

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Filip Petroušek

Příprava syntetických modifikovaných messenger RNA genů kódující
regulátory buněčného cyklu

Generation of synthetic modified mRNAs encoding cell cycle regulators

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Tomáš Koblas, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení:

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

V Praze dne

.....

Poděkování

Velmi bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Tomáši Koblasovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost a za skvělé vedení při vytváření bakalářské práce. Dále pak Mgr. Ivanu Leotovičovi, Ph.D. a Mgr. Kateřině Bittenglové za užitečné rady a pomoc při práci v laboratoři.

Abstrakt

Jedním z moderních léčebných postupů je aplikace *in vitro* transkribované mRNA do cílových buněk za účelem tvorby požadovaných proteinů. Zmíněná metoda se ukázala být daleko efektivnější než terapeutické podání již předem připravených proteinů, kde při jejich vpravení do organismu docházelo k denaturaci. Hlavní náplní této práce byla *in vitro* příprava mRNA, její následná transfekce do buněk Langerhansových ostrůvků a detekce exprese cílových proteinů pomocí metody Western blot. Konkrétně se jednalo o proteiny z rodin cyklinů a cyklin dependentních kináz (CDK), které hrají významnou roli v regulaci buněčného cyklu. Celkem byla připravena mRNA pro 8 molekul, mezi které patřily nemutované formy cyklinů D1, D2 a D3 a cyklinindependentní kináza 6, dále pak mutované verze cyklinů D1 T286AT288A, D2 T280A, D3 T283A a cyklin dependentní kináza 4 R24C. U cyklinů se jednalo o záměnu aminokyseliny threoninu za alanin. Tato záměna má za následek zpomalení degradace proteinu ve srovnání s přirozeně se vyskytující formou. Pro cyklin dependentní kinázu 4 záměna aminokyseliny argininu za cystein také spočívá ve zvýšení její stability *in vivo*. Připravená mRNA kódující uvedené regulátory buněčného cyklu byla transfekována do buněk Langerhansových ostrůvků izolovaných z potkaního pankreatu. Tato metoda by mohla v budoucnu sloužit jako jedna z možností při léčbě diabetu 1. druhu.

Klíčová slova: mRNA, buněčný cyklus, DNA, *In vitro* transkripce

Abstract

One of the modern therapeutic approaches is the application of *in vitro* transcribed mRNA into the target cells to produce the required target proteins. This method has proved to be more effective than therapeutic application of proteins prepared in advance, because their insertion into the organism lead to denaturation. The main task of this work was to prepare mRNA *in vitro* and mRNA transfection into the cells and monitoring the expression of target proteins with the method of Western blotting. The target proteins were from families of cyclins and cyclin-dependent kinases, which play an important role in cell cycle regulation. The mRNAs for 8 types of molecules have been prepared, including non-mutated forms of cyclins D1, D2, and D3, and cyclin-dependent kinase 6, as well were synthesized mutated versions of cyclins D1 T286AT288A, D2 T280A, D3 T283A and cyclin-dependent kinase 4 R24C. As for cyclins, there was a substitution of aminoacid threonine for alanine. This substitution could cause slowdown degradation of proteins in comparision with those existing in natural form. Regarding the cyclin-dependent kinase 4 the exchange of aminoacid arginine for cysteine causes its bigger stability *in vivo*. The prepared mRNA which encodes mentioned regulators of cell cycle was transfected into isolated pancreatic cells of rats. This method could be used as one of the options in treatment of type 1 diabetes in the future.

Key words: mRNA, cell cycle, DNA, *In vitro* transcription

OBSAH

Seznam zkratk	9
1. Teoretický úvod	11
1.1. Diabetes mellitus	11
1.2. Beta-buňka	12
1.3. Buněčný cyklus	14
1.4. Cykliny a cyklin dependentní kinázy	16
1.4.1. Cykliny	16
1.4.2. Cyklin dependentní kinázy	17
1.4.3. Úloha cyklínů a cyklin dependentních kináz v transkripci	17
1.5. Syntetická mRNA	19
1.5.1. 5' čepička	19
1.5.2. Nepřekládané oblasti	20
1.5.3. Otevřený čtecí rámec	21
1.5.4. Poly (A) konec	21
1.5.5. Syntéza mRNA <i>in vitro</i>	22
2. Cíl práce	25
3. Materiál a metody	25
3.1. Použitý materiál a chemikálie	25
3.2. Použité přístroje	29
3.3. Použité metody	30
3.3.1. PCR	30
3.3.1.1. Preparativní PCR	30
3.3.1.2. Analytická PCR	31
3.3.2. Restrikční štěpení	33
3.3.3. Elektroforéza a izolace DNA z gelu	34
3.3.3.1. Elektroforéza po analytické a preparativní PCR	34
3.3.3.2. Izolace DNA z gelu	35
3.3.4. Bezkoncové klonování	35
3.3.5. Transfekce plazmidu do bakterií	40
3.3.6. Stanovení kvality mRNA	41

3.3.7. Western blot	42
3.3.7.1. SDS elektroforéza	42
3.3.7.2. Western blot	44
3.3.8. Izolace plazmidu	46
3.3.9. Syntéza mRNA	47
3.3.10. Transfekce mRNA do buněk potkaních Langerhansových ostrůvků	54
4. Výsledky	55
4.1. Modifikované geny pro cyklíny a CDK	55
4.2. Výsledky ze stanovení kvality mRNA	56
4.3. Výsledky z western blotu	60
5. Diskuse	64
6. Závěr	66
7. Literární zdroje	67

SEZNAM ZKRATEK

ADP	Adenosindifosfát
APC	Anafázi podporující komplex
APS	Peroxodisíran amonný
ATP	Adenosintrifosfát
BSA	Hovězí sérový albumin
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CBD	cyklinový box
Cdk	Cyklin dependentní kináza
Cip/Kip	Cdk iteregující protein/Kinázu inhibující protein
CTD	C-terminální doména
CTP	Citidintrifosfát
dsRNA	Dvouvláknová RNA
DTT	Dithiotrietol
E2F	Rodina transkripčních faktorů
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
eIF4E	Eukaryotický translační iniciační faktor 4E
Ep300/Creb	Histon deacetyláza
Ep300/Crebbp	Histon deacetyláza vážící protein
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid redukována forma
GIP	Gastrický inhibiční polypeptid
GLP-1	Glukagonu podobný peptid
GTP	Guanosintrifosfát
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethylsulfonová kyselina
HRP	Křenová peroxidáza
IFN	Interferon
IFN1	Interferony typu 1
INK4	Rodina inhibitorů CDK (inhibitory CDK4)
IRES	Vnitřního místo pro vstup ribosomu
IVT	<i>In vitro</i> transkripce
IVT mRNA	<i>In vitro</i> transkribovaná mRNA

m ⁷ GpppN	5' čepička
NADH	Nikotinamidadeninukleotid redukována forma
NTP	Nukleosidtrifosfát
ORF	Otevřený čtecí rámeček
p300/Creb	Histon deacetyláza
PABP	Poly(A) vážící protein
PCR	Polymerázová řetězová reakce
pDNA	Plasmidová DNA
PRR	Receptory rozpoznávající vzory
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	Retinoblastomový protein
RD	Represorová doména
RNA Pol II	RNA polymeráza II
SAM	S-adenosyl methionin
SDS	Dodecylsírán sodný
ssRNA	Jednovláknová RNA
TAD	C-terminální transaktivační doména
TBE	Tris/kyselina boritá/EDTA
Tris	Trisaminomenthan
TLR	Toll-like receptor
UTP	Uridintrifosfát
UTR	Nepřekládaná oblast
WHO	Světová zdravotnická organizace
ψ	Pseudouridin
5mCTP	5-methylcytosintrifosfát
5mUTP	5-methylpseudouridintrifosfát

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus je klinický syndrom spojovaný s nedostatečnou sekrecí inzulínu nebo s jeho špatnou účinností a jedná se o jednu z největších hrozeb pro zdraví 21. století (Atkins a Zimmet 2010). Světová zdravotnická organizace WHO udává, že na celém světě žije 422 milionů diabetiků. Ovšem existuje celosvětově dlouhodobý cíl zastavit nárůst počtu lidí s diabetem a obezitou do roku 2025 (<https://www.who.int/health-topics/diabetes>).

Diabetes mellitus je jednou z hlavních příčin předčasné smrti, ischemické choroby srdeční, infarktu myokardu, mrtvice, periferních cévních onemocnění, amputací končetin, slepoty a selhání ledvin (Campbell-Thompson a kol. 2013, von Herrath a kol. 2013).

Rozlišujeme 2 základní typy diabetu. Diabetes mellitus prvního typu vzniká buď spontánně nebo pomocí podnětů z vnějšího prostředí. Jedná se o autoimunitní onemocnění, které postihuje beta-buňky pankreatu a způsobuje jejich úbytek a také nefunkčnost. U diabetu prvního typu trvá přibližně 3 až 5 let, než se projeví první klinické příznaky a může se znovu obnovit i po transplantaci Langerhansových ostrůvků (Campbell-Thompson a kol. 2013, von Herrath a kol. 2013). Diabetes mellitus druhého typu je důsledkem rezistence určitých cílových orgánů a tkání na insulin, jedná se především o játra, svalovou tkáň a adipocyty jako součást tukové tkáně (Wang a kol. 2015).

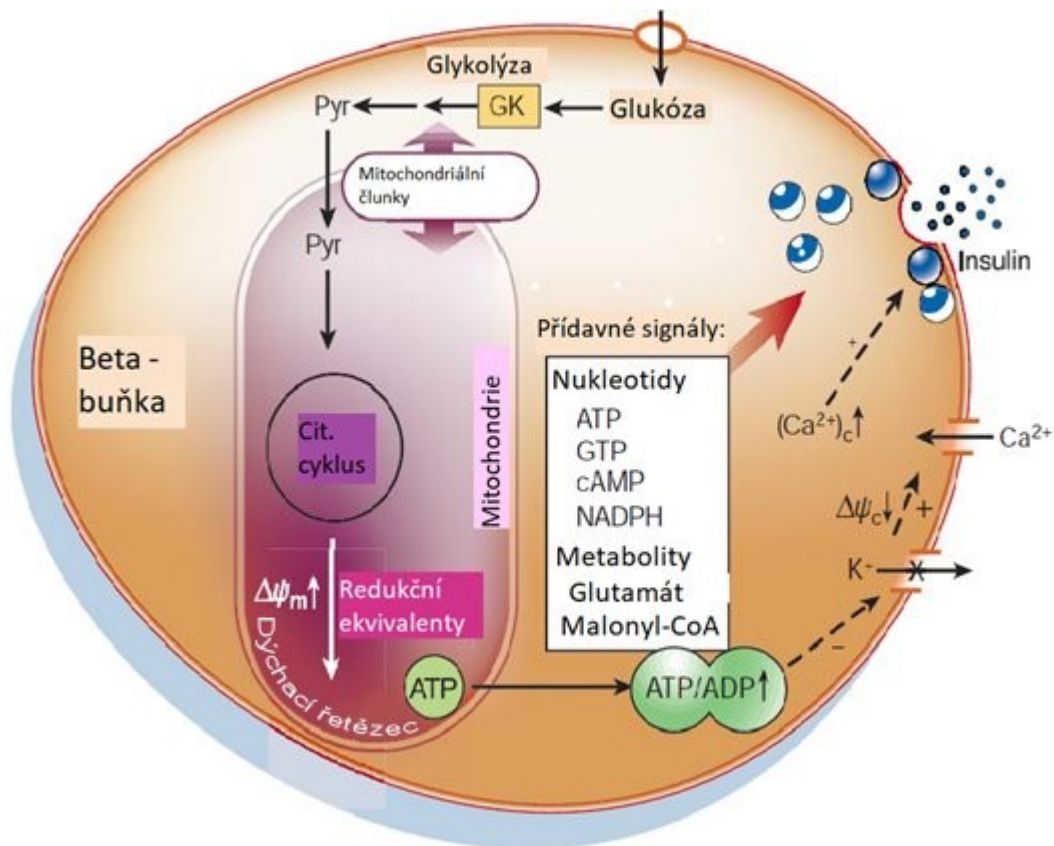
1.2. BETA-BUŇKA

Beta-buňky jsou buňky, které nalezneme jako součást Langerhansových ostrůvků ve slinivce břišní. Beta buňky tvoří většinou 50 až 70 % ze všech buněk Langerhansových ostrůvků u člověka. Jednou z jejich hlavních funkcí je, že syntetizují a následně produkují insulin s amylinem (Maechler a Wollheim 2001).

Hladina glukózy v krvi je kontrolována sekrecí insulinu produkovaného beta-buňkami a jeho následnou aktivitou v játrech a svalové tkáni, ale také v ostatních tkáních. Množství vyprodukovaného insulinu je přímo úměrné množství glukózy v krvi (Gray 1999).

Glukóza se do beta buňky dostane usnadněnou difuzí pomocí přenašečů (GLUT1 nebo GLUT2) přes membránu (Fridlyand a Philipson 2010). Následně je fosforylována na glukóza-6-fosfát pomocí glukokinázy. Následuje glykolýza a vznik pyruvátu, jehož množství je dáno množstvím glukózy v buňce (Matschinsky 1996, Newgard a Mcgarry 1995). Dodávání cytosolického NADH je nutné k udržení vysoké rychlosti glykolýzy a je zajištěno pomocí mitochondriálních člunků (Maechler a Wollheim 2001). Vzniklý pyruvát vstupuje do mitochondrie a poté do citrátového cyklu. Následný oxidační metabolismus udává spojení mezi stimulací buňky glukózou a sekrecí insulinu (Schuit a kol. 1997, Wollheim 2000). Přenos elektronů z citrátového cyklu do dýchacího řetězce pomocí NADH a FADH₂ způsobuje vznik ATP, které je transportováno do cytosolu pomocí adeninového nukleotidového translokátoru (ANT) výměnou za ADP (Maechler a Wollheim 2001). Zvýšení poměru ATP/ADP v cytosolu způsobuje depolarizaci plazmatické membrány, což má za následek uzavření draslíkových kanálů závislých na množství ATP. Tento děj následně způsobí otevření napětově řízených vápníkových kanálů (Juhl a Hutton 2004, Rorsman 1997). Tímto krokem glukóza stimuluje sekreci insulinu pomocí vápníkových kationtů, které způsobí exocytózu insulinu (Rorsman 1997, Lang 1999) (obrázek 1). Existuje několik signálů a poslů pro exocytózu inzulinu ven z buňky. Mezi nejvýznamnější spouštěče patří již zmiňované molekuly ATP a ADP, dále pak molekula GTP, která spouští exocytózu insulinu pomocí GTPáz. cAMP je universální druhý posel, který má v beta-buňce potenciál spouštět sekreci insulinu vyvolanou pomocí molekul glukózy. Hodně neurotransmiterů a hormonů, jakými jsou například trávicí hormony jako GLP-1 (glukagonu podobný peptid 1) i gastrický inhibiční polypeptid (GIP) aktivují

adenylátcyklázu v beta buňkách a tím zvyšují koncentraci cAMP (Maechler a Wollheim 2001).



Obrázek 1: Model znázorňující sekreci insulinu po vstupu glukózy do beta-buňky. Nejprve proběhne glykolýza, kde je glukóza fosforylována za pomoci glukokinázy (GK) a nakonec přeměněna na pyruvát (Pyr). Pyruvát se dostane do mitochondrie, kde vstupuje do citrátového cyklu a vzniklé redukované koenzymy se účastní dýchacího řetězce, v němž vzniká ATP a dochází k hyperpolarizaci mitochondriální membrány ($\Delta\psi_m \uparrow$). Následné uzavření draslíkových kanálů způsobí depolarizaci cytosolické membrány ($\Delta\psi_c \downarrow$) a to vede k otevření napětově řízených vápníkových kanálů, což způsobí zvýšení koncentrace cytosolického Ca^{2+} a dojde k exocytóze insulinu. Existuje i pár dalších molekul uvedených na obrázku, které slouží jako přidavné signály pro sekreci insulinu. Obrázek převzat z (Maechler a Wollheim 2001).

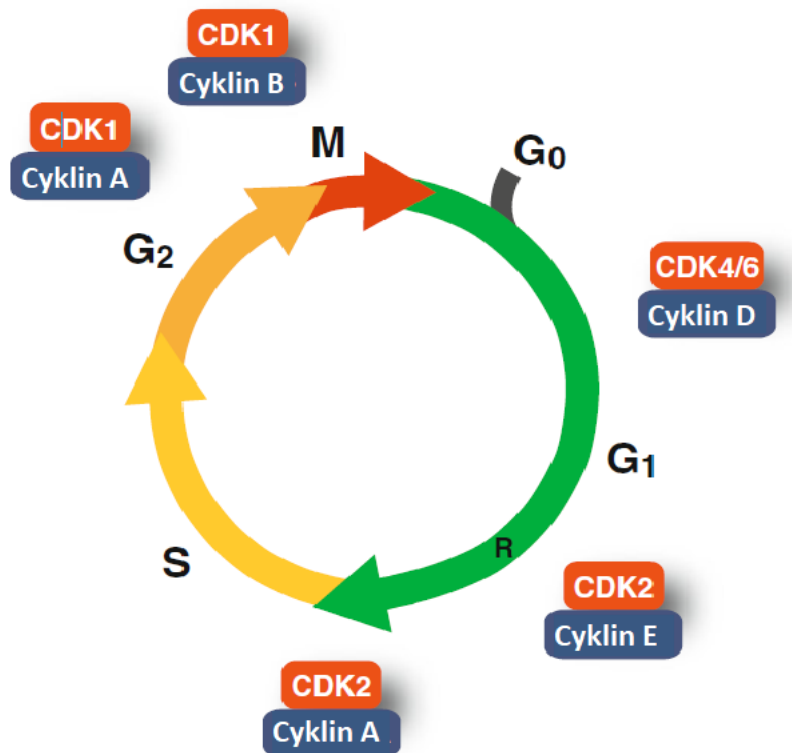
1.3. BUNĚČNÝ CYKLUS

Buněčný cyklus je sekvence dějů, přes které buňka duplikuje svůj genom, hypertrofuje a nakonec vytvoří dvě dceřiné buňky. Jedná se jednu z fundamentálních vlastností života (Poon 2016).

Buněčný cyklus začíná G1 fází, během které dochází k syntéze proteinů, RNA a buněčných membrán. Po ukončení G1 fáze následuje S fáze a syntéza DNA. Po S fázi buňka opět hypertrofuje v G2 fázi a vše se zakončí přechodem do mitózy. V mitóze je buňka rozdělena na dvě dceřiné buňky dějem zvaným cytokineze. Drtivá většina nedělících se buněk opouští buněčný cyklus v G1 fázi a přejde do klidové fáze neboli G0 fáze (Poon 2016) (obrázek 2).

Buněčný cyklus je složitý proces, jehož součástí jsou i dva mechanismy, které se podílejí na jeho regulaci: fosforylace proteinů a jejich degradace zprostředkována ubiquitiny. Mezi regulační proteiny patří cykliny, cyklin dependentní kinázy (CDK) a inhibitory cyklin dependentních kináz. Cykliny jsou regulační jednotky, kdežto CDK jsou katalytické jednotky a musí docházet ke vzájemné interakci molekul, aby buněčný cyklus mohl správně fungovat. Komplexy cyklin/CDK řídí různé fáze buněčného cyklu: cyklin D s CDK4 a CDK6 jsou důležité uprostřed G1 fáze, komplex cyklinu E/CDK2 hraje roli v pozdní fázi G1, cyklin A/CDK2 v S fázi, cyklin A/CDK1 v G2 fázi, cyklin B/CDK1 v M fázi. Pro ukončení S a M fáze musí být cykliny degradovány, a to zapříčiní anafázi podporující komplex (APC) (Heber-Katz a kol. 2012) (obrázek 2).

Inhibitory CDK jsou molekuly, které omezují aktivitu CDK. Zatím byly popsány 2 třídy inhibitorů CDK (Sherr a Roberts 1999). První třída obsahuje proteiny INK4 s funkcí vázat se a inhibovat CDK4 a CDK6. Druhá třída zahrnuje Cip/Kip rodinu inhibitorů, která má větší pole působnosti než molekuly rodiny INK4. To je zapříčiněno tím, že se váží na komplexy cyklin/CDK (Poon 2016).



Obrázek 2: Na obrázku je uveden buněčný cyklus, který je rozdělen do 4 fází: 1. přípravná (G₁), syntetická (S), 2. přípravná (G₂), mitotická (M). Nejdůležitější savčí buňky opustí G₁ fázi a přejdou do klidové fáze (G₀). Po průchodu restričním bodem (R) se buňka stává nezávislá na stimulantech proliferace. Komplexy cyklin/CDK, které působí v jednotlivých fázích cyklu jsou zobrazeny. Obrázek převzat z (Poon 2016).

1.4. CYKLINY A CYKLIN DEPENDENTNÍ KINÁZY

Dělení buněk je přesně regulovaný proces v živých organismech, při kterém z mateřských buněk vznikají buňky dceřiné. V množení buněk je přičítán veliký úděl dvěma typům molekul a těmi jsou cykliny a cyklin dependentní kinázy (CDK), což jsou vlastně serin threoninové kinázy (Morgan 1997). Cykliny ovlivňují kinázovou aktivitu a substrátovou specifitu CDK tím, že se váží na CDK a slouží jako regulační podjednotky. Poprvé byly komplexy cyklin/CDK jako regulátory buněčného cyklu pozorovány v průkopnické práci s kvasnicemi, kde bylo zjištěno, že CDK regulují přechody mezi fázemi buněčného cyklu po vazbě s různými cykliny. Kinázová aktivita komplexu cyklin/CDK je regulována pomocí inhibitorů cyklin dependentních kináz, které slouží jako brzdy při zastavení průběhu buněčného cyklu za nepříznivých podmínek (Lim a Kaldis 2013). Cykliny, CDK a inhibitory cyklin dependentních kináz hrají svojí roli při transkripci, opravě poškozené DNA, epigenetické regulaci, proteolytické degradaci proteinů, metabolismu, obnově kmenových buněk, správném fungování neuronů a spermatogenezi (Lim a Kaldis 2013).

1.4.1. CYKLINY

Hodně cyklinů obsahuje inhibiční a fosforylační aktivující místa (Atherton-Fessler a kol. 1993). Cykliny patří na rozdíl od CDK k různorodější skupině proteinů, která je charakterizována na základě existence tzv. cyklinového boxu (CBD) (Lim a Kaldis 2013). Sekvence aminokyselin, které jsou mimo cyklinový box udávají cyklinům funkční rozmanitost a rozdílnou formu jejich regulace (Sherr a Roberts 1999). Prostorová struktura cyklinů je závislá na délce jejich proteinového řetězce. Některé druhy jsou více prodloužené na N-konci a jiné naopak na C-konci CBD. Velmi zajímavé je také to, že co se týče sekvenční podobnosti N-terminální domény, tak atypické cykliny mají jednu CBD, zatímco kanonické cykliny mají dvě (Quandt a kol. 2020).

1.4.2. CYKLIN DEPENDENTNÍ KINÁZY

Existuje více než 20 druhů CDK (Malumbres a kol. 2009). Každé katalytické centrum je u CDK složeno z ATP vázícího místa, PSTAIRE cyklin vázící domény a z motivu T-smyčky. Tyto jednotlivé části se podílejí na aktivaci cyklinů a pomocí helixu na PSTAIRE dochází ke spojení cyklinů a CDK. K navázání cyklinu dochází tak, že se posune T-smyčka a odkryje se tím místo pro navázání cyklinu a dojde ke vhodnému uspořádání aminokyselinových zbytků v aktivním místě, aby mohlo dojít k fosforylační reakci (Lim a Kaldis 2013).

1.4.3. ÚLOHA CYKLINŮ A CYKLIN DEPENDENTNÍCH KINÁZ V TRANSKRIPCI

Zapojení regulátorů buněčného cyklu do transkripce je známo již dlouho a jedním z nejvýznamnějších příkladů je Rb/E2F cesta (Weinberg 1995). Ve fosforylovaném stavu se retinoblastomové proteiny Rb1, Rb11 a Rb12 váží k odloučeným proteinům z rodiny transkripčních faktorů E2F (Dyson 1998). CDK 4, CDK6 a CDK2 ve spojení s cykliny, které se na ně váží (jedná se o cykliny typu D a E), jsou odpovědné za fosforylaci Rb1, příslušný děj zmírní inhibici E2F a tím pádem může buňka vstoupit z G1 fáze do S fáze a dojde k syntéze DNA (Harbour a Dean 2000, Trimarchi a Lees 2002). Přejít z G1 fáze do S fáze je již hodně zdokumentován, oproti přechodu z G2 do M fáze, který se začíná teprve objevovat (Lim a Kaldis 2013).

Dále se ještě vyskytuje transkripční faktor FoxM1, který je členem Fox rodiny transkripčních faktorů (Hannenhalli a Kaestner 2009, Myatt a Lam 2007). FoxM1 je po dobu několika fází buněčného cyklu neaktivní, protože jeho N-terminální represorová doména (RD) interaguje a s C-terminální transaktivační doménou (TAD) a ruší tím svojí funkci. V průběhu G2 fáze je inhibice spuštěna pomocí komplexu cyklin A/CDK2 závislého na hyperfosforylaci TAD. Hyperfosforylovaná TAD se vytěsňuje z RD a zvyšuje se přísun transkripčního koaktivátoru, histon deacetylázy (p300/Creb) vázící protein (Ep300/Crebbp). Tento vzniklý komplex spustí expresi genů, které pak zapříčiní vstup buňky do fáze mitózy (Chen a kol. 2009, Laoukili a kol. 2008, Park a kol. 2008, Major a kol. 2004). Studium jak fosforylace Rb a FoxM1 ovlivňuje regulaci jednotlivých kroků genové exprese lze zjistit, že genové regulátory buněčného cyklu mohou posttranslačně modifikovat komponenty transkripčního aparátu, za účelem dosažení exprese specifických genových shluků a to je nezbytné pro zahájení přechodů

mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu, konkrétně mezi fázemi G1/S a G2/M. Fosforylace se vyskytuje na více místech cílového proteinu, což umožňuje větší „citlivost“ pro vnímání úrovně kinázové aktivity před umožněním vstupu do další fáze buněčného cyklu (Lim a Kaldis 2013).

Cykliny a CDK také regulují činnost RNA polymerázy II (RNA Pol II). CTD doména RNA Pol II obsahuje několik heptapeptidových sekvencí, které mohou být zaměřeny komplexy z cyklinů a CDK (poprvé to bylo zjištěno u CDK1) (Cisek a Corden 1989). Změny ve fosforylaci podjednotky CTD hrají významnou roli ve správném načasování polymerázové aktivity a v používání různých ko-regulátorů. Dále byly objeveny nové členové rodin cyklinů a CDK, které se zařadily do skupiny dalších molekul, které kontrolují transkripční činnost RNA Pol II. Především cyklin K interaguje s CDK12 a CDK13 a zprostředkovává fosforylaci CTD (Blazek a kol. 2011, Cheng a kol. 2012, Bartkowiak a kol. 2010). Je známo, že kontrola funkce RNA Pol II je velmi analogická k systému regulace buněčného cyklu. Ale pořádné porozumění tomu, jak komplexy cyklin/CDK spouštějí každý přechod do jiné fáze buněčného cyklu a jak je CTD přečtena, aby mohlo dojít k potřebným událostem během syntézy RNA, bude teprve cílem výzkumu (Lim a Kaldis 2013).

V souladu s charakteristickými rysy příslušné části molekul CDK se určuje následná vazba kanonických nebo transkripčních cyklinů. Kanonické cykliny interagují s rodinami CDK1 a CDK4, což je v souladu s jejich funkcí při regulaci buněčného cyklu, zatímco transkripční cykliny mohou reagovat s transkripčními CDK, mezi které patří CDK7, 8, 9, 11, 20. Naproti tomu existuje i několik cyklinů, které nemají svojí specifickou CDK, na kterou by se mohli navázat. Když je objevena nová CDK pro atypický cyklin, tak patří do podrodiny související s CDK5, což je skupina, do které spadají atypické CDK : 5,14, 15, 16, 17 a 18 (Quandt a kol. 2020). Identita CBD byla vybrána pro stanovení vztahů mezi cykliny, protože se jedná o evolučně nejzachovanější část všech cyklinů (Kobayashi a kol. 1992). Ovšem některé atypické cykliny (O, P, G, I) mají CBD podobnou kánonickým cyklinům, zatímco ostatní členové se zdají podobnostně vzdálenější, což naznačuje, že atypické cykliny mohou mít různý evoluční původ (Quandt a kol. 2020).

1.5. SYNTETICKÁ MRNA

Syntetická mRNA je alternativní genetický materiál, který nahrazuje využití konvenční plasmidové DNA (pDNA). Následná translace je ovlivněna stavbou a stabilitou syntetizovaného RNA vlákna (Kwon a kol. 2018).

Syntetická mRNA obsahuje čtyři základní stavební prvky. Na 5' konci je navázána 5' methyl-guanosinová čepička, jejímž úkolem je chránit mRNA před endonukleázami, když se příslušná RNA váže k eukaryotickému translačnímu iniciačnímu faktoru 4E (eIF4E) (Sonenberg a Gingras 1998). Nepřekládané oblasti (UTR) jsou na obou stranách otevřeného čtecího rámce. UTR kontrolují transkripční efektivitu, stabilitu a subcelulární lokalizaci mRNA (Mignone a kol. 2002). Otevřený čtecí rámec (ORF) obsahuje genetickou informaci pro translační proces, který začíná start kodómem (AUG) a končí stop kodómem (UAA, UAG, UGA) (Kwon a kol. 2018). Poly(A) konec je umístěn na 3' konci vlákna mRNA a jeho navázání na poly(A) vazebný protein (PABP) je jedním z iniciačních kroků translace. Pochopitelně také samotná délka poly(A) konce ovlivňuje stabilitu a translační efektivitu mRNA (Kwon a kol. 2018).

1.5.1. 5' ČEPIČKA

V přírodě se eukaryotická mRNA vyskytuje s navázaným 7-methylguanosyem na 5' konci mRNA a ten je navázán pomocí trifosfátu tak, že z každé strany je ribóza uchycena přes 5' konec na fosfáty (m⁷GpppN) (Ramanathan a kol. 2016). Tato čepička zprostředkovává navázání translačního iniciačního faktoru 4E (eIF4E). Dále pak ještě chrání mRNA před degradací exonukleázou Xrn1p od 5' konce směrem ke 3' konci (Chang a kol. 2011, Nagarajan a kol. 2013, Masison a kol. 1995). Po translaci dochází k degradaci mRNA a následuje oddisociování čepičky pomocí příslušných enzymů. Bez čepičky se pak mRNA rychle rozpadá ve směru od 5' ke 3' konci vlákna. Navázání čepičky je velmi důležité pro přípravu syntetické mRNA. Navázání čepičky může proběhnout buď jako post-transkripční modifikace za použití čepičkovacích enzymů nebo až v průběhu *in vitro* transkripce, kde dochází k navázání čepičkových analogů na mRNA (Kwon a kol. 2018).

Enzymatické navázání čepičky na mRNA se může provádět ve velkém měřítku a toho se často využívá v laboratořích. Prvním krokem při vzniku 5'čepičky na mRNA je, že dojde ke vzniku difosfátu na 5'konci *in vitro* transkribované mRNA vlákna pomocí RNA trifosfatázy. Následně dojde ke vzniku 5' (od navazujícího se guanosinu) a 5' (od mRNA) trifosfátové vazby za katalýzy guanosyl transferázy. Nakonec je 5'guanin methylován pomocí S-adenosyl methioninu (SAM) a dojde ke vzniku standartní čepičky (čepička0) (Zhao a kol. 2010).

Ko-transkripční reakce IVT mRNA s analogy čepičky je také častou technikou, která je levnější a více používanější, než předchozí enzymatická reakce. Principem této techniky je, že reakční směs obsahuje přebytek čepičkových analogů (m7GpppG) oproti GTP (Kwon a kol. 2018).

1.5.2. NEPŘEKLÁDANÉ OBLASTI

Hlavní funkcí nepřekládaných oblastí (UTR) je regulovat posttranskripční expresi genů. Proto UTR velmi ovlivňuje biologickou aktivitu mRNA. Obsahuje také sekvence, na které se mohou vázat různé regulační proteiny a tím způsobit spuštění nebo inhibování translačního procesu (Sweeney a kol. 1996, Timchenko 1999). Vytvořené sekundární struktury a délka řetězce mRNA mají také vliv na translační efektivitu (Kwon a kol. 2018).

UTR jsou umístěny na obou koncích ORF (5' a 3'konec) a regulují míru exprese proteinu. Především na 5' konci mRNA UTR kontroluje správné nasednutí ribosomu a následnou translaci ORF části. Přítomnost vnitřního místa pro navázání ribosomu (IRES) na 5' UTR umožňuje univerzální translační překlad i v buňkách s nízkou koncentrací eIF4E, který je také důležitý pro iniciaci translace. Zajímavé je, že na 5' konec mRNA bez čepičky se může inkorporovat IRES z viru encefalomyokarditidy a může se iniciovat exprese proteinů (Tan a Wan 2008, Elroy-stein a kol. 1989). 5'UTR ovlivňuje iniciaci translace, kdežto 3'UTR hraje roli ve stabilizaci mRNA (Matoulkova a kol. 2012).

1.5.3. OTEVŘENÝ ČTECÍ RÁMEC

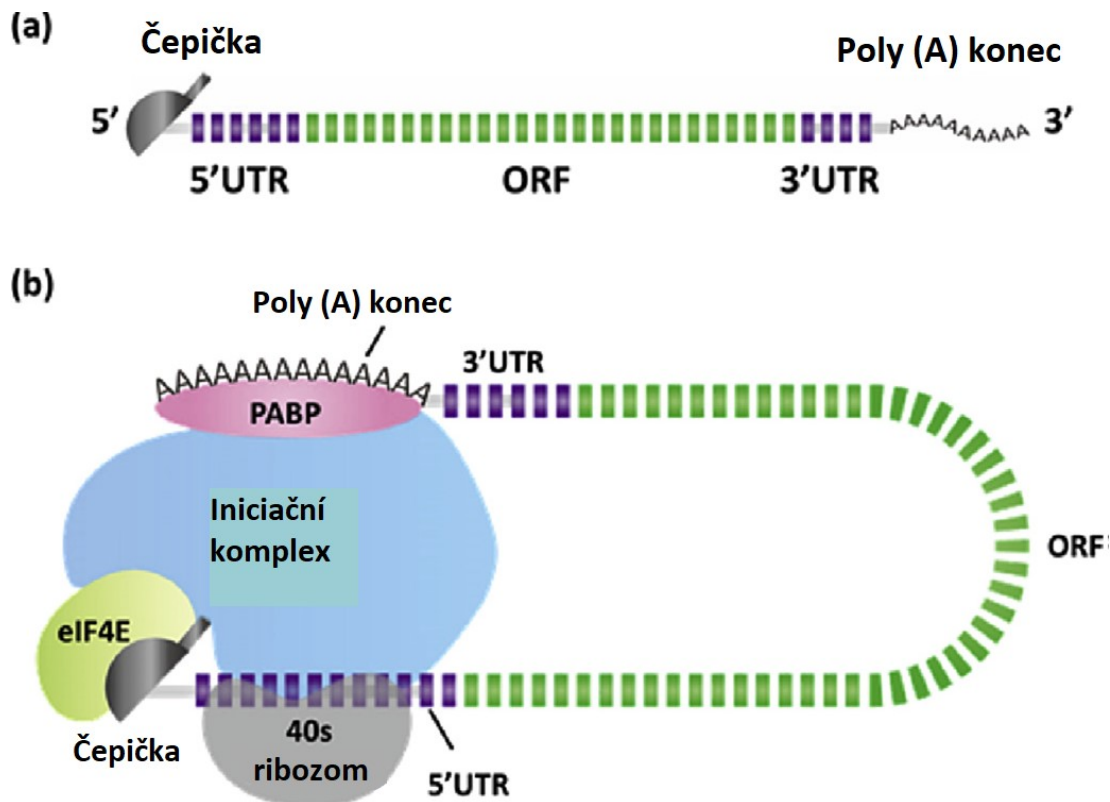
Otevřený čtecí rámeček (ORF) obsahuje genetickou informaci pro cílový protein. Na rozdíl od jiných částí mRNA ORF není hlavní faktor pro zvýšení její expresní funkce a ani její stability. Například vystříhnutím sekvencí UU a UA, může být ORF chráněna před rozštěpením endoribonukleázami (Al-saif a Khabar 2012). mRNA kódující reportérové proteiny, mezi které patří například protein luciferáza, jsou hojně používané pro zjištění efektivity translace mRNA. Stačí pouze záměna jednoho kodónu za jemu podobný a může to ovlivnit míru exprese, sbalení a následnou funkci cílového proteinu. Proto je důležité optimalizovat kodóny, aby došlo k maximální translační efektivitě mRNA. Tyto mRNA s optimalizovanými kodóny byly již úspěšně použity (Kwon a kol. 2018).

1.5.4. POLY(A) KONEC

Poly(A) konec přispívá k regulaci stability a translační efektivity mRNA. Jeho další funkcí je ochrana před nukleázami, které působí ve směru od 3' do 5' vlákna mRNA po navázání na poly(A) vázící protein (PABP). Délka poly(A) konce je velmi důležitá pro udržení stability mRNA při vázání na PABP. Aby došlo k dobré translační efektivitě IVT mRNA, tak musí mít poly(A) konec optimální délku. Optimální délka se nejčastěji pohybuje mezi 64 až 150 nukleotidy (Rabinovich a kol. 2006, Tcherepanova a kol. 2008, Mockey a kol. 2006). Ovšem existují i buňky, ve kterých uvedený rozsah nukleotidů neplatí a optimální délka poly(A) konce je pod nebo nad uvedeným rozmezím (Kwon a kol. 2018).

Pro vznik poly(A) konce při syntéze mRNA *in vitro* existují dvě různé možnosti. Buď můžeme zakomponovat předem připravený poly(A) konec pomocí enzymatické reakce k IVT mRNA, nebo přidat poly(T) sekvenci k DNA templátu před *in vitro* transkripcí mRNA. K první možnosti se používá poly(A) polymeráza, která snadno připojí poly(A) řetězec ke 3' konci mRNA. Jedná se o post-transkripční úpravu, kde po samotném navázání následuje ještě další úprava, která reguluje délku poly(A) konce mRNA. Druhá možnost je ko-transkripční modifikace mRNA *in vitro*. DNA templát je

připraven pomocí PCR s primerem obsahujícím dlouhou poly(T) sekvenci. Výsledné IVT mRNA mají všechny stejně dlouhý poly(A) konec (Kwon a kol. 2018).



Obrázek 3: (a) znázorněna mRNA se všemi příslušnými komponenty po *in vitro* transkripci. (b) znázornění iniciace translace. Nejprve se naváže iničiační translační faktor 4E (eIF4E) na 5' čepičku, na kterou se váží i další iničiační translační faktory. Součástí iničiačního komplexu je i poly-A vážící protein (PABP) a na něj se váže poly(A) konec mRNA. V průběhu iničiačního procesu je 40S ribozomální podjednotka také zabudována do iničiačního komplexu. Obrázek převzat z (Kwon a kol. 2018).

1.5.5. SYNTÉZA MRNA IN VITRO

Syntetická mRNA je připravena z DNA templátu a k syntéze se používá RNA polymeráza z bakteriofága. Z *in vitro* nasyntetizované mRNA obsahující ssRNA molekuly dojde k expresi bílkovin, které jsou podobné nebo totožné s proteiny nasyntetizovanými z mRNA eukaryotických organismů. DNA templát pro *in vitro* transkripci by měl obsahovat minimálně 4 základní části: bakteriofágový promotor, UTR, ORF a poly(T) sekvenci. Reakční směs pro *in vitro* transkripci by měla obsahovat nukleotidtrifosfáty (NTP), RNA polymerázu, DNA templát a případně

čepičková analoga, protože jeho navázání je v tomto případě ko-transkripční modifikace. Důležité je také použít správný molární poměr GTP a čepičkových analogů pro správnou syntézu 5'čepičky. Po *in vitro* transkripci je IVT mRNA následně upravena odstraněním fosfátové skupiny na 3' konci mRNA pomocí antarktické fosfatázy. Odstraněním trifosfátu snižuje možnou imunitní odpověď po transfekci do organismu. Chceme-li získat konkrétní *in vitro* transkribovanou RNA, tak je potřeba odstranit nezreagované nukleotidy, krátké oligonukleotidy, enzymové proteiny a zbytkové soli. Jedná se velmi důležitý krok, protože například zbytkové molekuly dsRNA mohou také aktivovat imunitní odpověď. V laboratoři je IVT mRNA purifikována pomocí komerčních purifikačních souprav, srážením isopropanolem nebo dalšími metodami. (Kwon a kol. 2018).

Dříve měly IVT mRNA nestabilní strukturu, což vedlo k nízké translační aktivitě a byla indukována vrozená imunitní odpověď. Když dojde k inkorporaci IVT mRNA do buňky, jsou rozpoznány jako exogenní RNA, které se podobají virovým RNA. To aktivuje PRR receptory a vede k vrozené imunitní reakci potlačující proteinovou expresi (Kwon a kol. 2018). Určité typy Toll-like receptorů (TLR) jsou aktivovány IVT mRNA molekulami nebo virovými RNA, které do buňky proniknou pomocí endocytózy. Aktivované TLR zprostředkují sekreci interferonů typu I (IFN1). Různé druhy TLR váží různé druhy RNA. Například ssRNA je rozpoznána TLR7 a TLR8, kdežto dsRNA je rozpoznávána pomocí TLR3 (Diebold a kol. 2004, Heil a kol. 2013). Uridinové zbytky aktivují TLR7. Vlákna RNA, které mají hojně obsaženy AU a GU dvojice bází, tak aktivují TLR7 a TLR8 (Gorden a kol. 2006). Neimunitní buňky mají jiné receptory rozpoznávající vzory (PRR), které se nazývají cytoplasmatické RNA senzory (Matsumiya a Stafforini 2010). Tyto receptory také zprostředkovávají sekreci IFN, když rozpoznají invazivní RNA, která by se navázala na TLR7 a TLR8 (Balachandran a kol. 2000). IVT mRNA mohou indukovat vlastní imunitní odpověď skrze různé cytoplasmatické receptory, čímž se snižuje efektivita transkripce. To je důvod, proč nemůže být aplikována pouze IVT mRNA, ale musí obsahovat různé přídavné látky pro klinické aplikace při terapii náhrady proteinů (Kwon a kol. 2018).

Do IVT mRNA mohou být zabudovány různé modifikované nukleotidy, které zlepšují její transkripční vlatnosti za snížení její imunogenicity. Jednou z využívaných modifikací u IVT mRNA je pseudouridin (Ψ). Jedná se o modifikovaný přirozeně se vyskytující nukleotid. Vzniká enzymatickou izomerací uridinu, která spočívá v rotaci

dusíku na šestém uhlíku. Tato modifikace výrazně snižuje aktivaci PRR, tudíž výsledkem je nízká imunitní odpověď a zesílení účinnosti translace (Karikó a kol. 2008).

Terapeutické podávání proteinů má několik problémů, které odrážejí jejich nízkou *in vivo* stabilitu po podání, protože zachování jejich správné trojrozměrné struktury je důležité pro jejich správnou funkci. Přímá injekce proteinů do krevního oběhu nebo do tkáně může způsobit denaturaci proteinů a snížit jejich biologickou aktivitu (Bruno a kol. 2013, Frokjaer a Otzen 2005). Ovšem když se místo nich aplikuje mRNA přímo do cílové tkáně, tak se může předejít předchozím nežádoucím účinkům. Jakmile jsou příslušné mRNA inkorporovány do buňky, tak může dojít k jejich translaci za vzniku cílových proteinů (Kwon a kol. 2018).

2. CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce byla příprava DNA templátů kódujících vybrané regulátory buněčného cyklu a následná *in vitro* transkripce syntetických mRNA pro příslušné regulátory buněčného cyklu.

DNA templáty a IVT mRNA byly připraveny pro následující cykliny, cyklin dependentní kinázy a jejich mutované formy: cyklin D1, cyklin D1 T286AT288A, cyklin D2, cyklin D2 T280A, cyklin D3, cyklin D3 T283A, CDK6, CDK4 R24C.

Dále pak bylo cílem ověřit kvalitu a funkčnost nasyntetizovaných mRNA konstruktů za pomoci detekce exprese příslušných proteinů v buňkách Langerhansových ostrůvků.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

Primery	Integrated DNA Technologies, USA
Q5 Reakční Pufr	New England Biolabs, USA
Q5 High-Fidelity DNA Polymeráza (<i>E. coli</i>)	New England Biolabs, USA
Q5 High GC Enhancer	New England Biolabs, USA
Q solution	New England Biolabs, USA
NEB Pufr	New England Biolabs, USA
Restrikční enzymy	New England Biolabs, USA
Antarktická fosfatáza (<i>E. coli</i>)	New England Biolabs, USA
AP reakční pufr	New England Biolabs, USA
LB medium	Carl Roth, SRN
LB medium	Carl Roth, SRN
LB agar	Carl Roth, SRN

Ethidium bromid	Sigma-Aldrich, SRN
Loading pufr	Sigma-Aldrich, SRN
SOC médium	Sigma-Aldrich, SRN
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, SRN
Agar	Sigma-Aldrich, SRN
Kyselinu boritá	Sigma-Aldrich, SRN
EDTA	Sigma-Aldrich, SRN
BSA	Sigma-Aldrich, SRN
Akrylamid	Sigma-Aldrich, SRN
SDS	Sigma-Aldrich, SRN
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, SRN
Tween 20	Sigma-Aldrich, SRN
APS	Sigma-Aldrich, SRN
HEPES	Sigma-Aldrich, SRN
octan amonný	Sigma-Aldrich, SRN
CMRL medium	Sigma-Aldrich, SRN
NTI pufr	MACHEREY-NAGEL, USA
NT3 pufr	MACHEREY-NAGEL, USA
NE pufr	MACHEREY-NAGEL, USA
Interkalační Dye	Agilent Scientific instruments, USA
5x 930 dsDNA Inlet Buffer	Agilent Scientific instruments, USA
Capillary Storage Solution	Agilent Scientific instruments, USA
0,25x TE Rinse Buffer	Agilent Scientific instruments, USA
RNA Ladder aliquot	Agilent Scientific instruments, USA

RNA Diluent Marker Solution	Agilent Scientific instruments, USA
BF-25 Blank Solution	Agilent Scientific instruments, USA
RNA Ladder	Agilent Scientific instruments, USA
tris-Base	Amresco, USA
Glycerol	Amresco, USA
Glycine	Amresco, USA
Pyruvát sodný	Thermo Fisher Scientific, USA
1-step Transfer Buffer	Thermo Fisher Scientific, USA
Pufr P1	Qiagen, SRN
Pufr P2	Qiagen, SRN
Pufr N3	Qiagen, SRN
PB pufr	Qiagen, SRN
PE pufr	Qiagen, SRN
EB pufr	Qiagen, SRN
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, SRN
NTP	TriLink Biotechnologies, USA
Analoga 5'čepičky	TriLink Biotechnologies, USA
DTT	Cellscript, USA
T7 RNA polymeráza (<i>E. coli</i>)	Cellscript, USA
10X reakční pufr	Cellscript, USA
Inhibitory RNáz	Cellscript, USA
Poly(A) polymeráza (<i>E. coli</i>)	Affimetrix, USA
MessengerMAX	Life Technologies, USA
Směs esenciálních aminokyselin	Life Technologies, USA

GLUTAMAX	Life Technologies, USA
ITS	Life Technologies, USA
Pyruvát sodný	Thermo Fisher Scientific, USA
Mini Kit	Macherey-Nagel, SRN
Nanosep Omega 30k	Nanosep, USA
MEGAclear Kit	Ambion, USA
Primární protilátky	NOVUS, USA
Sekundární protilátky	Invitrogen, USA
Chemoluminiscenční substrát pro pro HRP	Invitrogen, USA
TEMED	Bio-Rad, ČR
Methanol	PENTA, ČR
Black Protein Ladder	CentralEuropean.Biosystems, ČR
Master Mix	Roche Molecular Systems, USA
5x In-Fusion HD Enzyme Premix	Takara Bio, Japonsko
Roztok s bakteriemi E. coli	Clontech Laboratories, USA
Eluční roztok pro in vitro transkripci mRNA	Life technologies, USA

Složení roztoků:

CMRL médium: alanine (0.025 g/l), arginine (0.05787 g/l), asparagová kyselina (0.03 g/l), cystein-HCl-H₂O (0.26 g/l), cystin (0.02 g/l), glutamová kyselina (0.075 g/l), glutamin (0.1 g/l), glycin (0.05 g/l), histidin-HCl-H₂O (0.02 g/l), trans-4-hydroxy-prolin (0.01 g/l) isoleucin (0.02 g/l), leucine (0.06 g/l), lysin-HCl (0.07 g/l), methionin (0.015 g/l), fenylalanin (0.025 g/l), prolin (0.04 g/l), serin (0.025 g/l), threonin (0.03 g/l), tryptofan (0.01 g/l), tyrosine (0.04 g/l), valine (0.025 g/l), askorbová kyselina (0.05 g/l), kyselina 4-aminobenzoová (0.00005 g/l), biotin (0.00001 g/l), cholin chlorid (0.0005 g/l), koenzym A-Na (0.0025 g/l), kokarboxyláza (0.001 g/l), 2'-deoxyadenosin (0.01 g/l), 2'-deoxyguanosin (0.01 g/l), 2'-deoxycytidin-HCl (0.0116 g/l), FAD-2Na (0.000106 g/l), kyselina listová (0.00001 g/l), myo-inositol (0.00005 g/l) 5-methyldeoxycytidine (0.0001 g/l) NAD (0.007 g/l) NADP-Na (0.001 g/l); nikotinamid (0.000025 g/l); niacin (0.000025 g/l); D-kyselina pantothenová (0.00001 g/l); pyridoxal-HCl (0.000025 g/l), Pyridoxin-HCl (0.000025 g/l), Riboflavin (0.00001 g/l), thiamin-HCl (0.00001 g/l), Thymidin (0.01 g/l), Uridin-5-trifosfát-Na (0.001 g/l), CaCl₂

(anhydrid) (0.2 g/l), Síran hořečnatý (anhydrid) (0.09769 g/l), KCl (0.4 g/l), Octan sodný (Anhydrid) (0.05 g/l), chlorid sodný (6.8 g/l), dihydrogen fosofrečnan sodný (Anhydrid) (0.122 g/l) D-glukóza (1.0 g/l), fenolová červeň-Na (0.02124 g/l), glutathion (0.01 g/l), D-glukoronová kyselina-Na (0.00388 g/l) cholesterol (0.0002 g/l), Tween (80 0.005 g/l)

LB medium: trypron (10 g/l), extrakt z kvasnic (5 g/l), NaCl (10 g/l)

LB agar: agar (15 g/l), trypron (10 g/l), extrakt z kvasnic (5 g/l), NaCl (10 g/l)

SOC médium: trypron (20 g/l), extrakt z kvasnic (5 g/l); MgSO₄ (4.8 g/l), D-glukóza (3.603 g/l), NaCl (0.5g/l), KCl (0.186 g/l)

Pufr P1: Tris-Cl (50mM) (pH 8.0), EDTA (10mM), RNase A (100ug/mL)

Pufr P2 (200mM NaOH, 1% SDS)

Loading pufr: bromfenolová modř (0.05%), sacharóza (40%), 0.1M EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS (0.5%)

AP reakční pufr: MgCl₂ (1 mM), ZnCl₂ (0,1mM), Bis-tris-propan-HCl (50mM)

NE pufr (5mM Tris/HCl)

Pro ostatní pufrы výrobce nevedl složení.

3.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Centrifugy	Micro 200, Universal 320R, Hettich, Švýcarsko
PCR termocyklery	Applied Biosystems, Veriti, USA; Biometra Tpersonal, SRN
Třepačky	ThermoMixer comfort, Eppendorf, SRN; Innova42, New Brunswick Scientific, USA
Pipety	BRAND, SRN; Biohit, Finsko
Kývačka	WT17, Biometra, SRN
pH-metr	pH 2700, Eutech, Nizozemsko
Aparatury na elektroforézu	Mini-Wide Vertigel 2, Midigel 2, Appalex, Francie

Kapilární gelová elektroforéza	5200 Fragment Analyzer Systém, Agilent Technologies, US
Vodní lázeň	Julabo, TW12, SRN
Zařízení pro přenos na membránu	Thermo Fisher Scientific, Pierce G2 Fast Blotter, USA
Zdroj napájení	PS 305, Appelex, Francie

3.3. POUŽITÉ METODY

3.3.1. PCR

3.3.1.1. PREPARATIVNÍ PCR

Všechny komponenty potřebné pro PCR reakci se musely skladovat při nízkých teplotách. Před použitím se všechny komponenty řádně promíchaly v nádobkách, ve kterých byly uchovávány. DNA polymeráza byla před použitím 1x zředěna v Q5 reakčním pufru. Následně se namíchala příslušná reakční směs složená z látek uvedených v tabulce 1. Jako poslední byla do reakční směsi přidána DNA polymeráza. Pro preparativní PCR byla použita Q5 High-Fidelity DNA Polymeráza.

Tabulka 1: Použité roztoky, jejich množství a výsledná koncentrace v jednotlivých jamkách. V závorkách uvedeny koncentrace zásobních roztoků. Množství DNA templátu je uvedeno v ng.

Komponenty	Reakce 25 μ l	Reakce 50 μ l
	[μ l]	[μ l]
5X Q5 Reakční Pufř	5,0	10
(10 mM) dNTP	0,5	1,0
(10 μ M) Přední primer (forward)	1,25	2,5
(10 μ M) Zadní primer (reverse)	1,25	2,5
DNA Templát [ng]	20	40
Q5 High-Fidelity DNA Polymeráza	0,25	0,5
5X Q5 High GC Enhancer	5	10
Voda bez nukleáz	25	50

Následovalo nastavení PCR přístroje na konkrétní teploty a časy (tabulka 3). Nejprve se všechny vzorky zahřály na 98 °C po dobu 30 sekund, aby došlo k oddisociování dvou vláken dsDNA od sebe. Poté se opětovně zopakovalo 30 cyklů, které probíhaly následovně:

- 1.) nejprve se po dobu 5 až 10 sekund nechaly roztoky se vzorky zahřívát na 98 °C
- 2.) následovalo snížení teploty na 60 °C po dobu 30 s
- 3.) poté navýšení teploty na 72 °C po dobu 80 s.

Po ukončení cyklů se vzorek nechal po dobu 2 minut zahřívát na 72 °C, aby se všechna vlákna DNA stihla dosyntetizovat. Celý proces syntézy DNA se ukončil snížením teploty na 15 °C. Pro tuto reakci se použily na míru nasyntetizované primery se sekvencí uvedenou v tabulce 2.

Tabulka 2: Sekvence jednotlivých primerů pro preparativní PCR reakci.

Primer	Sekvence
Přední primer (forward)	ACTCACTATAAGGAGCCCTCCAGGACA
Zadní primer (reverse)	TTTCGGTTTGGCTCTGAAAAGAG

Tabulka 3: Časy a teploty v jednotlivých fázích při průběhu PCR reakce.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Iniciační denaturace	98	40
30 cyklů	98	20
-	60	20
-	72	80
Konečné prodloužení	72	120
Ukončení	15	-

3.3.1.2. ANALYTICKÁ PCR

Pro ověření úspěšné transformace klonů byla použita analytická PCR.

Po inkubaci vybraných klonů v LB mediu (4 hodiny) byly odebrány 2 μ l od každé z vybraných kolonií a každá kolonie byla napipetována zvlášť do jamky. Genom bakterií z vybraných kolonií byl použit jako DNA templát pro PCR. Složení každé z jamek je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4: Roztoky, které byly použity pro analytickou PCR a jejich množství v jednotlivých jamkách.

Komponenty	Objem [μ l]
Master Mix	10
Přední primer (forward)	1
Zadní primer (reverse)	1
Q solution	2
Voda	4
DNA templát	2
Výsledný objem	20

Pro tuto reakci se použily na míru nasyntetizované primery a sekvencí uvedenou v tabulce 5.

Tabulka 5: Sekvence jednotlivých primerů pro analytickou PCR reakci.

Primer	Sekvence
Přední primer (forward)	GTAAAACGACGGCCAGTGA
Zadní primer (reverse)	GGAAACAGCTATGACCATGT

Dále následovala PCR (tabulka 6) (postup byl stejný jako u preparativní PCR).

Tabulka 6: Časy a teploty pro jednotlivé fáze v průběhu PCR.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Iničiační denaturace	95	150
40 cyklů	95	25
-	59	15
-	72	60
Konečné prodloužení	72	300
Ukončení	4	-

3.3.2. RESTRIKČNÍ ŠTEPENÍ

Další metodou bylo restriční štěpení plazmidové pDNA za účelem její linearizace.

Do výsledné směsi byly přidány všechny potřebné komponenty pro restriční štěpení uvedené v tabulce 7. Roztok s endonukleázami se po vyndání z lednice nechal chladit na ledu a do reakční směsi byl přidán jako poslední komponent. Pufr byl použit 1 x koncentrovaný NEB Pufr. Vzniklé roztoky se odstředily na mikrocentrifuze (1000 g/5 min.). Plazmidy se nechaly inkubovat s endonukleázami 4 hodiny při teplotě 37 °C.

Tabulka 7: Použité sloučeniny a jejich objemy ve směsi pro restriční štěpení pDNA.

Komponenty	Objem [μl]
Restriční enzym	1
DNA	1
NEB Pufr*	5
Voda	43
Výsledný objem	50

* ve výsledném objemu 10X zředěn

Byly použity endonukleázy s odlišným štěpicím místem v polynukleotidové sekvenci. Mezi použité enzymy patří:

5'...A[▼]AGCTT...3'
3'...TTCGA[▲]A...5'

Obrázek 4: Polynukleotidová sekvence štěpená endonukleázou HindIII-HF[®]

5'...G[▼]GATCC...3'
3'...CCTAGG...5'

Obrázek 5: Polynukleotidová sekvence štěpená endonukleázou BamHI-HF[®]

5'...GGTAC[▼]C...3'
3'...C[▲]CATGG...5'

Obrázek 6: Polynukleotidová sekvence štěpená endonukleázou KpnI-HF[®]

5'...CTGC[▼]AG...3'
3'...G[▲]ACGTC...5'

Obrázek 7: Polynukleotidová sekvence štěpená endonukleázou PstI-HF[®]

5'...GCTAG[▼]C...3'
3'...C[▲]GATCG...5'

Obrázek 8: Polynukleotidová sekvence štěpená endonukleázou BmtI-HF[®]

Obrázky převzaty z (<https://international.neb.com/products/restriction-endonucleases>).

3.3.3. ELEKTROFORÉZA A IZOLACE DNA Z GELU

3.3.3.1. ELEKTROFORÉZA PRO ANALYTICKOU A PREPARATIVNÍ PCR

Pro elektroforézu využitou po analytické a preparativní PCR se použil 1% agarózový gel připravený z agarózy a TBE pufru.

Jako první krok se rozpustilo 1,0 g krystalické agarózy ve 100 ml TBE pufru. Agaróza byla rozpuštěna zahříváním. Poté se ještě napipetovalo 1 µl ethidium bromidu do roztoku a všechny roztok se přelil do předem připravené soupravy na elektroforézu. Do gelu se ponořil hřeben pro elektroforézu.

Po zatuhnutí agarózy se vyndal z gelu hřeben, který vytvořil jamky pro nanášení vzorku. Do elektroforetické nádoby se nalil TBE pufr, aby jeho hladina sahala až po horní okraj gelu. Před nanesením vzorků na gel, se napipetovalo ke každé mikrozkušavce se vzorkem 4 µl loading pufru. Vzniklé směsi se promíchaly a 20 µl

z každé směsi bylo napipetováno do jamek v agarozovém gelu. Následovalo zapojení elektroforézy do elektrického obvodu a nastavení proudu na 35 mA a napětí 60 V. Elektroforéza byla puštěna po dobu 120 minut.

PŘÍPRAVA TBE PUFRU

Nejprve byl připraven 5x ředěný TBE pufr, který obsahoval Tris, kyselinu boritou, EDTA a deionizovanou vodu.

Postup byl takový, že se do kádinky o objemu více než jeden litr přidalo 54 g Trisu, 27,5 g kyseliny borité a vše se rozpustilo v 900 ml deionizované vody. K nově vzniklému roztoku se napipetovalo 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Následně proběhla úprava pH vzniklého roztoku (upraveno pH metrem) na hodnotu 8,3 za pomoci 1M roztoku NaOH. K tomu byl použit pH metr. Nakonec se přidalo 100 ml deionizované vody, aby výsledný objem TBE pufru byl 1 litr.

3.3.3.2. IZOLACE DNA Z GELU

Po skončení elektroforézy se izolovala požadovaná DNA o potřebné velikosti (počtu bází).

Nejprve se vyřízly konkrétní pruhy DNA z agarózového gelu a každý zvlášť se vložil do čisté zkumavky. Na 100 mg gelu bylo použito 200 μ l NTI pufru. Vzorokly se s pufrum nechaly inkubovat 10 minut při 50 °C, aby došlo k úplnému rozpuštění gelu. V průběhu rozpouštění se zkumavky několikrát promíchaly na vortexu. Následně se do čistých mikrozkuumavek o maximálním objemu 2 ml vložily kolony, jejichž součástí byl filtr z oxidu křemičitého (Mini kity). Zkumavky s filtry se naplnily přibližně 650 μ l z roztoků vzniklých po rozpuštění gelů. Vše se odstředilo na mikrocentrifuze (11 000 x g; 30 s), aby se plazmidová DNA zachytila na filtru. Poté se na kolony napipetovaly zbytkové roztoky z rozpuštěných gelů a celý proces centrifugace se zopakoval. Pak proběhlo propláchnutí filtrů 700 μ l NT3 pufru také za pomoci centrifugace (11 000 x g; 30 s). Tento proces čištění se zopakoval ještě jednou. Následně se znovu odstředily zkumavky s kolonami na mikrocentrifuze (11 000 x g; 60 s), aby se všechen NT3 pufr odstranil z filtru za účelem dosažení vyšší čistoty DNA. Jako další krok se kolony

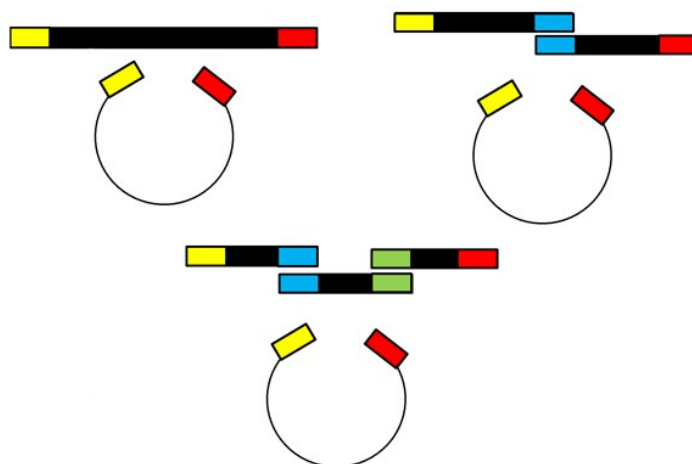
přendaly do nových čistých mikrozkušavek o maximálním objemu 1,5 ml. Na kolony se napipetovalo 30 µl NE pufru a kolony se nechaly inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Následně se vše odstředilo na mikrocentrifuze (11 000 x g; 60 s) a na dně zkumavek byl roztok s potřebnou DNA.

3.3.4. BEZKONCOVÉ KLONOVÁNÍ

Při této metodě se do linearizovaného plazmidu vložil gen pro příslušný cyklin nebo CDK a následně došlo k zacyklení nově vzniklého plazmidu obsahující inkorporovaný gen.

DNA pro jednotlivé geny byla nesyntetizována u komerčního dodavatele. DNA sekvence byly poté vloženy do linearizované pDNA. Při tomto kroku byla použita metoda bezkoncového klonování, v níž se nepoužíval enzym ligáza. DNA polymeráza s 3'–5' exonukleázovou aktivitou odštěpila vždy několik nukleotidů z každého konce pDNA a připraveného genu. Výsledek štěpení by měl vypadat vždy tak, že vznikne jedno vlákno, které je na každém konci dsDNA delší než vlákno k němu komplementární. Pak došlo k inkorporaci insertu do linearizované pDNA na základě homologní rekombinace. Konečné zacyklení řetězce proběhlo *in vivo* po transfekci do bakteriálního kmene *E. coli*. Geny vkládající se do pDNA mohou být složeny z jednoho, dvou nebo tří spojených vláken (obrázek 9).

Pro vložení insertů do plazmidů byly namíchány potřebné reakční směsi (tabulky 6-13). Veškeré komponenty, kromě vody, byly skladovány při -20 °C. Vše bylo napipetováno do zkumavek pro PCR s maximálním objemem jedné jamky 200 µl. Následně byly tyto zkumavky vloženy do termocykleru, který se nastavil na program In-Fusion (15 minut zahřívání na 50 °C, pak po dobu 5 minut pokles na 37 °C, poté konečné zchlazení na 4 °C). Po vyndání z termocykleru se zkumavky nechaly chladit na ledu.



Obrázek 9: Na obrázku jsou znázorněny geny, které se vkládají do linearizovaného plazmidu. Geny mohou být složeny z jednoho, dvou nebo tří dvoušroubovicových vláken DNA. Kruhovité útvary znázorňují linearizované plazmidy a barevné úseky na jejich koncích jsou jednovláknové přesahy komplementární ke stejně barevným komplementárním koncům insertů. Obrázek převzat z (<https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/in-fusion-cloning-technotes/single-and-multiple-insert-cloning>).

Tabulka 6: Reakční směs pro CDK6. V závorce je uvedena délka DNA v párech bází a její koncentrace v zásobním roztoku.

Komponenty	Objem [μl]
Linearizovaný plasmid (2684 pb ; c= 87 ng/ul)	1,1
Gen kódující CDK6 (1011 pb ; c = 17 ng/ul)	5,0
Voda	1,9
5x In-Fusion HD Enzyme Premix	2
Výsledný objem	10

Tabulka 7: Reakční směs pro cyklinD1 T286AT288A. V závorce je uvedena délka řetězce v párech bází a její koncentrace v zásobním roztoku.

Komponenty	Objem [μl]
Linearizovaný plasmid (2684 pb ; c= 87 ng/ul)	1,1
Gen kódující cyklin D1 T286AT288A (918 pb ; c = 18 ng/ul)	4,8
Voda	2,1
5x In-Fusion HD Enzyme Premix	2
Výsledný objem	10

Tabulka 8: Reakční směs pro cyklinD2 T280A. V závorce je uvedena délka DNA v párech bází a její koncentrace v zásobním roztoku.

Komponenty	Objem [μl]
Linearizovaný plasmid (2684 pb; c= 87 ng/ul)	1,1
Gen kódující cyklin D2 T280A (897 pb; c = 24 ng/ul)	3,5
Voda	3,4
5x In-Fusion HD Enzyme Premix	2
Výsledný objem	10

Tabulka 9: Reakční směs pro cyklinD3 T283A. V závorce je uvedena délka DNA v párech bází a její koncentrace v zásobním roztoku.

Komponenty	Objem [μl]
Linearizovaný plasmid (2684 pb; c= 87 ng/ul)	1,1
Gen kódující cyklin D3 T283A (914 pb; c = 140 ng/ul)	0,6 ul
Voda	6,3
5x In-Fusion HD Enzyme Premix	2
Výsledný objem	10

Tabulka 10: Reakční směs pro cyklinD3. V závorce je uvedena délka DNA v párech bází a její koncentrace v zásobním roztoku.

Komponenty	Objem [μl]
Linearizovaný plasmid (2684 pb; c= 87 ng/ul)	1,1
Gen kódující cyklin D3 (914 pb; c = 21ng/ul)	4,3
Voda	2,6
5x In-Fusion HD Enzyme Premix	2
Výsledný objem	10

Tabulka 11: Reakční směs pro CDK4 R24S. V závorce je uvedena délka DNA v párech bází a koncentrace v zásobním roztoku.

Komponenty	Objem [μl]
Linearizovaný plasmid (2684 pb; c= 87 ng/ul)	1,1
Gen kódující CDK4 (942 pb; c = 120 ng/ul)	0,8 ul
Voda	6,1
5x In-Fusion HD Enzyme Premix	2
Výsledný objem	10

Tabulka 12: Reakční směs pro cyklinD1. V závorce je uvedena délka DNA v párech bází a její koncentrace v zásobním roztoku.

Komponenty	Objem [μl]
Linearizovaný plasmid (2684 pb; c= 87 ng/ul)	1,1
Gen kódující cyklin D1 (918 pb; c = 26 ng/ul)	3,4 ul
Voda	3,5
5x In-Fusion HD Enzyme Premix	2
Výsledný objem	10

Tabulka 13: Reakční směs pro cyklinD2. V závorce je uvedena délka DNA v párech bází a její koncentrace v zásobním roztoku.

Komponenty	Objem [μ l]
Linearizovaný plasmid (2684 pb; c= 87 ng/ul)	1,1
Gen kódující cyklin D2 (897 pb; c = 30 ng/ul)	2,8 ul
Voda	4,1
5x In-Fusion HD Enzyme Premix	2
Výsledný objem	10

3.3.5. TRANSFEKCE PLAZMIDU DO BAKTERIÍ

Bakterie se po vyndání z prostředí $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nechaly inkubovat 10 minut na ledu, aby jejich roztok zkapalnil. Poté se vzaly mikrozkušavky o maximálním objemu 1,5 ml a nechaly se chladit na ledu. Do každé zkumavky se poté napipetovalo 50 μ l roztoku bakterií a k tomu bylo přidáno 2,5 μ l výsledného roztoku z bezkoncového klonování, obsahujícího plasmid s genem pro konkrétní cyklin nebo CDK. Jednotlivé zkumavky s roztoky se nechaly inkubovat 30 minut na ledu. Po skončení inkubace byly zkumavky přendány do vodní lázně o teplotě $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 minuty. Po vyndání z lázně byly zkumavky opět přendány na 2 minuty na led.

Předehřáli jsme si SOC médium na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a přidali 450 μ l ke klonovacímu roztoku po skončení dvouminutové inkubace na ledu (finální objem byl 500 μ l). Výsledná směs se nechala inkubovat za konstantního míchání na třepačce (950 rpm; 1 hodina) a teplota inkubace byla $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Potom byly připraveny zředěné roztoky v poměru 1:10 a 1:100. Do zkumavky (1:10) bylo napipetováno 180 μ l a do zkumavky (1:100) bylo napipetováno 198 μ l SOC média. Po skončení inkubace se do zkumavky se 180 μ l SOC média napipetovalo 20 μ l roztoku bakterií s transfekovaným plasmidem a ke 198 μ l SOC média se napipetovaly 2 μ l roztoku bakterií. V GMO laboratoři pak došlo k nanesení 50 μ l vzniklého roztoku na Petriho misky s agarózovým gelem. Vždy se napipetoval již míněný objem roztoku (50 μ l) na polovinu Petriho misky a rozetřel se pomocí skleněné hokejky. Od každého vzorku

byly použity 3 roztoky (1:10, 1:100, neřaděný). Petriho misky s agarem se nechaly inkubovat přes noc při 37 °C v inkubátoru.

3.3.6. STANOVENÍ KVALITY MRNA

Kvalita nasyntetizované mRNA byla určena na přístroji 5200 Fragment Analyzer System za pomoci Agilent RNA Kitu.

Nejprve se použila kuželovitá centrifugační zkumavka o maximálním objemu 50 ml a napipetovalo se do ní 1 µl fluoreskující barvy (Interkalační Dye) s 10 ml RNA separujícího gelu. Oba komponenty se musely před napipetováním do zkumavky ponechat při pokojové teplotě, dokud se na ni nezahřály.

Poté se připravil Vstupní pufr (5x řaděný 930 dsDNA Inlet Buffer). Zásobní roztok pufru se nechal zahřát na pokojovou teplotu (skladován při 4 °C) a pak se napipetovalo 20 ml vstupního pufru do čisté zkumavky a k němu bylo přidáno 80 ml deionizované vody.

Přístroj 5200 Fragment Analyzer System se skládá ze šesti šuplíků, které jsou umístěny pod sebou a jsou navzájem propojeny hadičkami, aby mohlo docházet k vyměňování kapalin mezi jednotlivými šuplíky. Součástí jednotlivých šuplíků jsou destičky (96 DeepWell 1ml Plate) obsahující 96 jamek. Řad v jedné destičce bylo 8 (A až H) a v jedné řadě bylo 12 jamek. Všechny destičky umístěny pod sebou byly stejně orientovány (řady A až H byly pod sebou).

V horním šuplíku se do všech dvanácti jamek v řadě A napipetoval vstupní pufr (1 ml do každé jamky). Do řady na druhém konci destičky (řada H) se napipetoval do 12 jamek roztok Capillary Storage Solution (1 ml do každé jamky). Ve druhém šuplíku od shora byla jenom prázdná mikrotitrační destička. Ve třetím šuplíku od shora byla mikrotitrační destička s oplachovacím pufrem. Do 12 jamek řady A bylo napipetováno 200 µl oplachovacího pufru (0,25 x koncentrovaný TE Rinse Buffer).

Sdandard (RNA Ladder aliquot) byl ponechán na ledu ve zkumavce pro PCR. Celý jeho objem se následně napipetoval do čisté zkumavky na PCR a nechal se zahřívát v termocykleru na 70 °C po dobu 2 minut, aby došlo k denuraci RNA.

Po skončení zahřívání došlo k jeho ochlazení na 4 °C a přendání zkumavky se vzorkem na led. Stejný postup se aplikoval i na vzorky s RNA.

Pro vzorky byla použita 96 jamková destička (RNase-free 96-well sample plate). Do každé jamky, kde byl později napipetován vzorek (8 jamek dohromady), se napipetovaly 2 µl vzorku smíchaných se 22 µl roztoku rozpouštědla (RNA Diluent Marker Solution). Do zbylých jamek v řadě bez vzorků se napipetoval BF-25 Blank Solution (24 µl / jamka). Do té samé řady jako byly umístěné vzorky v mikrotitrační destičce se do dvanácté jamky vždy napipetoval standard (RNA Ladder). Obsah příslušné jamky se také promíchal opakovaným nasátím a vypuštěním z pipety. Jako jeden z posledních kroků byla centrifugace destičky (1000 x g; 120 s), aby došlo k odstranění vzduchových bublin ve vzorcích a markeru. Nakonec se destička umístila do 4. šuplíku od shora a spustil se 5200 Fragment Analyzer System pomocí programu Fragment Analyzer control software.

3.3.7. WESTERN BLOT

3.3.7.1. SDS ELEKTROFORÉZA

Nejprve se připravily akrylamidové gely potřebné pro SDS elektroforézu. Byly použity gely s 5 % a 15 % obsahem akrylamidu (zaostřovací gel). Jako první se připravilo 100 ml roztoku akrylamidu. Složení uvedeno v tabulce 14.

Tabulka 14: Sloučeniny použité při přípravě 15 % akrylamidového gelu. 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) byl složen z 3,5 g tris-Base a 1,375 g tris-HCl a doplněn na požadovaný objem (25 ml) vodou.

Sloučeniny	Množství
Deionizovaná voda	75 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	25 ml
Akrylamid	15 g
Bis-akrylamid	0,40 g
SDS	0,10 g

Roztok se nechal zahřát. Potom bylo z roztoku gelu odpipetováno 18 ml a ke zbytku původního roztoku se napipetovalo 8 μ l roztoku TEMEDu a 33 μ l APS (0,5 mg/ml). Poté se roztok napipetoval do připravené soupravy na SDS elektroforézu. Byly připraveny dva gely s tím, že jeden byl ověřovací (neproběhla inkubace s primární protilátkou) a u druhého byl dodržen blotovací postup (inkubace s primární a sekundární protilátkou). Po napipetování roztoku gelu se gel ještě převrstvil 0,5 cm vysokou vrstvou deionizované vody.

Při přípravě 5 % akrylamidového gelu se postupovalo podobně jako při přípravě zaostřovacího gelu. Nejprve se napipetovaly a kvantitativně převedly sloučeniny potřebné pro přípravu 80 ml gelu do kádinky. Složení gelu uvedeno v tabulce 15.

Tabulka 15: Sloučeniny a jejich množství pro přípravu 5 % akrylamidového gelu.

Sloučeniny	Množství
Deionizovaná voda	60 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	20 ml
Akrylamid	4,1 g
Bis-akrylamid	110 mg
SDS	80 mg

Roztok se nechal zahřát, aby došlo k rozpuštění všech sloučenin. Po zahřátí se z roztoku odpipetovalo 10 ml a napipetovalo se 8 μ l roztoku TEMEDu a 22,5 μ l APS (0,5 mg/ml). Poté se odlila 0,5 cm vysoká vrstva vody ze zaostřovacího gelu a ten byl převrstven napipetováním roztoku 5 % akrylamidového gelu. Do tekutého gelu se vložil hřeben, který po zatuhnutí gelu vytvořil jamky, kam se následně pipetovaly vzorky. Migrační pufr se nalil do horní i dolní elektroforetické vany, aby jamky byly těsně pod hladinou. Do jamek v gelech se napipetovaly vzorky (24 μ l vzorku + 8 μ l vzorkovacího pufru) a marker (24 μ l markeru + 8 μ l vzorkovacího pufru). Jako marker byl použit Black Protein Ladder. Elektroforéza byla nastavena na proud 50 mA. Těsně před vstupem vzorků do zaostřovacího gelu se proud zvýšil na 100 mA. Elektroforéza byla puštěna po dobu 2 hodin.

Vzorkovací pufr (Laemmli 4x sample loading buffer)

Vzorkovacího pufru bylo připraveno 100 ml smícháním sloučenin uvedených v tabulce 16. Jako poslední se do roztoku přidal merkaptoethanol (výsledná koncentrace byla 20 %).

Tabulka 16: Sloučeniny a jejich množství pro přípravu vzorkovacího pufru.

Sloučeniny	Množství
Deionizovaná voda	40 ml
glycerol	40 ml
SDS	8,0 g
Bromfenolová modř	0,020 g
0,25 M Tris-HCl	20 ml

Migrační pufr (Standard migration 10x Laemmli buffer)

Migračního pufru bylo připraveno 700 ml (tabulka 17).

Tabulka 17: Složení migračního pufru. Tris-Base byl složený z 16,8 g Tris-Base a 4,3 g Tris-HCl. Konečné pH pufru bylo 8,4.

Sloučeniny	Množství
Deionizovaná voda	700 ml
Tris-Base	21,1 g
glycine	101 g
SDS	7,00 g

3.3.7.2. WESTERN BLOT

Do Petriho misky se nalil transferový pufr (1-step Transfer Buffer) a gely z elektroforézy se v něm nechaly inkubovat 10 minut. Poté se oba gely nechaly inkubovat 10 minut v methanolu a po vyndání se znovu inkubovaly 10 minut v transferovém pufru. Následně byly připraveny blotovací papíry o požadovaných rozměrech (60 cm²), které se namočily v transferovém pufru. Pak se gely vložily mezi blotovací papíry a PVDF membránu:

1. Vzaly se 2 spojené blotovací papíry (tloušťka vrstvy byla 0,83 mm) a položil se na ně gel

2. Na gel byla položena PVDF membrána
3. Na membránu se položily opět 2 kusy blotovacího papíru

Takto připravené gely se vložily do blotovacího zařízení a tam byly ještě převrstveny transferovým pufrům. Následoval přenos proteinů z gelů na PVDF membrány při napětí 25 V a proudu 1,3 A po dobu 7 minut. Po skončení přenosu proteinů z gelu na membránu byla membrána odebrána a inkubována ve dvou roztocích, kde jeden obsahoval primární a druhý sekundární protilátku. Pro přípravu blokovacích roztoků proti protilátkám bylo potřeba namíchat 2 různé pufrů o objemech 500 ml: TBS 10x (Tabulka 18) a TBST (Tabulka 19).

Tabulka 18: Sloučeniny a jejich množství použité pro přípravu TBS 10x (Tris-buffered saline 10x) pufru. Tris-HCl byl připraven smícháním 9 g Tris-Base a 3,1 g Tris-HCl. Výsledné pH pufru bylo 7,6.

Sloučeniny	Množství
Deionizovaná voda	500 ml
Tris-HCl	12,1 g
NaCl	40,0 g

Tabulka 19: Sloučeniny pro přípravu TBST pufru (Tris-buffered saline Tween).

Sloučeniny	Objem [ml]
TBS 10x	500
deionizovaná voda	450
Tween 20	0,375

Blokovací roztok byl připraven smícháním 1,5 g BSA a 50 ml TBS. Pak došlo k nalití blokovacího roztoku do Petriho misky a k němu byly přidány obě membrány za účelem navázání BSA na nepotřebné proteiny, aby se na ně nemohla navázat primární protilátka. Inkubace v blokovacím roztoku trvala 45 minut. Roztok primární protilátky byl zředěn 1:1000 (roztok primární protilátky: TBST pufr). Vzniklý roztok se nalil do Petriho misky a byla do něj položena pouze jedna membrána. Membrána se s roztokem primární protilátky inkubovala přes noc při teplotě 4 °C. Druhá membrána se nechala inkubovat přes noc pouze v TBST pufru. Druhý den se membrána vyndala z inkubačního prostředí a veškeré látky nenavázané na membráně byly smyty z membrán inkubací v TBST pufru. Tato technika byla provedena třikrát po sobě a

membrána se vždy ponořila na 5 minut do čistého roztoku pufru. Následně se namíchal roztok sekundární protilátky v poměru 1:10 000 (roztok sekundární protilátky: TBST pufr). Vzniklý roztok se nalil do Petriho misky a ponořily se do něj obě membrány na 60 minut. Membrány se s roztokem inkubovaly na kývačce. Po skončení inkubace se membrány vyndaly a nenavázané sekundární protilátky se smyly pryč ponořením gelů do TBST pufru. Tento postup omytí gelů byl provedený celkem třikrát a vždy se použil čistý roztok pufru.

Jako primární protilátky byly použity polyklonální králíčí. Pro každý cyklin a CDK byla použita jiná protilátka (dohromady 6 protilátek). Sekundární protilátkou byla HRP myší protilátka.

Vyvolání

Membrána byla vložena na fólii a následně převrstvena chemoluminiscenčním substrátem pro HRP. Inkubace se substrátem trvala 5 minut.

3.3.8. IZOLACE PLAZMIDU

Příslušné bakteriální kultury se nechaly přes noc namnožit v 10 ml LB media. 5 ml se napipetovalo do centrifugačních zkumavek a nechaly se odstředit na cetrifuze (6 000 x g; 3 minuty). Mezitím se připravily zředěné roztoky Lyse Blue s pufem P1 (1:1000) a roztok RNázy A s pufem P1 (1:100). Z centrifugačních zkumavek s peletami na dně se odlily supernatanty. K peletám se napipeto 250 µl pufru P1. Následně byly pelety s roztokem resuspendovány a napipetovány do mikrozkušavek o maximálním objemu 1,5 ml. Do zkumavek se vzorky se ještě napipetovalo 250 µl lyzačního pufru P2 a zkumavky byly promíchány otočením zkumavek dny nahoru a dolu (6x). Roztoky se změnilly na čiré a modré. Poté se do každé ze zkumavek napipetovalo 250 µl N3 pufru a zkumavky byly promíchány otočením dny nahoru a dolu. Roztoky se změnilly na bezbarvé. Roztoky byly odstředěny na mikrocentrifuze (16 000 x g; 10 minut). Vzniklé supernatanty byly napipetovány na kolonu (QIAprep) a přefiltrovány do čisté zkumavky odstředěním na mikrocentrifuze (15 000 x g; 1 minuta).

Vzorky zachycené na filtrech kolon byly promyty pomocí 750 μ l PB pufru. K promytí byla použita centrifugace za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Poté se připravil PE pufr tak, že se ke stávajícímu roztoku PE pufru napipetoval 96 % ethanol. Mezitím byl dopředu zahřát eluční pufr v termocykleru na 60 °C. Vzorky byly znovu promyty, tentokrát připraveným roztokem PE pufru (do každé kolony napipetováno 750 μ l PE pufru). Promytí vzorků se opět uskutečnilo odstředěním na mikrocentrifuze za stejných podmínek jako při promytí PB pufrem. Následovalo ještě odstředění (15 000 x g; 1 minuta) bez přidání promývacího roztoku, aby na filtrech kolon nebyl přítomen PE pufr. Kolony s plazmidem zachyceným na jejich filtru byly vloženy do čistých mikrozkuvek a na kolony bylo napipetováno 20 μ l předeřátého elučního pufru (EB pufr). Vzniklé roztoky byly promíchány na třepačce (5 minut) a následně odstředěny na centrifuze (15 000 x g, 1 minuta). Poté se ještě jednou napipetovalo 20 μ l elučního pufru na kolony a opět se vše odstředilo na centrifuze při 15 000 x g a po dobu jedné minuty. Vzniklé roztoky plazmidů v mikrozkuvkách byly napipetovány do čistých zkuvek s maximálním objemem 600 μ l. Všechny vzorky byly uloženy do lednice.

3.3.9. SYNTÉZA IVT MRNA

Pro syntézu příslušných mRNA se nejprve připravila společná reakční směs, jejíž výsledný objem se rozdělil do tří zkuvek (1 směs pro 3 různé mRNA kódující cykliny nebo jejich mutované formy). Připravily se 2 reakční směsi pro nemutované formy cyklinů, konkrétně pro cyklin D1, cyklin D2 a cyklin D3 a další směs pro jejich mutované formy (tabulka 20). Dále se pak připravila jedna reakční směs pro CDK6 a CDK4 R24C (1 směs pro 2 různé mRNA kódující CDK nebo jejich mutované formy) (tabulka 21).

Tabulka 20: Reakční směs pro *in vitro* syntézu mRNA kódující cykliny a jejich mutované formy. V každé zkumavce pak bylo 14 μ l. V závorce vždy uvedena koncentrace ve 14 μ l.

Komponenty	Objem [μ l]
DNA templát	3 x 3
Voda bez nukleáz	4,4
Roztok ATP (7,9nM)	3,3
7-methylguanosine (8,6nM)	3,6
Roztok GTP (7,1nM)	3,0
5mC : CTP (1 : 3) (8,1nM)	3,4
5mPU : UTP (1 : 3) (5,5nM)	2,3
DTT (10,7mM)	4,5
Inhibitor RNáz	2,0
10X reakční pufr	4,5
T7 RNA polymeráza	2,0
Výsledný objem	42

Tabulka 21: Reakční směs pro *in vitro* syntézu mRNA kódující CDK6 a mutovanou formu CDK4. V každé zkumavce pak bylo 19 μ l. V závorce vždy uvedena koncentrace v 19 μ l.

Komponenty	Objem [μ l]
DNA templát	2 x 4
Voda bez nukleáz	3,2
Roztok ATP (8,7nM)	3,3
7-methylguanosine (8,4nM)	3,2
Roztok GTP (7,1nM)	2,7
5mCTP : CTP (1 : 3) (8,7nM)	3,3
5mPUTP : UTP (1 : 3) (6,1nM)	2,3
DTT (10,5 mM)	4,0
Inhibitor RNáz	2,0
10X reakční pufr	4,0
T7 RNA polymeráza	2,0
Výsledný objem	38

Jako poslední se do reakce přidal vždy DNA templát, který byl pro každý cyklin nebo CDK jiný (tabulka 22 až 24). Objem reakce se ještě v průběhu reakce mění, protože se k jednotlivým reakčním směsím přidává v pravidelných intervalech (každých 30 minut) 1 μ l 30% roztoku GTP (roztok byl připraven smícháním 3 μ l GTP a 7 μ l vody). Postupné přidávání GTP do reakční směsi má za následek efektivnější navázání analogů 5'čepičky na 5' konec mRNA. Jako analogum 5'čepičky by použit: 5'-(7-methyl)-guanosin-PPP-5'-(2'-O-methyl)-adenosintrifosfát. Reakce byla prováděna po dobu hodiny a půl při teplotě 37 °C v termocykleru.

Tabulka 22: Použité DNA templáty pro přirozené formy cyklinů a jejich množství v reakční směsi. V závorce uvedena koncentrace v zásobních roztocích.

Použité DNA templáty	Množství DNA templátu na jednu reakční směs (15 μ l)
Cyklin D1 (100 ng/ μ l)	300 ng
Cyklin D2 (150 ng/ μ l)	450 ng
Cyklin D3 (180 ng/ μ l)	540 ng

Tabulka 23: Použité DNA templáty pro mutované formy cyklinů a jejich množství v reakční směsi. V závorce uvedena koncentrace v zásobních roztocích.

Použité DNA templáty	Množství DNA templátu na jednu reakční směs (14 μ l)
Cyklin D1 T286A (130 ng/ μ l)	390 ng
Cyklin D2 T280A (150 ng/ μ l)	450 ng
Cyklin D3 T283A (130 ng/ μ l)	390 ng

Tabulka 24: Použité DNA templáty pro CDK6 a mutovanou formu CDK4 a jejich množství v reakční směsi. V závorce uvedena koncentrace v zásobních roztocích.

Použité DNA templáty	Množství DNA templátu na jednu reakční směs (14 μ l)
CDK4 R24C (160 ng/ μ l)	640 ng
CDK6 (90 ng/ μ l)	360 ng

Připravená mRNA *in vitro* byla následně purifikována pomocí kolony s filtrem z polyethersulfonu (NANOSEP). Vždy se se z každé mikrozkušavky s nově připravenou mRNA odebralo 15 μ l (pro cykliny) nebo 20 μ l (pro CDK) a objem se napipetoval na kolonu, která byla vložena do mikrozkušavky. Na kolonu se dále napipetovaly 4 μ l (pro cykliny) nebo 3 μ l (pro CDK) 500 mM EDTA a 450 μ l (pro cykliny) nebo 500 μ l (pro CDK) deionizované vody. Vzniklá směs se odstředila na mikrocentrifuze (15 000 x g; 25 minut pro cykliny / 5 000 x g; 30 minut pro CDK). Tento krok se provedl ještě dvakrát, aby na filtru zůstala zachycena především mRNA bez nečistot. Pokaždé se na kolonu napipetovalo pouze 450 μ l deionizované vody a došlo k odstředění na mikrocentrifuze (15 000 x g; 25 minut pro cykliny / 5 000 x g; 30 minut pro CDK).

Pro eluci mRNA z filtru se napipetovalo 18 μ l (pro cykliny) nebo 40 μ l (pro CDK) elučního roztoku na kolonu. Kolona se přendala do prázdné mikrozkušavky. Roztok se na koloně nechal inkubovat 5 minut při 65 °C v termocykleru. Poté se kolona s roztokem odstředila na mikrocentrifuze (15 000 x g; 25 minut). Celý postup se ještě jednou zopakoval, aby se do roztoku uvolnila všechna mRNA. Nově vzniklý roztok se následně zchlادil.

Inkubace s antarktickou fosfatázou

Dále se připravil roztok s antarktickou fosfatázou. Složení roztoku uvedeno v tabulkách 25 a 26. Antarktická fosfatáza byla použita, aby se defosforylovala IVT mRNA na jejím 3' konci.

Roztok s IVT mRNA se nechal inkubovat při 37 °C po dobu 2 hodin. Poté se nechal inkubovat přes noc při 10 °C. Z roztoku se odpipetovalo 50 µl na kolonu s filtrem z polyethersulfonu (NANOSEP). Na kolonu se ještě napipetovaly 2 µl 500mM roztoku EDTA a 450 µl vody bez endonukleáz. Roztok byl odstředěn na mikrocentrifuze (15 000 x g; 25 minut pro cykliny / 5 000 x g; 25 minut pro CDK). mRNA byla promyta ještě dvakrát s tím, že se vždy na kolonu napipetovalo 450 µl vody bez endonukleáz a vše se odstředilo na mikrocentrifuze (15 000 x g; 25 minut pro cykliny / 5 000 x g; 25 minut pro CDK).

Pro eluci defosforylované mRNA z filtru se napipetovalo 19 µl elučního roztoku na kolonu. Kolona se přendala do prázdné mikrozkušavky. Roztok se na koloně nechal inkubovat 5 minut při 65 °C v termocykleru. Poté se kolona s roztokem odstředila na mikrocentrifuze. Celý postup se ještě jednou zopakoval, aby se do roztoku uvolnila všechna mRNA. Nově vzniklý roztok se následně zchladil.

Tabulka 25: Složení reakčního roztoku pro defosforylaci IVT mRNA u cyklinů a jejich mutovaných forem. Roztok pro jeden druh mRNA.

Komponenty	Objem [µl]
Antarktická fosfatáza	7,5
AP reakční pufr	7,5
Inhibitor RNáz	5
Voda bez nukleáz	24
Roztok IVT mRNA	36
Výsledný objem	80

Tabulka 26: Složení reakčního roztoku pro defosforylaci IVT mRNA u CDK6 a CDK4 R24S.

Roztok pro jeden druh mRNA.

Komponenty	Objem [μl]
Antarktická fosfatáza	12
AP reakční pufr	10
Inhibitor RNáz	6
Voda bez nukleáz	20
Roztok IVT mRNA	80
Výsledný objem	128

Syntéza poly(A) konce

Pro polyadenylaci byla připravena reakční směs, jejíž složení je uvedeno v tabulce 27.

Všechny potřebné komponenty se napipetovaly do mikrozkušavky. Reakční směsi obsahovaly stejné složení jak pro cykliny tak pro CDK. mRNA se nechala inkubovat v roztoku 2 hodiny.

Tabulka 27: Reakční směs pro syntézu poly (A) konce u IVT mRNA.

Komponenty	Objem [μl]
Roztok IVT mRNA	38
Roztok ATP (100mM)	1
5X reakční pufr	20
Inhibitor RNáz	0,5
Enzym (Poly(A) polymeráza)	1
Voda bez nukleáz	40
Výsledný objem	100,5

Izolace nasyntetizované mRNA

Jako další krok se uskutečnila izolace nasyntetizované mRNA. Pro purifikaci by použit MEGAclear Kit.

První se k roztoku mRNA přidalo 350 μ l vázacího roztoku. Roztok se promíchal a napipetovalo se k němu ještě 250 μ l 96% ethanolu a směs se opět promíchala. Nově vzniklý roztok se napipetoval na kolonu obsahující filtr z oxidu křemičitého. Kolona byla vložena do čisté mikrozkušavky. Kolona se odstředila na mikrocentrifuze (15 000 x g; 1 minuta).

K 5 ml promývacího roztoku se přidalo 20 ml 100 % roztoku ethanolu. Na kolonu se napipetovalo 500 μ l nově připraveného promývacího roztoku a mRNA zachycená na filtru se promyla odstředěním na mikrocentrifuze (15 000 x g; 1 minuta). Celý postup se zopakoval ještě jednou, akorát centrifugace trvala 90 s, aby na koloně nezůstaly zbytky promývacího roztoku. Následně proběhla eluce mRNA z kolony do roztoku. Nejprve se kolona umístila do čisté mikrozkušavky. Na kolonu se napipetovalo 50 μ l elučního roztoku. Roztok se nechal inkubovat na koloně po dobu 5 minut při 65 °C. Po ukončení inkubace se kolona s roztokem odstředila v mikrocentrifuze (15 000 x g; 1 minuta). Celý proces eluce se zopakoval ještě jednou, aby se z filtru uvolnila všechna IVT mRNA.

K roztoku mRNA (100 μ l) se následně napipetovalo 10 μ l 5M roztoku octanu amonného a 275 μ l 100 % roztoku ethanolu. Vzniklý roztok se promíchal a nechal se inkubovat při teplotě -20 °C a po dobu 30 minut. Roztok se odstředil na mikrocentrifuze (15 000 x g; 15 minut). Poté se opatrně odpipetoval všechn supernatant a vzniklá peleta z mRNA se promyla roztokem 70 % ethanolu. Mikrozkušavka s peletou a ethanolem se odstředila na mikrocentrifuze (15 000 x g; 5 minut). Poté se všechn ethanol odpipetoval.

3.3.10. TRANSFEKCE NASYNTETIZOVANÉ MRNA DO BUNĚK POTKANÍCH LANGERHANSOVÝCH OSTRŮVKŮ

Nejprve se připravilo transfekční činidlo Messenger Max smícháním 50 μ l média (Opti-MEM) a 2 μ l činidla (MessengerMAX).

Následně se vzalo 8 mikrozkušavek (pro každý druh mRNA jedna) a do každé se napipetovalo 2,5 μ l IVT mRNA, 6,5 μ l činidla (MessengerMAX). Vzniklý roztok se promíchal a nechal inkubovat 6 minut. Po skončení inkubace se k roztoku na pipetovalo 111 μ l kultivačního média. Složení kultivačního média uvedeno v tabulce 28.

Připravené roztoky byly napipetovány k buňkám potkaních Langerhansových ostrůvků a vše se nechalo inkubovat 24 hodin. Po 24 hodinách bylo odsáto veškeré kultivační médium a k buňkám s transfekovanou mRNA byl přidán RIPA pufr pro lýzu všech přítomných buněk. Následně byl proveden Western blot pro detekci jednotlivých cyklinů a CDK.

Tabulka 28: Složení kultivačního média pro potkaní Langerhansovy ostrůvky. Roztok pyruvátu sodného byl použit o koncentraci 100mM.

Komponenty	Objem [μ l]
CMRL médium	9 000
Albumin	500
Směs esenciálních aminokyselin	100
GLUTAMAX(L-glutamin)	100
ITS 100x	100
Pyruvát sodný	100
HEPES	100

4. VÝSLEDKY

4.1. PŘÍPRAVA DNA KONSTRUKTŮ

Byly použity geny pro přirozeně se vyskytující cykliny a CDK nacházející se v potkaních pankreatických buňkách a také pro jejich mutované formy. Geny pro nemutované formy byly připravovány stejným způsobem jako geny s úmyslně inkorporovanou mutací.

Geny kódující jednotlivé cykliny a CDK obsahují změny v polynukleotidové sekvenci. Sekvence jednotlivých genů byly porovnávány se sekvencemi genů kódujícími cykliny a CDK v potkaních buňkách. U cyklinů a CDK vedla změna v sekvenci nukleotidů k záměně aminokyselin v proteinech. Konkrétně došlo k záměně threoninu za alanin v molekulách cyklinů. U CDK4 došlo k náhradě argininu za cystein (pouze pro CDK4). V genu kódujícím cyklin D3 se vyskytuje mezi 21. až 60. nukleotidem více změn v pořadí nukleotidů. Ovšem dané změny nezpůsobují změnu ve výsledné aminokyselinové sekvenci.

Sekvence genů s úmyslně vnesenou mutací byla zjištěna a ověřena pomocí Sangerova sekvenování.

Jednotlivé změny v sekvenci nukleotidů jsou zvýrazněny červeně. Horní řádek obsahuje sekvenci originálních potkaních genů a na spodním řádku je znázorněna část genu obsahující konkrétní mutaci.

Cyklin D1 T286AT288A

mRNA	841	GCTGGTCTGGCTTGC ACACCC ACCGACGTCCGAGATGTGG	880
Plasmid	841	GCTGGTCTGGCTTGC GCACCC GCCGACGTCCGAGATGTGG	880

Cyklin D2 T280A

mRNA	801	CTCCAAGTCTGTGGAAGATCCGGACCAAGCCACC ACCCCT	840
Plasmid	979	CTCCAAGTCTGTGGAAGATCCGGACCAAGCCACC GCCCCT	1018

Cyklin D3 T283A

mRNA	21	GGGCACCCG G CTCGCGCC CCGGGC CGGGCC C GACCCGCGG	60
Plasmid	21	GGGCACCCG A CTCGCGCC ACGAGCAGGACCA GACCCGCGG	60
mRNA	843	GACCAGC A CTCCCACAGATGTCACAGCCATCCACCTGT AG	882
Plasmid	843	GACCAGC G CTCCCACAGATGTCACAGCCATCCACCTGT GA	882

CDK4 R24C

mRNA	61	TACAAAGCC CGA GATCCCCACAGTGGCCACTTTGTGGCTC	100
Plasmid	102	TACAAAGCC TGT GATCCCCACAGTGGCCACTTTGTGGCTC	141

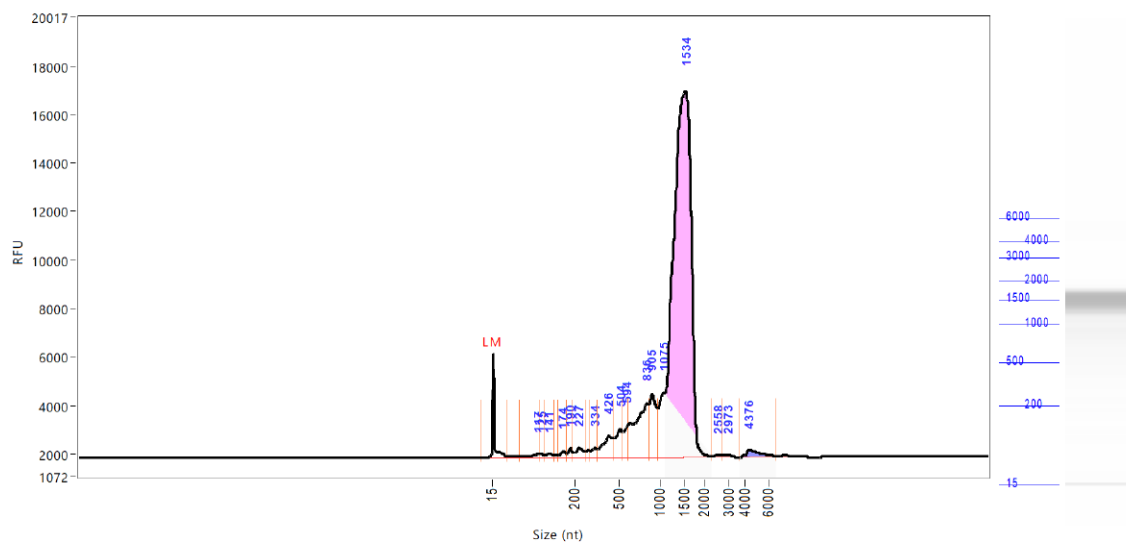
CDK6

U CDK6 byl použit nezměněný gen, který se přirozeně vyskytuje v potkaních buňkách.

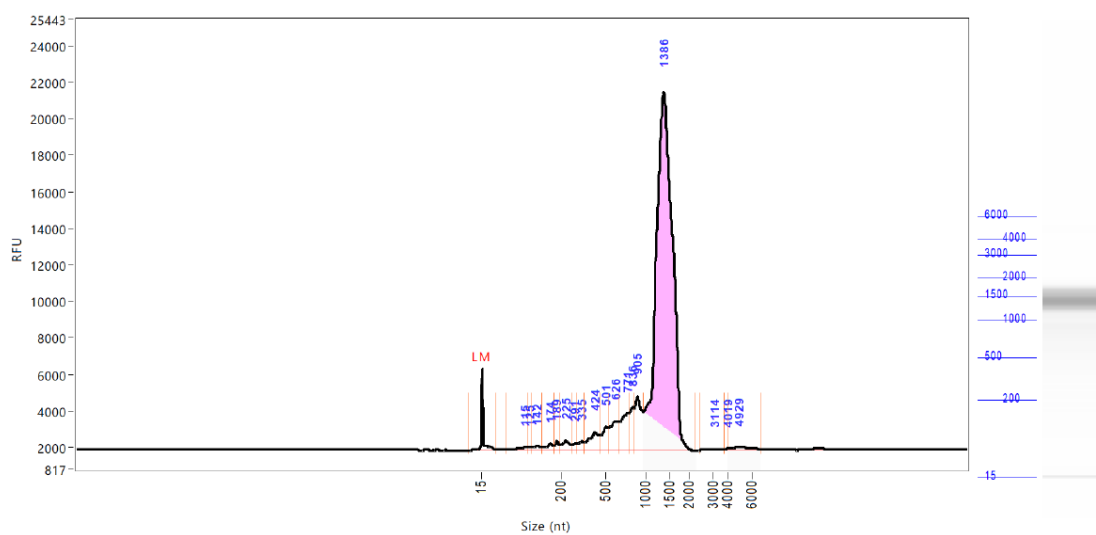
4.2. VÝSLEDKY ZE STANOVENÍ KVALITY MRNA

Kvalita nasytetizované mRNA kódující jednotlivé cykliny a CDK byla stanovena kapilární gelovou elektroforézou na přístroji 5200 Fragment Analyzer System.

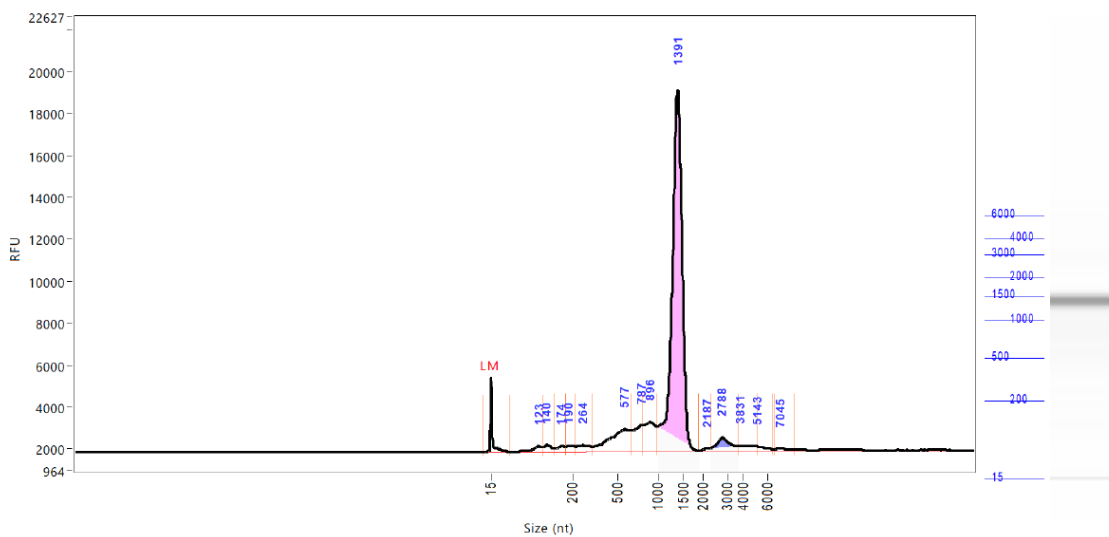
Výsledky jsou uvedeny formou grafů, kde je vynášena závislost relativní fluorescenční jednotky udávající množství nasytetizované mRNA na velikosti (počtu ribonukleotidů) jednotlivých syntetických mRNA, která byla udána rychlostí migrace mRNA v gelu. mRNA byla nasytetizována se 7-methylguanosiinovou čepičkou na 5'konci a s poly(A) řetězcem na 3'konci.



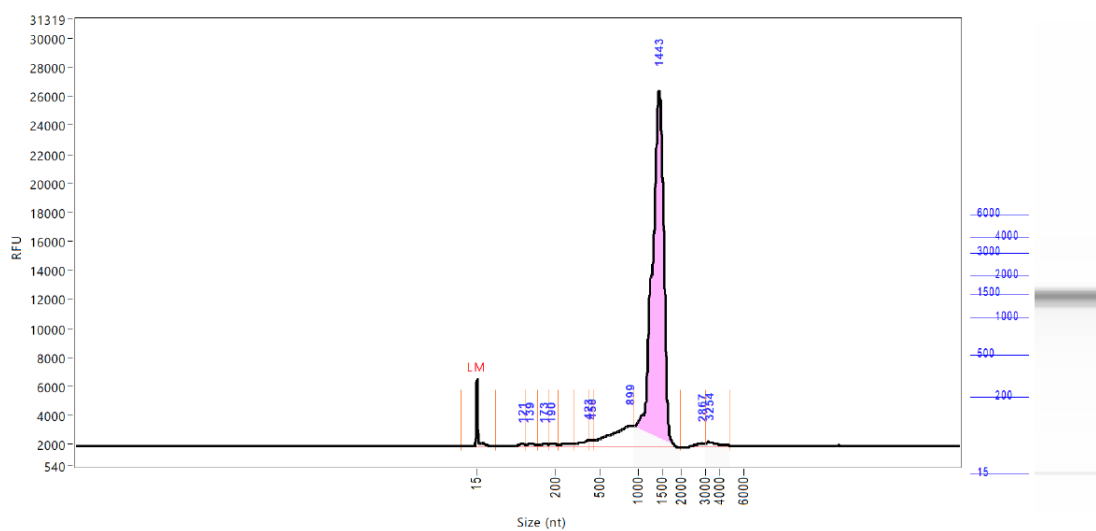
Obrázek 10: Stanovení kvality IVT mRNA pro přirozenou formu cyklinu D1.



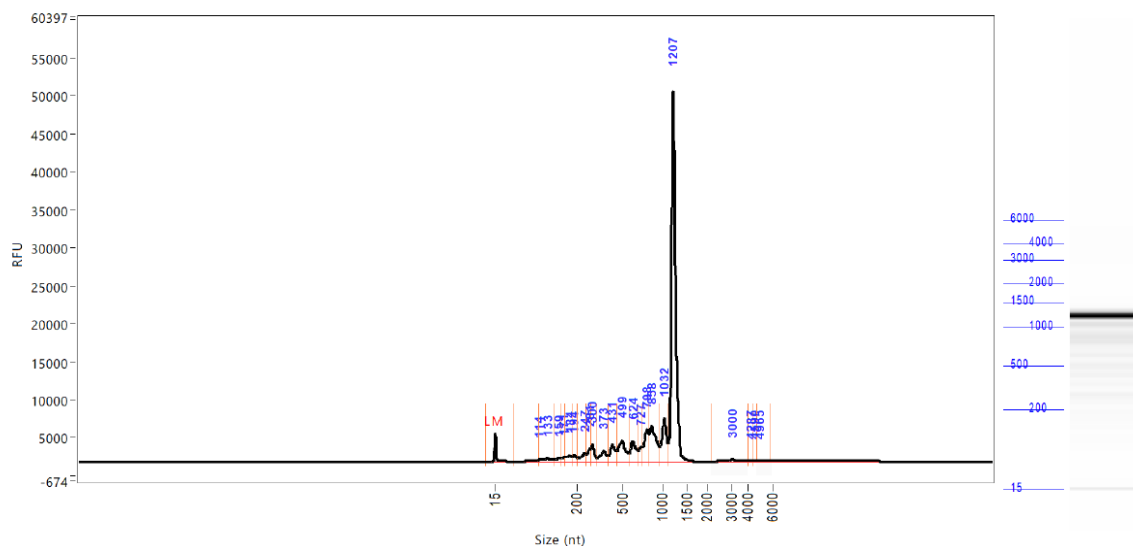
Obrázek 11: Stanovení kvality mRNA pro mutovanou formu cyklinu D1 T286AT288A.



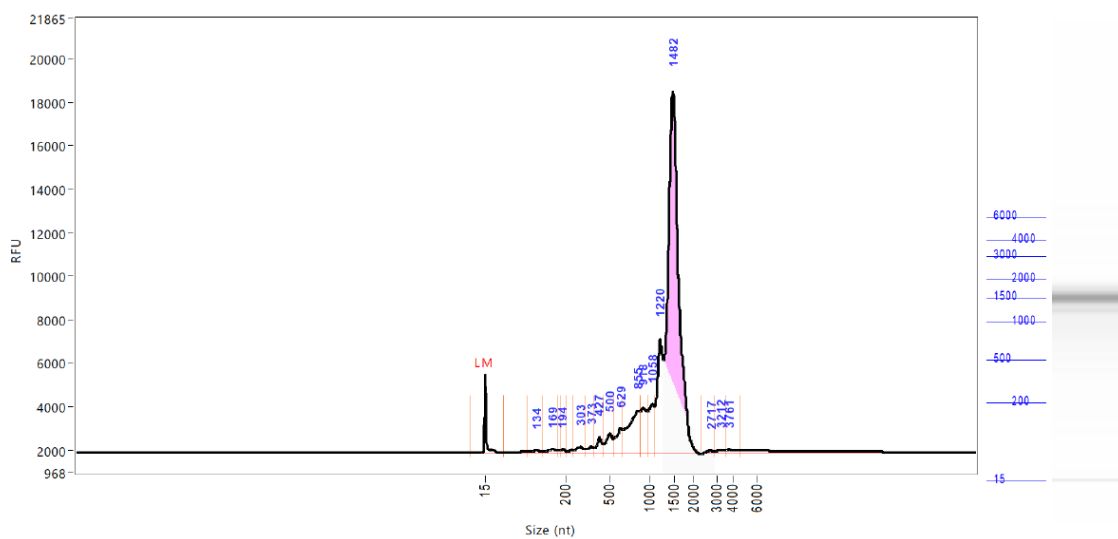
Obrázek 12: Stanovení kvality mRNA pro přirozenou formu cyklinu D2.



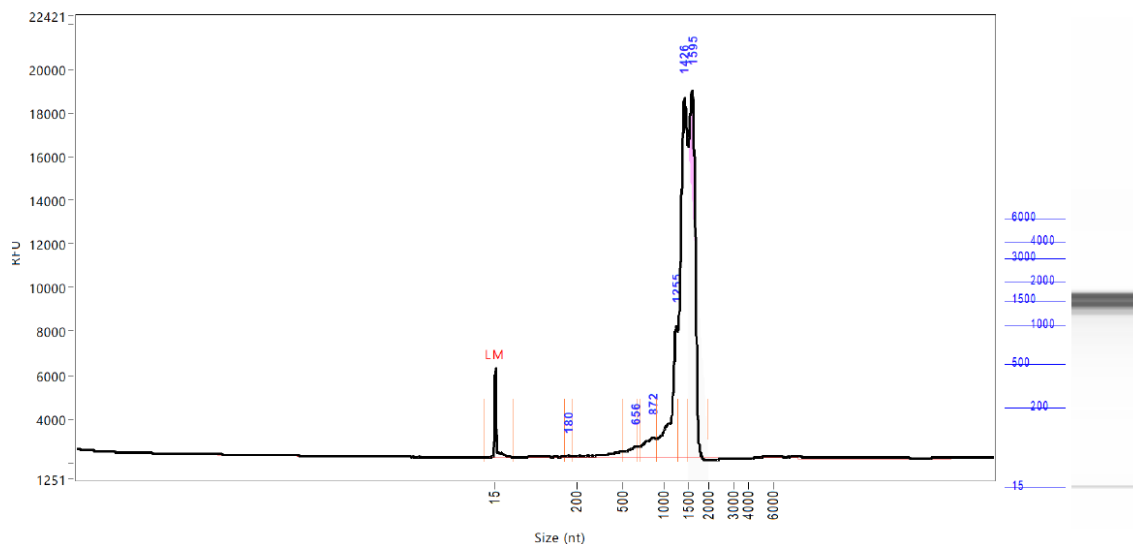
Obrázek 13 : Stanovení kvality mRNA pro mutovanou formu cyklinu D2 T280A.



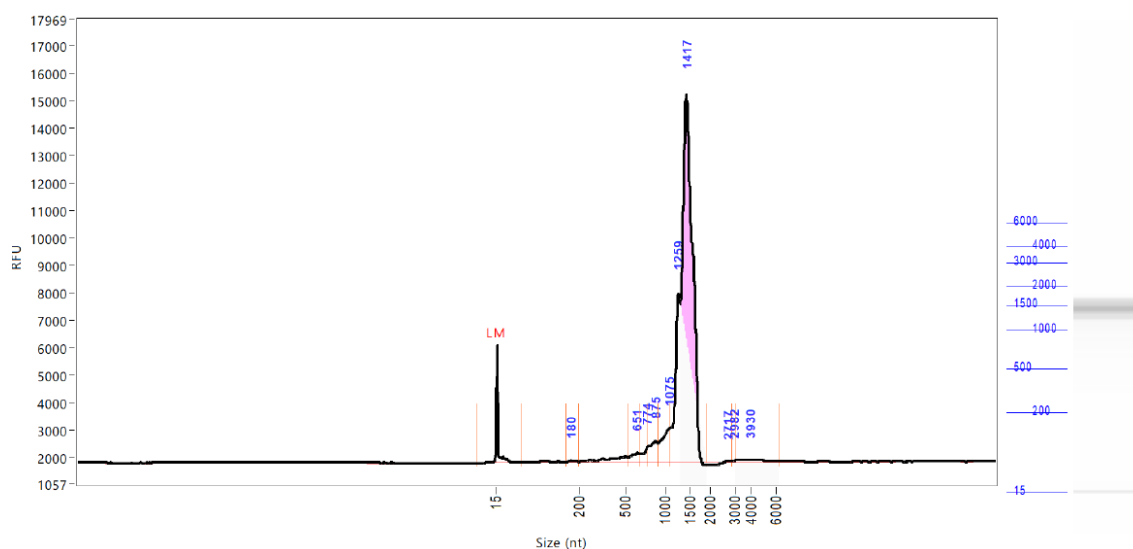
Obrázek 14: Stanovení kvality mRNA pro přirozenou formu cyklinu D3. Délka genu byla 1170. Ovšem nasytetizovaná mRNA měla délu 1207 nukleotidů. Nejspíše nedošlo k polyadenilaci.



Obrázek 15 : Stanovení kvality mRNA pro mutovanou formu cyklinu D3 T283A.



Obrázek 16: Stanovení kvality mRNA pro mutovanou formu CDK4 R24C.



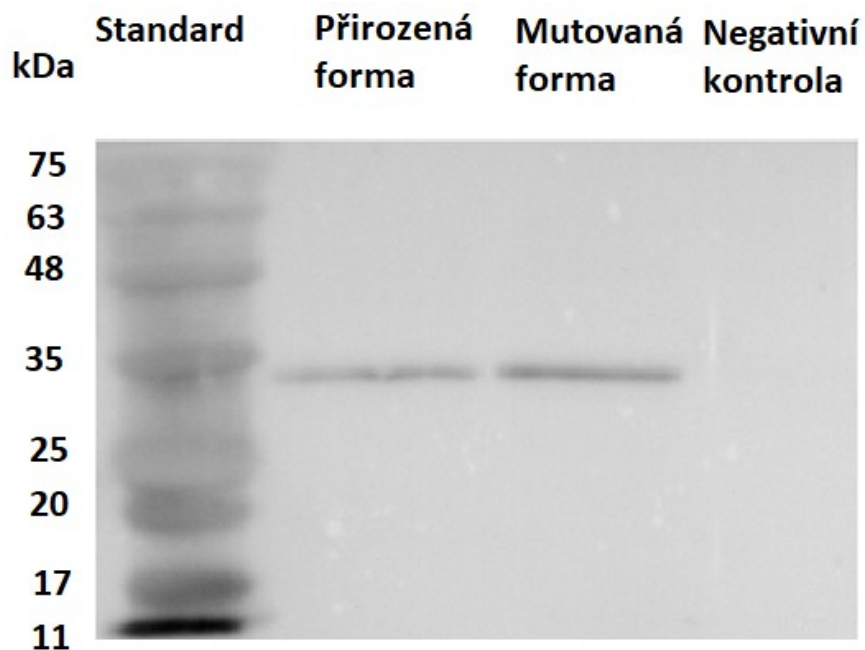
Obrázek 17 : Stanovení kvality mRNA pro přirozenou formu CDK6.

4.3. VÝSLEDKY Z WESTERN BLOT ANALÝZY

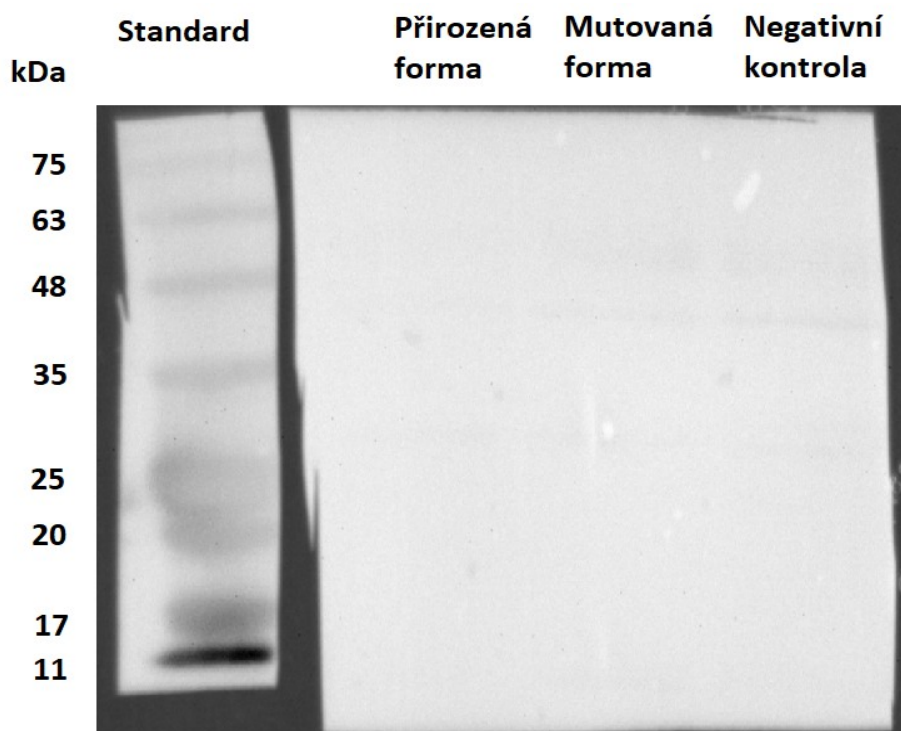
Pomocí metody Western blot se ověřilo, zda transfekce mRNA do buněk Langerhansových ostrůvků proběhla úspěšně a také zda došlo k expresi cílových proteinů.

Každý obrázek s výsledkem obsahuje vždy standard udávající přibližnou molekulovou hmotnost jednotlivých molekul (kDa), analyzované vzorky

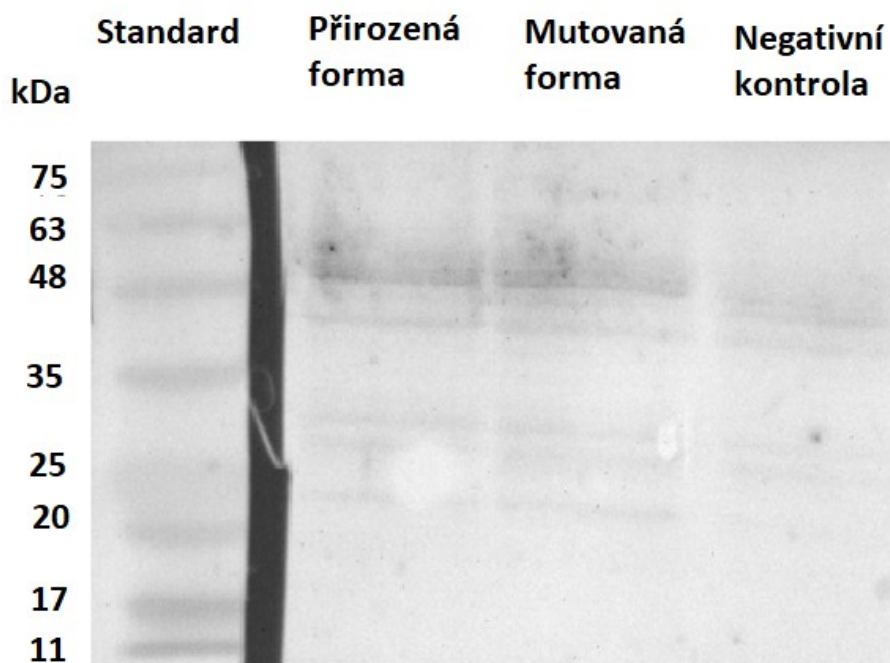
(pro přirozenou nebo mutovanou formu cyklinu / CDK) a negativní kontrolu (vzorek buněk bez transfekce IVT mRNA).



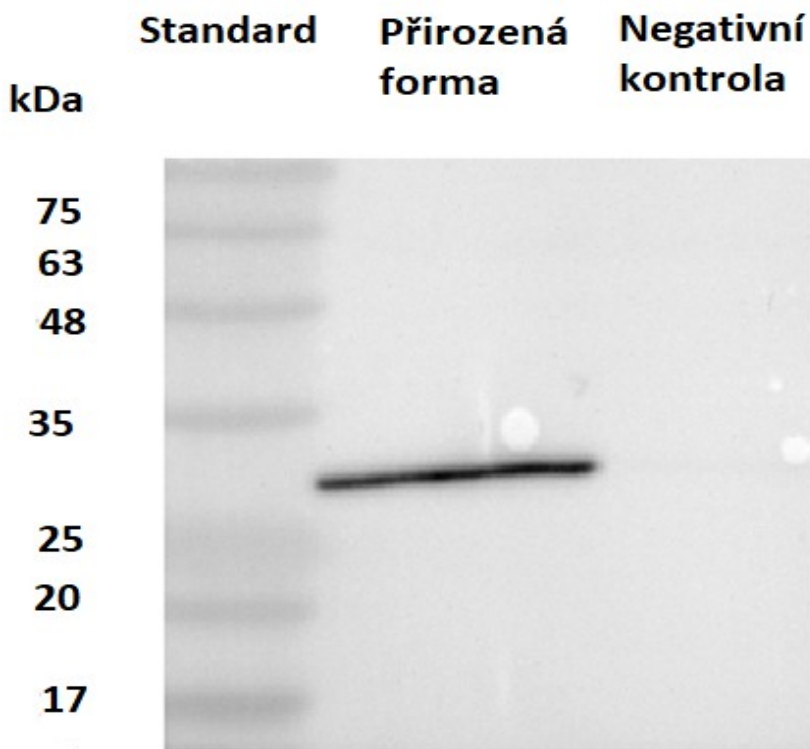
Obrázek 18: Pozitivní výsledek exprese molekul cyklinu D1 a cyklinu D1 T286AT288A. Molekulová hmotnost pro cyklin D1 a jeho mutovanou formu je přibližně 34 kDa.



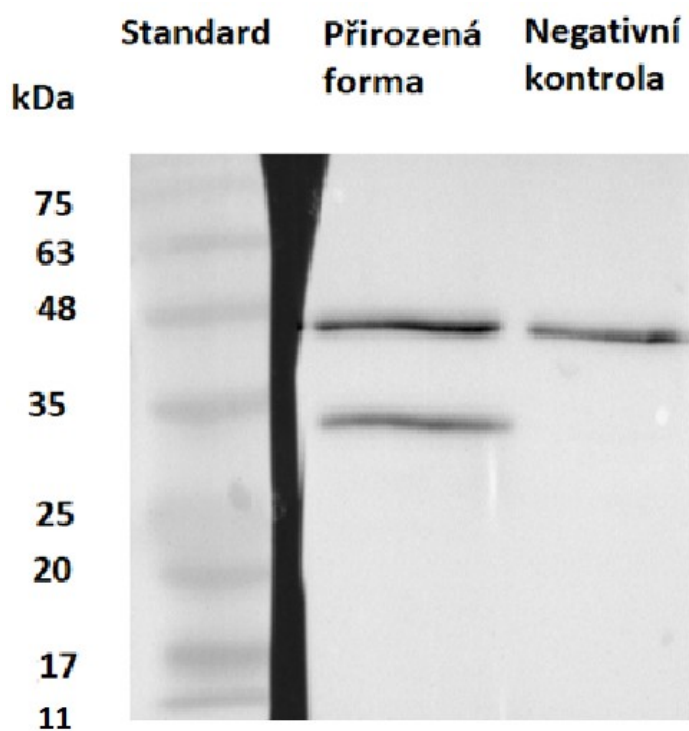
Obrázek 19: Negativní výsledek exprese molekul cyklinu D2 a cyklinu D2 T280A. Molekulová hmotnost pro cyklin D2 a jeho mutovanou formu je přibližně 33 kDa.



Obrázek 20: Negativní výsledek exprese molekul cyklinu D3 a cyklinu D3 T283A. Molekulová hmotnost pro cyklin D3 a jeho mutovanou formu je přibližně 35 kDa.



Obrázek 21: Pozitivní výsledek exprese molekul CDK4 R24C. Molekulová hmotnost pro cyklin CD4 R24C je přibližně 33,7 kDa.



Obrázek 22: Pozitivní výsledek exprese molekul CDK6. Molekulová hmotnost pro cyklin CD6 je přibližně 37 kDa

5. DISKUSE

Molekuly mRNA připraveny *in vitro* jsou hojně používány v regenerativní medicíně. Podání IVT mRNA do organismu se ukázalo být daleko efektivnější než terapeutická aplikace konkrétního proteinu. Pro svoji správnou funkci v organismu potřebují proteiny biologicky aktivní prostorovou strukturu. Podání proteinu přímo do krve může zapříčinit jeho denaturaci a ztrátu potřebné biologické aktivity. Oproti proteinům je IVT mRNA více stabilní při aplikacích do tkání nebo do krve a její dostupnost pro buňku skrze buněčnou membránu je také lepší ve srovnání s řadou proteinů. (Kwon a kol. 2018).

Náplní této bakalářské práce byla příprava IVT mRNA, kódující cykliny, CDK a jejich mutované formy. Následně se pak ověřila i schopnost translace IVT mRNA po transfekci do buněk potkaních Langerhansových ostrůvků.

DNA templáty, podle kterých byla připravena příslušná IVT mRNA, kódovaly cykliny, CDK a jejich mutované formy. Mutace vždy spočívala v tom, že se u genu kódujícího daný cyklin zaměnily určité báze tak, že nově vzniklé proteiny obsahovaly místo threoninu aminokyseliny alanin ve specifické pozici aminokyselinového řetězce. Mutace v genu kódující CDK4 způsobila, že nově vzniklý protein obsahoval namísto argininu cystein.

Cykliny D1, D2 a D3 obsahují na C-terminální části řetězce podobné domény ovlivňující jejich stabilitu v buňkách (Lu a kol. 2009). Degradaci jednotlivých cyklinů ovlivňuje především aminokyselina threonin, konkrétně její fosorylovaná forma. Ovšem při záměně threoninu za alanin dojde k degradaci mutované molekuly cyklinu za podstatně delší dobu než u přirozeně se vyskytující formy (Casanovas a kol. 2004, Germain a kol. 2000, Lu a kol. 2009).

Mutace u CDK4 R24C na rozdíl od cyklinů spočívá v tom, že tyto molekuly jsou daleko méně citlivé na interakci s inhibitory buněčného cyklu, konkrétně s inhibitorem INK4 (Marzo a kol. 2004).

Mutované formy cyklinů a CDK4 (společně s nemutovanou formou CDK6) by měly být schopny efektivněji vyvolat buněčnou proliferaci a tím způsobit nárůst počtu

buněk v cílových tkáních. Příslušné poznatky by mohly vést k vývoji nových léčebných postupů a významnou roli by mohly hrát i při léčbě diabetu mellitu prvního typu.

Jak bylo zmíněno již na začátku diskuse, náplní práce byla především příprava příslušných mRNA *in vitro*. Zda byly příslušné mRNA správně nasynetizovány bylo ověřeno stanovením jejich kvality (str. 56-60). Požadované molekuly mRNA byly téměř všechny připraveny o odpovídající velikosti. Pouze mRNA kódující nemutovanou formu cyklinu D3 neměla předpokládanou velikost. V tomto konkrétním případě nejspíše nedošlo k syntéze poly(A) konce. mRNA připravená *in vitro* pro cyklin D3 měla odhadovanou velikost přibližně 1207 nukleotidů, kdežto její mutovaná forma obsahující gen o stejném počtu nukleotidů (1170) měla přibližnou výslednou délku 1482 nukleotidů. Chyba mohla být zapříčiněna tím, že nedošlo k odštěpení trifosfátu na 3' konci mRNA, tudíž nemohlo dojít k syntéze poly(A) konce.

Jako další následovala transfekce připravených mRNA do buněk a následné ověření exprese požadovaných proteinů pomocí metody Western blot. Z výsledků (str. 60-63) vyplývá, že úspěšná transfekce a následná exprese byla detekována pro cyklin D1 (přirozená i mutovaná forma), CDK4 a CDK6. U cyklinů D2, D3 a jejich mutovaných forem byly výsledky negativní. Negativní výsledek mohl nastat chybným nasynetizováním mRNA u přirozené formy cyklinu D3. Dále mohlo dojít k neúspěšné transfekci IVT mRNA do buněk Langerhansových ostrůvků.

Další možností neprokázání exprese požadovaných molekul je nenavázání primární protilátky na cykliny D2, D3 a jejich mutované formy, což pak vedlo k negativním výsledkům u Western blotu. U CDK6 je vidět, že se zde nachází nečekaný produkt o přibližné molekulové hmotnosti 48 kDa. Ovšem tento produkt byl přítomen i v kontrolním vzorku, který nebyl transfekován IVT mRNA pro CDK6, tudíž se s vysokou pravděpodobností jedná o nespecifickou reakci primární protilátky proti jinému proteinu, než li je CDK6.

6. ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byly *in vitro* připraveny molekuly mRNA kódující cykliny, CDK a jejich mutované formy. Jednalo se o tyto konkrétní molekuly: cyklin D1, cyklin D1 T286AT288A, cyklin D2, cyklin D2 T280A, cyklin D3, cyklin D3 T283A, CDK4 R24C, CDK6.

Téměř všechny mRNA nasyntetizované *in vitro* byly připraveny o požadované délce, s výjimkou mRNA kódující cyklin D3.

Sekvence DNA konstruktů pro nemutované formy cyklinů D1, D2 a CDK6 vždy vykazovaly 100 % shodnost v polynukleotidové sekvenci s příslušnými geny. Pro nemutovanou formu cyklinu D3 byly zjištěny změny v polynukleotidové sekvenci genu, ale sekvence aminokyselin zůstala zachována. U mutovaných forem byly vneseny úmyslné mutace, které zapříčinily záměnu vždy jedné nebo dvou aminokyselin na konci aminokyselinového řetězce. Záměna threoninu za alanin pro cykliny a záměna argininu za cystein pro CDK4.

Poté se provedla transfekce IVT mRNA do buněk Langerhansových ostrůvků. Výsledky z Western blot analýzy prokázaly, že exprese požadovaných proteinů byla zaznamenána pro: cyklin D1, cyklin D1 T286AT288A, CDK4 R24C, CDK6. Exprese proteinů nebyla prokázána pro: cyklin D2, cyklin D2 T280A, cyklin D3, cyklin D3 T283A.

7. LITERÁRNÍ ZDROJE

- Al-saif, M.; Khabar, K. S. A.: UU / UA Dinucleotide Frequency Reduction in Coding Regions Results in Increased mRNA Stability and Protein Expression. *Molecular Therapy*. 20, 954–959 (2012)
- Atherton-Fessler, S.; Parker, L. L.; Geahlen, R. L.; Piwnica-Worms, H.: Mechanisms of p34cdc2 regulation. *Molecular and Cellular Biology*. 13, 1675–1685 (1993)
- Atkins, R. C.; Zimmet, P.: Diabetic kidney disease: Act now or pay later. *Acta Diabetologica*, 47, 1–4 (2010).
- Balachandran, S.; Roberts, P. C.; Brown, L. E.; Truong, H.; Pattnaik, A. K.; Archer, D. R.; Barber, G. N.: Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity*. 13, 129–141 (2000)
- Bartkowiak, B.; Liu, P.; Phatnani, H. P.; Fuda, N. J.; Cooper, J. J.; Price, D. H.; Greenleaf, A. L.: CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1. *Genes & Development*. 24, 2303–2316 (2010)
- Blazek, D.; Kohoutek, J.; Bartholomeeusen, K.; Johansen, E.; Hulinkova, P.; Luo, Z.; Peterlin, B. M.: The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes & Development*. 25, 2158–2172, (2011)
- Bruno, B. J.; Miller, G. D.; Lim, C. S.: Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Therapeutic Delivery*. 4, 1443–1467 (2013).
- Campbell-Thompson, M. L.; Atkinson, M. A.; Butler, A. E.; Chapman, N. M.; Frisk, G.; Gianani, R.; In'T Veld, P. A.: The diagnosis of insulinitis in human type 1 diabetes. *Diabetologia*, 56, 2541–2543 (2013)
- Casanovas, O.; Jaumot, M.; Paules, A. B.; Agell, N.; Bachs, O.: P38SAPK2 phosphorylates cyclin D3 at Thr-283 and targets it for proteasomal degradation. *Oncogene*. 23, 7537–7544 (2004)
- Cisek, L. J.; Corden, J. L.: Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2. *Nature*. 339, 679–684 (1989)

- Diebold, S. S.; Kaisho, T.; Hemmi, H.; Akira, S.; Reis E Sousa, C.: Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. *Science*. 303, 1529–1531 (2004)
- Dyson, N.: The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes and Development*. 12, 2245–2262 (1998)
- Elroy-Stein, O.; Fuerst, T. R.; Moss, B.: Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86, 6126–6130 (1989)
- Fridlyand, L. E.; Philipson, L. H.: Glucose sensing in the pancreatic beta cell: A computational systems analysis. *Theoretical Biology and Medical Modelling*. 7, 1–44. (2010)
- Frokjaer, S.; Otzen, D. E.: Protein drug stability: A formulation challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*. 4, 298–306 (2005)
- Germain, D.; Russell, A.; Thompson, A.; Hendley, J.: Ubiquitination of free cyclin D1 is independent of phosphorylation on threonine 286. *Journal of Biological Chemistry*. 275, 12074–12079 (2000)
- Gorden, K. K. B.; Qiu, X.; Battiste, J. J. L.; Wightman, P. P. D.; Vasilakos, J. P.; Alkan, S. S.: Oligodeoxynucleotides Differentially Modulate Activation of TLR7 and TLR8 by Imidazoquinolines. *The Journal of Immunology*. 177, 8164–8170 (2006)
- Gray, M. W.; Burger, G.; Lang, B. F.: Mitochondrial evolution. *Science*. 283, 1476–1481 (1999)
- Hannenhalli, S.; Kaestner, K. H.: The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nature Reviews Genetics*. 10, 233–240. (2009)
- Harbour, J. W.; Dean, D. C.: The Rb/E2F pathway: Expanding roles and emerging paradigms. *Genes and Development*. 14, 2393–2409 (2000)
- Heil, F.; Hemmi, H.; Hochrein, H.; Ampenberger, F.; Akira, S.; Lipford, G.; Bauer, S.: Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science*. 303, 1526–1529 (2013)

- Heber-Katz, E.; Zhang, Y.; Bedelbaeva, K.; Song, F.; Chen, X.; Stocum, D. L.: Cell Cycle Regulation and Regeneration. *New Perspectives in Regeneration*. 367, 253–276 (2012)
- Chang, J. H.; Xiang, S.; Xiang, K.; Manley, J. L.; Tong, L.: Structural and biochemical studies of the 5'→3' exoribonuclease Xrn1. *Nature Structural and Molecular Biology*. 18, 270–276 (2011)
- Chen, Y. J.; Dominguez-Brauer, C.; Wang, Z.; Asara, J. M.; Costa, R. H.; Tyner, A. L.; Raychaudhuri, P.: A conserved phosphorylation site within the forkhead domain of FoxM1B is required for its activation by cyclin-CDK1. *Journal of Biological Chemistry*. 284, 30695–30707 (2009)
- Cheng, S.-W. G.; Kuzyk, M. A.; Moradian, A.; Ichu, T.-A.; Chang, V. C.-D.; Tien, J. F.; Morin, G. B.: Interaction of Cyclin-Dependent Kinase 12/CrkRS with Cyclin K1 Is Required for the Phosphorylation of the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Molecular and Cellular Biology*. 32, 4691–4704 (2012)
- Juhl, K.; Hutton, J.: Stimulus-secretion coupling in the pancreatic beta-cell. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 552, 66–90 (2004)
- Karikó, K.; Muramatsu, H.; Welsh, F. A.; Ludwig, J.; Kato, H.; Akira, S.; Weissman, D.: Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Molecular Therapy*. 16, 1833–1840 (2008)
- Kobayashi, H.; Stewart, E.; Poon, R.; Adamczewski, J. P.; Gannon, J.; Hunt, T.: Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Molecular Biology of the Cell*. 3, 1279–1294 (1992)
- Kwon, H.; Kim, M.; Seo, Y.; Moon, Y. S.; Lee, H. J.; Lee, K.; Lee, H.: Biomaterials Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. *Biomaterials*. 156, 172–193 (2018)
- Lang, J.: Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *European Journal of Biochemistry*. 259, 3–17. (1999)

- Laoukili, J.; Alvarez, M.; Meijer, L. A. T.; Stahl, M.; Mohammed, S.; Kleij, L.; Medema, R. H.: Activation of FoxM1 during G2 Requires Cyclin A/Cdk-Dependent Relief of Autorepression by the FoxM1 N-Terminal Domain. *Molecular and Cellular Biology*. 28, 3076–3087 (2008)
- Lim, S.; Kaldis, P.: Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. *Development*. 140, 3079–3093 (2013)
- Lu, M. H.; Sartori, D. J.; Teta, M.; Opare-Addo, L. M.; Rankin, M. M.; Long, S. Y.; Kushner, J. A.: Cyclin D2 protein stability is regulated in pancreatic β -cells. *Molecular Endocrinology*. 23, 1865–1875 (2009)
- Maechler, P.; Wollheim, C. B.: Mitochondrial function in normal and diabetic β -cells. *Nature*. 414, 807–812 (2001)
- Major, M. L., Lepe, R., Costa, R. H.: Forkhead Box M1B Transcriptional Activity Requires Binding of Cdk-Cyclin Complexes for Phosphorylation-Dependent Recruitment of p300/CBP Coactivators. *Molecular and Cellular Biology*. 24, 2649–2661 (2004)
- Malumbres, M.; Harlow, E.; Hunt, T.; Hunter, T.; Lahti, J. M.; Manning, G.; Wolgemuth, D. J.: Cyclin-dependent kinases: A family portrait. *Nature Cell Biology*. 11, 1275–1276 (2009)
- Marzo, N.; Mora, C.; Fabregat, M. E.; Martín, J.; Usac, E. F.; Franco, C.; Gomis, R.: Pancreatic islets from cyclin-dependent kinase 4/R24C (Cdk4) knockin mice have significantly increased beta cell mass and are physiologically functional, indicating that Cdk4 is a potential target for pancreatic beta cell mass regeneration in Type 1 diabe. *Diabetologia*. 47, 686–694 (2004)
- Masison, D. C.; Blanc, A.; Ribas, J. C.; Carroll, K.; Sonenberg, N.; Wickner, R. B.: Decoying the cap-mRNA degradation system by a double-stranded RNA virus and poly(A)- mRNA surveillance by a yeast antiviral system. *Molecular and Cellular Biology*. 15, 2763–2771 (1995)

- Matoulkova, E.; Michalova, E.; Vojtesek, B.; Hrstka, R.: The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biology*. 9, 563–576 (2012)
- Matschinsky, F. M.: A Lesson in Metabolic Regulation Inspired by the Glucokinase Glucose Sensor Paradigm. *Diabetes*. 45, 223–241 (1996)
- Matsumiya, T.; Stafforini, D. M.: Function and regulation of retinoic acid-inducible gene-I. *Critical Reviews in Immunology*. 30, 489–513 (2010)
- Mignone, F.; Gissi, C.; Liuni, S.; Pesole, G.: Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology*. 3, 1–10 (2002)
- Mockey, M.; Gonçalves, C.; Dupuy, F. P.; Lemoine, F. M.; Pichon, C.; Midoux, P.: mRNA transfection of dendritic cells: Synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 340, 1062–1068 (2006)
- Morgan, D. O.: CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 13, 261–291 (1997)
- Myatt, S. S.; Lam, E. W. F.: The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 7, 847–859. (2007)
- Nagarajan, V. K.; Jones, C. I.; Newbury, S. F.; Green, P. J.: XRN 5'→3' exoribonucleases: Structure, mechanisms and functions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1829, 590–603 (2013)
- Newgard, C. B.; McGarry, J. D.: Metabolic Coupling Factors in Pancreatic β -Cell Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*. 64, 689–719 (1995)
- Park, H. J.; Wang, Z.; Costa, R. H.; Tyner, A.; Lau, L. F.; Raychaudhuri, P.: An N-terminal inhibitory domain modulates activity of FoxM1 during cell cycle. *Oncogene*. 27, 1696–1704 (2008)
- Poon, R. Y. C.: Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. In: *Cell Cycle Oscillators. Methods and Protocols*. Coutts, A. S.; Weston L. (Ed.), New York: Humana Press, 2016, p. 3-19, ISBN 978-1-4939-2957-3

- Quandt, E.; Ribeiro, M. P. C.; Clotet, J.: Atypical cyclins: the extended family portrait. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 77, 231–242 (2020)
- Rabinovich, P. M.; Komarovskaya, M. E.; Ye, Z. J.; Imai, C.; Campana, D.; Bahceci, E.; Weissman, S. M.: Synthetic messenger RNA as a tool for gene therapy. *Human Gene Therapy*. 17, 1027–1035 (2006)
- Ramanathan, A.; Robb, G. B.; Chan, S. H.: mRNA capping: Biological functions and applications. *Nucleic Acids Research*. 44, 7511–7526. (2016)
- Rorsman, P.: The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: An electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia*, 40, 487–495. (1997)
- Schuit, F.; De Vos, A.; Farfari, S.; Moens, K.; Pipeleers, D.; Brun, T.; Prentki, M.: Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in β cells. *Journal of Biological Chemistry*. 272, 18572–18579 (1997)
- Sherr, C. J.; Roberts, J. M.: CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development*. 13, 1501–1512 (1999)
- Sonenberg, N.; Gingras, A.-C.: The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Current Opinion in Cell Biology*. 10, 268–275 (1998)
- Sweeney, R.; Fan, Q.; Yao, M. C.: Antisense ribosomes: rRNA as a vehicle for antisense RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93, 8518–8523 (1996)
- Tan, X.; Wan, Y.: Enhanced protein expression by internal ribosomal entry site-driven mRNA translation as a novel approach for in vitro loading of dendritic cells with antigens. *Human Immunology*. 69, 32–40 (2008)
- Tcherepanova, I. Y.; Adams, M. D.; Feng, X.; Hinohara, A.; Horvatinovich, J.; Calderhead, D.; Nicolette, C. A.: Ectopic expression of a truncated CD40L protein from synthetic post-transcriptionally capped RNA in dendritic cells induces high levels of IL-12 secretion. *BMC Molecular Biology*. 9, 1–13 (2008)
- Timchenko, L. T.: Myotonic Dystrophy: The Role of RNA CUG Triplet Repeats. *The American Journal of Human Genetics*. 64, 360–364 (1999)
- Trimarchi, J. M.; Lees, J. A.: Sibling rivalry in the E2F family. *Nature Reviews*

- Molecular Cell Biology*. 3, 11–20 (2002)
- von Herrath, M.; Peakman, M.; Roep, B.: Progress in immune-based therapies for type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*. 172, 186–202 (2013)
- Wang, P.; Fiaschi-Taesch, N. M.; Vasavada, R. C.; Scott, D. K.; García-Ocaña, A.; Stewart, A. F.: Diabetes mellitus-advances and challenges in human β -cell proliferation. *Nature Reviews Endocrinology*, 11, 201–212. (2015)
- Weinberg, R. A.: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 81, 323–330 (1995)
- Wollheim, C. B.: Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: A new culprit in Type II diabetes. *Diabetologia*. 43, 265–277. (2000)
- Zhao, Y.; Moon, E.; Carpenito, C.; Paulos, C. M.; Liu, X.; Brennan, A. L.; June, C. H.: Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. *Cancer Research*. 70, 9053–9061 (2010)