UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Adriana Veľasová

Charakterizace beta-buněk pankreatu po jejich *in vitro* stimulované proliferaci syntetickými modifikovanými mRNA

Characterization of pancreatic beta cells after their *in vitro* proliferation induced by synthetic modified mRNA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Tomáš Koblas, Ph.D.

Praha 2022

PROHLÁŠENÍ

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

V Praze dne 16. 5. 2022 .....

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Koblasovi, PhD., za jeho ochotu, vstřícnost a všestrannou pomoc při vypracovávání praktické i teoretické části této práce, stejně jako za mnohé zkušenosti, které jsem pod jeho vedením načerpala.

ABSTRAKT

Vznik *diabetu mellitu I.*, či *II.* typu přímo souvisí s homeostázou proliferace a apoptosu β-buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. Jakákoliv dysbalance, která vede k úbytku v množství β-buněk organismu zvyšuje pravděpodobnost vzniku tohoto onemocnění. Pacienti trpící *diabetem mellitem* jsou odkázáni na částečnou, či úplnou substituci insulinu alternativními cestami, neboť jejich pankreas není schopen pokrýt potřeby insulinu organismu. S cílem obnovy přirozené produkce insulinu u pacientů trpících *diabetem mellitem* dochází k hledání optimálního způsobu, který by zajistil navýšení počtu β-buněk organismu a tím obnovil fyziologickou produkci insulinu. Velkou překážkou se v tomto ohledu jeví nízká citlivost diferencovaných β-buněk k mitogenním signálům, které by mohly zajistit vstup β-buněk do buněčného cyklu.

Znovuobnovení buněčného cyklu β-buněk souvisí s $G_0/G_1/S$ přechodem buněčného cyklu, který je pod kontrolou retinoblastomového proteinu (RB). RB musí být pro vstup do buněčného cyklu fosforylován, přičemž fosforylaci zajišťují cyklin dependentní kinasy 4 a 6, které asociují s cykliny rodiny D. V rámci této práce byl proto sledován vliv IVT mRNA (*in vitro transkribované mRNA*) na proliferaci potkaních β-buněk. Transfekce IVT mRNA pro kombinace homologů cyklinů D a cyklin dependentních kinas 4 a 6 ve všech případech zvýšila proliferaci senescentních β-buněk a poskytla statisticky významné výsledky oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA. Kombinace IVT mRNA, která potencovala nejvyšší nárůst proliferace β-buněk byla IVT mRNA pro mutovanou formu cyklinu D1 (CD1T286A) a cyklin dependentní kinasu 4 (CDK4).

Na základě výsledků z genové exprese bylo dokázáno, že β-buňky v období 24 hodin po proliferaci prodělávají částečnou dediferenciaci, kterou doprovází snížení exprese genů β-buněčné identity (Ins1, Ins2, Gck, Pdx1, MafA, Nkx6-1, Nkx2-2). Zároveň dochází k zvýšení exprese genů pro další regulátory buněčného cyklu jako jsou například cyklin E, A a B (společně s CDK2 a CDK1). Po 120 hodinách od transfekce dochází k opětovné expresi genů β-buněčné identity a normalizaci exprese genů regulátorů buněčného cyklu.

Transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 nijak nenarušuje genom β-buněk vznikem dvouvláknových zlomů a 120 hodin po transfekci má mírně anti-apoptotické, protektivní, účinky.

Klíčová slova: mRNA, β-buňky, buněčný cyklus, proliferace, genová exprese, apoptosa

ABSTRACT

The origin and development of type I. and II. diabetes mellitus is directly related to homeostasis of proliferation and apoptosis of pancreatic β-cells. Any imbalance that leads to a decrease in the number of β-cells consequently increases the probability of developing this disease. Patients suffering from diabetes mellitus are dependent on partial or complete exogenous insulin replacement, as their pancreas is unable to meet the body's insulin needs. Therefore a need for restoration of normal β-cell mass in diabetic patients leads to the attempts to develop new therapeutic approaches that could expand remaining β-cells of the organism and restore physiological insulin production. A major obstacle in this regard is a low sensitivity of terminally differentiated β-cells to mitogenic stimuli that could induce the entry of β-cells into the cell cycle.

Activation of β-cell proliferation is associated with the G0/G1/S cell cycle transition, which is under the control of retinoblastoma protein (RB). In order to activate cell cycle entry RB must be phosphorylated. RB phosphorylation is provided by specific cell cycle regulators, particularly cyclin-dependent kinases 4 and 6, which associate with family D cyclins. In accordance with the aim of this Diploma thesis, the effect of these cell cycle regulators in a form of IVT mRNA (in vitro transcribed mRNA) on rat β-cell proliferation was studied. Transfection of IVT mRNA for a combination of cyclin D and cyclin dependent kinase 4 and 6 homologues in all cases significantly increased the proliferation of senescent β-cells in comparison with a control sample without transfected IVT mRNA. The combination of IVT mRNA that potentiated the highest β-cell proliferation rate was IVT mRNA for the mutated form of cyclin D1 (CD1T286A) and cyclin dependent kinase 4 (CDK4).

Based on the results from gene expression analysis, it has been shown that β cells undergo partial dedifferentiation within 24 hours after induction of proliferation, accompanied by attenuated expression of β-cell specific genes (Ins1, Ins2, Gck, Pdx1, MafA, Nkx6-1, Nkx2-2). At the same time, the expression of genes for other cell cycle regulators such as cyclin E, A and B (together with CDK2 and CDK1) was increased. Following 120 hours after the IVT mRNA transfection, there was a restoration of the β-cell identity genes expression and a normalization of cell cycle regulators expression.

Transfection of IVT mRNA for CD1TA + CDK4 does not disrupt the genome of β cells in any way and has mild anti-apoptotic, protective effects 120 hours after transfection.

Key words: mRNA, cell cycle, beta cell, proliferation, gene expression, apoptosis

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Arf ADP-dependentní ribosylační faktor (z angl. *ADP Ribosylation Factor*)

Abcc8 ATP-vážící kazetový transportér, rodina C, člen 8 (z angl. *ATP-binding cassete subfamily C, member 8*)

ActB aktin β (převzato z angl. *Actin-β*)

AF chromofor (z angl. *AlexaFluor*)

ATM ATM serin/threoninová proteinkinasa (z angl. *Ataxia Telangiectasia Mutated Serine/Threonine Kinase*

ATR ATR serin/threoninová proteinkinasa (z angl. *Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Serine/Threonine Kinase*

AurkB Aurora kinasa B (z angl. *Aurora kinase B*)

BAD antiapoptotický protein rodiny Bcl2 (z angl. *BCL2 associated agonist of cell death*

BARD1 (z angl. *BRCA1 associated RING domain 1*)

Bcl2 regulátor apoptosy Bcl2 rodiny (z angl. *BCL2 apoptosis regulator*)

BER excizní oprava vyštěpením báze (z angl. *Base Excision Repair*)

BSA hovězí sérový albumin (z angl. *Bovine Serum Albumine*)

Casp3 exekuční kaspáza 3 (z angl. *Caspase 3*)

Casp7 exekuční kaspáza 7 (z angl. *Caspase 7*)

Casp8 iniciační kaspáza 8 (z angl. *Caspase 8*)

CcnA1 gen cyklinu A1 (z angl. *Cyclin A1*)

CcnA2 gen cyklinu A2 (z angl. *Cyclin A2*)

CcnB1 gen cyklinu B1 (z angl. *Cycklin B1*)

CcnB2 gen cyklinu B2 (z angl. *Cyclin B2*)

CcnD1 gen cyklinu D1 (z angl. *Cyclin D1*)

CcnD2 gen cyklinu D2 (z angl. *Cyclin D2*)

CcnD3 gen cyklinu D3 (z angl. *Cyclin D3*)

cDNA komplementární DNA (z angl. *Complementary DNA*)

CcnE1 gen cyklinu E1 (z angl. *Cyclin E1*)

CcnE2 gen cyklinu E2 (z angl. *Cyclin E2*)

CD1TA mutovaná forma cyklinu D1 (nahrazení

CD2TA mutovaná forma cyklinu D2 (nahrazení

CD3TA mutovaná forma cyklinu D3 (nahrazení

CDK1 cyklin dependentní kinasa 1

CDK2 cyklin dependentní kinasa 2

CDK4 cyklin dependentní kinasa 4

CDK6 cyklin dependentní kinasa 6

CDT1 licenční faktor replikace DNA 1 (z angl. *chromatin licensing and DNA replication factor 1*)

CENPA centromerický protein A (z angl. *Centromeric protein A*)

CDNPB centromerický protein B (z angl. *Centromeric protein B*)

CENPE centromerický protein E (z angl. *Centromeric protein E*)

DAPI 2-(4-amidinofenyl)-1H-indol-6-karboxyamidin (z angl. *2-(4-Amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamidine*)

DM diabetes mellitus

DMI diabetes mellitus I. typu

DMII diabetes mellitus II. typu

dsDNA dvouvláknová DNA (z angl. *Double strand DNA*)

EdU 5-ethynyl-2'-deoxyuridin (z angl. *5-ethynyl-2'-deoxyuridine*)

EGFR receptor pro epiteliální růstový faktor (z angl. *Epithelial growth factor receptor*)

Eno1 enolasa 1 (z angl. *Enolase 1*)

Ezh2 histon-lysin N-methyltransferasa (z angl. *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*)

FBS fetální bovinní sérum

FOX transkripční faktory Forkheadové rodiny (z angl. *Forkhead transcription factors*)

FoxM1 Fox transkripční faktor M1 (z angl. *forkhead box M1*)

FoxO1 FOX transkripční faktor O1 (z angl. *forkhead box O1*

Gcg glukagon (z angl. *glusagon*)

gDNA jaderná deoxyribonukleová kyselina (z angl. *genomic DNA*)

Gck glukokinasa (z angl. *glucokinase*)

GFP zelený fluorescenční protein (z angl. *Green fluorescent protein*)

GLP-1 glukagonu podobný peptid 1 (z angl. *glucagon-like peptide 1*)

GLPR receptor GLP-1 (z angl. *glucagon like peptide 1 receptor*)

GLUT2 glukosový transportér 2, viz. Slcl2a2

HBSS pufr (z angl. *Hank's Balanced Salt Solution*)

hMRE11 nukleasa podílející se na DSB (z angl. *human MRE11 homolog, double strand break repair nuclease*)

HPRT hypoxanthinfosforiboxylstransferasa (z angl. *hypoxanthine phosphoribosyltransferase*)

HR homologní rekombinace (z angl. *homologous recombination*)

hRAD50 protein podílející se na opravě DSB (z angl. *RAD50 double strand break repair protein*)

ICdk inhibitor cyklin dependentní/ch kinas

IFN-γ interferon γ

IGF-I insulinu podobný růstový faktor I (z angl. *insulin like growth factor 1*)

IL-β interleukin β

INK4 inhibitor komplexů cyklinu D a CDK4/CDK6 (z angl. *inhibitors of cyklin dependent kinase 4*

Ins1 gen pro insulin 1 (z angl. *insulin 1*)

Ins2 gen pro insulin 2 (z angl. *insulin 2*)

IVT *in vitro* transkribovaná mRNA (z angl. *in vitro transcribed mRNA*

Kcnj11 draslíkový kanál vyskytující se na membráně β-buněk (z angl. *potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11*)

KO vyřazení (např. vyřazení genu, z angl. *knockout*)

LED elektroluminiscenční dioda (z angl. *Light Emiting Diode*)

LdhA laktátdehydrogenasa A (z angl. *lactate dehydrogenase A*

MafA transkripční faktor obsahující leucinovou zipper doménu (z angl. *MAF bZIP transcription factor A*)

MAPK mitogeny aktivovaná proteinkinasa (z angl. *mitogen-activated protein kinase*)

MDC1 mediátor poškození DNA (z angl. *mediator of DNA damage checkpoint 1*)

MMR oprava DNA založená na rekombinaci špatně zařazených nukleotidů (z angl. *mismatch repair*)

Mn-SOD superoxiddismutasa využívající mangan (z angl. *Manganese Superoxide Dismutase*)

MRN komplex proteinů odpovídajících na poškození DNA MRE11/NBN/RAD50

NBS1 komponent Mre-komplexu (z angl. *Nijmegen breakage syndrome*)

NER nukleotidová excizní oprava (z angl. *nucleotide excision repair*)

NeuroD1 transkripční daktor podílející se na diferenciaci (z angl. *neuronal differentiation 1*)

Ngn3 neurogenin 3

NHEJ nehomologní spojování konců (oprava DNA, z angl. *Non-Homologous end joining*)

NF-κB B-buněčný jaderný faktor *kappa*(z angl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

Nkx2-2 NK2 homebox 2

Nkx6-1 NK6 homebox 1

oxoG oxoguanin

Pax4 transkripční faktor (z angl. *paired box 4*)

PBS fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (z angl.*Phosphate Buffered Saline*)

PcG transkripční faktory Polycomb rodiny (z angl. *Polycomb Group*)

Pcsk1 proprotein konvertasa 1 (z angl. *proprotein convertase subtilisin/kexin type 1*)

Pcsk2 proprotein konvertasa 2 (z angl. *proprotein convertase subtilisin/kexin type 2*)

PCNA svorkový protein (z angl. *proliferating cell nuclear antigen*)

PDGF růstový faktor odvozený z krevních destiček (z angl. *platelet derived growth factor*)

PDGFR receptor růstového faktoru odvozeného z krevních destček (z angl. *platelet derived growth factor receptor*)

Pdx1 pankreatický a duodenální morfogen 1 (z angl. *pancreatic and duodenal homeobox 1*)

Plk (z angl. *polo like kinase 1*)

PP-ZP přední primer - zadní primer

pRB proteiny retinoblastomové rodiny

PRC1 protein regulující cytokinesi (z angl. *protein regulator of cytokinesis 1*)

PRL prolaktin (převzato z angl. *prolactin*)

qRT-PCR kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (z angl. *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*)

RAD51 rekombináza RAD51 (z angl. *RAD51 recombinase*)

RB retinoblastomový protein

ROS reaktivní formy kyslíku (z angl. *Reactive oxygen spicies*)

SAM S-adenosylmethionin

Slc2a2 glukosový přenašeč, také GLUT2 (z angl. *solute carrier family 2 member 2*)

SNP jednonukleotidový polymorfismus (z angl. *single nucleotide polymorphosm*)

Sst somatostatin (převzato z angl. *somatostatin*)

TCR T-buněčný receptor (z angl. *T cell receptor*)

TdT terminální deoxynukleotidyltransferasa (z angl. *Terminal deoxynucleotidyl transferase*)

TNFα nádorový nekrotický faktor α (z angl. *Tumor necrosis factor α)*

Top2A DNA topoisomerasa 2A (z angl. *DNA topoisomerase II alpha*)

TS typ opravy DNA lézí (z angl. *Template Switch*)

TLS typ opravy DNA lézí (z angl. *Translesion Synthesis*

TUNEL metoda detekce apoptosy založená na značení terminální 3'-OH skupiny (z angl. *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)

Ucn3 urokortin 3 (z angl. *urocortin 3*)

Obsah

1 TEORETICKÝ ÚVOD **17**

1.1 Proliferace β-buněk 18

1.1.1 Látky ovlivňující β-buněčnou proliferaci 19

1.2 Buněčný cyklus a jeho regulace 20

1.3 Specifika buněčného cyklu β-buněk 22

1.3.1 Prenatální a postnatální vývoj β-buněk 24

1.3.2 Důležitéβ-buněčné transkripční faktory 26

1.4 Hlavní regulační molekuly buněčného cyklu beta-buněk 28

1.4.1 Cykliny 29

1.4.2 Cyklin-dependentní kinasy 31

1.4.3 Regulační mechanismy cyklinů a CDK 31

1.5 Poškození genetické informace v průběhu buněčného cyklu 33

1.5.1 Detekce poškození genetické informace 35

2 CÍL PRÁCE **37**

3 MATERIÁL A METODY **39**

3.1 Materiál 39

3.1.1 Chemikálie 39

3.1.2 Soupravy reagencií 40

3.1.3 Charakterizace biologických vzorků 40

3.2 Přístroje 41

3.2.1 Software 42

3.3 Metody 43

3.3.1 Kultivace buněk karcinomu močového měchýře 43

3.3.2 Příprava extracelulární matrix z HTB-9 buněk 44

3.3.3 Disociace Langerhansových ostrůvků 45

3.3.4 Transfekce syntetické mRNA do buněk Langerhansových ostrůvků 46

3.3.5 Detekce proliferace β-buněk metodou Click-iT EdU a nepřímé imunofluorescence 48

3.3.6 Detekce proliferace β-buněk pomocí průtokové cytometrie . . . 52

3.3.7 Purifikace a izolace buněčné RNA 57

3.3.8 Reverzní transkripce izolované buněčné mRNA 58

3.3.9 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce 60

3.3.10 Detekce poškození genomu β-buněk pomocí nepřímé imunofluorescence a detekce γH2AX 66
3.3.11 Detekce poškození genomu β-buněk pomocí metody TUNEL . 69

4 VÝSLEDKY **75**

4.1 Detekce proliferace na základě nepřímé imunofluorescence 75
4.1.1 Stanovení míry proliferace β-buněk transfekovaných IVT mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy 75
4.2 Analýza genové exprese buněk Langerhansových ostrůvků na základě kvantitativní PCR 83
4.2.1 Genová analýza aktivátorů buněčného cyklu 86
4.2.2 Genová analýza tumorsupresorových genů 98
4.2.3 Genová analýza exprese transkripčních faktorů β-buněk 103
4.2.4 Genová analýza genů podílejících se na funkci β-buněk 109
4.2.5 Genová analýza genů pro pankreatické hormony 114
4.3 Detekce poškození genomu pomocí nepřímé imunofluorescence 118
4.3.1 Vliv IVT mRNA pro regulátory buněčného cyklu na tvorbu dvouvláknových zlomů v genomu β-buněk 118
4.3.2 Vliv IVT mRNA pro regulátory buněčného cyklu na fragmentaci DNA β-buněk 127

5 DISKUSE **131**

6 ZÁVĚR **137**

Seznam použité literatury **138**

1 TEORETICKÝ ÚVOD

Diabetes mellitus (DM) je chronické metabolické onemocnění, jenž je charakterizováno dlouhodobě zvýšenou hladinou glukosy v krvi, která je doprovázena kombinací metabolických poruch sacharidů a lipidů. Hyperglykemie nastává v důsledku defektů produkce, či funkce[1] insulinu – peptidického hormonu, který je přirozeně produkován β-buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu.

Dle příčiny vzniku DM rozlišujeme dva základní typy *diabetu mellitu – diabetes mellitus I. typu* (DMI) a *diabetes mellitus II. typu* (DMII).

DMI je charakterizován neschopností β-buněk Langerhansových ostrůvků produkovat dostatečné množství insulinu, které by mělo být tvořeno v přímé návaznosti na příjem glukosy potravou. Insuficience tvorby insulinu nastává v důsledku lymfocyty-mediované destrukce β-buněk [1]. V rámci imunitní odpovědi dochází vlivem prozánětlivých cytokinů k řadě biochemických změn, které podporují tvorbu zánětlivého prostředí, jehož přítomnost podmiňuje změny v genové expresi specifických genů a posttranslační modifikace β-buněčných proteinů. Změny v posttranslačních modifikacích a genové expresi zapříčiňují vyšší náchylnost β-buněk k imunitnímu ataku, v důsledku čehož dochází k jejich destrukci [2, 3]. Výzkum autoimunitní destrukce β-buněk přináší do popředí zájmu faktory (jako například cyklin D3 (viz dále)), které přispívají k životaschopnosti β-buněk a představují tak potenciální terapeutické cíle léčby DMI [4].

DMII se řadí mezi civilizační onemocnění a jeho zvýšený výskyt v populaci pozitivně koreluje s nadměrným příjmem potravy, nedostatkem pohybu, stářím a zvýšenou hladinou stresu. V důsledku metabolického přetěžování β-buněk dochází ke snižování počtu β-buněk v organismu a v kombinaci s nízkou fyzickou aktivitou dochází rovněž k snížení vnímavosti periferních tkání k insulinu [5–9]. Vznik DMII je přímo spojován s děním na Cdkn2A/B lokusu chromosomu 9p21, který kóduje inhibitory buněčného cyklu $p16^{INK4A}$, $p15^{INK4B}$, $p14^{ARF}$ a anti-sense nekódující oblast regulující buněčnou senescenci, proliferaci a stárnutí [10]. Obecně lze tedy označit DMII jako civilizační onemocnění a jeho zvýšený výskyt v populaci pozitivně koreluje s nadměrným příjmem potravy, zvýšenou hladinou stresu, nedostatkem pohybu a dalšími faktory, které jsou přímo spojovány se vznikem obezity a patologií spojených s kardiovaskulární soustavou.

Jednonukleotidové záměny (SNP z angl. Single Nucleotide Polymorphism) v promotorové oblasti Cdkn2A/B lokusu ovlivňují nejen vznik DMII, ale i riziko vzniku onemocnění cévní soustavy [10], jako je například ischemická choroba srdeční [11–14], aneurysma, či mrtvice, [15, 16] onemocnění nervové soustavy jako je Alzheimerova

[1] Při defektní, či nedostatečné tvorbě a funkci insulinu nedochází k informaci organismu o stavu nasycen.

choroba [17] a zvyšují riziko vzniku dalších věkem podmíněných chorob [18, 19]. Jednotlivým inhibitorům buněčného cyklu se věnuje kapitola 1.4 na straně 28.

1.1 Proliferace β-buněk

Proliferace β-buněk dosahuje u hlodavců i člověka maxima v neonatálním období, kdy mírně přesahuje 2% [5]. Donedávna se předpokládalo, že opětovná proliferace plně diferencovaných β-buněk v dospělosti již není možná a množství β-buněk, se kterými se člověk narodí je tak terminální. V posledních dvou desetiletích se však na vědecké půdě objevuje stále více informací o β-buněčných růstových faktorech, které jsou schopny podpořit proliferaci β-buněk in vivo i in vitro. Kromě růstových faktorů podporuje β-buněčnou proliferaci také zvýšená metabolická potřeba organismu. Kompenzační β-buněčná expanze tak nastává po streptozotocinem[2]-mediované destrukci β-buněk ([20], [21]), obezitě, nebo během těhotenství [7] [20] . Dle studie Hainan Chena a Xueying Gua je tato adaptivní proliferace β-buněk regulována methyltransferasou Ezh2 (z angl. *Enhancer of Zeste Homolog 2*), která představuje funkční enzymatický komponent PRC2 (z angl. *Polycomb Repressive Complex 2*). Dle výsledků výše zmíněné studie podporuje Ezh2 proliferaci β-buněk v neonatálním období represí INK4/ARF lokusu DNA methylací histonu H3 na lysinu 27 za účasti kofaktoru S-adenosyl-L-methioninu (SAM). Vysoká koncentrace Ezh2 je detekovatelná v časném neonatálním období a v období přibližně 15 dnů po xenobiotiky-indukované destrukci β-buněk, přičemž v obou případech s rostoucím časem klesá. Represí inhibitorů INK4/ARF genu v tomto období dochází ke zvýšení proliferace β-buněk.

Přelomový objev se v rámci β-buněčné proliferace zdálo být zjištění, že v rámci vývoje Langerhansových ostrůvků dochází v dospělosti k proliferaci pouze diferencovaných β-buněk [22]. Nově však panuje názor, že o rozvoji DM rozhoduje mnoho faktorů a počet β-buněk v organismu se odvíjí nejen od míry proliferace a apoptosy diferencovaných buněk, ale především od počtu progenitorových buněk a jejich následné proliferace v rámci embryonálního vývoje.

V dospělosti obsahuje lidský pankreas přibližně 1 – 2 gramy β-buněk, přičemž množství buněk se mezi dvěma nezávislými jedinci může lišit až desetinásobně [23]. Rozdíl v množství β-buněk se přisuzuje především počtu embryonálních progenitorových buněk, věku, obezitě a rozvoji diabetu mellitu I i II typu. Studie [24] stejně jako Kloppel et al. a Ogilvie uvádí až 50% nárůst parenchymální tkáně pankreatu zodpovědné za exokrinní funkci slinivky břišní u obézních lidí. Lidé s vyšším BMI vykazují vyšší požadavky na metabolickou a společně s tím i vyšší sekreční aktivitu β-buněk. Zvýšené metabolické nároky organismu a snížená citlivost k insulinu vede

[2]Xenobiotikum, které mimikuje glukosu a selektivně poškozuje genetickou informaci β-buněk.

k hypertrofii β-buněk, což se následně projevuje zvětšením endokrinní části pankreatu bez očividně probíhající proliferace β-buněk a vzniku resistence vůči insulinu u periferních tkání.

1.1.1 Látky ovlivňující β-buněčnou proliferaci

V rámci snahy o vyřešení problému insulinové resistence je výzkum posledních let zaměřen na nalezení a identifikaci mechanismů, které by podpořily proliferaci ostrůvkových β-buněk a umožnily tak řešení DMI i DMII.

Dle dosavadních poznatků je proliferace β-buněk ovlivňována mnoha vnitřními a vnějšími faktory, které se společně s věkem mění. Mezi přirozené z vnějšku působící signály regulující proliferaci β buněk patří signalizace pomocí PDGF (růstový faktor odvozený od krevních destiček, z angl. *Platelet Derivated Growth Factor*), či regulace pomocí prolaktinu (PRL z angl. *Prolactin*) a glukagonu-podobnému peptidu (GLP, z angl. *glucagon-like peptide 1*) [6].

PDGFR (receptor PDGF) je exprimován v neonatálním období ostrůvkovými buňkami jak u hlodavců, tak u lidí [25] a jeho aktivace vede k pozitivní regulaci MAPK/Erk a PI3K/Akt kinasové dráhy [25, 26] a transkripci Ezh2. Exprese PDGFR-α na povrchu β-buněk s rostoucím věkem u hlodavců a lidí klesá, což potvrzuje dříve zmíněnou nízkou proliferaci β-buněk u dospělých jedinců [7, 20, 21, 25]. PDGFR-α se ve vzájemné souhře s N-methyltransferasou Ezh2 dále podílí na regeneraci a expanzi β-buněk v dospělosti po poškození buněk toxickými látkami, či poranění slinivky břišní [20, 25].

GLP-1 pozitivně reguluje β-buněčnou proliferaci přímou modulací transkripčního faktoru FoxO1 (z angl. *Forkhead transcription factor O1*) [27]. GLP-1 je schopný kromě svého přirozeného receptoru GLPR (receptor pro glukagonu podobný faktor, z angl. *Glucagon-like Peptid 1 Receptor*) aktivovat receptor pro epiteliální růstový faktor (EGFR – z angl. *Epitelial Growth Factor Receptor*), ze kterého je signál dále přenášen pomocí PI3K/Akt dráhy [27–30]. FOXO1 se na základě signalizace GLP-1 fosforyluje, v důsledku čehož dochází k jeho jaderné exkluzi, která je stěžejní pro aktivaci proliferačních drah β-buněk [31]. V případě jaderné lokalizace FoxO1 váže promotorovou oblast transkripčního faktoru Pdx1 (pankreatický a duodenální transkripční faktor, z angl. *Pancreatic and Duodenal Homebox 1*)[3] a zapříčiňuje tak represi proliferace. FoxO1 rodina transkripčních faktorů dále zajišťuje ochranu pankreatických β-buněk při buněčném selhání v důsledku oxidativního stresu způsobeného glukosovou [32], či lipidovou [33] toxicitou, kdy v závislosti na fázi buněčného cyklu rozhoduje o senescenci, či apoptose dané buňky [34, 35]. GLP-1 a FoxO1 společně s dalšími transkripčními faktory, jako je například FoxM1 (podrobněji v kapitole

[3]Pozitivní regulátor proliferace β-buněk.

1.4, strana 28), tak přispívají k proliferaci a prosperitě β-buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu[4].

Neméně zajímavá je indukce proliferace β-buněk pod vlivem prolaktinu v období těhotenství. PRL působí na svých receptorech, které jsou ve vyšší míře exprimovány mimo jiné také po poškození β-buněk toxickými látkami, jak dokazují *in vitro* studie [36]. Důležitost exprese prolaktinových receptorů potvrzuje i skutečnost, že myši, které trpí jejich nedostatkem vykazují hypoplasii β-buněk, sníženou produkci mRNA pro insulin a mírnou glukosovou intoleranci [24]. Laktogeny, do kterých kromě prolaktinu spadá i placentární laktogen, a jejich signalizace jsou tak pravděpodobně důležité nejen v rámci proliferace [7], ale také v rámci maturace, vývoje a funkce β-buněk.

1.2 Buněčný cyklus a jeho regulace

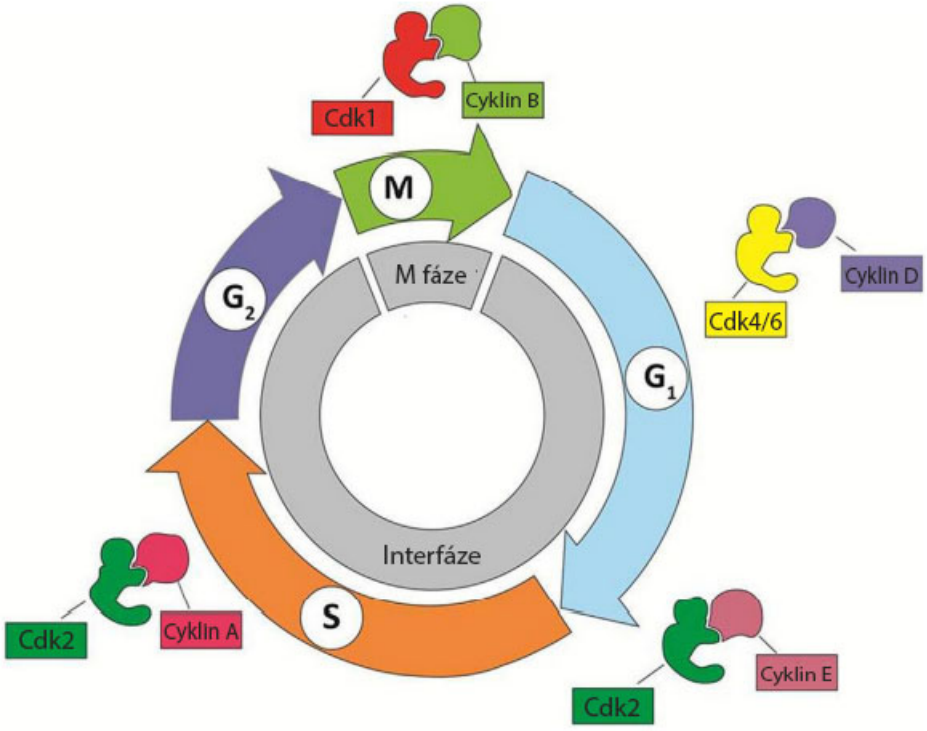
Buněčný cyklus slouží k popisu a charakterizaci buněčného dělení. Dva základní celky, které v rámci buněčného cyklu rozlišujeme jsou interfáze a mitosa. Interfázi lze na základě charakteristických pochodů a biochemických změn odehrávajících se v buňce rozdělit na G_1-fázi, S-fázi a G_2-fázi. Mitosu rozlišujeme na karyokinesi (dělení jádra) a cytokinesi (dělení buňky). Souhrn celého buněčného cyklu společně s regulačními molekulami vyobrazuje obrázek 1 na straně 21.

Pokud budeme popisovat buněčný cyklus kontinuálně se dělící buňky, nastává ihned po buněčném dělení G_1-fáze. Během přibližně 10 - 20 hodin trvající G_1-fázi (lidská dělící se buňka) buňka roste, duplikuje organely přijaté v procesu cytokinese a opravuje případné poškození DNA vzniklé chybnou replikací v S-fázi předchozího buněčného cyklu. Buňka se nachází v haploidním stavu, tzn. obsahuje jednu chromosomovou sadu, čili N párů chromosomů[5].

Na konci G_1 fáze dochází k začátku licencování replikačních počátků na DNA mobilizací MCM2-7 komplexu pomocí signálních drah, podmíněných přechodem mezi G_1 a S-fází buněčného cyklu (také G_1/S přechod). G_1/S přechod je realizován mnohonásobnou fosforylací retinoblastomového proteinu (RB) pomocí specifických cyklinů rodiny D a E a cyklin dependentních kinas 2, 4 a 6 (více v kapitole cykliny a cyklin dependentní kinasy). Po zdárném překonání G_1/S přechodu dochází k inhibici licencování DNA a odstartování replikace (též označováno jako *firing replikace*) genetické informace uložené v DNA. Pokud buňka úspěšně zajistí označení replikačních počátků a spustí replikaci, většinou dochází i k dokončení celého buněčného dělení s rozdělením jádra i buňky. Replikace DNA v kombinaci s případnými opravami genetické informace trvá přibližně 8 hodin a během této fáze buňka přechází

[4]U potkanních β-buněk je proliferace stimulována pouze GLP-1, u lidských β-buněk je kromě GLP-1 zapotřebí i dalších transkripčních faktorů.
[5]Počet chromosomů se odvíjí od živočišného druhu.

z haploidního do diploidního stavu genomu (tedy z N do 2N chromosomových párů).



Obrázek 1: | **Grafické znázornění průběhu buněčného cyklu společně s řídícími molekulami**: M-fáze (zeleně) je fází, při které dochází k buněčnému dělení. Ihned po M-fázi následuje G_1 fáze (světle modře), ve které buňka roste, zvyšuje počet svých organel a kontroluje celistvost a nepoškozenost genetické informace. Z této fáze buňka může vystoupit do G_0-fáze (nevyobrazena), která představuje klidový stav plně diferencované buňky. Po G_1-fázi u dělících se buněk následuje S-fáze (oranžová), při které dochází k replikaci genetického materiálu a G_2-fáze (fialová), ve které dochází ke kontrole zreplikované DNA. Následuje další buněčné dělení a cyklus se opakuje. Každou fázi buněčného cyklu regulují různé heterodimery cyklin-cyklin dependentní kinasa (CDK). Příslušné komplexy charakteristické pro danou část cyklu jsou znázorněny vedle dané fáze buněčného cyklu

G_2 fáze je většinou krátká a dochází při ní ke kontrole integrity zreplikované DNA a přípravě buňky na mitotické dělení. Následuje mitosa, jejíž výklad pro porozumění problematiky této práce není potřebný.

Dceřiné buňky, které úspěšně prošly buněčným dělením mohou po mitotické fázi zůstat v tzv. G_0-fázi. Jedná se o klidovou fázi, ve které spočívá většina diferencovaných somatických buněk, které plní v organismu specifickou funkci. k výstupu z G_0 fáze a znovuzapojení buňky do buněčného cyklu je třeba mitogenní signalizace.

Děje, odehrávající se během různých fází buněčného cyklu a přechody mezi nimi regulují cykliny a cyklin dependentní kinasy (CDK, z ang. *Cyclin-Dependent Kinase*), které realizují přenos signálu pomocí fosforylace příslušných substrátů. Regulace aktivity cyklinů a CDK probíhá jak na úrovni translace a transkripce, tak na úrovni posttranslačních modifikací. Koncentrace cyklinů během jednotlivých fází buněčného cyklu fluktuuje. Fluktuace cyklinů zapříčiňuje periodické změny v akti-

vitě CDK, neboť kinasa nemůže fosforylovat cílové substráty pokud není v komplexu s cyklinem (viz obrázek 1, strana 21).

Plně diferencované buňky se zastavují v G_0 fázi buněčného cyklu a dochází u nich k intenzivní represi molekul podporujících průběh buněčného cyklu. Soubor signálů, které buňka v tomto stavu přijímá označuje pojmem restrikční bod. Existence restrikčního systému je hlavním důvodem nízké proliferace většiny diferencovaných buněk a stojí za pozastavením buněčné proliferace u buněk, které postrádají dostatečnou zásobu živin. Restrikční bod však není terminální inhibicí buněčného cyklu a v případě mitogenního signálu je buňka schopna restrikční bod vypnout, vystoupit z G_0 dáze a obnovit buněčnou proliferaci.

Dlouhou dobu se uvažovalo o restrikčním bodu jako o části G_1/S přechodu, který souvisí s hyperfosforylací retinoblastomového proteinu. Sabrina Spencer ([37]) a později ve své práci předkládá důkazy o tom, že buňka činí rozhodnutí o dalším buněčném cyklu již v závěru mitosy, těsně před rozdělením mateřské buňky. Restrikční bod je na základě těchto experimentů realizován prostřednictvím aktivity cyklin dependentní kinasy 2 (CDK2) a inhibitoru CDK2 proteinu p21 [37]. Tato tvrzení vychází z faktů, které dokládají sníženou aktivitu CDK2 u dále se nedělících buněk oproti kontinuálně se dělícím buňkám při výstupu z anafáze. Buňky, které nepokračují v buněčném dělení vychází z anafáze s aktivitou CDK2 pod 25% jejího maxima a s vyšší expresí p21 než buňky, které po anafázi čeká krátká G_1-fáze následovaná dalším buněčným dělením.

1.3 Specifika buněčného cyklu β-buněk

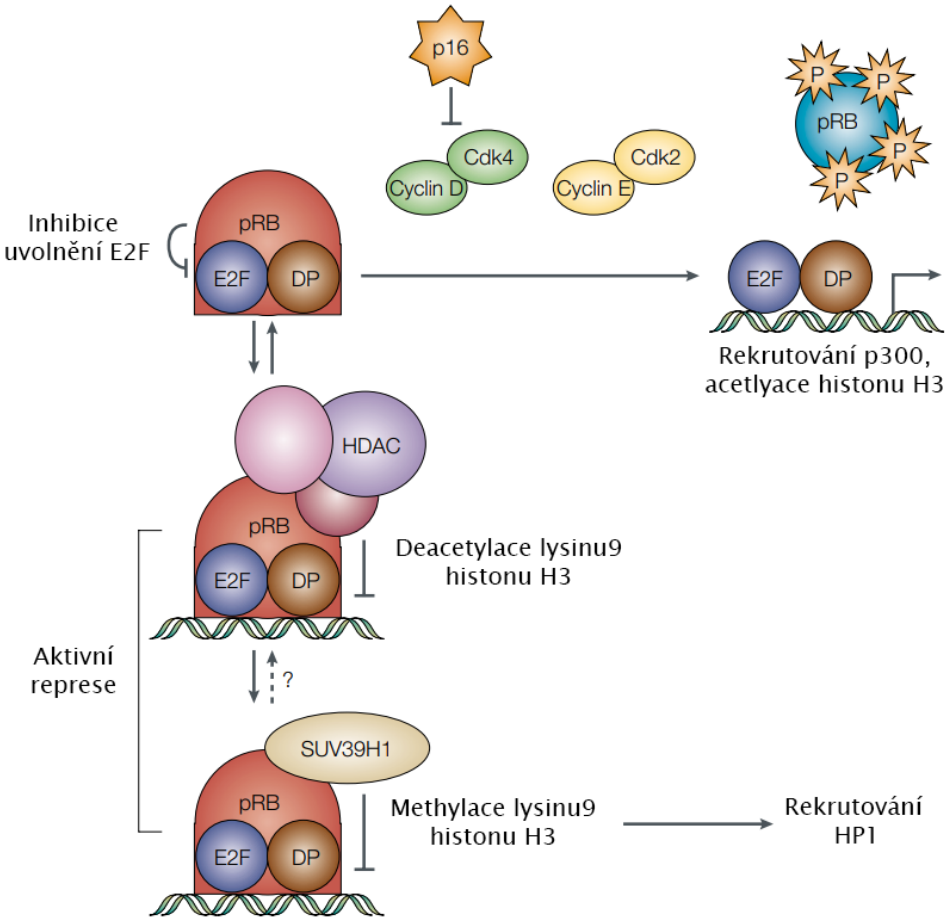
Ačkoliv v rámci β-buněk dochází k neustálé expresi proteinů potřebných pro chod buněčného cyklu [38], je proliferační aktivita diferencovaných β-buněk dospělého člověka prakticky nulová [7, 8, 39, 40].

Proliferace a růst β-buněk Langerhansových ostrůvků je majoritně řízena pomocí signalizace odehrávající se na insulinovém a IGF-I receptoru (z angl. *Insulin/Insulin like Growth factor receptor*) [41–43]. Mitogeny podmíněná stimulace tohoto a dalších receptorů stimuluje expresi a aktivitu cyklinu D [44], který se po tvorbě komplexu s cyklin dependentní kinasou 4, nebo 6 (CDK4, CDK6) podílí na fosforylaci a inaktivaci retinoblastomového proteinu a ostatních tumor-supresorových proteinů spadajících do stejné rodiny (pRB – p107, 130) [45, 46].

Retinoblastomový tumorsupresor (RB) reguluje rozličné biologické procesy včetně progrese buněčného cyklu, metabolismu a diferenciace buněk. Mutace jedné z alel RB výrazně zvyšuje riziko vzniku karcinomu sítnice, mutace obou jeho alel vyúsťuje v rozvoj retinoblastomu [47–50]. RB váže a moduluje aktivitu rodiny transkripčních faktorů E2F, která čítá 7 členů a představuje hlavní skupinu transkripčních fak-

torů zodpovědných za průběh buněčného cyklu β-buněk. Myší β-buňky transkribují všechny členy E2F rodiny, přičemž E2F2 a E2F4 v nejvyšší míře [51].

RB inhibuje průběh buněčného cyklu tvorbou komplexu s transkripčním faktorem E2F(1-3). Vazba RB na E2F zapříčiňuje stínění transaktivačních domén E2F transkripčních faktorů a rekrutování histon deacetylas, které zajišťují umlčení transkripce genů řízených E2F rodinou [52, 53], čímž dochází k inhibici buněčného cyklu. Inhibice buněčného cyklu je pouze přechodná a u proliferujících buněk dochází během G_1-fáze k jejímu přerušení hyperfosforylací RB pomocí cyklinů z rodiny D a jejich vazebných partnerů s kinasovou aktivitou – CDK4 a CDK6. Fosfroylace na celkem 14 fosforylačních místech retinoblastomocého proteinu [54, 55] způsobuje uvolnění E2F transkripčních faktorů, které následně aktivují expresi genů kódujících proteiny potřebné pro průchod G_1/S a S-fází buněčného cyklu (shrnutí obrázek 2, strana 23). Mezi cílové geny E2F spadají geny důležité pro regulaci (cyklin E, cyklin



Obrázek 2: |Mechanismus regulace transkripčního faktoru E2F: RB váže během G_0/G_1 fáze buněčného cyklu transaktivační doménu E2F, což vede k represi cílových E2F cílových genů. Represe cílových genů E2F je dále zajištěna vazbou histon-deacetylas (HDACs), které deacetylují lysin 9 histonu H3 a methylas, které v dalším kroku methylují stejný lysin 9. Tento sled modifikací vede k transkripčnímu umlčení E2F cílových genů. Znovuobnovení buněčného cyklu je dáno aktivitou heterodimerů CD-CDK4/6 a CE-CDK2. C-CDK komplexy fosforylují RB a zajišťují uvolnění E2F, který rekrutuje protein p300 a zajišťuje opětovnou acetylaci lysinu 9 histonu H3.

D, inhibitory cyklinů a cyklin dependentních kinas), geny důležité pro replikaci DNA (PCNA, MCM2-7, CENPE, CDT1, DNA polymerasa), geny důležité pro S/G_2 přechod (AurkB, Plk kinasa, TOP2A), geny účastnící se diferenciace (Hox geny, Ezh2), a také geny podmiňující apoptosu a odpověď buňky na poškození genomu (BAD, Bcl2, Casp3/7/8, RAD51, BARD1) [53].

V plně diferencovaných buňkách, aktivuje RB histon methyltransferasy a další enzymy, které regulují kondenzaci chromatinu. Výsledkem tohoto procesu je vznik epigenetických modifikací, které zamezují transkripci genů potřebných pro průchod buňky buněčným cyklem a snižují proliferační odpověď buňky na mitogenní signál [56–58].

RB je exprimován v β-buňkách i ostatních ostrůvkových buňkách ve srovnatelných množstvích [43]. Napříč své důležitosti, kterou sehrává během G_1/S přechodu buněčného cyklu však není pro proliferaci β-buněk stěžejní, což je pravděpodobně zapříčiněno jeho snadnou zastupitelností ostatními protproteiny retinoblastomové rodiny (například p107, nebo p130) [59, 60].

β-buňky dospělého člověka po své diferenciaci vystupují z buněčného cyklu a zastavují se v G_0-fázi. Výstup z buněčného cyklu do klidového stavu představuje jeden z problémů v otázce stimulace β-buněčné proliferace, neboť aby bylo dosaženo mitosy, je v případě β-buněk třeba silné mitogenní signalizace, která zapříčiní znovuobnovení buněčného cyklu.

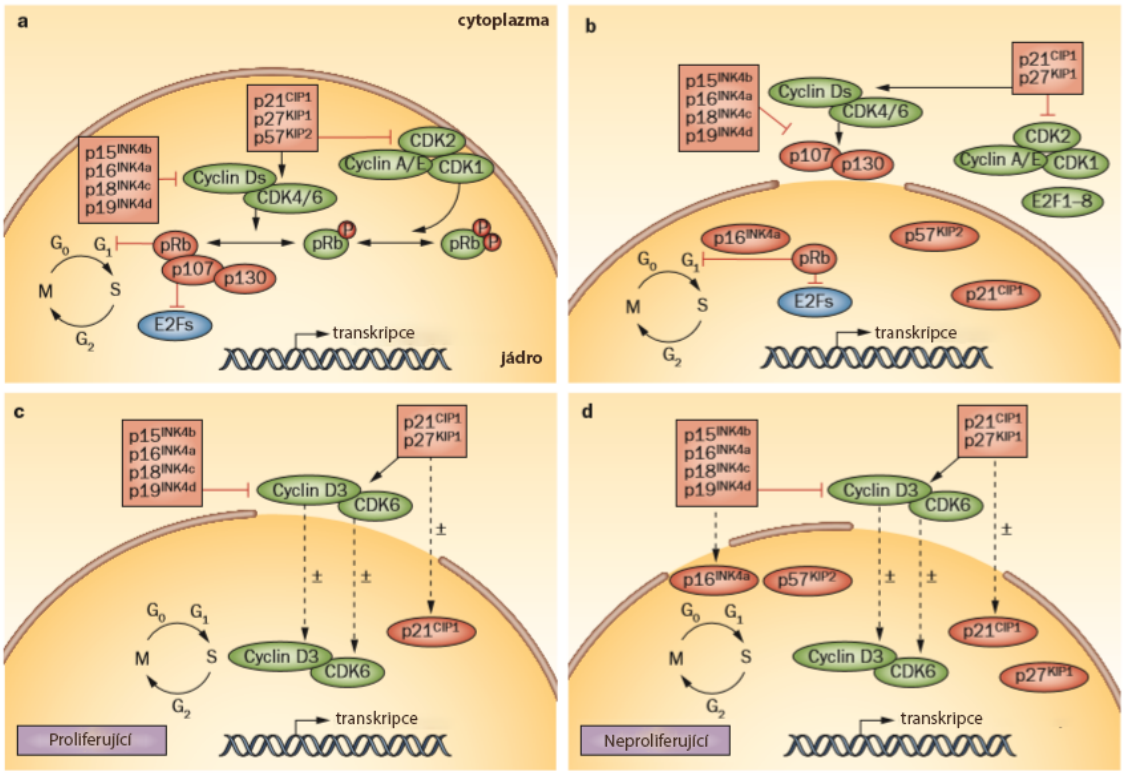
1.3.1 Prenatální a postnatální vývoj β-buněk

β-buňky dospělého člověka exprimují geny pro všechny cykliny a cyklin dependentní kinasy, stejně jako pro proteiny retinoblastomové rodiny, E2F transkripční faktory a inhibitory cyklin dependentních kinas (ICdk) nutné pro obnovení, či zastavení buněčného cyklu [8, 40, 43, 61]. Oproti ostatním ostrůvkovým buňkám exprimují pankreatické β-buňky vyšší množství transkripčních faktorů FoxO a méně glukosových transportérů GLUT2 (glukosový transportér 2, z angl. *Glucose Transporter 2*) [43]. Skutečnost, že se diferencované β-buňky nereplikují ani po vystavení mitogenních signálů je přisuzována vyšší jaderné koncentraci inhibitorů buněčného cyklu a exkluzi cyklinů a cyklin dependentních kinas z jádra do cytoplasmy, kde nemohou ovlivňovat genovou expresi a buněčné dělení [5, 62] (viz. obrázek 3, strana 25).

Další příčinou nízké proliferace adolescentních β-buněk může být snížená intenzita specifických signálů vedoucích v juvenilním období k diferenciaci β-buněk – jedná se například o signalizaci zprostředkovanou Notch 1 receptorem. Notch 1 se po své expresi a dimerizaci podílí na proliferaci endokrinních tkání [9] a inhibici diferenciace. Notch1 signalizace u β-buněk inhibuje expresi transkripčního faktoru neurogenin 3 (Ngn3, z angl. *Neurogenin III*), jenž společně s Pdx1 a MafA (transkripční faktor obsahující leucinovou zipper doménu, z angl. *MAF bZIP transcription*

factor A) zajišťuje diferenciaci a regeneraci ostrůvkových buněk [75, 76].

Mechanismus, kterým dochází k proliferaci pankreatických β-buněk se mění v závislosti na věku organismu. V rámci embrya vznikají β-buňky z multipotentních progenitorových buněk v důsledku signalizace rozsáhlé regulační sítě transkripčních faktorů, zejména poté Ezh2, Pdx1 a FoxO1 (viz tabulka 1, strana 26). Oproti tomu v dospělosti je množství β-buněk v organismu regulováno rovnováhou mezi jejich dělením, neogenesí a apoptosou. Ačkoliv je mechanismus proliferace β-buněk v prenatálním a postnatálním období rozdílný, dle tabulky 1 (strana 26) lze usuzovat, že transkripční faktory podílející se na správném embryonálním vývoji β-buněk přispívají k jejich optimální funkci a vitalitě i po narození [77].



Obrázek 3: | **Lokalizace regulačních molekul buněčného cyklu proliferujících a neproliferujících β-buněk: (A)** U většiny roliferujících buněk, embryonálních buněk a rakovinných buněk jsou kontrolní molekuly G_1/S přechodu lokalizovány v jádře. Červené rámečky reprezentují inhibitory buněčného cyklu, zelené oválky reprezentují aktivátory buněčného cyklu. **(B)** Quiescentní, neproliferující buňky (dospělé β-buňky) exkludují aktivátory buěčného cyklu z jádra do okolní cytoplasmy, kde nemohou podporovat buněčnou proliferaci. V jádře zůstávají pouze inhibitory buněčného cyklu (inhibitory cyklin dependentních kinas, ICdk) jako jsou například $p57^{KIP2}$, nebo ICdk $p16^{INK4A}$. **(C)** β-buňky, u kterých byla indukována proliferace zvýšenou expresí CD a CDK6 translokují některé aktivátory buněčného cyklu zpět do jádra a podstupují buněčné dělení. **(D)** β-buňky, u kterých došlo ke zvýšení exprese CD a CDK6, ale přesto nedošlo k proliferaci dochází k současné translokaci aktivátorů, ale také inhibitorů buněčného cyklu z cytoplasmy do jádra. ICdk převyšují svým množstvím a účinky cykliny a CDK a k proliferaci tudíž neodchází. [5]

Tabulka 1 | Stručný přehled transkripčních faktorů podílejících se na vývoji β-buněk

Transkripční faktor	**Role prenatálně**	**Role postnatálně**
Pdx1	diferenciace endokrinních buněk [63], proliferace β-buněk [64]	udržení β-buněčné masy, zajištění funkce β buněk [65]
FoxO1	regulace transkripce Pdx1 [66]	negativní regulace β-buněčné proliferace [67]
Placentární laktogeny	neznámá funkce	stimulace proliferace β-buněk [68]
Cyklin D2	bez efektu na neogenesi [69]	stimulace proliferace β-buněk [69]
CDK4	bez efektu na neogenesi [70]	null-mutanti vykazují sníženou proliferaci β-buněk a vznik DM [71]
p27(KIip1)	negativní regulace proliferace β-buněk [72]	aktivace u adolescentů nevykazuje žádný efekt na β-buněčnou proliferaci. Aktivace u dospělých jedinců zvyšuje proliferaci β-buněk [72]
mTORC2	regulace exprese FoxO1 a p27 [73]	null-mutanti vykazují střední hyperglykemii a glukosovou intoleranci s redukcí β-buněčné masy [74]

1.3.2 Důležitéβ-buněčné transkripční faktory

Ezh2 protein (z angl. Enhancer of Zeste Homolouge) se řadí do evolučně konzervované skupiny polycomb proteinů (PcG, z angl. *Polycomb Group Proteins*), která se podílí na modulaci struktury chromatinu a genové expresi tvorbou heteroproteinových komplexů [78]. Ezh2 v rámci Langerhansových ostrůvků pankreatu reguluje methylaci histonů a represi Ink4a/Arf lokusu, čímž podporuje fyziologickou neonatální expanzi β-buněk a adaptivní β-buněčnou regeneraci a předchází β-buněnému selhání v důsledku ROS (reaktivní kyslíkové radikály, z angl. *Reactive Oxygen Spicies*), které vyvolává patologie DM [20]. Ezh2 je dle zmíněné citace zároveň zodpovědný za udržování normoglykemie a optimální sekreci insulinu. Zvýšená koncentrace Ezh2 byla také detekována u maternálních ostrůvkových buněk během těhotenství

[20, 79].

Ochranu β-buěnk před oxidativním stresem zajišťují také proteiny patřící do FoxO rodiny (z angl. *Forkhead transcription factors*). FoxO proteiny regulují apoptosu, proliferaci a β-buněčnou senescenci v závislosti na aktuálním metabolickém stavu buňky a její pozici v rámci buněčného cyklu. V rámci patologie DM dochází vlivem chronické expozice zvýšeným koncentracím glukosy k aktivaci enolizačních drah produkujících superoxidové radikály [32]. Diferencované β-buňky exprimují v důsledku zvýšené produkce insulinu (a proteinů potřebných pro správný intracelulární přenos signálu o extracelulární glukose) nízkou hladinu antioxidačních enzymů jako je katalasa, glutathion peroxidasa a Mn-SOD (superoxiddismutasa využívající mangan, z angl. *Manganese Superoxide Dismutase*). V důsledku nízké produkce těchto enzymů jsou β-buňky více náchylné k oxidativnímu stresu ať už v důsledku enolizačních procesů sacharidů, nebo v důsledku lipidové toxicity [80, 81]. Pokud nastane oxidativní poškození buněčných komponent během S-fáze buněčného cyklu, nebo poškození dosáhne rozměrů, které jsou neslučitelné se životem buňky, podpoří FoxO1 expresi pro-apoptotických faktorů a buňka postupuje buněčnou smrtí [82]. V případě výskytu oxidativního poškození genomu během G_1-fáze, nebo G_2/M přechodu dochází naopak k zvýšení transkripce inhibitorů buněčného cyklu $p27^{Kip}$ a $p27^{Waf}$ a iniciaci předčasné senescence β-buněk [83].

FoxO1, zástupce z rodiny FoxO proteinů, zároveň působí jako kompetitivní inhibitor promotorové oblasti Pdx1, a slouží tedy jako jeho negativní regulátor. Pdx1 je transkripční faktor, který bývá označován jako gen β-buněčné identity, neboť aktivuje expresi většiny genů specifických pouze pro β-buňky [84–86] za současné represe α-buněčných genů [87][6]. Pdx1 zajišťuje regulaci buněčného cyklu, proliferaci a diferenciaci β-buněk ovlivněním struktury chromatinu [88]. Během aktivní proliferace β-buňky snižují expresi Pdx1 a dochází k jeho exkluzi z DNA-vazebných oblastí do nukleoplasmy. Koncentrace Pdx1 v β-buňkách reguluje průchod G_2/M kontrolním bodem buněčného cyklu. U buněk, které produkují příliš, nebo naopak velice málo Pdx1 nastává dočasná blokace progrese buněčného cyklu a obnovení buněčného cyklu nastává až po ustálení koncentrace Pdx1 na určité střední hodnotě. Podobnou tendenci takto Pdx1 vykazují i ostatní specifické β-buněčné transkripční faktory jako jsou Nkx6.1 [89] a MafA [90, 91]. Inhibice buněčného cyklu v důsledku vysoké koncentrace Pdx1 je pravděpodobně zapříčiněna kolapsem buněčného cyklu, který však nevzniká v důsledku DSB DNA (dvouvláknové zlomy DNA, z angl. *Double-Strand Breaks*) a nelze jej tak detekovat pomocí histonu γ-H2AX [88].

Trend podobný transkripčním faktorům Nkx6.1 (z angl. *NK6 homebox 1*) a MafA vykazuje také další pro β-buňky, ale i jiné buněčné typy, stěžejní transkripční fak-

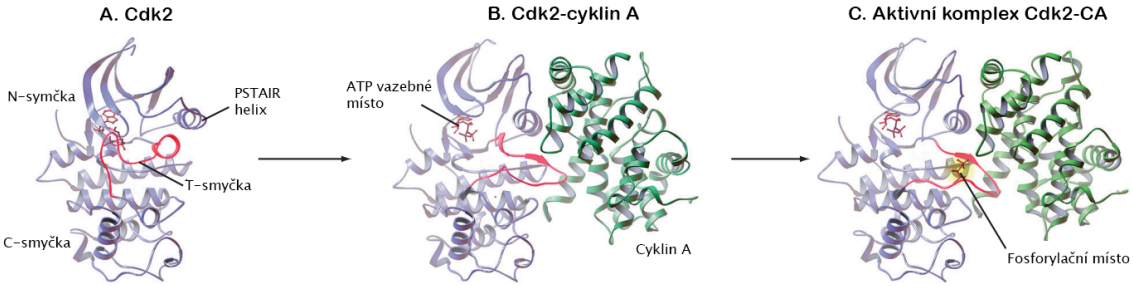
[6] α-buňky Langerhansových ostrůvků pankreatu jsou zodpovědné za syntézu peptidového hormonu glukagonu v případě poklesu koncentrace glukosy v krvi.

tor spadající do *Forkhead* rodiny, FoxM1 [92, 93]. FoxM1 podporuje funkci β-buněk a vyšší koncentrace podporuje také jejich proliferaci [94]. FoxM1 reguluje zejména G1/S a G2/M přechod buněčného cyklu ovlivněním exprese cyklinu B, Cdc25 fosfatasy [95], AurkB, Plk1 [96], nebo CENPA a CENPB [97] a je stěžejní pro postnatální β-buněčnou proliferaci. Specifická delece FoxM1 v pankreatických buňkách hlodavců zapříčiňuje zhoršenou glukosovou toleranci, zvýšenou β-buněčnou senescenci a defekty v morfologii β-buněk, ale i ostatních buněčných typů pankreatu [98]. FoxM1 zároveň podporuje regeneraci β-buněk po streptozotocinem indukované destrukci β-buněk snížením exprese prozánětlivých cytokinů a současným zvýšením exprese protizánětlivých T-lymfocytů (viz. kapitola o cyklinech rodiny D) [99]. Stejně tak se FoxM1 podílí na kompenzační proliferaci β-buněk u gravidních, či obézních hlodavců, jak bylo diskutováno v kapitole (kapitola o mitotických faktorech beta-buněk) [99, 100]. β-buněčná proliferace by v tomto případě mohla být zprostředkována pomocí nervových signálů pomocí vagových nervů, které v důsledku aktivují MAPK kinasovou dráhu, která zajistí fosforylaci a následnou translokaci FoxM1 z cytoplasmy do jádra β-buněk [101].

1.4 Hlavní regulační molekuly buněčného cyklu beta-buněk

Hlavní molekuly, které jsou zodpovědné za řízení buněčného cyklu β-buněk jsou cykliny, cyklin-dependentní kinasy a inhibitory cyklin dependentních kinas (ICdk, z angl. *Inhibitor of Cyclin Dependent Kinase*).

Cykliny jsou vazebnými partnery cyklin dependentních kinas a své jméno zís-



Obrázek 4: | Mechanismus vzniku komplexu C-CDK: A. (PDB: 1DM2) Aktivní místo CDK se nachází mezi malou N-terminální a velkou C-terminální doménou. Monomerní CDK obsahuje flexibilní T-smyčku, která která stericky brání aktivní místo enzymu. Inhibici aktivity přispívá i orientace glutamátu krátkého α-helixu ven z aktivního centra enzymu, který v této konformaci není schopný přijmout γ-fosfátovou skupinu od ATP. **B.** (PDB: 1FIN) Po vazbě cyklinu dochází ke změně konformace T-smyčky a k umožnění fosforylace CDK. Vzniklý komplex C-CDK má pouze nízkou katalytickou aktivitu a pro plnou aktivaci vyžaduje fosforylaci pomocí CAK kinasy (CDK-activating kinase). **C.** (PDB:1JST) CAK kinasa fosforyluje threonin v oblasti T-smyčky, která ještě více odkrývá katalytické centrum enzymu a stabilizuje vazbu cyklinu na cyklin dependentní kinasu (aktivita se zvyšuje až 300x). CDK1 a CDK2 mohou vázat svým C-terminálním koncem i další malé Cdc kinasové podjednotky, čímž dochází k zvýšení specifity a efektivity komplexů cyklin-CDK.

kaly díky své koncentrační oscilaci v závislosti na části buněčného cyklu, ve kterém se buňka nachází. Obecně každou část buněčného cyklu reguluje jeden, nebo více komplexů cyklinů a cyklin dependentních kinas (dále jako C-CDK), které prostřednictvím fosforylací řídí děje spojené s (1) replikací a licencováním DNA během S-fáze, (2) separací chromosomů během mitosy a (3) přechodu buněk z klidového období G_0-fáze do G_1 fáze. Tabulka 2 na straně 30 přiřazuje aktivitu C-CDK jednotlivým fázím buněčného cyklu a zároveň uvádí stručný výčet fosforylačních cílů C-CDK komplexů. Aktivaci komplexu C-CDK popisuje obrázek 4, strana 28.

Výzkum β-buněčné replikace se směřuje na aktivaci G_1/S kontrolního bodu buněčného cyklu (také G_0/G_1/S přechod), jehož ovlivnění může zajistit výstup pankreatických β-buněk z G_0 fáze a jejich zapojení do buněčného cyklu končícího dělením. Tiwari a kol. ([102]) společně s dalšími [61, 102] dokazují možnost obnovení buněčného cyklu β-buněk zvýšenou expresí CDK6 a cyklinů rodiny D. Stejných výsledků lze dosáhnout také částečnou inhibicí ICdk a jejich komplexů [103]. Obecně lze tedy konstatovat, že zvýšenou expresí proteinů podporujících buněčný cyklus, či sníženou expresí inhibitorů buněčného cyklu lze podpořit proliferaci diferencovaných (senescentních) β-buněk jak u myší, tak u člověka.

1.4.1 Cykliny

Stěžejní bod v otázce proliferace β-buněk představuje hyperfosforylace RB a s ní spojený G_1/S přechod. Fosforylaci RB zajišťují cyklin dependentní kinasy (CDK4, CDK6, CDK2), které tvoří heterodimery s cykliny rodiny D (D1, D2, D3) a E (E1, E2)[7]

Pro správný postnatální vývoj ostrůvkových buněk je stěžejní přítomnost cyklinu D2 a CDK4. Absence jednoho z těchto proteinů vede k tvorbě defektních β-buněk Langerhansových ostrůvků a rozvoji DM [21, 45, 104]. Cyklin D2 přímo přispívá k dělení ostrůvkových buněk a je tak společně s cyklinem D1 stěžejní pro post-, ale do jisté míry i prenatální vývoj β-buněk. Kombinovaná mutace obou zmíněných cyklinů vede k tvorbě morfologicky defektních β-buněk a v důsledku rozvoje silného DM také ke smrti organismu [45]. Oba ze zmíněných cyklinů mohou být v rámci neonatálního vývoje nahrazeny jinými typy cyklinů D a E rodiny [105] a neonatální vývoj pankreatu tak na jejich přítomnosti přímo nezávisí.

Cykliny a k nim příslušné CDK jsou kromě proliferace β-buněk zodpovědné i za viabilitu, správnou produkci insulinu a ochranu β-buněk před ROS a předčasnou senescencí. Poslední zmíněná vlastnost je přisuzována zejména cyklinu D3, jehož zvýšená exprese chrání β-buňky pankreatu před cytokiny-zprostředkovanou apoptosou [1, 106, 107]. Promotorová oblast genu pro cyklin D3 obsahuje vazebná místa

[7] CDK4 a CDK6 tvoří heterodimerní pár s cykliny rodiny D, CDK2 tvoří heterodimerní pár s cykliny rodiny E.

Tabulka 2 | Stručný přehled transkripčních faktorů podílejících se na vývoji β-buněk

Heterodimer C-CDK	**Perioda aktivity**	**Funkce**
CD-CDK4/6, CE-CDK2	G_0/G_1 přechod	fosforylace RB, aktivace E2F
CD-CDK4/6	G_1 fáze	kontrola G_1-fáze buněčného cyklu, fosforylace RB, podpora transkripční aktivity E2F
CD-CDK4/6, CE-CDK2	G_1/S přechod	regulace přechodu do S-fáze buněčného cyklu, podpora transkripce E2F cílových genů
CD-CDK2, CA-CDK2	S fáze	kontrola S fáze, kontrola replikace DNA, kontrola poškození DNA
CD-CDK4/6, CE-CDK2	G_2 fáze	kontrola integrity genomu
CA-CDK2/1, CB-CDK1	G_2/M přechod	kontrola G_2/M přechodu
CB-CDK1	M fáze	kontrola M-fáze, kontrola separace genetické informace, cytokinese

pro NF-κB (jaderný faktor κB, z angl. *Nuclear Factor* κB), IL-1β (interleukin β) a TNF-α (tumorový faktor nekrosy α, z angl. *Tumor Necrosis* α, což naznačuje jeho úloze v anti-apoptotické ochraně, která roste úměrně jeho koncentraci v buňce [4]. Anti-apoptotické vlastnosti jsou přisuzovány také cyklinu D1, který je ve vyšších mírách produkován rakovinnými buňkami pankreatu [108], či melanomu [109].

Cyklin D3 se výrazně nepodílí na proliferaci β-buněk, nicméně přispívá k jejich optimální funkci. Nedostatek cyklinu D3 zhoršuje patologii DMI a způsobuje insulitidu[8] a činí tak β-buňky náchylnější k autoimunitní destrukci aniž by byla ovlivněna jejich proliferace [4]. Při vyřazení genu (KO genu, z angl. *knockout*) pro cyklin D3 byla také zaznamenána zhoršená odpověď β-buněk na zvýšenou koncentraci extracelulární glukosy, což napovídá o možné úloze cyklinu D3 v metabolismu β-buněk. Mechanismus, kterým cyklin D3 přispívá k metabolické aktivitě β-buněk se týká ovlivňování intracelulární koncentrace vápníku v odpovědi na glukosovou stimulaci

[8]Zánět Langerhansových ostrůvků způsobený infiltrací ostrůvků T-lymfocyty v důsledku autoimunitní reakce.

[4]. Úlohu v udržování glukosové homeostázy plní i cyklin D2 [21].

1.4.2 Cyklin-dependentní kinasy

Hlavní regulační molekulu proliferace hlodavčích β-buněk představuje CDK4[9], neboť po jejím knockoutu dochází k propuknutí těžkého DM s poruchou proliferace β-buněk. Delece CDK6, která je do jisté míry schopná zastupovat CDK4 a tvořit podobné komplexy s cykliny rodiny D, tento fenotyp nevykazuje [110, 111].

Další významnou cyklin-dependentní kinasou, přednostně exprimovanou v endokrinních buňkách pankreatu, je CDK2, která tvoří komplex s cykliny z rodiny E (E1, E2) a je stěžejní pro G_1/S přechod a S-fázi buněčného cyklu. Myši se specifickou delecí CDK2 v pankreatických buňkách vykazují glukosovou-intoleranci, což vypovídá o roli CDK2 v glukosou stimulované sekreci insulinu. Měnící se koncentrace CDK2 v průběhu života souvisí také se senescencí pankreatických endokrinních buněk. S rostoucím věkem dochází ke snižování exprese CDK2 v organismu a společně s tím i ke snižování proliferace β-buněk [104]. KO-CDK2 myši vykazují nedostatečnou tvorbu insulinu vedoucí ke vzniku DM, kdežto opětovná aktivace CDK2 podporuje zvýšení množství β-buněk, [112, 113] regeneraci pankreatu [114], optimalizaci jeho vývoje [115] a stabilizaci transkripčního faktoru Pdx1 [116]. CDK2 je zodpovědná za přenos signálu o přítomnosti extracelulární glukosy do nitra β-buňky pomocí aktivace FoxO1 [104]. FoxO1 zajišťuje β-buněčnou diferenciaci a jeho deplece způsobuje vznik DM v důsledku dediferenciace β-buněk [117].

1.4.3 Regulační mechanismy cyklinů a CDK

Aktivita cyklinů rodiny D a cyklin dependentních kinas 4 a 6 je regulována nepřeberným množstvím mechanismů, mezi které patří regulace transkripce a translace, regulace tvorby heterodimerů C-CDK, či ovlivňování proteinové stability pomocí ICdk [118, 119]. Poslední výzkumy poukazují také na možnost regulace degradace D-cyklinů pomocí posttranslačních modifikací specifických aminokyselin [120, 121], které ovlivňují jejich stabilitu a poločas rozpadu [21].

Všechny CDK podléhají pozitivní regulaci, která je zprostředkována vazbou cyklinu a tvorbou příslušného heterodimeru cyklin-CDK (viz. kapitola 1.3.2 na straně 26 a obrázek 4 na straně 28). Hlavním β-buněčným negativním regulátorem aktivity CDK jsou inhibitory cyklin dependentních kinas (viz. obrázek 5 na straně 33) rodiny INK4 a rodiny Cip/Kip . Hlavní β-buněčné inhibitory jsou produkty Cdkn2A/B genu krátkého raménka chromosomu 9. Cdkn2A/B lokus člověka obsahuje tři kódující úseky, které kódují inhibitory buněčného cyklu $p14^{ARF}$ (který

[9]pro vývoj lidských β-buněk je nepostradatelná CDK6

mimo jiné také určuje čtecí rámec), $p15^{INK4B}$ a $p16^{INK4A}$ (poslední dva jmenovaní jsou inhibitory CDK4) [122–124][10]. Cdkn2A/B gen kóduje také dlouhou nekódující sekvenci non-coding RNA zvanou ANRIL. Produkty Cdkn2A/B genu inhibují progresi buněčného cyklu, tumorgenesi, senescenci a stárnutí v rozličných tkáních (viz. tabulka 3, [123, 124]). SNP vyskytující se v Cdkn2A/B lokusu výrazně ovlivňují genetické predispozice člověka ke vzniku DM.

Incidence DMII roste přímo úměrně rostoucímu věku a souvisí s postupným snížením proliferace a regenerace β-buněk. S rostoucím věkem dochází v ostrůvkových buňkách člověka i hlodavců ke zvýšení exprese inhibitoru cyklin-dependentní kinasy 4 $p16^{INK4A}$ [126–129] pravděpodobně v důsledku progresivní na věku závislé demethylace Cdkn2A/B lokusu [130]. p16INKA zapříčiňuje v dospělosti sníženou proliferaci β-buněk související s inhibicí CDK4 [131]. $p16^{INK4A}$ má vliv i na funkci β-buněk a jeho knock-out je v lidských EndoC-βH1 β-buňkách spojen se zvýšenou sekrecí insulinu [132]. Epigenetické modifikace a SNP vyskytující se na Cdkn2A/B lokusu a ovlivňující expresi inhibitorů buněčného cyklu tak svou povahou do jisté míry předurčují vznik DMII a dalších onemocnění.

[10] $p16^{INK4A}$ spadá společně s $p15^{INK4B}$, p18INK4C a $p19^{INK4D}$ do rodiny INK-inhibitorů, které kompetitivně váží CDK4/6 a zabraňují tak jejímu navázání na cyklin D [125].

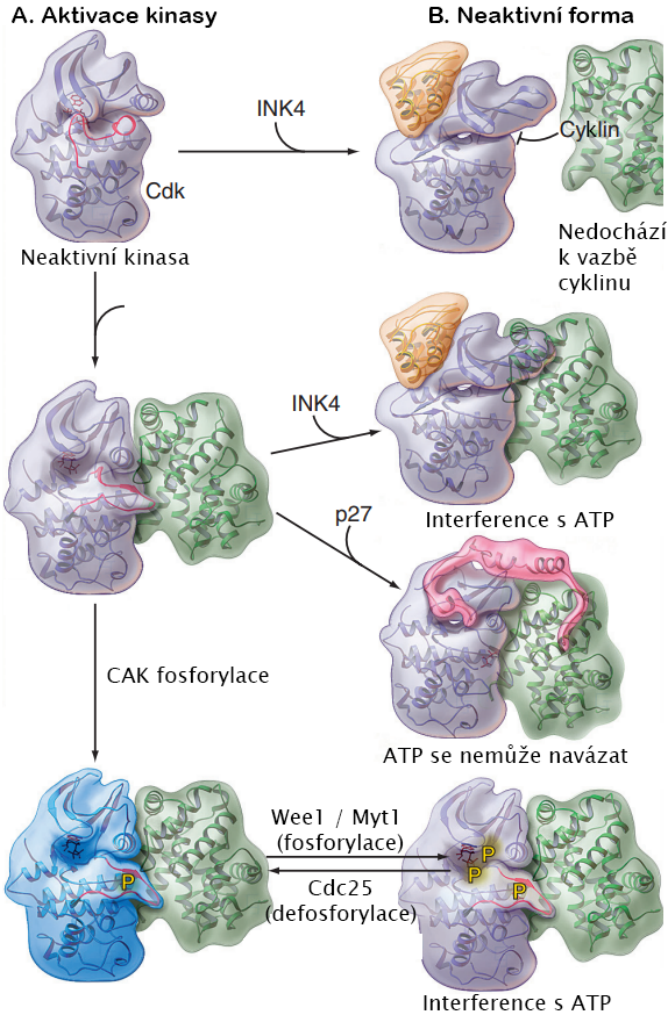
Tabulka 3 | Stručný přehled transkripčních faktorů podílejících se na vývoji β-buněk

Tkáň	**Produkt Cdkn2A/B lokusu**	**Funkce**
Ostrůvkové buňky	$p16^{INK4A}$	ovlivnění funkce β-bunněk: zamezení proliferace stárnoucích buněk, represe regenerace, aktivace senescence vlivem nadměrného kalorického příjmu, redukce sekrece insulinu
Tukové buňky	$p15^{INK4B}$	inhibice diferenciace tukových buněk
(adipocyty)	$p16^{INK4A}$	ovlivnění polarizace a aktivace makrofágů
Jaterní buňky (hepatocyty)	$p16^{INK4A}$	inhibice glukoneogenese

1.5 Poškození genetické informace v průběhu buněčného cyklu

Poškození buněčné DNA může být vyvoláno celou řadou různých příčin jak endogenního, tak exogenního původu – případně i kombinací obou zmíněných [133, 134]. Mezi nejčastější endogenní příčiny poškození DNA patří spontánní depurinace deoxyribonukleotidových bazí vlivem hydrolýzy, oxidace bazí a zlomy na DNA vzniklé působením volných kyslíkových radikálů (ROS z angl. *Reactive Oxygen Spicies*), nebo kolapsem replikační vidličky během replikace DNA [134].

Jednou z nejčastějších mutací stojící za vznikem lidských nádorů většiny buněk se řadí oxidace guaninu vlivem kyslíkových radikálů [135]. Oxidace guaninu vede k produkci oxoguaninu (oxoG), který je kvůli své pozměněné vaznosti vysoce mutagenní. OxoG je schopen tvořit vodíkové můstky s adeninem a zapříčinit tak



Obrázek 5: A: Aktivace CDK pomocí vazby cyklinu a fosforylace pomocí CAK; **B**: Negativní regulace CDK pomocí vazby inhibitoru a následné fosforylace. Po vazbě INK4 inhibitoru dochází ke změně konformace CDK, která zamezuje vazbu cyklinu a hydrolýzu ATP. Naopak po vazbě p27 na CDK dochází ke změně konformace vedoucí k zamezení vazby ATP do aktivního místa CDK. PDB soubory: 1B17 (CDK2-INK4), 1FIN a 1BI7 (CDK2-INK4-cyklin), 1JSU (CDK2-p27-cyklin A)

vznik transverzí G:C za T:A [136].

Mezi exogenní vlivy vedoucí k poškození genetické informace patří UV záření, ale i jiné druhy radiace včetně tepla a působení chemických sloučenin, které narušují replikaci DNA, či buněčný cyklus [137–139]. Již zmíněné UV záření postihuje sousedící nukleotidy thimidinu a zapříčiňuje vznik pyrimidinových dimerů [140–142].

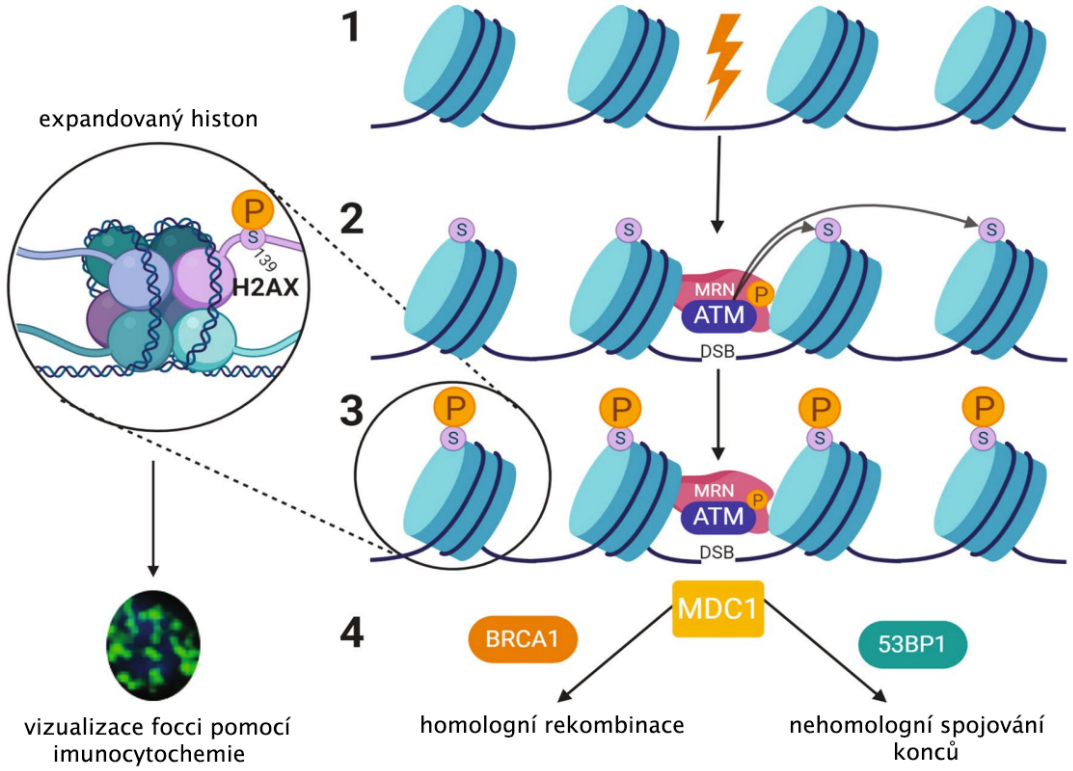
Během metabolických dějů a reprodukce buňky dochází často ke vzniku různých poškození genetické informace. Vzniklá poškození jsou následně opravována pomocí mechanismů odvíjejících se od fáze buněčného cyklu a počtu chromosomů buňky.

Nejnebezpečnějším poškozením genetické informace jsou dvouvláknové zlomy DNA (DSB – z angl. *Double-Strand Breaks*). DSB DNA jsou v závislosti na fázi buněčného cyklu opravovány buď homologní rekombinací (HR, z ang.Í. *Homologous Recombination*, buňka se nachází v S, či G_2 fázi), nebo nehomologním spojováním konců (NHEJ, z angl. *Non-Homologous End Joining*), které nastává během částí buněčného cyklu, ve kterých je buňka haploidní. Celkový souhrn poškození DNA a způsobů, kterými jsou opravovány je uveden v tabulce 4.

Detekce a opravy poškození genomu jsou regulovány prostřednictvím kinas (ATM a ATR kinasa – viz dále) a jejich signálních drah, nebo ubikvintinylací a sumoylací proteinů (například sumoylace PCNA). Určitý stupeň DNA poškození vzniká v rámci metabolismu buňky fyziologicky a je dán nedokonalostí a chybovostí biologických systémů [133, 134, 143].

Tabulka 4 | Stručný přehled poškození genetické informace a typů oprav, které se odvíjí od buněčného cyklu buňky. Pro vysvětlení zkratek nahlédněte do seznamu zkratek.

Fáze buněčného cyklu	**Typ poškození genomu**	**Oprava genomu**
G_1 fáze	dvouvláknové zlomy	NHEJ
	oxidace bazí	BER
	záměna nukleotidů	NER, TCR
S fáze	špatné zařazení nukleotidů	-
	vznik mezer a nik	HR
	nepřesné párování nukleotidů	MMR, BER
	dvouvláknové zlomy	HR
	léze na DNA	TS, TLS
G_2, M fáze	dvouvláknové zlomy	HR



Obrázek 6: | **Mechanismus vzniku γ-H2AX focci**: [133]. Mutageny v podobě UV záření, chemických látek (1), nebo tepla způsobují dvouvláknové zlomy na DNA, která je obalena bazickými histony (2). Zlomy, které se nachází na dvouvláknové DNA přivolávají MRN komplex, který je složen z proteinů Mre11, Rad50 a Nbs1 a v důsledku své činnosti rekrutují ATM kinasu (3). ATM kinasa fosforyluje histon H2AX na jeho serinovém reziduu 139 za vzniku značky, kterou lze pozorovat pomocí imunocytochemie jako γ-H2AX focci (4). Poté, co je dvouvláknový zlom označen fosforylací, dochází k příchodu MDC1 proteinů jako jsou BRCA1 a 53BP1, které zprostředkovávají přímou opravu dvouvláknového zlomu v závislosti na počtu chromosomů a části buněčného cyklu. Fosforylace histonu H2AX sahá až 11Mbp od místa poškození na DNA

1.5.1 Detekce poškození genetické informace

Histon H2AX představuje nejvíce konzervovaný histon z rodiny H2A a v rámci genomu tvoří 2-25% H2A histonů. Fosforylace histonu H2AX na serinu 139 v rámci časné odpovědi buňky na poškození DNA vede ke vzniku γ-H2AX (tzv. γ-H2AX focci). Vizualizace takto označených segmentů genetické informace pomocí technik založených na interakci specifických protilátek s γ-H2AX jednoznačně určuje místa genomu, na kterých dochází ke vzniku dvouvláknových zlomů DNA [133, 144–146].

Fosforylace γ-H2AX (obrázek 6) je realizována pomocí ATM kinasy (z angl. *Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase*), která se řadí do rodiny fosfatidylinositol-3-OH kinasám podobné rodiny (z angl. překladu *Phosphatidylinositol-3-OH-kinase-like Family*) [147, 148]. Počáteční fosforylace histonu H2AX pomocí ATR kinasy je následována rekrutováním MDC1 proteinu (z angl. *Mediator of DNA Damage Checkpoint*) a MRN komplexu, který zahrnuje molekuly NBS1/hMRE11/hRAD50. MRN komplex zvyšuje aktivitu ATM kinasy, která následně fosforyluje několik stovek až

tisíců H2AX histonů v oblasti výskytu DSB DNA [133].

Vizualizace γ-H2AX pozitivních buněk, u kterých bylo vyvoláno poškození DNA mutagenní látkou poskytuje rozdílné výsledky jak v rámci intenzity viditelných γ-H2AX focci, tak v rámci jejich počtu. Vědecká skupina Pauliny Rybak roku 2016 [146] publikovala první práci o možné souvislosti intenzity signálu γ-H2AX na typu poškození genetické informace. Jasně definované γ-H2AX focci s intenzivním signálem přímo korelují s výskytem molekul podílejících se na opravě DNA DSB a jasně tak definují místa dvouvláknových zlomů na DNA. Nejvyšší počet takto označených míst se nachází v pozdní S-fázi [144], přičemž v G_2 fázi se jejich počet snižuje, avšak neklesá na nulu. γ-H2AX focci ovšem nutně nemusí definovat DSB poškození DNA. Výskyt nejasně definovaných γ-H2AX focci nekoleruje s výskytem proteinů podílejících se na opravě DNA [146]. Tyto focci tedy pravděpodobně souvisí s odpovědí buňky na poškození DNA, které nebylo vyvoláno DSB DNA, nebo které vzniká v důsledku replikačního stresu. Skutečnost, že by málo intenzivní γ-H2AX focci představovaly pouze dohasínající signál intenzivních γ-H2AX focci vyvrací fakt, že se nenachází v blízkosti proteinu BP51, ani jiných proteinů podílejících se na opravě dvouvláknových zlomů, či na počátcích replikace.

Další studie na toto téma naznačují, že fosforylace γ-H2AX pravděpodobně probíhá také během přestavby transkripčně neaktivního heterochromatinu na transkripčně aktivní euchromatin a funkce fosforylovaného histonu H2AX daleko přesahuje problematiku poškození DNA. γ-H2AX v mitotických buňkách označuje separované chromosomy [145] a lze jej detekovat i v buňkách senescentních [146]. Na základě toho se mohou γ-H2AX focci zobrazovat nejen v případě vzniku dvouvláknových zlomů na DNA vyvolaných kolapsem replikační vidličky, nebo v místech jednovláknových zlomů DNA zapříčiněných kolapsem RNA polymerasy, ale také v místech špatného svinutí chromatinu, nebo v rámci aktivace kontrolních bodů buněčného cyklu nevyvolaných poškozením DNA [143].

Z uvedených informací vyplývá, že samotná detekce γ-H2AX není všeříkajícím údajem o tom, zda buňka prožívá vážné poškození DNA, které není slučitelné s jejím životem a při studiu vitality buňky je třeba využít i další přístupy. Jedním ze způsobů určení kritického poškození buněk je detekce apoptosy, neboli buněčné smrti. Apoptosu buňka podstupuje v případě vážného poškození genomu a jedná se o přísně řízený proces. K apoptose nemusí docházet pouze prostřednictvím narušení integrity genetické informace, ale také kolapsem buněčného cyklu a aktivací kontrolních bodů, které nevedou k fosforylaci histonu H2AX, avšak ústí v buněčnou smrt. Mezi tyto faktory v případě β-buněk patří, zejména množství transkribovaných transkripčních faktorů FoxM1, MafA, Nkx6 a Pdx1 [88] jak již bylo zmíněno dříve.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo *in vitro* studium vlivu synteticky připravených mRNA, (také IVT mRNA z angl. *In Vitro Transcribed messenger-RNA*) kódujících cykliny a cyklin dependentní kinasy na proliferaci, genovou expresi a genovou stabilitu β-buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu.

Hlavními cíli této práce je:

(1) Určení kombinace IVT mRNA, která potencuje nejvyšší míru proliferace β-buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu.

(2) Stanovení změn v genové expresi β-buněk po transfekci IVT mRNA pro regulátory buněčného cyklu, které zajišťují nejvyšší β-buněčnou proliferaci.

(3) Detekce poškození genomu β-buněk v důsledku proliferace stimulované IVT mRNA pro regulátory buněčného cyklu, které zajišťují nejvyšší β-buněčnou proliferaci.

Informace vyplývající z cílů této práce mohou výrazně pomoci v léčbě *diabetu mellitu I* i *II* typu, neboť rozvoj tohoto onemocnění nastává v důsledku snížení počtu a ztráty β-buněk Langerhansových ostrůvků. Analýza vlivu IVT mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy na genovou expresi a poškození genomu β-buněk Langerhansových ostrůvků zároveň poskytuje informace o vlivu IVT mRNA na funkci a vlastnosti buněk. Tato práce tak poskytuje ucelený obraz na použití IVT mRNA v terapii *diabetu mellitu*.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Název reagencie	**Katalogové číslo**	**Výrobce**
Accutase	A1110501	SigmaAldrich
Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit Ig	A31570	Life Technologies
Alexa Fluor 647 donkey anti-rabbit Ig	A31573	Life Technologies
Anti γ-H2AX antibody	9781	CellSignaling
CMRL Medium	21530027	Gibco™
DAPI	62248	Thermo Scientific™
DABCO	803456	Merck
EDTA[11]	E6758	Sigma Aldrich
Fetální bovinní sérum	F7524	Sigma Aldrich
Formaldehyd 4%	AAJ60401AP	Fisher Scientific™
GlutaMAX™	35050061	Gibco™
HBSS	24020117	Gibco™
HEPES	H0887	Sigma Aldrich
Kozí sérum	16210064	Gibco™
MessengerMAX Reagent	LMRNA001	Invitrogen™
Mowiol	81381	Sigma Aldrich
Opti-MEM Reduced Serum Medium	31985062	Gibco™
Oslí sérum	ab7475	Sigma Aldrich
PBS	10728775	Gibco™

[11] z angl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*

Název reagencie	**Katalogové číslo**	**Výrobce**
Rekombinantní protilátka Anti-Insulin	ab181547	Abcam
RPMI-1640 Meidum	R0883	Sigma Aldrich
TRITON-X 100	9036-19-5	Sigma Aldrich
TrypLE Express	12605010	Gibco™
TURBO DNasa	AM2238	Thermo Fisher™

3.1.2 Soupravy reagencií

Název soupravy	**Originální název (katalogové číslo)**	**Výrobce**
Soupava pro detekci proliferace metodou Click-iT Edu	*Click-iT EdU Cell Proliferation Kit* (C10337)	Invitrogen™
Souprava pro detekci poškození genomu metodou TUNEL	*Click-iT Plus Tunel Assay Kit* (C10619)	Invitrogen™
Souprava pro imunobarvení s AF647	*Click-iT Plus Edu Alexa Fluor 647 Imaging Kit* (C10640)	Invitrogen™
Soupava pro izolaci RNA	*RNeasy Mini Kit* (74106)	Qiagen™
Souprava pro reverzní transkripci	*Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (04379012001)	Roche™

3.1.3 Charakterizace biologických vzorků

Langerhansovy ostrůvky a β-buňky byly izolovány z potkanů Wistar Rat (*Rattus norvegicus*) v přibližném věku 4-6 měsíců a hmotnosti 250g.

3.2 Přístroje

Název	**Katalogové číslo**	**Výrobce**
Automatická elektronická pipeta	-	BrandTech Scientific
Centrifuga Hettich 320R	Z654736	Hettich
Centrifuga Hettich Mikro 200	Z652091	Hettich
CO_2 inkubátor	51030301	Thermo Scientific™
Fluorescenční mikroskop EVOS FL Auto	AMF5000	Thermo Scientific
Inkubátor	50129111	Thermo Scientific™
Laminární box Herasafe™KS	51022481	Thermo Scientific™
PCR Thermocyklér Quant Studio 6 Flex Real-Time PCR	4485691	Applied Biosystems™
Průtokový cytometr LSRII	-	BD Biosciences
QIAvac vakuový systém	19413	QIAGEN
Termocyklér TP Personal	846-2-070-311	Biometra
Vodní lázeň	TSGP02	ThermoScientific™
50um filtry Cell Trics	-	Sysmex

Fluorescenční mikroskop EVOS FL Auto využívá k excitaci a následné detekci fluorescence vzorků LED (elektroluminiscenční dioda, z angl. *Light-Emitting Diode*) kostky. V rámci této diplomové práce byly využity LED kostky typu DAPI, RFP a Cy5 (Thermo Fisher Scientific), jejichž charakteristiky jsou uvedeny níže:

LED kostka	**Barva**	**Excitace**	**Emise**	**Katalogové číslo**
DAPI	modrá	357/44 nm	447/60 nm	AMEP4950
RFP	oranžová	531/40 nm	593/40 nm	AMEP4952
Cy5	tmavě červená	628/40 nm	685/40 nm	AMEP4956

Průtokový cytometr LSRII (BD Biosciences) využívá leaserové hlavy firmy Coherent OBIS:

Barva	**Vlnová délka**	**Charaketristika**	**Katalogové číslo**
Fialová	405 nm	100mW	SKU 1287002
Modrá	488 nm	150mW	SKU 1174040
Žlutá	561 nm	50mW	SKU 1230935
Červená	637 nm	140mW	SKU: 1196625

3.2.1 Software

Název softwaru	**Odkaz**	**Výrobce**
Adobe Photoshop CS v2017	Adobe Photoshop	Adobe
FlowJo™v10.8.1.	FlowJo Software	FlowJo™
GraphPrism	GraphPad GraphPrism	Dotmatics
QuantStudio™Real-Time PCR Software v1.3	RT PCR Software	Applied Biosystems™

3.3 Metody

3.3.1 Kultivace buněk karcinomu močového měchýře

Kultivace buněk karcinomu močového měchýře (HTB-9) probíhala v kultivační lahvičce za použití média pro kultivaci buněk karcinomu močového měchýře obsahující fetální bovinní sérum (FBS, z angl. *Fetal Bovinne Serum*). Složení média je uvedeno v tabulce 5). Kultivace a pasážování probíhalo za účelem tvorby specifické extracelulární matrix, která je produkována tímto typem buněk a která je stěžejní pro kultivaci ostrůvkových buněk. Kultivace HTB-9 buněk probíhala při 37°C a 5% atmosféře CO_2. K oddělení buněčné linie od povrchu kultivační lahvičky pro účely pasážování byl použit ředěný roztok trypsinu (složení viz. tabulka 6, strana 44). Buňky byly pasážovány každý sedmý den.

Před začátkem kultivace byl stav adherentních buněk karcinomu močového měchýře HTB-9 linie zkontrolován pod mikroskopem. Z kultivační lahvičky s adherentními buňkami bylo pomocí Pasteurovy pipety odsáto kultivační médium, které bylo následně uschováno v10ml zkumavce pro další použití.

Tabulka 5 | Tabulka složení média pro kultivaci buněk karcinomu močového měchýře HTB-9 linie. Tabulka uvádí množství roztoků, které je potřeba na přípravu média o celkovém objemu 100 ml.

Reagencie	**Množství**
FBS	10 ml
GlutaMAX	1 ml
RPMI Medium[12]	89 ml

Kultivační lahvička s adherovanými buňkami byla promyta 4 x 3 ml PBS (fosfátem pufrovaný fyziologický roztok, z angl. *Phosphate Buffered Saline*). Při posledním proplachu bylo v kultivační lahvičce ponecháno přibližně 3 ml PBS. K tomuto objemu bylo přidáno 1,5 ml 5x ředěného roztoku trypsinu TRYPSIN-EDTA 0,25% (viz. tabulka 6, strana 44), který slouží k oddělení adherentních HBT–9 buněk od povrchu kultivační lahvičky.

Kultivační lahvička byla vložena do inkubátoru a inkubována při 37°C a 5% CO_2 atmosféře po dobu 15 minut.

Po inkubaci byla z kultivační lahvičky pomocí Pasteurovy pipety odebrána suspenze obsahující již oddělené HTB-9 buňky. Obsah Pasteurovy pipety byl přenesen do 10ml

[12]Médium bylo pojmenováno dle místa, kde bylo poprvé připraveno - *Roswell Park Memorial Institute*

[13]Hanks Balanced Salt Solution

Tabulka 6 | Tabulka složení média pro disociaci buněk karcinomu močového měchýře HTB-9 linie od povrchu mikrotitrační destičky. Tabulka uvádí množství roztoků, které je potřeba na přípravu média o celkovém objemu 100 ml.

Reagencie	**Množství**
EDTA	0,02 g
Vepřový trypsin	0,25 g
HBSS pufr[13]	100 ml

zkumavky obsahující kultivační médium pro HTB-9 buňky (RPMI médium) uschované z prvního kroku experimentu.

Kultivační lahvička byla 1x propláchnuta přibližně 2 ml čerstvého RPMI média (složení viz. tabulka 5, strana 43). Proplach byl přidán do zkumavky obsahující suspenzní HTB-9 buňky. Zkumavka byla následně centrifugována při 400 x g po dobu 5 minut ($V_{kapalina}$ = 10ml).

Po centrifugaci byl odsát supernatant a peleta HTB-9 buněk byla resuspendována pomocí 10 ml čerstvého RPMI média. Ze vzniklé suspenze byl odebrán přibližně 1 ml roztoku, který byl přenesen do nové kultivační lahvičky. Do kultivační lahvičky bylo zároveň přidáno RPMI médium v objemu 4 ml. Kultivace buněk dále probíhala v inkubátoru při 37°C a 5% atmosféře CO_2.

Roztok HTB-9 buněk, který nebyl použit pro kultivaci byl po promíchání rozpipetován po 200 μl do jamek mikrotitrační destičky určené k pozdější kultivaci buněk Langerhansových ostrůvků.

3.3.2 Příprava extracelulární matrix z HTB-9 buněk

V rámci této práce bylo při všech dále zmíněných experimentech využíváno buněk Langerhansových ostrůvků adherovaných k extracelulární matrix (kolagen IV a laminin), která byla vyprodukována HTB-9 buňkami na povrchu jamek mikrotitrační destičky. Ostrůvkové buňky vyžadují pro svou adhezi k povrchům přítomnost specifických proteinů extracelulární matrix. Proteiny extracelulární matrix zároveň podporují vitalitu a funkci buněk Langerhansových ostrůvků. Proteiny extracelulární matrix důležité pro adhezi a přežívání buněk Langerhansových ostrůvků jsou tvořeny také HTB-9 adherentními buňkami karcinomu močového měchýře, které byly pro tento účel nasazeny a následně inkubovány (po dobu 4 - 5 dnů) vjednotlivých jamkách mikrotitrační destičky tak, jak je uvedeno vkapitole 3.3.1 (strana 43).

Z mikrotitrační destičky, jejíž jamky obsahují adherované buňky karcinomu močového měchýře, bylo odsáto kultivační medium (RPMI medium). Jamky obsahující adherované buňky byly 1x propláchnuty 125 μl HBSS pufru (z angl. *Hank's Balan-*

ced Salt Solution). Jamky byly následně odsáty do sucha a do každé z nich bylo přidáno 100 μl roztoku pro desintegraci buněk karcinomu močového měchýře obsahující TRITON-X 100 (2-[4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenoxy]ethanol, složení viz. tabulka 7). Mikrotitrační destička byla následně inkubována při 37°C a 5% atmosféře CO_2 po dobu 5 minut. Desintegrační roztok zajistí decelularizaci buněk karcinomu močového měchýře bez ovlivnění struktury extracelulární matrix potřebné pro adhezi buněk Langerhansových ostrůvků.

Tabulka 7 | Tabulka složení média pro decelularizaci buněk karcinomu močového měchýře HTB-9 linie. Tabulka uvádí množství roztoku, které je potřeba na přípravu média o celkovém objemu 100 ml.

Reagencie	**Množství**
Destilovaná voda	97,9 ml
Hydroxid sodný (1M)	2 ml
TRITON-X 100	0,1 ml

Po uplynutí doby potřebné k decelularizaci HTB-9 buněk byl objem každé jamky několikrát promíchán opakovaným stlačením pístu ruční pipety. Suspenze obsahující decelularizované buňky byla následně odsáta.

Jamky mikrotitrační destičky určené k nasazení buněk Langerhansových ostrůvků byly 3x propláchnuty 200 μl HBSS pufru. Mezi jednotlivými proplachy byly jamky mikrotitrační destičky odsávány do sucha za použití multikanálové vakuové pipety. Po posledním promytí bylo do každé jamky přidáno 200 μl 100% CMRL média.

3.3.3 Disociace Langerhansových ostrůvků

Před adherováním ostrůvkových buněk na specifickou extracelulární matrix přítomnou na povrchu jamek mikrotitrační destičky bylo třeba rozvolnit shluky, které buňky Langerhansových ostrůvků tvoří. Disociace ostrůvkových buněk byla provedena za pomoci enzymatické směsi Accutase.

Před zahájením experimentu byl stav Langerhansových ostrůvků zkontrolován pod mikroskopem. Následně byly ostrůvky pomocí Pasteurovy pipety přeneseny z kultivační lahvičky do 15ml zkumavky. Kultivační lahvička byla propláchnuta 1 x 2 ml HBSS roztoku a proplach byl přidán k obsahu zkumavky.

Zkumavka s Langerhansovými ostrůvky byla centrifugována po dobu 1 minuty při 40 x g. Supernatant byl opatrně odstraněn za použití pipety a peleta byla intenzivně resuspendována v3 - 4 ml enzymatické směsi Accutase. Zkumavka s resuspendovanou peletou Langerhansových ostrůvků byla uvedena do horizontální polohy

Tabulka 8 | Tabulka složení média pro kultivaci buněk Langerhansových ostrůvků. Tabulka uvádí množství roztoku, které je potřeba na přípravu média o celkovém objemu 100 ml.

Reagencie	Množství
CMRL Médium	67,5 ml
Fetální bovinní sérum	30 ml
GlutaMAX	1 ml
HEPES (1M)	0,5 ml
Pyruvát sodný (100mM)	1 ml

a byla takto ponechána po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Následně byla suspenze Langerhansových ostrůvků důkladně promíchána ruční pipetou za účelem rozvolnění buněk Langerhansových ostrůvků na jednotlivé buňky. Úspěšné rozvolnění ostrůvků lze pozorovat ve formě lehkého zakalení roztoku.

Roztok obsahující disociované buňky Langerhansových ostrůvků byl centrifugován při 200 x g po dobu 5 minut. Supernatant byl odsán a k buňkám bylo pipetováno 3,3 ml média pro kultivaci Langerhansových ostrůvků obsahující 30% FBS (složení viz. tabulka 8), ve kterém byly buňky důkladně resuspendovány.

Do jamek mikrotitrační destičky s extracelulární matrix pocházející z HTB-9 buněčné linie bylo pipetováno po 100 μl roztoku vzniklého resuspendováním pelety rozvolněných buněk Langerhansových ostrůvků.

3.3.4 Transfekce syntetické mRNA do buněk Langerhansových ostrůvků

Navození proliferace β-buněk (ale také ostatních buněk Langerhansových ostrůvků) bylo zajištěno transfekcí buněk syntetickými modifikovanými mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy (také IVT mRNA, *in vitro* transkribovaná RNA, převzato z angl. *in vitro transcribed mRNA*) vkombinacích, které udává tabulka 9 (strana 47). Přenos syntetické mRNA kódující cykliny a CDK do buněk Langerhansových ostrůvků umožňuje transfekční činidlo MessengerMAX Reagent. Transfekce mRNA do buňky je založena na elektrostatické interakci záporně nabitého povrchu nukleové kyseliny a kladně nabitých lipidových částí transfekčního činidla. Kladný a záporný náboj tvoří elektrostatické interakce, které vedou k tvorbě micely, která je schopna endocytovat do buňky. Uvnitř buňky dochází k uvolnění syntetických mRNA, které jsou přeloženy na příslušné proteiny, které následně aktivují buněčný cyklus buňky.

Směs pro transfekci buněk Langerhansových ostrůvků byla připravena následu-

Tabulka 9 | Možné kombinace transfekované mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy

Cyklin	Cyklin dependentní kinasa
Cyklin D1	CDK 4
Cyklin D1	CDK 6
Cyklin D1 mutace T286A	CDK 4
Cyklin D1 mutace T286A	CDK 6
Cyklin D2	CDK 4
Cyklin D2	CDK 6
Cyklin D2 mutace T280A	CDK 4
Cyklin D2 mutace T280A	CDK 6
Cyklin D3	CDK 4
Cyklin D3	CDK 6
Cyklin D3 mutace T283A	CDK 4
Cyklin D3 mutace T283A	CDK 6

jícím způsobem[14]: do mikrozkumavky byly pipetovány 2 μl (= 80 ng) IVT mRNA pro cyklin, ke kterým byly přidány 2 μl IVT mRNA pro CDK o stejné koncentraci. Koncentrace jednotlivých IVT mRNA byla před přípravou transfekční směsi upravena pomocí Opti-MEM média tak, aby výsledná koncentrace IVT mRNA byla 40 ng/μl.

Poté, co byly smíchány IVT mRNA pro cykliny i CDK bylo k roztoku pipetováno 10 μl transfekčního činidla MessengerMAX. Před přidáním k IVT mRNA bylo transfekční činidlo naředěno Opti-MEM médiem v poměru 1:25 a inkubováno 10 minut při laboratorní teplotě. Směs IVT mRNA a naředěného transfekčního činidla MessengerMAX byla smíchána a inkubována při laboratorní teplotě po dobu 5 - 10 minut.

Po uplynutí inkubační doby bylo do každé mikrozkumavky obsahující transfekční směs pipetováno 36 μl média pro kultivaci Langerhansových ostrůvků.

Z mikrotitrační destičky obsahující adherované buňky Langerhansových ostrůvků (viz. kapitola 3.3.3, strana 45) bylo odsáto 100 μl kultivačního média. Transfekční směs byla následně v objemu 50 μl pipetována do příslušných jamek mikrotitrační

[14]Objemy odpovídají množství transfekční směsi potřebné pro transfekci jedné jamky mikrotitrační destičky

destičky s adherovanými buňkami Langerhansových ostrůvků. Buňky byly následně inkubovány při 37°C a 5% CO_2 atmosféře po dobu 8 hodin.

8 hodin po transfekci IVT mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy bylo do každé jamky mikrotitrační destičky pipetováno 17 μl 0,25 mmol.dm^{-3} roztoku EdU (5'-ethenyl-deoxyuridin). Buňky byly dále kultivovány při 37°C a 5% CO_2 atmosféře.

24 hodin po transfekci IVT mRNA bylo buňkám vyměněno kultivační médium pro Langerhansovy ostrůvky za čerstvé kultivační médium obsahující EdU o výsledné koncentraci 20 μmol.dm^{-3} tak, že bylo odsáto 70 μl stávajícího média a přidáno 100 μl média čerstvého.

3.3.5 Detekce proliferace β-buněk metodou Click-iT EdU a nepřímé imunofluorescence

Proliferace β-buněk byla detekována pomocí nepřímé imunofluorescence v kombinaci s metodou Click-iT EdU. Metoda Click-iT EdU je založena na inkorporaci nukleotidového analogu, 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu, do DNA během procesu replikace DNA v S-fázi. Zainkorporovaný derivát thimidinu následně reaguje se 2° protilátkou označenou fluoroforem, který obsahuje azidovou skupinu. Reakce probíhá za katalýzy měďatých iontů za vzniku alkenu a fluorescenčního signálu. Proliferující β-buňky byly jednoznačně určeny souběžnou detekcí 2° protilátky proti insulinu a barvením jader pomocí DAPI (4',6'-diamidino-2'-fenylindol). Pro detekci proliferace byla využita souprava reagencií *Click-iT EdU Cell Proliferation Kit* od firmy Invitrogen™.

Byl připraven pracovní roztok reakčního pufru ředěním komponentu D (součástí kitu) v poměru 1:10 s deionizovanou vodou v množství, které odpovídá počtu jamek v našem experimentu[15]. Dále byl připraven 1X koncentrovaný roztok Click-iT EdU aditiv ředěním roztoku "Aditiv reakčního pufru"(z angl. *Reaction buffer additive*) v poměru 1:10 s deionizovanou dobou. 1X Click-iT Edu aditiv je třeba připravit vždy v den použití.

Mikrotitrační destička obsahující transfekované buňky Langerhansových ostrůvků byla 3x promyta 200 μl HBSS pufru s 1% přídavkem FBS. Jamky byly odsáty (za zachování přibližně 50 μl tekutiny na dně jamky) a buňky byly fixovány přidáním 100 μl fixačního roztoku obsahujícího 4% formaldehyd (složení viz. tabulka 10, strana 49). Následovala inkubace po dobu 15 minut při laboratorní teplotě.

Fixační roztok byl odsát a jamky mikrotitrační destičky byly promyty 3x 200 μl PBS. Při promývání byl na dně jamek mikrotitrační destičky vždy udržován tenký film roztoku, aby se předešlo vyschnutí jamek. Po posledním promytí byl roztok PBS odsán (za současného zachování menisku) a do jamek bylo pipetováno 100 μl perme-

[15]Na jednu jamku mikrotitrační destičky je třeba připravit 88 μl reakčního pufru.

Tabulka 10 | Tabulka složení fixačního roztoku v rámci detekce proliferace β-buněk metodou Click-iT EdU a nepřímé imunofluorescence. Objemy reagencií uvedené v tabulce jsou potřeba na přípravu na přípravu roztoku o celkovém objemu 100 ml.

Reagencie	**Množství**
Formaldehyd	4 g
PBS	100 ml

abilizačního roztoku (0,5% Triton-X 100 v PBS, viz. tabulka 11). Permeabilizační roztok slouží k tvorbě pórů v membránách buňky, čímž umožňuje reakci primárních a sekundárních protilátek s cílovými proteiny. Permeabilizace probíhala po dobu 20 minut při laboratorní teplotě.

Tabulka 11 | | Tabulka složení permeabilizačního roztoku v rámci detekce proliferace β-buněk metodou Click-iT EdU a nepřímé fluorescence. Objemy reagencií uvedené v tabulce jsou potřeba na přípravu na přípravu roztoku o celkovém objemu 100 ml.

Reagencie	**Množství**
PBS	99,5 ml
Triton-X 100	500 μl

Během permeabilizace byla připravena Click-iT EdU reakční směs dle tabulky 12 (strana 50). Na jednu jamku mikrotitrační destičky je spotřebováno 100 μl připravovaného roztoku. Jednotlivé reagencie byly míchány v přesném pořadí tak, jak jsou vypsány v tabulce 12 pod sebou. Pro optimální průběh reakce je doporučeno připravit Click-iT reakční směs 15 minut před použitím.

Po uplynutí doby potřebné k permeabilizaci byly jamky mikrotitrační destičky 3x promyty 200 μl PBS. Po posledním promytí byly jamky odsáty (za současného zachování menisku) a do jamek bylo přidáno 100 μl Click-iT EdU reakční směsi. Obsah jamek byl po každém přidání reakční směsi promíchán opakovaným stlačením pístu ruční pipety. Mikrotitrační destička byla následně inkubována po dobu 30 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Během inkubace byl připraven blokovací roztok, kterým bylo 5% oslí sérum v promývacím roztoku (podrobné složení obou roztoků udává tabulka 13 na straně 50). Blokovací roztok slouží k minimalizaci signálů na pozadí vznikajících aktivitou endogenních enzymů, biotinu a nespecifických vazeb tkáňových prvků s detekčními činidly. Blokování nespecifické vazby protilátky je zajištěno tím, že se protein obsažený v blokovacím roztoku na dané místo sám

Tabulka 12 | Tabulka pro přípravu reakční směsi Click-iT Plus pro detekci proliferace v určitém počtu jamek mikrotitrační destičky. Všechny reagencie jsou součástí proliferačního kitu *Click-iT EdU Cell Proliferation Kit* (C10337) od Thermofisher Scientific.

Reagencie	**5 jamek**	**25 jamek**	**50 jamek**	**125 jamek**
1X koncentrovaný reakční pufr	440 μl	2,25 ml	4,4 ml	10,9 ml
Roztok obsahující Cu^{2+} ionty	10 μl	50 μl	100 μl	250 μl
AlexaFluor picolyl azid	1,2 μl	6 μl	12,5 μl	31 μl
Aditiv reakčního pufru	50 μl	250 μl	500 μl	1,25 ml
Celkový objem	500 μl	2,5 ml	5 ml	12,5 ml

váže. Blokovací roztok byl připraven v dostatečném množství, neboť byl kromě blokovací reakce využit také k ředění sekundárních protilátek v dalším kroku postupu.

Po inkubaci byly jamky promyty 3 x 200 μl PBS pufru. Po posledním promytí byl odsán roztok PBS tak, aby na dně jamky zůstal mikrofilm tekutiny a do všech jamek byl přidán blokovací roztok o objemu 100 μl/jamka. Mikrotitrační destička byla inkubována za laboratorní teploty po dobu 30 minut ve tmě.

Tabulka 13 | Tabulky složení promývacího a blokovacího roztoku pro detekci proliferace β-buněk Langerhansových ostrůvků pomocí nepřímé imunofluorescence.

Složení promývacího roztoku

Glycin v PBS	0,1 mM
Triton-X 100	0,05 %

Složení blokovacího roztoku

Promývací roztok	4,75 ml
Oslí sérum	250 μl

Do jamek mikrotitrační destičky byla bez předešlého promývání pipetována primární protilátka proti insulinu (Abcam, ab181547) ředěná v předstihu rozpouštědlem (připraveno v laboratoři dříve, složení dle tabulky 14, strana 51) v poměru 1:400. Mikrotitrační destička byla inkubována 60 minut ve tmě při laboratorní teplotě.

Po uplynutí doby potřebné k inkubaci byly jamky mikrotitrační destičky 3x promyty 200 μl PBS pufru. Po posledním promytí byl roztok PBS odsán do sucha a do jamek bylo pipetováno 100 μl ředěné sekundární protilátky AlexaFluor555 (Life Technologies) v poměru 1:600. Ředění primární a sekundární protilátky pro detekci

Tabulka 14 | Roztok určený k ředění 1° protilátky pro detekci insulinu v rámci detekce proliferace β-buněk Langerhansových ostrůvků pomocí nepřímé imunofluorescence.

Reagencie	Objem reagencie
BSA	1 g
Želatina z kůže ryb žijících v chladné vodě (z angl. *Cold water fish skin gelatin*)	200 μl
Triton X-100	500 μl
Azid sodný	10 μl
PBS	99,3 ml
Celkový objem	100 ml

β-buněčné proliferace shrnuje tabulka 15, strana 51. Destička byla následně inkubována při laboratorní teplotě po dobu 60 minut ve tmě.

Tabulka 15 | Ředění primárních a sekundárních protilátek pro detekci insulinu pomocí nepřímé imunoflurescence v rámci detekce proliferace β-buněk.

1° protilátka	Druh	Ředění	Dodavatel	Katalogové číslo
Anti-insulin	králičí	1:400 (ředěno v Ab diluent)	Abcam	ab181547

2° protilátka	Druh	Ředění	Dodavatel	Katalogové číslo
AlexaFluor555	oslí proti králičí	1:600 (ředěno v B[16])	Life Technologies	A31572

Jamky mikrotitrační destičky byly 3x promyty 200 μl PBS pufru. Po posledním promytí byl roztok PBS odsát a do jednotlivých jamek bylo pipetováno 100 μl roztoku DAPI, který byl připraven dle tabulky 16 (strana 52), které se váže na oblasti DNA bohaté na AT páry, čímž při fluorescenční mikroskopii označuje pozici jader. Následovala inkubace po dobu 5 minut při laboratorní teplotě a tmě.

[16]B = blokovací roztok, 5% oslí sérum v promývacím roztoku

Tabulka 16 | | Tabulka složení roztoku pro vizualizaci buněčných jader.

Reagencie	Množství
NucBlue Fixed Cell Stain Ready Probes (DAPI)	2 kapky
PBS	1 ml

Po inkubaci byly jamky 3x promyty 200 μl PBS pufru, po kterém následovaly další 3 promytí 200 μl PBS s 5 minutovou inkubací mezi jednotlivými promytími. Po posledním promytí byl odsát všechen roztok PBS (do sucha) a do jednotlivých jamek bylo pipetováno 80 μl Dabco-Mowiol v glycerolu, které slouží jako montážní médium.

Detekce sekundárních protilátek byla prováděna pomocí fluorescenční mikroskopie. Jádra buněk značená DAPI se na fluorescenčních snímcích zobrazují modrou pseudobarvou (excitační spektrum = $357 \pm 22nm$, emisní spektrum = $447 \pm 30nm$). Proliferující buňky jsou označeny fluoroforem AlexaFluor647 (absorpční spektrum $635 \pm 10nm$, emisní spektrum $692 \pm 20nm$), který poskytuje na fluorescenčních snímcích zelenou pseudobarvu. Insulin je značen pomocí fluoroforu AlexaFluor555 (absorpční spektrum $542 \pm 10nm$, emisní spektrum $593 \pm 20nm$) a na fluorescenčních snímcích je zobrazován červenou pseudobarvou.

3.3.6 Detekce proliferace β-buněk pomocí průtokové cytometrie

Detekce proliferace ostrůvkových buněk pomocí průtokové cytometrie je založena na kombinaci imunochemického barvení buněk Langerhansových ostrůvků primární a sekundární protilátkou s detekcí proliferace pomocí metody Click-iT EdU. Fluorescenčně označené buňky jsou následně detekovány průtokovým cytometrem na základě síly signálu fluoroforu a granularity. Postup této metody se až na drobné odchylky shoduje s postupem uvedeným v kapitole 3.3.5 na straně 48. Detekce proliferace buněk Langerhansových ostrůvků pomocí průtokové cytometrie byla prováděna za účelem určení kombinace IVT mRNA pro cyklin a CDK, která zajišťuje nejvyšší nárůst míry proliferace β-buněk Langerhansových ostrůvků.

Před začátkem experimentu byly připraveny roztoky Accutase, Trypsin-EDTA (TrypleMAX), PBS a 4% formaldehyd. Roztok Accutase a 4% formaldehyd byly vytemperovány na pokojovou teplotu. Ze zásobního roztoku PBS bylo odebráno menší množství roztoku do 5ml zkumavky, která byla ve vodorovné poloze umístěna na led. Zbylý zásobní roztok byl vytemperován na pokojovou teplotu. Roztok TrypleMAX byl dle rozložení experimentu[17] rozpipetován do 1ml zkumavek (do jedné zkumavky je pipetováno maximálně 700 μl TrypleMax, které vystačí na disociaci bu-

[17]Pro disociaci jedné jamky mikrotitrační destičky je zapotřebí 100μl TrypleMAX

něk Langerhansových ostrůvků v rámci 6 jamek mikrotitrační destičky) a alikvoty byly vytemperovány na 37°C ve vodní lázni. Zahřátím TrypleMAX na 37°C dochází ke zvýšení aktivity trypsinu, v důsledku čehož dochází k snazší disociaci buněk Langerhansových ostrůvků ode dna jamky.

Před začátkem disociace byl stav adherovaných buněk Langerhansových ostrůvků zkontrolován pomocí mikroskopu. Jamky mikrotitrační destičky obsahující buňky určené k disociaci byly následně naplněny roztokem PBS (pokojová teplota) až po okraj (přidáno bylo přibližně 200 μl PBS/jamka). Multikanálovou pipetou bylo odsáto 300 μl kapaliny tak, aby buňky zůstaly stále pokryty tenkou vrstvou kapaliny. Jamky byly následně 3x promyty 200 μl PBS (pokojová teplota). Po posledním promytí bylo z jamek odsáto 200 μl PBS a ihned pipetováno 100 μl roztoku TrypleMAX vytemperovaného na 37°C. Jamky byly inkubovány za laboratorní teploty 8 minut.

Během inkubace byly připraveny 1,5ml zkumavky v množství odpovídajícímu počtu vzorků experimentu. Do zkumavek bylo následně pipetováno 100 μl chlazeného PBS. Mikrozkumavky byly následně umístěny na led.

Po 8 minutách byl stav buněk umístěných na mikrotitrační destičce zkontrolován pod mikroskopem (pokud disociace proběhla úspěšně, došlo k změně tvaru buněk z podlouhlého na zakulacený a buňky se nachází v různých rovinách roztoku). V dalším kroku byla jamka mikrotitrační destičky promíchána ruční pipetou a celý objem jamky byl přenesen do zkumavky umístěné na ledu. Jamka mikrotitrační destičky byla následně 2x promyta 100 μl PBS (vychlazené). Proplach byl přidán do stejné zkumavky, která byla nadále uchovávána na ledu.

Vzorek byl centrifugován 3 minuty při 200 x g. Supernatant byl odsán, peleta byla jemným poklepáním disociována a zkumavka byla umístěna zpět na led.

Po dokončení disociace všech jamek mikrotitrační destičky byl k jednotlivým vzorkům pipetován roztok enzymatické směsi Accutase v množství 100 mul/jedna jamka mikrotitrační destičky. V případě, že byl vzorek získán disociací 3 jamek mikrotitrační destičky, bude pipetovaný objem roztoku Accutase 300 μl/vzorek. Vzorky inkubujeme s občasným protřepáním při laboratorní teplotě 15 - 20 minut. Disociace ostrůvkových buněk je charakterizována mírným zakalením roztoku.

Během disociace ostrůvkových buněk byly připraveny nové 1ml zkumavky, do kterých byly vloženy 50μl filtry (*CellTricks Disposable Filters*). Filtry byly smočeny pomocí 200 μl roztoku s přídavkem azidu sodného a rybí želatiny (FACS roztok, složení viz. tabulka 17, strana 54). Po smočení filtru následovalo filtrování vzorků kvantitativním přenesením objemu mikrozkumavek na příslušné filtry. Zkumavky byly od vzorků propláchnuty 2 x 200 μl roztoku FACS. Proplach byl rovněž filtrován a přidán k objemu vzorku.

Zfiltrované vzorky byly centrifugovány při 2000 x g po dobu 2 minut. Ze vzorků

Tabulka 17 | | Tabulka složení pufru s přídavkem azidu sodného. Objemy reagencií uvedené v tabulce jsou třeba na přípravu roztoku o celkovém objemu 100 ml.

Reagencie	**Množství**
Azid sodný	10 μ/l
Želatina z kůže ryb žijících v chladné vodě	200 μl
PBS	95 ml

byl odsát supernatant a pelety byly resuspendovány v100 - 500 μl FACS roztoku. Vzorky byly následně rozpipetovány do jamek mikrotitrační destičky umístěné na ledu dle tabulky 18, strana 55. Každá zkumavka původně nesoucí vzorek byla 2x promyta 100 μl FACS roztoku a proplach byl přidán do příslušné jamky mikrotitrační destičky.

Mikrotitrační destička se vzorky byla centrifugována po dobu 2 minut (4°C) při 300 x g. Přítomnost pelety byla vizuálně ověřena, supernatant byl rychlým pohybem ruky odcáknut do umyvadla, destička byla osušena buničinou a pelety byly ve zbylé kapalině resuspendovány jemným vortexem. Do jamek mikrotitrační destičky se vzorky bylo následně pipetováno 100 μl PBS s přídavkem 1% BSA. Destička byla ihned centrifugována při 300 x g po dobu 2 minut (4°C).

Stejně jako v předchozím kroku došlo k vizuální kontrole přítomnosti pelety, odcáknutí supernatantu a jemného resuspendování pomocí vortexu. Do každé jamky mikrotitrační destičky se vzorkem bylo pipetováno 100 μl 4% formaldehydu vytemperovaného na pokojovou teplotu. Destička byla krátce promíchána pomocí vortexu a následně inkubována po dobu 20 minut na ledu.

Po uplynutí inkubační doby potřebné k fixaci bylo do jamek s fixačním činidlem pipetováno 200 μl PBS roztoku s 1% BSA. Mikrotitrační destička byla ihned centrifugována při 350 x g po dobu 2 minut (4°C). Supernatant byl odcáknut a pelety byly resuspendovány jemným vortexem. Od tohoto kroku byly vzorky zpracovávány při laboratorní teplotě.

Byl připraven permeabilizační roztok Saponin Perm-Wash smísením permeabilizačního pufru (*Termo Fisher Scientific*) a PBS s 1% BSA (složení viz. tabulka 19, strana 55). Permeabilizační roztok byl pipetován po 100 μl do všech jamek mikrotitrační destičky obsahujících vzorky. Mikrotitrační destička byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Permeabilizace byla ukončena centrifugací destičky při 350 x g po dobu 2 minut (4°C) s následným odcáknutím supernatantu a resuspendováním pelety jemným vortexem.

Tabulka 18 | Rozložení experimentu při přenosu vzorků rozvolněných ostrůvků ze zkumavek do sloupců a řad mikrotitrační destičky. *Buňky s názvem "Pozice"jsou ve formátu řada - sloupec*

Pozice	**Název vzorku**	**Charakterizace vzorku**
A-1	Negativní kontrola	Vzorek bez protilátky anti-insulin a bez detekce proliferace pomocí Click-IT EdU
A-2	Kontrola Click-iT EdU	Vzorek bez protilátky anti-insulin s detekcí proliferace Click-IT EdU
A-3	Kontrola anti-insulin	Vzorek s protilátkou anti-insulin a bez detekce proliferace pomocí ClickIT EdU
A-4	Funkční kontrola	Vzorek obsahující buňky Langerhansových ostrůvků bez transfekce IVT mRNA pro cykliny a CDK, vzorek s protilátkou anti-insulin a s detekcí proliferace Click-IT EdU
B-1 až B-x	Vzorek	Vzorek obsahující buňky Langerhansových ostrůvků s transfekovanou IVT mRNA pro cykliny a CDK, vzorek s protilátkou anti-insulin a s detekcí proliferace Click-IT EdU

Tabulka 19 | | Tabulka složení permeabilizačního roztoku pro průtokovou cytometrii. Objemy reagencií uvedené v tabulce jsou třeba na přípravu roztoku o celkovém objemu 100 ml.

Reagencie	**Množství**
PBS	95 ml
10X koncentrovaný permeabilizační pufr	5 ml

Během permeabilizační inkubace byl připraven Click-iT Plus reakční roztok dle

tabulky 20. Roztoky byly míchány v přesném pořadí, které udává sloupec "reagencie". Click-iT Plus reakční směs byla připravena ve dvou různých variantách - pro jamky mikrotitrační destičky A1 a A3 byla směs připravena bez přídavku fluorescenční barvičky Alexa Fluor Picolyl Azide (viz. tabulka 18, strana 55). Pro ostatní jamky byla směs připravena se všemi složkami uvedenými v tabulce 20. 1X koncentrovaný aditiv reakčního pufru byl připraven ředěním zásobního roztoku 10X koncentrovaného aditivu reakčního pufru v poměru 1:10 destilovanou vodou.

Tabulka 20 | Tabulka pro přípravu reakční směsi Click-iT Plus pro detekci proliferace v určitém počtu jamek mikrotitrační destičky. Všechny reagencie jsou součástí proliferačního kitu od Thermofisher Scientific.

Reagencie	**5 jamka**	**25 jamek**	**50 jamek**	**125 jamek**
1X koncentrovaný reakční pufr	440 μl	2,25 ml	4,4 ml	10,9 ml
Roztok obsahující Cu^{2+} ionty	10 μl	50 μl	100 μl	250 μl
AlexaFluor picolyl azid	1,2 μl	6 μl	12,5 μl	31 μl
Aditiv reakčního pufru	50 μl	250 μl	500 μl	1,25 ml
Celkový objem	500 μl	2,5 ml	5 ml	12,5 ml

Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 μl příslušného Click-iT Plus reakčního roztoku. Mikrotitrační destička byla inkubována po dobu 30 minut při laboratorní teplotě ve tmě.

Ihned po skončení inkubační doby bylo do jamek mikrotitrační destičky pipetováno 200 μl Saponin Perm-Wash a mikrotitrační destička byla centrifugována při 300 x g po dobu 2 minut. Po centrifugaci došlo k odcáknutí supernatantu, osušení jamek buničinou a resuspendování pelety jemným protřepáním na vortexu. Jamky mikrotitrační destičky byly následně stejným způsobem ještě 2x promyty 200 μl roztokem Saponin Perm-Wash.

Byl připraven blokovací roztok (2% roztok potkaního séra v roztoku Saponin Perm-Wash, potkaní sérum bylo připraveno v laboratoři dříve). Blokovací roztok byl pipetován do příslušných jamek mikrotitrační destičky v množství 50 μl / jamka. Mikrotitrační destička byla následně inkubována 15 minut ve tmě.

V mezičase byly naředěny primární a sekundární protilátky pro detekci insulinu následujícím způsobem: primární protilátka anti-insulin (ab181547, AbCam) byla ředěna pomocí roztoku Saponin Perm-Wash v poměru 1:66 (výsledná koncentrace

primární protilátky po jejím pipetování do jamek mikrotitrační destičky odpovídala 1:400); sekundární protilátka anti-insulin (oslí proti králičí protilátce, Alexa Fluor 555, Thermo Fisher Scientific) byla ředěna v poměru 1:500 pomocí roztoku Saponin-Perm/Wash.

Do jamek s blokovacím roztokem (mimo jamky A1 a A2) bylo pipetováno 10 μl primární protilátky anti-insulin. Jamky byly jemně promíchány za použití vortexu a destička byla inkubována po dobu 30 minut za laboratorní teploty ve tmě. Po inkubaci bylo do všech jamek pipetováno 200 μl roztoku Saponin Perm-Wash a destička byla centrifugována po dobu 2 minut při 350 x g. Supernatant byl odcáknut, jamky byly osušeny buničinou a pelety jemně resuspendovány na vortexu. Stejným způsobem byly jamky ještě 2x promyty pomocí 200 μl roztoku Saponin Perm-Wash, po každém promytí následovala centrifugace (2 minuty při 2200 x g), odcáknutí a resuspendování pelety.

Do jamek mikrotitrační destičky (mimo jamku A1) bylo pipetováno 50 μl sekundární protilátky Alexa Fluor 555. Mikrotitrační destička byla následně inkubována ve tmě po dobu 30 minut. Po inkubaci bylo do jamek destičky pipetováno 200 μl roztoku Saponin Perm-Wash. Následovala centrifugace po dobu 2 minut při 350 x g, odcáknutí supernatantu, osušení jamek buničinou a jemné resuspendování pelet pomocí vortexu. Všechny jamky byly stejným způsobem promyty 2x 350 μl roztoku Saponin Perm-Wash. Po každém promytí následovala centrifugace (2 minuty při 350 x g), osušení a resuspendování pelety.

Na průtokovou cytometrii (průtokový cytometr LSRII) byly buňky neseny bez přidání roztoku, aby nedošlo k přelití vzorků. Na místě bylo do jamek doplněno 150 - 200 μl roztoku Saponin Perm-Wash a bylo spuštěno měření.

Výstup průtokového cytometru byl zpracován za použití softwaru FlowJo™.

3.3.7 Purifikace a izolace buněčné RNA

Buněčná RNA byla izolována z ostrůvkových buněk, které byly transfekovány IVT mRNA pro cyklin CDT1A a CDK4 za účelem analýzy změny genové exprese oproti kontrolním buňkám bez přídavku IVT mRNA pro cykliny a CDK a kontrolním buňkám s přídavkem IVT mRNA kódující GFP protein (z angl. *Green Fluorescent Protein*). Kombinace IVT mRNA byla vybrána na základě výsledků z průtokové cytometrie, která určila nejpotentnější kombinaci v rámci navození proliferace β-buněk. Izolace celkové buněčné RNA probíhala za použití RNeasy Plus Micro Kitu (Qiagen), který zajišťuje odstranění genomické DNA (gDNA - z angl. *Genomic DNA*) a izolaci buněčné RNA na základě sorpce požadované nukleové kyseliny na afinitní náplň kolonek.

V prvním kroku byl stav adherovaných ostrůvkových buněk, již dříve transfekovaných mRNA pro cyklin D1TA a CDK4, zkontrolován pod mikroskopem. Následně

bylo pomocí ruční pipety do sucha odsáto kultivační CMRL medium s obsahem FBS. Do jamek mikrotitrační destičky bylo následně pipetováno 2 x 175 μl RLT roztoku (součást RNeasy Kitu, složení neznámé), které zajistí lýzu buněk adherovaných na dno jamek mikrotitrační destičky. Při každém přidání RLT roztoku byly jamky promíchány opakovaným stlačením pístu pipety do první polohy. Na konci tohoto kroku bylo ve všech jamkách mikrotitrační destičky 350 μl RLT roztoku.

Do čistých 2ml zkumavek, které jsou součástí kitu byly vloženy gDNA eliminační kolonky, kterými byl posléze filtrován lyzát buněk získaný z jamek mikrotitrační destičky pomocí centrifugace při 8000 x g (30 s). gDNA kolonky slouží k zachycení genomické DNA na základě elektrostatických interakcí. K tekutině, která byla zachycena 2ml zkumavkou bylo pipetováno 350 μl 70% ethanolu.

Roztok vzniklý smísením lyzátu buněk a 70% ethanolu byl filtrován skrze kolonky RNeasy spin column, které byly umístěny do čistých 2ml zkumavek. Kolonka RNeasy spin column slouží pro zachycení buněčné RNA na základě elektrostatických interakcí. Zkumavky s nasazenými kolonkami byly následně centrifugovány po dobu 30 sekund při 8000 x g. Centrifugační krok slouží k zajištění průchodu celého objemu tekutiny kolonkou a umožňuje zachycení RNA na kolonku.

RNeasy spin kolonka byla následně vložena do čisté 2ml zkumavky a promyta 700 μl RW1 pufru (součást RNeasy Kitu, složení neznámé). Poté byla kolonka společně se zkumavkou centrifugována po dobu 30 x sekund při 8000 x g.

RNeasy spin kolonka byla 2x promyta 500 μl RPE pufru (součást kitu, složení neznámé). Po prvním promytí byla kolonka centrifugována 30 sekund při 8000 x g, při druhém promytí centrifugace trvala 2 minuty při 8000 x g. Centrifugační krok je důležitý pro vymytí případných zbytkových objemů ethanolu, které by mohly interferovat s elucí RNA z kolonky. Pro dodatečné odstranění ethanolu byla kolonka s navázanou RNA umístěna na 5 minut do Thermomixéru při teplotě 50°C .

Kolonka RNeasy spoin byla přenesena do čisté 2ml zkumavky. Eluce RNA probíhala pomocí 20 μl vody pro eluci (součást RNeasy Kitu) a následnou centrifugací při 8000 x g po dobu 2 minut. Voda byla před elucí zahřáta na 60°C vtermosheakeru. Eluovaná RNA byla následně rozpipetována na alikvoty, označena a zmrazena pro budoucí použití.

3.3.8 Reverzní transkripce izolované buněčné mRNA

RNA izolovaná z ostrůvkových buněk byla přepsána do cDNA (komplementární DNA, z angl. *Complementary DNA*) pomocí reverzní transkripce. Reverzní transkripce využívá reverzní transkriptasu, která je schopná po rozeznání specifických oblastí RNA tvořit komplementární vlákno cDNA. Pro vyloučení ostatních buněčných RNA, které nenesou informaci o přepsaných genech (tedy tRNA a rRNA) bylo použito dvou typů primerů: *anchored-oligo(dT)18* a *random hexamer* primery.

Anchored-oligo(dT)18 primer obsahuje sekvenci 18 thymidinů a komplementárně váže polyA konec, který je speicfický pouze pro molekuly mRNA. *Random hexamer* primer nasedá na náhodné části mRNA, čímž zajišťuje nabohacení přepisované mRNA. Získaná cDNA je v dalším kroku amplifikována pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (viz. kapitola 3.3.9 na straně 60).

Vzorky byly zpracovávány ve sterilním prostředí laminárního boxu tak, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků RNAsami, které by mohly zapříčinit degradaci ribonukleové kyseliny. Před začátkem experimentu byla připravena směs primerů dle tabulky 21 v množství odpovídající počtu vzorků experimentu (počet vzorků odpovídá počtu vzorků, které byly transfekovány IVT mRNA, kontrolnímu vzorku bez transfekce mRNA a kontrolnímu vzorku s transfekovanou IVT mRNA pro GFP).

Tabulka 21 | Složení roztoku obsahující směs primerů pro metodu reverzní transkripce.

Reagencie	**Objem reagencie pro 1 vzorek**
Anchored-oligo(dT)-18 primer	2 μl
Random hexamer primer	2 μl
Voda pro PCR	2 μl

Reakční směs primerů byla následně rozpipetována po 6 μl do mikrozkumavek, jejichž počet odpovídá počtu vzorků (mikrozkumavky byly před tímto krokem patřičně označeny). K směsi primerů bylo následně pipetováno 20 μl příslušné izolované RNA (vzorek). Po každém přidání vzorku byla směs promíchána opakovaným stlačením ruční pipety.

Mikrozkumavky se směsí primerů a vzorků byly umístěny do termocykléru a zahřívány při 65°C po dobu 5 minut. Prvotní zahřívání na 65°C zajišťuje denaturaci vlásenkových struktur RNA a umožňuje snazší tvorbu heterodimeru RNA-primer.

Po době potřebné k denaturaci byly zkumavky umístěny na led. V nové sterilní mikrozkumavce byla připravena směs reverzní transkriptasy dle tabulky 22 (strana 60). Objem směsi s obsahem reverzní transkriptasy byl připraven vmnožství, které odpovídá počtu vzorků.

Do všech mikrozkumavek umístěných na ledu bylo pipetováno 14 μl směsi s reverzní transkriptasou. Mikrozkumavky byly inkubovány vThermocykléru po dobu 10 minut při 25°C a následně 30 minut při 55°C. Rozdílné inkubační teploty zajišťují nasednutí primerů na řetězce RNA a reverzní transkripci řetězce RNA do cDNA.

Pro inaktivaci reverzní transkriptasy byla na konci reverzní transkripce reakční směs zahřáta na 85°C po dobu 5 minut. Případné stále probíhající reakce byly zastaveny umístěním zkumavek na led.

Tabulka 22 | Složení roztoku s obsahem reverzní transkriptasy pro provedení reverzní transkripce.

Reagencie	Objem reagencie pro 1 vzorek
Reakční pufr	8 μl
Inhibitor RNAs	1 μl
Směs deoxyribonukleotidů	4 μl
Reverzní transkriptasa	1 μl

3.3.9 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

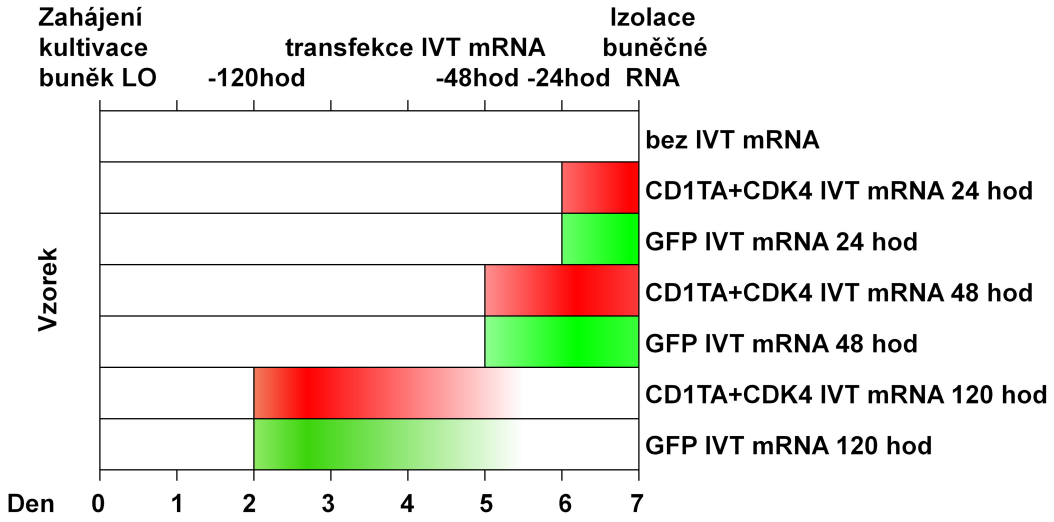
Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR, z angl. *Quantitative Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction* je laboratorní metoda vycházející z klasické polymerázové řetězové reakce (PCR, z angl. *Polymerase Chain Rection*. Podstatou PCR reakce (a také RT-PCR reakce) je amplifikace specifických úseků molekul DNA, které jsou jednoznačně určeny sadou primerů[18]. Reakce probíhá v cyklech, které zahrnují fáze lišící se v délce, teplotě a typu probíhající reakce. qRT-PCR se využívá při stanovování genové exprese, neboť je schopna podat přesnou informaci o množství vznikajícího buněčného transkriptu daného genu. Oproti klasické PCR reakci, která amplifikuje genetickou informaci uloženou v DNA, dochází u qRT-PCR reakce díky předcházející reverzní transkripci (jak bylo popsáno v kapitole 3.3.8, strana 58) k amplifikaci cDNA vzniklé z mRNA molekul buňky. Jedná se tedy o jasný důkaz o probíhající transkripci genů danou buňkou.

V první fázi qRT-PCR reakce dochází k postupnému zahřívání směsi templátové cDNA, primerů a dalších substrátů a enzymů stěžejních pro průběh reakce. Kvantifikace qRT-PCR reakce probíhá za pomoci fluorescenční barvičky, která je schopná interagovat se do vznikající dsDNA. V této práci bylo pro kvantifikaci využito fluorescenčního činidla SYBR Green, které po vazbě na dvouvláknovou molekulu DNA (dsDNA) výrazně zvyšuje svou fluorescenční intenzitu, která je následně detekována Thermocyklérem. Jako vnitřní standard byl použit β-aktin a HPRT. Výstup qRT-PCR byl vyhodnocován pomocí softwaru QuantStudio Real-Time PC Software v1.3.

V rámci pokusů byla sledována změna v genové expresi β-buněk vlivem IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 po 24, 48 a 120 hodinách. Experiment byl prováděn následujícím způsobem: v prvním kroku byly buňky kultivovány na povrchu jamek

[18]Sada primerů se skládá vždy z primeru komplementárního k počátku sekvence genu ve směru 3'-> 5' (FP, z angl. *Forward Primer*) a primeru komplementárního k počátku sekvence genu ve směru 5' -> 3' (RP z angl. *Reverse Primer)*

96-jamkové mikrotitrační destičky a rozděleny na 3 stejné díly; dva dny od počátku kultivace (tzv. čas minus 120h) byla první část buněk transfekována IVT mRNA pro CD1TA + CDK4, po 72h od první transfekce (tzv. čas minus 48h) došlo k transfekci pomocí IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 druhé skupiny buněk Langerhansových ostrůvků pomocí stejné kombinace IVT mRNA, po 96 hodinách od první transfekce, tedy 24h po druhé transfekci, (tzv. čas minus 24h) došlo k transfekci poslední části buněk Langerhansových ostrůvků (opět IVT mRNA pro CD1TA + CDK4). Kultivace buněk Langerhansových ostrůvků byla ukončena 24 hodin po transfekci poslední části buněk Langerhansových ostrůvků přítomných na 96-jamkové destičce. Z buněčného lyzátu byla izolována celková buněčná RNA, která byla dle postupů uvedených v rámci kapitoly 3.3.8 (strana 58) přepsána na molekuly cDNA, které byly následně analyzovány v rámci kvantitativní RT-PCR reakce diskutované v této kapitole. Schéma experimentu graficky znázorňuje obrázek 7.



Obrázek 7: Schéma transfekce buněk Langerhansových ostrůvků pomocí IVT mRNA pro CD1T286A + CDK4 a IVT mRNA pro GFP pro následnou genovou analýzu. LO = Langerhansovy ostrůvky. Podrobnější popis postupu experimentu naleznete v textu.

V prvním kroku byla připravena směs dvojice primerů PP-ZP (přední primer-zadní primer, převzato z angl. *Forward Primer* a *Reverse Primer*) pro daný gen (sekvence primerů uvádí tabulky 23 a 24 na stranách 63 - 64): do mikrozkumavky (počet mikrozkumavek je totožný s počtem analyzovaných genů) bylo pipetováno 0,6 μl PP, 0,6 μl ZP a 3,8 μl deklarované vody pro PCR reakce. Objem zkumavky byl několikrát promíchán opakovaným stlačením pístu ruční pipety. Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky o 348 jamkách bylo následně pipetováno 5 μl příslušného primer-mixu pro daný gen.

V dalším kroku byl připraven Master-Mix, jehož složky společně s objemy uvádí tabulka 26 (strana 65). V prvním kroku bylo v požadovaném množství v mikrozku-

mavce smícháno 2x koncentrovaný zásobní roztok FastStart Universal SYBR Green Master (obsahující fluorescenční činidlo SYBR Green, DNA polymerasu a reakční pufr) společně s deklarovanou vodou pro PCR reakce. Množství takto předpřipraveného Master-Mixu odpovídalo množství Master-Mixu, které je třeba připravit pro dvojnásobný počet vzorků (genová analýza se prováděla v duplikátech). Reagencie jsou součástí kitu *FastStart Universal SYBR Green Master* a jejich přesné složení není známé.

Do připraveného Master-Mixu bylo pipetováno 0,5 μl templátové cDNA vzorku připraveného reverzní transkripcí z buněčného lyzátu, který byl před decelularizací transfekován příslušnou kombinací IVT mRNA. Připravená směs byla několikrát promíchána opakovaným stlačením pístu ruční pipety a po 15 μl pipetována do příslušných řad mikrotitrační destičky obsahující směs FP-RP primerů. Výsledný objem každé jamky mikrotitarční destičky odpovídá 20 μl.

Mikrotitrační destička byla převrstvena plastovou membránou zamezující odpar vzorků a umístěna do Thermocykléru pro qPCR reakci (QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR, Thermo Fisher Scientific). Program termocykléru uvádí tabulka 27 na straně 65.

Tabulka 23 | Charakterizace primerů pro detekci genové exprese. Tabulka znázorňuje sekvence primerů ve směru 3'-> 5' (přední primer) a primerů ve směru 5'-> 3' (zadní primer)

Gen	Sekvence předního primeru	Sekvence zadního primeru
Abcc8	AGGAATGTGCCCTGGACCAAT	GGAACACAGGCGTGACGTAG
ActB	TATCGGCAATGAGCGGTTCC	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC
AurkB	CAGCTCCGCCGAGAGATCGAAAT	TGCATCCGCCCTTCAATCATCTC
Cdk1	AGTACGGCAATCCGGGAAATCTC	ATGAACTGGCCAGGAGGGATAGA
Cdk2	AGCCTTTGGAGTCCCTGTCCGTA	CCGAGCCCACTTGGGGAAACTTG
Cdk4	GTCTATGGTCTGGCCCGAAGCG	TACACCGTCCCATAGGCACCGA
Cdk6	AATCTGCCCAACCCATCGAGAA	GGTCCTCAGCCAGCAGTCTGTAA
CcnA1	CTGACCGTTCCAACCACCAACCA	GCTCACTCAGGCAAGGCACAATC
CcnA2	TAAACAGCCTGCCTTCACCATTC	ACTTCAACTAGCCAGTCCACAAG
CcnB1	GGATGTGCACCTGCCGAAGAATA	ACAACTGTCCTGCATGAACCGAT
CcnB2	TCCAGCCCACCAAAGCAATAAAT	TTGCAGAGCAAAGCATCAGAGAA
CcnE1	CCGTCTTGAATTGGGGCAATAG	TGGTGCAACTTTGGAGGGTAGAT
CcnE2	TCAGGAGACGTTCATCCAAATAGC	CAAAAGGCACCATCCAGTCTACAC
CcnD1	CAGATCATCCGCAAACATGCACA	GCGGATGCCACTACTTGGTGACT
CcnD2	TCACCCCTCACGACTTCATTGAG	ATGACGAACACGCCTCTCTCTTG
CcnD3	CTCAGACCTTTTTGGCCCTCTGT	CTGAGGGGGCCTGTCCCAAACTA
Cdkn1A	TGTCCGACCTGTTCCACACAGGA	CAATCGGCGCTTGGAGTGATAGA
Cdkn1B	CCTTCGACGCCAGACGTAAAC	GCAGATGGTTTAAGAGTGCCTAA
Cdkn1C	AATGCGAACGGTGCGATCAAGA	TCCGGTTCCTGCTACATGAATGA
Cdkn2A	GTCGTGCGGTATTTGCGGTATC	TCTCGCGTTGCCAGAAGTGAAG

Tabulka 24 | Charaketrizace primerů pro detekci genové exprese. Tabulka znázorňuje sekvence primerů ve směru 3'-> 5' (přední primer) a primerů ve směru 5'-> 3' (zadní primer)

Gen	Sekvence předního primeru	Sekvence zadního primeru
Cdkn2B	GCTCAGAGACGAGGCTGTAACAA	CGTGCAGATACCTCGCAATATCA
Cdkn2C	TTCTGCGAGACGGATGGAAAGTG	CCGGATTCCCAAGTTTCATAACCT
Cdkn2D	CACCGGTAGCCACTATGCTTCTG	AGAGCAACTGCTGGACTTCCAAA
FoxM1	ATCCAGTGGCTTGGAAAGATGAG	GCCTGGCTTGGCAATGTGCTTAA
Gcg	AGACCGTTTACATCGTGGCT	GGCAATGTTGTTCCGGTTCC
Gck	TGCCGAGATGCTCTTTGACTACA	GGGTTCGCTGAGCTTTCATCC
Hprt	ATGACCAGTCAACGGGGGACATA	CCAACAAAGTCTGGCCTGTATCC
Ins1	CCCTAAGTGACCAGCTACAATCAT	CGGGACTTGGGTGTGTAGAAG
Ins2	AAGTGACCAGCTACAGTCGG	ACCTCCAGTGCCAAGGTCTG
Kcnj11	CCAGGTGACCATTGGTTTCGG	GAGTGGTGTGGGCACTTTAACG
LdhA	CCCTGAAGTCTCTGAACCCGCA	GAAATGGGATGCACCCGCCTAA
NeuroD1	GGCTCCAGGGTTATGAGATCG	GCCAAGCGCAGTGTCTCTAT
Nkx2-2	ACCGAGGGCCTCCAATACTC	GGCACGTTTCATCTTGTAGCG
Nkx6-2	AGAGAGCACGCTTGGCCTATT	AATAGTAAAGCCGGGCGAGCA
Pax4	CAATCGAGTCCTTCGGGCAC	GCCCACGCTGGAACTCTTTC
Pcks1	CCTCCTAGCTCTAGTAAAGCAACC	TGTTGTTCCGCCCATATCAC
Pcks2	GCTATGCGTCAAGCATGTGG	CTCTCCTGGTTGCGTTGACT
Pdx1	TTCCCGAATGGAACCGAGACT	TCCACTTCATGCGACGGTTT
Sst	CCCCAGACTCCGTCAGTTTC	CGCAGGGTCTAGTTGAGCAT
Ucn3	CTAGAGCAAAGTCCTCTTACAGGGA	CCCCGGTCGTTTTTGACCTT

Tabulka 25 | Složení roztoku s obsahem roztoku "primer mix"pro detekci genové exprese pomocí qRT-PCR.

Reagencie	**Objem reagencie pro 1 vzorek**
Přední Primer	0,6 μl
Zadní Primer	0.6 μl
Voda určená pro PCR	3,8 μl

Tabulka 26 | Složení roztoku MASTER MIX pro jednu jamku mikrotitrační destičky (tj. jeden vzorek)

Reagencie	**Objem reagencie pro 1 vzorek**
FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)	10 μl
Voda určená pro PCR	4,5 μl
Templátová cDNA získaná reverzní transkripcí	0,5 μl

Tabulka 27 | Program qPCR reakce. Rychlost přechodu mezi teplotami vyjadřuje o kolik stupňů za sekundu bude docházet ke změně původní teploty. *Například: z 0°C na 50°C se bude teplota zvyšovat rychlostí 1,9°C/s; z 50°C na 95°C se bude teplota zvyšovat rychlostí 1,9°C; mezi přechodem mezi inkubační částí a PCR programem setrvá teplota na 95°C, poté se bude snižovat na teplotu 63°C rychlostí 1,6°C/s, ...*

Fáze, počet cyklů	**Čas, teplota**	**Rychlost přechodu mezi teplotami**
Inkubační fáze	140s, 50°C	1,9 °C / s
(1 cyklus)	10s, 95°C	1,9 °C / s
PCR fáze	15s, 95°C	1,9 °C / s
(42 cyklů)	30s, 63°C	1,6 °C / s
Analýza křivek tání (1 cyklus)	15s, 95°C	1,9 °C / s
	60s, 60°C	1,6 °C / s
	15s, 95°C	0,3 °C / s

3.3.10 Detekce poškození genomu β-buněk pomocí nepřímé imunofluorescence a detekce γH2AX

Jedna z hlavních signálních drah je v případě DSB tvorba γ-H2AX focci fosforylací specifického serinu histonu H2AX. γ-H2AX lze detekovat pomocí nepřímé imunofluorescence, která je založená na specifickém rozpoznání γ-H2AX histonu pomocí primární protilátky, která je následně rozpoznána specifickou 2° protilátkou obsahující fluorofor. Pokus byl prováděn na buňkách Langerhansových ostrůvků, jenž byly kultivovány v96-jamkové mikrotitrační destičce po *in vitro* transfekci syntetickými modifikovanými mRNA pro cyklin D1TA a cyklin dependentní kinasu 4. Pro zajištění vyšší čistoty experimentu byl pokus prováděn v laminárním boxu a k promývání mikrotitrační destičky byly používány sterilní roztoky.

Jako pozitivní kontrolní vzorek byly použity buňky Langerhansových ostrůvků, do jejichž média byl 2 dny před začátkem experimentu přidán etoposid (ETOP) ve výsledné koncentraci 30 μM. V den experimentu byl s předstihem rozmrazen 4% formaldehyd. Rozmrazení formaldehydu probíhalo za tmy, aby se předešlo jeho rozkladu vlivem světla.

Z jamek mikrotitrační destičky obsahující buňky Langerhansových ostrůvků bylo odsáto kultivační médium a ihned pipetováno 200 μl HBSS pufru s 1% přídavkem fetálního bovinního séra (FBS). Jamky byly následně 3x promyty proudem 200 μl HBSS. Vytvořením slabého proudu bylo zajištěno odmytí neadherovaných buněk.

HBSS pufr byl odsát (za zachování mikrofilmu na dně jamek) a do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 μl rozmrazeného 4% formaldehydu v PBS. Fixace probíhala po dobu 20 minut ve tmě a při laboratorní teplotě.

Tabulka 28 | Blokovací roztok zajišťující inhibici nespecifických vazeb 1° primární protilátky pro detekci insulinu a γ-H2AX focci

Reagencie	Objem reagencie na 1 jamku
Oslí sérum	5 μl
PBS s 0,1M glycinem a 0,05% obsahem TRITON-X 100	95 μl
Celkový objem	100 μl

Po době potřebné k fixaci byly jamky mikrotitrační destičky promyty 3 x 200 μl PBS. Do jamek bylo následně pipetováno 0,1% roztoku TRITON-X-100 (v PBS) v množství 100 μl / jamka. Permeabilizace probíhala 20 minut za laboratorní teploty. V mezičase byl připraven blokovací roztok dle tabulky 28 v dvojnásobném množství oproti počtu jamek mikrotitrační destičky s nasazenými buňkami. Blokovací roztok

byl kromě inhibice nespecifických interakcí primární protilátky využit také k ředění sekundární protilátky.

Po době potřebné k permeabilizaci byly jamky mikrotitrační destičky 3x promyty 200 μl PBS. Jamky nebyly mezi promýváními odsávány do sucha, ale vždy bylo na dně jamky ponecháno 50 - 60 μl roztoku, který chránil buňky před vysušením.

K blokaci nespecifické vazby 1° protilátky proti histonu γ-H2AX bylo použito 5% oslí sérum (ředěné promývacím roztokem, složení tabulka 28, strana 66). Do každé jamky mikrotitrační destičky (po odsátí) bylo pipetováno 100 μl 5% oslího séra v promývacím roztoku. Mikrotitrační destička byla následně inkubována při laboratorní teplotě po dobu 30 minut.

Jamky mikrotitrační destičky byly 3x promyty 200 μl PBS. Mezi promytími nebyly jamky odsávány do sucha, ale byl zachován mikrofilm přítomný na dně jamky.

1° protilátky byly ředěny roztokem určeným k ředění 1° protilátek (složení viz. tabulka 29. 1° protilátka proti insulinu (myší, Proteintech, 66198-1-Ig) byla ředěna výše zmíněným roztokem v poměru 1:150. 1° protilátka proti γ-H2AX (králičí, Cell-Signaling, 9718) byla ředěna stejným roztokem v poměru 1:300. Ředění protilátek shrnuje tabulka 30 (strana 68).

Jednokanálovou ruční pipetou byl odsát všechen roztok PBS (do sucha) a do jamek bylo ihned pipetováno 100 μl 1° protilátky. 1° protilátka byla s předstihem ředěna v roztoku pro ředění 1° protilátek (složení dle tabulky 29). Mikrotitrační destička byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě.

Tabulka 29 | Roztok určený k ředění 1° protilátky pro detekci insulinu

Reagencie	**Objem reagencie na 1 jamku**
BSA	1 g
Želatina z kůže ryb žijících v chladné vodě (z angl. *Cold water fish skin gelatin*)	200 μl
Triton X-100	500 μl
Azid sodný	10 μl
PBS	10 μl
Celkový objem	10 μl

V rámci experimentu byly použity dvě různé 2° protilátky: Alexa647 (oslí proti králičí, A31573, Life Technologies) pro detekci γ-H2AX a Alexa555 (oslí proti myší, A31570, Life Technologies) pro detekci insulinu. Obě 2° protilátky byly ředěny roztokem určeným k blokaci nespecifických vazeb (tzv. blokovací roztok, 5% oslí sérum

v promývacím roztoku) v poměru 1:600 (tzn. 1 μl 2° protilátky + 600 μl blokovacího roztoku). Před ředěním byly 2° protilátky centrifugovány při 13000 x g po dobu 1 minuty (4°C).

Tabulka 30 | Ředění primárních a sekundárních protilátek pro detekci γ-H2AX a insulinu pomocí nepřímé imunoflurescence v rámci detekce poškození genomu β-buněk.

1° protilátka	**Druh**	**Ředění**	**Dodavatel**	**Katalogové číslo**
Anti-insulin	Myší	1:150 (ředěno v Ab diluent)	Proteintech	66198-1-Ig
Anti-γH2AX	Králičí	1:300 (ředěno v Ab diluent)	CellSignaling	9718

2° protilátka	**Druh**	**Ředění**	**Dodavatel**	**Katalogové číslo**
Alexa555	oslí proti myší	1:600 (ředěno v B[19])	Life Technologies	A31570
Alexa647	oslí proti králičí	1:600 (ředěno v B[24])	Life Technologies	A31573

Po inkubaci buněk s 1° protilátkou byly všechny jamky mikrotitrační destičky 3x promyty 200 μl PBS. Jamky nebyly odsávány do sucha, ale pouze natolik, aby byl zachován meniskus přibližně 50 μl na dně jamky. Po dokončení promývání byl jednokanálovou pipetou odsát všechen roztok PBS (do sucha) a do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 μl předem naředěné 2° protilátky dle tabulky 30. Mikrotitrační destička byla inkubována při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 60 minut (alternativně při 37°C ve tmě po dobu 30 minut).

Po inkubaci vzorků se 2° protilátkou byly všechny jamky mikrotitrační destičky 3x promyty 200 μl PBS. Jamky nebyly odsávány do sucha, ale byl vždy zachován přibližně 50 μl meniskus na dně jamky mikrotitrační destičky. Po promytí vzorků od 2° protilátky byl z jamek mikrotitrační destičky odsát roztok PBS (za současného zachování menisku) a do každé jamky bylo pipetováno 100 μl DAPI ředěné v PBS (1 kapka DAPI na 0,5 ml PBS). Mikrotitrační destička byla následně inkubována ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 5 minut.

[19]B = blokovací roztok

Po uplynutí inkubační doby potřebné pro nabarvení jader buněk byly jamky mikrotitrační destičky 3x promyty 200 μl PBS. Následně byly jamky mikrotitrační destičky znovu 3x promyty 200 μl PBS, avšak po každém přidání roztoku PBS následovala 5 minutová inkubace za tmy a laboratorní teploty.

Po dokončení promývání byly jamky mikrotitrační destičky po jedné do sucha odsáty a do jamky bylo ihned pipetováno 80 μl roztoku Dabco-Mowiol v glycerolu. Roztok Dabco-Mowiol nesmí bublat jinak hrozí defekt fluorescenčních snímků. Dabco je třeba rozmrazit v lednici ideálně 1 den před plánovaným experimentem a pro eliminaci vzniku bublin jej před použitím centrifugovat na 13000 x g po dobu 2 minut za laboratorní teploty.

Detekce sekundárních protilátek byla prováděna pomocí fluorescenční mikroskopie. Jádra buněk značená DAPI se na fluorescenčních snímcích zobrazují modrou pseudobarvou (excitační spektrum = $357 \pm 22nm$, emisní spektrum = $447 \pm 30nm$). Buňky obsahující fosforylovaný histon H2AX jsou značeny fluoroforem AlexaFluor647 (absorpční spektrum $635 \pm 10nm$, emisní spektrum $692 \pm 20nm$), který poskytuje na fluorescenčních snímcích zelenou pseudobarvu. Insulin je značen pomocí fluoroforu AlexaFluor555 (absorpční spektrum $542 \pm 10nm$, emisní spektrum $593 \pm 20nm$) a na fluorescenčních snímcích je zobrazován červenou pseudobarvou.

3.3.11 Detekce poškození genomu β-buněk pomocí metody TUNEL

Metoda TUNEL (z angl. *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling*) je imunochemická metoda založená na detekci fragmentace genomu pomocí značení 3'-OH hydroxylové skupiny DNA specifickou značkou, kterou je možno vizualizovat pomocí Click-iT reakce. TUNEL assay je využívána pro detekci apoptotických buněk a pozitivita buněk souvisí s množstvím dvouvláknových zlomů DNA. V prvním kroku TUNEL assaye dochází za pomoci specifického enzymu k navázání modifikovaného nukleotidu, odvozeného od dUTP, na 3'-OH konec fragmentované DNA. Modifikovaný nukleotid je v případě Click-iT Plus TUNEL metody modifikován pomocí alkynové skupiny. Alkynová skupina následně interaguje s azidovou skupinou fluoroforu AlexaFluor (AF) za katalýzy měďnatými kationty. Fluorofor tak jasně označuje 3'-OH konce fragmentované DNA a lze ho vizualizovat pomocí fluorescenční mikroskopie. Všechny použité reagencie v rámci toho experimentu jsou součástí soupravy reagencií *Click-iT Plus TUNEL assay kit* od výrobce Thermo Fisher Scientific, C10619.

Jako pozitivní kontrolní vzorek byly použity buňky Langerhansových ostrůvků, do jejichž média byla 2 dny před barvením přidána směs cytokinů IFN-γ + TNFα. Koncentrace IFN-γ odpovídala 250 ng/ml (1250 jednotek/ml), koncentrace TNF-α byla koncentraci 50 ng/ml (5000 jednotek/ml). Jako superpozitivní kontrolní vzorek byly použity buňky Langerhansových ostrůvků, do jejichž média byla během TUNEL

Tabulka 31 | Tabulka pro přípravu zásobního roztoku TUNEL Mix pro detekci apoptosy za použití fluoroforu Alexa Fluor 647 (AF647). Zbylý roztok, který není v rámci experimentu použit, lze zamrazit a uchovávat při teplotě nižší než -20°C po dobu maximálně 6 měsíců.

Reagencie	**Objem reagencie**
1X Click-iT Plus TUNEL Pufr	2625 μl
Roztok obsahující Cu^{2+}	67 μl
AlexaFluor picolyl azide	8,3 μl
Celkový objem	2,7 ml

assaye přidána deoxyribonukleasa (postup dále v textu).

Reagencie byly před použitím vytemperovány na pokojovou teplotu. Následně byl připraven reakční pufr smísením komponentu D (10x koncentrovaný reakční pufr, součást kitu) s deionizovanou vodou v poměru 1:9. Následně byl na základě tabulky 31 připraven pracovní roztok TUNEL Mix. Jednotlivé reagencie je třeba mísit ve stejném pořadí jako jsou uvedeny v rámci sloupečku "reagencie".

Dále byl připraven zásobní roztok 100x koncentrovaného aditivu reakčního pufru smísením 2 ml deionizované vody s 400 mg aditivu v pevné formě (součást soupravy reagencií *Click-iT Plus TUNEL assay kit)*. Vzniklý zásobní roztok byl následně ředěn v poměru 1:9 v potřebném množství deionizované vody.

Jamky mikrotitrační destičky byly 3x důkladně promyty 200 μl HBSS s přídavkem 1% FBS. Po prvním promytí byly jamky mikrotitrační destičky odsáty do sucha, při druhém promývání bylo na dně jamek zachováno malé množství roztoku odpovídající 50 - 60 μl roztoku.

Po třetím promytí byl odsát všechen HBSS pufr a do jamek bylo pipetováno po 100 μl 4% formaldehydu (formaldehyd byl s předstihem temperován na laboratorní teplotu, temperování probíhalo za tmy). Buňky byly fixovány po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby potřebné k fixaci bylo z jamek odsáto fixační činidlo (za zachování menisku) a jamky byly 3x promyty 200 μl PBS.

Po posledním promytí byly jamky odsáty do sucha a do každé jamky bylo pipetováno 100 μl 0,25% Triton-X 100 (v PBS). Permeabilizace probíhala 20 minut za laboratorní teploty. Poté byly jamky 3x promyty 200 μl PBS. Při promývání byl roztok vždy odsát tak, aby zůstal zachovaný meniskus na dně jamky a buňky se tak neocitly na suchu. Po posledním promytí nedošlo k odsátí PBS.

Ve vzorku pozitivní kontroly byly vyvolány dvouvláknové zlomy DNA pomocí DNasy (TURBO DNasa, AM2238). Jamka pozitivní kontroly byla po fixaci a permeabilizaci odsáta do sucha. Do jamky bylo poté pipetováno 100 μl 100x zředěné

Tabulka 32 | Tabulka pro přípravu TdT reakční směsi pro detekci apoptosy v určitém počtu jamek (vzorků) mikrotitrační destičky.

Reagencie	1 jamka	5 jamek	10 jamek	25 jamek
TdT reakční pufr	47 μl	225 μl	480 μl	1 125 μl
EdUTP	1 μl	5 μl	10 μl	25 μl
TdT enzym	2 μl	10 μl	20 μl	50 μl
Celkový objem	50 μl	250 μl	500 μl	1250 μl

TURBO-DNasy v pufru pro TURBO-DNasu (koncentrace před ředěním = 2 U/μl) a mikrotitrační destička byla inkubována po dobu 30 minut při 37°C. Po inkubaci byla jamka pozitivní kontroly 3x promyta 200 μl PBS. V dalších krocích postupu se pracovalo již se všemi jamkami mikrotitrační destičky, které obsahují vzorky.

Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 μl TdT reakčního pufru (reakční pufr obsahující terminální deoxyribonukleotidyl transferasu, převzato z angl. *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*) tak, aby roztok rovnoměrně pokryl dno jamky. Mikrotitrační destička byla následně inkubována po dobu 10 minut při 37°C. Mezitím byla dle tabulky 32 připravena TdT reakční směs. Aby se předešlo nespecifickému signálu, byla TdT reakční směs ředěna v poměru 1:4 s TdT reakčním pufrem.

Po 10 minutách inkubace byly jamky mikrotitrační destičky odsáty do sucha. Ihned poté bylo do každé jamky pipetováno 50 μl TdT reakční směsi připravené v předchozím kroku. Mikrotitrační destička byla následně inkubována po dobu 60 minut při 37°C.

Po inkubaci byly jamky mikrotitrační destičky 5x promyty 200 μl 3% BSA (v PBS, připraveno v předstihu rozpuštěním požadovaného množství pevného BSA

Tabulka 33 | Tabulka pro přípravu Click-iT Plus TUNEL Supermix pro určitý počet jamek (vzorků) mikrotitrační destičky

Reagencie	1 jamka	5 jamek	10 jamek	25 jamek
Click-iT Plus TUNEL mix	45 μl	225 μl	450 μl	1 125 μl
10x konc. Click-iT Plus TUNEL aditiv reakčního pufru	5 μl	25 μl	50 μl	125 μl
Celkový objem	50 μl	250 μl	500 μl	1250 μl

v PBS). Po každém přidání 3% roztoku BSA byly jamky inkubovány za laboratorní teploty po dobu 3 minut.

Byl připraven Click-iT Plus TUNEL Supermix dle tabulky 33. Reagencie je třeba míchat v pořadí, které uvádí sloupeček "reagencie". Po smísení všech složek supermixu byl roztok promíchán pomocí vortexu. Aditiv reakčního pufru byl připraven ředěním 100x koncentrovaného zásobního roztoku v poměru 1:10 deionizovanou vodou. Aditiv reakčního pufru byl připraven v den experimentu.

Jamky mikrotitrační destičky byly odsáty do sucha a do jamek bylo ihned pipetováno 50 μl Click-iT Plus TUNEL Supermixu. Mikrotitrační destička byla následně inkubována ve tmě po dobu 30 minut při 37°C.

Po uplynutí inkubační doby byly jamky 3x promyty 3% roztokem BSA v PBS. Po každém přidání 3% roztoku BSA následovala 3 minutová inkubace za laboratorní teploty. Pro blokaci nespecifických vazeb primární protilátky bylo použito 5% oslí sérum v promývacím roztoku (složení viz. tabulka 34). Do každé jamky bylo pipetováno 100μl blokovacího roztoku. Mikrotitrační destička byla následně inkubována po dobu 30 minut ve tmě.

Tabulka 34 | Blokovací roztok zajišťující inhibici nespecifických vazeb 1° primární protilátky pro detekci insulinu v rámci metody TUNEL

Reagencie	**Objem reagencie na 1 jamku**
Oslí s0rum	5 μl
PBS s 0,1M glycinem a 0,05% obsahem TRITON-X 100	95 μl
Celkový objem	100 μl

Dle tabulky 35 (strana 73) byly naředěny 1° a 2° protilátky proti insulinu. 1° protilátka proti insulinu (myší, Proteintech, 66198-1-Ig) byla ředěna roztokem určeným k ředění 1° protilátek (Ab diluent, připraveno v laboratoři) v poměru 1:150. 2° protilátka (Alexa555 oslí proti myší, Life Technologies) byla ředěna v poměru 1:600 pomocí roztoku použitého k blokaci nespecifických vazeb (blokovací roztok, 5% oslí sérum v promívacím roztoku).

Jamky mikrotitrační destičky byly odsáty do sucha. Do jamek bylo následně pipetováno 100 μl ředěné 1° protilátky proti insulinu. Mikrotitrační destička byla inkubována po dobu 30 minut při 37°C. Po inkubaci byly jamky mikrotitrační destičky 3x promyty 200 μl PBS. Mezi promytími byly jamky odsávány tak, aby na dně jamky zůstalo přibližně 50 μl tekutiny a buňky tak nebyly vystaveny suchu. Po dokončení promývání byly jamky odsány do sucha a ke každému vzorku bylo pipetováno 100 μl ředěné sekundární protilátky. Mikrotitrační destička byla následně

inkubována při laboratorní teplotě po dobu 60 minut ve tmě.

Tabulka 35 | Ředění primárních a sekundárních protilátek pro detekci insulinu pomocí nepřímé imunoflurescence v rámci detekce apoptosy β-buněk.

1° protilátka	**Druh**	**Ředění**	**Dodavatel**	**Katalogové číslo**
Anti-insulin	králičí	1:150 (ředěno v Ab diluent)	AbCam	181547

2° protilátka	**Druh**	**Ředění**	**Dodavatel**	**Katalogové číslo**
AlexaFluor555	oslí proti králičí	1:600 (ředěno v B[20])	Life Technologies	A31572

Po uplynutí inkubační doby potřebné pro nabarvení jader buněk byly jamky mikrotitrační destičky 3x promyty 200 μl PBS. Následně byly jamky mikrotitrační destičky znovu 3x promyty 200 μl PBS, avšak po každém přidání roztoku PBS následovala 5 minutová inkubace za laboratorní teploty.

Po dokončení promývání byly jamky mikrotitrační destičky po jedné do sucha odsáty a do jamky bylo ihned pipetováno 80 μl roztoku Dabco-Mowiol v glycerolu. Roztok Dabco-Mowiol nesmí bublat jinak hrozí defekt fluorescenčních snímků. Dabco je třeba rozmrazit v lednici ideálně 1 den před plánovaným experimentem a před použitím jej centrifugovat na 13000 x g při laboratorní teplotě po dobu 2 minut.

Detekce sekundárních protilátek byla prováděna pomocí fluorescenční mikroskopie. Jádra buněk značená DAPI se na fluorescenčních snímcích zobrazují modrou pseudobarvou (excitační spektrum = $357 \pm 22nm$, emisní spektrum = $447 \pm 30nm$). Buňky s poškozenou DNA jsou označeny fluoroforem AlexaFluor647 (absorpční spektrum $635 \pm 10nm$, emisní spektrum $692 \pm 20nm$), který poskytuje na fluorescenčních snímcích zelenou pseudobarvu. Insulin je značen pomocí fluoroforu AlexaFluor555 (absorpční spektrum $542 \pm 10nm$, emisní spektrum $593 \pm 20nm$) a na fluorescenčních snímcích je zobrazován červenou pseudobarvou.

[20]B = blokovací roztok, 5% oslí sérum v promývacím roztoku

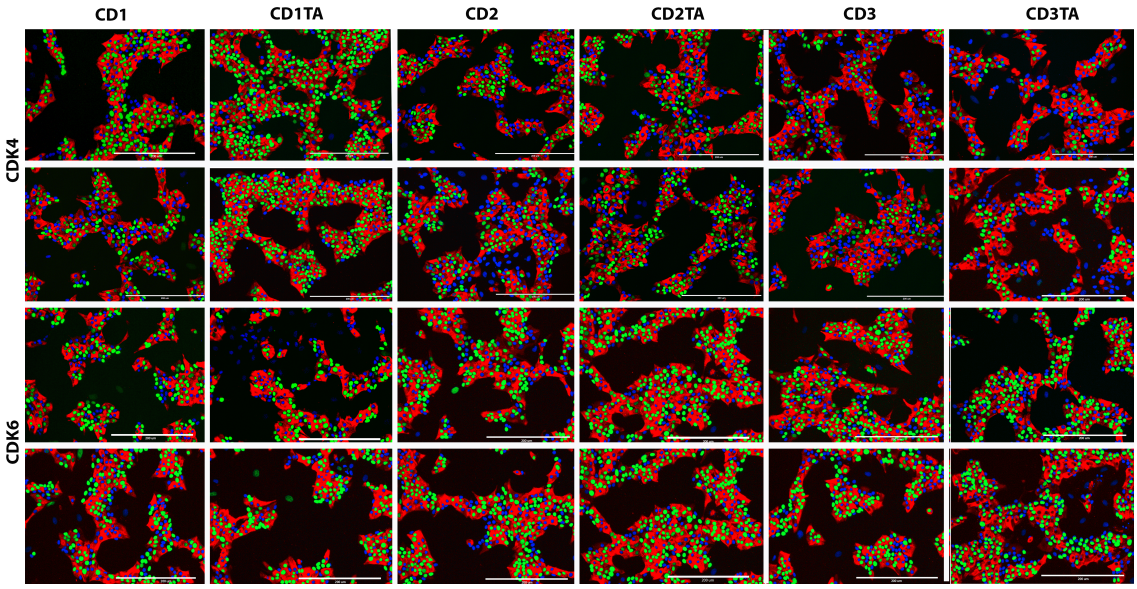
4 VÝSLEDKY

4.1 Detekce proliferace na základě nepřímé imunofluorescence

4.1.1 Stanovení míry proliferace β-buněk transfekovaných IVT mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy

Změny v proliferaci β-buněk byly sledovány po jejich transfekci IVT mRNA (*in vitro* transkribovaná mRNA) pro cykliny rodiny D (D1, D2 a D3), včetně cíleně mutovaných forem cyklinů rodiny D (D1 T286A, D2 T288A, D3 T283A), v kombinaci s IVT mRNA pro cyklin dependentní kinasy 4 a 6. Mutace cyklinů rodiny D spočívala v záměně aminokyseliny threonin (T) na příslušné pozici polypeptidového řetězce za aminokyselinu alanin (A). V důsledku této záměny došlo k deleci akceptorového místa fosfátové skupiny, které se podílí na procesu ubikvintinylace a prodloužení poločasu rozpadu proteinu [149]. Výběr konkrétní mutované aminokyseliny v peptidovém řetězci cyklinu byl založen na dříve publikovaných studiích na toto téma. Messengerové RNA kódující výše zmíněné cykliny a cyklin dependentní kinasy byly pro účely této práce připraveny v laboratoři již dříve.

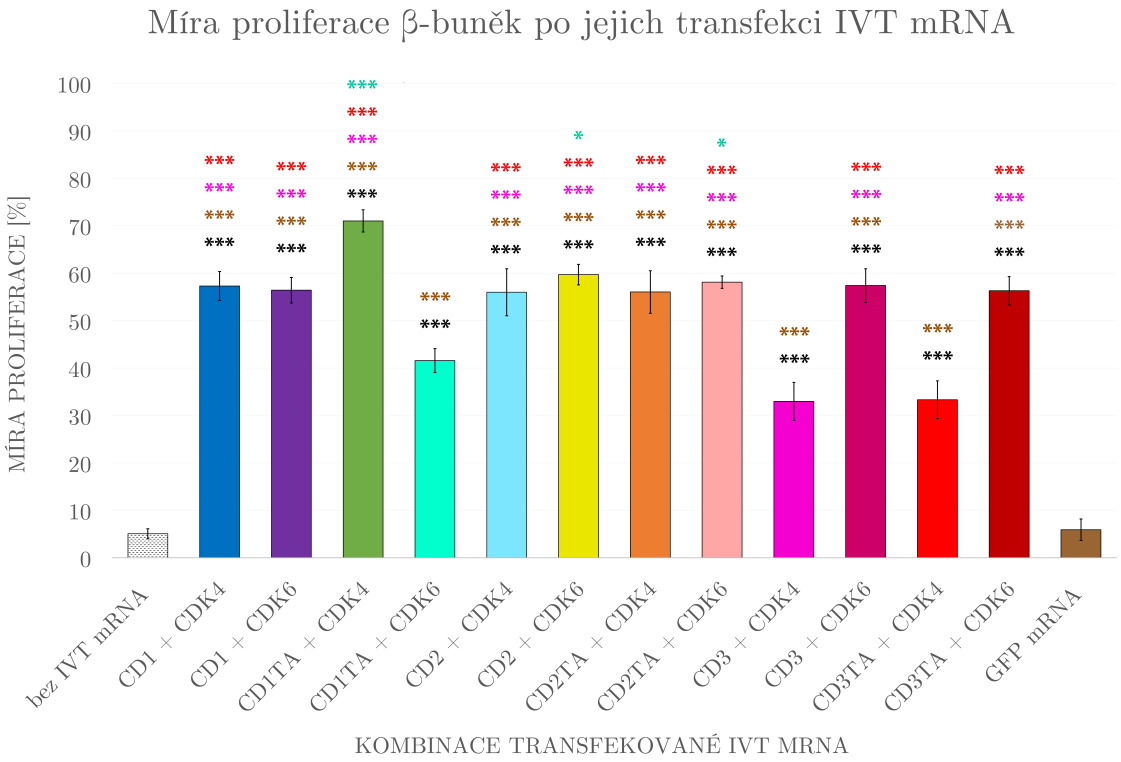
Míra proliferace β-buněk po jejich transfekci IVT mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy byla detekována pomocí nepřímé imunofluorescence. K výpočtu počtu proliferujících β-buněk byla použita rovnice z obrázku 9 (strana 76).



Obrázek 8: Souhrn fluorescenčních snímků testování vlivu různých kombinací IVT mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy na proliferaci buněk Langerhansových ostrůvků se speciálním zaměřením na β-buňky. Zeleně jsou značeny proliferující buňky (EdU pozitivní). Modře jsou značena buněčná jádra (DAPI). Červeně je značena přítomnost insulinu. Za β-buňky lze považovat takové buňky, jejichž jádra jsou ze všech stran obklopena insulinem. Měřítko každého snímku má rozměr 200 μm.

$$MP = \frac{0,5 EdU^{+} Ins^{+}}{0,5 EdU^{+} Ins^{+} \; + \; EdU^{-} Ins^{+}} \cdot 100$$

Obrázek 9: | Rovnice pro výpočet míry proliferace β-buněk přítomných ve vzorku. $EdU^{+}Ins^{+}$ odpovídá počtu pozitivních β-buněk na proliferační marker EdU, které byly detekovány pomocí průtokové cytometrie. $EdU^{-}Ins^{+}$ odpovídá počtu negativních β-buněk na proliferační marker EdU. Výpočet předpokládá, že nejvyšší možný počet buněčných cyklů jakékoliv β-buňky je po transfekci vzorku IVT mRNA pro danou kombinaci cyklinu a cyklin dependentní kinasy roven jedné (tedy každá β-buňka může nejvýše projít jedním buněčným cyklem, který končí dělením). Výsledná míra proliferace vychází v procentech.



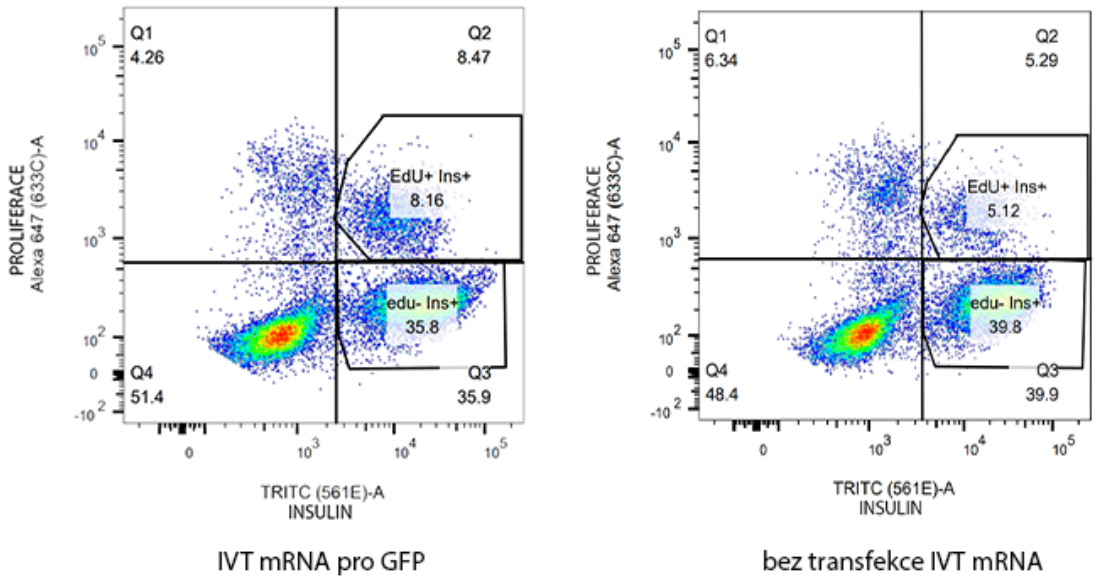
Graf 1: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD + CDK na proliferaci β-buněk Langerhansových ostrůvků. Nejvyšší míra proliferace β-buněk nastala po transfekci IVT mRNA pro kombinaci mutovaného cyklinu CD1TA a CDK4. Nejnižší míra proliferace byla pozorována u β-buněk transfekovaných IVT mRNA pro cyklin D3 a CDK4. Pro vyloučení případných pro-proliferačních účinků samotné IVT mRNA byla testována také transfekce IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (také GFP, z angl. *Green Fluorescent Protein*). Výsledek této transfekce neposkytl statisticky významný rozdíl oproti kontrolnímu vzorku. Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. Statistická významnost vzorků vůči vzorku transfekovanému IVT mRNA pro GFP je značena hnědými hvězdičkami. Statistická významnost vzorků vůči vzorku transfekovanému IVT mRNA pro CD3 + CDK4 je značena fialovými hvězdičkami. Statistická významnost vzorků vůči vzorku s transfekovanou IVT mRNA pro CD1TA + CDK6 je značena světle zelenými hvězdičkami. Statistická významnost vzorků vůči vzorku s transfekovanou IVT mRNA pro CD3TA + CDK4 je značena červenými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4.

Hlavní metodou analýzy proliferace β-buněk byla průtoková cytometrie. Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí softwaru GraphPrism za použití jednofaktorového ANOVA testu s Tukey post hoc analýzou. na základě výsledků z průtokové cytometrie byla pro další experimenty zvolena kombinace IVT mRNA

pro cyklin a cyklin dependentní kinasu, která po transfekci potencovala nejvyšší nárůst proliferace β-buněk. Touto kombinací byla IVT mRNA pro mutovaný cyklin D1 (D1 T286A, dále jako CD1TA) a cyklin dependentní kinasu 4 (CDK4).

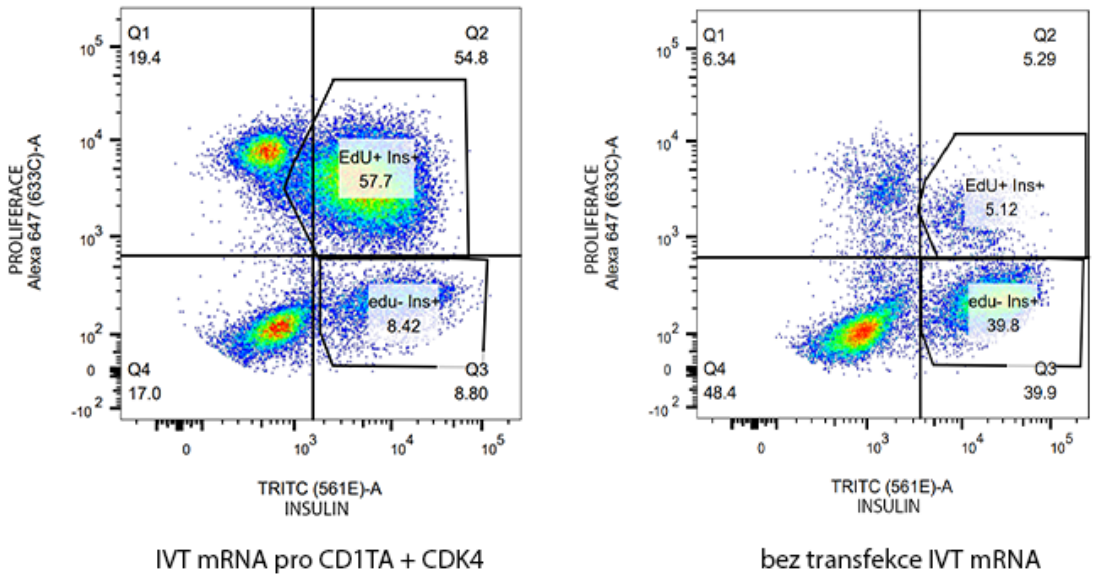
Výsledky konzistentní s tímto zjištěním poskytly také předchozí analýzy imunofluorescenčních snímků, jež byly založeny na sčítání β-buněk, pozitivních a negativních na přítomnost znaku proliferace EdU, přímo z fluorescenčních snímků (výsledky nejsou součástí této práce). Souhrn fluorescenčních snímků je zobrazen na obrázku 8 (strana 73). Souhrn výsledků z průtokové cytometrie včetně statistických dat znázorňuje graf 1 (strana 76).

Pro vyloučení vlivu syntetické mRNA na proliferaci β-buněk byla společně s IVT mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy testována také IVT mRNA kódující zelený fluorescenční protein (GFP). Transfekce IVT mRNA pro GFP probíhala za stejných podmínek jako transfekce buněk pomocí IVT mRNA kódující cykliny a cyklin dependentní kinasy. Proliferace β-buněk Langerhansových ostrůvků transfekovaných IVT mRNA pro GFP nebyla oproti kontrolnímu vzorku nijak statisticky významná. Proliferující β-buňky, které byly transfekovány IVT mRNA pro GFP tvořily 4,9 % z celkového množství β-buněk. V kontrolním vzorku proliferovalo 5,1 % ze všech přítomných β-buněk. Výsledky proliferace β-buněk pro zmíněné vzorky jsou shrnuty na obrázku 10.



Obrázek 10: Výsledky průtokové cytometrie pro buňky transfekované IVT mRNA kódující zelený fluorescenční protein (GFP, vlevo) a buňky bez jakékoliv transfekované IVT mRNA (vpravo). Proliferující β-buňky se nachází v II. kvadrantu (Q2), neproliferující β-buňky se nachází v III. kvadrantu (Q3). Ostatní kvadranty náleží dalším buněčným typům Langerhansových ostrůvků.

Všechny kombinace IVT mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy (tak, jak je uvedeno v souhrnném grafu 1, strana 76) zajistili zvýšení míry proliferace β-buněk, které bylo statisticky významné oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT



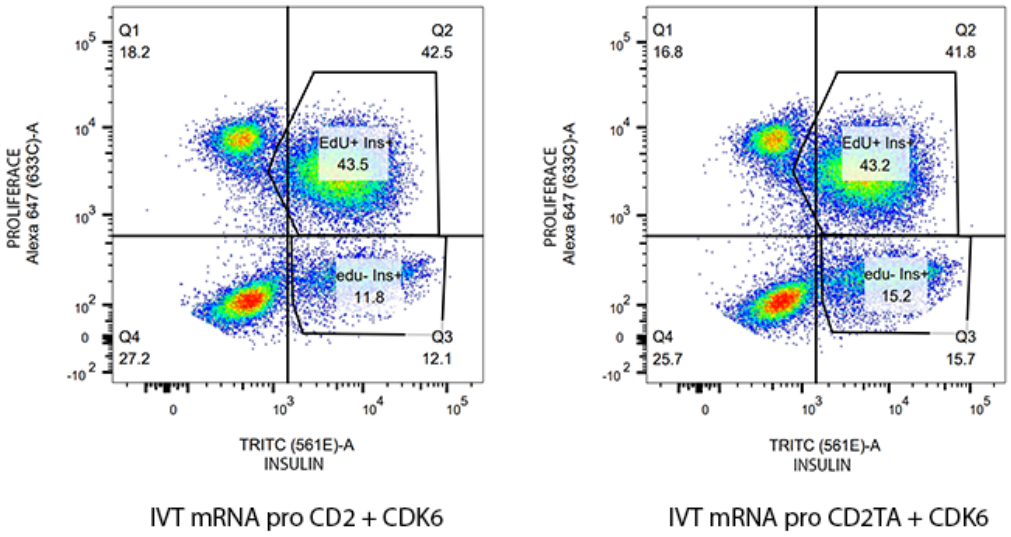
Obrázek 11: Výsledky průtokové cytometrie pro kombinaci IVT mRNA, která nejvíce potencuje zvýšení proliferace potkaních β-buněk (CD1TA + CDK4, vpravo) a buněk bez transfekované IVT mRNA (vlevo). Proliferující β-buňky se nachází v II. kvadrantu (Q2), neproliferující β-buňky se nachází v III. kvadrantu (Q3).

mRNA. Vzorek transfekovaný IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byl navíc statisticky významný na hladině významnosti $p \leq 0,0001$ také v porovnání se vzorky, jež byly transfekovány IVT mRNA pro CD1TA + CDK6, CD3 + CDK4 a CD3TA + CDK4.

Vzorek transfekovaný IVT mRNA pro mutovaný cyklin D1 (CD1TA) a cyklin dependentní kinasu 4 (CDK4) zároveň zajistil nejvyšší nárůst proliferace pankreatických β-buněk oproti kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA. IVT mRNA pro CD1TA a CDK4 zvýšila proliferaci β-buněk v průměru 13,8 krát oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA, který vykazoval 5,1 % proliferujících β-buněk (vzorek transfekovaný IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 vykazoval 70,26 % proliferujících β-buněk). Výsledky průtokové cytometrie jsou zobrazeny na obrázku 11.

Kombinace IVT mRNA, které po transfekci ve srovnání s kontrolou zhruba 12 krát zvýšily proliferaci β-buněk shrnuje obrázek 12 (strana 79). Transfekcí IVT mRNA pro kombinaci cyklinu D2 a cyklin dependentní kinasy 6 (CD2 + CDK6) bylo dosaženo 11,7 násobného zvýšení míry proliferace β-buněk Langerhansových ostrůvků oproti kontrolnímu vzorku (59,7 % proliferujících β-buněk ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD2 + CDK6, 5,1 % proliferujících β-buněk ve vzorku bez transfekované IVT mRNA). Tento výsledek byl v rámci měření druhým nejvyšším výsledkem v rámci ovlivnění proliferace β-buněk.

Transfekce IVT mRNA pro mutovaný cyklin D2 a cyklin dependentní kinasu 6 (CD2TA + CDK6) zajistila 11,4 násobný nárůst proliferace β-buněk oproti kontrolnímu vzorku. Vzorek po transfekci IVT mRNA pro CD2TA + CDK6 vykazoval



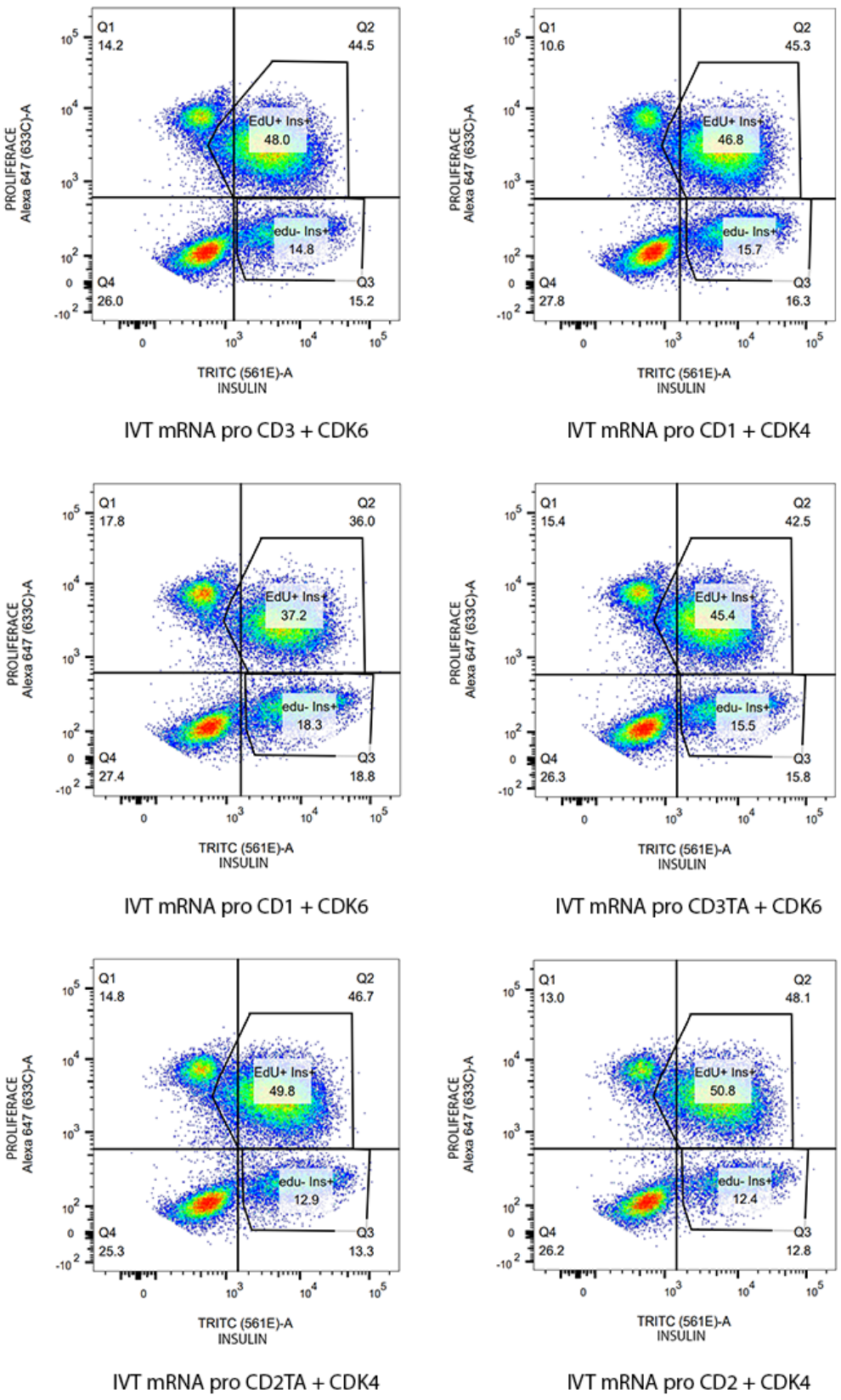
Obrázek 12: Výsledky průtokové cytometrie kombinací IVT mRNA, které zajistily zhruba dvanáctinásobné zvýšení míry proliferace β-buněk Langerhansových ostrůvků oproti kontrolnímu vzorku bez trans transfekované IVT mRNA. Výstupy z průtokové cytometrie jsou řazeny v pořadí, ve kterém jednotlivé kombinace IVT mRNA potencovaly proliferaci β-buněk. Jako první je řazen výsledek s nejvyšší stimulací proliferace β-buněk. Proliferující β-buňky se nachází v II. kvadrantu (Q2), neproliferující β-buňky se nachází v III. kvadrantu (Q3).

58,1 % β-buněčnou proliferaci, kontrolní vzorek bez přidané IVT mRNA vykazoval 5,1 % proliferaci β-buněk.

Výsledky průtokové cytometrie pro kombinace IVT mRNA, které po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků zajistily jedenáctinásobné zvýšení proliferace pankreatických β-buněk (oproti míře proliferace kontrolního vzorku bez IVT mRNA) shrnuje obrázek 13 na straně 80. Kombinacemi IVT mRNA byly IVT mRNA pro cyklin D3 v kombinaci s cyklin dependentní kinasou 6 (CD3 + CDK6), IVT mRNA pro cyklin D1 v kombinaci s cyklin dependentní kinasou 4 (CD1 + CDK4), IVT mRNA pro cyklin D1 v kombinaci s cyklin dependentní kinasou 6 (CD1 + CDK6), IVT mRNA pro mutovanou formu cyklinu D3 v kombinaci s cyklin dependentní kinasou 6 (CD3TA + CDK6), IVT mRNA pro mutovanou formu cyklinu D2 v kombinaci s cyklin dependentní kinasou 4 (CD2TA + CDK4) a IVT mRNA pro cyklin D2 v kombinaci CD2 + CDK4 (řazeno dle klesající míry proliferace vzorků po transfekci).

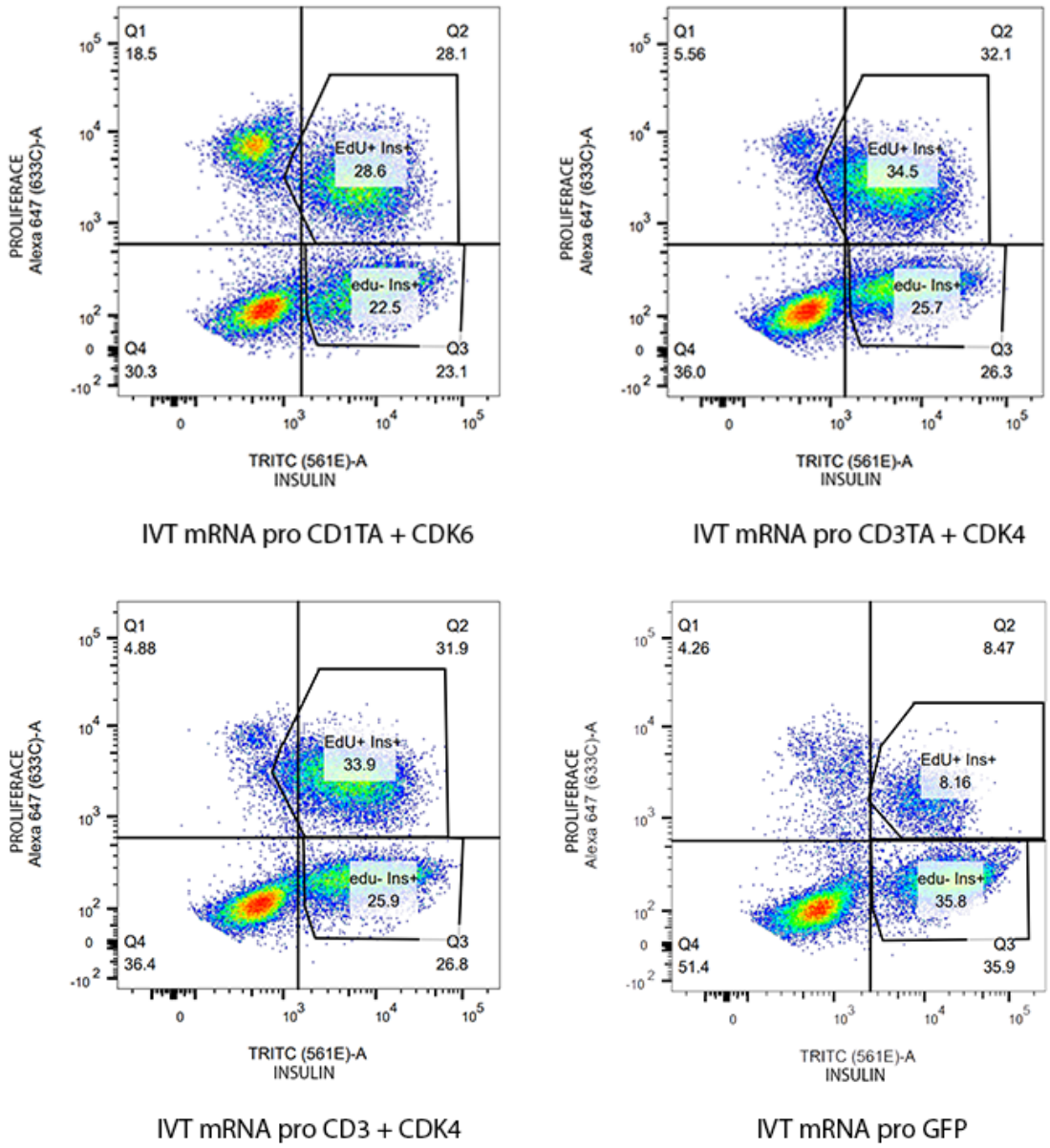
Všechny zmíněné kombinace zajistily jedenáctinásobný nárůst míry proliferace v porovnání s kontrolním vzorkem bez transfekované mRNA. Vzorky se liší v procentuálním zastoupení proliferujících β-buněk, avšak tyto odlišnosti jsou pouze minimální.

Vzorek transfekovaný kombinací IVT mRNA pro cyklin D3 a cyklin dependentní kinasu 6 (CD3 + CDK6) vykazoval 57,4 % proliferujících β-buněk. Vzorek transfekovaný IVT mRNA pro cyklin D1 a cyklin dependentní kinasu 4 (CD1 + CDK4)



Obrázek 13: Výsledky průtokové cytometrie kombinací IVT mRNA, které zajistily zhruba jedenáctinásobné zvýšení proliferaci β-buněk Langerhansových ostrůvků oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované mRNA. Výstupy z průtokové cytometrie jsou řazeny v pořadí, ve kterém jednotlivé kombinace IVT mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy potencovaly proliferaci β-buněk. Jako první je řazen výsledek s nejvyšší stimulací proliferace. Proliferující β-buňky se nachází v II. kvadrantu (Q2), neproliferující β-buňky se nachází v III. kvadrantu (Q3).

vykazoval 57,3 % proliferujících β-buněk. Vzorek transfekovaný IVT mRNA pro cyklin D1 a cyklin dependentní kinasu 6 (CD1 + CDK6) vykazoval 56,4 % proliferujících β-buněk. Vzorek s transfekcí VIT mRNA pro mutovaný cyklin D3 a cyklin dependentní kinasu 6 (CD3TA + CDK6) vykazoval 56,3 % proliferaci β-buněk. Vzorky transfekované IVT mRNA pro mutovanou formu cyklinu D2 v kombinaci s cyklin dependentní kinasou 4 (CD2TA + CDK4) a cyklinem D2 v kombinaci s cyklin dependentní kinasou 4 (CD2 + CDK4) vykazovaly shodně 56 % proliferujících β-



Obrázek 14: Výsledky z průtokové cytometrie pro kombinace IVT mRNA, které zajistily méně než desetinásobné zvýšení míry proliferace pankreatických β-buněk. Kombinace IVT mRNA pro cyklin D3 a CDK4 potencovala nejnižší zvýšení míry proliferace (oproti kontrolní skupině) ze všech testovaných kombinací IVT mRNA. Obrázky jsou řazeny dle klesající míry proliferace po transfekci příslušnými IVT mRNA. Proliferující β-buňky se nachází v II. kvadrantu (Q2), neproliferující β-buňky se nachází v III. kvadrantu (Q3).

buněk. Kontrolní vzorek, který neobsahoval žádnou IVT mRNA vykazoval 5,1 % proliferujících β-buněk.

Kombinace IVT mRNA, které po transfekci zvýšily proliferaci β-buněk méně než 10 krát jsou vyobrazeny na obrázku 14 (strana 81). Jedná se o kombinace IVT mRNA kódující mutovanou formu cyklinu D1 v kombinaci s cyklin dependentní kinasou 6 (CD1TA + CDK6), mutovanou formu cyklinu D3 v kombinaci s cyklin dependentní kinasou 4 (CD3TA + CDK4), cyklin D3 v kombinaci s cyklin dependentní kinasou 4 (CD3 + CDK4) a IVT pro mRNA kódující zelený fluorescenční protein (GFP). IVT mRNA pro CD1TA + CDK6 po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků zvýšila proliferaci 8,2 krát oproti kontrolnímu vzorku bez transfekce IVT mRNA (41,6 % proliferujících β-buněk ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK6, 5,1 % proliferujících β-buněk bez transfekované IVT mRNA). Transfekce IVT mRNA pro CD3TA + CDK4 zvýšila proliferaci β-buněk 6,5 krát (33,3 % proliferujících
β-buněk po transfekci IVT mRNA pro CD3TA + CDK4, 5,1 % proliferujících β-buněk ve vzorku bez transfekované IVT mRNA).

Nejnižší míra β-buněčné proliferace byla pozorována po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro cyklin D3 v kombinaci s cyklin dependentní kinasou 4. Tato kombinace vykazovala pouze 6,5 krát vyšší proliferaci β-buněk Langerhansových ostrůvků než bylo pozorováno v kontrolním vzorku (33,0 % proliferujících β-buněk ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD3 + CDK4, 5,1 % proliferujících β-buněk v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA).

4.2 Analýza genové exprese buněk Langerhansových ostrůvků na základě kvantitativní PCR

Pro analýzu změn v genové expresi v průběhu IVT mRNA stimulované proliferace bylo využito kvantitativní PCR reakce s reverzní transkripcí. Na základě výsledků průtokové cytometrie byly analýze genové exprese podrobeny pouze vzorky transfekované IVT mRNA pro mutovanou formu cyklinu D1 a cyklin dependentní kinasu 4 (CD1TA + CDK4), neboť tato kombinace IVT mRNA zajišťuje nejvyšší míru proliferace
β-buněk. IVT mRNA pro CD1TA a CDK4 tak má nejvyšší možnost terapeutického uplatnění.

U buněk transfekovaných CD1TA a CDK4 bylo analyzováno celkem 39 genů, které byly rozděleny do 6 skupin, které shrnují tabulky 36 a 37 na stranách 84 a 85. Jako vnitřní standard byly vybrány dva geny se stabilní expresí - β-aktin a hypoxantinfosforibosyltransferasa (Hprt).

Pro vyloučení případného vlivu IVT mRNA na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byla genová exprese uvedených genů testována také v rámci vzorku transfekovaného IVT mRNA pro GFP. Transfekce IVT mRNA do buněk Langerhansových ostrůvků pro GFP probíhala ve stejných časech a za stejných podmínek jako transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4. Žádný z výsledků transfekce IVT mRNA pro GFP do buněk Langerhansových ostrůvků, s výjimkou zvýšení exprese genu pro CDK6 24 hodin po transfekci, neposkytl statisticky významný výsledek oproti kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí jednofaktorového ANOVA testu s Tukey post hoc analýzou, grafy byly vytvořeny v programu GraphPrism.

Charakterizace primerů

Tabulka 36 | Charakterizace primerů pro detekci genové exprese. Tabulka znázorňuje názvy genů a jejich rozřazení do skupin dle jejich úlohy v buňce. Pro význam příslušných zkratek nahlédněte, prosím, do kapitoly Seznam zkratek.

Skupina genů	Produkt genu	Zkratka
Aktivátory buněčného cyklu	Aurora Kinasa B	AurkB
	Cyklin Dependentní Kinasa 1	CDK1
	Cyklin Dependentní Kinasa 2	CDK2
	Cyklin Dependentní Kinasa 4	CDK4
	Cyklin Dependentní Kinasa 6	CDK6
	Cyklin A1	CcnA1
	Cyklin A2	CcnA2
	Cyklin B1	CcnB1
	Cyklin B2	CcnB2
	Cyklin E1	CcnE1
	Cyklin E2	CcnE2
	Cyklin D1	CcnD1
	Cyklin D2	CcnD2
	Cyklin D3	CcnD3
	Pozitivní regulátor proliferace	FoxM1
Tumor supresorové geny	CDK Inhibitor 1A (p21)	Cdkn1A
	CDK Inhibitor 1B (p27)	Cdkn1B
	CDK Inhibitor 1C (p57)	Cdkn1C
	CDK Inhibitor 2A (p16)	Cdkn2A
	CDK Ihnibitor 2B (p15)	Cdkn2B
	CDK Inhibitor 2C (p18)	Cdkn2C
	CDK Inhibitor 2D (p19)	Cdkn2D

Tabulka 37 | Charakterizace primerů pro detekci genové exprese. Tabulka znázorňuje názvy genů a jejich rozřazení do skupin dle jejich úlohy v buňce. Pro význam příslušných zkratek nahlédněte, prosím, do kapitoly Seznam zkratek.

Skupina genů	**Produkt genu/ funkce TF**	**Zkratka**
Transkripční faktory β-buněk	Regulace exprese genů pro insulin	NeuroD1
	Regulace exprese genů pro insulin	MafA
	Diferenciace progenitorů β-buněk	Nkx2-2
	Diferenciace progenitorů β-buněk	Nkx6-1
	Regulace funkce dospělých β-buněk	Pax4
	Regulace exprese genů pro insulin a represe α-buněčných genů	Pdx1
Funkce β-buněk	ABC transportér	Abcc8
	Glukokinasa	Gck
	Draslíkový kanál, Kir6.2	Kcnj11
	Laktátdehydrogenasa A	LdhA
	Proproteinkonvertasa, typ 1	Pcsk1
	Proproteinkonvertasa, typ 2	Pcsk2
	Urokortin III	Ucn3
Panreatické hormony	Insulin 1	Ins1
	Insulin 2	Ins2
	Glukagon	Gcg
	Somatostatin	Sst
Geny se stabilní expresí	Aktin β	Actb
	Hypoxanthinfosforibosyltransferasa 1	Hprt

4.2.1 Genová analýza aktivátorů buněčného cyklu

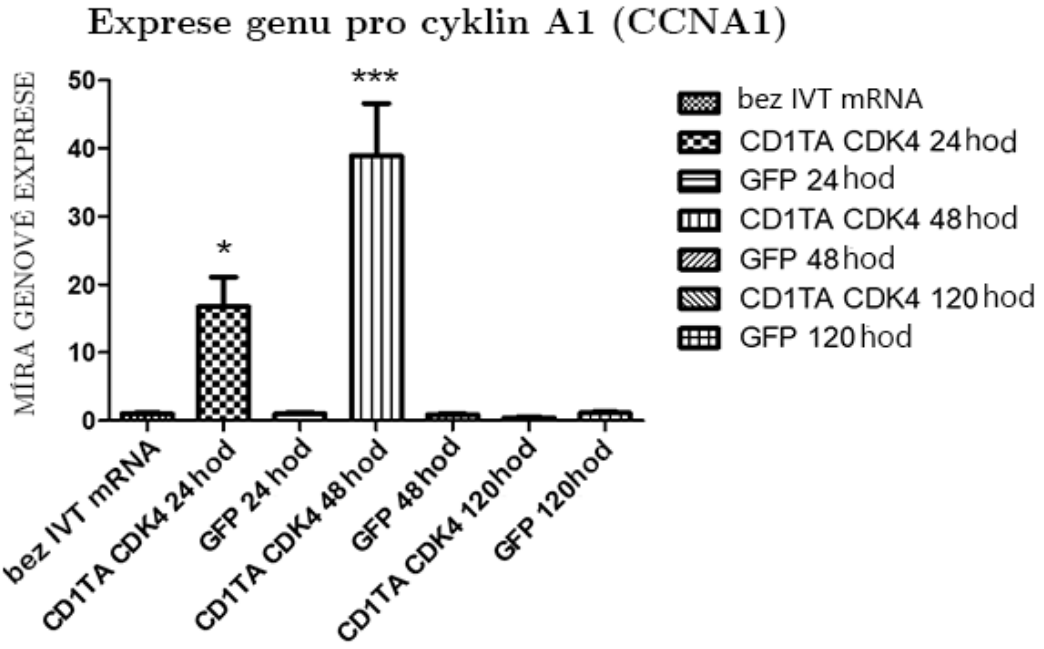
V rámci detekce změn genové exprese aktivátorů buněčného cyklu bylo analyzováno celkem 15 genů, kterými byly jednotlivé izoformy časných cyklinů (cykliny rodiny D - CCND, cykliny rodiny E - CCNE), jednotlivé izoformy pozdních cyklinů (cykliny rodiny A - CCNA) a jednotlivé izoformy cyklinů podílejících se na průběhu mitosy (cyklin rodiny B - CCNB). Dále byla stanovována exprese s cykliny asociovanými kinasami - cyklin dependentí kinasa 1 (CDK1), cyklin depnendentní kinasa 2 (CDK2), cyklin dependentní kinasa 4 (CDK4) a cyklin dependentní kinasa 6 (CDK6). Ve spojení s mitosou byla sledována také změna exprese genu pro auroru kinasu B (AurkB), která se společně s cykliny rodiny B a CDK1 účastní mnoha procesů spojených s karyokinesí a cytokinesí. V rámci této kategorie byla sledována také změna exprese genu pro transkripční faktor forkheadové rodiny M1 (FoxM1), který zajišťuje regulaci β-buněčné proliferace.

Míra exprese vzorku negativní kontroly (buňky Langerhansových ostrůvků bez transfekované IVT mRNA pro CD1TA + CDK4) byla v rámci analýzy označena jako 100 %, neboli 1. Výsledky získané z měření byly následně vztahovány k vzorku negativní kontroly jako její násobky.

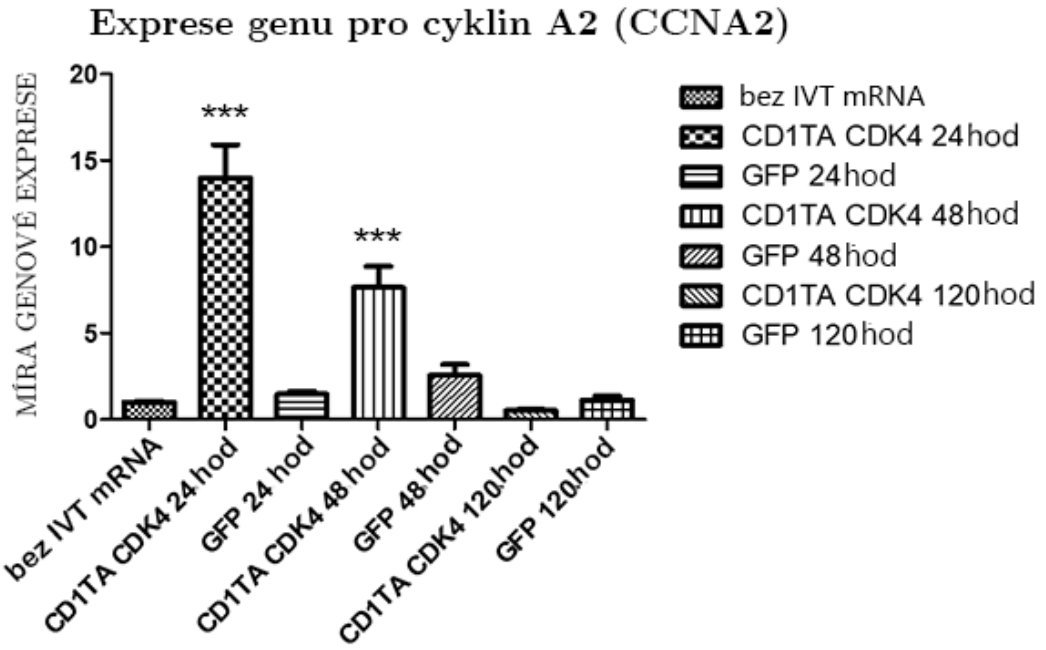
Na základě výsledků qRT-PCR je obecným trendem zvýšení exprese aktivátorů buněčného cyklu buňkami Langerhansových ostrůvků 24 a 48 hodin po transfekci pomocí IVT mRNA pro mutovaný cyklin D1 a cyklin dependentní kinasu 4 (CD1TA + CDK4), které po 120 hodinách od transfekce následuje normalizaci na nižší, či přibližně stejnou hodnotu jako vzorek negativní kontroly (buňky Langerhansových ostrůvků bez transfekované IVT mRNA). Tento trend se přitom netýká časných cyklinů a cyklin dependentních kinas, které vykazují 24, 48 i 120 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 stabilní, či lehce nižší expresi.

Změny v expresi genů pro cykliny rodiny A

Exprese cyklinu A1 (také CCNA1) vzrostla po 24 hodinách od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 16,8 krát oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA. Po 48 hodinách od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k nárůstu exprese cyklinu A1 o dalších 113 % oproti 24 hodinové expresi. Exprese cyklinu A1 byla po 48 hodinách od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 38,9 krát vyšší než exprese genu pro cyklin A1 v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA. 120 hodin od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k poklesu exprese genu pro cyklin A1, který byl v tento čas exprimován 86 krát méně oproti expresi po 48 hodinách od transfekce. Vzorek transfekovaný IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 vykazoval po 120 hodinách od transfekce pouze 45 % expresi oproti vzorku negativní kontroly, které byla v rámci analýzy přidělena hodnota 100 %.



Graf 2: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi cyklinu A1 buněk Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.



Graf 3: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi cyklinu A2 buněk Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

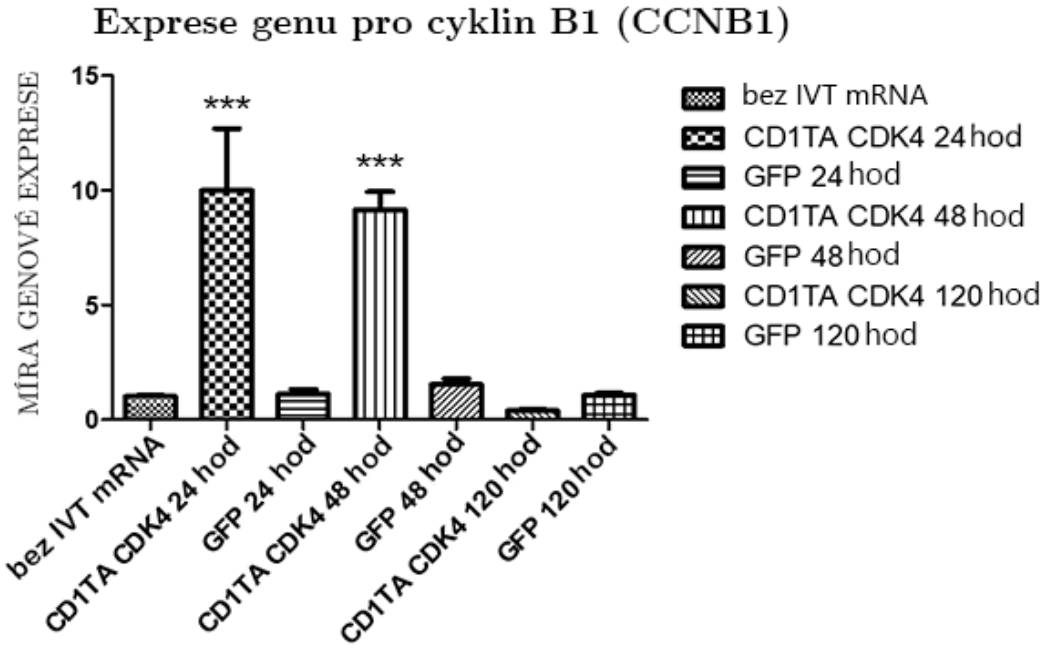
Výsledky genové exprese cyklinu A1 shrnuje graf 2 na straně 87.

Exprese cyklinu A2 (také CCNA2) vzrostla po 24 hodinách od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 v průměru 14 krát oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA. Po 48 hodinách od transfekce danou kombinací IVT mRNA došlo k mírnému poklesu (oproti 24 hodinové expresi) v expresi genu pro cyklin A2. 48 hodin po transfekci byla exprese cyklin A2 7,6 krát vyšší než negativní kontrolní vzorek. 120 hodin po transfekci došlo k dalšímu poklesu v expresi genu pro cyklin A2 na přibližně stejnou hodnotu jako v případě cyklinu A1. V tento čas byla exprese cyklinu A2 pouze poloviční oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA pro CD1TA + CDK4.

Výsledky genové exprese cyklinu A2 shrnuje graf 3 na straně 87.

Změny v expresi genů pro cykliny rodiny B

Exprese cyklinu B1 (také CCNB1) vzrostla oproti kontrolnímu vzorku po 24 hodinách od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 desetkrát. Přibližně stejný nárůst exprese oproti kontrolnímu vzorku byl detekován také 48 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 (po 48 hodinách od transfekce vzrostla exprese cyklinu B1 9 krát oproti kontrolnímu vzorku). Po 120 hodinách od transfekce IVT



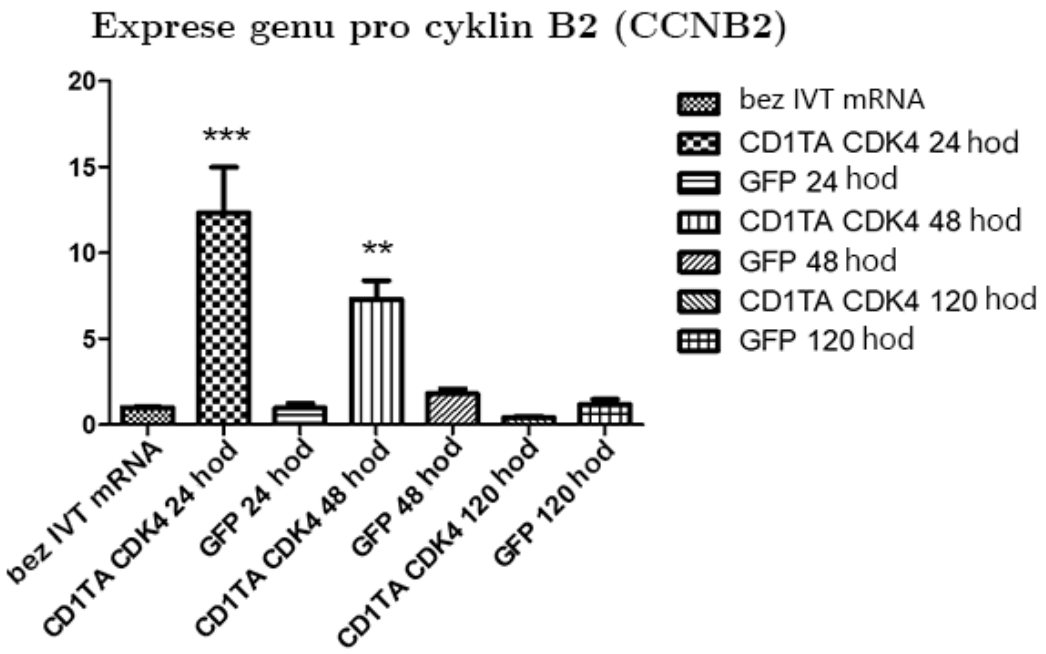
Graf 4: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi cyklinu B1 buněk Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k výraznému poklesu exprese genu pro cyklin B1. Exprese cyklinu B1 klesla na 40 % hodnoty, která byla naměřena u kontrolního vzorku buněk Langerhansových ostrůvků bez transfekované IVT mRNA.

Výsledky genové exprese cyklinu B1 shrnuje graf 4 na straně 88.

Exprese genu pro cyklin B2 (také CCNB2) dosáhla 24 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 12,3 násobné hodnoty v porovnání s kontrolním vzorkem bez transfekované IVT mRNA. Po 48 hodinách od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k mírnému poklesu míry exprese genu pro cyklin B2 (oproti expresi po 24 hodinách od transfekce). Vzorek transfekovaný IVT mRNA vykazoval po 48 hodinách 7,3 krát vyšší expresi cyklinu B2 oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA. Po 120 hodinách od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo, stejně jako v případě cyklinu B1, k výraznému poklesu v míře exprese cyklinu B2 a to na hodnotu, která odpovídala 42 % hodnoty kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA.

Výsledky genové exprese cyklinu B2 shrnuje graf 5.



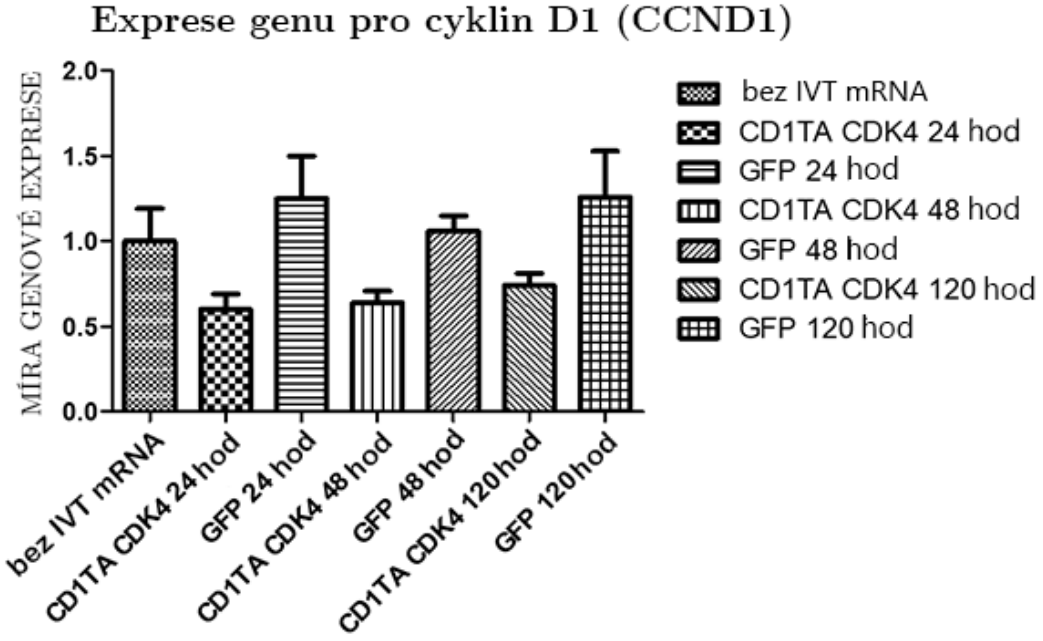
Graf 5: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi cyklinu B2 buněk Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Změny v expresi genů pro cykliny rodiny D

Změny v expresi cyklinu D1 byly v období 24, 48 a 120 hodin po transfekci pouze minimální. 24 hodin po transfekci odpovídala míra exprese cyklinu D1 ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 60% expresi naměřené v kontrol-

ním vzorku. 48 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 odpovídala míra exprese cyklinu D1 v transfekovaném vzorku 63% expresi naměřené v kontrolním vzorku. 120 hodin o transfekci danou kombinací IVT mRNA odpovídala míra exprese cyklinu D1 v transfekovaném vzorku 73 % míry exprese naměřené v kontrolním vzorku. Míra exprese v žádném z měření neposkytla statisticky významné rozdíly oproti kontrolnímu vzorku.

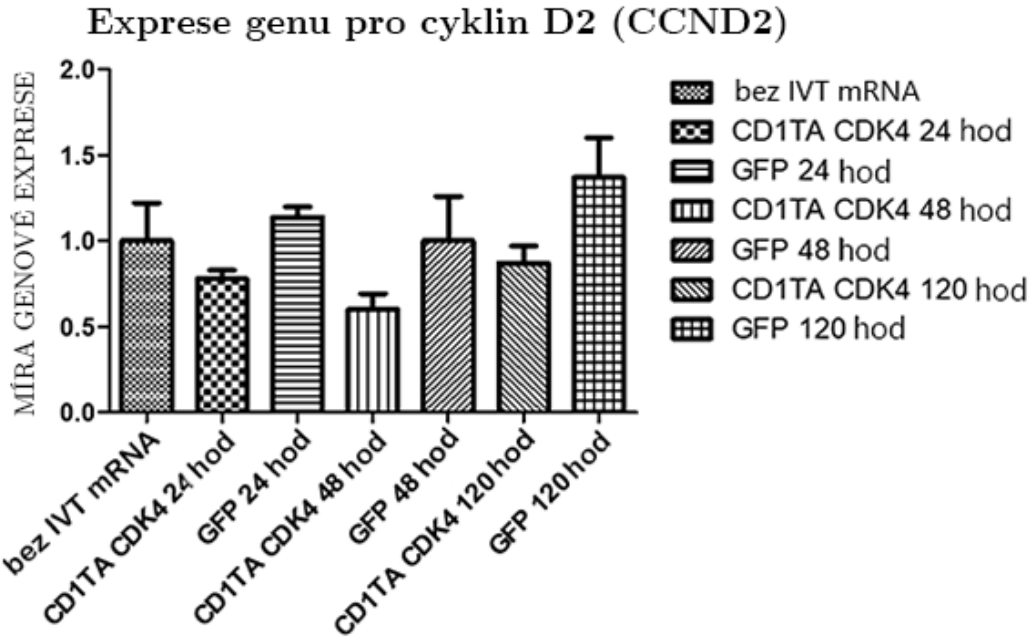
Výsledky genové exprese cyklinu D1 shrnuje graf 6.



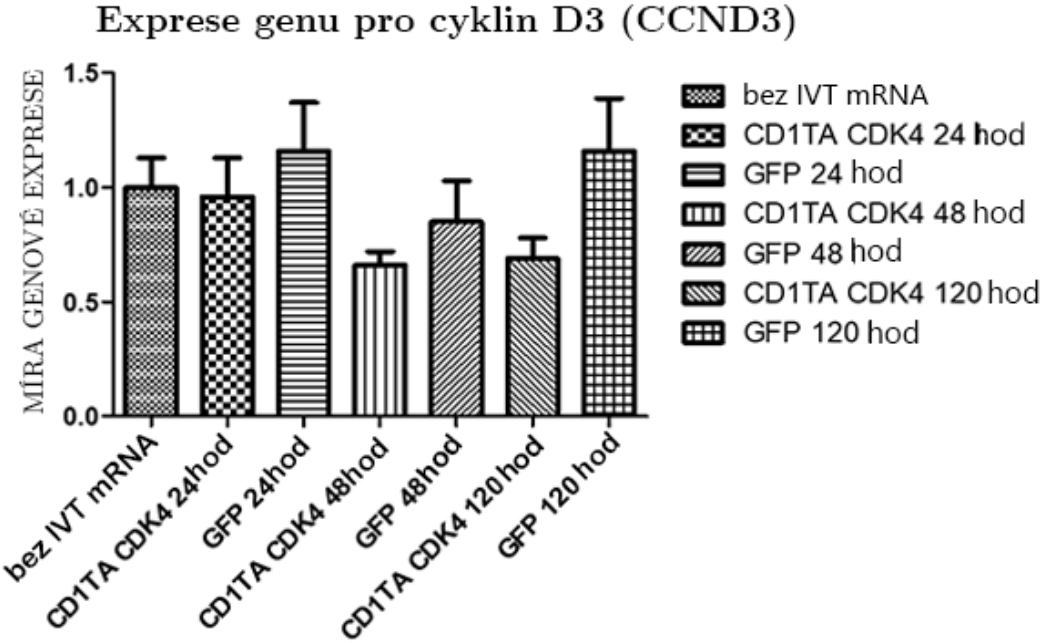
Graf 6: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi cyklinu D1 buněk Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Změny v expresi cyklinu D2 neposkytly po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 po 24, 48 a 120 hodinách žádné statisticky významné rozdíly. 24 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k přibližně 25% poklesu exprese cyklinu D1 ve vzorku transfekovaném danou kombinací regulátorů buněčného cyklu oproti kontrolnímu vzorku. Po 48 hodinách došlo k dalšímu poklesu exprese cyklinu D2 na přibližně polovinu (59 %) oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA. 120 hodin po transfekci došlo k mírnému navýšení v expresi cyklinu D2 na hodnotu odpovídající 86 % hodnoty kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA.

Výsledky genové exprese cyklinu D2 shrnuje graf 7 na straně 91.



Graf 7: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi cyklinu D2 buněk Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.



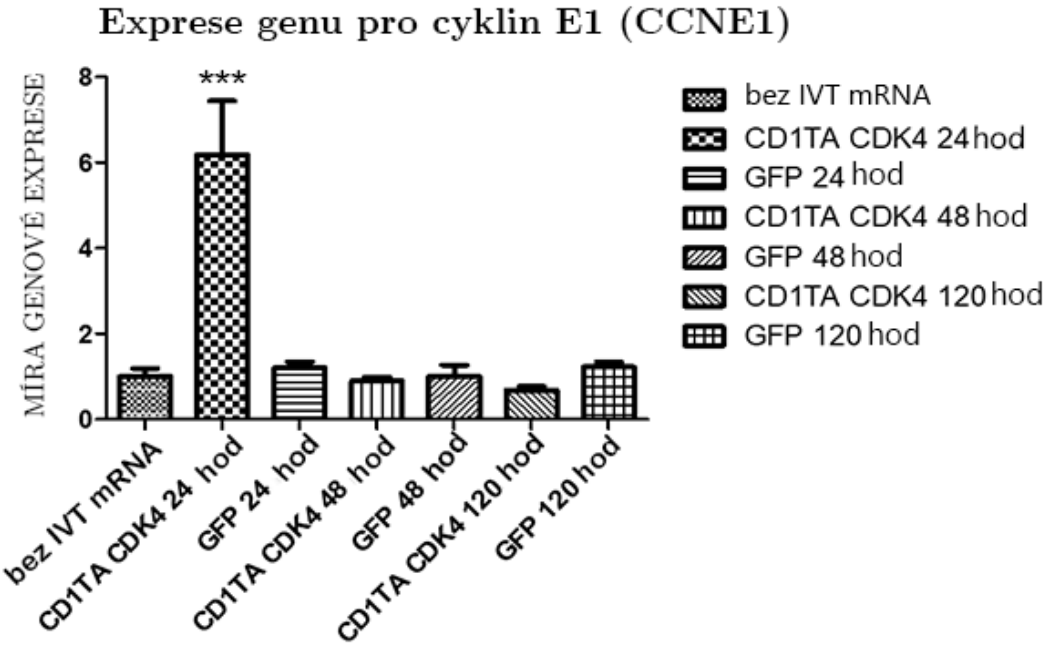
Graf 8: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi cyklinu D3 buněk Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Změny v genové expresi cyklinu D3 v důsledku transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 nepřinesly po 24, 48, ani 120 hodinách žádné statisticky významné rozdíly transfekovaných vzorků oproti kontrolnímu vzorku. 24 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byla v transfekovaném vzorku naměřena téměř identická míra exprese oproti kontrolnímu vzorku (transfekovaný vzorek vykazoval 0,5% snížení exprese v genu pro cyklin D3). 48 hodin po transfekci danou kombinací IVT mRNA došlo k snížení exprese cyklinu D3 na hodnotu odpovídající 66 % hodnoty kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA. 120 hodin po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byla detekována téměř identická míra exprese cyklinu D3 (tj. 68 % hodnoty kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA).

Výsledky genové exprese cyklinu D3 shrnuje graf 8 na straně 91.

Změny v expresi genů pro cykliny rodiny E

24 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byla pozorována k 6,1 krát vyšší exprese cyklinu E1 oproti kontrolnímu vzorku. 48 hodin po transfekci došlo k snížení exprese cyklinu E1 oproti expresi po 24 hodinách od transfekce z hodnoty 6,1 násobku negativního kontrolního vzorku na míru genové exprese,



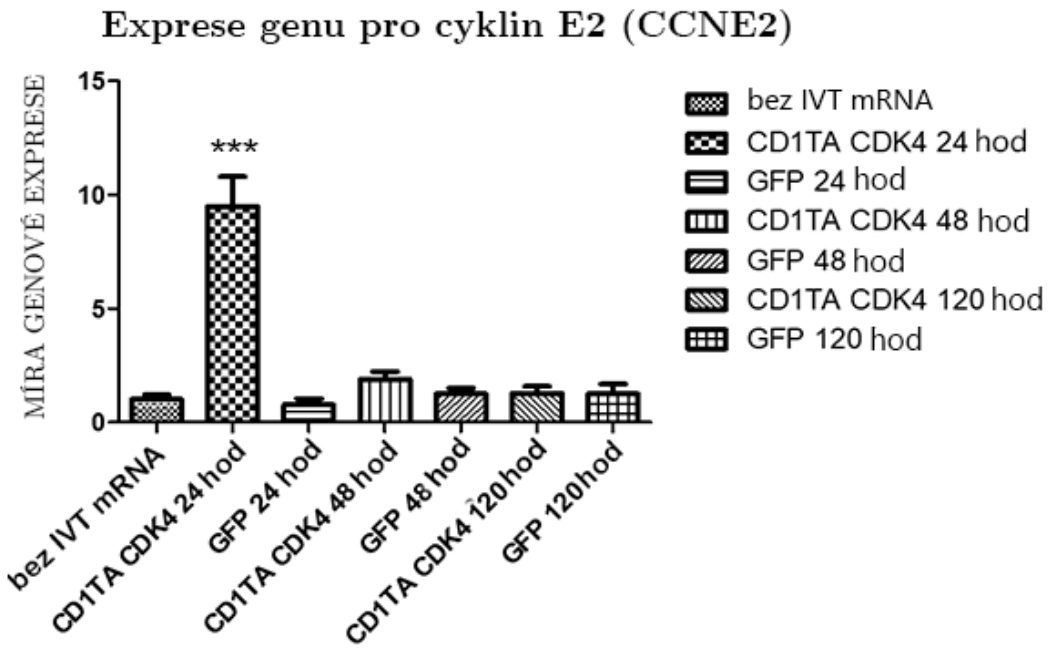
Graf 9: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi cyklinu E1 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

která odpovídá 0,9 násobku negativního kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA pro CD1TA + CDK4. 120 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k dalšímu poklesu v expresi cyklinu E1, jehož exprese po 5 dnech od transfekce dosahovala hodnoty 70% exprese cyklinu E1 v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA.

Výsledky genové exprese cyklinu E1 shrnuje graf 9 na straně 92.

Míra exprese cyklinu E2 byla 24 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 9,5 násobně vyšší oproti kontrolnímu vzorku. Po 48 hodinách od transfekce došlo k výraznému snížení exprese cyklinu E2 oproti jeho expresi po 24 hodinách od transfekce a exprese cyklinu E2 byla ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 1,9 násobně vyšší než míra exprese kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA pro CD1TA + CDK4. Podobná exprese cyklinu byla detekována i 120 hodin od transfekce danou IVT mRNA.

Výsledky genové exprese cyklinu E2 shrnuje graf 10.



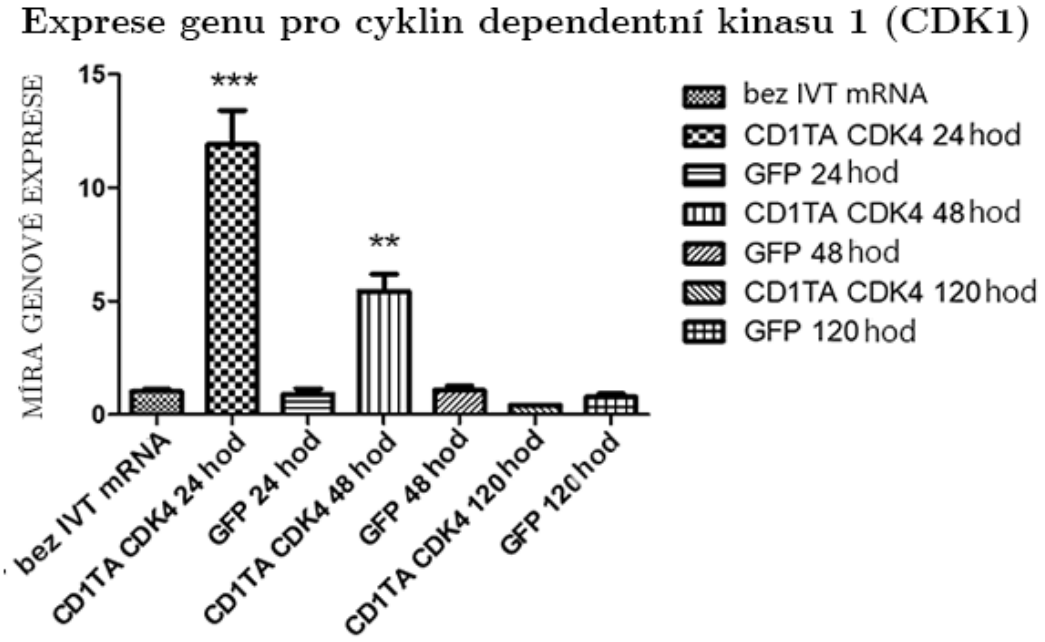
Graf 10: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi cyklinu E2 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Změny v expresi genů cyklin dependentních kinas

24 hodin po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 dosáhla exprese cyklin dependentní kinasy 1 (také jako CDK1) 11,9 násobného zvýšení oproti kontrolnímu vzorku (výsledek je statisticky významný oproti kontrolnímu vzorku na hladině významnosti 0,001). Po 48 hodinách od transfekce

IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo oproti expresi po 24 hodinách k poklesu exprese CDK1 na 5,4 násobek kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA (výsledek statisticky významný na hladině významnosti 0,01). 120 hodin po transfekci zmíněnou kombinací IVT mRNA došlo k rapidnímu poklesu exprese CDK1 na přibližně 40% exprese kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA.

Výsledky genové exprese CDK1 shrnuje graf 11.

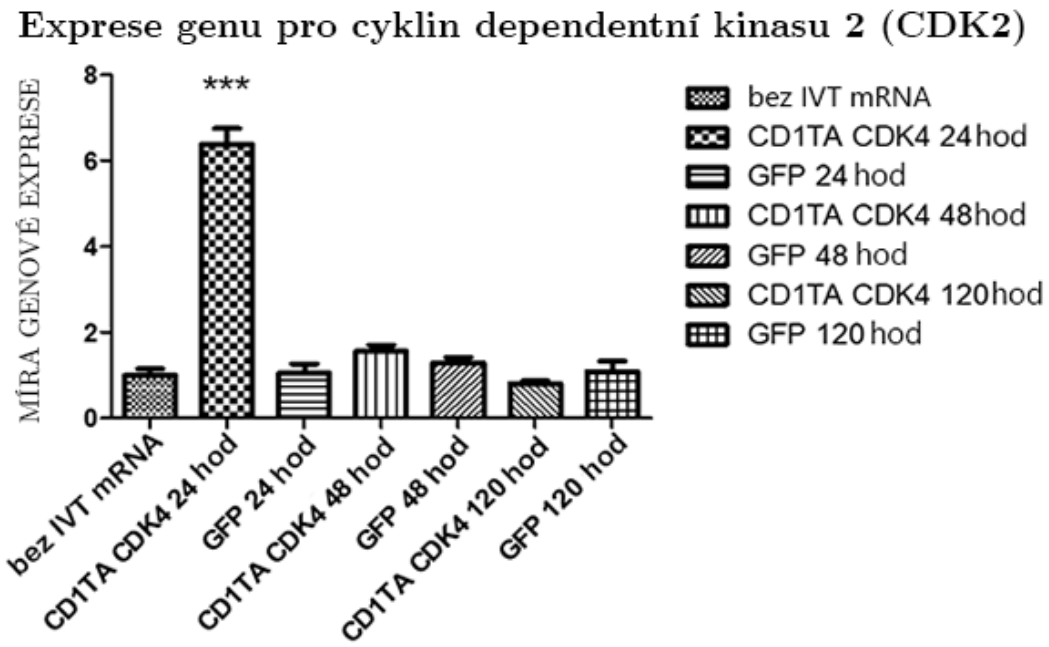


Graf 11: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi CDK1 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

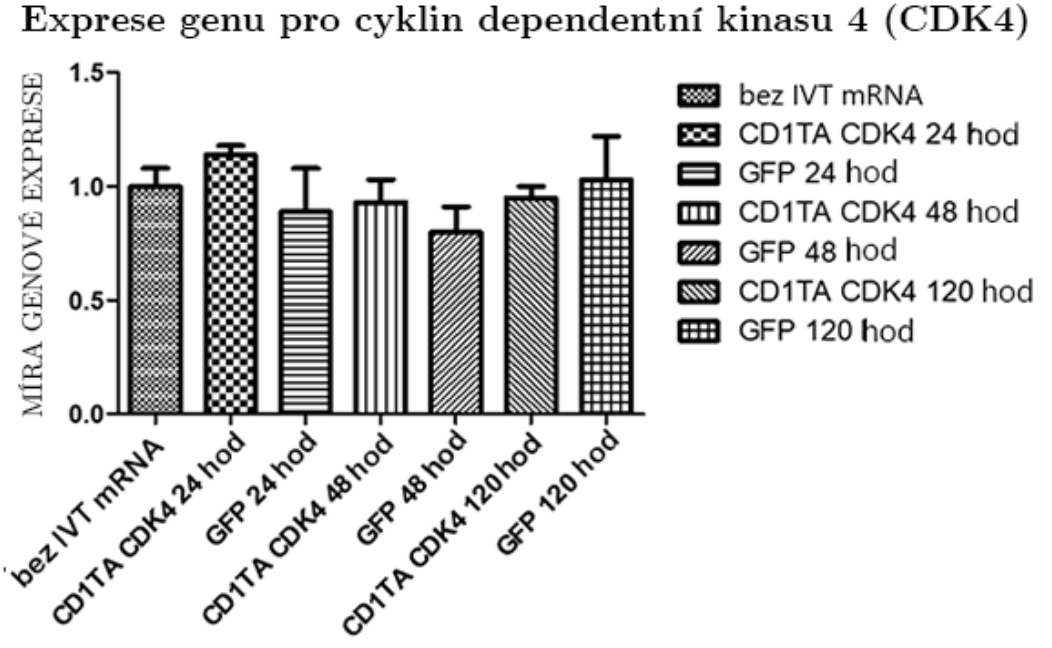
Exprese cyklin dependentní kinasy 2 (také CDK2) se 24 hodin po transfekci zvýšila 6,4 krát oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA (výsledek statisticky významný oproti kontrolnímu vzorku na hladině významnosti 0,001). 48 hodin po transfekci došlo k poklesu exprese CDK2 na 1,5 násobek exprese CDK2 kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA, 120 hodin po transfekci došlo k dalšímu snížení exprese CDK2 na 80 % exprese CDK2 kontrolního vzorku bez transfekce IVT mRNA pro regulátory buněčného cyklu.

Měření exprese cyklin dependentní kinasy 4 (také CDK4) neposkytlo žádný statisticky významný výsledek oproti kontrolnímu vzorku v žádném z časů 24, 48, ani 120 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4. Exprese CDK4 byla v časech 24, 48 a 120 hodin po transfekci stabilní a výrazně se neodchylovala od kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA pro CD1TA + CDK4.

Výsledky genové exprese CDK2 a CDK4 shrnuje graf 12 a 13 na straně 95.



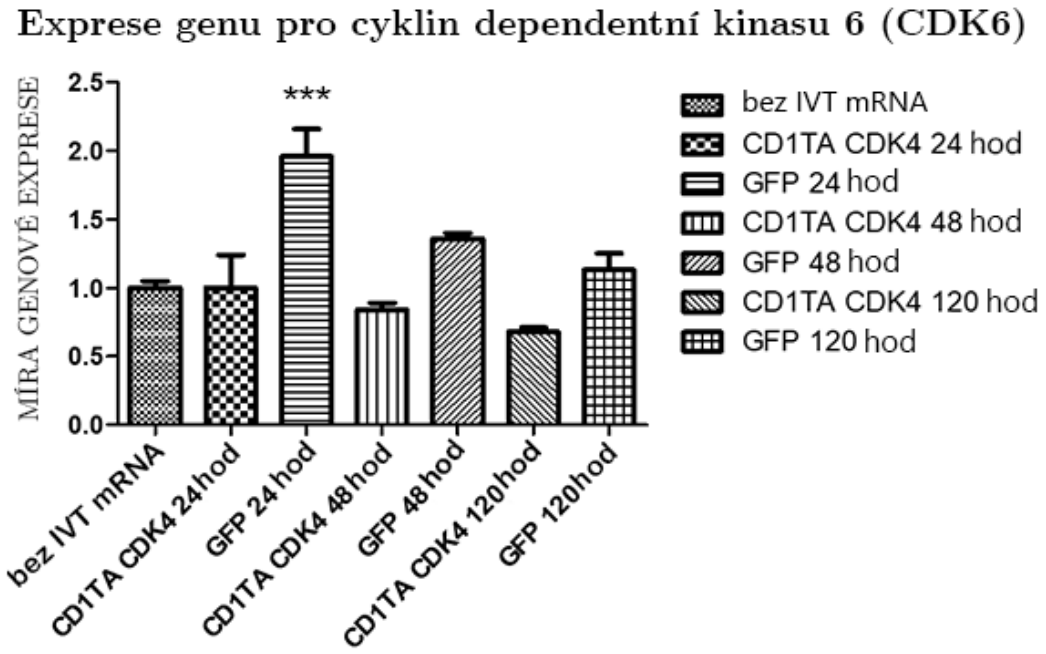
Graf 12: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi CDK2 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.



Graf 13: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi CDK4 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

24 hodin po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 nedošlo k žádné změně v expresi cyklin dependentní kinasy 6 (také CDK6) v porovnání s kontrolním vzorkem bez transfekované IVT mRNA. 48 hodin po transfekci došlo k snížení míry exprese CDK6 20 % pod hodnotu exprese pro CDK6 naměřenou u negativního kontrolního vzorku. 120 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k dalšímu snížení exprese CDK6 na 0,68 násobek negativní kontroly. Pouze v případě transfekce buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro GFP došlo 24 hodin po transfekci k statisticky významnému zvýšení exprese cyklin dependentní kinasy 6 (také CDK6) na 2 násobek v porovnání s kontrolním vzorkem bez transfekované IVT mRNA.

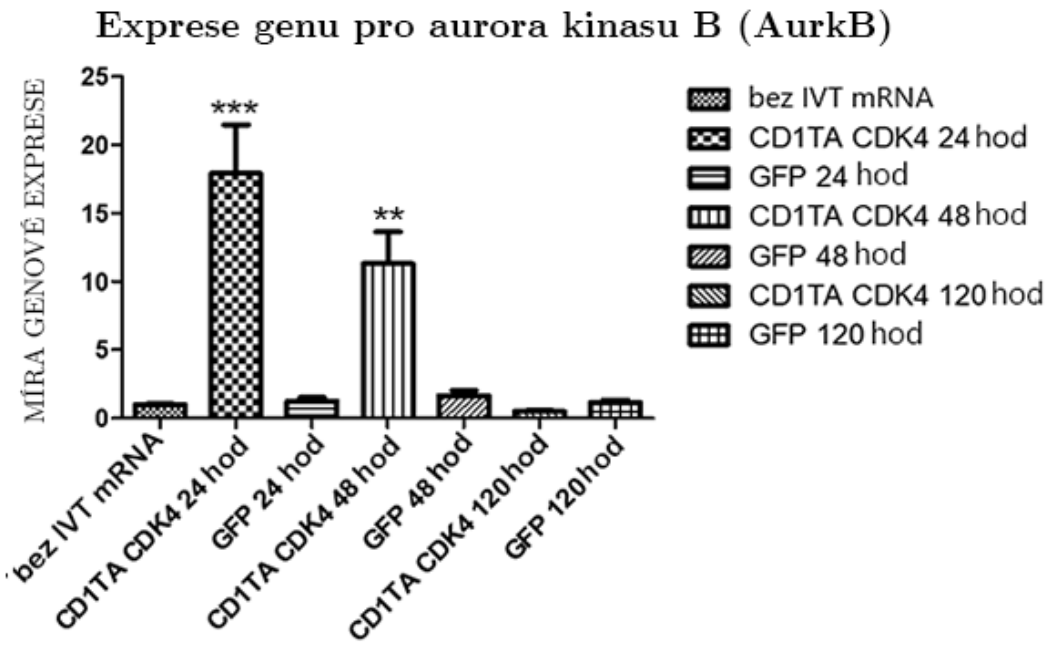
Výsledky genové exprese CDK6 shrnuje graf 14.



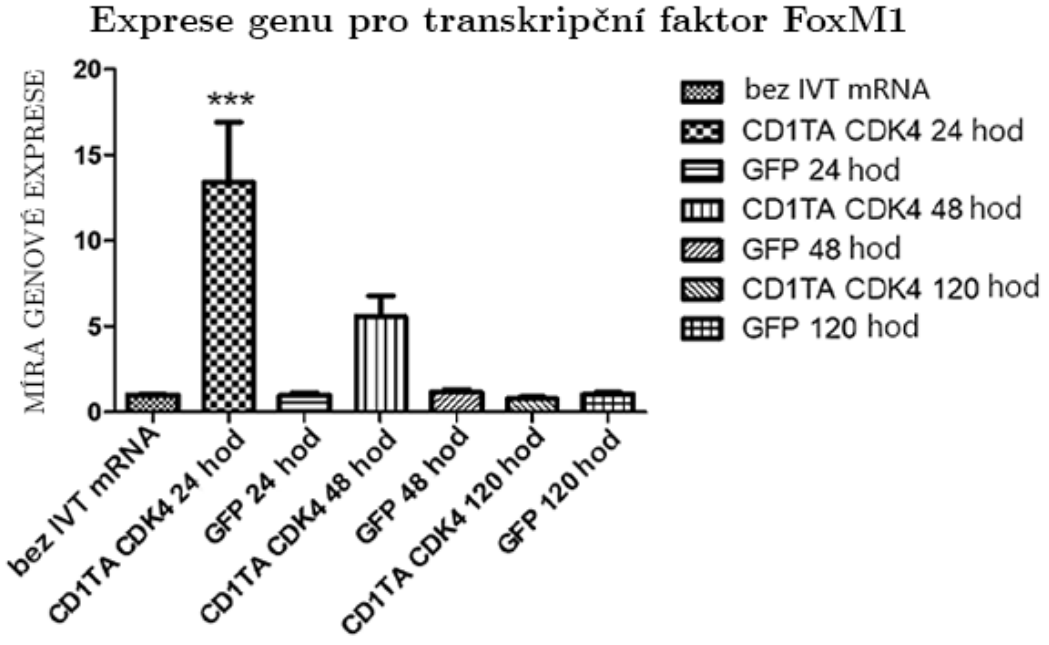
Graf 14: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi CDK6 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Změny v expresi genů pro FoxM1 a AurkB

24 hodin po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byla pozorována 17,9 krát vyšší exprese genu pro auroru kinasu B (také AurkB) oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA. Tento nárůst exprese AurkB byl pozorován i po 48 hodinách od transfekce buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 (11,3 násobný nárůst exprese po 48 hodinách oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA). 120 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k rapidnímu poklesu



Graf 15: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi AurkB buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.



Graf 16: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi FoxM1 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

exprese AurkB na hodnotu 0,5 násobku negativního kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA.

Výsledky genové exprese AurkB shrnuje graf 15 na straně 97.

Změna exprese transkripčního faktoru forkheadové rodiny M1 (také jako FoxM1) následovala podobný trend jako změna exprese AurkB. 24 hodin po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k 13,4 násobnému nárůstu exprese FoxM1 oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA. 48 hodin po transfekci byl detekován nárůst exprese FoxM1 5,6 krát oproti negativnímu kontrolnímu vzorku. 120 hodin po transfekci uvedené kombinace IVT mRNA došlo k poklesu exprese genu pro FoxM1. FoxM1 byl exprimován o 20 % méně ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 než v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA.

Výsledky genové exprese FoxM1 shrnuje graf 16 na straně 97.

4.2.2 Genová analýza tumorsupresorových genů

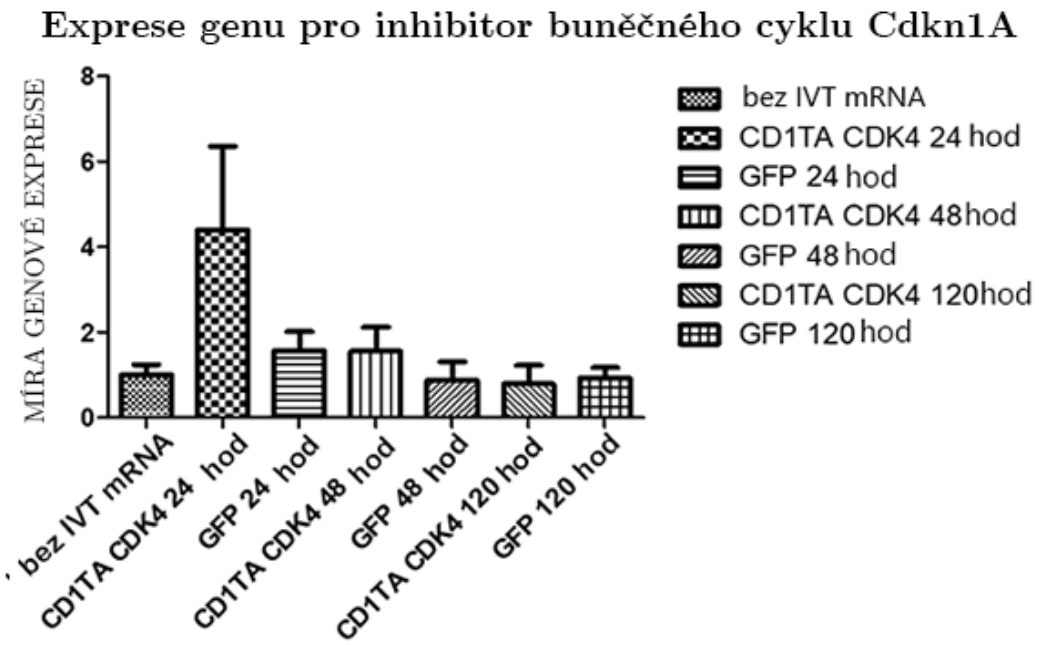
V rámci detekce změn genové exprese tumorsupresorových genů bylo analyzováno celkem 7 genů, kterými byly inhibitory cyklinů a cyklin dependentních kinas p21 (také Cdkn1A), p27 (také Cdkn1B), p57 (také Cdkn1C), p16 (také Cdkn2A), p15 (také Cdkn2B), p18 (také Cdkn2C) a p19 (také Cdkn2D).

Obecný trend exprese inhibitorů komplexů cyklin dependentních kinas následuje nárůst exprese daného inhibitoru v čase 24 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 s následným větším, či menším poklesem v expresi daného inhibitoru v období 48 a 120 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4. Výjimku z tohoto pravidla tvoří exprese Cdkn2B, u kterého byl pozorován pokles exprese v 24 a 48 hodinách po transfekci, následovaný zvýšením exprese 120 hodin od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4.

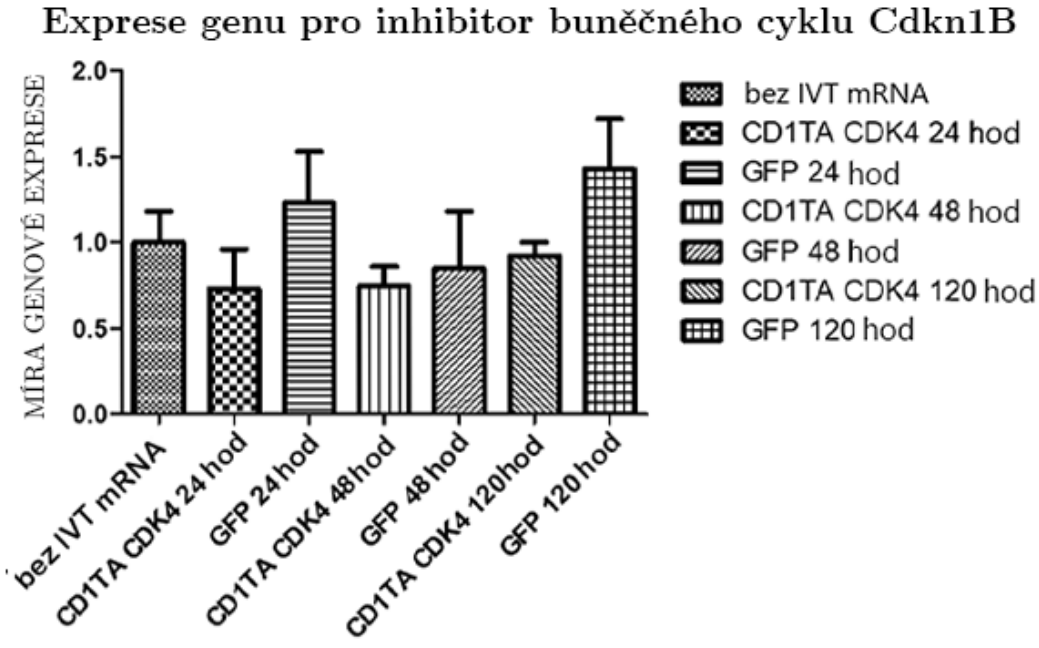
Změny v expresi genů pro inhibitory buněčného cyklu rodiny Cdkn1

Tumorsupresorový gen Cdkn1A (produktem genu je protein p21) vykazoval 4,4 krát vyšší expresi ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 v období 24 hodin po transfekci oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA. 48 hodin po transfekci byla exprese genu pro tumorsupresor p21 1,5 krát vyšší než v případě kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA. Po 120 hodinách od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo v transfekovaném vzorku k poklesu genové exprese tumorsupresoru p21 na hodnotu 70 % kontrolního vzorku bez přidané IVT mRNA.

Výsledky genové exprese proteinu p21 shrnuje graf 17 na straně 99.



Graf 17: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Cdkn1A buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.



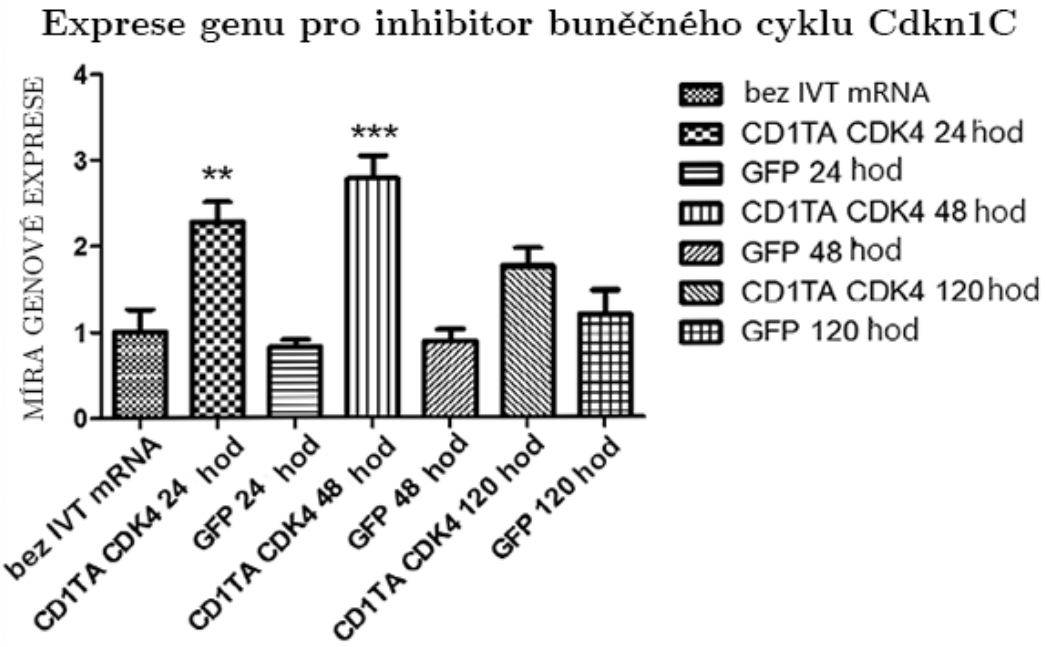
Graf 18: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Cdkn1B buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Tumorsupresorový gen Cdkn1B (produktem genu je protein p27) vykazoval ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 ve všech měřených časech (tj. 24, 48 i 120 hodin od transfekce) přibližně stejnou expresi, která byla ve všech případech nižší než exprese proteinu p27 v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA pro CD1TA + CDK4.

Výsledky genové exprese proteinu p27, společně s vyznačenou mírou statisticky významných výsledků, shrnuje graf 18 na straně 99.

Tumorsupresorový gen Cdkn1C (produktem genu je protein p57) byl exprimován ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 v období 24 hodin po transfekci 2,3 krát více než v případě kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA. 48 hodin po transfekci byla v transfekovaném vzorku detekována stále 2,7 násobná exprese proteinu p57 ve srovnání s negativním kontrolním vzorkem. 120 hodin po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k mírnému poklesu exprese proteinu p57 na 1,8 násobek exprese proteinu p57 v kontrolním vzorku bez přidané IVT mRNA.

Výsledky genové exprese proteinu p57 shrnuje graf 19.

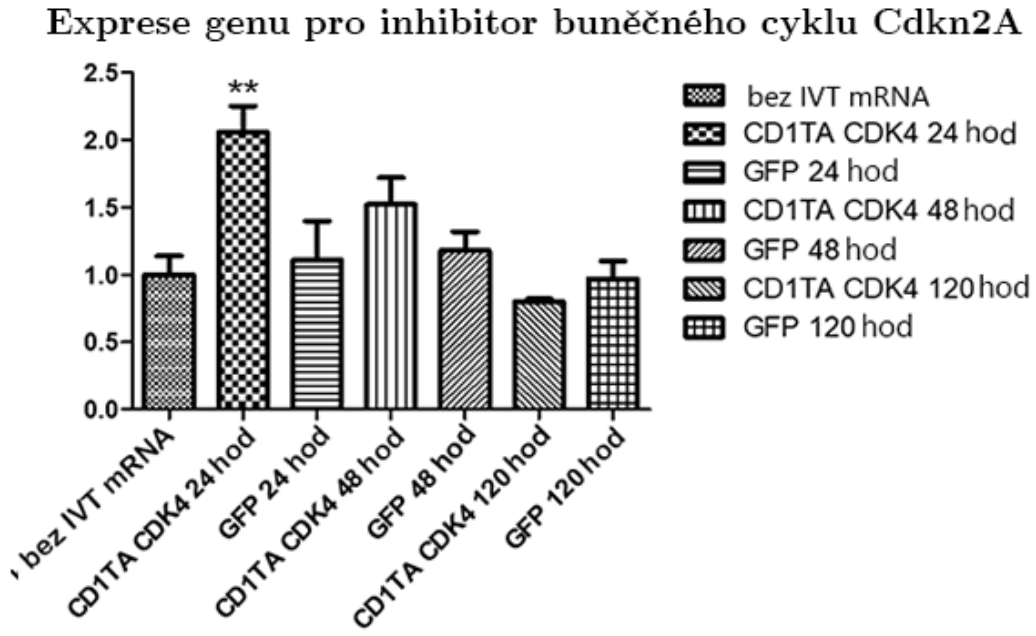


Graf 19: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Cdkn1C buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Změny v expresi genů pro inhibitory buněčného cyklu rodiny Cdkn2

Exprese tumorsupresorového genu Cdkn2A (produktem genu je protein p16) byla 24 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 2 krát vyšší než exprese proteinu p16 v kontrolním vzorku (bez transfekované IVT mRNA). 48 hodin po transfekci IVT mRNA byla exprese proteinu p16 1,5 krát vyšší než v případě kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA. 120 hodin po transfekci danou kombinací IVT mRNA došlo k poklesu v expresi proteinu p16. 120 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byla v transfekovaném vzorku naměřen 20% pokles v expresi proteinu p16 oproti kontrolnímu vzorku.

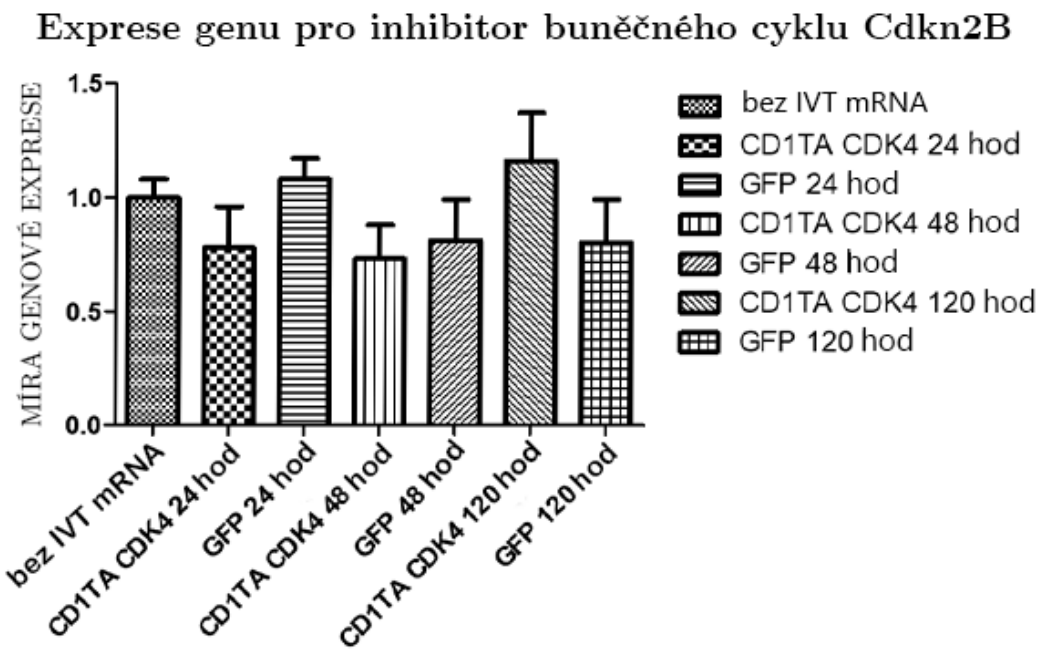
Výsledky genové exprese proteinu p16 shrnuje graf 20.



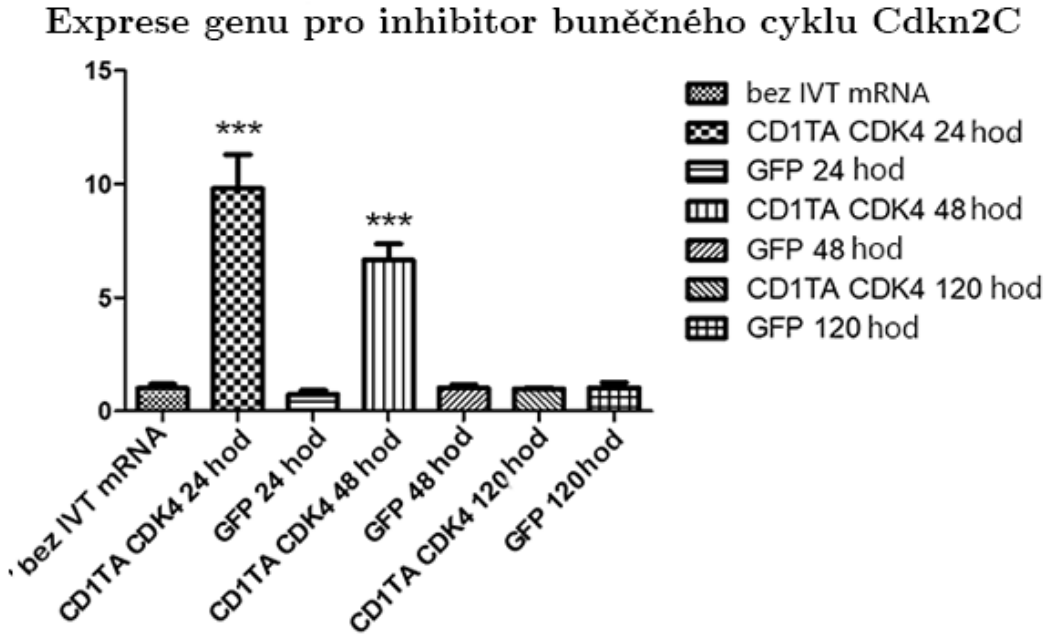
Graf 20: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Cdkn2A buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Protein p15 (tumorsupresorový gen Cdkn2B) byl ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 v období 24 a 48 hodin po transfekci exprimován v množství, které bylo v obou případech o přibližně 25 % nižší v porovnání s kontrolním vzorkem bez transfekované IVT mRNA. 120 hodin po transfekci došlo u vzorku k nárůstu exprese genu Cdkn2B na 1,1 násobek exprese měřené v kontrolním vzorku bez IVT mRNA.

Výsledky genové exprese proteinu p15 shrnuje graf 21 na straně 102.



Graf 21: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Cdkn2B buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.



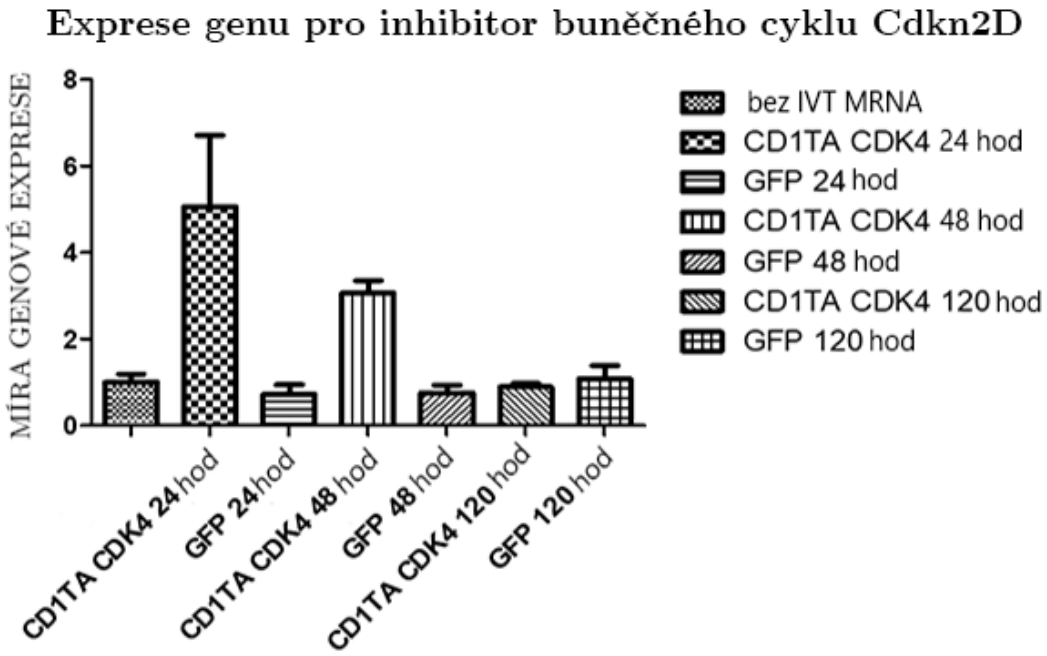
Graf 22: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Cdkn2C buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Exprese tumorsupresorového genu Cdkn2C (produktem genu je protein p18) dosáhla 24 hodin po transfekci vzorku IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 9,8 násobného nárůstu v porovnání s kontrolním vzorkem bez transfekované IVT mRNA. 48 hodin po transfekci byla exprese stále 6,7 krát vyšší v porovnání s kontrolním vzorkem. 120 hodin po transfekci došlo ke snížení exprese proteinu p18 na hodnotu shodnou s expresí proteinu p18 v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA.

Výsledky genové exprese proteinu p18 shrnuje graf 22 na straně 102.

Exprese tumorsupresorového genu Cdkn2D (produktem genu je protein p19) byla 24 hodin po transfekci rovna 5 násobku exprese proteinu p19 v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA. 48 hodin po transfekci byla ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 naměřena exprese odpovídající trojnásobku exprese v kontrolním vzorku bez transfekce IVT mRNA. 120 hodin po transfekci byla v transfekovaném vzorku naměřena exprese proteinu p19 o 10 % nižší v porovnání s kontrolním vzorkem.

Výsledky genové exprese proteinu p19 shrnuje graf 23.



Graf 23: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Cdkn2D buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

4.2.3 Genová analýza exprese transkripčních faktorů β-buněk

V rámci detekce změn genové exprese β-buněčných transkripčních faktorů bylo analyzováno celkem 6 genů. Jednalo se o geny kódující transkripční faktory, které re-

gulují expresi genů pro insulin (Pdx1, NeuroD1, MafA), geny kódující transkripční faktory regulující diferenciaci progenitorů a maturaci β-buněk (Nkx2-2, Nkx6-1), geny kódující transkripční faktory ovlivňující funkci diferencovaných β-buněk (Pax4) a gen kódující transkripční faktory zajišťující represi α-buněčných genů (Pdx1).

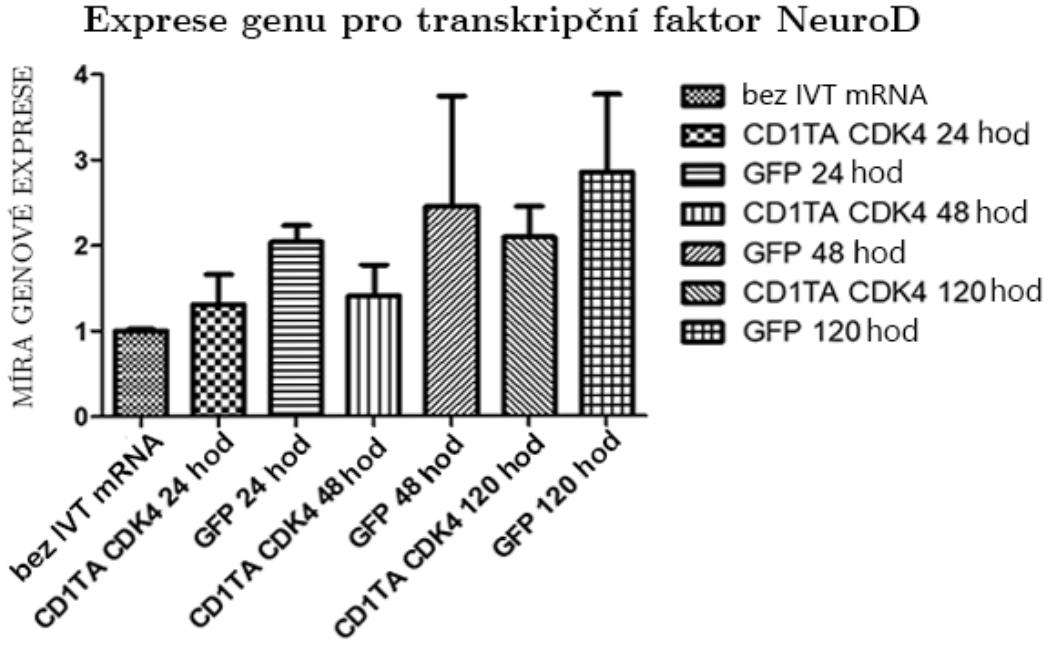
Obecný trend v expresi transkripčních faktorů ovlivňujících funkci β-buněk je snížení exprese daného transkripčního faktoru 24 po transfekci (IVT mRNA pro CD1TA + CDK4) o desítky procent pod hodnotu exprese daného transkripčního faktoru ve vzorku negativní kontroly s následným zvýšením exprese v období 48 a 120 hodin od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4. Tomuto trendu se vymyká genová exprese transkripčního faktoru NeuroD, u kterého dochází k zvýšení exprese i v období 24 hodin po transfekci vzorku IVT mRNA pro CD1TA + CDK4.

Změny v expresi genů pro transkripční faktory regulující expresi genů pro insulin

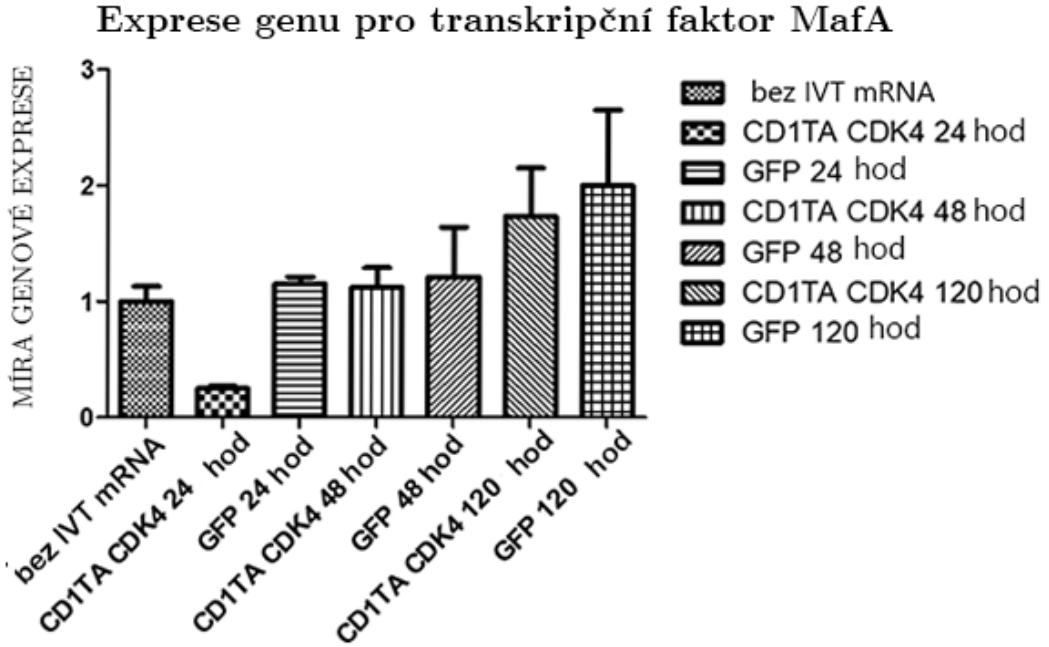
Exprese transkripčního faktoru NeuroD vykazovala ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 24 hodin po transfekci 30% nárůst oproti kontrolnímu vzorku (hodnota kontrolního vzorku je rovna 100 %, neboli 1). Podobná míra exprese byla pozorována ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 také 48 hodin po transfekci (40% nárůst exprese NeuroD oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA). Po 120 hodinách od transfekce došlo k dalšímu nárůstu exprese transkripčního faktoru NeuroD a v transfekovaných buňkách byla naměřena dvojnásobná exprese NeuroD oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA.

Exprese transkripčního faktoru MafA klesla v období 24 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na pouhých 20 % hodnoty kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA. Po 24 hodinách tak došlo v transfekovaném vzorku k výraznému útlumu exprese genů pro MafA. V období 48 a 120 hodin po transfekci následoval nárůst exprese transkripčního faktoru MafA. 48 hodin po transfekci byla exprese ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 v porovnání s kontrolním vzorkem o 10 % vyšší, 120 hodin po transfekci byla v transfekovaném vzorku exprese transkripčního faktoru v porovnání s kontrolním vzorkem vyšší o 73 %.

Výsledky genové exprese transkripčního faktoru Neuro D a MafA shrnují grafy 24 a 25 na straně 105.



Graf 24: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi NeuroD buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

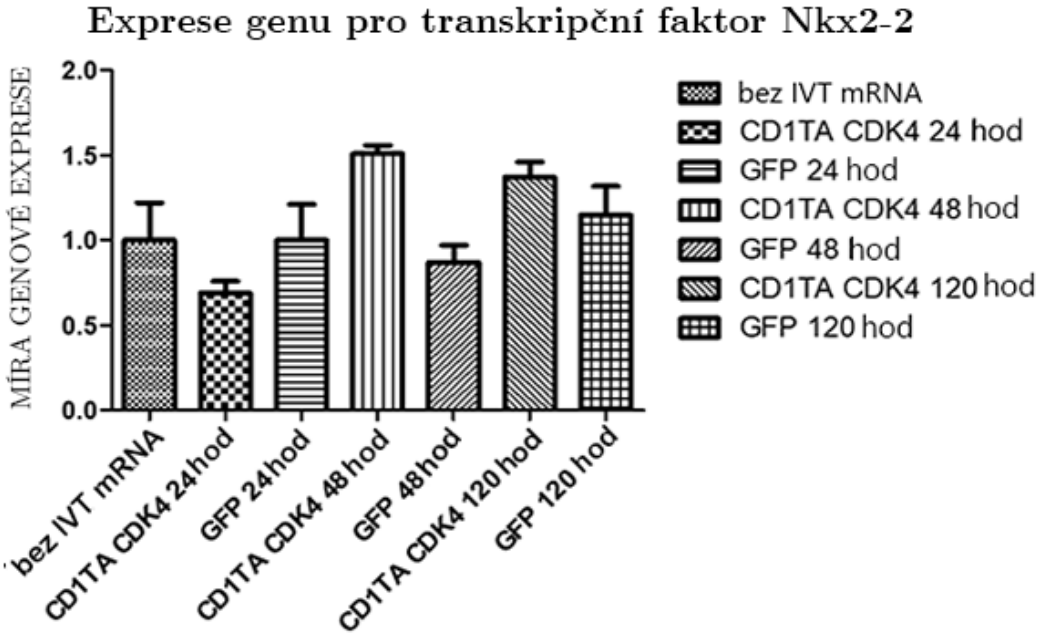


Graf 25: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi MafA buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

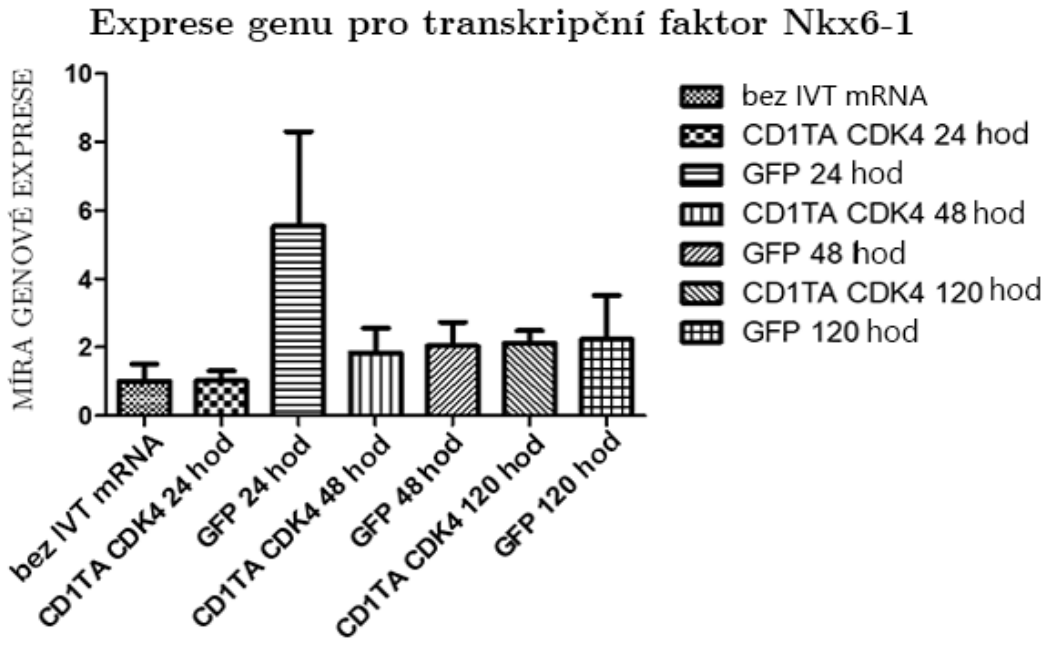
Změny v expresi genů pro transkripční faktory regulující diferenciaci progenitorů β-buněk

Exprese transkripčního faktoru Nkx2-2 a Nkx6-1 kopírovala téměř identický trend. 24 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byl ve vzorku naměřen pokles exprese transkripčního faktoru Nkx2-2 o 48 % a Nkx6-1 o 39 % oproti kontrolnímu vzorku bez transfekce IVT mRNA (exprese daného transkripčního faktoru kontrolního vzorku byla určena hodnotou 100 %). 48 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo jak v případě Nkx2-2, tak v případě Nkx6-1 k mírnému nárůstu exprese těchto transkripčních faktorů (zvýšení exprese Nkx2-2 o 50 % oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA, zvýšení exprese Nkx6-1 o 10 % oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA, jehož míra exprese daného transkripčního faktoru je rovna 100 %). 120 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byla ve vzorku s transfekcí naměřena o 30 % vyšší exprese transkripčních faktorů Nkx2-2 i Nkx6-1 oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA pro CD1TA + CDK4.

Výsledky genové exprese transkripčního faktoru Nkx2-2 shrnuje graf 26, výsledky z genové exprese transkripčního faktoru Nkx6-1 poté graf 27 na straně 107.



Graf 26: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Nkx2-2 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

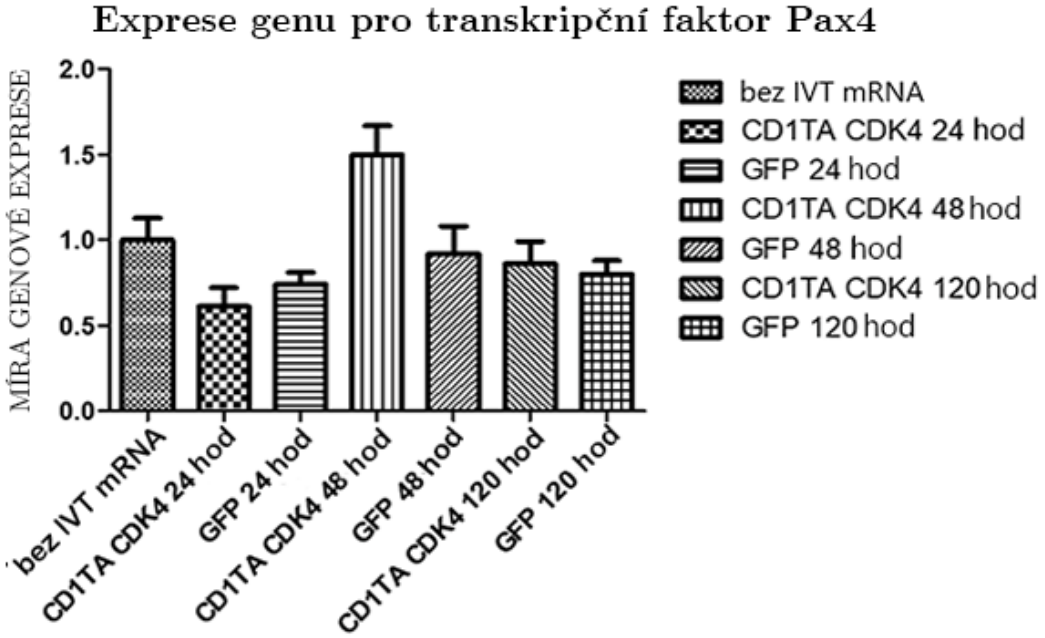


Graf 27: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Nkx6-1 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

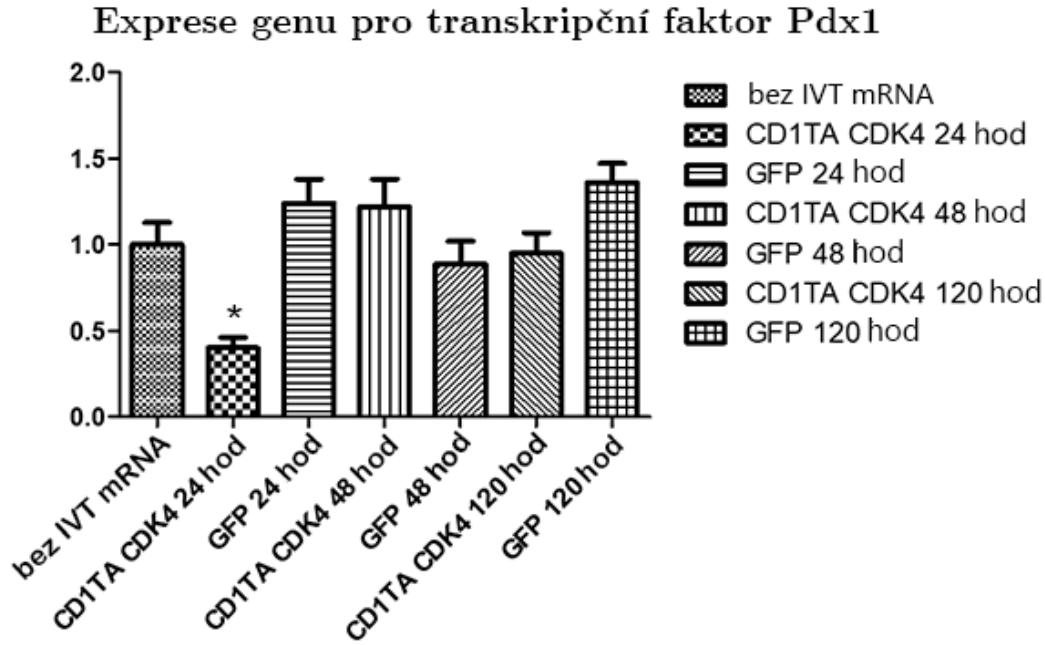
Změny v expresi genů pro transkripční faktory regulující funkci diferencovaných β-buněk

24 hodin po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků pomocí IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo v transfekovaném vzorku k poklesu exprese transkripčního faktoru Pax4 na 60% hodnotu míry exprese kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA (míra exprese kontrolního vzorku byla stanovena jako 100 %). 48 hodin po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků bylo zaznamenáno navýšení exprese transkripčního faktoru Pax4 na hodnotu o 50 % vyšší než naměřenou expresi v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA. 120 hodin od transfekce vzorku IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k dalšímu poklesu exprese Pax4 na hodnotu rovnou 80 % hodnoty míry exprese transkripčního faktoru Pax4 v případě kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA.

Výsledky genové exprese transkripčního faktoru Pax4 shrnuje graf 28 na straně 108.



Graf 28: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Pax4 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.



Graf 29: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Pdx1 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Změny v expresi genů pro transkripční faktory regulující represi α-buněčných genů

Exprese transkripčního faktoru Pdx1 klesla v transfekovaném vzorku po 24 hodinách od transfekce vzorku pomocí IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na 40 % hodnoty naměřené v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA. Po 48 hodinách poté došlo k zvýšení exprese transkripčního faktoru Pdx1 v transfekovaném vzorku na 1,2 násobek exprese transkripčního faktoru Pdx1 v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA. 120 hodin po transfekci vzorku IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byla exprese Pdx1 přibližně totožná s expresí Pdx1 pozorovanou v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA pro regulátory buněčného cyklu.

Výsledky genové exprese transkripčního faktoru Pdx1 shrnuje graf 29 na straně 108.

4.2.4 Genová analýza genů podílejících se na funkci β-buněk

V rámci detekce změn exprese genů podílejících se na funkci β-buněk bylo detekováno celkem 7 genů. Analyzovány byly geny pro ABC transportér (Abcc8), glukokinasu (Gck), draslíkový kanál (Kcnj11), laktátdehydrogenasu A (LdhA), proproteinkonvertasy typu I a II (Pcsk1, Pcsk2) a gen pro urokortin III (Ucn3).

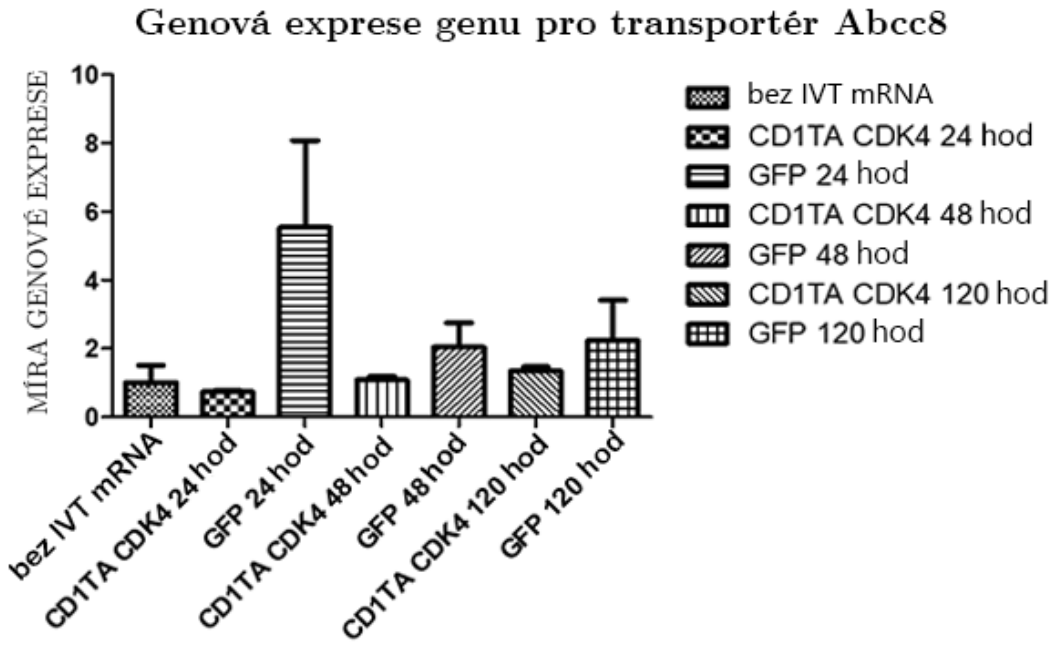
Obecný trend v expresi genů z této skupiny není jednoznačný, naznačuje ale poklesu v expresi daného genu 24 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 následovaný normalizací míry exprese na přibližně stejnou hodnotu, která odpovídá expresi danému genu v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA s následným zvýšením exprese genu nad hodnotu kontrolního vzorku 120 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4.

Změny v expresi genů pro Abcc8, Gck, Kcnj11 a LdhA

Míra exprese ABC transportéru Abcc8 se 24, 48 i 120 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 pohybovala přibližně kolem hodnoty exprese Abcc8 negativního kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA. 24 hodin po transfekci IVT mRNA byl v transfekovaném vzorku pozorován 27% pokles transkripce genu oproti kontrolnímu vzorku, 48 hodin po transfekci byl zaznamenán mírný nárůst na hodnotu identickou s hodnotou kontrolního vzorku. 120 hodin od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byla v transfekovaném vzorku detekována o 33 % vyšší míra exprese v porovnání s kontrolním vzorkem bez transfekované IVT mRNA.

Výsledky exprese genu pro ABC transportér Abcc8 shrnuje graf 30 na straně 110.

Míra exprese genu pro glukokinasu (také Gck) odpovídala ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 v období 24 hodin po transfekci 30% hodnotě exprese Gck v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA. Po 24 hodinách



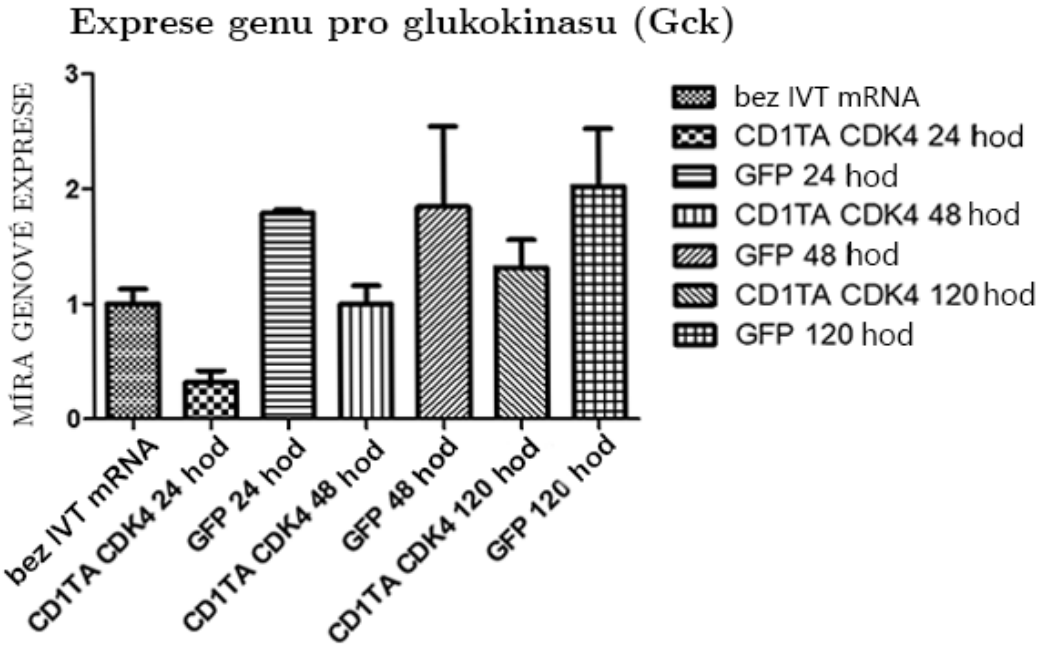
Graf 30: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Abcc8 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

od transfekce tak došlo v transfekovaném vzorku k 70 % poklesu v expresi Gck oproti kontrolnímu vzorku. Po 48 hodinách od transfekce došlo k nárůstu exprese Gck ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 k hodnotě, která téměř odpovídala míře exprese Gck v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA. 120 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byla v transfekovaném vzorku naměřena o 30 % vyšší exprese Gck oproti kontrolnímu vzorku bez transfekce IVT mRNA.

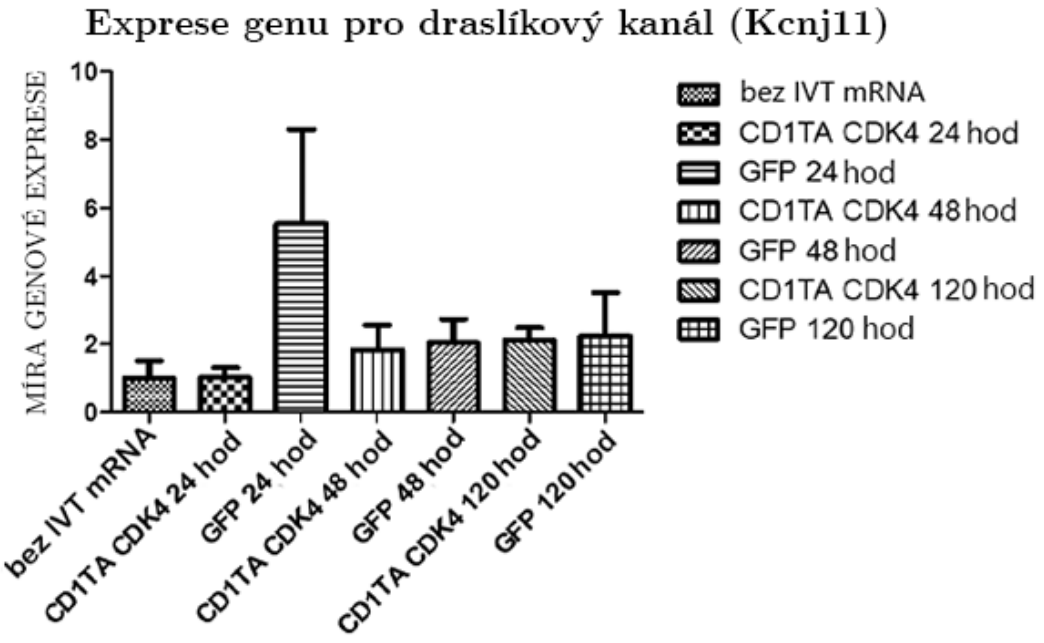
Výsledky exprese genu pro glukokinasu shrnuje graf 31 na straně 111.

Exprese genu pro draslíkový kanál (Kcnj11) byla 24 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 shodná s expresí Kcnj11 v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA pro regulátory buněčného cyklu. 48 hodin po transfekci došlo v transfekovaném vzorku k nárůstu exprese genu pro Kcnj11 o 20 % oproti kontrolnímu vzorku a 120 hodin po transfekci o 140 % oproti kontrolnímu vzorku (tedy na 2,4 násobek kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA).

Výsledky exprese genu pro draslíkový kanál shrnuje graf 32 na straně 111.



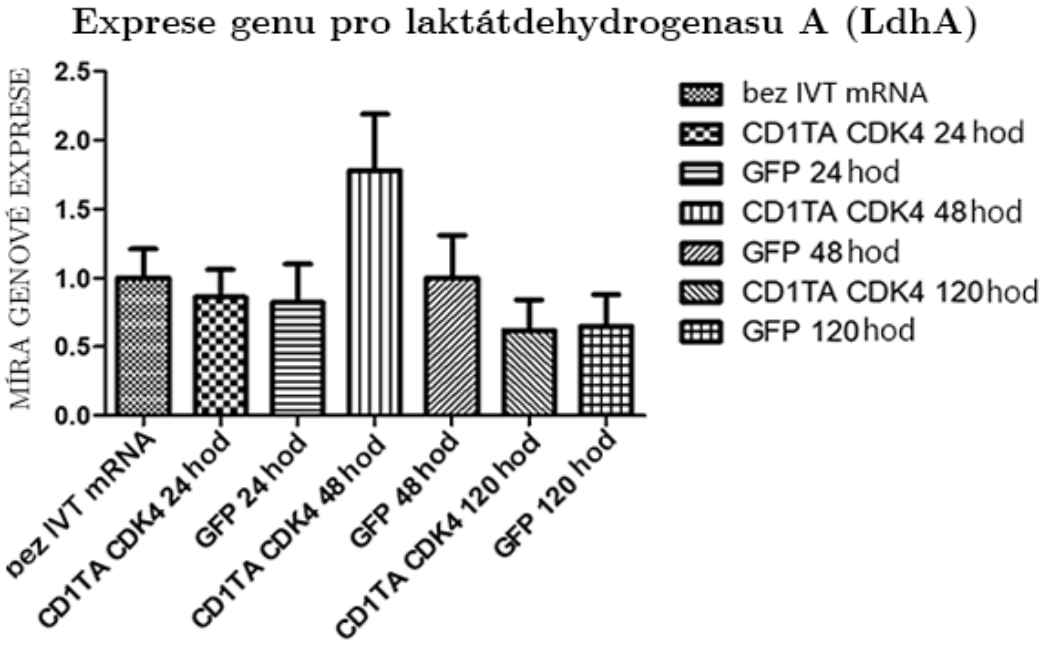
Graf 31: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Kcnj11 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.



Graf 32: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi genu pro Kcnj11 buněk Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení případného vlivu IVT mRNA na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován také vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4.

Exprese genu pro laktátdehydrogenasu (LdhA) klesla po 24 hodinách od transfekce vzorku IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 o přibližně 15 % oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA. Po 48 hodinách došlo k nárůstu v expresi LdhA v transfekovaném vzorku na 1,7 násobek exprese kontrolního vzorku. 120 hodin po transfekci došlo k opětovnému poklesu exprese LdhA v transfekovaném vzorku na 0,6 násobek exprese LdhA v kontrolním vzorku.

Výsledky exprese genu pro laktátdehydrogenasu shrnuje graf 33.



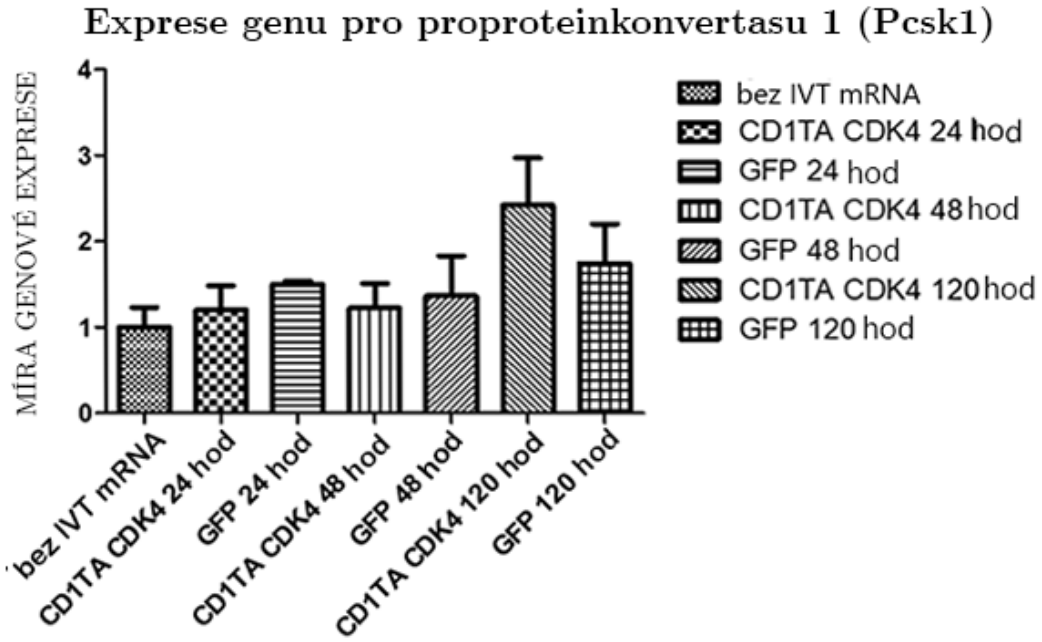
Graf 33: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi LdhA buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Změny v expresi genů pro Pcsk1, Pcsk2 a Ucn3

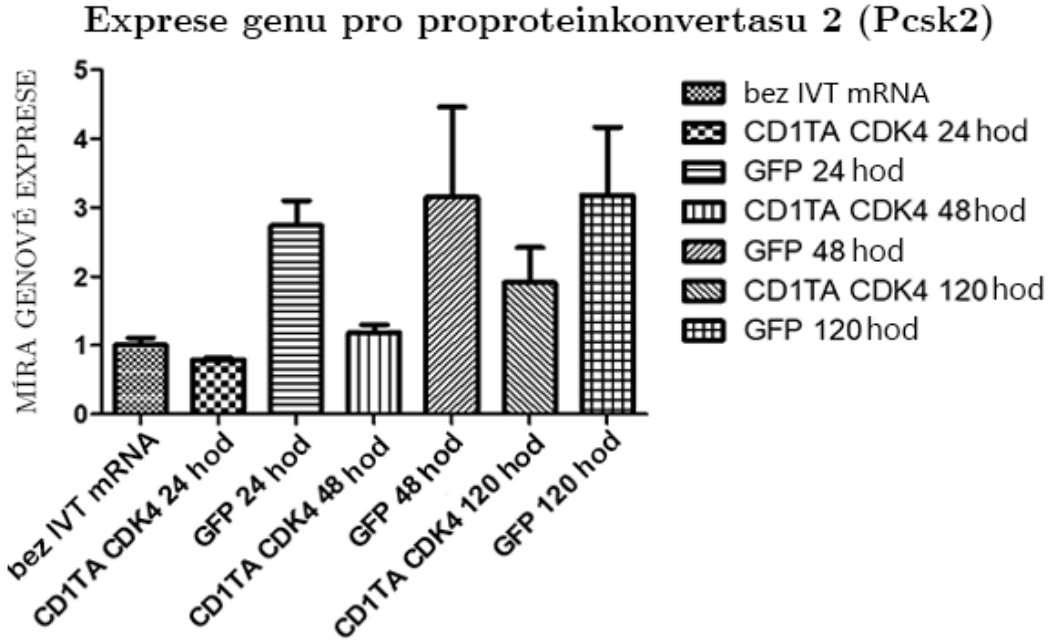
Exprese genu pro proproteinkonvertasu 1 (Pcsk1) byla 24 a 48 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 v transfekovaném vzorku shodná s expresí Pcsk1 v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA. 120 hodin po transfekci došlo k nárůstu exprese Pcsk1 na 2,4 násobek exprese kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA.

Výsledky exprese genu pro proproteinkonvertasu 1 shrnuje graf 34 na straně 113.

Exprese genu pro proproteinkonvertasu 2 (Pcsk2) vykazovala 24 hodin po transfekci vzorku IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 22% pokles oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA. 48 hodin po transfekci došlo k nárůstu exprese genu pro



Graf 34: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Pcsk1 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.



Graf 35: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Pcsk2 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Pcsk2 v transfekovaném vzorku na 1,2 násobek exprese kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA a po 120 hodinách k dalšímu nárůstu na 1,9 násobek exprese kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA.

Výsledky exprese genu pro proproteinkonvertasu 2 shrnuje graf 35 na straně 113.

4.2.5 Genová analýza genů pro pankreatické hormony

V rámci detekce změn exprese genů pankreatických hormonů byly sledovány 4 geny. Sledované geny jsou geny pro glukagon (Gcg), insulin 1 (Ins1), insulin 2 (Ins2) a somatostatin (Sst).

Obecným trendem v expresi pankreatických hormonů je snížení exprese daného hormonu 24 a 48 hodin po transfekci s následným zvýšením exprese po 120 hodinách od transfekce IVT mRNA Pro CD1TA + CDK4. Tomuto trendu se vymyká glukagon, jehož exprese je snížená po 24, 48 i 120 hodinách od transfekce danou kombinací IVT mRNA.

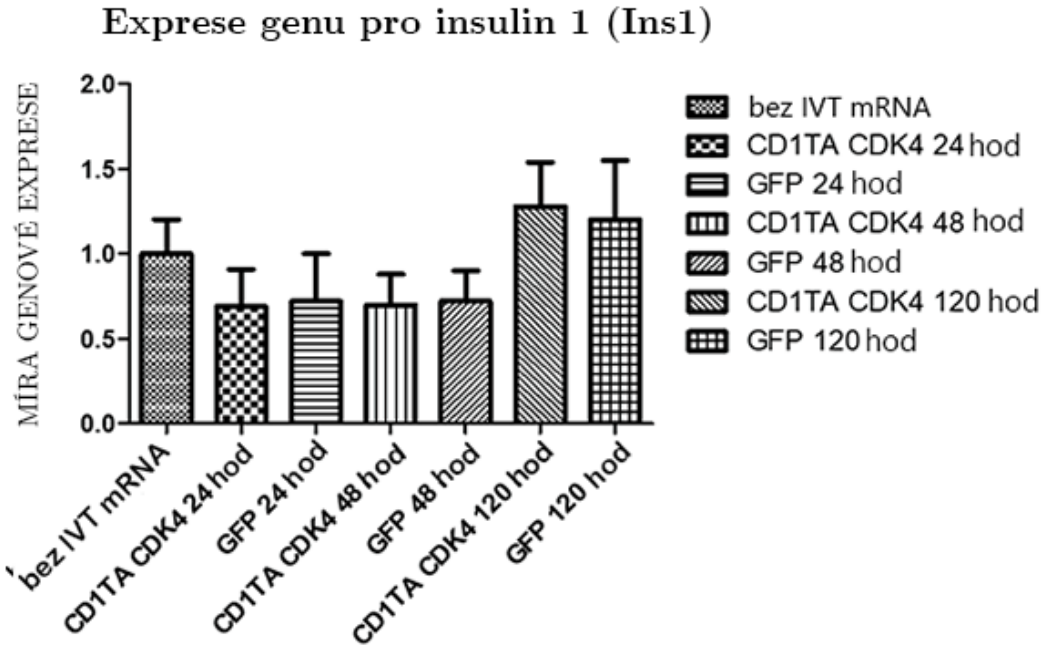
Změny v expresi genů pro Ins1, Ins2, Gcg a Sst

24 a 48 hodin po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k poklesu exprese genu pro insulin 1 (Ins1) v průměru na 0,7 násobek exprese genu pro insulin kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA. Tento pokles byl následován zvýšením exprese genu pro Ins1 po 120 hodinách od transfekce na 1,3 násobek exprese Ins1 v kontrolním vzorku bez transfekce IVT mRNA.

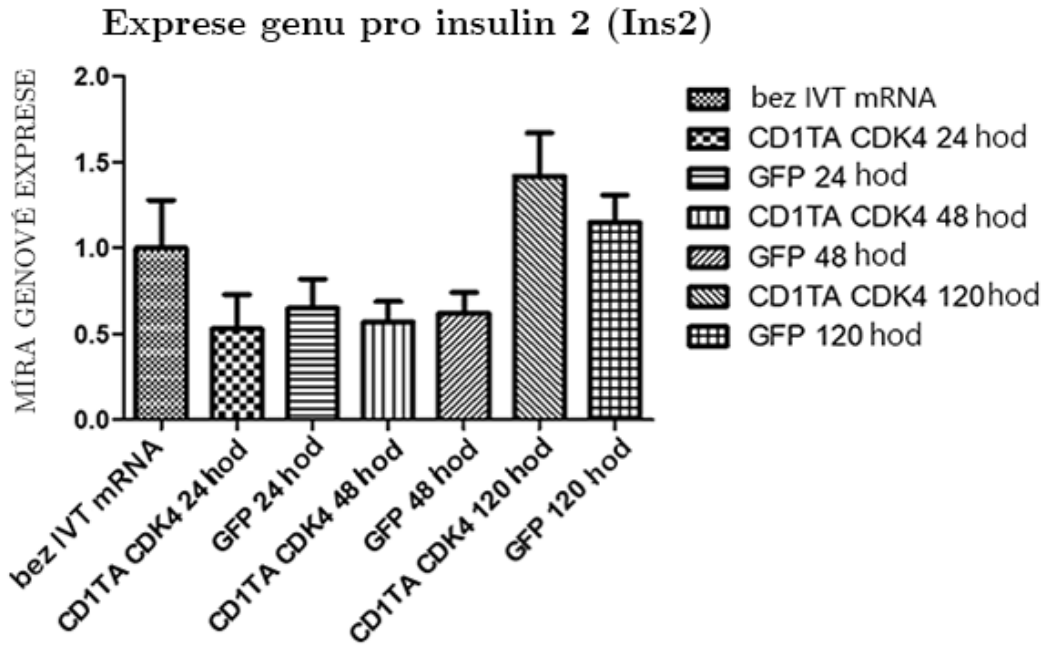
Exprese genu pro insulin 2 (Ins2) kopíruje trend uvedený v rámci exprese genu Ins1. Po 24 a 48 hodinách od transfekce vzorku IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k poklesu exprese genu pro Ins2 na 0,5 násobek exprese genu pro Ins2, který byl detekován v rámci kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA pro CD1TA + CDK4. 120 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 následovalo zvýšení exprese genu pro Ins2 na 1,4 násobek exprese Ins2 v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA pro CD1TA + CDK4.

Výsledky exprese genu pro insulin 1 a 2 shrnuje graf 36 a 37 na straně 115.

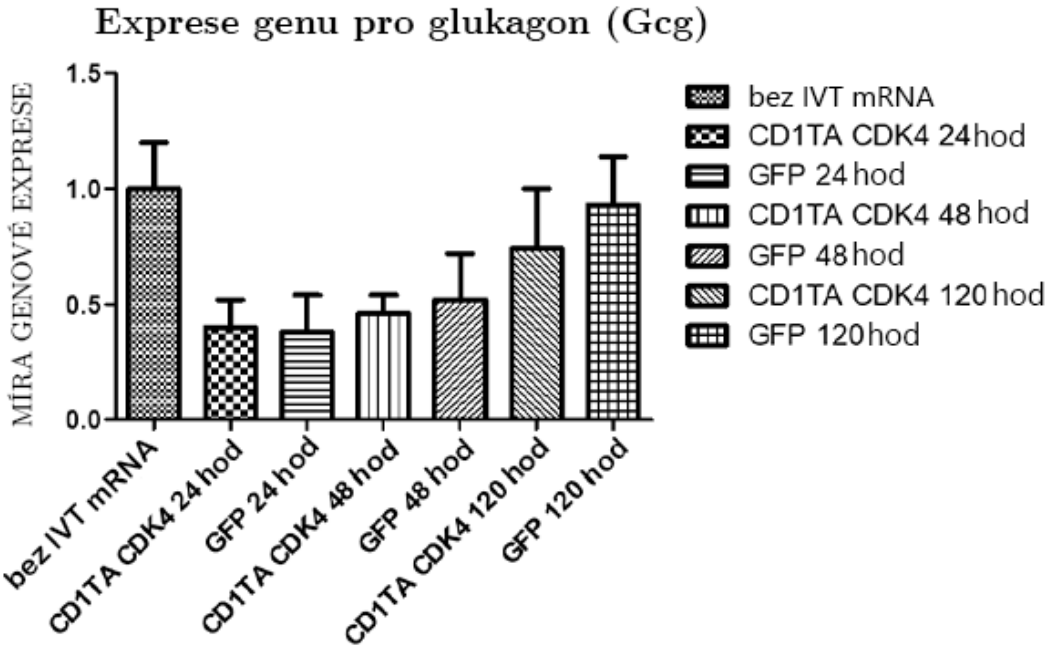
V rámci genové analýzy glukagonu (Gcg) bylo detekováno snížení exprese genu pro Gcg v období 24, 48 i 120 hodin po transfekci vzorku IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA. 24 a 48 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byla exprese Gcg v transfekovaném vzorku o 60 % nižší než v případě kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA. 120 hodin po transfekci byla exprese Gcg v transfekovaném vzorku nižší oproti kontrolnímu vzorku pouze o 27 %.



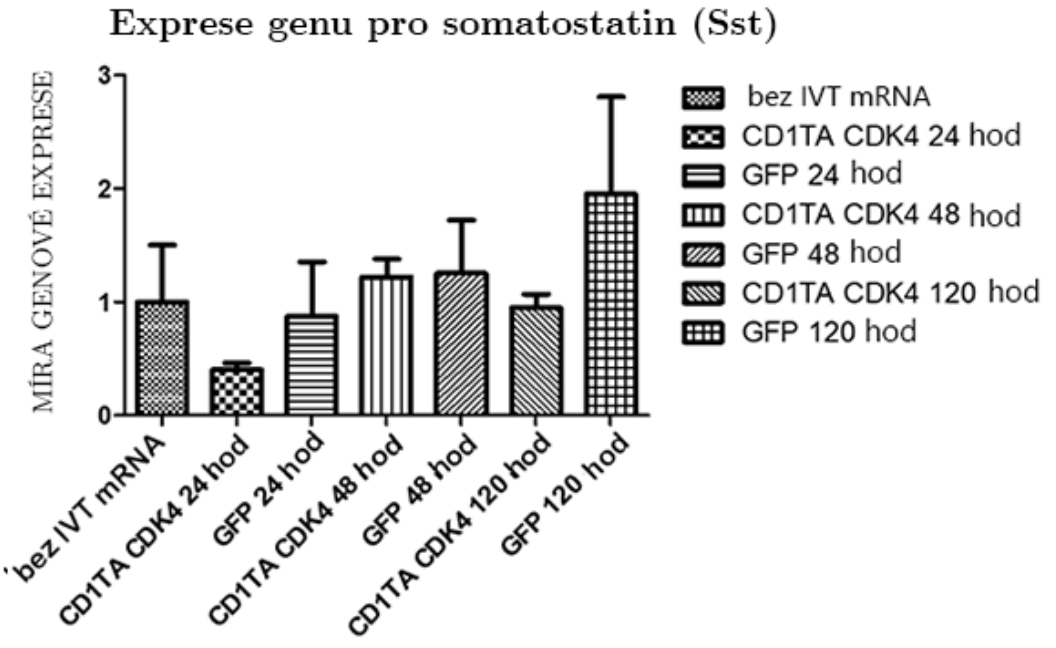
Graf 36: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Ins1 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.



Graf 37: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Ins2 buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.



Graf 38: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Gcg buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.



Graf 39: Vliv transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 na genovou expresi Sst buňkami Langerhansových ostrůvků 24, 48 a 120 hodin po transfekci. K vyloučení vlivu vektoru na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků byl testován vzorek ostrůvkových buněk transfekovaný IVT mRNA pro zelený fluorescenční protein (GFP). Statistická významnost vzorků vůči kontrolnímu vzorku bez přidané IVT mRNA je značena černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 4. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Výsledky exprese genu pro glukagon shrnuje graf 38 na straně 116.

Exprese genu pro somatostatin (Sst) klesla po 24 hodinách od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 o 27 % oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA. 48 a 120 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k nárůstu a stabilizaci exprese genu pro somatostatin na 1,2-1,3 násobek exprese Sst v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA.

Výsledky exprese genu pro somatostatin shrnuje graf 39 na straně 116.

4.3 Detekce poškození genomu pomocí nepřímé imunofluorescence

Průkaz detekce dvouvláknových zlomů (také DSB, z angl. *Double Strand Break*) na DNA (a poškození genomu byla, stejně jako v případě genové analýzy, provedena na buňkách Langerhansových ostrůvků transfekovaných IVT mRNA pro mutovanou formu cyklinu D1 (specificky T286A) a cyklin dependentní kinasu 4. Tato kombinace IVT mRNA byla zvolena na základě výsledků z průtokové cytometrie a jedná se o kombinaci IVT mRNA, která potencovala nejvyšší nárůst proliferace β-buněk a zároveň poskytla takový výsledek, který byl statisticky významný vůči většině testovaných kombinací IVT mRNA.

Dvouvláknové zlomy byly analyzovány pomocí fluorescenční mikroskopie a nepřímé imunofluorescence založené na interakci primární protilátky a histonem γ-H2AX (fosforylovaný histon H2AX, také γ-H2AX focci), jehož fosforylace probíhá primárně během DSB na DNA. Jako druhá nezávislá metoda studia poškození genomu byla využita metoda TUNEL, která je založena na začlenění modifikovaného nukleotidu na 3'-OH konce rozštěpené DNA a jeho následné imunofluorescenční vizualizaci. K statistickému vyhodnocení bylo využito jednofaktorového ANOVA testu s Tukey post-hoc analýzou.

Analýza snímků fluorescenční mikroskopie s γ-H2AX focci i snímků fragmentace DNA (TUNEL) byla provedena pomocí softwaru Adobe Photosphp CS.

4.3.1 Vliv IVT mRNA pro regulátory buněčného cyklu na tvorbu dvouvláknových zlomů v genomu β-buněk

V rámci detekce dvouvláknových zlomů genomu β-buněk vlivem transfekce IVT mRNA pro regulátory buněčného cyklu byla u buněk Langerhansových ostrůvků imunofluorescenčně detekována přítomnost fosforylovaného histonu H2AX. Histon H2AX je fosforylován v odpovědi na poškození genomu buňky vlivem DSB. Histon H2AX je zároveň fosforylován během přeměny transkripčně neaktivního heterochromatinu na transkripčně aktivní euchromatin a také během dalších, s transkripcí spojených, aktivit. na základě různých příčin fosforylace histonu H2AX byly v rámci analýzy γ-H2AX zavedeny 4 kategorie výsledků lišící se intenzitou signálu fosforylovaného histonu H2AX a počtu γ-H2AX focci. Jednotlivé kategorie a s nimi související procesy v buňkách shrnuje tabulka 38 (strana 119).

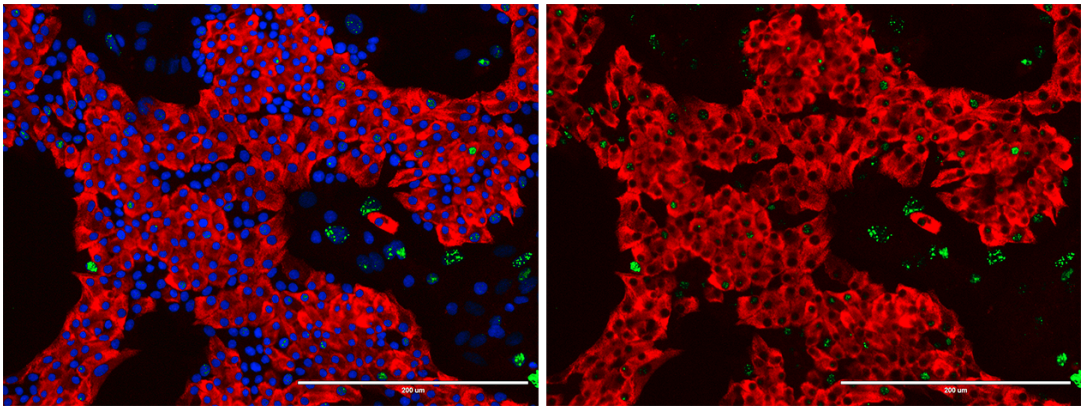
Intenzita signálu a počet γ-H2AX focci v rámci buňky souvisí s různými procesy, které se v buňce vyskytují a rozdělení buněk do těchto kategorií tak pomohlo odlišit buňky s jasným poškozením genomu od těch, které v důsledku buněčného dělení procházely vysokou transkripční aktivitou, atd.

Tabulka 38 | Kategorie výsledků detekce γ-H2AX focci. Kategorie byly zavedeny z důvodu různých příčin detekce γ-H2AX focci.

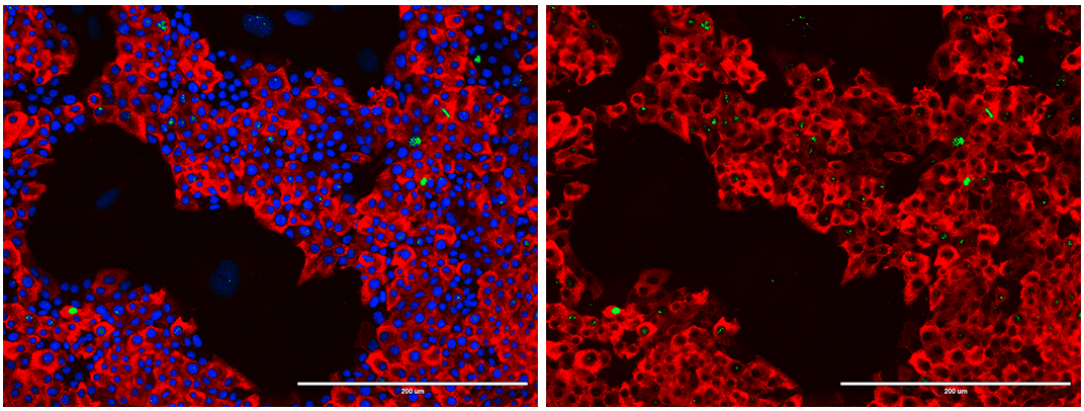
Kategorie	**Charaketristika kategorie**
β-buňky obsahující 1-2 H2AX focci	β-buňky obsahující 1-2 γ-H2AX focci, které mohou být přítomné v rámci oprav genomu v rámci životního cyklu buňky, transkripční aktivity buněk, nebo značící přítomnost centrosomů v rámci probíhající mitosy
β-buňky obsahující 3-10 H2AX focci	β-buňky obsahující 3-10 γ-H2AX focci, které vypovídají o vyšší transkripční aktivitě buňky, nebo mírném poškození genomu
β-buňky jasně pozitivní	β-buňky obsahující více jak 10 γ-H2AX focci, nebo buňky o vysoké intenzitě signálu, která jednoznačně vypovídá o přítomnosti DSB DNA
β-buňky jasně negativní	β-buňky neobsahující žádný signál o přítomnosti γ-H2AX focci, buňky bez transkripční aktivity, bez většího poškození genomu

Transfekovaná kombinace IVT mRNA (IVT mRNA pro mutovaný cyklin D1 a cyklin dependentní kinasu 4, CD1TA + CDK4) byla vybrána neboť poskytla nejlepší výsledky v rámci stimulace proliferace pankreatických β-buněk při analýze pomocí průtokové cytometrie. Výsledky shrnují, s ohledem na statistickou významnost, grafy 40, 41, 42 a 43 (dále v textu na stranách 122, 123, 124 a 125). Jako vzorek pozitivní kontroly byly použity buňky Langerhansových ostrůvků, jejichž kultivace probíhala v přítomnosti etoposidu (ETOP, koncentrace 30 μM), sloučeniny způsobující závažné poškození genomu doprovázené DSB. Jako vzorek negativní kontroly byly použity buňky Langerhansových ostrůvků bez jakékoliv transfekované IVT mRNA. Snímky vzorků z fluorescenčního mikroskopu 24, 48 a 120 hodin po transfekci IVT mRNA, stejně jako snímek pozitivní a negativní kontroly vyobrazují obrázky 15,16, 17, 18 a 19 na stranách 120 -121.

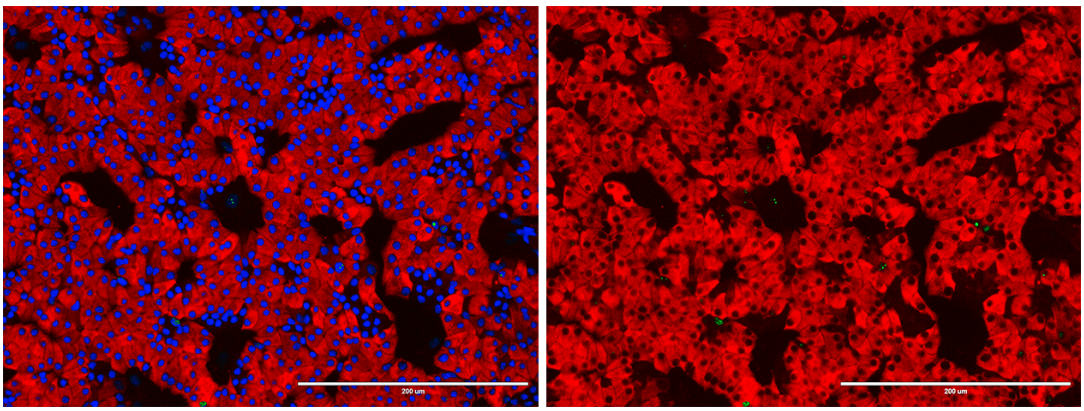
Obecně lze konstatovat, že IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 nezpůsobila po 24, 48 ani 120 hodinách od transfekce žádný statisticky významný rozdíl v rámci počtu γ-H2AX pozitivních β-buněk oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA a transfekce této IVT mRNA pro regulátory buněčného cyklu nezpůsobuje poškození genomu β-buněk.



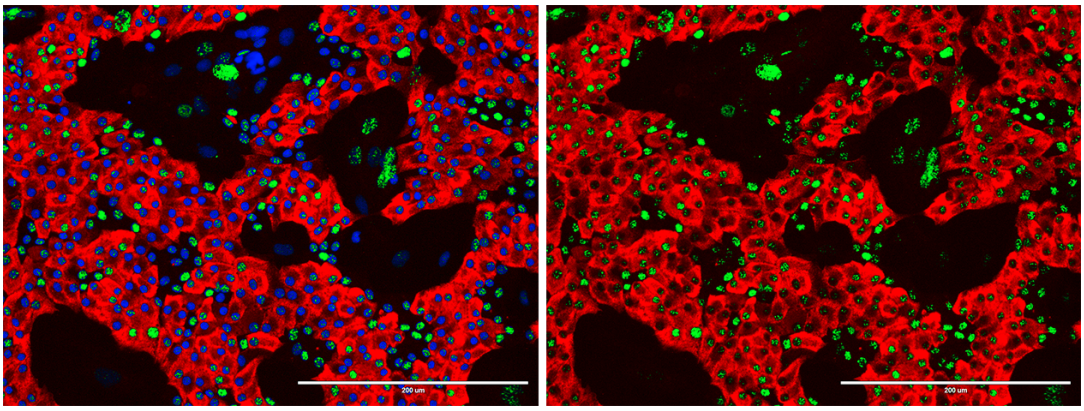
Obrázek 15: | Výsledky detekce γ-H2AX focci u buněk transfekovaných IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 po 24 hodinách od transfekce. Vlevo je snímek fluorescenčního mikroskopu, který zobrazuje jak přítomnost insulinu (červeně), tak přítomnost buněčných jader (modře) a γ-H2AX focci (zeleně). Vpravo je stejný snímek bez signálu buněčných jader, které častokrát překrývají signál γ-H2AX. Měřítko snímku je 200 μm.



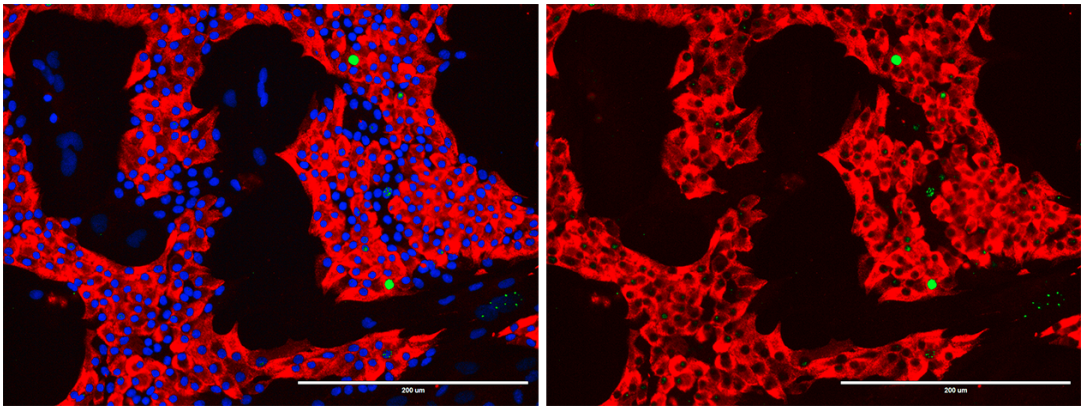
Obrázek 16: | Výsledky detekce γ-H2AX focci u buněk transfekovaných IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 po 48 hodinách od transfekce. Vlevo je snímek fluorescenčního mikroskopu, který zobrazuje jak přítomnost insulinu (červeně), tak přítomnost buněčných jader (modře) a γ-H2AX focci (zeleně). Vpravo je stejný snímek bez signálu buněčných jader, které častokrát překrývají signál γ-H2AX. Měřítko snímku je 200 μm.



Obrázek 17: | Výsledky detekce γ-H2AX focci u buněk transfekovaných IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 po 120 hodinách od transfekce. Vlevo je snímek fluorescenčního mikroskopu, který zobrazuje jak přítomnost insulinu (červeně), tak přítomnost buněčných jader (modře) a γ-H2AX focci (zeleně). Vpravo je stejný snímek bez signálu buněčných jader, které častokrát překrývají signál γ-H2AX. Měřítko snímku je 200 μm.



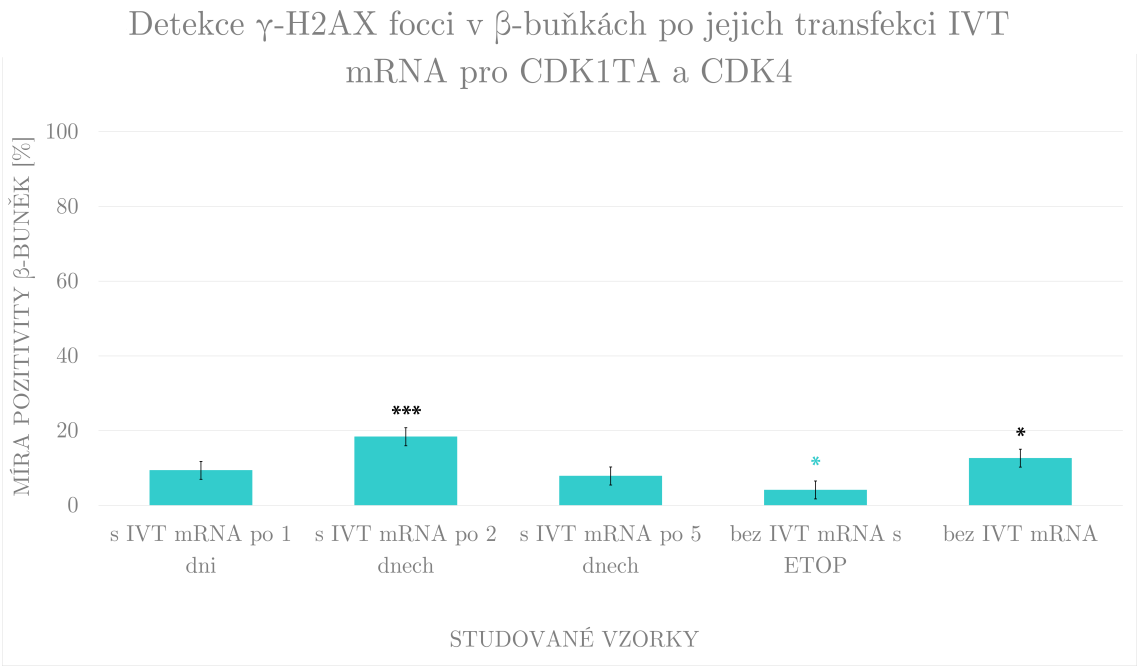
Obrázek 18: | Výsledky detekce γ-H2AX focci u buněk pozitivní kontroly (buňky Langerhansových ostrůvků s bez transfekované IVT mRNA s přidaným etoposidem, ETOP). Vlevo je snímek fluorescenčního mikroskopu, který zobrazuje jak přítomnost insulinu (červeně), tak přítomnost buněčných jader (modře) a γ-H2AX focci (zeleně). Vpravo je stejný snímek bez signálu buněčných jader, které častokrát překrývají signál γ-H2AX. Měřítko snímku je 200 μm.



Obrázek 19: | Výsledky detekce γ-H2AX focci u buněk negativní kontroly bez transfekované IVT mRNA. Vlevo je snímek fluorescenčního mikroskopu, který zobrazuje jak přítomnost insulinu (červeně), tak přítomnost buněčných jader (modře) a γ-H2AX focci (zeleně). Vpravo je stejný snímek bez signálu buněčných jader, které častokrát překrývají signál γ-H2AX. Měřítko snímku je 200 μm.

KATEGORIE I: *β-buňky obsahující 1-2 γ-H2AX focci*

Během buněčného metabolismu vzniká přirozeně určité množství ROS, které mohou v různé míře poškodit genom buňky. Malé množství DSB vzniká také během transkripce vlivem nedokonalosti eukaryotických transkripčních enzymů. Nízký počet γ-H2AX focci je tak spjat s poškozením genomu, který buňka získává v důsledku své funkce. Výsledky měření společně se statistickou významností jednotlivých vzorků vůči negativnímu a pozitivnímu kontrolnímu vzorku shrnuje graf 40 na straně 122.



Graf 40: | Souhrn výsledků analýzy poškození β-buněčného genomu pomocí detekce γ-H2AX focci. Testovány byly buňky Langerhansových ostrůvků transfekované IVT mRNA pro CD1TA + CDK4. Analýza buněk byla prováděna 24, 48 a 120 hodin po transfekci. Statistické vyhodnocení je znázorněno pomocí hvězdiček. Statistická významnost vzorků vůči negativnímu kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA je znázorněna červenými hvězdičkami. Statistická významnost vzorků vůči pozitivnímu kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA s ETOP je znázorněna černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 3.

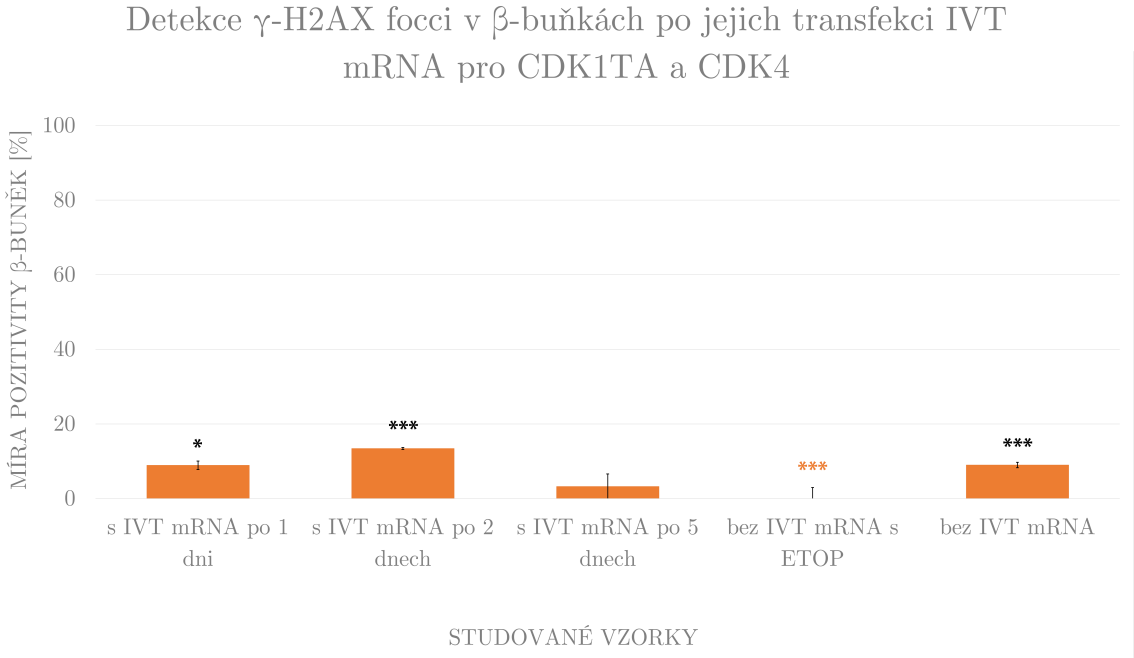
Po 24 hodinách od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k mírnému poklesu v počtu β-buněk obsahujících 1-2 γ-H2AX focci. Ve vzorku bylo 24 hodin po transfekci danou kombinací IVT mRNA 9,4 % β-buněk vykazujících 1-2 γ-H2AX focci, jedná se tedy přibližně o 25% pokles v počtu β-buněk oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA, ve kterém bylo přítomno 12,6 % β-buněk obsahujících 1-2 γ-H2AX focci.

48 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo ve vzorku transfekovaném danou kombinací IVT mRNA k 50% nárůstu β-buněk obsahujících 1-2 γ-H2AX focci (18,4 % β-buněk obsahujících 1-2 γ-H2AX focci ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4, 12,6 % β-buněk obsahujících 1-2 γ-H2AX focci v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA).

Po 120 hodinách došlo k opětovanému snížení β-buněk obsahujících 1-2 γ-H2AX focci. Ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 obsahovalo 1-2 γ-H2AX focci pouze 7,85 % β-buněk. V kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA obsahovalo 1-2 γ-H2AX focci 12,6 % β-buněk.

KATEGORIE II: ***β-buňky obsahující 3-10 γ-H2AX focci***

Signál o nižší intenzitě neznačí jednoznačně probíhající DSB DNA, nicméně vysoký počet γ-H2AX focci naznačuje probíhající poškození DNA jiným způsobem než DSB. Výsledky z měření shrnuje graf 41.



Graf 41: Souhrn výsledků analýzy poškození β-buněčného genomu pomocí detekce γ-H2AX focci. Testovány byly buňky Langerhansových ostrůvků transfekované IVT mRNA pro CD1TA + CDK4. Analýza buněk byla prováděna 24, 48 a 120 hodin po transfekci. Statistické vyhodnocení je znázorněno pomocí hvězdiček. Statistická významnost vzorků vůči negativnímu kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA je znázorněna oranžovými hvězdičkami. Statistická významnost vzorků vůči pozitivnímu kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA s ETOP je znázorněna černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 3.

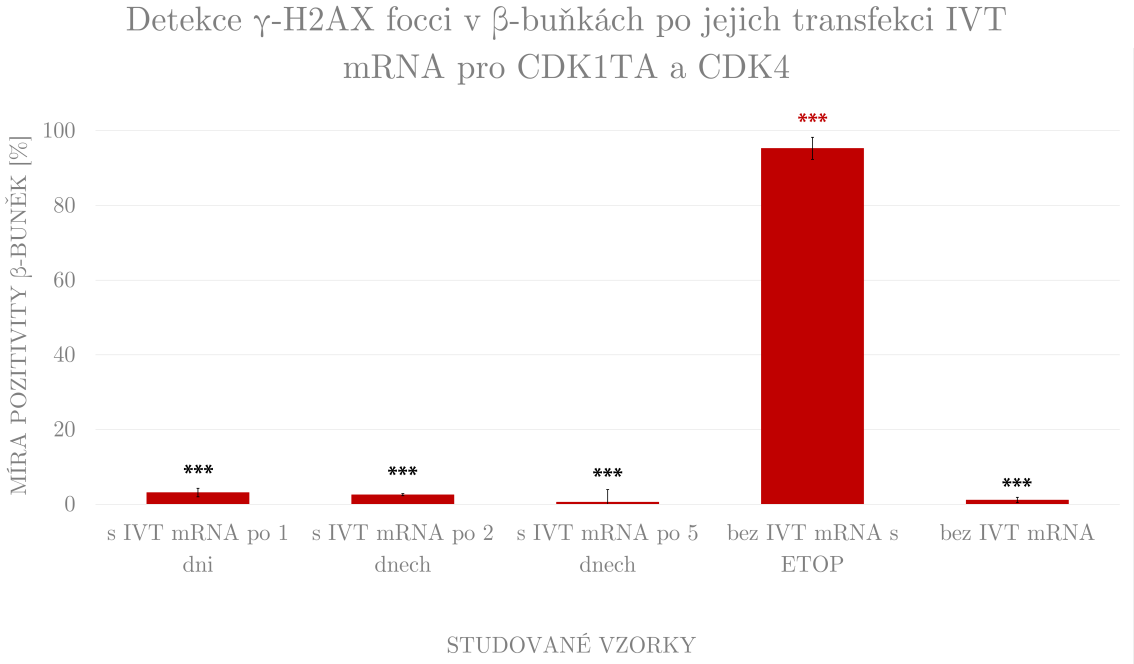
Transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 nepřinesla po 24, 48 ani 120 hodinách od transfekce žádný statisticky významný rozdíl v rámci počtu β-buněk obsahujících 3-10 H2AX focci oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA.

Po 24 hodinách od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 nepřinesla prakticky žádný rozdíl v množství β-buněk obsahujících 3-10 γ-H2AX focci oproti kontrolnímu vzorku (9 % β-buněk obsahujících 3-10 γ-H2AX focci po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4, 9 % β-buněk obsahujících 3-10 γ-H2AX focci bez transfekce IVT mRNA).

Po 48 hodinách od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 bylo u vzorku transfekovaného IVT mRNA detekováno 1,5 krát více β-buněk obsahujících 3-10 H2AX focci oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA (13,4 % β-buněk obsahujících 3-10 H2AX focci ve vzorku transfekovaných IVT mRNA pro CD1TA + CDK4, 9 % β-buněk obsahujících 3-10 H2AX focci bez transfekce IVT mRNA.

KATEGORIE III: ***β-buňky jasně pozitivní na γ-H2AX***

Signál o vysoké intenzitě značí při detekci γ-H2AX probíhající dvouvláknové zlomy na DNA. Výsledky měření, společně s přihlédnutím ke statistické významnosti jasně pozitivních β-buněk, shrnuje graf 42



Graf 42: Souhrn výsledků analýzy poškození β-buněčného genomu pomocí detekce γ-H2AX focci. Testovány byly buňky Langerhansových ostrůvků transfekované IVT mRNA pro CD1TA + CDK4. Analýza buněk byla prováděna 24, 48 a 120 hodin po transfekci. Statistické vyhodnocení je znázorněno pomocí hvězdiček. Statistická významnost vzorků vůči negativnímu kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA je znázorněna červenými hvězdičkami. Statistická významnost vzorků vůči pozitivnímu kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA s ETOP je znázorněna černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 3.

Po 24 hodinách od transfekce buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro CD1 + CDK4 bylo ve vzorku přítomno 2,7 krát více pozitivních β-buněk (vykazujících dvouvláknové zlomy DNA) oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA (3 % β-buněk vykazují dvouvláknové zlomy na DNA, 1 % pozitivních β-buněk v kontrolním vzorku bez transfekované IVT).

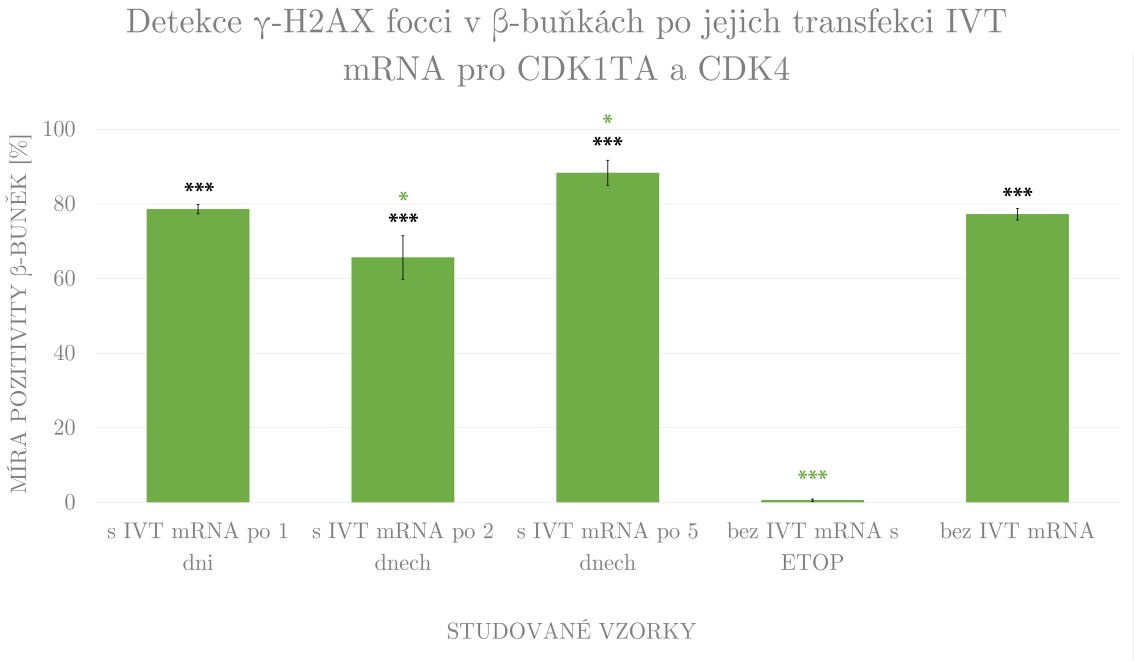
Po 48 hodinách od transfekce buněk Langerhansových ostrůvků pomocí IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 bylo ve vzorku detekováno pouze 2,2 krát více pozitivních β-buněk oproti kontrolnímu vzorku (ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 bylo přítomno 2,5 % buněk vykazujících poškození genomu, kontrolní vzorek bez transfekované IVT mRNA vykazoval 1 % pozitivních β-buněk na DSB).

Po 120 hodinách došlo ve vzorku, který byl transfekován IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 k výraznému poklesu pozitivity β-buněk a pozitivních β-buněk bylo ve vzorku o polovinu méně oproti kontrolnímu vzorku (0,5 % pozitivních β-buněk po transfekci

IVT mRNA pro CD1TA + CDK4, 1 % pozitivních β-buněk ve vzorku bez transfekce IVT mRNA).

KATEGORIE IV: *β-buňky jasně negativní na γ-H2AX*

Jasně negativní buňky byly takové, které nevykazovaly žádný signál na γ-H2AX. Jedná se o buňky, u kterých nedocházelo k žádnému poškození genomu. Výsledky s ohledem na statistickou významnost negativních buněk shrnuje graf 43.



Graf 43: Souhrn výsledků analýzy poškození β-buněčného genomu pomocí detekce γ-H2AX focci. Testovány byly buňky Langerhansových ostrůvků transfekované IVT mRNA pro CD1TA + CDK4. Analýza buněk byla prováděna 24, 48 a 120 hodin po transfekci. Statistické vyhodnocení je znázorněno pomocí hvězdiček. Statistická významnost vzorků vůči negativnímu kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA je znázorněna zelenými hvězdičkami. Statistická významnost vzorků vůči pozitivnímu kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA s ETOP je znázorněna černými hvězdičkami. $*$ odpovídá $p \leq 0,05$, $**$ odpovídá $p \leq 0,01$, $***$ odpovídá $p \leq 0,0001$, n = 3.

24 hodin po transfekci bylo množství negativních β-buněk ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 rovno množství β-buněk ve vzorku negativní kontroly bez transfekované IVT mRNA. Ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 bylo přítomno 78,6 % negativních β-buněk na přítomnost γ-H2AX focci. Kontrolní vzorek bez transfekované IVT mRNA obsahoval 77,2 % negativních β-buněk.

Po 48 hodinách od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 došlo k 20% poklesu v počtu negativních buněk na přítomnost γ-H2AX oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA. Ve vzorku transfekovaném IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 bylo přítomno 65,6 % γ-H2AX negativních β-buněk, v kontrolním vzorku bez transfekované IVT mRNA bylo přítomno 77,2 % negativních β-buněk.

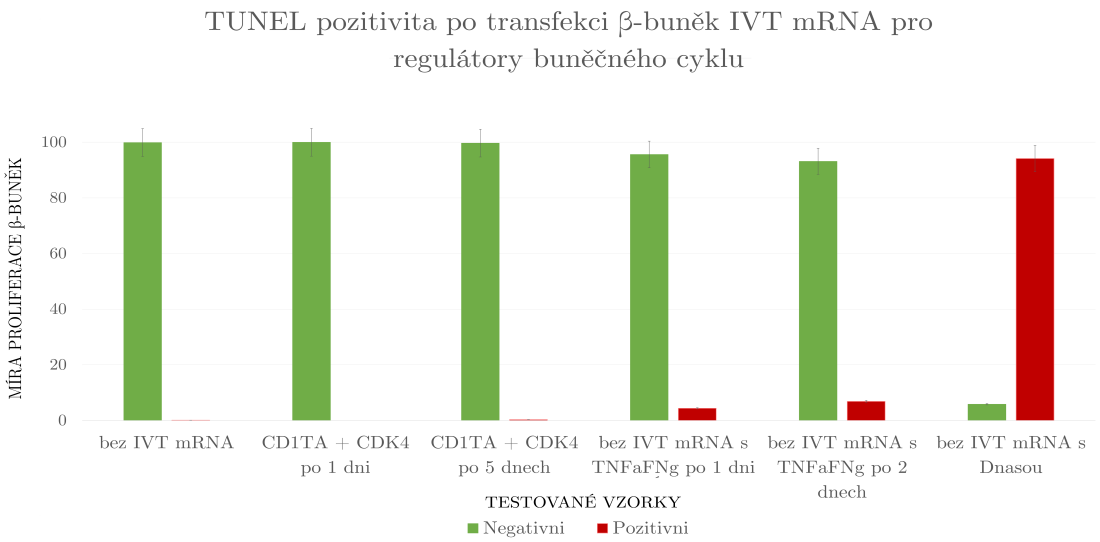
120 hodin od transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 bylo ve vzorku přítomno 1,5 krát více negativních buněk než v případě kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA. Ve vzorku transfekovaném danou kombinací regulátorů buněčného cyklu bylo přítomno 88,3 % β-buněk bez přítomnosti γ-H2AX focci. V kontrolním vzorku bylo přitom přítomno 77,2 % negativních β-buněk.

4.3.2 Vliv IVT mRNA pro regulátory buněčného cyklu na fragmentaci DNA β-buněk

V rámci studia vlivu transfekce IVT mRNA na buněčný cyklus a prosperitu β-buněk byla sledována také míra apoptosy β-buněk po jejich transfekci syntetickými kombinacemi IVT mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy. Míra apoptosy byla detekována pomocí metody TUNEL, která specificky detekuje fragmentaci DNA, jenž je charakteristická pro finální fázi programované buněčné smrti. Analyzovány byly vzorky transfekované IVT mRNA pro mutovanou formu cyklinu D1 a cyklin dependentní kinasu 4 (CD1TA + CDK4), neboť tato kombinace byla na základě předchozích analýz potvrzena jako kombinace IVT mRNA potencující nejvyšší nárůst míry proliferace β-buněk a má tak největší terapeutický potenciál.

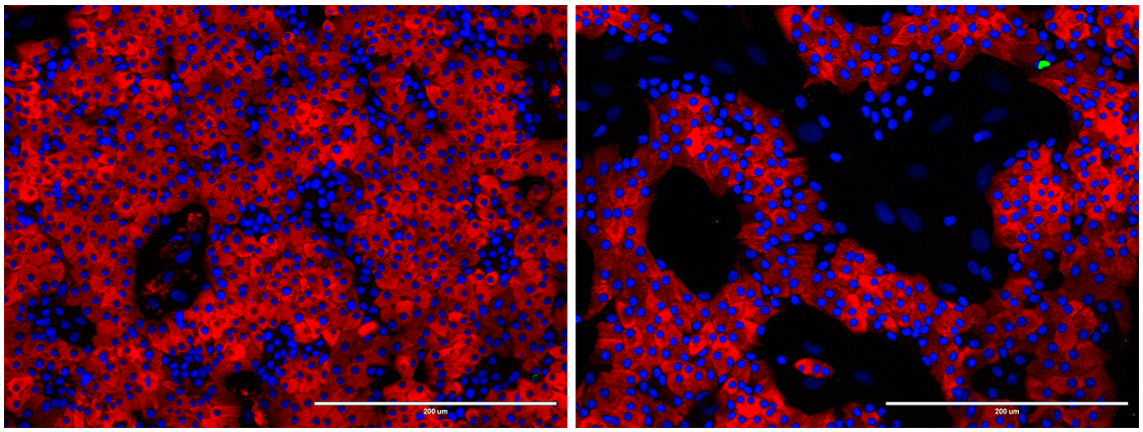
Vzorky transfekované IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byly analyzovány 1 a 5 dní po transfekci. Jako super-pozitivní kontrolní vzorek ověřující správnost provedení experimentu byly použity buňky, jejichž genom byl poškozen působením deoxyribonukleasy se zvýšenou aktivitou (tzv. Turbo DNasa). Druhým vzorkem pozitivní kontroly, který měl za úkol simulovat *in vivo* procesy probíhající při patologii *diabetu mellitu* byly použity buňky Langerhansových ostrůvků ovlivněné působením kombinace cytokinů TNFα a IFNγ. Apoptosa u β-buněk ovlivněných cytokiny byla sledována 1 a 2 dny po přidání cytokinů do média. Výsledky měření shrnuje graf 44.

Z grafu 44 vyplývá, že transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 nijak nepřispívá k nárůstu apoptosy β-buněk 24, ani 120 hodin po transfekci, neboť je počet



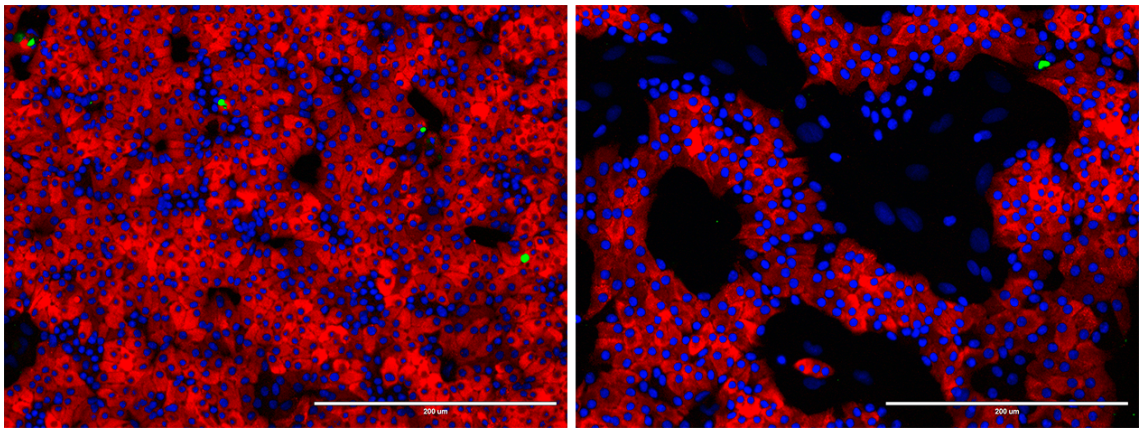
Graf 44: Souhrn výsledků analýzy β-buněčné apoptosy ve vzorcích (zleva) bez transfekované IVT mRNA, s transfekovanou IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 po 1 dni po transfekci, s transfekovanou IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 5 dnů po transfekci, s adicí prozánětlivých cytokinů TNFα a IFNγ 1 dnu po přidání, s adicí prozánětlivých cytokinů TNFα a IFNγ 2 dnu po přidání a vzorku s adicí deoxyribonukleasy, n = 1.

pozitivních buněk minimální (podrobnější výsledky dále v textu). V případě ovlivnění buněk pro-zánětlivými cytokiny TNFα dochází k nárůstu apoptosy β-buněk Langerhansových ostrůvků.



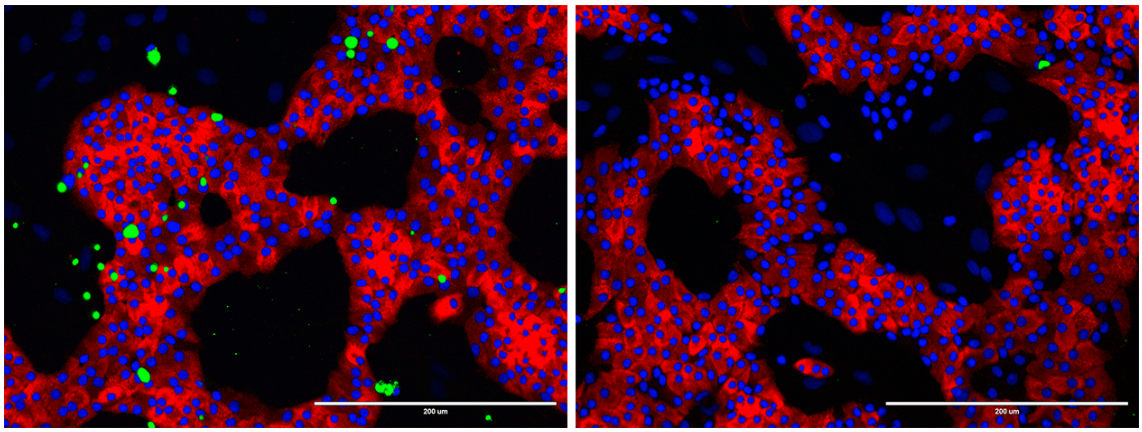
Obrázek 20: Snímek fluorescenčního mikroskopu metody TUNEL 1 den po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 (vlevo) v porovnání se vzorkem bez transfekované IVT mRNA (vpravo). Červeně je značen insulin, modře jsou značena jádra, zeleně je značena fragmentace DNA zapříčiněná apoptosou. Měřítko každého snímku je 200 μm.

Porovnání apoptosy β-buněk Langerhansových ostrůvků 1 a 5 dnů po transfekci buněk IVT mRNA v porovnání s kontrolním vzorkem bez transfekce IVT mRNA shrnují obrázky 20 a 21. Míra apoptosy u kontrolního vzorku bez transfekované IVT mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy byla na základě analýzy fluorescenčních snímků stanovena na 0,6 % (tj. 6 pozitivních β-buněk z 1000).



Obrázek 21: Snímek fluorescenčního mikroskopu metody TUNEL 5. den po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 (vlevo) v porovnání se vzorkem bez transfekované IVT mRNA (vpravo). Červeně je značen insulin, modře jsou značena jádra, zeleně je značena fragmentace DNA zapříčiněná apoptosou. Měřítko každého snímku je 200 μm.

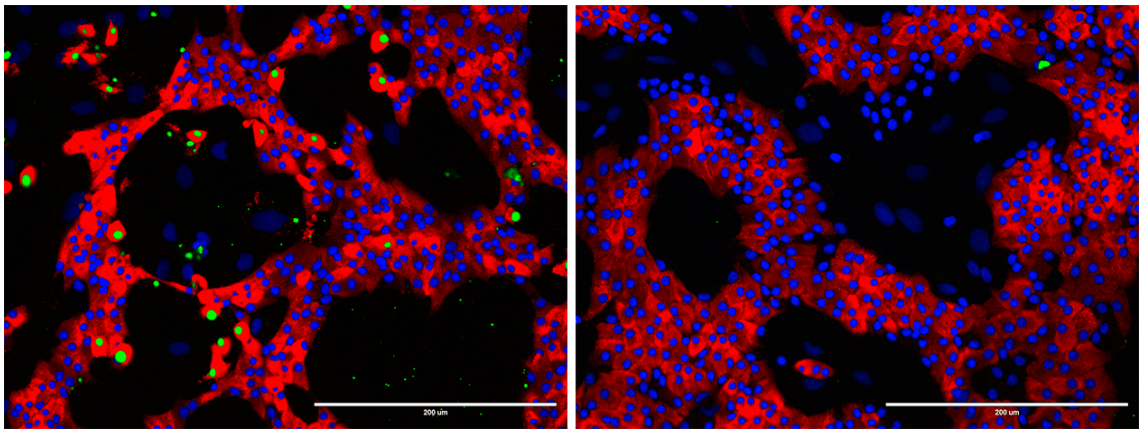
První den po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků pomocí IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 odpovídala míra apoptosy β-buněk 0 % (tj. 100 % buněk přítomných ve vzorku bylo negativních na TUNEL a nedocházelo u nich k fragmentaci DNA). 5 dnů po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byla zaznamenána 0,3 % míra apoptosy (tj. 3 pozitivní β-buňky z 1000).



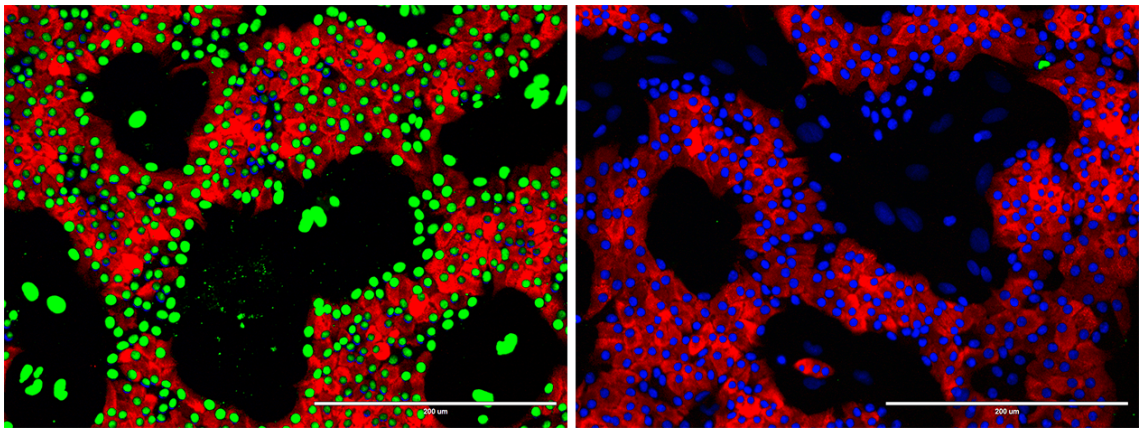
Obrázek 22: Snímek fluorescenčního mikroskopu metody TUNEL 1. den po přidání prozánětlivých cytokinů k buňkám Langerhansových ostrůvků (vlevo) v porovnání s kontrolním vzorkem bez adice cytokinů (vpravo). Oba vzorky představují buňky Langerhansových ostrůvků bez transfekované IVT mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy..Ze snímku je patrný výrazný úbytek v počtu buněk v důsledku probíhající apoptosy. Červeně je značena přítomnost insulinu, modře jsou značena jádra, zeleně je značena fragmentace DNA zapříčiněná apoptosou. Měřítko každého snímku je 200 μm.

Po přidání prozánětlivých cytokinů k buňkám Langerhansových ostrůvků došlo ke zvýšení míry apoptosy jak 1, tak 2 dny po přidání. První den po přidání prozánětlivých cytokinů byla detekována 1,9 % míra apoptosy u β-buněk Langerhansových ostrůvků (viz. obrázek 22. Dva dny od přidání prozánětlivých cytokinů byla apoptosa pozorována u 6,9 % β-buněk (viz. obrázek 23).

Vzorek pozitivní kontroly, který byl v průběhu provedení metody TUNEL inkubován s enzymem deoxyribonukleasou zapřičiňujícím fragmentaci DNA, vykazoval pozitivní signál v průměru u 94,1 % β-buněk přítomných ve vzorku. Působení deo-



Obrázek 23: Snímek fluorescenčního mikroskopu metody TUNEL 2. den po přidání prozánětlivých cytokinů k buňkám Langerhansových ostrůvků (vlevo) v porovnání s kontrolním vzorkem bez přidání cytokinů (vpravo). Oba vzorky představují buňky Langerhansových ostrůvků bez transfekované IVT mRNA pro cykliny a cyklin dependentní kinasy. Ze snímku je patrný výrazný úbytek v počtu buněk v důsledku probíhající apoptosy. Červeně je značena přítomnost insulinu, modře jsou značena jádra, zeleně je značena fragmentace DNA zapříčiněná apoptosou. Měřítko každého snímku je 200 μm.



Obrázek 24: Snímek fluorescenčního mikroskopu metody TUNEL vzorku obsahujícího deoxyribonukleasu zapřičiňující štěpení endogenní DNA (vlevo) v porovnání s kontrolním vzorkem bez přidání DNasy (vpravo). Červeně je značena přítomnost insulinu, modře jsou značena jádra, zeleně je značena fragmentace DNA zapříčiněná deoxyribonukleasou. Měřítko každého snímku je 200 μm.

xyribonukleasy shrnuje obrázek 24.

5 DISKUSE

Tato diplomová práce se zabývá studiem vlivu *in vitro* transfekovaných IVT mRNA pro časné regulátory buněčného cyklu na proliferaci, genovou expresi a poškození genomu potkaních pankreatických β-buněk. Informace získané v rámci této práce mohou být využity k vývoji léčebných postupů v rámci onemocnění *diabetes mellitus I.* a *II.* typu a mohou přispět k pochopení molekulárních mechanismů funkce dospělých β-buněk.

V rámci diplomové práce byl postupně testován vliv 6 různých kombinací IVT mRNA pro cykliny rodiny D a k nim příslušné cyklin dependentní kinasy (CDK4, CDK6) na proliferaci potkaních pankreatických β-buněk. Na základě výsledků byla následně vybrána kombinace IVT mRNA, která potencovala nejvyšší nárůst míry proliferace β-buněk (CD1T286A + CDK4) a následující pokusy probíhaly pouze na buňkách transfekovaný touto kombinací IVT mRNA. V dalších krocích byl postupně sledován vliv IVT mRNA CD1TA + CDK4 na genovou expresi buněk Langerhansových ostrůvků a její vliv na poškození genomu a realizaci apoptosy.

V rámci této diplomové práce bylo prokázáno, že : 1) transfekce synteticky připravených IVT mRNA pro cykliny D v kombinaci s cyklin dependentními kinasami 4 a 6 podporuje proliferaci pankreatických β-buněk, přičemž 2) nejpotentnější kombinací IVT mRNA časných cyklinů je v tomto směru mutovaná forma cyklinu D1 (CD1TA) v kombinaci s cyklin dependentní kinasou 4 (CDK4); 3) transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 způsobuje 24 a 48 hodin po transfekci více, či méně patrnou změnu v genové expresi genů souvisejících s buněčným cyklem, prosperitou a funkcí β-buněk; 4) transfekce synteticky připravené IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 podporuje transkripční aktivitu buněk, avšak nezpůsobuje vážné poškození genomu vlivem dvouvláknových zlomů, či jiných procesů, které ústí v apoptosu; 5) vliv vektoru (IVT mRNA) nijak neovlivňuje výsledky této práce s výjimkou genové exprese genů pro proproteinkonvertasu 1, proproteinkonvertasu 2 a cyklin dependentní kinasu 6.

Transfekce synteticky připravených IVT mRNA pro cykliny D v kombinaci s cyklin dependentními kinasami 4 a 6 podporuje proliferaci pankreatických β-buněk

Na základě výsledků z průtokové cytometrie je patrné, že všechny z testovaných kombinací IVT mRNA pro časné cykliny a cyklin dependentní kinasy stimulovaly proliferaci pankreatických β-buněk. Tyto výsledky jsou konzistentní se skutečností, že zvýšená exprese časných regulátorů buněčného cyklu podporuje $G_0/G_1/S$ přechod β-buněk a usnadňuje tak vstup do buněčného cyklu hyperfosforylací retino-

blastomového proteinu u lidí i hlodavců, jak potvrzují i další studie na toto téma [21, 39, 40, 150]. Ačkoliv zvýšená exprese cyklinů D a k nim patřičných cyklin dependentních kinas stimuluje proliferaci ostrůvkových β-buněk lidí i hlodavců, existují mezi těmito skupinami určité rozdíly. Zatímco lidské β-buňky poskytují vyšší míru proliferace po stimulaci buněčného cyklu cyklin dependentní kinasou 6, proliferaci potkaních a myších β-buněk lépe stimuluje zvýšená exprese cyklin dependentní kinasy 4 [40, 151], která je pro hlodavce zároveň esenciálním regulátorem postembryonálního vývoje pankreatu [45, 152]. Tato skutečnost se promítá i do výsledků této práce, kdy nejvyšší míru proliferace potkaních β-buněk stimulovala právě kombinace IVT mRNA pro CD1TA v kombinaci s cyklin dependentní kinasou 4.

Hlavní regulační molekulou lidských β-buněk je cyklin dependentní kinasa 6, která je schopna navodit proliferaci lidských β-buněk i v případě, že je do β-buněk transfekována bez příslušného cyklinu [40]. CDK6 v lidských buňkách asociuje s cyklinem D3, který je stěžejní pro správný vývoj a funkci lidských β-buněk a jehož delece způsobuje vznik *diabetu mellitu* [149]. V potkaních β-buňkách plní cyklin D3 ochrannou funkci a k proliferaci výrazně nepřispívá [4] jak je patrné i z detekce vlivu IVT mRNA pro časné regulátory buněčného cyklu pomocí pomocí průtokové cytometrie, kdy kombinace IVT mRNA obsahující mRNA pro cyklin D3 přinesly celkově jedny z nejnižších výsledků.

Nejpotentnější kombinací IVT mRNA časných cyklinů je v tomto směru mutovaná forma cyklinu D1 (CD1T286A) v kombinaci s cyklin dependentní kinasou 4 (CDK4)

Schopnost cyklinů rodiny D fosforylovat retinoblastomový protein je založena na jejich snadné aktivaci pomocí extracelulárních mitogenních signálů, ale také na jejich vlastní nízké stabilitě a krátkém poločasu rozpadu v nepřítomnosti vazebného partnera v podobě CDK. V případě absence mitogenního signálu tak dochází k rychlé deaktivaci drah, které by jinak vedly k aktivaci a překonání G_1/S kontrolního bodu buněčného cyklu.

Záměna aminokyseliny threonin na pozici 286 za aminokyselinu alanin (T286A) v polypeptidovém řetězci cyklinu D1 prodlužuje poločas rozpadu cyklinu D1 přibližně 6 krát [153]. Znemožnění fosforylace a následné ubikvintinylace tak poskytuje delší mitogenní stimul a vyšší pravděpodobnost překonání G_1/S buněčného přechodu β-buněk.

IVT mRNA pro T286A mutant cyklinu D1 v kombinaci s, pro potkaní β-buňky esenciální, cyklin dependentní kinasou 4 tak byla schopna zajistit nejvyšší nárůst proliferace β-buněk Langerhansových ostrůvků potkanů. Zvýšení míry proliferace potkaních β-buněk po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 zároveň přineslo

statisticky významné rozdíly oproti kontrolnímu vzorku a oproti některým vzorkům z ostatních testovaných skupin IVT mRNA.

Transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 způsobuje 24 a 48 hodin po transfekci změny v expresi genů souvisejících s buněčným cyklem, prosperitou a funkcí β-buněk

Během proliferace buňky přepisují velké množství genů, které jsou nutné pro zajištění replikace DNA, kontrolu integrity genomu a úspěšné rozdělení genetického materiálu při mitose. Většina diferencovaných buněk podstupuje v návaznosti na mitosu částečnou dediferenciaci, tedy posunutí metabolismu buňky k dřívějšímu vývojovému stádiu, která má zajistit aklimatizaci nově vzniklé buňky na podmínky prostředí před tím, než začne plně plnit svou funkci v organismu [154]. V rámci této diplomové práce byly sledovány geny související s průběhem buněčného cyklu, funkcí a identitou β-buněk.

K největší pozitivní změně exprese analyzovaných genů docházelo zpravidla po 24 hodinách od transfekce vzorku Langerhansových ostrůvků danou kombinací IVT mRNA, přičemž statisticky významný rozdíl oproti kontrolnímu vzorku přinesly geny pro cykliny rodiny A, B, E a cyklin dependentní kinasy 1 a 2. Zároveň bylo pozorováno mírné snížení exprese genů pro cykliny rodiny D a cyklin dependentní kinasu 4. Tyto výsledky byly očekávané, neboť transfekcí časných regulátorů buněčného cyklu byla aktivována transkripce pozdních cyklinů a genů podílejících se na úspěšném dokončení buněčného cyklu. O aktivně probíhající replikaci nasvědčuje i zvýšená genová exprese aurory kinasy B, která se podílí na anafázi a telofázi mitosy. Transfekcí cyklinu D1 s prodlouženým poločasem rozpadu a CDK4 byl v buňkách Langerhansových ostrůvků stimulován silný mitogenní signál a patrně v důsledku negativní zpětné vazby došlo k poklesu transkripce genů pro cykliny rodiny D a cyklin dependentní kinasu 4.

Parciální dediferenciace β-buněk byla sledována pomocí genové exprese transkripčních faktorů Pdx1 a MafA, které se mimo jiné podílí na regeneraci a diferenciaci pankreatických β-buněk [76, 77]. Pokles v genové expresi Pdx1 24 hodin po transfekci kombinace CD1TA + CDK4 IVT mRNA může nasvědčovat mírnému posunu v charakteru β-buněk k nediferencované formě, neboť Pdx1 je zodpovědný za transkripci řady genů důležitých pro funkci β-buněk [84]. Pokles genové exprese transkripčního faktoru Pdx1 24 hodin po transfekci buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 následovaný nárůstem genové exprese Pdx1 po 120 hodinách od transfekce pozitivně koreluje s výsledky, které ve své práci uvádí Fujimoto a Polonsky (2009). Stejný vzor, jako lze pozorovat v případě genové exprese Pdx1, následuje také transkripční faktor MafA. Podobné chování transkripčních fak-

torů souhlasí s výsledky nezávislých studií [76].

O postupném návratu β-buněk do plně maturovaného stavu svědčí kromě zvýšení transkripce β-buněčných transkripčních faktorů (Pdx1, MafA, Nkx2-2 a Nkx6-1) v období 120 hodin po transfekci také útlum transkripce genů pro LdhA a Sst doprovázený zvýšením transkripce genů pro insulin v čase 120 hodin po transfekci.

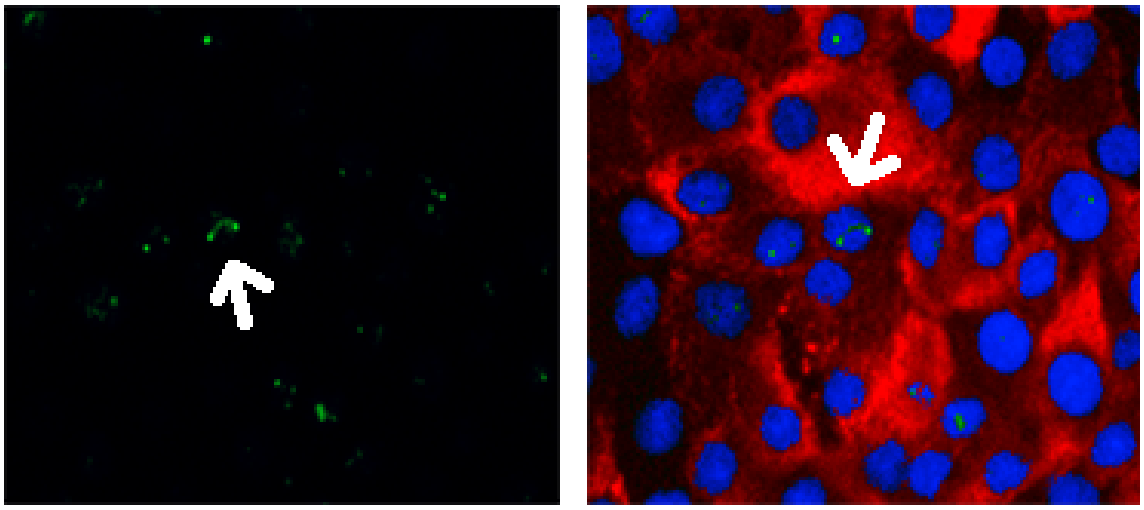
Zvýšená exprese inhibitorů p57 a p19 v období 24 a 48 hodin po transfekci může nasvědčovat aktivní opravě buněčného genomu v rámci chyb vzniklých při replikaci. Zvýšená exprese specifických inhibitorů komplexů cyklin D-CDK4/6 (p16, p18) může souviset s útlumem replikace po odeznění mitogenního signálu v podobě transfekce IVT mRNA pro CD1TA + CDK4.

Transfekce synteticky připravené IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 podporuje transkripční aktivitu buněk, avšak nezpůsobuje vážné poškození genomu vlivem dvouvláknových zlomů, či jiných procesů, které ústí v apoptosu

Vysoká míra proliferace způsobuje ve spojitosti s replikací DNA a mitosou zvýšenou úroveň buněčného stresu. V důsledku vysoké metabolické aktivity buněk během buněčného cyklu dochází ke vznikům různých forem ROS, které mohou poškozovat genom buněk. Pokud je poškození genomu pro buňky neúnosné, dochází k realizaci apoptosy. Z těchto důvodů byla u β-buněk Langerhansových ostrůvků provedena detekce míry dvouvláknových zlomů DNA (pomocí detekce fosforylovaného histonu H2AX) a apoptosy (pomocí metody TUNEL). Výsledky detekce γ-H2AX a TUNEL neposkytly žádné statisticky významné rozdíly v rámci poškození β-buněčného genomu oproti kontrolnímu vzorku. Tyto výsledky dokazují, že transfekce synteticky připravené IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 nezpůsobuje poškození β-buněčného genomu v případě transfekce *in vitro*.

V rámci analýzy TUNEL bylo detekováno snížení apoptosy β-buněk oproti kontrolnímu vzorku 120 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4. Toto snížení v množství apoptotických β-buněk může nasvědčovat protektivním vlastnostem cyklinů rodiny D [4].

Zvýšený počet 1-2 γ-H2AX focci detekovaných v β-buňkách během prvních dnů po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 může souviset s vysokou genovou expresí aurory kinasy B 24 a 48 hodin po transfekci IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 jak dokládají výsledky z qRT-PCR. AurkB je zodpovědná za fosforylaci histonu H10, čímž zajišťuje kondenzaci chromosomů a průběh cytokinese během mitosy [155]. Aktivace AurkB probíhá pomocí AurkB-zprostředkované fosforylace histonu H2AX v oblasti centromery jak ve své práci uvádí Shimada a kol. (2016), [156]. V rámci této diplomové práce byly přitom během detekce γ-H2AX focci pozorovány útvary



Obrázek 25: |γ-H2AX focci (zeleně) buněk Langerhansových ostrůvků transfekovaných IVT mRNA pro CD1TA + CDK4. Snímek vlevo zobrazuje přítomnost histonu γ-H2AX, která tvarem a rozložením signálu připomíná dělící vřeténko (buňka označena bílou šipkou). Vpravo se nachází stejný snímek, avšak se signálem γ-H2AX (zeleně), signálem buněčných jader (modře) a přítomností insulinu (červeně). Měřítko každého snímku je 200 μm.

podobající se anafáznímu dělícímu vřeténku (obrázek 25, strana 133).

Vliv vektoru (IVT mRNA) nijak neovlivňuje výsledky této práce s výjimkou genové exprese genů pro proproteinkonvertasu 1, proproteinkonvertasu 2 a Cdk6

V rámci všech měření nedošlo při transfekci buněk Langerhansových ostrůvků IVT mRNA pro GFP k žádnému statisticky významnému rozdílu exprese daných genů, proliferace, nebo poškození genomu v porovnání s kontrolním vzorkem bez transfekované IVT mRNA. Vliv samotného vektoru na dané parametry je tedy minimální. Jedinou výjimkou tohoto trendu je genová exprese genu pro proproteinkonvertasu I (Pcsk1) a proproteinkonvertasu II (Pcsk2), u kterých došlo k znatelnému zvýšení exprese po transfekci IVT mRNA pro GFP. Ačkoliv nebyl výsledek statisticky významným oproti kontrolnímu vzorku lze předpokládat, že IVT mRNA, nebo GFP mohou mít vliv na expresi genů pro proproteinkonvertasy typů I a II. Pro potvrzení této teorie je však třeba dalších experimentů.

Sledování vývoje transkripce genu pro cyklin dependentní kinasu 6 (CDK6) přineslo jako jediné statisticky významný výsledek transfekce IVT mRNA pro GFP oproti kontrole. 24 hodin po transfekci IVT mRNA pro GFP došlo k statisticky významnému nárůstu expres CDK6 na hladině významnosti 0,0001. Zvýšení exprese CDK6 po transfekci IVT mRNA pro GFP pravděpodobně nastává v důsledku nespecifické zánětlivé odpovědi β-buněk na přítomnost cizorodé ribonukleové kyseliny, která mimikuje virovou infekci. Pro potvrzení této hypotézy je však třeba provést další testy.

6 ZÁVĚR

Byl prokázán pro-proliferační účinek synteticky připravených kombinací IVT mRNA pro cykliny rodiny D a cyklin dependentních kinas 4 a 6 na potkaní pankreatické β-buňky. Kombinací, která potencovala nejvyšší míru proliferace byla na základě výsledků průtokové cytometrie zvolena IVT mRNA pro mutovaný cyklin D1 (CD1T286A) v kombinaci s IVT mRNA pro cyklin dependentní kinasu 4. Tato kombinace IVT mRNA zajistila 13,8 násobné zvýšení proliferace β-buněk oproti kontrolnímu vzorku bez transfekované IVT mRNA.

Na základě analýzy genové exprese buněk transfekovaných IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 byla následně potvrzena mírná dediferenciace β-buněk během buněčného dělení. Dediferenciace byla charakterizována snížením exprese typických β-buněčných faktorů (Nkx2-2, Nkx6-1, Pdx1, MafA, Ucn3). 120 hodin od transfekce dochází k navýšení exprese genů zajišťujících β-buněčnou indentitu (zmíněné transkripční faktory) stejně jako genů souvisejících s produkcí insulinu (Ins1, Ins2, Gck, Pcsk1, Pcsk2).

Detekce poškození genomu β-buněk v důsledku proliferace stimulované vlivem IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 nepřinesla žádné statisticky významné výsledky oproti kontrolnímu vzorku β-buněk Langerhansových ostrůvků bez transfekované IVT mRNA. V rámci detekce apoptosy bylo detekováno mírné snížení apoptosy buněk transfekovaných IVT mRNA pro CD1TA + CDK4 oproti kontrole, což může nasvědčovat protektivním vlastnostem cyklinů rodiny D.

Seznam použité literatury

[1] Cardozo A. K.; Kruhøffer M.; Leeman R.; Orntoft T.; Eizirik D. L.:. Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-cells by high-density oligonucleotide arrays. *Diabetes*, **50**(5):909–920, (2001).

[2] Mauricio D.; Mandrup-Poulsen T.:. Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes*, **47**(10):1537–1547, (1998).

[3] Wägner A. M.; Cloos P.; Bergholdt R.; Boissy P.; Andersen T. L.; Henriksen D. B.; Christiansen C.; Christgau S.; Pociot F.; Nerup J.:. Post-translational protein modifications in type 1 diabetes: a role for the repair enzyme protein-l-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase? *Diabetologia*, **50**(3):676–681, (2007).

[4] Saavedra Ávila N. A.; Sengupta U.; Sánchez B.; Sala E.; Haba L.; Stratmann T.; Verdaguer J.; Mauricio D.; Mezquita B.; Ropero A. B.; Nadal Á.; Mora C.:. Cyclin D3 promotes pancreatic β-cell fitness and viability in a cell cycle-independent manner and is targeted in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **111**(33):3405–3414, (2014).

[5] 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. *Nat Rev Endocrinol*, **11**(4):212–215, (2015).

[6] Kim S.K.; Powers A. C. Dai Chunhua; Hang Y.; Shostak A.; Poffenberger G.; Hart N.; Prasad N.; Phillips N.; Levy S. E.; Greiner D. L.; Shultz L. D.; Bottino R. Age-dependent human beta-cell proliferation induced by glucagon-like peptide 1 and calcineurin signaling. *J. Clin Invest*, **10**:3835–3844, (2017).

[7] Vasavada R.C.; Gonzalez-Pertusa J.A.; Fujinaka Y.; Fiaschi-Taesch N.; Cozar-Castellano I.; Garcia-Ocaña A.:. Growth factors and β-cell replication. *Int J Biochem Cell Biol*, **38**(5-6):931–950, (2006).

[8] Fiaschi-Taesch N.M.; Kleinberger J.W.; Salim F.G.; Troxell R.; Wills R.; Tanwir M.; Casinelli G.; Cox A. E.; Takane K. K.; Scott D. K.; Stewart A.F.:. Human pancreatic β-cell g_1/s molecule cell cycle atlas. *Diabetes*, **62**(7):2450–2459, (2013).

[9] Marrif H. I.; Al-Sunousi S. I.:. Pancreatic b-cell mass death. *Front Pharmacol*, **7**(83):1–16, (2016).

[10] Kong Y.; Sharma R: B.; Nwosu B. U.; Alonso L. C.:. Islet biology, the CDKN2A/B locus and type 2 diabetes risk. *Diabetologia*, **59**(8):1579–1593, (2016).

[11] The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, **447**(1):661—678, (2007).

[12] Samani N. J.; Erdmann J.; Hall A. S.; Hengstenberg C.; Mangino M.; Mayer B.; Dixon R. J.; Meitinger T.; Braund P.; Wichmann H. E.; Barrett J. H.; König I. R.; Stevens S. E.; Szymczak S.; Tregouet D. A.; Iles M. M.; Pahlke F.; Pollard H.; Lieb W.; Cambien F.; Fischer M.; Ouwehand W.; Blankenberg S.; Balmforth A. J.; Baessler A.; Ball S. G.; Strom T. M.; Braenne I.; Gieger C.; Deloukas P.; Tobin M. D.; Ziegler A.; Thompson J. R.; Schunkert H.; WTCCC and the Cardiogenics Consortium. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*, **357**(5):443–453, (2007).

[13] ; Peden J. F.; Lorkowski S.; Goel A.; Ongen H.; Green F.; Clarke R.; Collins R.; Franzosi M. G.; Tognoni G.; Seedorf U.; Rust S.; Eriksson P.; Hamsten A.; Farrall M.; Watkins H.: Broadbent H. M. PROCARDIS consortium. susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked snps in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum. Mol. Genet.*, **17**(6):806–814, (2008).

[14] Pasmant E.; Sabbagh A.; Vidaud M.; Bièche I.:. ANRIL, a long, noncoding rna, is an unexpected major hotspot in gwas. *FASEB J.*, **25**(2):444–448, (2011).

[15] Matarin M.; Brown W. M.; Singleton A.; Hardy J. A.; Meschia J. F.:. Whole genome analyses suggest ischemic stroke and heart disease share an association with polymorphisms on chromosome 9p21. *Stroke*, **39**(5):1586–1589, (2008).

[16] InteSrnational Stroke Genetics Consortium: Gschwendtner A.; Bevan S.; Cole J. W.; Plourde A.; Matarin M.; Ross-Adams H.; Meitinger T.; Wichmann E.; Mitchell B. D.; Furie K.; Slowik A.; Rich S. S.; Syme P. D.; MacLeod M. J.; Meschia J. F.; Rosand J.; Kittner S. J.; Markus H. S.; Müller-Myhsok B.; Dichgans M. Sequence variants on chromosome 9p21.3 confer risk for atherosclerotic stroke. *Ann Neurol*, **65**(5):531–539, (2009).

[17] Emanuele E.; Lista S.; Ghidoni R.; Binetti G.; Cereda C.; Benussi L.; Maletta R.; Bruni A. C.; Politi P.:. Chromosome 9p21.3 genotype is associated with vascular dementia and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **32**(7):1231–1235, (2011).

[18] Jeck W. R.; Siebold A. P.; Sharpless N. E.:. Review: a meta-analysis of GWAS and age-associated diseases. *Aging Cell*, **11**(5):727–731, (2012).

[19] Melzer D.; Frayling T. M.; Murray A.; Hurst A. J.; Harries L. W.; Song H.; Khaw K.; Luben R.; Surtees P. G.; Bandinelli S. S.; Corsi A. M.; Ferrucci L.; Guralnik J. M.; Wallace R. B.; Hattersley A. T.; Pharoah P. D.:. A common variant of the p16(ink4a) genetic region is associated with physical function in older people. *Mech Agening Dev*, **128**(5–6):370–377, (2007).

[20] Chen H.; Gu X.; Su I. H.; Bottino R.; Contreras J. L.; Tarakhovsky A.; Kim S. K.:. Polycomb protein Ezh2 regulates pancreatic beta-cell Ink4a/Arf expression and regeneration in diabetes mellitus. *Genes Dev.*, **23**(8):975–985, (2009).

[21] He L. M.; Sartori D. J.; Teta M.; Opare-Addo L. M.; Rankin M. M.; Long S. Y.; Diehl J. A.; Kushner J. A.:. Cyclin D2 protein stability is regulated in pancreatic β-cells. *Mol Endocrinol*, **23**(11):1865–1875, (2009).

[22] Dor Y.; Brown J.; Martinez O.I.; Melton D.A.:. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, **429**(6987):41–46, (2004).

[23] Saisho Y.; Elashoff D.; Butler A. E.; Rizza R. A.; Manesso E.; Butler P. C.:. β cell mass and turnover in humans. *Diabetes Care*, **36**(1):111–117, (2013).

[24] Freemark M.; Avril I.; Fleenor D.; Driscoll P.; Petro A.; Opara E.; Kendal W.; Oden J.; Bridges S.; Binart N.; Breant B.; Kelly P. A.:. Targeted deletion of the PRL receptor: Effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology*, **143**(4):1378–1385, (2002).

[25] Chen Hainan; Gu X.; Liu Y.; Wang J.; Wirt SE.; Bottino R.; Schorle H.; Sage J.; Kim SK.:. PDGF signalling controls age-dependent proliferation in pancreatic β-cells. *Nature*, **478**(7369):349–355, (2011).

[26] Zhang H.; Bajraszewski N.; Wu E.; Wang H.; Moseman A. P.; Dabora S.L.; Griffin J. D.; Kwiatkowski D. J.:. PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *J. Clin Invest*, **117**(3):730–738, (2007).

[27] Buteau J.; Spatz M. L.; Accili D.:. Transcription factor FoxO1 mediates glucagon-like peptide-1 effects on pancreatic beta-cell mass. *Diabetes*, **5**(55):1190–1196, (2006).

[28] Buteau J.; Roduit R.; Susini S.; Prentki M.:. Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases

transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia*, **42**(7):856–864, (1999).

[29] Stoffers D. A.; Kieffer T. J.; Hussain M. A.; Drucker D. J.; Bonner-Weir S.; Habener J. F.; Egan J. M.:. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes*, **49**(5):741–748, (2000).

[30] Buteau J.; Foisy S.; Joly E.; Prentki M.:. Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes*, **52**(1):124–132, (2003).

[31] Kitamura T.; Nakae J.; Kitamura Y.; Kido Y.; Biggs W. H. III.; Wright C. V.; White M. F.; Arden K. C.; Accili D.:. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J. Clin Invest*, **110**(12):1839–1847, (2002).

[32] Robertson R. P.; Harmon J.; Tran P. O.; Tanaka Y.; Takahashi H.:. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*, **52**(3):581–587, (2003).

[33] Buteau J.; Shlien A.; Foisy S.; Accili D.:. Metabolic diapause in pancreatic beta-cells expressing a gain-of-function mutant of the forkhead protein Foxo1. *Journal of Biological Chemistry*, **282**(1):287–293, (2007).

[34] Sandri M.; Sandri C.; Gilbert A.; Skurk C.; Calabria E.; Picard A.; Walsh K.; Schiaffino S.; Lecker S. H.; Goldberg A. L.:. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, **117**(3):399–412, (2004).

[35] Stitt T. N.; Drujan D.; Clarke B. A.; Panaro F.; Timofeyva Y.; Kline W. O.; Gonzalez M.; Yancopoulos G. D.; Glass D. J.:. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular Cell*, **14**(3):395–403, (2004).

[36] Friedrichsen B. N.; Galsgaard E. D.; Nielsen J. H.; Møldrup A.:. Growth hormone- and prolactin-induced proliferation of insulinoma cells, INS-1, depends on activation of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5). *Mol Endocrinol*, **15**(1):136–148, (2001).

[37] Moser J.; Hiller I.; Carter D.; Spencer S. L.:. Control of the Restriction Point by Rb and p2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**(35):8219–8227, (2018).

[38] Cozar-Castellano I.; Haught M.; Stewart A. F.:. The cell cycle inhibitory protein p21cip is not essential for maintaining beta-cell cycle arrest or beta-cell function in vivo. *Diabetes*, **55**(12):3271–3278, (2006).

[39] Tschen S. I.; Zeng C.; Field L.; Dhawan S.; Bhushan A.; Georgia S.:. Cyclin D2 is sufficient to drive β-cell self-renewal and regeneration. *Cell Cycle*, **16**(22):2183–2191, (2017).

[40] Fiaschi-Taesch N. M.; Salim F.; Kleinberger J.; Troxell R.; Cozar-Castellano I.; Selk K.; Cherok E.; Takane K. K.; Scott D. K.; Stewart A. F.:. Induction of human β-cell proliferation and engraftment using a single g_1/s regulatory molecule, cdk6. *Diabetes*, **59**(8):926–1936, (2010).

[41] Kulkarni R.N.; Brüning J. C.; Winnay J. N.; Postic C.; Magnuson M. A.; Kahn C. R.:. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*, **96**(3):329–339, (1999).

[42] Withers D. J.; Burks D. J.; Towery H. H.; Altamuro S. L.; Flint C. L.; White M. F.:. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet*, **23**(1):32–40, (1999).

[43] Hinault C.; Hu J.; Maier B. F.; Mirmira R. G.; Kulkarni R. N.:. Differential expression of cell cycle proteins during ageing of pancreatic islet cells. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **10**(4):136–146, (2008).

[44] Sherr C. J.:. The pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer. Res*, **60**(14):3689–3695, (2000).

[45] Kushner J. A.; Ciemerych M. A.; Sicinska E.; Wartschow L. M.; Teta M.; Long S. Y.; Sicinski P.; White M. F.:. Cyclins D2 and D1 Are Essential for Postnatal Pancreatic β-Cell Growth. *Molecular and Cellular Biology*, **25**(9):3752–3762, (2005).

[46] F. A.; Bader G. D.; Bremner R.; Woo M.; Zacksenhaus E.: Jiang Z.; Li H.; Schroer S. A.; Voisin V.; Ju Y.; Pacal M.; Erdmann N.; Shi W.; Chung P. E. D.; Deng T.; Chen N. J.; Ciavarra G.; Datti A.; Mak T. W.; Harrington L.; Dick. Hypophosphorylated pRb knock-in mice exhibit hallmarks of aging and vitamin C-preventable diabetes. *EMBO J.*, **15**(41):1–23, (2022).

[47] Dyson N. J.:. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Dev*, **30**(13):1492–502, (2016).

[48] Zacksenhaus E.; Shrestha M.; Liu J. C.; Vorobieva I.; Chung P. E. D.; Ju Y.; Nir U.; Jiang Z.:. Mitochondrial OXPHOS induced by rb1 deficiency in breast cancer: Implications for anabolic metabolism, stemness, and metastasis. *Trends Cancer*, **3**(11):768–779, (2017).

[49] Dick F. A.; Goodrich D. W.; Sage J.; Dyson N. J.:. Non-canonical functions of the rb protein in cancer. *Nat Rev Cancer*, **18**(7):442–451, (2018).

[50] Kitajima S.; Li F.; Takahashi C.:. Tumor milieu controlled by rb tumor suppressor. *Int J Mol Sci*, **21**(7):2450, (2020).

[51] Cozar-Castellano I.; Fiaschi-Taesch N.; Bigatel T. A.; Takane K. K.; Garcia-Ocaña A.; Vasavada R.; Stewart A. F.:. Molecular control of cell cycle progression in the pancreatic β-cell. *Endocrine Reviews*, **27**(4):136–146, (2006).

[52] Harbour J. W.; Dean D. C.:. Chromatin remodeling and rb activity. *Curr Opin Cell Biol*, **12**(6):685–689, (2000).

[53] Bracken A. P.; Ciro M.; Cocito A.; Helin K.:. E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci*, **29**(8):409–417, (2004).

[54] Lees J. A.; Buchkovich K. J.; Marshak D. R.; Anderson C. W.; Harlow E.:. The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2. *EMBO J*, **10**(13):4279–4290, (1991).

[55] Fu M.; Wang C.; Li Z.; Sakamaki T.; Pestell R. G.:. Minireview: Cyclin d1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*, **145**(12):5439–5347, (2004).

[56] Narita M.; Nũnez S.; Heard E.; Narita M.; Lin A. W.; Hearn S. A.; Spector D. L.; Hannon G. J.; Lowe S. W.:. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of e2f target genes during cellular senescence. *Cell*, **113**(6):703–716, (2003).

[57] Ait-Si-Ali S.; Guasconi V.; Fritsch L.; Yahi H.; Sekhri R.; Naguibneva I.; Robin P.; Cabon F.; Polesskaya A.; Harel-Bellan A.:. A Suv39h-dependent mechanism for silencing s-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *EMBO J*, **23**(3):605–615, (2004).

[58] Uchida C.:. Roles of prb in the regulation of nucleosome and chromatin structures. *Biomed Res Int*, **2016**:5959721, (2016).

[59] Harvey M.; Vogel H.; Lee E. Y.; Bradley A.; Donehower L. A.:. Mice deficient in both p53 and Rb develop tumors primarily of endocrine origin. *Cancer Research*, **55**(1):1146—-1151, (1995).

[60] Williams B. O.; Remington L.; Albert D. M.; Mukai S.; Bronson R. T.; Jacks T.:. Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in rb and p53. *Nature Genetics*, **7**(1):480–484, (1994).

[61] Fiaschi-Taesch N.; Bigatel T. A.; Sicari B.; Takane K. K.; Salim F.; Velazquez-Garcia S.; Harb G.; Selk K.; Cozar-Castellano I.; Stewart A. F.:. Survey of the Human Pancreatic β-Cell g1/s Proteome Reveals a Potential Therapeutic Role for Cdk-6 and Cyclin D1 in Enhancing Human β-Cell replication and function in vivo. *Diabetes*, **58**(9):882–893, 2004.

[62] Fiaschi-Taesch N. M.; Kleinberger J.W.; Salim F. G.; Troxell R.; Wills R.; Tanwir M.; Casinelli G.; Cox A. E.; Takane K. K.; Srinivas H.; Scott D. K.; Stewart A. F.:. Cytoplasmic-nuclear trafficking of g_1/s cell cycle molecules and adult human β-cell replication: a revised model of human β-cell g_1/s control. *Diabetes*, **62**(7):2460–2470, (2013).

[63] Holland A.M.; Hale M. A.; Kagami H.; Hammer R. E.; MacDonald R. J.:. Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**(19):12236–12241, (2002).

[64] Gannon M.; Ables E. T.; Crawford L.; Lowe D.; Offield M. F.; Magnuson M. A.; Wright C. V.:. Pdx-1 function is specifically required in embryonic beta cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis. *Dev Biol*, **314**(2):406–417, (2008).

[65] Ahlgren U.; Jonsson J.; Jonsson L.; Simu K.; Edlund H.:. β-Cell-specific inactivation of the mouse Ipf1/Pdx1 gene results in loss of the β-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes and Development*, **12**(12):1763–1768, (1998).

[66] D.: Kitamura T.; Nakae J.; Kitamura Y.; Kido Y.; Biggs III W. H.; Wright C. V. E.; White M F.; Arden K. C.; Accili. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic β-cell growth. *The Journal of Clinical Investigation*, **110**(12):1839–1847, (2002).

[67] Buteau J.; Accili D.:. Regulation of pancreatic β-cell function by the forkhead protein FoxO1. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **9**(2):140–146, (2007).

[68] Sorenson R. L.; Brelje T. C.:. Adaptation of Islets of Langerhans to Pregnancy: β-Cell Growth, Enhanced Insulin Secretion and the Role of Lactogenic Hormones. *Hormone and Metabolic Research*, **29**(6):301–307, (1997).

[69] Georgia S.; Bhushan A.:. β-cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J. Clin Invest*, **114**(7):963–968, (2004).

[70] Cozar-Castellano I.; Takane K. K.; Bottino R.; Balamurugan A. N.; Stewart A. F.:. Induction of β-Cell Proliferation and Retinoblastoma Protein Phosphorylation in Rat and Human Islets Using Adenovirus-Mediated Transfer of Cyclin-Dependent Kinase-4 and Cyclin D1. *Diabetes*, **53**(1):149–159, (2004).

[71] Martín J.; Hunt S. L.; Dubus P.; Sotillo R.; Néhmé-Pélluard F.; Magnuson M. A.; Parlow A. F.; Malumbres M.; Ortega S.; Barbacid M.:. Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene*, **22**(34):5261–5269, (2003).

[72] Georgia S.; Bhushan A.:. p27 Regulates the transition of β-Cells From Quiescence to Proliferation. *Diabetes*, **55**(11):2950–2956, (2006).

[73] Gu Y.; Lindner J.; Kumar A.; Yuan W.; Magnuson M. A.:. Rictor/mTORC2 is essential for maintaining a balance between beta-cell proliferation and cell size. *Diabetes*, **60**(3):827–837, (2011).

[74] Gu Y.; Lindner J.; Kumar A.; Yuan W.; Magnuson M. A.:. Rictor/mTORC2 is essential for maintaining a balance between beta-cell proliferation and cell size. *Diabetes*, **60**(3):827–837, (2011).

[75] Gradwohl G.; Dierich A.; LeMeur M.; Guillemot F.:. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Aci USA*, **97**(4):1607–1611, (2000).

[76] Zhu Y.; Liu Q.; Zhou Z.; Ikeda Y.:. PDX1, Neurogenin-3 and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Res Ther*, **8**(1):240, (2017).

[77] Gunasekaran U.; Hudgens C. W.; Wright B. T.; Maulis M. F.; Gannon M.:. Differential regulation of embryonic and adult β-cell replication. *Cell Cycle*, **11**(13):2431–2442, (2012).

[78] Ringrose L.; Paro R.:. Polycomb/trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development*, **134**(2):223–232, (2007).

[79] Karnik S. K.; Chen H.; McLean G. W.; Heit J. J.; Gu X.; Zhang A. Y.; Fontaine M.; Yen M. H.; Kim S. K.:. Menin controls growth of pancreatic beta-cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus. *Science*, **318**(5851):806–809, (2007).

[80] Lenzen S.; Drinkgern J.; Tiedge M.:. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med*, **20**(3):463–466, (1996).

[81] Welsh N.; Margulis B.; Borg L. A.; Wiklund H. J.; Saldeen J.; Flodström M.; Mello M. A.; Andersson A.; Pipeleers D. G.; Hellerström C.; et al.:. Differences in the expression of heat-shock proteins and antioxidant enzymes between human and rodent pancreatic islets: implications for the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Mol Med*, **1**(7):806–820, (1995).

[82] Chen Q. M.; Liu J.; Merrett J. B.:. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in h_2o_2 response of normal human fibroblasts. *Biochem J*, **347**(2):543–551, (2000).

[83] Frippiat C.; Chen Q. M.; Zdanov S.; Magalhaes J. P.; Remacle J.; Toussaint O.:. Subcytotoxic h_2o_2 stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem*, **276**(4):2531–2537, (2001).

[84] Fujimoto K.; Polonsky K. S.:. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic β-cell survival. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **11**(4):30–37, (2009).

[85] Fujitani Y.:. Transcriptional regulation of pancreas development and β-cell function [review]. *Endocrinology*, **64**(5):477–486, (2017).

[86] Pan F. C.; Wright C.:. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn*, **240**(3):530–565, (2011).

[87] Gao T.; McKenna B.; Li C.; Reichert M.; Nguyen J.; Singh T.; Yang C.; Pannikar A.; Doliba N.; Zhang T.; Stoffers D. A.; Edlund H.; Matschinsky F.; Stein R.; Stanger B.:. Pdx1 maintains β-cell identity and function by repressing an α-cell program. *Cell. Metab.*, **19**(2):259–271, (2014).

[88] M.: Zhu X.; Oguh A.; Gingerich M. A.; Soleimanpour S. A.; Stoffers D. A.; Gannon. Cell Cycle Regulation of the Pdx1 Transcription Factor in Developing Pancreas and Insulin-Producing β-Cells. *Diabetes*, **70**(4):903–916, 2021.

[89] Aigha I. I.; Abdelalim E. M.:. NKX6.1 transcription factor: a crucial regulator of pancreatic β-cell development, identity, and proliferation. *Stem. Cell. Res. Ther.*, **11**(1):459, (2020).

[90] Artner I.; Hang Y.; Mazur M.; Yamamoto T.; Guo M.; Lindner J.; Magnuson M. A.; Stein R.:. MafA and MafB regulate genes critical to beta-cells in a unique temporal manner. *Diabetes*, **59**(10):2530–2539, (2010).

[91] Zhang C.; Moriguchi T.; Kajihara M.; Esaki R.; Harada A.; Shimohata H.; Oishi H.; Hamada M.; Morito N.; Hasegawa K.; Kudo T.; Engel J. D.; Yamamoto M.; Takahashi S.:. MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol.*, **25**(12):4969–4976, (2005).

[92] Zhang H.; Ackermann A. M.; Gusarova G. A.; Lowe D.; Feng X.; Kopsombut U. G.; Costa R. H.; Gannon M.:. The FoxM1 Transcription Factor Is Required to Maintain Pancreatic β-Cell Mass. *Molecular Endocrinology*, **20**(8):1853–1866, (2006).

[93] M.: Zhang H.; Zhang J.; Pope C. F.; Crawford L. A.; Vasavada R. C.; Jagasia, S. M.; Gannon. Gestational diabetes mellitus resulting from impaired β-cell compensation in the absence of foxm1, a novel downstream effector of placental lactogen. *Diabetes*, **59**(1):143–152, (2010).

[94] Golson M. L.; Dunn J. C.; Maulis M. F.; Dadi P. K.; Osipovich A. B.; Magnuson M. A.; Jacobson D. A.; Gannon M.:. Activation of foxm1 revitalizes the replicative potential of aged beta-cells in male mice and enhances insulin secretion. *Diabetes*, **64**(11):3829–3838, (2015).

[95] Wang X.; Kiyokawa H.; Dennewitz M. B.; Costa R. H.:. The forkhead box m1b transcription factor is essential for hepatocyte dna replication and mitosis during mouse liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(26):16881–16886, (2002).

[96] Krupczak-Hollis K.; Wang X.; Kalinichenko V. V.; Gusarova G. A.; Wang I. C.; Dennewitz M. B.; Yoder H. M.; Kiyokawa H.; Kaestner K. H.; Costa R. H.:. The mouse forkhead box m1 transcription factor is essential for hepatoblast mitosis and development of intrahepatic bile ducts and vessels during liver morphogenesis. *Dev. Biol.*, **276**(1):74–88, (2004).

[97] Wng I. C.; Chen Y. J.; Hughes D.; Petrovic V.; Major M. L.; Park H. J.; Tan Y.; Ackerson T.; Costa R. H.:. Forkhead box m1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the scf (skp2-cks1) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol*, **25**(24):10875–10894, (2005).

[98] Zhang H.; Ackermann A. M.; Gusarova G. A.; Lowe D.; Feng X.; Kopsombut U. G.; Costa R. H.; Gannon M.:. The foxm1 transcription factor is required to maintain pancreatic beta-cell mass. *Mol Endocrinol*, **20**(8):1853–1866, (2006).

[99] Golson M. L.; Maulis M. F.; Dunn J. C.; Poffenberger G.; Schug J.; Kaestner K. H.; Gannon M. A.:. Activated foxm1 attenuates streptozotocin-mediated beta-cell death. *Mol Endocrinol*, **28**(9):1435–1447, (2014).

[100] Davis D. B.; Lavine J. A.; Suhonen J. I.; Krautkramer K. A.; Rabaglia M. E.; Sperger J. M.; Fernandez L. A.; Yandell B. S.; Keller M. P.; Wang I. M.; Schadt E. E.; Attie A. D.:. oxm1 is up-regulated by obesity and stimulates beta-cell proliferation. *Mol Endocrinol*, **24**(9):1822–1834, (2010).

[101] Yamamoto J.; Imai J.; Izumi T.; et al. Neuronal signals regulate obesity induced beta-cell proliferation by foxm1 dependent mechanism. *Nat Column*, **8**(1):1930–1930, (2017).

[102] Tiwari S.; Roel C.; Wills R.; Casinelli G.; Tanwir M.; Takane K. K.; Fiaschi-Taesch N. M.:. Early and late G1/S cyclins and cdks act complementarily to enhance authentic human β-cell proliferation and expansion. *Diabetes*, **64**(10):3485–3498, (2015).

[103] C.; Yu M.; Jiao Y.; Zhang J.; Naji A.; Ziaie S.; Glaser B.; Kaestner K.H.: Avrahami D.; Li. Ttargeting the cell cycle inhibitor $p57^{Kip2}$ promotes adult human β cell replication. *The Journal of Clinical Investigation*, **124**(2):670–674, (2014).

[104] Kim S. Y.; Lee J.; Merrins M. J.; Gavrilova O.; Bisteau X.; Kaldis P.; Satin L. S.; Rane S. G.:. Loss of Cyclin/dependent Kinase 2 in Pancreas Links Primary β-Cell Dysfunction to Progressive Depletion of β/Cell Mass and Diabetes. *The Journal of Biological Chemistry*, **292**(9):3841–3853, (2017).

[105] Ciemerych M.A.; Kenney A. M.; Sicinska E.; Kalaszczynska I.; Bronson R. T.; Rowitch D. H.; Gardner H.; Sicinski P.:. Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes. Dev.*, **16**(24):3277–3289, (2002).

[106] Kacheva S.; Lenzen S.; Gurgul-Convey E.:. Differential effects of proinflammatory cytokines on cell death and ER stress in insulin-secreting INS1E cells and the involvement of nitric oxide. *Cytokine*, **55**(2):195–201, (2011).

[107] Chen M. C.; Schuit F.; Eizirik D. L.:. Identification of IL-1beta-induced messenger RNAs in rat pancreatic beta cells by differential display of messenger RNA. *Diabetologia*, **42**(10):1199–1203, (1999).

[108] A.; Bollig A.; Sarkar F. H.; Liao J. D.: Biliran H. Jr.; Wang Y.; Banerjee S.; Xu, H.; Heng H.; Thakur. Overexpression of cyclin d1 promotes tumor cell growth and confers resistance to cisplatin-mediated apoptosis in an elastase-myc transgene-expressing pancreatic tumor cell line. *Clin. Cancer Res.*, **11**(16):6075–6086, (2005).

[109] Sauter E. R.; Takemoto R.; Litwin S.; Herlyn M.:. p53 alone or in combination with antisense cyclin D1 induces apoptosis and reduces tumor size in human melanoma. *Cancer Gene. Ther.*, **9**:807–812, (2002).

[110] Rane S. G.; Dubus P.; Mettus R. V.; Galbreath E. J.; Boden G.; Reddy E. P.; Barbacid M.:. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in β-islet cell hyperplasia. *Nature Genetics*, **22**(1):44–52, (1999).

[111] Tsutsui T.; Hesabi B.; Moons D. S.; Pandolfi P. P.; Hansel K. S.; Koff A.; Kiyokawa H.:. Targeted disruption of cdk4 delays cell cycle entry with enhanced p27(kip1) activity. *Mol. Cell. Biol.*, **19**(10):7011–7019, (1999).

[112] ; Mettus R. V.; Galbreath E. J.; Boden G.; Reddy E. P.; Barbacid M.: Rane S. G.; Dubus P. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet*, **22**(1):44–52, (199).

[113] Rane S. G.; Reddy E. P.:. Cell cycle control of pancreatic beta cell proliferation. *Front Biosci*, **5**:D1–D19, (2000).

[114] ; Periwal V.; Rane S. G.: Lee J. H.; Jo J, ; Hardikar A. A. Cdk4 regulates recruitment of quiescent beta-cells and ductal epithelial progenitors to reconstitute beta-cell mass. *PLos One*, **5**(1):e8653, (2010).

[115] Kim S. Y.; Rane S. G.:. The cdk4-e2f1 pathway regulates early pancreas development by targeting $pdx1^+$ progenitors and $ngn3^+$ endocrine precursors. *PLos One*, **138**(10):1903–1912, (2011).

[116] Kim Y. C.; Kim S. Y.; Mellado-Gil J. M.; Yadav H.; Neidermyer W.; Kamaraju A. K.; Rane S. G.:. RB regulates pancreas development by stabilizing Pdx1. *EMBO*, **30**(1):1536–1576, (2011).

[117] Talchai C.; Xuan S.; Lin H. V.; Sussel L.; Accili D.:. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell*, **150**(6):1223–1234, (2012).

[118] Ravitz M. J.; Wenner C. E.:. Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. *Adv Cancer Res*, **75**:165–207, (1997).

[119] Sherr C. J.; McCormick F:. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, **2**(2):103–112, (2002).

[120] Fatrai S.; Elghazi L.; Balcazar N.; Cras-Me´neur C.; Krits I.; Kiyokawa H.; Bernal-Mizrachi E.:. Akt induces β-cell proliferation by regulating cyclin D1, cyclin D2, and p21 levels and cyclin-dependent kinase-4 activity. *Diabetes*, **55**:318–325, (2006).

[121] S. K.; O Donnell C. P.; Garcia-Ocana A. Alonso L. C.; Yokoe T.; Zhang P.; Scott D. K.; Kim. Glucose infusion in mice: A new model to induce β-cell replication. *Diabetes*, **56**(7):1792–1801, (2007).

[122] Hannou S. A.; Wouters K.; Paumelle R.; Staels B.:. Functional genomics of the CDKN2A/B locus in cardiovascular and metabolic disease: what have we learned from GWASs? *Trends Endocrionl Metab*, **26**(4):176–184, (2015).

[123] Kim W. Y.; Sharpless N. E.:. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*, **127**(2):265–275, (2006).

[124] Sharpless N. E.; Sherr C. J.:. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer*, **15**(7):397–408, (2015).

[125] Serrano M.; Hannon G. J.; Beach D.:. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, **366**(6456):704–707, (1993).

[126] Krishnamurthy J.; Ramsey M. R.; Ligon K. L.; Torrice C.; Koh A.; Bonner-Weir S.; Sharpless N. E.:. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*, **443**(7110):453–457, (2006).

[127] Dhawan S.; Tschen S. I.; Bhushan A.:. Bmi-1 regulates the ink4a/arf locus to control pancreatic beta-cell proliferation. *Genes Dev*, **23**(8):906–911, (2009).

[128] Guo N.; Parry E. M.; Li LS.; Kembou F.; Lauder N.; Hussain M. A.; Berggren P. O.; Armanios M.:. Short telomeres compromise β-cell signaling and survival. *PLos One*, **6**(3):e17858, (2011).

[129] Taneera J.; Fadista J.; Ahlqvist E.; Zhang M.; Wierup N.; Renström E.; Groop L.:. Expression profiling of cell cycle genes in human pancreatic islets with and without type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol*, **375**(1–2):35–42, (2013).

[130] Avrahami D.; Li C.; Zhang J.; Schug J.; Avrahami R.; Rao S.; Stadler M. B.; Burger L.; Schübeler D.; Glaser B.; Kaestner K. H.:. Aging-dependent demethylation of regulatory elements correlates with chromatin state and improved β cell function. *Cell Metab*, **22**(4):619–632, (2015).

[131] Ramsey M. R.; Krishnamurthy J.; Pei X. H.; Torrice C.; Lin W.; Carrasco D. R.; Ligon K. L.; Xiong Y.; Sharpless N. E.:. Expression of p16ink4a compensates for p18ink4c loss in cyclin-dependent kinase 4/6-dependent tumors and tissues. *Cancer Res*, **67**(10):4732–4741, (2007).

[132] Pal A.; Potjer T. P.; Thomsen S. K.; Ng H. J.; Barrett A.; Scharfmann R.; James T. J.; Bishop D. T.; Karpe F.; Godsland I. F.; Vasen H. F.; Newton-Bishop J.; Pijl H.; McCarthy M. I.; Gloyn A. L.:. Loss-of-function mutations in the cell-cycle control gene CDKN2A impact on glucose homeostasis in humans. *Diabetes*, **65**(2):527–533, (2016).

[133] Noubissi F. K.; McBride A. A.; Leppert H. G.; Millet L. J.; Wang X.; Davern S. M.:. Detection and quantifcation of γ-H2AX using a dissociation enhanced lanthanide fuorescence immunoassay. *Scientific Reports*, **11**(1):8945, (2021).

[134] Branzei D.; Foiani M.:. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**(1):297—-308, 2008.

[135] Soussi T.; Béroud C.:. Significance of TP53 mutations in human cancer: a critical analysis of mutations at CpG dinucleotides. *Hum. Mutat.*, **21**(3):192–200, (2003).

[136] Shibutani S.; Takeshita M.; Grollman A. P.:. Isertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, **349**(6308):431–434, (1991).

[137] Geißler D.; Wegmann M.; Jochum T.; Somma V.; Sowa M.; Scholz J.; Fröhlich E.; Hoffmann K.; Niehaus J.; Roggenbuck D.; Resch-Genger U.:. An automatable platform for genotoxicity testing of nanomaterials based on the fluorometric γ-H2AX assay reveals no genotoxicity of properly surface-shielded cadmium-based quantum dots. *Nanoscale*, **11**(28):13458–13648, (2019).

[138] Hershman J. M.; France B.; Hon K.; Damoiseaux R:. Direct quantification of gamma h2ax by cell-based high throughput screening for evaluation of genotoxicity of pesticides in a human thyroid cell lines. *Environ Mol Mutagen*, **58**(7):522–528, (2017).

[139] Huang X.; Traganos F.; Darzynkiewicz Z.:. DNA damage induced by dna topoisomerase i- and topoisomerase ii-inhibitors detected by histone H2AX phosphorylation in relation to the cell cycle phase and apoptosis. *Cell Cycle*, **2**(6):614–619, (2003).

[140] Hanasoge S.; Ljungman M.:. H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis*, **28**(11):2298–2304, (2007).

[141] Marti T. M.; Hefner E.; Feeney L.; Natale V.; Cleaver J. E.:. H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**(26):9891–9896, (2006).

[142] Oh K. S.; Bustin M.; Mazur S. J.; Appella E.; Kraemer K. H.:. UV-induced histone H2AX phosphorylation and DNA damage related proteins accumulate and persist in nucleotide excision repair-deficient XP-B cells. *DNA Repair (Amst)*, **10**(1):5–15, (2011).

[143] Sharma R. B.; Darko C.; Zheng X.; Gablaski B.; Alonso L. C.:. DNA Damage Does Not Cause Brdu Labeling of Mouse or Human β-Cells. *Diabetes*, **68**(5):975–987, (2019).

[144] Bruhn C.; Kroll T.; Wang Z. Q.:. Systematic characterization of cell cycle phase-dependent protein dynamics and pathway activities by high-content microscopy-assisted cell cycle phenotyping. **12**(1):255—-265, 2004.

[145] Hernández L.; Terradas M.; Martín M.; Tusell L.; Genescà A.:. Highly sensitive automated method for dna damage assessment: gamma-H2AX foci counting and cell cycle sorting. *Int J Mol Sci*, **14**(8):15810–15826, (2013).

[146] Rybak P.; Hoang A.; Bujnowicz L.; Bernas T.; Berniak K.; Zarębski M.; Darzynkiewicz Z.; Dobrucki J.:. Low level phosphorylation of histone H2AX on serine 139 (γH2AX) is not associated with DNA double-strand breaks. *Oncotarget*, **7**(31):49574–49587, (2016).

[147] Burma S.; Chen B. P.; Murphy M.; Kurimasa A.; Chen D. J.:. ATM phosphorylates histone h2ax in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, **276**(45):42462–42467, (2001).

[148] Meyer B.; Voss K. O.; Tobias F.; Jakob B.; Durante M.; Taucher-Scholz G.:. Clustered DNA damage induces pan-nuclear H2AX phosphorylation mediated by ATM and DNA-PK. *Nucleic Acids Res*, **41**(12):6109–6118, (2013).

[149] He Lu Mei; Sartori D. J.; Teta M.; Opare-Addo L. M.; Rankin M. M.; Long S. Y.; J.; Diehl J. A.; Kushner J. A.:. Cyclin d2 protein stability is regulated in pancreatic beta-cells. *Molecular Endoxrinology*, **23**(11):1865—1875, (2009).

[150] Cozar-Castellano I.; Takane K.K.; Bottino R.; Balamurugan A. N.; Stewart A. F.:. Induction of beta-cell proliferation and retinoblastoma protein phosphorylation in rat and human islets using adenovirus-mediated transfer of cyclin-dependent kinase-4 and cyclin d1. *Diabetes*, **53**(1):149—159, (2004).

[151] Nathalie Fiaschi-Taesch; Bigatel T. A.; Sicari B.; Takane K. K.; Salim F.; Velazquez-Garcia S.; Harb G.; Selk K.; Cozar-Castellano I.; Stewart A. F.:. Survey of the human pancreatic beta-cell g1/s proteome reveals a potential therapeutic role for cdk-6 and cyclin d1 in enhancing human beta-cell replication and function in vivo. *Diabetes*, **58**(4):882—893, (2009).

[152] Park M.; Krause M. W.:. Regulation of postembryonic g(1) cell cycle progression in caenorhabditis elegans by a cyclin d/cdk-like complex. *Development*, **126**(21):4849–4860, (1999).

[153] Diehl J. A.; Zindy F.; Sherr C. J.:. Inhibition of cyclin d1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.*, **11**(8):957–972, (1997).

[154] Oakie A.; Nostro M. C.:. Harnessing proliferation for the expansion of stem cell-derived pancreatic cells: Advantages and limitations. *Front Endocrinol*, **12**(1):636182, (2021).

[155] Nie M.; Wang Y.; Yu Z.; Li X.; Deng Y.; Wang Y.; Yang D.; Li Q.; Zeng X.; Ju J.; Liu M.; Zhao Q.:. Aurkb promotes gastric cancer progression via activation of ccnd1 expression. *Aging*, **12**(2):1304–1321, (2020).

[156] Shimada M.; Goshima T.; Matsuo H.; Johmura Y.; Haruta M.; Murata K.; Tanaka H.; Ikawa M.; Nakanishi K.; Nakanishi M.:. Essential role of autoactivation circuitry on aurora b-mediated h2ax-ps121 in mitosis. *Nat. Column*, **7**(1):12059, (2016).