DNA methylace je ale také ovlivněna prostředím - tím je částečně i získaná (Allis et al., 2007). Aberantní metylace CpG ostrůvků v promotorových oblastech, zejména nádorově supresorových genů, patří mezi negenetické mechanismy karcinogeneze.

### 1.3.2. Post-translační modifikace histonů

Proteiny sdružené s chromatinem - histony, mohou podléhat kovalentní modifikaci. Histony podléhají následujícím post-translačním modifikacím:

- acetylace
- fosforylace
- metylace

nebo připojování větších skupin:

- poly(ADP-ribosa)
- ubiquitin
- SUMO ("small ubiquitin-related modifier")

**Acetylace histonů** je regulována enzymy histonacetyltransferasami (HAT) a histon-deacetylaseami (HDAC) a je spojována s aktivací transkripce respektive s represí (Sassone-Corsi et al., 2013). Acetylace postranních aminokyselinových zbytků vede ke změně náboje a následné změně struktury chromatinu na aktivní otevřenou formu (Bannister et al.,

2000) a naopak deacetylace N-terminálních konců pomocí HDAC vede k sbalení chromatinu a snížení genové exprese (Barnes et al., 2005).

**Fosforylace histonů** pomocí fosfatas a kinas je spojována s mnoha buněčnými procesy jako je např. replikace DNA, regulace transkripce, průběh buněčného cyklu či regulace apoptózy (Dastidar et al., 2013). Ve většině případů je fosforylace serinových a threoninových zbytků histonů spojována s kondenzací chromatinu během mitózy a meiózy. Příkladem je serinový zbytek u S10 histonu, či H3 C-terminální fosforylace threoninového zbytku T119 histonu H2A (Banerjee et al., 2011).

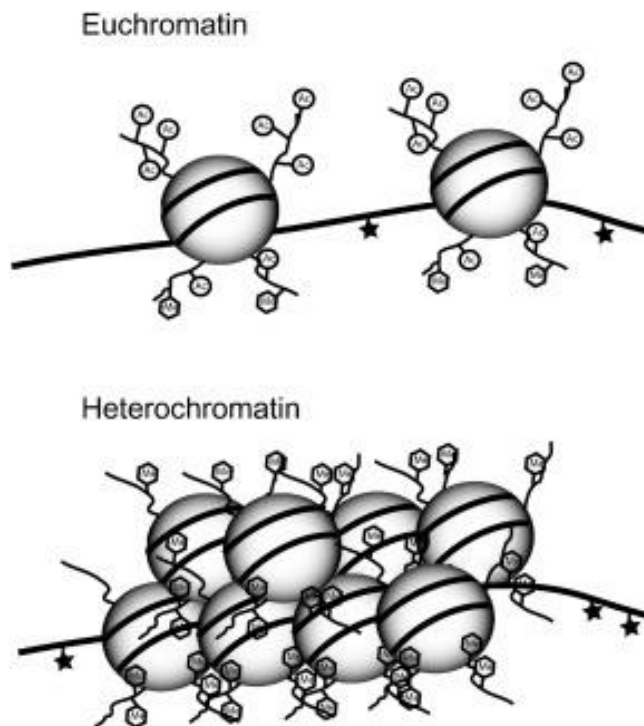
**Methylace histonů** patří mezi méně studované post-translační modifikace histonů (Zhang et al., 2001). Methylace probíhá zejména na zbytcích lysinu, kde je možná methylace do tří stupňů a argininu, kde rozeznáváme dva stupně (Bannister et al., 2011). Methylovaní histonů katalyzují tři různé skupiny enzymů: 1) specifické lysinové histonmethyltransferasy (HMT) obsahující SET ("Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax") doménu, které modifikují lysinové zbytky K4, K9, K27 a K36 histonu H3 a lysinový zbytek K20 histonu H4; 2) lysinové histonmethyltransferasy, které neobsahují SET doménu se svým jediným zástupcem Dot1 ("disruptor of telomeric silencing1"), který modifikuje lysinový zbytek K79 histonu H3 (Sims et al., 2003); 3) argininové methyltransferasy (PRMT) modifikující argininové zbytky R2, R17 a R26 histonu H3 a argininový zbytek R3 histonu H4 (Shilatifard et al., 2006).

**ADP-ribozylace** představuje kovaletní post-translační modifikaci identifikovanou u méně než 1 % histonových proteinů a to v N-terminální oblasti jaderných histonů (Hotz et al., 2011; Hassa et al., 2006).

Jiným mechanismem je **ubiquitinace**, či **SUMOylace**, kdy jde o napojení ubiquitinu (8 kDa protein) nebo SUMO. Jedná se o vícefázový proces probíhající za katalýzy specifickými enzymy jako ubiquitin- nebo SUMOyl-aktivátory, konjugasy, ligasy či proteasy. Post-translační modifikace proteinů ubiquitinací hraje klíčovou roli při odstraňování bílkovin degradací pomocí proteosomů. Avšak ne vždy to musí znamenat jejich proteolytickou degradaci, ale kovaletní vazba může také měnit jejich funkci, SUMOylace např. stimuluje aktivitu faktoru tepelného šoku HSF1 a nádorového supresoru p53 (Lyst et al., 2010).

**"Remodelace" chromatinu** můžeme také řadit mezi epigenetické mechanismy regulace. Dva základní morfologické stavy chromatinu vyšších eukaryot jsou heterochromatin a euchromatin (Dinant et al., 2008). Přejídy mezi konformacemi vedou ke změně genové exprese, heterochromatin je transkripčně neaktivní pro své těsné uspořádání a špatnou do-

stupnost transkripčního aparátu, naopak euchormatin je transkripčně aktivní a méně kompaktní (obrázek 4) (Li, 2002; Kouzarides, 2007).



**Obrázek 4:** Znázornění struktury euchromatinu a heterochromatinu (Tost et al., 2017).

### 1.3.3. Nekódující RNA

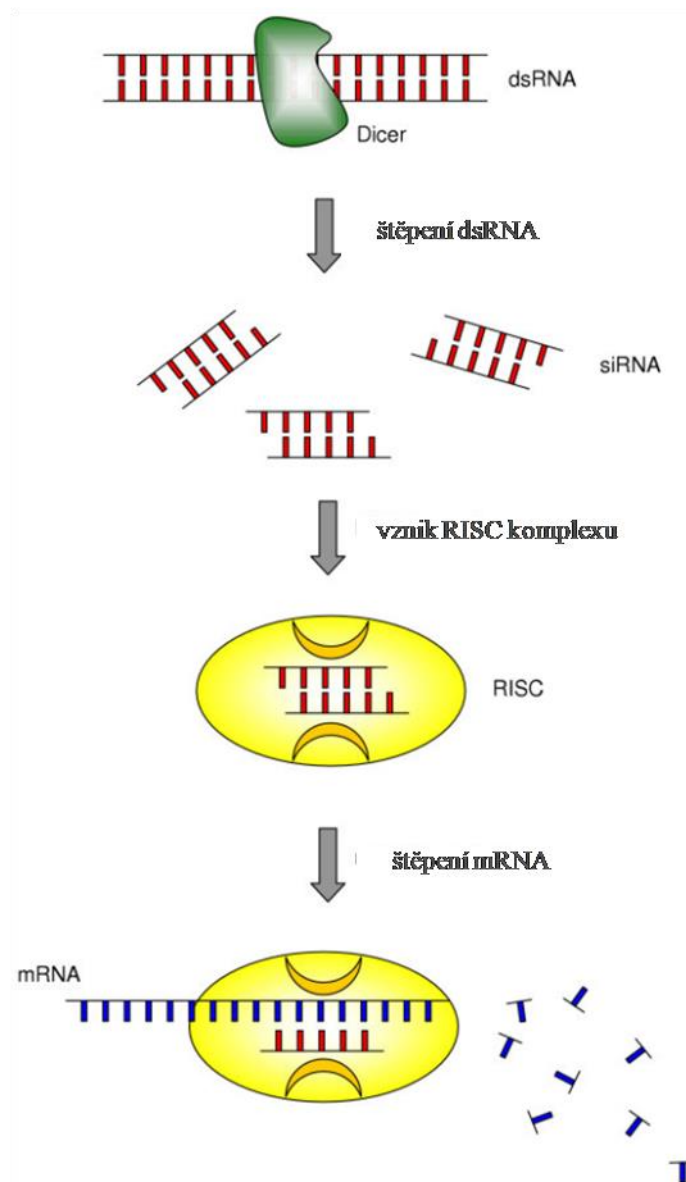
Na základě prvních analýz sekvenovaných genomů se předpokládalo, že většina genetické informace je exprimována ve formě proteinů, které mají strukturní, katalytické a regulační funkce (Stein, 2004). Pokročilé technologie však dokázaly, že lidský genom obsahuje pouze asi 20 000 protein-kódujících genů, což představuje necelá 2%. Avšak nejméně 90 % genomu je transkripčně aktivních. Lidský transkript tedy neobsahuje pouze sekvence protein-kódujících genů, ale také podstatně větší množství nekódujících RNA (Stein, 2004; Taft et al., 2010). Zpočátku se předpokládalo, že tyto nekódující RNA jsou jen jakýsi nahromaděný "genetický odpad" vzniklý při sestavování genů. Nicméně nedávné výzkumy prokázaly, že mají významnou roli při mnoha fyziologických a patofyziologických procesech. Nekódující RNA jsou tedy nepostradatelnou součástí systému buněčných regulací (Mattrick, 2001; Zhang, 2012).

Na základě velikosti se nekódující RNA dělí na dvě velké skupiny a to krátké nekódující RNA - transkripty o velikosti maximálně několik desítek bází a dlouhé nekódující RNA (lncRNA) - transkripty o délce 200 nt a více.

### **1.3.3.1. "Umlčení" translačního mechanismu pomocí mikroRNA**

Mikro RNA (miRNA) jsou negativní regulátory genové exprese. Tvoří ji krátké úseky RNA o velikosti 17-24 bází, které nekódují proteiny (Esquela-Kerscher, 2006). miRNA umožňuje post-translační represi genů a to buď inhibicí translačního mechanismu, nebo destabilizací cílového transkriptu (Sivdasani, 2006). Mohou tak ovlivňovat klíčové buněčné pochody jako je proliferace, diferenciací, buněčný cyklus a buněčná smrt. Změny exprese miRNA byly nalezeny u řady nádorů (Zhang et al., 2007). Molekuly miRNA jsou částečně komplementární k určitým molekulám mRNA, čímž jsou schopné snižovat ribozomální přepis na proteiny, které tyto mRNA kódují. Prekurzorem miRNA je tzv. pre-mikroRNA nacházející se na kličce základního vlákna mRNA. Ta vzniká z tzv. primární pre-mikroRNA štěpením RNasami III Drosha a DGCR8/Pasha v buněčném jádře. Odtud se vzniklá pre-mikroRNA dostává do cytoplazmy v komplexu s Ran-GTP-dependentním faktorem exportin-5, kde ji RNase III-like nukleasa štěpí na duplex miRNA (Shivdasani, 2006).

Mikro RNA blokuje translaci pomocí RISC komplexu ("RNA-induced silencing complex"). RISC je nukleoproteinový komplex, do kterého se inkorporují jednovláknové fragmenty jako miRNA nebo dvouvláknové jako siRNA, které slouží jako templát pro RISC pro rozpoznávání komplementární mRNA. RISC dále obsahuje proteiny "dicer", TRBP a "argonaute". "Dicer" má ribonuklasovou aktivitu a štěpí dsRNA na 21 až 23 nukleotidů (nt) dlouhé fragmenty s 3'-přesahem. Tyto RNA jsou začleněny do proteinového komplexu RISC a aktivují ho. Protein TRBP obsahuje domény vázající RNA a "argonaute" představuje RNasu, která degraduje mRNA. Nakonec může aktivní RISC rozpoznat a štěpit cílovou mRNA na základě komplementarity siRNA k cílové mRNA (obrázek 5, str. 23) (Kusenda et al., 2006; Wang et al., 2009).

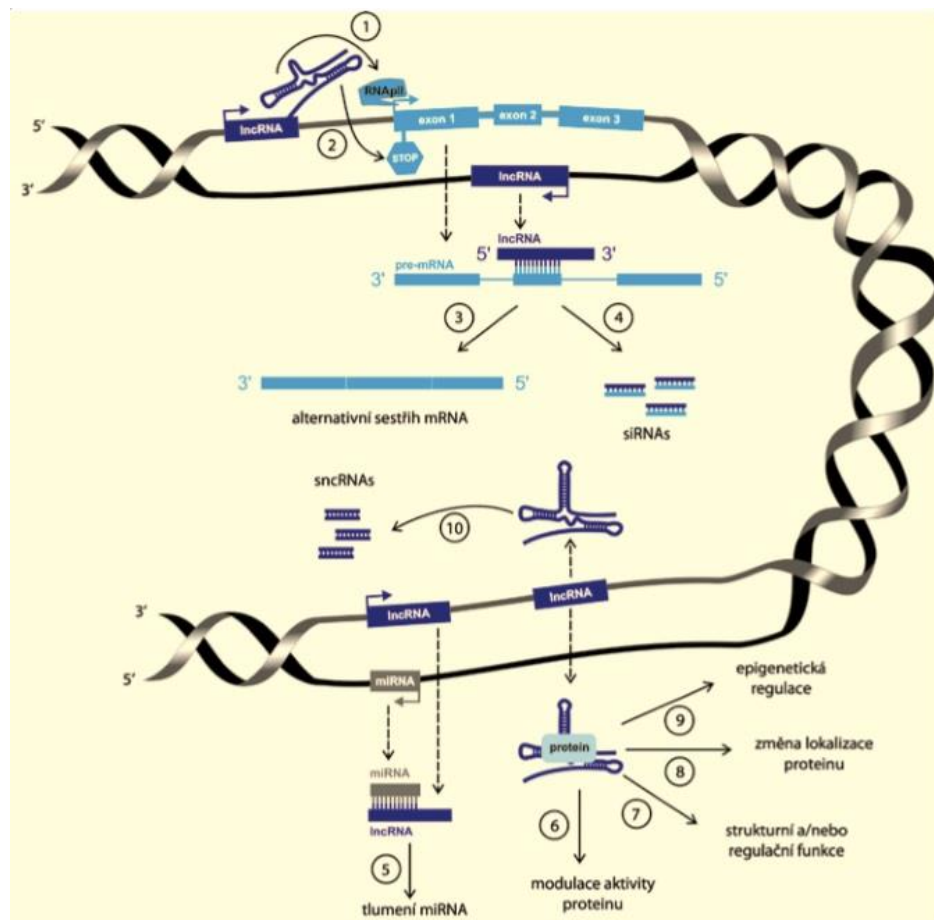


**Obrázek 5:** Mechanismus RNA interference (upraveno podle Mocellin et al., 2004).

## 1.4. Dlouhé nekódující RNA

LncRNA obsahují pouze krátký otevřený čtecí rámec, nebo jim úplně chybí, což zabraňuje jejich úspěšnému překladu do proteinů. Mnohé dosud známé lncRNA jsou přepisovány RNA polymerasou II a sestřihovány. Některé mají polyadenylované 3'-konce, nebo obsahují 5'-čepičku (Taft et al., 2010). Jiné lncRNA jsou kvůli struktuře jejich promotorových sekvencí přepisovány spíše RNA polymerasou III (Pagano et al., 2007). Jejich promotory jsou regulovány jak transkripčními faktory, tak epigeneticky pomocí specifické modifikace histonů (Guttman, 2009). Molekuly lncRNA jsou spojovány s mnoha buněč-

nými procesy jako modulace proteinové aktivity, alternativní sestřih, změny proteinové lokalizace i epigenetická regulace (Costa, 2010; Iacoangeli 2004; Oromia, 2010). Hlavním úkolem je však regulace genové exprese a to na transkripční i post-transkripční úrovni (obrázek 6) (Mattrick et al., 2009). Deregulace exprese lncRNA je prokazována u mnohých multifaktoriálně podmíněných nemocí jako je ischemická choroba srdeční (Ishii et al., 2006), Alzheimerova choroba (Faghihi et al., 2008) a nádorová onemocnění a také se podílí na progresi těchto nemocí (Taft et al., 2010).



**Obrázek 6:** Znárodnění funkcí lncRNA (Šána et al., 2012)

- 1) inhibice polymerasy II
- 2) remodelace chromatinu
- 3) alternativní sestřih primárního transkriptu
- 4) vznik endogenních siRNA
- 5) funkční umlčení miRNA
- 6) modulace aktivity proteinu
- 7) zapojení do strukturních a organizačních rolí buňky
- 8) změna lokalizace proteinu
- 9) ovlivňování epigenetických procesů
- 10) zkracování do krátkých nekódujících RNA



Hlavní třídy dlouhých nekódujících RNA jsou:

- a) dlouhé mezigenové nekódující RNA
- b) dlouhé intronové nekódující RNA
- c) nekódující RNA asociované s telomerami
- d) dlouhé nekódující RNA s dvojí funkcí
- e) pseudogeny
- f) přepisované vysoce konzervované oblasti

**Dlouhé mezigenové nekódující RNA (lincRNA)** mají velikost od stovek do desítek tisíc nt a nacházejí se v genomech mezi dvěma geny. Jsou zapojeni do tumorigeneze a nádorového metastazování. LincRNA mění svůj expresní profil v průběhu fyziologického vývoje na základě odpovědi na různé druhy signalizace. Vykazují odlišné expresní hladiny v primárních nádorech a metastázách v porovnání s příslušnou nenádorovou tkání. Nádorově asociované lincRNA proto představují skupinu lncRNA s potenciálem pro onkologickou diagnostiku a moderní terapii (Guttman et al., 2009). Do této třídy patří např. HULC (Highly Upregulated in Liver Cancer), která je výrazně zvýšena v jaterních metastázách kolorektálního karcinomu a buněčných liniích hepatocelulárního karcinomu (Gabor et al., 2010). Další popsanou lncRNA patřící do této třídy je HOTAIR (HOX antisense intergenic RNA), u které jako jedné z prvních byla popsána asociace s metastazováním. Její zvýšená exprese byla pozorována u primárních i metastatických nádorů prsu, kde koreluje se špatnou prognózou (Gupta et al., 2010). U hepatocelulárního karcinomu je zvýšená exprese této lncRNA vhodným biomarkrem predikce relapsu u pacientů po transplantaci jater (Yang et al., 2011). **Dlouhé intronové nekódující RNA** jsou v genomu umístěny uvnitř intronů a vyznačují se tkáňovou a subbuněčnou specifitou. Některé z nich jsou u nádorových onemocnění aberantně exprimovány. Diskutována je jejich buněčná funkce v posttranskripčním tlumení exprese genů. Studie ukázaly, že tato třída lncRNA je různě exprimována v primárních a metastatických nádorech slinivky a ve většině případů jsou lokalizovány v genech asociovaných s MAPK dráhou (Tahira et al., 2011). Identifikovanou lncRNA patřící do této třídy je COLDAIR (cold assisted intronic noncoding RNA), která při dlouhodobém působení nízkých teplot epigeneticky umlčuje gen FLC (Heo, 2011). **Nekódující RNA asociované s telomerami** mají velikost 100 bp až 9 kb. Syntetizují se v oblastech bohatých na konstitutivní heterochromatin a jsou polyadenylované. Mají potenciální význam u onemocnění asociovaných s délkou telomer, včetně nádorů a jejich

biologická funkce spočívá v negativním regulování kompenzační kapacity telomer. **Dlouhé nekódující RNA s dvojitou funkcí** regulují genovou expresi nekódujících RNA a za určitých okolností jsou schopny kódovat proteiny. Mezi tyto molekuly patří např. SRA (steroid receptor RNA activator), který má vlastnosti nekódující RNA, avšak po začlenění specifické oblasti k jeho 5'-konci vzniká transkript kódující protein SRA (Lanz et al., 1999; Kawashima et al., 2003; Chooniedass-Kothari et al., 2004). Zvýšená exprese byla pozorována v játrech, nadledvinách a hypofýze a naopak snížena v placentě, plicích a nadledvinách (Lanz et al., 1999). Tyto molekuly tedy představují jakýsi unikát, protože jediný transkript může vést ke vzniku proteinu, nebo zůstat v podobě RNA a uplatňovat regulační funkci lncRNA (Ulveling, 2011; Hussein-Fikret, 2005). **Pseudogeny** jsou kopie genů, které ale ztratily schopnost kódovat proteiny a dlouho byly označovány jako "junk" DNA. Jejich funkcí je regulace genové exprese funkčním umlčením miRNA a jsou deregulovány v průběhu nádorové iniciace a následné progresi. Poslední třídou jsou **přepisované vysoce konzervované oblasti**, které jsou delší než 200 bp a jsou umístěny jak v inter- tak i v intragenových oblastech. Jejich hlavní funkcí je inhibice protein-kódujících genů i některých nekódujících RNA (Šáňa et al., 2012).

#### **1.4.1. Myocardial infarction-associated transcript**

Myocardial infarction-associated transcript (MIAT) je jednou z lncRNA, která patří do třídy dlouhých mezigenových RNA. Poprvé byla identifikována jako lncRNA v roce 2006. Také je známá jako RNCR2, AK028326 či GOMAFU. Její gen je u člověka lokalizován na 22q12.1 (Sone et al., 2007).

##### ***1.4.1.1. Identifikace MIAT jako nekódující RNA***

První zmínka o MIAT byla v roce 2000 (Ohnishi et al., 2000). Ishii a jeho tým provedli studii u 188 pacientů s infarktem myokardu a 752 zdravých obyvatel Japonska s použitím "high-throughput multiplex PCR-Invader assay" pro 52608 SNP (jednonukleotidový polymorfismus, z ang. "single-nucleotide polymorphism") vybraných z JSNP ("Japanese Single Nucleotide Polymorphism") databáze (Haga et al., 2002; Tsunoda et al., 2004). Jeden SNP, který byl identifikován na FLJ25967 genu a lokalizovaný na 22q12.1, byl významně asociovaný s infarktem myokardu. Pro analýzu a přezkoumání, zda tato sekvence kóduje proteiny, autoři použili 4 fetální a 16 dospělých lidských tkání. Northern blot však

neprokázal žádný dlouhý otevřený čtecí rámeček. Pro potvrzení, že se jedná o nekódující transkript, provedli *in vitro* translační zkoušku čtyř variant tohoto genu. Žádný produkt translace však nebyl detekován, a tak určili, že tento gen nekóduje "funkční" RNA a nazvali ho "myocardial infarction-associated transcript" (Ishii et al., 2006).

#### **1.4.1.2. *Exprese MIAT u různých onemocněních***

Výzkumy vedly k závěrům, že MIAT se podílí na různých onemocněních a buněčných procesech jako jsou infarkt myokardu (Ishii et al., 2006; Vausort et al., 2014), mikrovaskulární dysfunkce (Yan et al., 2015), paranoidní schizofrenie (Rao et al., 2015) a tvorba jaderných tělísek v buňkách neuroblastomu (Ishizuka et al., 2014). Zvýšená exprese MIAT byla pozorována u chronické lymfocytární leukémie (CLL), zejména s 11q a 17p delecí, které jsou typické pro agresivní formu CLL. U buněčných linií chronické lymfocytární leukémie a patientských vzorků CLL, se MIAT zvyšuje v závislosti na přítomnosti transkripčního faktoru OCT4 u agresivních forem této leukémie. OCT4 též pozitivně reguluje transkripci Gomafu (myší homolog MIAT) v myších embryonálních kmenových buňkách (Sheik et al., 2010). OCT4 tedy pravděpodobně představuje pozitivní regulátor transkripce MIAT (Sattari et al., 2016). Exprese MIAT byla také zvýšena v buněčných liniích karcinomu prsu. Výrazně byla zvýšena u pacientů s třetím stadiem (TNM III) karcinomu prsu a u pacientů s metastázami v lymfatických uzlinách. Některé výsledky také naznačují, že knockdown exprese MIAT by mohla inhibovat proliferaci, migraci, invazivitu a epithelálně-mesenchymální transici (EMT) buněk karcinomu prsu (Luan et al., 2017).

V předchozí studii Laboratoře biologie solidních nádorů zaměřené na účinek valproátu na buňky v normoxii a hypoxii bylo metodou expresní mikroarraye u neuroblastomových buněk nalezeno významné zvýšení exprese lncRNA MIAT v hypoxii, které bylo potvrzeno i RT PCR v reálném čase (dosud nepublikováno).

## 2. Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce je studium dlouhé nekódující RNA MIAT a jejího vztahu k chemorezistenci buněčných linií a hypoxii.

V rámci této práce byly sledovány následující cíle:

- Stanovení dynamiky exprese genu MIAT v hypoxii (1% O<sub>2</sub>).
- Stanovení exprese genu MIAT v chemosenzitivních a chemorezistentních neuroblastomových buněčných liniích.

## 3. Experimentální část

### 3.1. Materiál a chemikálie

Ambion (USA): "PureLink® RNA Mini Kit" pro izolaci RNA

Carl Roth (Německo): merkaptoethanol

Generi Biotech (ČR): kit pro reverzní transkripci "gb Reverse Transcription Kit", master mix pro polymerasovu řetězovou reakci v reálném čase "gb Easy PCR Master Mix"  
Primery a sondy: Assay qPCR hPOLR2A FAM, Assay qPCR hMIAT FAM

Gibco (USA): sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl (PBS), telecí sérum (fetal bovine serum FBS), "Iscove's modified Dulbecco's" médium (IMDM) s glutaminem

Sigma-Aldrich (USA): ellipticin

Thermo Fisher Scientific (USA): Alamar Blue

Teva (Izrael): doxorubicin, cisplatina, vinkristin

Všechny chemikálie byly čistoty p.a. (pro analýzu) nebo vyšší.

Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 a UKF-NB-3 byly darem prof. Jindřicha Činátla, DrSc. z Goetheho Univerzity ve Frankfurtu nad Mohanem.

### 3.2. Metody

#### 3.2.1. Kultivace buněčných linií

Buňky neuroblastomových linií UKF-NB-4 a UKF-NB-4 rezistentní k doxorubicinu (UKF-NB-4<sup>DOXO</sup>), UKF-NB-4 rezistentní k ellipticinu (UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>), UKF-NB-4 rezistentní k cisplatině (UKF-NB-4<sup>CDDP</sup>) a UKF-NB-4 rezistentní k vinkristinu (UKF-NB-4<sup>VCR</sup>), UKF-NB-3 a UKF-NB-3 rezistentní k cisplatině (UKF-NB-3<sup>CDDP</sup>), SK-N-AS a SK-N-AS rezistentní k cisplatině (SK-N-AS<sup>CDDP</sup>) a linie karcinomu ovaria A2780 a A2780 rezistentní k cisplatině (A2780<sup>CDDP</sup>) byly kultivovány v IMDM médiu obohaceném 10% fetálním hovězím sérem (FBS) a 1% antibiotikem penicilin-streptomycin. Kultivace probíhala v inkubátoru Jouan IGO 150 (Thermo Fisher, USA) při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> a 95% vlhkos-

ti vzduchu. Buňky byly pasážovány v pravidelných intervalech. Z povrchu kultivačních lahviček byly uvolňovány pomocí 0,2% roztoku trypsinu v PBS a resuspendovány v médiu. Kultivace probíhala v kultivačních lahvích o ploše 25 cm<sup>2</sup> a 75 cm<sup>2</sup>, případně na Petriho miskách o ploše 60 cm<sup>2</sup> a 22 cm<sup>2</sup>.

U výše uvedených rezistentních linií byla rezistence navozena dlouhodobou kultivací se stoupající koncentrací příslušného cytostatika v laboratoři profesora Činátla a v naší laboratoři (UKF-NB-4<sup>ELLI</sup> a SK-N-AS<sup>CDDP</sup>).

### **3.2.2. Příprava konodiciovaného média**

Buňky byly kultivovány na Petriho misce o ploše 22 cm<sup>2</sup> v počtu 1,2 milionu buněk na misku po dobu 24 hodin ve 4 ml média. Jedna miska byla kultivovaná v inkubátoru Jouan IGO 150 (Thermo Fisher, USA) a druhá v hypoxické komoře Proox model 21 (Biospherix, USA) v atmosféře obsahující 1% kyslíku. Po 24 hodinách bylo buňkám odebráno médium a následně bylo centrifugováno při 300 RCF po dobu 2 minut při laboratorní teplotě, čímž byly od média odděleny případné mrtvé buňky a detritus. Supernatant byl přenesen na buňky kultivované 24 hodin za normálních podmínek na Petriho miskách o velikosti 22 cm<sup>2</sup> v počtu 1,2 milionu buněk na misku, kterým bylo odebráno původní kultivační médium. Tyto buňky byly následně kultivovány v inkubátoru Jouan IGO 150 (Thermo Fisher, USA) 24 hodin.

### **3.2.3. Příprava vzorků pro analýzu RT-qPCR**

Buňky kultivované na Petriho miskách o ploše 60 cm<sup>2</sup> a 22 cm<sup>2</sup> v různých počtech byly umístěny do inkubátoru Jouan IGO 150 (Thermo Fisher, USA) po dobu 24 hodin. Následně byly buňky umístěny do hypoxické komory Proox model 21 (Biospherix, USA). Pro všechny varianty byla ponechána miska v podmínkách normoxie sloužící jako kontrola. Následně byly buňky ze dna Petriho misky odmyty pomocí pipety a 1 ml PBS, přeneseny do zkumavky a centrifugovány po dobu 2 minut při 300 RCF a laboratorní teplotě v centrifuze Universal 320 (Hettich, Německo). Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendovaná v 1 ml PBS a odstředěna za stejných podmínek. Veškerý supernatant byl odstraněn a peleta buněk byla uchovávána při -20 °C pro další práci.

### 3.2.4. Izolace RNA z analyzovaných buněk neuroblastomových linií

Na izolaci RNA z buněčných pelet byl použit PureLink® RNA Mini Kit. K zmrazené buněčné peletě bylo přidáno 0,6 ml lyzačního pufru s přídatkem 1% 2-merkapt ethanolu. Následovalo vortexování na vortexu Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA), až do rozptýlení buněčné pelety. Následně bylo k suspenzi přidáno 0,6 ml 70% ethanolu a vortexováno až do rozptýlení všech pouhým okem viditelných částic. Maximálně 700  $\mu$ l zvortexovaného vzorku bylo přeneseno na kolonku a centrifugováno v centrifuze Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf, Německo) při 12 000 x g, 15 sekund. Krok byl opakován až do zpracování celého vzorku. Následně bylo přidáno na kolonku 700  $\mu$ l promývacího pufru I a centrifugováno při stejných podmínkách. Na kolonku tak bylo přidáno 500  $\mu$ l promývacího pufru II a centrifugováno za stejných podmínek, přičemž tento krok byl prováděn dvakrát. Pro vysušení membrány na kolonce s navázanou RNA byla kolonka centrifugována při 12 000 x g, 2 minuty. Na kolonku tak bylo přidáno 30  $\mu$ l vody zbavené RNas a inkubováno při laboratorní teplotě po dobu 1 minuty. Posledním krokem byla centrifugace při 13 000 x g po dobu 2 minut pro uvolnění vyizolované RNA z membrány. Práce byla prováděna v laminárním boxu Telstar AV-100 (Telstar, Španělsko). Koncentrace izolované RNA byla změřena použitím přístroje NanoDrop Lite (Thermo Fisher, USA) a čistota posuzovaná na základě poměru absorbancí  $A_{260}/A_{280}$  se vždy pohybovala v požadovaném rozmezí 1,8 - 2.

### 3.2.5. Reverzní transkripce RNA

Reverzní transkripce RNA do komplementární DNA (cDNA) je základní metodou pro studium genové exprese, protože vytvořená cDNA odráží množství a složení původní mRNA.

Pro přepis RNA do cDNA byl použit kit pro reverzní transkripci na cDNA s inhibítorem RNas Generi Biotech Reverse Transcription Kit. Vzorky RNA byly naředěné vodou zbavené RNas do 10  $\mu$ l tak, aby v reakci bylo 1000 ng RNA. K naředěné RNA tak bylo přidáno 10  $\mu$ l "Master Mixu". Reverzní transkripce byla připravována v boxu Aura PCR (Bioair instruments, Itálie). Pro následný přepis RNA do cDNA byly vzorky umístěny do termocykleru Labcycler (SensoQuest, Německo) s teplotním profilem: 42 °C po dobu 60 minut a poté 4 °C  $\infty$ .

### 3.2.6. Kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (RT-qPCR) pro gen MIAT

Metoda kvantitativní polymerasové řetězové reakce v reálném čase (RT-qPCR) se používá pro kvantitativní analýzu templátu, tedy určitého úseku cDNA v reálném čase. Amplifikace je detekována pomocí fluorescenční TaqMan sondy, které se na amplifikovanou DNA specificky váže.

Pro RT-PCR byly použity primery navržené a připravené v Generi Biotech (ČR) hMIAT a kontrolní gen hPOLR2A s FAM (6-Carboxyfluorescein) značenými fluorescenčními specifickými sondami. Reakce RT-PCR byla provedena se vzorky cDNA. Každá 20 $\mu$ l reakce sestávala z: 10  $\mu$ l "Easy Master Mixu", 2  $\mu$ l primerů s FAM fluorescenční sondou, 7  $\mu$ l vody zbavené RNas a 1  $\mu$ l vzorku cDNA. Měření každého vzorku bylo prováděno v triplicátu. Vzorky byly vloženy do QuantStudio™ 3 and 5 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA), kde byl pomocí programu QuantStudio™ Design & Analysis Software nastaven následující teplotní protokol:

95 °C - 3 minuty

50 cyklů o následujících podmínkách:

95 °C - 10 sekund

65 °C - 20 sekund

Pro vyhodnocení výsledků byla použita relativní kvantifikace, která popisuje relativní změnu exprese sledovaného genu vůči tzv. house-keeping genu (POLR2A), jehož hladina exprese je za podmínek experimentu konstantní. Pro výpočet exprese cílového genu byla použita  $\Delta\Delta C_t$  metoda. K výpočtu celkového množství cílového genu se používá vztah:

$$R=2^{(-\Delta\Delta C_t)} \quad (1)$$

$$\text{kde: } \Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{vzorku}} - \Delta C_{t\text{kontrola}} \quad \text{a} \quad \Delta C_t = C_{t(\text{MIAT})} - C_{t(\text{POLR2A})} \quad (2)$$

$R$  relace (z ang. "ratio")

$C_t$  mezní úroveň (z ang. "threshold")

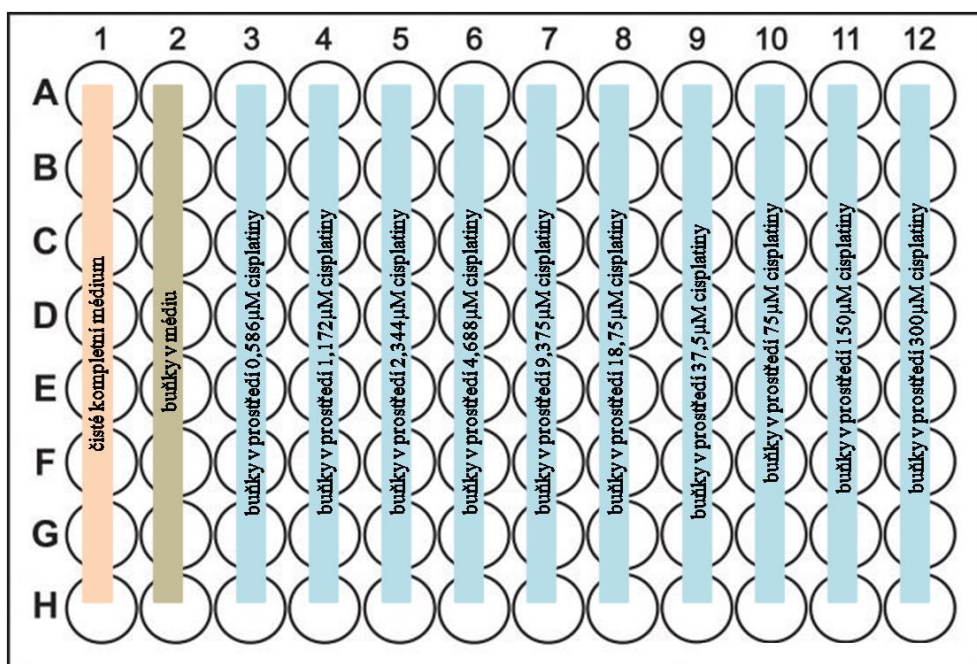
Data byla dále statisticky zpracována pomocí programu REST 2009 (Pfaffl et al., 2002).



### 3.2.7. Test cytotoxicity a stanovení IC<sub>50</sub>

Cytotoxicita byla stanovena pomocí fluorescenční látky Alamar Blue, jejíž aktivní složka je resazurin. Resazurin je nefluorescenční indikátorové barvivo, které vstupuje do buněk a zároveň je pro ně netoxické. V živých buňkách se pomocí redukčních reakcí metabolicky mění na fluoreskující resofurin. Intenzita fluorescence je tak úměrná počtu živých buněk.

Test byl prováděn ve formátu 96-jamkové destičky. Do 1. sloupce bylo osmi-kanálovou pipetou přidáno 100  $\mu$ l kompletního média IMDM, a do sloupců 2 až 12 bylo přidáno po 50  $\mu$ l. Do posledního sloupce 12 bylo pipetováno 50  $\mu$ l cisplatinu o finální koncentraci 300  $\mu$ M a osmi kanálovou pipetou tzv. dvojkovou ředící řadou pipetovány do předchozích sloupců destičky až k sloupci 3 (obrázek 7). Poté bylo do sloupců 2 až 12 přidáno 50  $\mu$ l buněčné suspenze o koncentraci 300 000 buněk na ml. Destička byla inkubována při 37°C a 5% CO<sub>2</sub> po dobu 72 hodin. Poté bylo do všech jamek napipetováno 5  $\mu$ l Alamar Blue a inkubováno při 37°C a 5% CO<sub>2</sub> 2 hodiny. Následně byla na spektrofotometru VERSAmax (MolecularDevices, USA) měřena fluorescence o excitační vlnové délce 560 nm a emisní vlnové délce 590 nm. Fluorescence média byla odečtena jako pozadí a hodnota fluorescence živých kontrolních buněk v sloupci 2 byla brána jako 100 %. Hodnota IC<sub>50</sub> byla stanovena v programu SoftMax Pro 4.8.



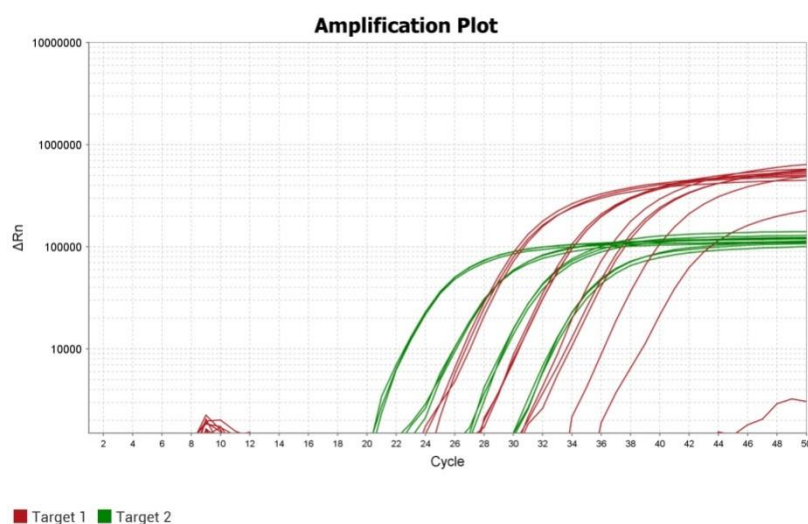
Obrázek 7: Schéma testu cytotoxicity.

## 4. Výsledky

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na epigenetický mechanismus chemorezistence, konkrétně na dlouhou nekódující RNA MIAT a její kvantifikaci pomocí RT-qPCR v senzitivních a chemorezistentních neuroblastomových buněčných liniích.

### 4.1. Účinnost kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase

Účinnost RT-qPCR byla měřena jednak pro sledovaný gen MIAT, tak i pro kontrolní gen POLR2A. cDNA přepsána z vyizolované RNA byla naředěna desítkovou ředící řadou a následně bylo postupováno tak, jak je popsáno v kapitole 3.2.6. Na obrázku 8 je výsledný amplifikační graf měření účinnosti RT-qPCR.



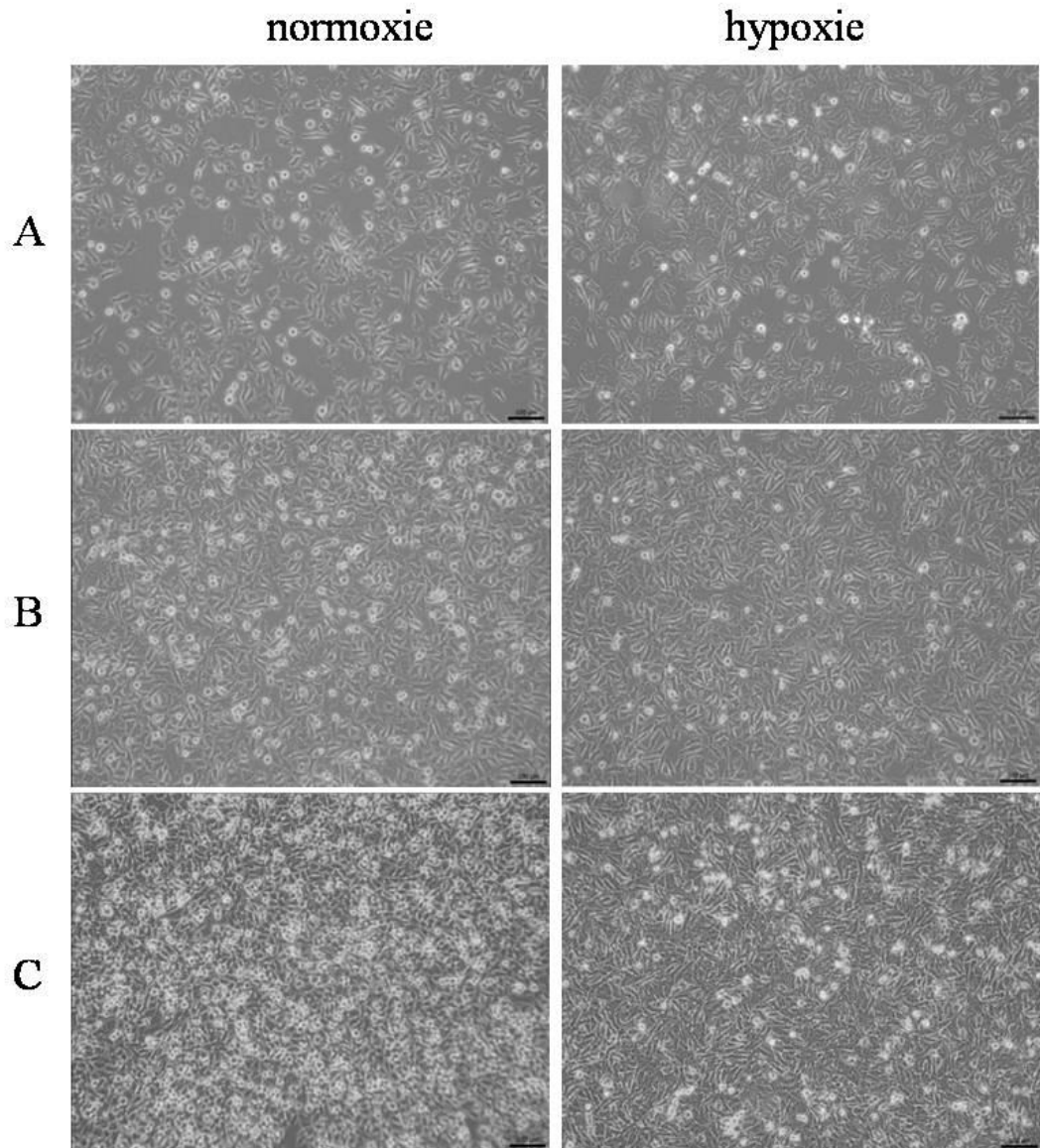
**Obrázek 8:** Amplifikační graf měření účinnosti RT-qPCR. Target 1 označuje gen MIAT, target 2 označuje kontrolní gen POLR2A.

Účinnost byla pomocí QuantStudio™ Design & Analysis Softwaru vypočtena na základě standardní křivky jako **92,9 %** pro gen MIAT a **98,6 %** pro kontrolní gen POLR2A.

Takto získaná účinnost RT-qPCR byla dále používána při statistických zpracováních výsledků pro expresi jednotlivých genů.

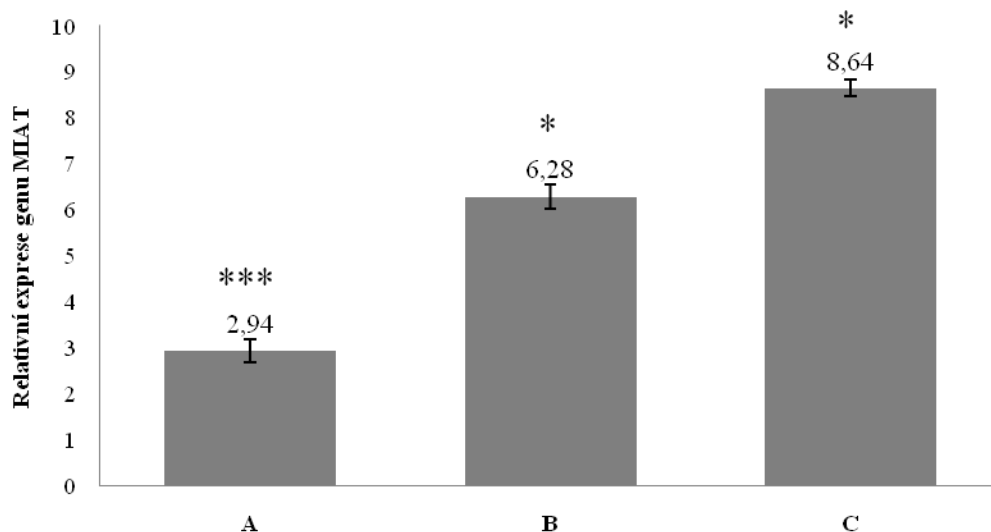
## **4.2. Exprese MIAT v senzitivní neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 v hypoxii (1% O<sub>2</sub>) při různém počtu kultivovaných buněk**

Pro sledování závislosti relativní exprese MIAT na počtu kultivovaných buněk a pro stanovení kultivačních podmínek pro následné experimenty byly buňky senzitivní neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 kultivované na Petriho misce o ploše 22 cm<sup>2</sup> v 4 ml média v hypoxii (1% O<sub>2</sub>). Varianta A: 4.10<sup>5</sup> buněk, varianta B: 8.10<sup>5</sup> buněk a varianta C 1,6.10<sup>6</sup> buněk. Prvních 24 hodin byly buňky kultivovány v normoxických podmínkách a následně byly přemístěny do hypoxické komory Biospherix (USA) na 24 hodin, přičemž kontrolní buňky byly nadále kultivovány za podmínek normoxie. Obrázek 9 (str. 36) znázorňuje fotografie jednotlivých variant v hypoxii a normoxii těsně před sklizením. Z těchto buněk byla izolována RNA. Následně byla izolovaná RNA přepsána pomocí reverzní transkripce do komplementární DNA (cDNA) a exprese genu MIAT byla analyzována pomocí RT-qPCR, obrázek 10 (str. 37) znázorňuje výslednou relativní expresi genu MIAT pro všechny 3 varianty.



**Obrázek 9:** Buňky neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 v počtu A)  $4 \cdot 10^5$  buněk na misku, B)  $8 \cdot 10^5$  buněk na misku a C)  $1,6 \cdot 10^6$  buněk na misku za podmínek normoxie a hypoxie (1%  $O_2$ ). (Zvětšení 200x)

### Expresa genu MIAT v hypoxii při různém počtu kultivovaných buněk



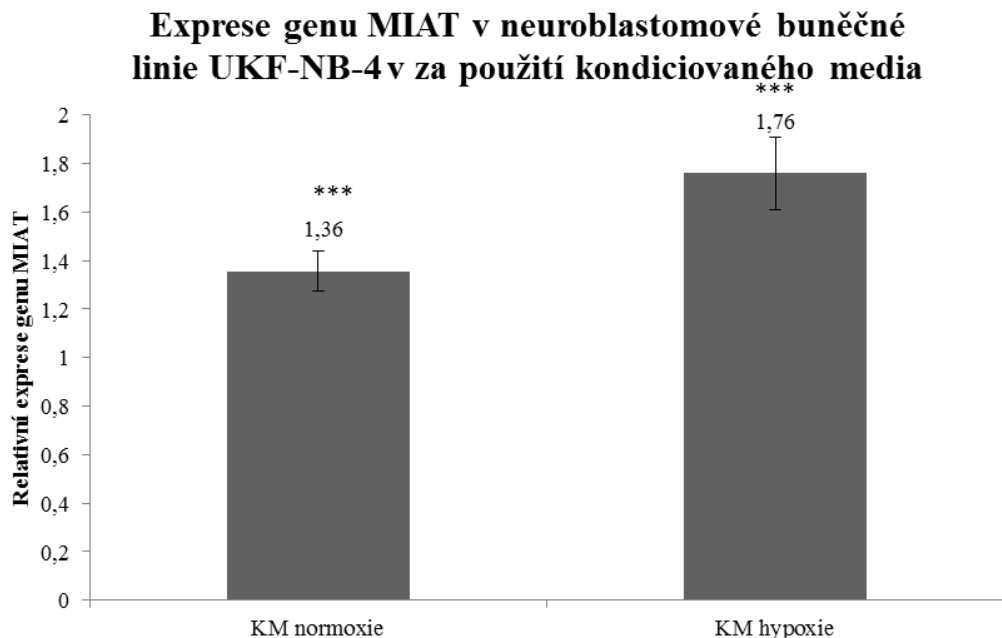
**Obrázek 10:** Relativní exprese genu MIAT v senzitivní neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 v hypoxii (1% O<sub>2</sub>), vztaženo vůči hodnotám v normoxii (relativní exprese genu MIAT v normoxii je rovna jedné) ve shodném čase kultivace při různém počtu kultivovaných buněk. Varianta A) 4.10<sup>5</sup> buněk na misku, B) 8.10<sup>5</sup> buněk na misku a C) 1,6.10<sup>6</sup> buněk na misku. Data byla vyhodnocena pomocí programu REST 2009. Signifikance p <0,05 znázorněna \*, signifikance p <0,001 znázorněna \*\*\*.

Z obrázku 10 vyplývá, že relativní exprese genu MIAT se v hypoxii zvyšuje se zvyšujícím se počtem kultivovaných buněk. Přesná příčina tohoto jevu není jasná, může jím však být zvýšený stres buněk ve větším počtu nebo parakrinní či autokrinní působení buněk.

#### 4.3. Expresa MIAT v senzitivní neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 při kultivaci v kondiciovaném médiu

Pro sledování vlivu kultivačního média na expresi MIAT byly buňky senzitivní neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 kultivované na Petriho misce o ploše 22 cm<sup>2</sup> v 4 ml média o počtu 1,2 miliónu buněk na misku v podmínkách normoxie po dobu 24 hodin. Variantě A bylo po 24 hodinách vyměněno kultivační médium za nové, variantě B bylo kultivační médium vyměněno za kondiciované médium z normoxie a variantě C bylo kultivační médium vyměněno za kondiciované médium z hypoxie (1% O<sub>2</sub>) a následně

byly všechny tři varianty kultivovány po dobu 24 hodin za podmínek normoxie. Obrázek 11 znázorňuje výslednou relativní expresi genu MIAT pro varianty B a C vztahované k expresi v buňkách kultivovaných v čerstvém (nekondiciovaném) médiu (varianta A).



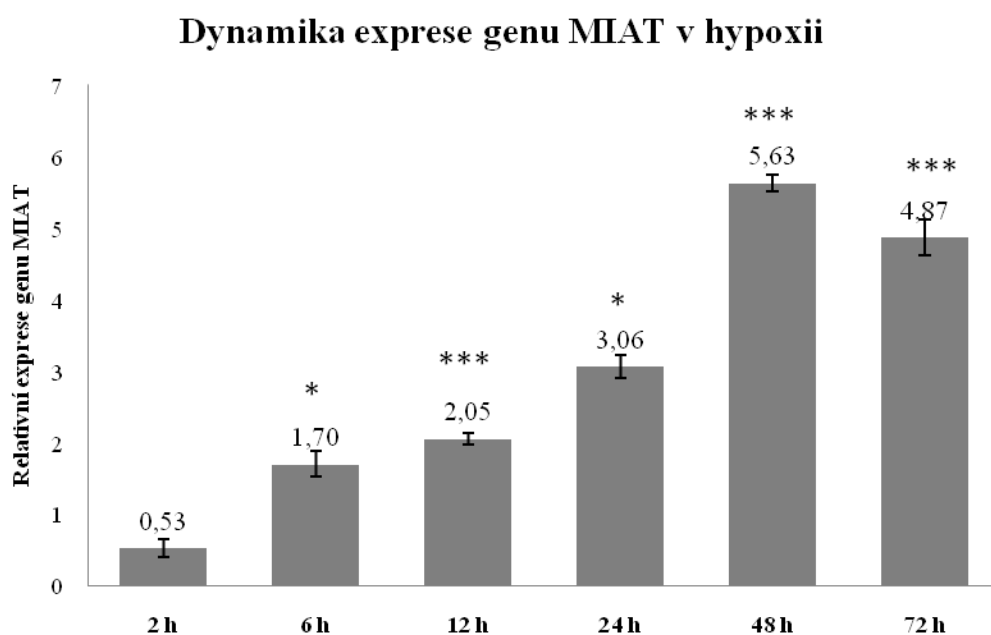
**Obrázek 11:** Relativní exprese genu MIAT v senzitivní neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 za použití kondiciovaného média (KM normoxie označuje kondiciované médium z normoxie - varianta B, KM hypoxie označuje kondiciované médium z hypoxie (1% O<sub>2</sub>) - varianta C) vztaheno vůči hodnotám varianty A. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a vyhodnoceny pomocí programu REST 2009. Signifikance  $p < 0,001$  znázorněna \*\*\*.

Jak je z obrázku 11 patrné kondiciované médium jak z normoxie, tak z hypoxie (1% O<sub>2</sub>) významně zvyšuje expresi MIAT. Příčina tohoto jevu je však nejasná. Může se jednat o vylučování neznámé látky/látek při metabolismu buněk do média, která se zapojuje do drah exprese MIAT.

#### **4.4. Dynamika exprese MIAT v senzitivní neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 v hypoxii (1% O<sub>2</sub>)**

Pro sledování dynamiky exprese genu MIAT v hypoxii (1% O<sub>2</sub>) byly buňky senzitivní neuroblastomové buněčné linie kultivovány na Petriho misce o ploše 60 cm<sup>2</sup> tak, aby v každé misce byl 1 milion buněk a objem média byl 8 ml, po dobu 24 hodin v normoxii. Následně byly misky přemístěny do hypoxické komory Biospherix (USA), přičemž kon-

trólní buňky byly nadále kultivovány za podmínek normoxie. Buňky tak byly sklizeny po 2, 6, 12, 24, 48 a 72 hodinách vystavení hypoxickým podmínkám (1% O<sub>2</sub>). Následně byla z těchto buněk izolována RNA, přepsána pomocí reverzní transkripce do komplementární DNA (cDNA) a exprese genu MIAT byla analyzována RT-qPCR. Výsledná exprese genu MIAT v jednotlivých dobách vystavení podmínkám hypoxie (1% O<sub>2</sub>) vztažená k expresi v buňkách kultivovaných po stejné dobu kultivace v normoxii je znázorněna na obrázku 12.



**Obrázek 12:** Dynamika exprese genu MIAT v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 v hypoxii (1% O<sub>2</sub>) vztaženo vůči hodnotám v normoxii ve shodném čase kultivace. Reprezentativní data jednoho ze dvou měření byla vyhodnocena pomocí programu REST 2009. Signifikance  $p < 0,05$  znázorněna \*, signifikance  $p < 0,001$  znázorněna \*\*\*.

Z výsledků znázorněných na obrázku 12 je patrné, že exprese genu MIAT je signifikantně zvýšena již po 6 hodinách kultivace v hypoxických podmínkách (1% O<sub>2</sub>) a svého maxima dosahuje po 48 hodinách.

#### 4.5. Stanovení $IC_{50}$ u buněčných linií UKF-NB-4, UKF-NB-4<sup>CDDP</sup>, UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>CDDP</sup>, SK-N-AS a SK-N-AS<sup>CDDP</sup>

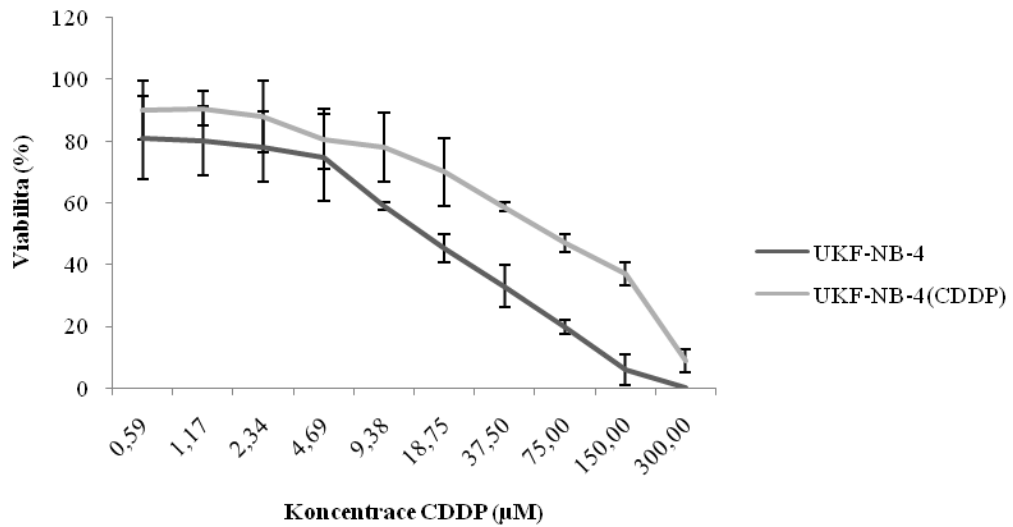
Pro zjištění cytotoxicity cisplatinu na neuroblastomovou buněčnou linii UKF-NB-4, UKF-NB-3, SK-N-AS, jejich chemorezistentních liniích k cisplatině UKF-NB-4<sup>CDDP</sup>, UKF-NB-3<sup>CDDP</sup> a SK-N-AS<sup>CDDP</sup> a linie lidského ovariálního karcinomu A2780 a linie rezistentní k cisplatině A2780<sup>CDDP</sup> byla pomocí Alamar Blue zjištěna hodnota  $IC_{50}$ , tj. dávka, jejímž působením se buněčná populace sníží na polovinu proti kontrole. Buňky byly kultivovány v prostředí různých koncentrací cisplatinu, jak je uvedeno v kapitole 3.2.7. Hodnoty  $IC_{50}$  pro jednotlivé linie po 72 hodinách působení cisplatinu jsou shrnuty v tabulce 1 a na obrázcích 13-16 (str. 41-42).

**Tab. 1:** Hodnoty  $IC_{50}$  neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-4, UKF-NB-3, SK-N-AS a od nich odvozených liniích chemorezistentních liniích k cisplatině UKF-NB-4<sup>CDDP</sup>, UKF-NB-3<sup>CDDP</sup> a SK-N-AS<sup>CDDP</sup> a linie lidského ovariálního karcinomu A2780 a linie rezistentní k cisplatině A2780<sup>CDDP</sup>. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka 3 nezávislých měření.

	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
<b>UKF-NB-4</b>	16,86 $\pm$ 1,79
<b>UKF-NB-4<sup>CDDP</sup></b>	90,25 $\pm$ 4,34
<b>UKF-NB-3</b>	1,83 $\pm$ 0,35
<b>UKF-NB-3<sup>CDDP</sup></b>	23,45 $\pm$ 0,73
<b>SK-N-AS</b>	7,23 $\pm$ 1,33
<b>SK-N-AS<sup>CDDP</sup></b>	27,04 $\pm$ 2,61
<b>A2780</b>	5,62 $\pm$ 1,07
<b>A2780<sup>CDDP</sup></b>	28,14 $\pm$ 0,78

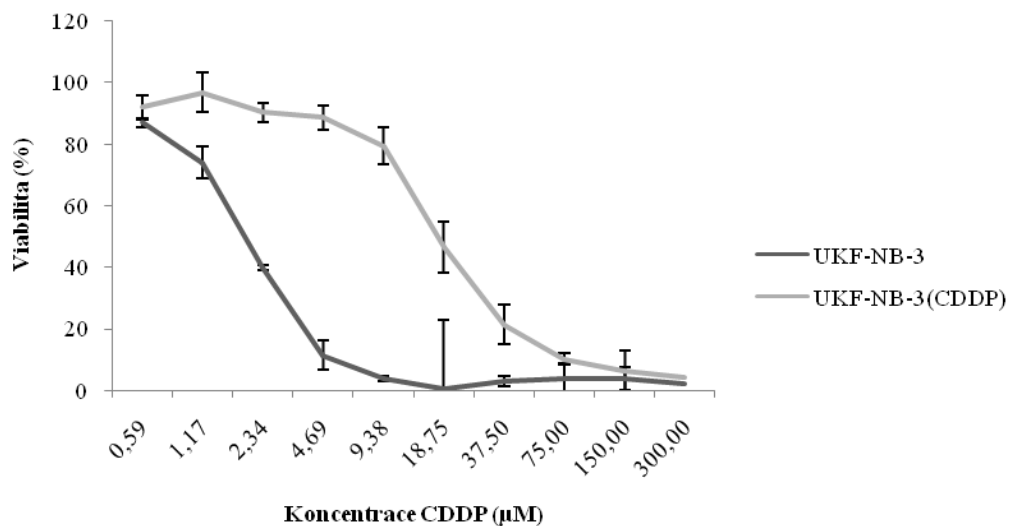


### Viabilita neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 senzitivní a rezistentní vůči cisplatině



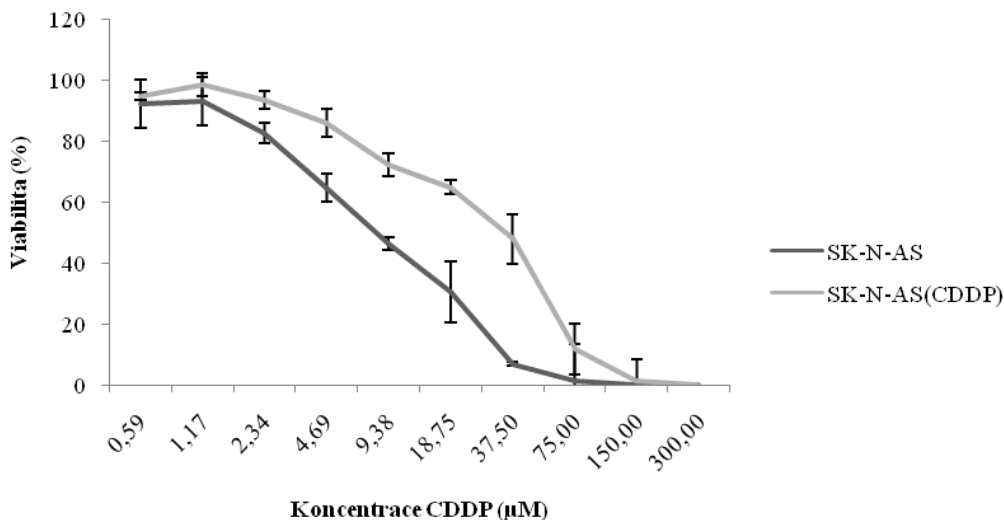
**Obrázek 13:** Viabilita neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 a od ní odvozené linie rezistentní k cisplatině UKF-NB-4(CDDP). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

### Viabilita neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 senzitivní a rezistentní vůči cisplatině



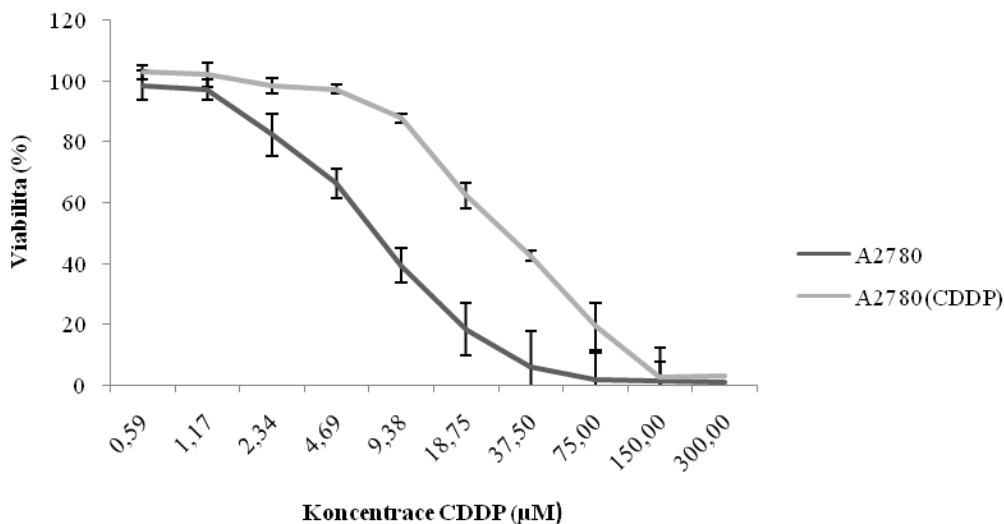
**Obrázek 14:** Viabilita neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 a od ní odvozené linie rezistentní k cisplatině UKF-NB-3(CDDP). Výsledky jsou vyjádřeny jako reprezentativní data jednoho ze tří měření.

### Viabilita neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS senzitivní a rezistentní vůči cisplatině



**Obrázek 15:** Viabilita neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS a od ní odvozené linie rezistentní linie k cisplatině SK-N-AS(CDDP). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

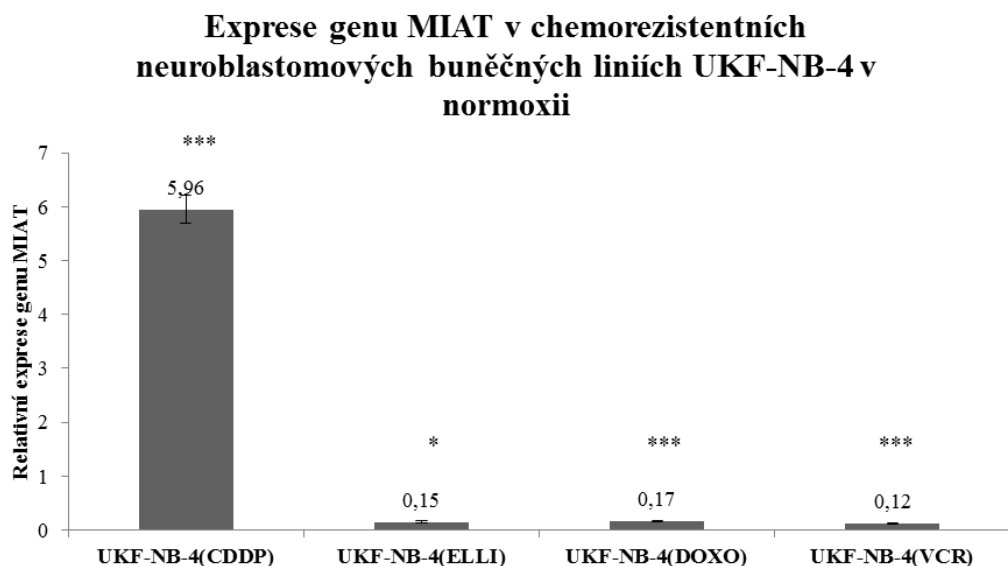
### Viabilita buněčné linie ovariálního karcinomu A2780 senzitivní a rezistentní vůči cisplatině



**Obrázek 16:** Viabilita linie lidského ovariálního karcinomu A2780 a od ní odvozené linie rezistentní k cisplatině A2780(CDDP). Výsledky jsou vyjádřeny jako reprezentativní data jednoho ze tří měření.

#### 4.6. Exprese MIAT v chemorezistentních neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4, UKF-NB-3 a SK-N-AS v normoxii

Pro zjištění exprese MIAT v chemorezistentních neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4<sup>CDDP</sup>, UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>, UKF-NB-4<sup>DOXO</sup> a UKF-NB-4<sup>VCR</sup> byly buňky kultivovány na Petriho miskách o ploše 22 cm<sup>2</sup> v počtu 800 000 buněk na misku ve 4 ml média po dobu 48 hodin. Z těchto buněk byla izolována RNA, přepsána pomocí reverzní transkripce do komplementární DNA (cDNA) a exprese genu MIAT byla analyzována pomocí RT-qPCR. Obrázek 17 znázorňuje výslednou relativní expresi genu MIAT pro všechny varianty.

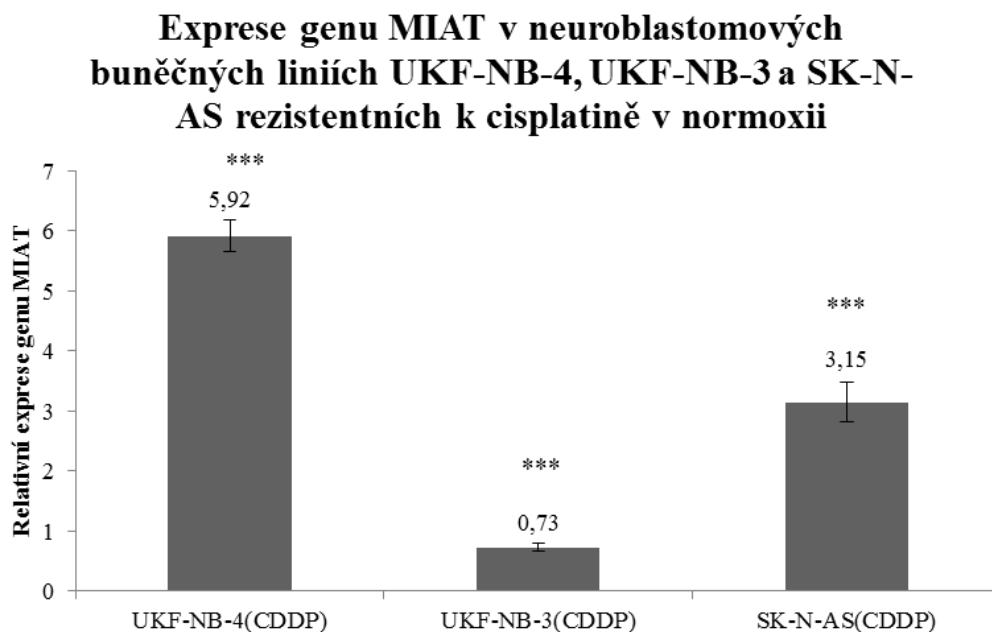


**Obrázek 17:** Relativní exprese genu MIAT rezistentní neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 v normoxii vztaženo vůči senzitivní linii (relativní exprese genu MIAT v senzitivní linii je rovna jedné) ve shodném čase kultivace. Linie UKF-NB-4(CDDP) představuje linii rezistentní k cisplatině, UKF-NB-4(ELLI) k elipticinu, UKF-NB-4(DOXO) k doxorubicinu a UKF-NB-4(VCR) k vinkristínu. Hodnoty jsou výsledky dvou nezávislých experimentů a vyhodnoceny pomocí programu REST 2009. Signifikance  $p < 0,05$  znázorněna \*, signifikance  $p < 0,001$  znázorněna \*\*\*. U UKF-NB-4(CDDP) se jedná o signifikantní zvýšení exprese a v případech UKF-NB-4(ELLI), UKF-NB-4(DOXO) a UKF-NB-4(VCR) dochází k signifikantnímu snížení exprese.

Jak je z obrázku 17 patrné exprese genu MIAT je výrazně zvýšena u neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 rezistentní k cisplatině v porovnání se senzitivní linií UKF-

NB-4. U linií UKF-NB-4 rezistentních k elipticinu, doxorubicinu a vinkristinu naopak dochází k snížení exprese MIAT v porovnání se senzitivní linií UKF-NB-4.

Pro zjištění, zda se jedná o specifické zvýšení exprese MIAT u neuroblastomových linií rezistentních k cisplatině, byla stanovena exprese MIAT i u neuroblastomové linie SK-N-AS rezistentní k cisplatině a UKF-NB-3 rezistentní k cisplatině. Obrázek 18 shrnuje expresi MIAT u neuroblastomových liniích rezistentních k cisplatině.



**Obrázek 18:** Relativní exprese genu MIAT rezistentní neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4, UKF-NB-3 a SK-N-AS v normoxii vztaženo vůči senzitivní linii (relativní exprese genu MIAT v senzitivní linii je rovna jedné) ve shodném čase kultivace. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a vyhodnoceny pomocí programu REST 2009. Signifikance  $p < 0,001$  znázorněna \*\*\*. V případech UKF-NB-4(CDDP) a SK-N-AS(CDDP) se jedná o signifikantní zvýšení exprese a v případě UKF-NB-3(CDDP) dochází k signifikantnímu snížení exprese.

U linie lidského ovariálního karcinomu A2780 ani od ní odvozené k cisplatině chemorezistentní linie A2780<sup>CDDP</sup> jsme expresi MIAT neprokázali.

## 5. Diskuze

Chemorezistence je vlastnost buněk, která umožňuje jejich přežití v průběhu cytostatické léčby. Představuje závažnou komplikaci chemoterapie a je jednou z hlavních příčin jejího selhání. Předkládaná diplomová práce je zaměřena na epigenetický mechanismus chemorezistence, a to na dlouhou nekódující RNA MIAT. LncRNA MIAT patří do třídy dlouhých mezigenových RNA (lincRNA), které vykazují odlišné expresní hladiny v primárních nádorech a metastázích v porovnání s příslušnou nenádorovou tkání (Alipoor et al., 2018; Luan et al., 2017; Sha et al., 2018). Nádorově asociované lincRNA proto představují skupinu lincRNA s potenciálem pro onkologickou diagnostiku a moderní terapii, kdy mohou být léčebným cílem.

Naše výsledky naznačují, že kultivační podmínky mají významný vliv na hladinu exprese MIAT. Exprese MIAT signifikantně roste s rostoucím počtem kultivovaných buněk neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4. Co přesně tento jev způsobuje, však zatím neznáme. Možným vlivem je zvýšený stres buněk zapříčiněný nedostatkem prostoru pro růst nebo mezibuněčný kontakt. Zmetabolizování kultivačního média by mohlo rovněž představovat stresující podnět pro buňky. Na základě tohoto výsledku byl proveden experiment za použití kondiciovaného média. Kondiciované médium bylo buňkami UKF-NB-4 připraveno jednak v normoxii a jednak v hypoxii (1% O<sub>2</sub>) a následně v něm byly buňky kultivovány v normoxii. Kondiciované médium signifikantně zvýšilo hladinu exprese MIAT a více zvyšovalo expresi MIAT kondiciované médium produkované v hypoxii. Tento jev by mohl být způsoben vylučováním neznámé látky/látek do média, které by mohly být zapojeny do metabolické dráhy MIAT a tím její hladinu významně zvyšovat. Objasnit, které látky v kondiciovaném mediu se podílí na zvýšení exprese MIAT, lze pomocí proteomické analýzy kondiciovaného média, což však nepředstavuje snadnou úlohu. Extrahované proteiny by byly rozděleny pomocí např. gelové elektroforézy na několik frakcí analyzovaných např. pomocí LC-MS/MS. Na této problematice plánuje Laboratoř biologie solidních nádorů spolupracovat v budoucnu s proteomickou laboratoří.

Dále byla v rámci této práce sledována dynamika exprese MIAT v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 v hypoxii (1% O<sub>2</sub>). Exprese MIAT se signifikantně zvyšuje již po 6 hodinách kultivace v hypoxických podmínkách (1% O<sub>2</sub>) a své maximum dosahuje přibližně po 48 hodinách kultivace v těchto podmínkách.

Pro vztah mezi lncRNA MIAT a hypoxie může nepřímo svědčit častý výskyt mutací této lncRNA u infarktu myokardu (Liao et al., 2016). Srdeční infarkt je vyvolán nekrotizací v důsledku ischemie myokardu, jedná se tedy o stav, kde hypoxie hraje významnou roli. Další indicií je detekce vyšších hladin MIAT u plicních karcinomů u větších primárních nádorů (Li et al., 2016), protože hypoxie bývá přítomna v centru rozsáhlejších nádorů v důsledku špatného prokrvení centrálních partií nádorů (Klener P, 2011). Přímý průkaz zvýšení exprese MIAT v hypoxii v některých nádorových buňkách však podává až tato práce. Posouzení významu této lncRNA pro hypoxií indukovanou chemo- a radiorezistenci bude předmětem další práce, kdy plánujeme využít buňky transfekované siRNA inhibující MIAT.

Pro přiblížení se ke zjištění podílu MIAT na chemorezistenci byla kvantifikována exprese MIAT v chemorezistentních neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4<sup>CDDP</sup>, UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>, UKF-NB-4<sup>DOXO</sup> a UKF-NB-4<sup>VCR</sup> odvozených od senzitivní buněčné linie UKF-NB-4. Tyto chemorezistentní linie se liší ve svém genomu od linie mateřské (Bedrnicek et al., 2005; Procházka et al., 2012). Hladina MIAT byla signifikantně zvýšena v případě linie rezistentní k cisplatině a významně snížena v případech linií rezistentních k ellipticinu, doxorubicinu a vinkristinu ve srovnání se senzitivní linií. Dále byla zjišťována hladina exprese MIAT v neuroblastomových liniích UKF-NB-3 a SK-N-AS a od nich odvozených chemorezistentních liniích k cisplatině UKF-NB-3<sup>CDDP</sup> a SK-N-AS<sup>CDDP</sup>. Signifikantní nárůst byl pozorován v linii SK-N-AS<sup>CDDP</sup> ve srovnání se senzitivní mateřskou linií, tento rozdíl jsme však neprokázali u linie UKF-NB-3<sup>CDDP</sup>. U linie lidského ovariálního karcinomu A2780 a od ní odvozené k cisplatině chemorezistentní linie A2780<sup>CDDP</sup> nebyla zjištěna žádná exprese MIAT. To by mohlo nasvědčovat tomu, že vyšší exprese lncRNA MIAT u buněk rezistentních vůči cisplatině by se mohla vyskytovat pouze u některých nádorů, eventuálně pouze u neuroblastomu. Vyšetření palety buněčných linií odvozených od jiných nádorů včetně chemorezistentních sublinií a později i vzorků nádorů získaných od pacientů plánujeme jako pokračování této studie. Teprve tyto výsledky umožní posoudit, zda je zvýšení exprese MIAT specifické pro chemorezistenci a pro některé nádory.

Není zatím známo, co způsobuje signifikantní zvýšení exprese MIAT u linií chemorezistentních vůči cisplatině. Mezi mechanismy podílející se na rezistenci k cisplatině patří regulace OCT4 (např. v důsledku hypoxie nebo expozice cisplatinou), neschopnost vyvolat expresi PUMA a NOXA, nebo změny v hladinách exprese mikro-RNA jako je miR-17,

miR-106b, miR-302 nebo miR-371 až -373 (Jacobsen et al., 2015). V literatuře je popsáno, že inhibice MIAT vyvolala expresi miR-302 a miR-150 v buňkách rakoviny prsu a OCT4 a NANOG jako cíle miR-302 poklesly při inhibici MIAT (Alipoor et al., 2018). V experimentech provedených v naší laboratoři byla zjištěna zvýšená exprese markerů kmenových buněk OCT4, NANOG a SOX u liniích neuroblastomů rezistentních k cisplatině a vinkristinu (Khalil et al., 2016). Právě exprese znaků kmenových buněk by mohla být příčinou zvýšení exprese MIAT u linií rezistentních vůči cisplatině.

V další části diplomové práce byla pomocí Alamar Blue hodnocena cytotoxicita cisplatinu po 72 hodinách na senzitivní buněčné linie UKF-NB-4, UKF-NB-3, SK-N-AS a A2780 a od nich odvozených chemorezistentních linií k cisplatině UKF-NB-4<sup>CDDP</sup>, UKF-NB-3<sup>CDDP</sup>, SK-N-AS<sup>CDDP</sup> a A2780<sup>CDDP</sup> s cílem potvrdit chemorezistenci vůči cisplatině. IC<sub>50</sub> pro buňky UKF-NB-4 je 16,86 ± 1,79 μM cisplatinu, pro buňky UKF-NB-4<sup>CDDP</sup> 90,25 ± 4,34 μM, pro buňky UKF-NB-3 1,83 ± 0,35 μM, pro buňky UKF-NB-3<sup>CDDP</sup> 23,45 ± 0,73 μM, pro SK-N-AS je rovná koncentraci 7,23 ± 1,33 μM, pro SK-N-AS<sup>CDDP</sup> 27,04 ± 2,61 μM, pro buňky A2780 je koncentrace cisplatinu 5,62 ± 1,07 μM a pro chemorezistentní linii A2780<sup>CDDP</sup> je koncentrace cisplatinu 28,14 ± 0,78 μM. Je tedy patrné, že chemorezistentní buňky jsou schopné přežít při vyšší dávce cisplatinu.

## 6. Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývala významem exprese lncRNA MIAT jako epigenetického mechanismu pro možný vznik rezistence lidské neuroblastomové linie UKF-NB-4, UKF-NB-3, SK-N-AS a od nich odvozených linií rezistentních k cisplatině UKF-NB-4<sup>CDDP</sup>, UKF-NB-3<sup>CDDP</sup> a SK-N-AS<sup>CDDP</sup>.

V práci byly získány následující poznatky:

- Exprese MIAT v senzitivní neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 v hypoxii (1% O<sub>2</sub>) je závislá na kultivačních podmínkách. Exprese MIAT se zvyšuje se zvyšujícím se počtem kultivovaných buněk. Kondiciované médium získané z této linie kultivovaných jak v normoxických, tak i v hypoxických podmínkách signifikantně zvyšuje expresi MIAT, přičemž zvýšení je vyšší po hypoxickém kondiciovaném médiu.
- Exprese MIAT je signifikantně zvýšena již po 6 hodinách kultivace neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 v hypoxii (1% O<sub>2</sub>).
- Exprese MIAT je signifikantně zvýšena v neuroblastomové buněčné linii rezistentní k cisplatině UKF-NB-4<sup>CDDP</sup> a SK-N-AS<sup>CDDP</sup> ve srovnání se senzitivní linií a signifikantně snížena v neuroblastomové buněčné linii rezistentní k ellipticinu UKF-NB-4<sup>ELLI</sup>, k doxorubicin UKF-NB-4<sup>DOXO</sup> a vinkristinu UKF-NB-4<sup>VCR</sup> ve srovnání se senzitivní linií.
- Metodou Alamar Blue jsme ověřili chemorezistenci používaných linií UKF-NB-4, UKF-NB-4<sup>CDDP</sup>, UKF-NB-3, UKF-NB-3<sup>CDDP</sup>, SK-N-AS, SK-N-AS<sup>CDDP</sup>, A2780 a A2780<sup>CDDP</sup>.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abdullah LN, Chow EK-H, (2013): *Clin. Transl. Med.* 2, 3.
- Alipoor FJ, Asadi MH, Torkzadeh-Mahani M, (2018): *J Cell Biochem.* (Accepted Article).
- Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D et al., (2007): *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, USA, New York .
- Azab AK, Hu J, Quang P et al.,(2012):*Blood* 119, 5782–94.
- Banerjee T, Chakravarti D, (2001): *Molecular and cellular biology* 31, 4858–4873.
- Bannister J, Miska E, (2000): *Cellular and molecular life sciences* 57, 1184–1192.
- Bannister AJ, Kouzarides T, (2011): *Cell research* 21, 381–395.
- Barnes PJ, Adcock IM, Ito K, (2005): *European respiratory journal* 25, 552– 563.
- Bedrnicek J, Vicha A, Jarosova M et al., (2005): *Neoplasma* 52 (5), 415-9.
- Bhatia M, Karlenius TC, Trapani G et al., (2013): *The Interaction Between Redox and Hypoxic Signalling Pathways in the Dynamic Oxygen Environment of Cancer Cells.* © The Author(s), ISBN 978-953-51-0945-7.
- Brasseur K, Gévry N, Asselin E, (2017): *Oncotarget* 8, 4008–42.
- Brock A, Chang H, Huang S, (2009): *Nat. Rev. Genet.* 10, 336-42.
- Chang HH, Hemberg M, Barahona M et al., (2008): *Nature* 453, 544-47.
- Chapman-Smith A, Lutwyche JK, Whitelaw ML, (2004):*J Biol Chem.* 279, 5353–62.
- Chooniedass-Kothari S, Emberley E, Hamedani MK, (2004): *FEBS Lett* 566 (1–3), 43–47.
- Cornelison R, Llana DC, Landen CN, (2017): *Int. J. Mol. Sci.* 18 (10), 2171.
- Costa FF, (2010): *Bioessays* 32(7), 599–608.
- Covello KL, Kehler J, Yu H et al.,(2006):*GenesDev* 20(5), 557-70.
- Cree IA, Charlton P, (2017): *BMC Cancer* 17, 10.
- Dastidar EG, Dzeyk K, Krijgsveld J et al., (2013): *PloS one* 8, 1–12.
- Déry MA, Michaud MD, Richard DE, (2005):*Int J of BiochemCell Biol.* 37(3), 535-40.
- Dinant C, Houtsmuller AB, Vermeulen W, (2008): *Epigenetics & chromatin* 1, 1-13.
- Esquela-Kerscher, (2006): *Nat Rev Cancer* 6(4), 259-69.
- Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, (2008):*Nat Med* 14(7), 723–730.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A et al., (2005): *Nat. Genet.* 37, 391-400.
- Frei E, Karon M, Levin RH et al., (1965): *Blood* 26, 642–56.
- Gabory A, Jammes H, Dandolo L, (2010):*Bioessays* 32(6), 473–480.
- Gilany K, Vafakhah M, (2010): *J ParamedSci* 1, 43-60.

- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE, (2002): *Nat. Rev. Cancer* 2, 48–58.
- Gottesman MM, Pastan IH, (2015): *J. Natl. Cancer Inst.* 107.
- Groenendijk FH, Bernardis R, (2014): *Mol. Oncol.* 8, 1067–83.
- Gupta RA, Shah N, Wang KC, (2010): *Nature* 464(7291), 1071–1076.
- Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G et al., (2011): *Cell* 146, 633-44.
- Guttman M, Amit I, Garber M, (2009): *Nature* 458(7235), 223–237.
- Haga H, Yamada R, Ohnishi Y et al., (2002): *J. Hum. Genet.* 47, 605-10.
- Hampfl F, Rádl S, Paleček J, (2007): *Farmakochemie. VŠCHT* 450 s. ISBN 978-80-7080-639-5.
- Hanahan D, Weinberg RA, (2011): *Cell* 144, 646-74.
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M et al., (2006): *Microbiology and molecular biology reviews* 70, 789–829.
- Heo JB, Sung S, (2011): *Science* 331(6013), 76–79.
- Hottiger MO, (2011): *FEBS letters* 585, 1595–1599.
- Hynie S, (2001): *Farmakologie v kostce*. Triton 520 s. ISBN 80-725-4181-1.
- Hussein-Fikret s, Fuller PJ, (2005): *Mol Cell Endocrinol* 229(1–2), 149–160.
- Iacoangeli A, Lin Y, Morley EJ, (2004): *Carcinogenesis* 25(11), 2125–2133.
- Ishii N, Ozaki K, Sato H et al., (2006): *J hum Genet* 51(12), 1087–1099.
- Ishizuka A, Hasegawa Y, Ishida K et al., (2014): *Genes Cells* 19, 704-721.
- Jacobsen C, Honecker F, (2015): *Andrology* 3 (1), 111-21.
- Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA et al., (1997): *J. Clin. Investig.* 100, 1282–93.
- Kawashima H, Takano H, Sugita S, (2003): *Biochem J* 369, 163–171.
- Khalil MA, Hraběta J, Groh T et al., (2016): *PLoS One.* 11(9).
- Klener P, (2013): *Principy systémové protinádorové léčby*. Grada ISBN 978-80-247-4171-0.
- Klener P, (2011): *Základy klinické onkologie*. Galén 96 s. ISBN 978-80-7262-716-5.
- Kouzarides T, (2007): *Cell* 128, 693–705.
- Kusenda B, Pospíšilová Š, (2006): *Neurol. pro praxi* 2, 69–71.
- Lanz Rb, McKenna NJ, Onate sA, (1999): *Cell* 97(1), 17–27.
- Li DS, Ainiwaer JL, Sheyhiding I et al., (2016): *Eur Rev Medi Pharmacol Sci* 20, 2285-95.
- Li E, (2002): *Nature reviews Genetics* 3, 662–673.
- Liao J, He Q, Li M et al., (2016): *Gene* 278, 158-61.
- Lin JH, Lu AY, (2001): *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 535.

- Ling KS, Chen GD, Tsai HJ et al., (2005): *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 44, 209–17.
- Loeb LA, (1989): *Cancer Res.* 49, 5489–96.
- Longley DB, Johnston PG, (2005): *J Pathol* 205(2), 275-92.
- Lord EM, Harwell L, Koch CJ, (1993): *CancerRes.* 53, 5721–26.
- Luan T, Zhang X, Wang S, (2017): *Oncotarget* 8 (44), 76153-64.
- Lyst MJ, Stancheva I, (2010): *Biochemical Society Transactions* 35, 1389–1392.
- Mattick JS, (2001): *EMBO Rep* 2, 986–991.
- Mattick JS, Amaral PP, Dinger ME, (2009): *Bioessays* 31(1), 51–59.
- Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS, (2009): *Nat. Rev. Cancer* 9, 665–74.
- Minchinton AI, Tannock IF, (2006): *Nat. Rev. Cancer* 6, 583–92.
- Mocellin S, Provenzano M, (2004): *J Transl Med.* 22; 2 (1), 39.
- Národní onkologický program [online]. 2014 [cit. 2.3.2017]. Dostupné z: <http://www.onconet.cz/index.php?pg=aktuality&aid=981>
- Noguera R, Fredlund E, Piqueras M et al., (2009): *ClinCancerRes*15(23), 7130-6.
- Ohnishi Y, Yanaka T, Yamada R et al., (2000): *Hum. Genet.* 106, 288-92.
- Oliviera PA, Colaco A, Chaves R et al., (2007): *An. Acad. Bras. Ciênc.* 79, 4, 593-16.
- Oliveira P, Colaço A, Chaves R et al., (2007): *Biomedical and medical sciences* 79, 1678-2690.
- Orom UA, Derrien T, Beringer M (2010): *Cell* 143(1), 46–58.
- Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H et al., (2003): *Oncogene* 22, 7280–95.
- Pagano A, Castelnuovo M, Tortelli F, (2007): *PLoS Genet* 3(2), e1.
- Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, et al., (2015): *Nature* 521, 489–94.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L, (2002): *Nucleic Acids Research* 30 (9), 36.
- Procházka P, Libra A, Zemanová Z et al., (2012): *Cancer Sci.* 103 (2), 334-41.
- Rao SQ, Hu HL, Ye N et al., (2015): *Schizophr. Res.* 166, 125-30.
- Rédei, GP, (2008): *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics.* Springer, ISBN 978-1-4020-6753-2.
- Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg, M, (2006): *Oncogene* 25, 1679–91.
- Saggar JK, Yu M, Tan Q, (2013): *Front. Oncol.* 3, 154.
- Sana J, Faltejskova P, Svoboda M, (2012): *J Transl Med* 10(1), 103.
- Sassone-Corsi P, (2013): *Science* 339, 148–150.
- Sattari A, Siddiqui H, Moshiri F et al., (2016): *Oncotarget* 34(7), 54174-82.
- Seligson DB, Horvath S, Shi T et al., (2005): *Nature* 435, 1262-66.

- Semenza GL, (2001): *Pediatr Res* 49(5), 614– 617.
- Sha M, Lin M, Wang J et al., (2018): *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 37, 58.
- Sheik MJ, Gaughwin PM, Lim B et al., (2010): *RNA* 16, 324-37.
- Shilatifard A, (2006):*Annual review of biochemistry* 75, 243–269.
- Shipitsin M, Campbell LL, Argani P et al., (2007): *Cancer Cell* 11, 259-73.
- Sims RJ, Nishioka K, Reinberg D, (2003):*Trends in genetics* 19, 629–639.
- Sivdasani RA, (2006): *Blood* 108(12), 3646-53.
- Slíva J, Votava M, (2010): *Farmakologie*. Triton 238 s. ISBN 978-807-3874-247.
- Sone M, Hayashi T, Tarui H et al., (2007): *J Cell Mol Sci* 120, 2498-506.
- Stein LD, (2004):*Nature* 431(7011), 915–916.
- Stiborová M, Mikšanová M, (1999):*Živa* 4, 146-148.
- Stiborová M, Sejbal J, Bořek-Dohalská L et al., (2004): *Cancer Res* 64, 8374- 8380.
- Stratil P, Kubáň V, (2004):*Chem. Listy* 98, 379-387.
- Sueyoshi T, Negishi M, (2001): *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 123–43.
- Šána J, Faltejsková P, Svoboda M et al., (2012): *Klin Onkol* 25(4), 246– 54.
- Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, (2010): *J Pathol* 220(2), 126–139.
- Tahira AC, Kubrusly MS, Faria MF, (2011): *Mol Cancer* 10, 141.
- Tapia G, Diaz-padilla I, (2013): *Ovarian Cancer A Clin. Transl. Update*, 371.
- Tost J, Gut IG, (2017): *Molecular Diagnostics (Third Edition)*, Academic press, 103-39.
- Tsuonda T, Lathrop GM, Sekine A et al., (2004): *Hum. Mol. Genet.* 13, 1623-32.
- Ulveling D, Francastel C, Hube F, (2011):*Biochemie* 93(4), 633–644.
- Vausort M, Wagner DR, Devaux Y, (2014): *Circ. Res.* 115, 688-77.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA et al.,(1995):*ProcNatlAcadSci USA* 92, 5510-14.
- Wang HW, Noland C, Siridechadilok B et al., (2009): *Nature Structural & Molecular Biology.* 16 (11), 1148–53.
- Wenger RH, (2002): *Faseb J* 16(10), 1151– 1162.
- Wilting RH, Dannenberg JH, (2012): *Drug Resistance Updates* 15, 21-38.
- Yan B, Yao J, Liu JY et al., (2015): *Circ. Res.* 116, 1143-56.
- Yang J, Zhang L, Erbel PJ et al., (2005):*J Biol Chem.* 280, 36047–54.
- Yang Z, Zhou L, Wu LM, (2011): *Ann surg Oncol* 18(5), 1243–1250.
- Yap TA, Carden CP, Kaye SB, (2009): *Nat. Rev. Cancer* 9, 167–81.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP et al., (2007): *Dev Biol.* 302(1), 1-12.

Zhang R, Zhang L, Yu W, (2012): *Acta biochim biophys sin* 44(1), 40–47.

Zhang Y, Reinberg D, (2001): *Genes & development* 15, 2343–2360.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno, příjmení a adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka