

Vliv miR-29b na nefrotoxické účinky etoposidu

Mandrla J., Dostál Z., Mgr. Ph.D.

Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP



Úvod

Etoposid patří mezi běžně používaná kancerostatika a v klinické praxi je využíván přes čtyřicet let. Primárním mechanismem účinku etoposidu je inhibice topoisomerázy II, což vede k dvouvláknovým zlomům v DNA. Nejnovější poznatky naznačují, že lze jeho léčebný potenciál ovlivnit pomocí mikroRNA, což jsou krátké molekuly nekódující RNA se schopností ovlivnit expresi až stovek proteinů. Zásadní problém v onkologické praxi však představuje potenciální nefrotoxicita protinádorových léčiv. Proto si tato práce klade za cíl prozkoumat potenciální vliv miR-29b na nefrotoxicitu etoposidu s využitím buněčné linie HEK 293 jako modelu ledvin.

Metodika

Buněčná kultura

V experimentech byla použita buněčná linie HEK 293 (ECACC No. 85120602), která je odvozená z embryonálních buněk ledvin. Pro kultivaci buněk bylo využito Minimum Essential Medium Eagle. Použité médium bylo doplněno o 10 % fetálního bovinního séra, 1 % pyruvátu, 100 j/ml penicilinu, 0,1 mg/ml streptomycinu. Buněčná kultura byla inkubována v atmosféře obsahující 5 % CO₂ při teplotě 37 °C. Buňky byly pasážovány každé 2-4 dny.

MTT

Pro základní vyhodnocení cytotoxicity etoposidu u buněčné kultury HEK 293 byla použita metoda MTT, která umožňuje stanovit viabilitu buněk prostřednictvím schopnosti jejich oxidoreduktáz přeměňovat tetrazoliovou sůl na formazanový produkt. Tento produkt lze stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm. Absorbance tedy reflektuje životaschopnost buněk. Buňky byly den po vyšetí vystaveny etoposidu v rozmezí koncentrací 1-60 μmol/l, tritonu x-100 a DMSO (negativní kontrola) po dobu 24 hodin před měřením.

Transfekce

Buněčná kultura byla transfekována v sérovém médiu po dobu 24 hodin (pre-miR-29b/siRNA/kontrolní RNA), poté byla transfekční směs vyměněna za růstové médium. K liposomální transfekci bylo použito činidlo Lipofectamine 2000.

Systém xCELLigence

K měření cytotoxicity etoposidu byl použit systém xCELLigence. Tento systém stanovuje množství živých buněk prostřednictvím měření impedance zlatými elektrodami umístěnými na dně každé kultivační jamky. Růst buněk na elektrodách způsobuje nárůst impedance. Přírůstek impedance pak systém převádí na Cell index. Buněčná linie byla transfekována prekurzory miR-29b, siRNA nebo negativní kontrolou. Po transfekci byly buňky vystaveny 5 μM etoposidu a inkubovány. Po celou dobu experimentu probíhalo měření každých 15 minut. Výsledkem je zde uvedený graf č. 1, ze kterého byl vypočten doubling time za pomoci vyznačené části křivky.

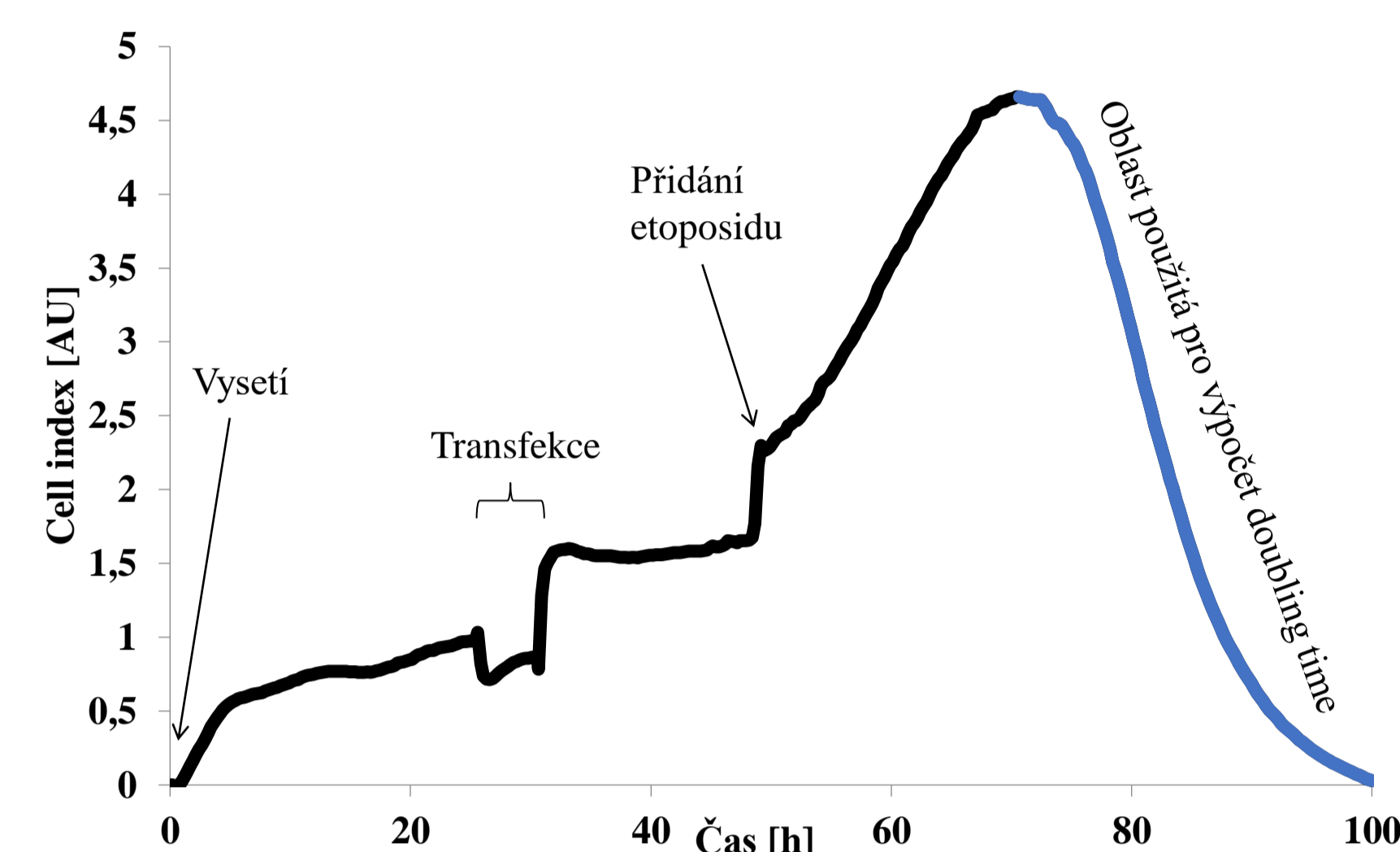
Elektroforéza a Western blot

Pro analýzu exprese proteinů Mcl-1L a Mcl-1S byly využity celkové buněčné lysáty. Separace proteinů byla provedena na 12,5% SDS PAGE gelech. Následně byly proteiny přeneseny na PVDF membrány pomocí přístroje Trans-Blot Turbo.

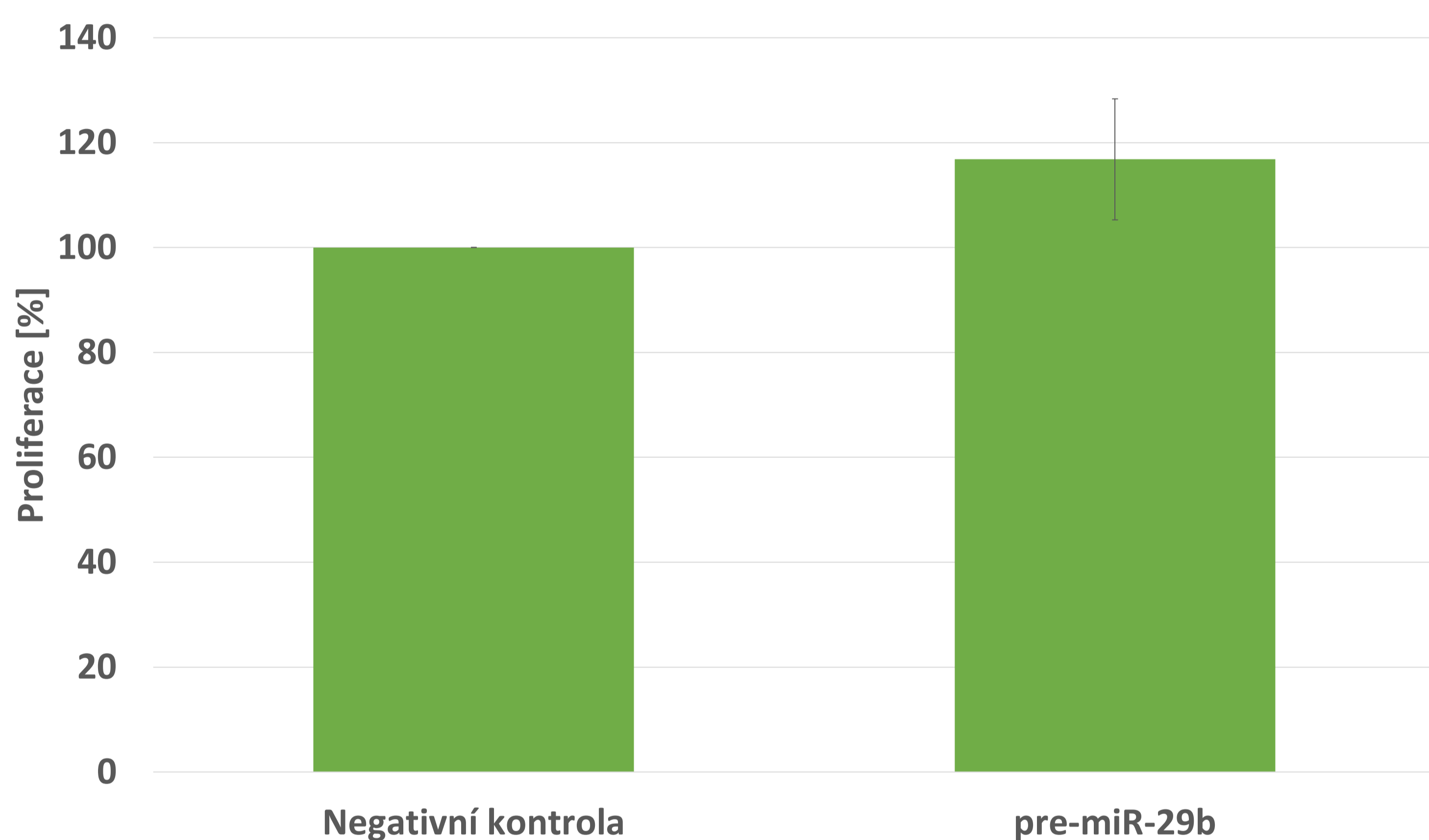
Jednotlivé proteiny byly na membráně detekovány pomocí příslušných primárních protilátek (1:1 000) (Cell signaling) a sekundárních protilátek spojených s HRP (1:10 000). Obsah sledovaných proteinů byl normalizován oproti housekeeping proteinu β-Tubulinu.

Statistická analýza

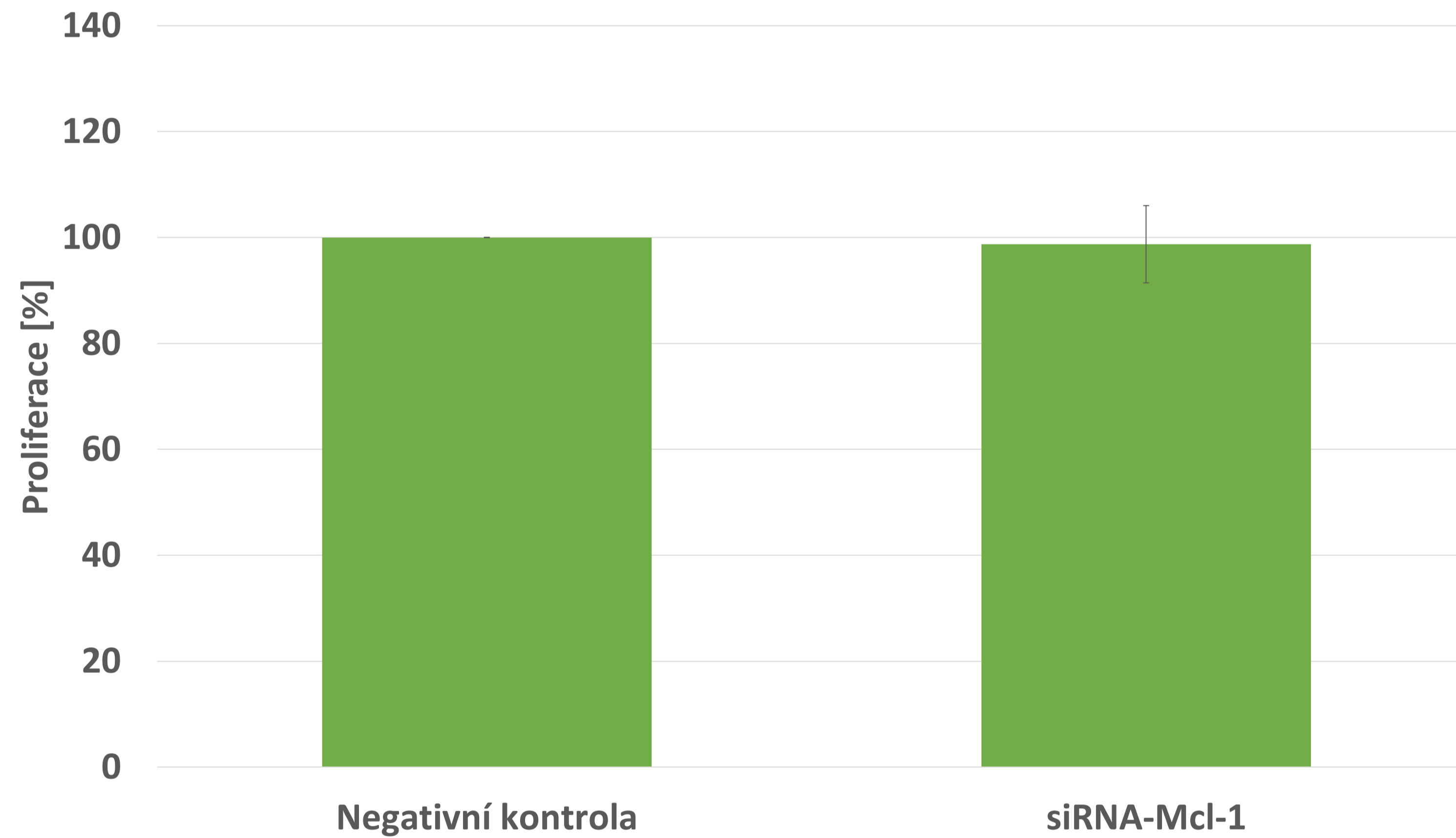
Analýza statistické významnosti byla provedena za pomoci programu Statistica 13. Statistická významnost dat z experimentů byla stanovena studentovým T testem nebo jednofaktorovou ANOVA s Tukeyho posthoc testem.



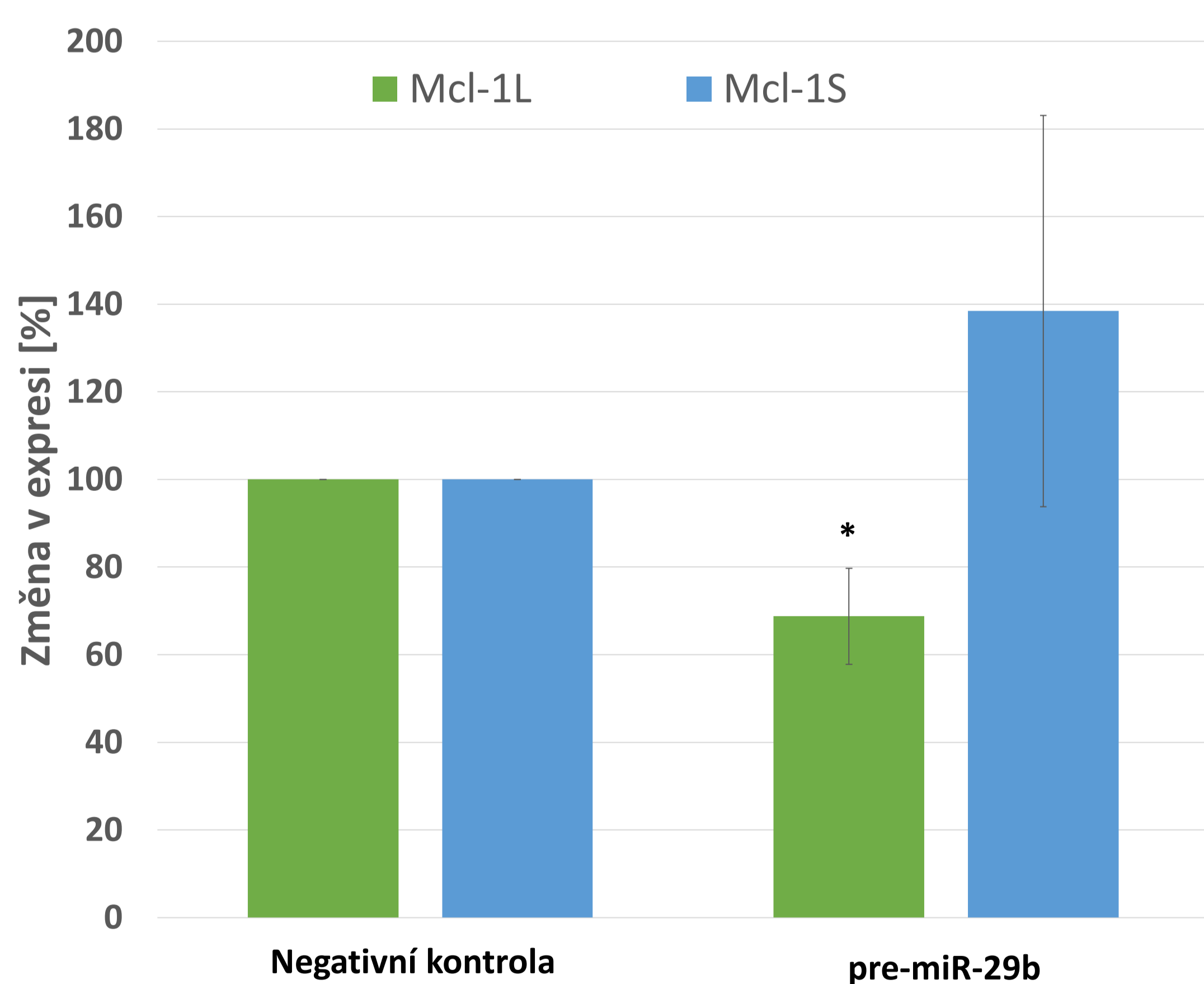
Graf č. 1: Příklad měření v systému xCELLigence. Vyznačená část křivky byla použita pro výpočet doubling time. Skokové změny na křivce odpovídají manipulaci s buňkami.



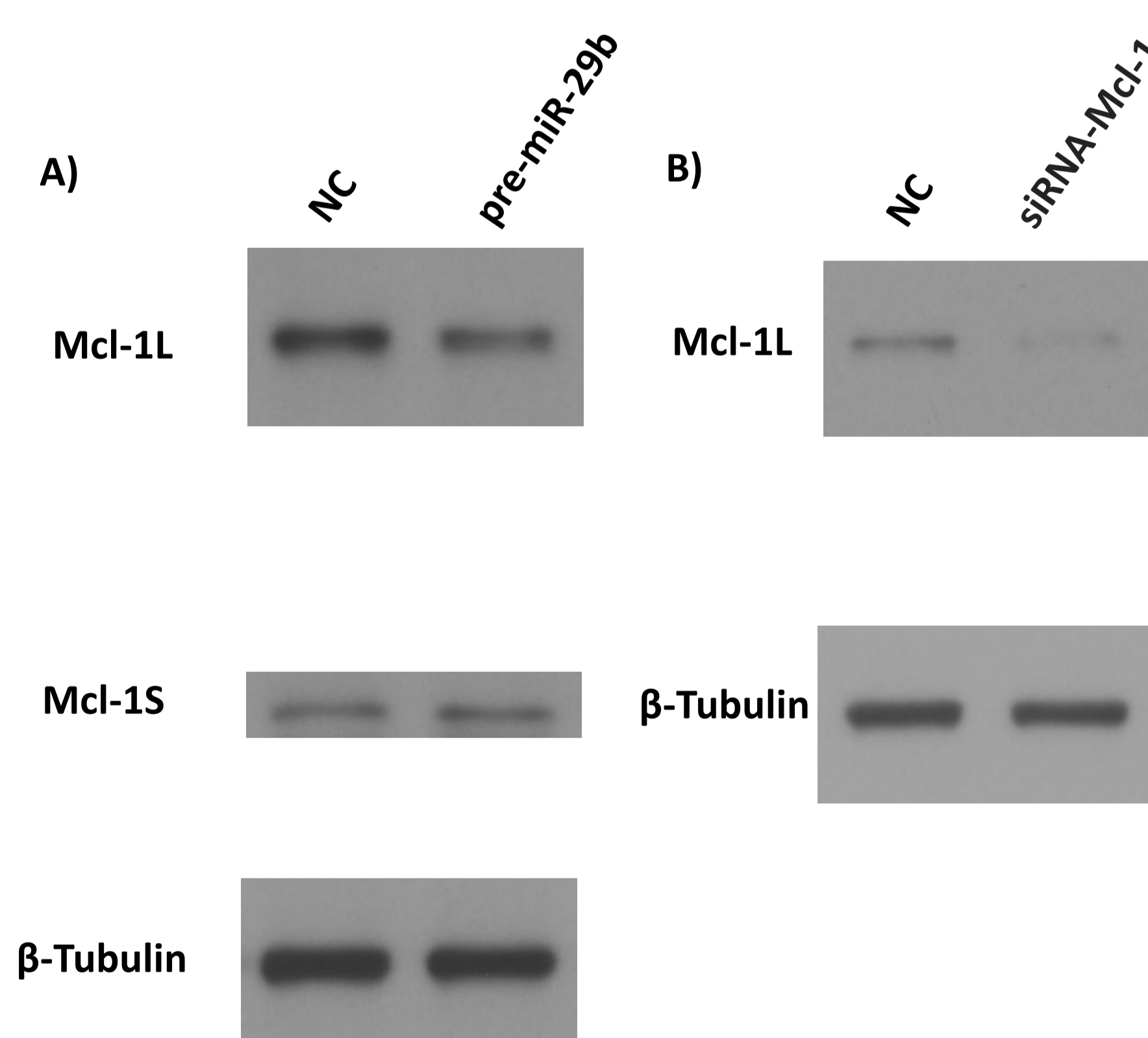
Graf č. 2: Stanovení vlivu transfekce prekurzory miR-29b na cytotoxicitu etoposidu v buněčné linii HEK 293. Buňky HEK 293 byly transfekovány prekurzory miR-29b nebo negativní kontrolou a následně vystaveny 5 μM etoposidu. Data představují průměr ± směrodatnou odchylku tří nezávislých experimentů.



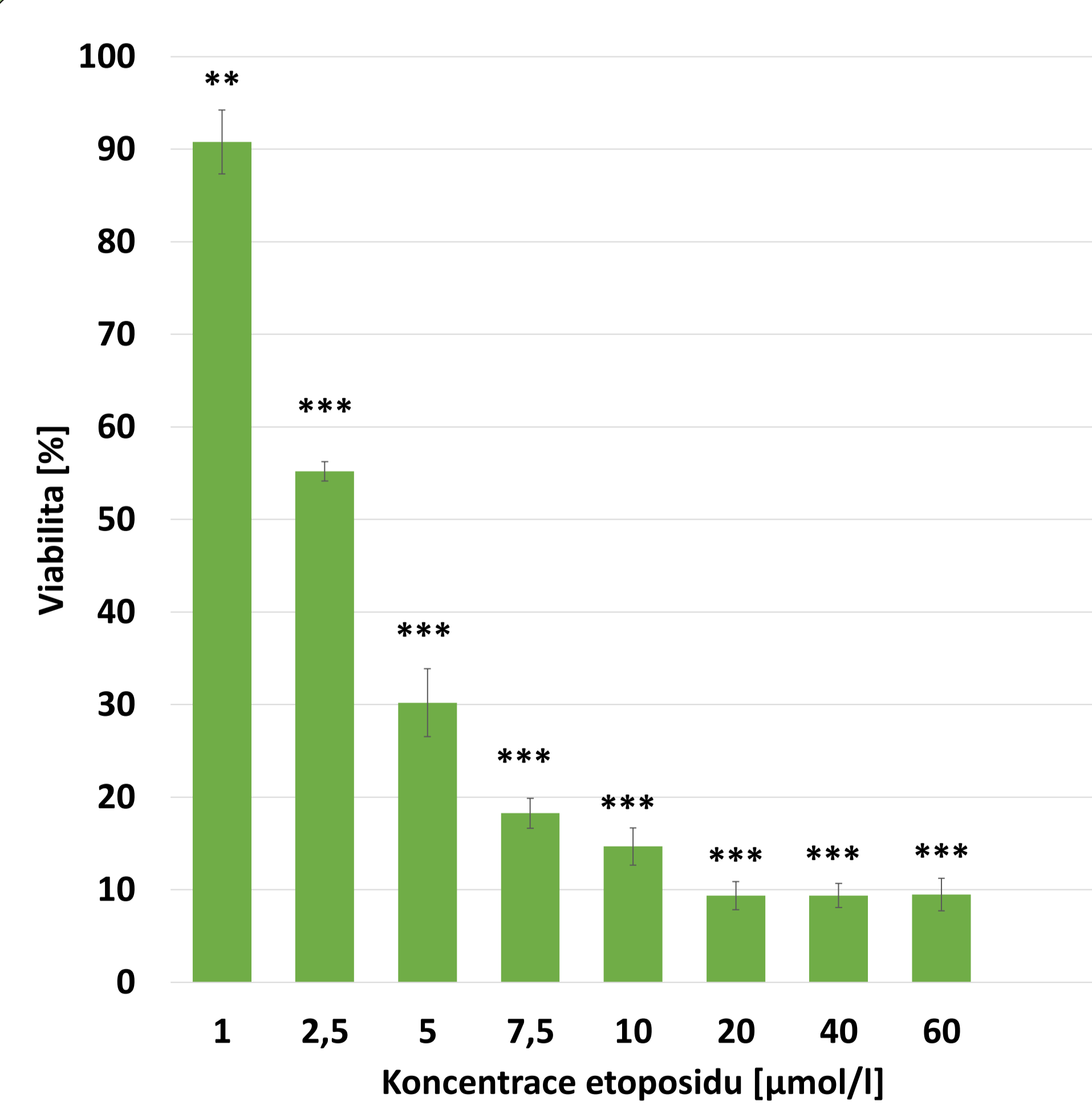
Graf č. 3: Stanovení vlivu transfekce anti-Mcl-1 siRNA na cytotoxicitu etoposidu v buněčné linii HEK 293. Buňky HEK 293 byly transfekovány siRNA proti Mcl-1 nebo negativní kontrolou a následně vystaveny 5 μM etoposidu. Data představují průměr ± směrodatnou odchylku tří nezávislých experimentů.



Graf č. 4: Stanovení vlivu transfekce prekurzory miR-29b na expresi izoforem proteinu Mcl-1. Buňky byly transfekovány prekurzory miR-29b nebo miRNA negativní kontrolou a následně vystaveny etoposidu. Data představují průměr ± směrodatnou odchylku tří nezávislých experimentů. *p < 0,05 proti negativní kontrole.



Obr. č. 1: Reprezentativní Western bloty. Modul A - Efekt transfekce pre-miR-29b na expresi L a S formy Mcl-1. Modul B - Vyhodnocení efektivity transfekce anti-Mcl-1 siRNA.



Graf č. 5: Stanovení cytotoxicity etoposidu pomocí MTT testu. Graf reprezentující výsledky získané metodou MTT při měření cytotoxicity etoposidu pro buněčnou linii HEK 293. **p < 0,01 (**p < 0,001) proti negativní kontrole.

Závěr

- Transfekce buněčné linie HEK 293 pomocí prekurzorů miR-29b nezvyšuje cytotoxicitu etoposidu.
- Výsledky pravděpodobně souvisejí s téměř nulovou odezvou na signály zprostředkované proteinem Mcl-1, což jsme prokázali pomocí siRNA mířené proti Mcl-1.

Literatura

- Kollinerova et al., 2017. MicroRNA hsa-miR-29b potentiates etoposide toxicity in HeLa cells via down-regulation of Mcl-1. *Toxicol. in Vitro* 40, 289–296.
- Jiang et al., 2014. Diverse roles of miR-29 in cancer (Review). *Oncol Rep* 31, 1509-1516.
- Hande, K.R., 1998. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur. J. Cancer* 34, 1514–1521.
- Anai S et al., 2018. Association of nephrotoxicity during platinum-etoposide doublet therapy with UGT1A1 polymorphisms in small cell lung cancer patients, *Lung Cancer*