

Úvod

Etoposid se řadí mezi běžně používaná protinádorová léčiva a v klinické praxi je využíván již více jak čtyřicet let. Jeho hlavním mechanismem účinku je inhibice topoisomerázy II, což vede k dvouvláknovým zlomům v DNA. Nově se ukazuje, že jeho léčebný potenciál lze ovlivnit pomocí mikroRNA, které představují přibližně 22 nukleotidů dlouhé molekuly nekódující RNA, schopné ovlivňovat expresi až stovek proteinů. Cílové proteiny určuje tzv. seed sekvence šesti nukleotidů nacházející se na 5' konci molekuly. Prvním cílem této práce bylo prověřit, zda je účinek miR-29b, tedy navýšení cytotoxicity etoposidu, jedinečný pro buněčnou linii HeLa. Proto byla původní studie rozšířena o kultury buněk Hep G2 a Caco-2. Dalším cílem práce bylo zjistit, jakým mechanismem u těchto buněk efekt vzniká.

Metodika

Buněčné kultury

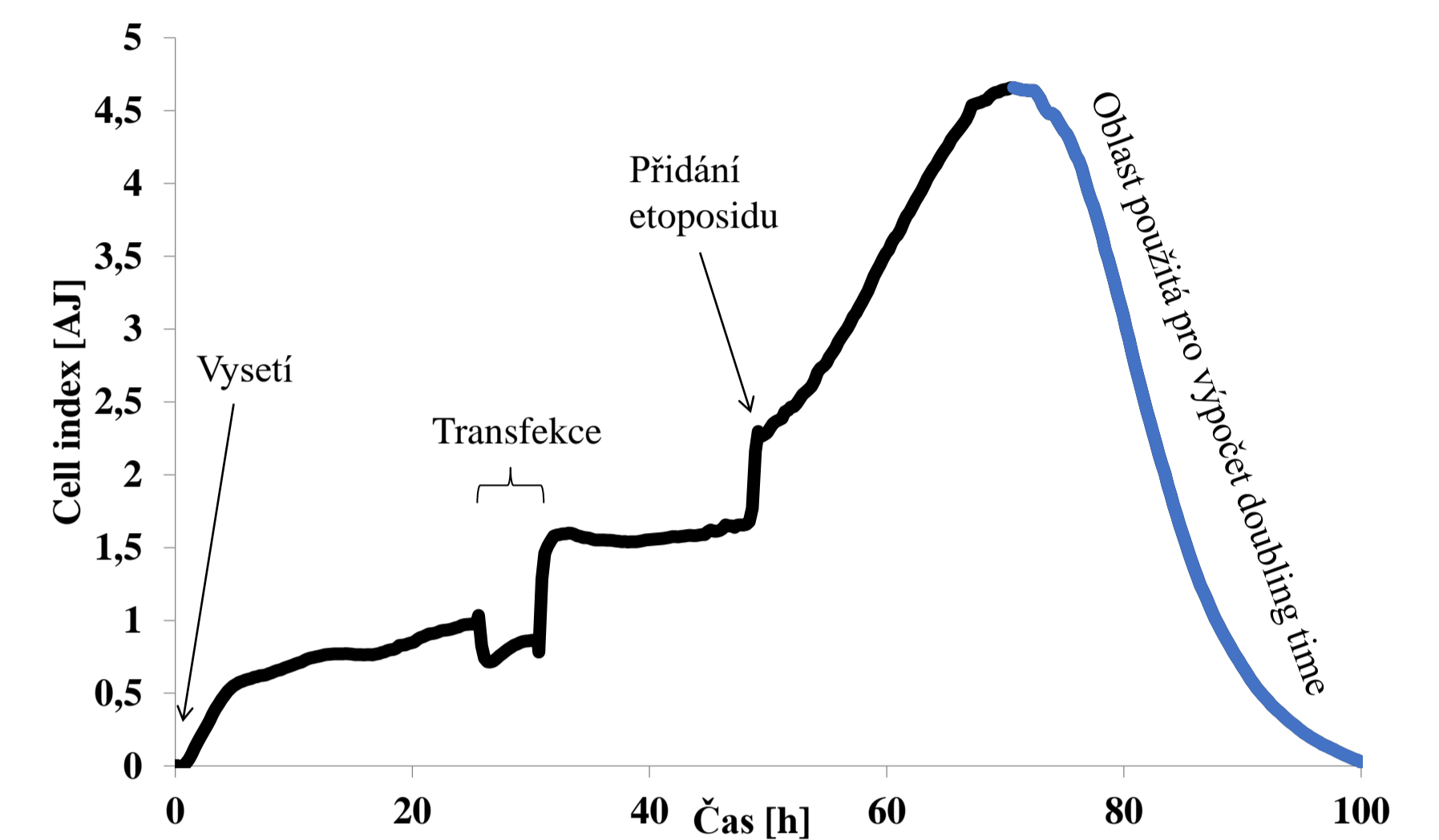
V experimentech byly použity buněčné modely kolorektálního karcinomu Caco-2 (ECACC No. 93021013), hepatoblastomu Hep G2 (ECACC No. 85011430), karcinomu děložního čípku HeLa (ECACC No. 86010202) a jako nenádorová kontrola kardiomyoblasty H9c2 (ECACC No. 88092904). Buňky Hep G2 a H9c2 byly kultivovány v Dulbecco's Modified Eagle Medium – High glucose. Při kultivaci buněk HeLa a Caco-2 bylo využito Minimum Essential Medium Eagle. Obě použitá média byla doplněna o 10 % fetálního bovinního séra, 1 % neesenciálních aminokyselin, 100 j/ml penicilinu, 0,1 mg/ml streptomycinu. Buněčné kultury byly inkubovány v atmosféře s 5 % CO₂ při teplotě 37°C. Pasáž byla provedena každé 2 až 4 dny.

Transfekce

Transfekce buněčných linií prekurzory miR-29b, případně siRNA, byla provedena lipofekcí s použitím transfekčního činidla Lipofectamine 2000. V průběhu transfekce byl dodržován postup doporučený výrobcem. Po šestihodinové inkubaci byla transfekční směs vyměněna za růstové médium. 24 hodin od začátku transfekce byly buněčné modely vystaveny 60 μM etoposidu.

Systém xCELLigence

K měření cytotoxicity etoposidu byl použit systém xCELLigence. Tento systém stanovuje množství živých buněk měřením impedance zlatých elektrod na dnech jednotlivých kultivačních jamek. Při nárůstu buněk na elektrodách impedance těchto elektrod stoupá, což systém převádí na Cell index. Buněčné linie byly transfekovány prekurzory miR-29b, siRNA nebo negativní kontrolou. Po transfekci byly buňky vystaveny etoposidu a inkubovány. Během tohoto procesu celou dobu probíhalo měření každých 15 minut. Výsledkem je zde uvedený graf č. 1, ze kterého byl vypočten doubling time za pomoci vyznačené části křivky.



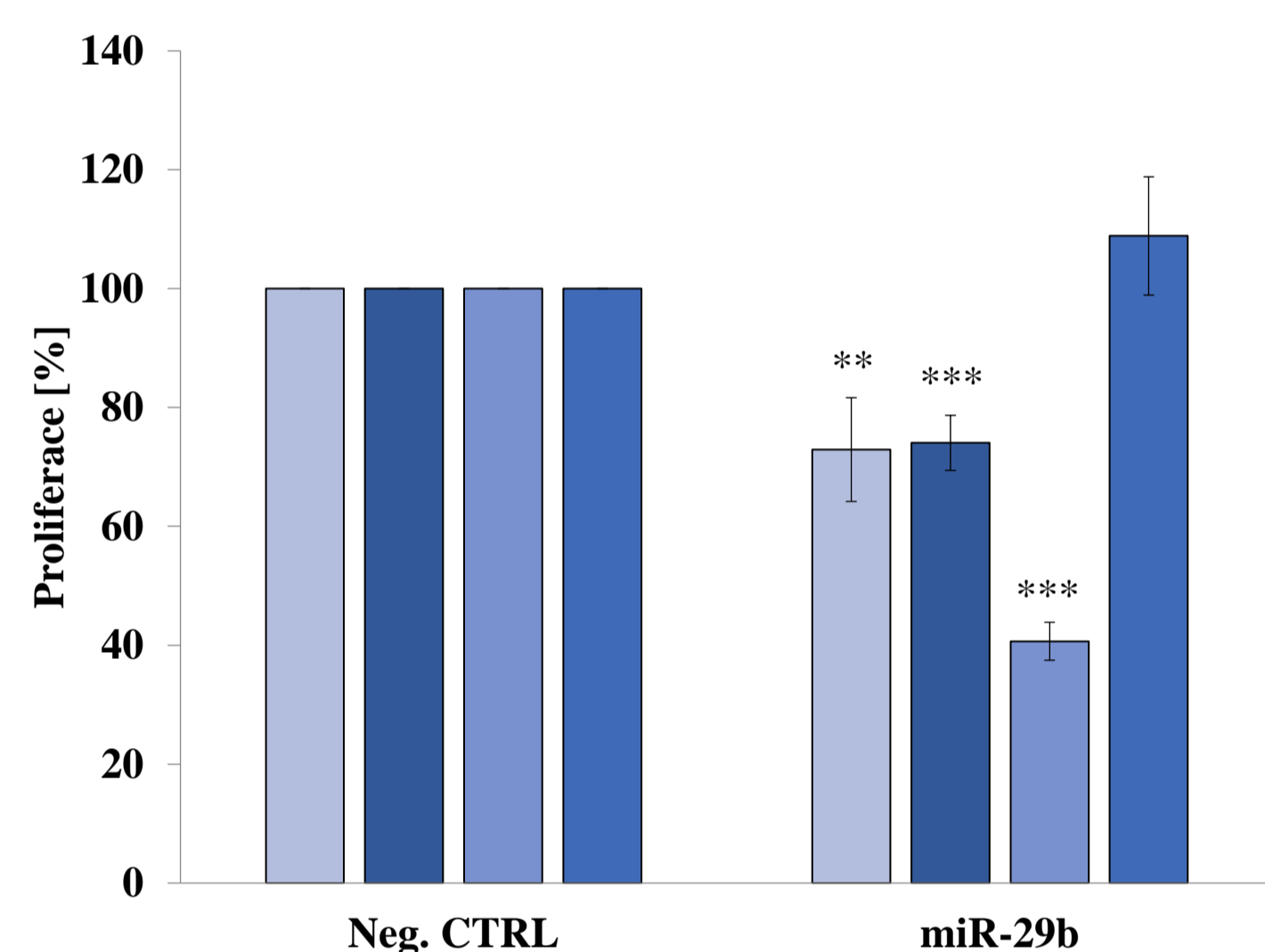
Graf č. 1: Příklad měření v systému xCELLigence. Vyznačená část křivky byla použita pro výpočet doubling time. Skokové změny na křivce odpovídají manipulaci s buňkami.

Elektroforéza a Western blot

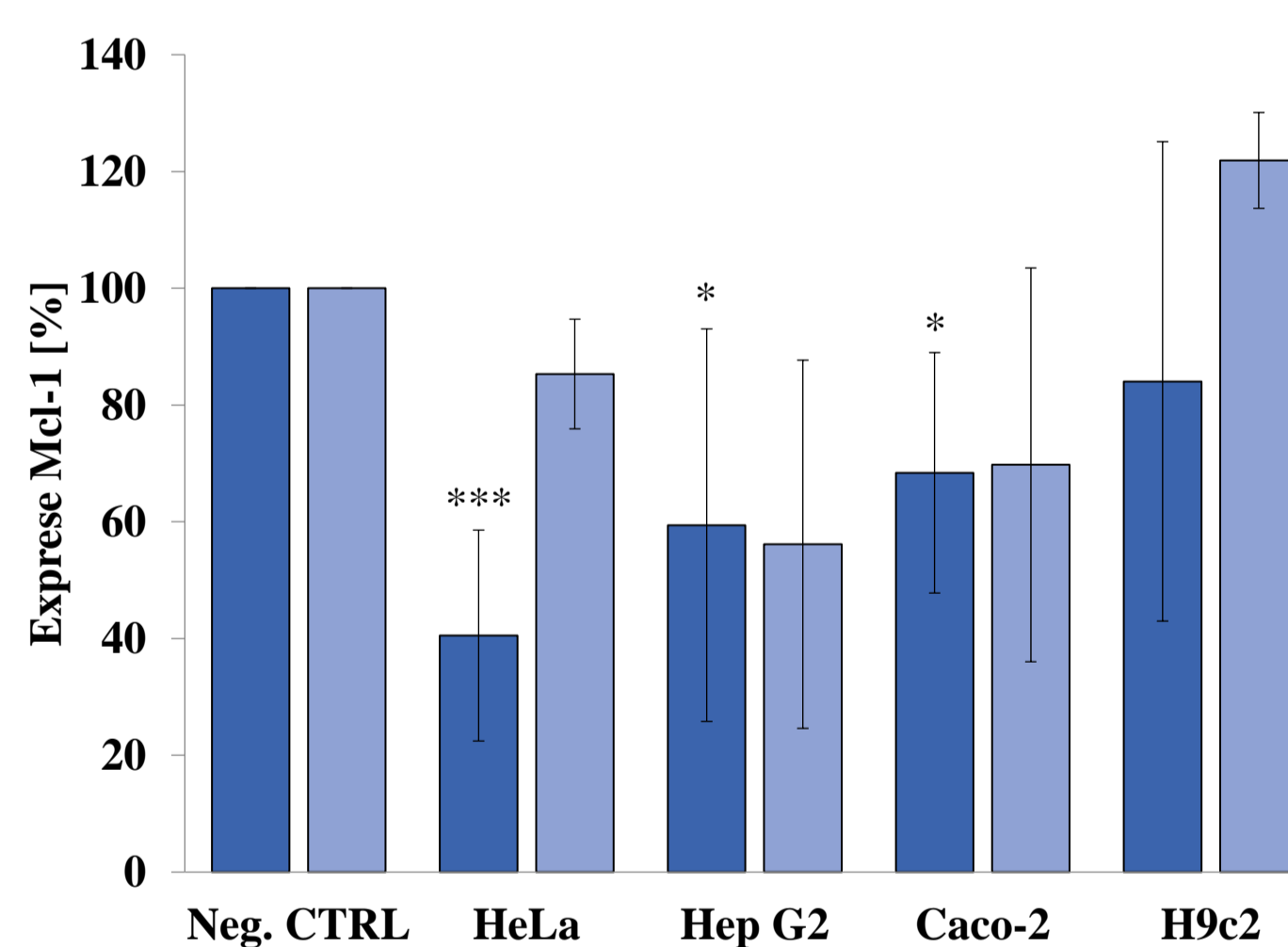
Pro analýzu exprese Mcl-1 a Bcl-2 byly využity celkové buněčné lyzáty. Separace proteinů byla provedena na 7,5%/12,5% SDS PAGE gelech. Následně byly proteiny přeneseny na PVDF membrány pomocí přístroje Trans-Blot Turbo. Jednotlivé proteiny byly na membráně detekovány pomocí příslušných primárních protilátek (1:1 000) (Cell signaling) a sekundárních protilátek spojených s HRP (1:10 000). Expres sledovaných proteinů byla normalizována oproti housekeeping proteinům – GAPDH, β-tubulin.

Statistická analýza

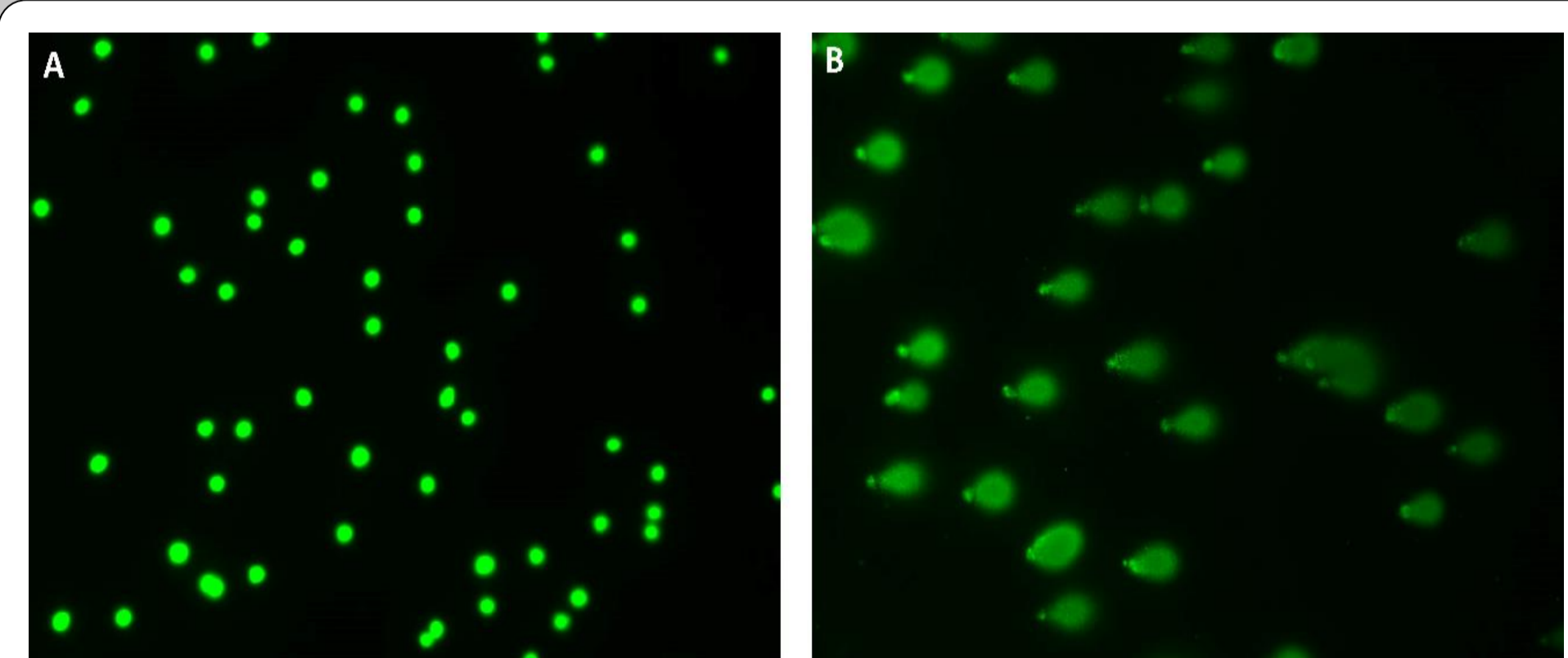
Analýza statistické významnosti byla provedena za pomoci programu Statistica 12. Data z experimentů byla podrobena jednofaktorové ANOVA s Tukeyho posthoc testem.



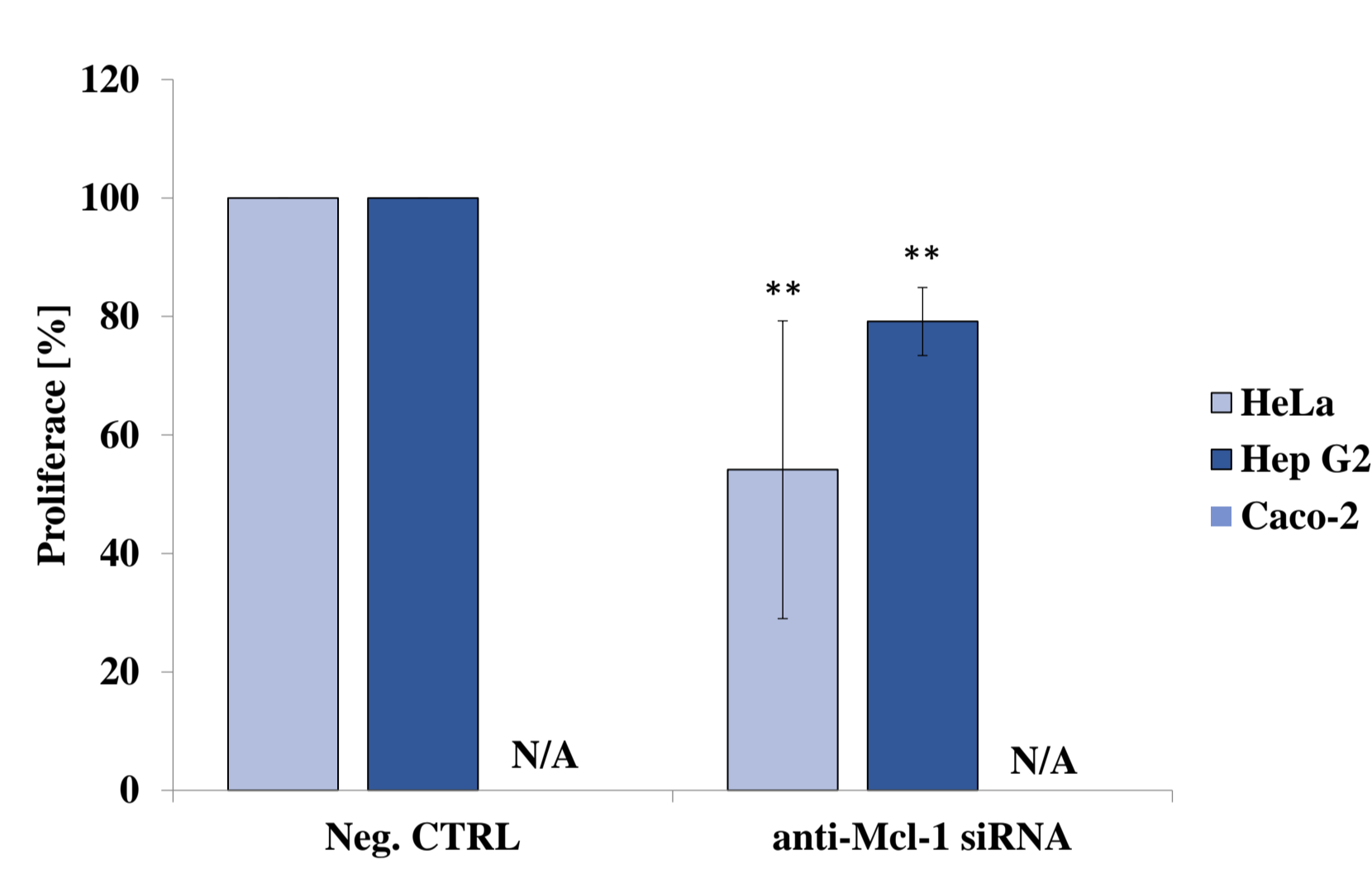
Graf č. 2: Efekt transfekce prekurzory miR-29b na toxicitu etoposidu v jednotlivých buněčných liniích. Buněčné linie byly transfekovány prekurzory miR-29b nebo negativní kontrolou. Po transfekci byly buňky vystaveny etoposidu a inkubovány. Proliferace byla vypočítána z měření v systému xCELLigence pomocí doubling time, jak bylo popsáno výše.



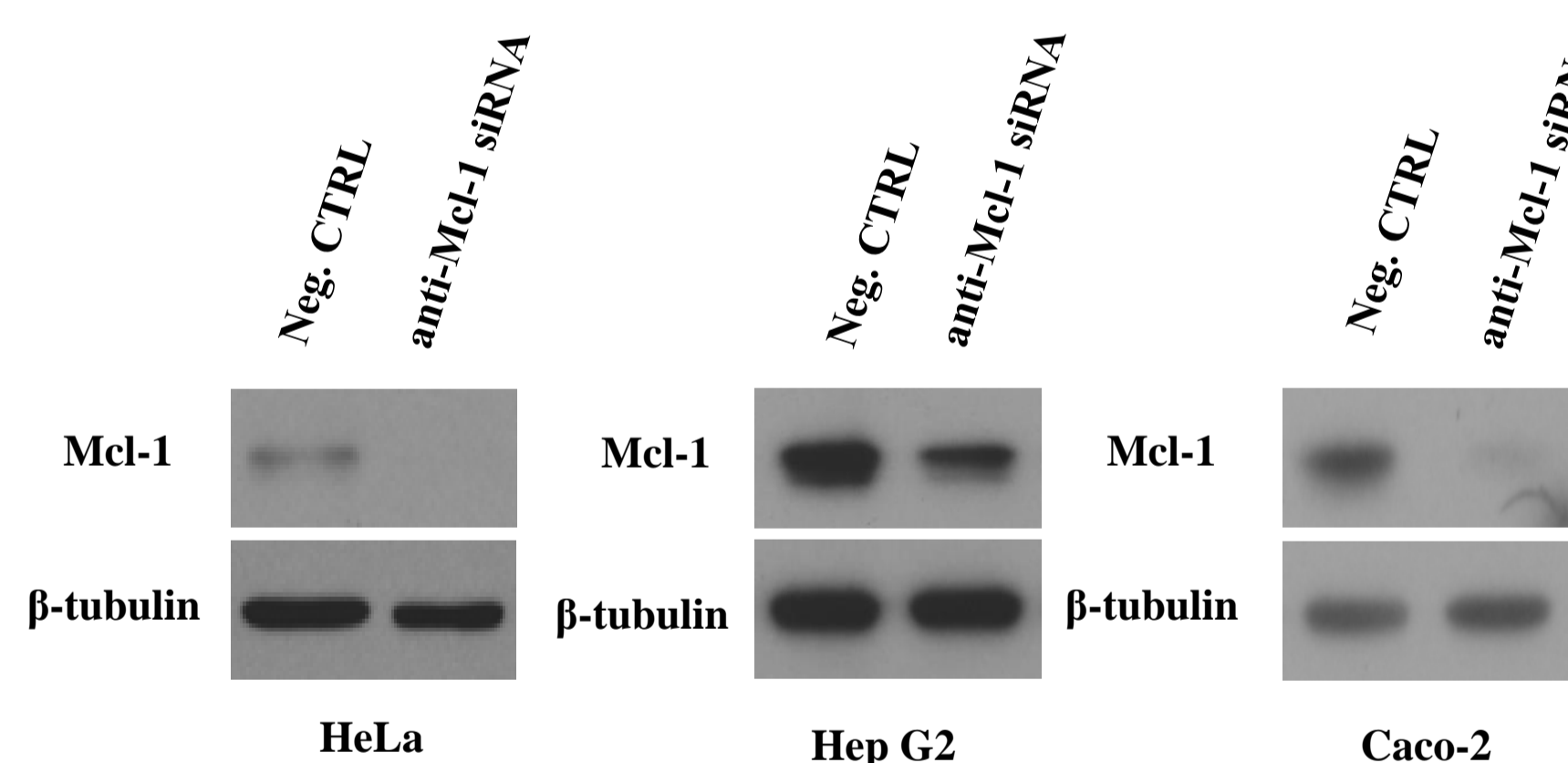
Graf č. 3: Efekt transfekce prekurzory miR-29b na expresi proteinu Mcl-1. Data byla získána metodou Western blot, exprese proteinů byla normalizována k β-tubulinu.



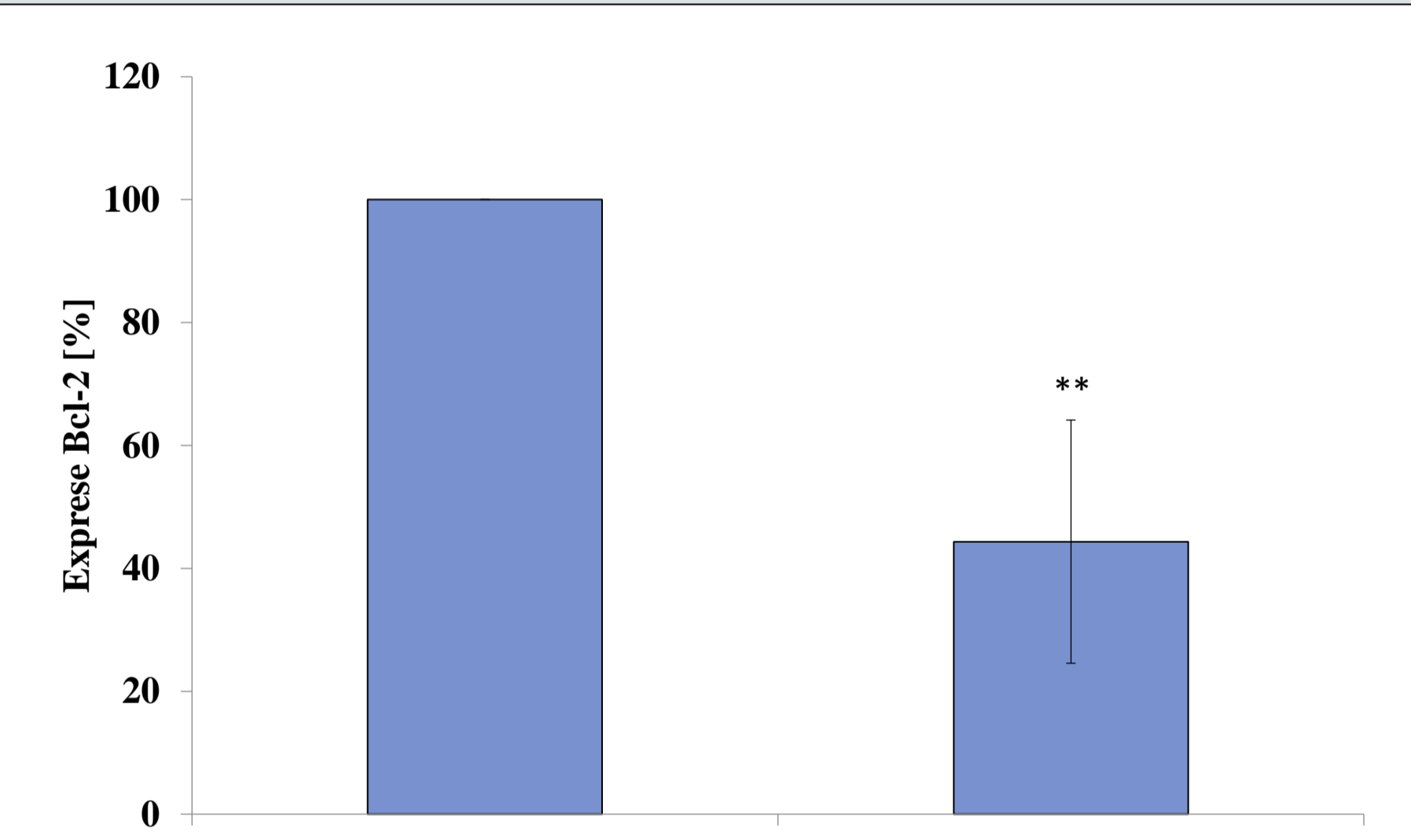
Obr. č. 3: Vliv etoposidu na poškození DNA. Poškození DNA vyvolané etoposidem v použitém experimentálním modelu (HeLa buňky) ve srovnání s neošetřenou kontrolou (aplikováno pouze DMSO). Vyhodnocení bylo provedeno metodou kometové analýzy po 24 hodinové inkubaci s testovaným léčivem. Modul A reprezentuje neošetřenou kontrolu. Modul B reprezentuje vzorek ošetřený etoposidem v koncentraci 60 μM. DNA byla označena sondou Sybr Green naředěnou v poměru 1:10 000 TE pufrém.



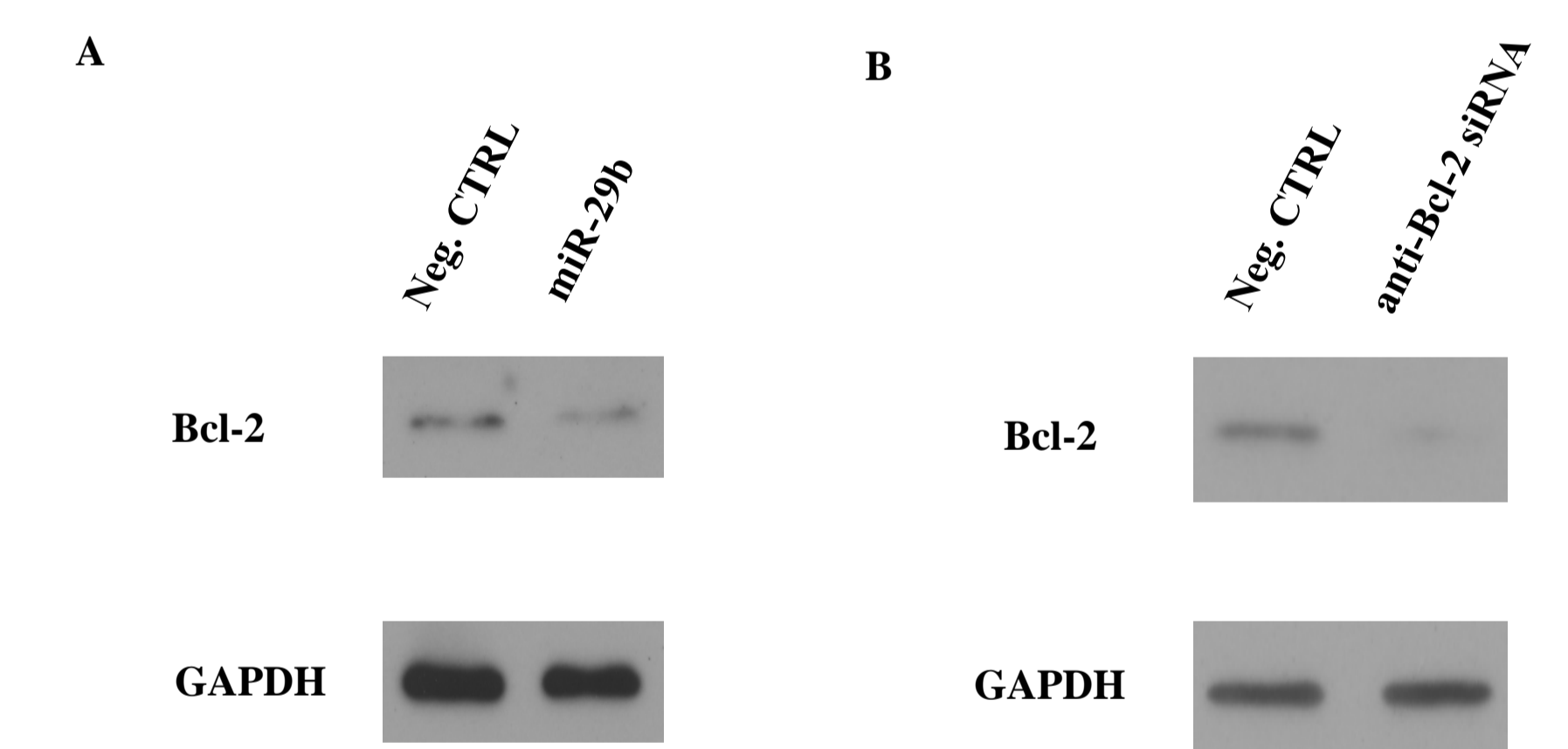
Graf č. 4: Efekt transfekce anti-Mcl-1 siRNA na toxicitu etoposidu v jednotlivých buněčných liniích. Proliferace byla stanovena pomocí systému xCELLigence.



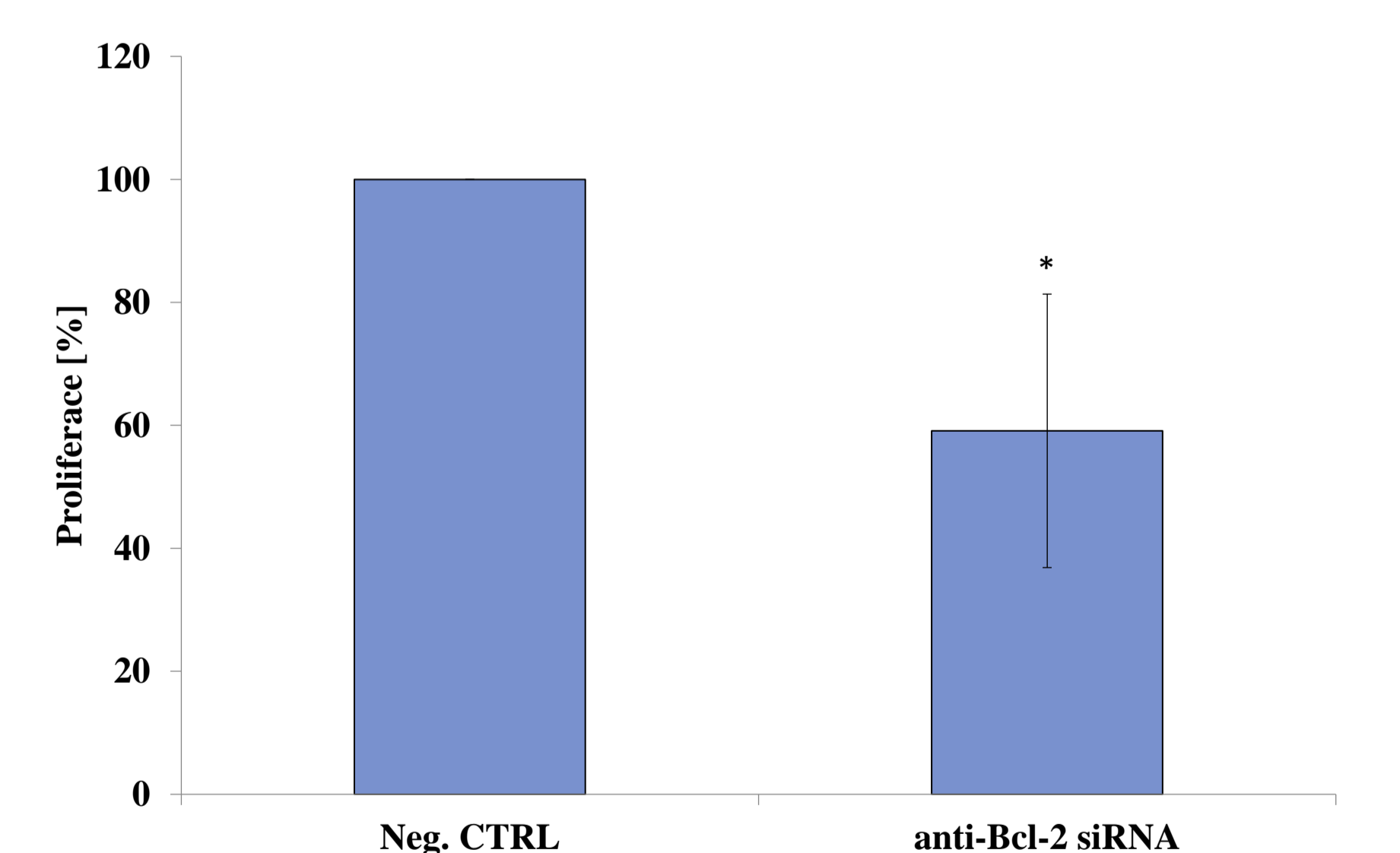
Obr. č. 1: Reprezentativní Western bloty – Evaluace efektivity použité anti-Mcl-1 siRNA v transfekovaných buněčných liniích.



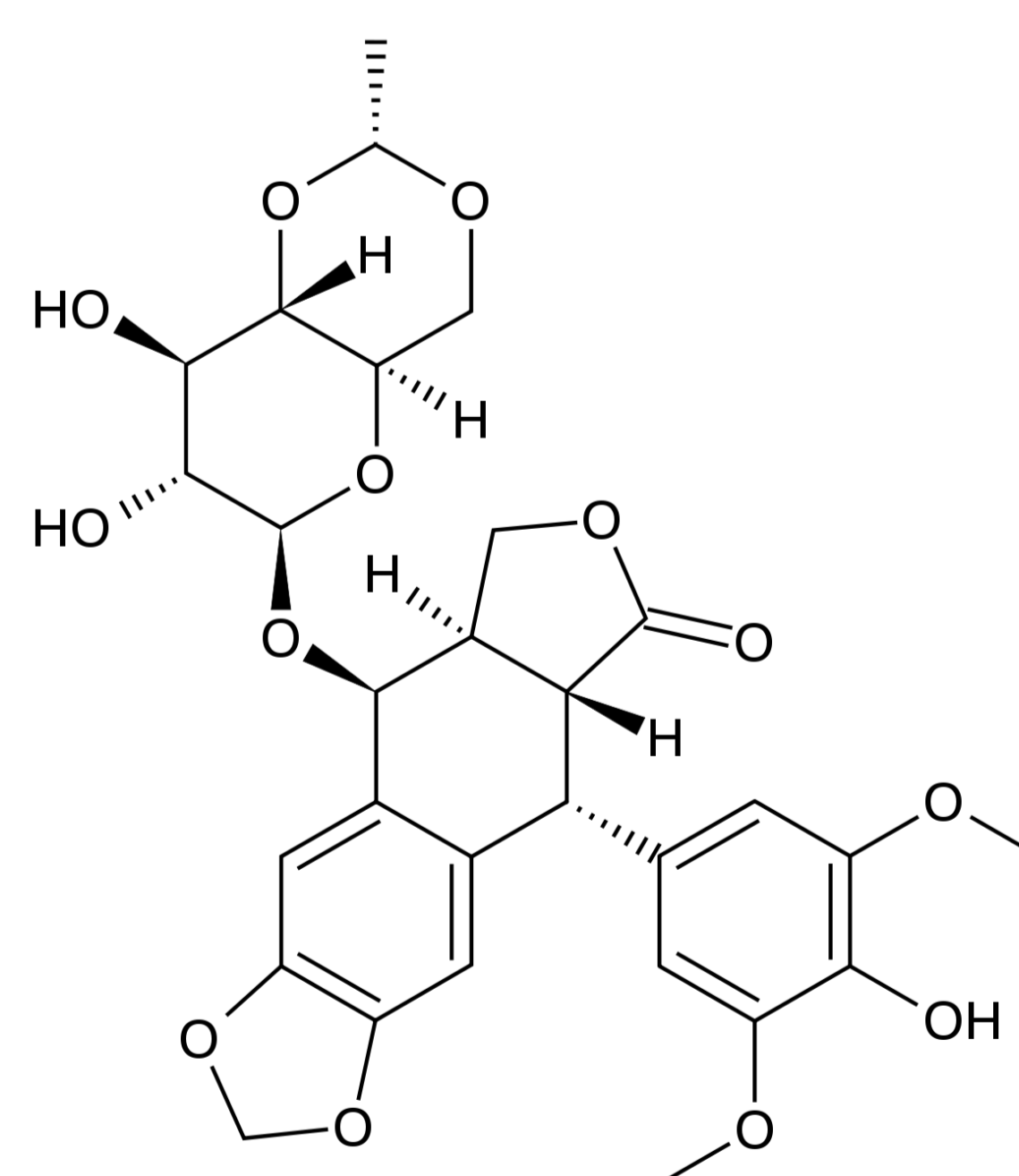
Graf č. 5: Efekt transfekce prekurzory miR-29b na expresi Bcl-2 v buněčné linii Caco-2. Expres proteinu byla změněna metodou Western blot, normalizováno k GAPDH.



Obr. č. 2: Reprezentativní Western bloty. Modul A - Efekt transfekce prekurzory miR-29b na expresi Bcl-2 v buněčné linii Caco-2. Modul B - Evaluace efektivity použité anti-Bcl-2 siRNA v buněčné linii Caco-2.



Graf č. 6: Efekt transfekce anti-Bcl-2 siRNA na toxicitu etoposidu v buněčné linii Caco-2. Proliferace byla stanovena pomocí systému xCELLigence.



Obr. č. 4: Chemická struktura etoposidu.

Závěr

- Efekt miR-29b je přenositelný na buněčné linie Hep G2 a Caco-2.
- U linií Hep G2 a HeLa souvisí biologická aktivita miR-29b se snížením exprese proteinu Mcl-1.
- U linie Caco-2 se aktivita miR-29b pojí s potlačením exprese proteinu Bcl-2.
- U buněčné linie H9c2, představující nenádorový model, byl vliv transfekce miR-29b na toxicitu etoposidu zanedbatelný.

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.
- Lopez-Terrada et al., 2009. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum Pathol* 40, 1512–1515.