

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Šárka Loukotová

Příprava a charakterizace syntetické mRNA kódující pankreatické transkripční faktory

Preparation and characterization of synthetic mRNA coding for pancreatic transcription factors

Diplomová práce

Vedoucí/Školitel: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Konzultant: RNDr. Tomáš Koblas, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou 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

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych chtěla poděkovat především RNDr. Tomáši Koblasovi, Ph.D. za umožnění vypracování mé diplomové práce v jeho laboratoři, za jeho užitečné a cenné rady a nápady. Dále bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za vedení mé diplomové práce. Zajisté bych také chtěla poděkovat Mgr. Ivanu Leontovyčovi a celému týmu LLOE IKEM za příjemnou spolupráci. Na závěr děkuji své rodině za veškerou podporu při studiích.

Obsah

1. Teoretický úvod.....	10
1.1. Struktura a funkce mRNA v buňce.....	10
1.1.1. Centrální dogma molekulární biologie.....	10
1.1.2. Stabilita mediátorové RNA v buňce.....	10
1.1.3. Regulace genové exprese pomocí mRNA.....	11
1.1.4. Typy 5' čepiček, jejich struktura a syntéza.....	12
1.1.5. Hlavní úlohy čepičky v organismu.....	12
1.1.6. 5' nepřekládaná oblast (5'UTR) mRNA.....	13
1.1.7. 3' nepřekládaná oblast (3'UTR) a poly(A) konec.....	15
1.1.8. Role poly(A) konce při translaci mRNA.....	17
1.2. Výskyt a použití modifikovaných nukleosidů v rámci RNA.....	18
1.2.1. Využití mRNA pro přenos genetické informace.....	18
1.2.2. Modifikovaný nukleosid pseudouridin (Ψ).....	18
1.2.3. Rozložení a lokalizace pseudouridinu v RNA.....	19
1.2.3.1. Výskyt pseudouridinu v transferové RNA.....	19
1.2.3.2. Výskyt pseudouridinu v ribosomální RNA.....	19
1.2.3.3. Výskyt pseudouridinu v messenger RNA.....	20
1.2.4. Modifikovaný nukleosid 5-methylcytosin (m5C).....	21
1.2.5. Rozložení a lokalizace m5C v RNA.....	22
1.2.5.1. Výskyt m5C v transferové RNA.....	22
1.2.5.2. Výskyt m5C v ribosomální RNA.....	22
1.2.5.3. Výskyt m5C v messenger RNA.....	23
1.3. Imunitní odpověď buňky na přítomnost cizorodé RNA.....	23
1.3.1. Přirozená imunitní odpověď buňky na cizorodou mRNA.....	23
1.3.2. Aktivace proteinkinasy R pomocí „single-stranded“ RNA.....	23
1.3.2.1. Inkorporace pseudouridinu ovlivňuje aktivaci proteinkinasy R.....	24
1.3.3. Protein B18R zabraňuje aktivaci interferonů alfa a beta.....	24
1.4. Pankreatické buňky a jejich transkripční faktory.....	25
1.4.1. Vývoj pankreatických buněk.....	25
1.4.2. Pankreatické transkripční faktory.....	27

1.4.2.1. Transkripční faktor „Pancratic duodenal homeobox-1“ (Pdx1).....	27
1.4.2.2. Transkripční faktor Neurogenin 3.....	29
1.4.2.3. Transkripční faktor MafA.....	30
1.5. Buněčný reprogramming.....	31
2. Cíl práce.....	34
3. Použitý materiál.....	35
4. Metody.....	37
4.1. Metoda homologní rekombinace In-fusion®.....	37
4.2. Amplifikace plasmidů s DNA konstrukty - kontrola úspěšnosti transformace.....	38
4.3. Izolace plasmidů pAcGFP1-N3 s DNA konstruktem.....	38
4.4. Příprava plasmidu pAcGFP1-N3 s DNA konstruktem a genem pro mRNA kódující transkripční faktory.....	39
4.5. Sekvence plasmidů Sangerovou metodou.....	39
4.6. Příprava templátu pro syntézu mRNA.....	40
4.7. Syntéza a purifikace mRNA.....	41
4.8. Kultivace buněk.....	44
4.9. Příprava extracelulární matrix pro kultivaci buněk AR42J.....	44
4.10. Transfekce syntetické mRNA do buněčné linie AR42J.....	45
4.11. Imunochemické stanovení s fluorescenčním vyhodnocením.....	45
4.12. Izolace celkové RNA a kvantitativní PCR s reversní transkripcí (qRT-PCR).....	46
5. Výsledky.....	48
5.1. Příprava DNA templátů pro syntézu mRNA transkripčních faktorů Pdx1, Neurogenin3 a MafA.....	48
5.2. Vliv extracelulární matrix na morfologii buněčné linie AR42J.....	51
5.3. Transfekce synteticky připravené mRNA pro Pdx1, Ngn3 a MafA do buněk AR42J... ..	52
5.4. Životnost transkripčních faktorů ve formě proteinu v buňkách AR42J po transfekci syntetickou mRNA.....	53
5.5. Detekce koexprese transkripčních faktorů Pdx1, Ngn3 a MafA.....	55
5.6. Transdiferenciace exokrinních buněk na buňky produkující insulin pomocí syntetické mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA a pozitivní účinek epigenetického modulátoru 5-aza-2'-deoxycytidin na míru exprese insulinu.....	57
5.7. Transfekce transkripčních faktorů Pdx1, Ngn3 a MafA aktivují expresi genů	

charakterizující β -buňky.....	60
6.Diskuse.....	63
7.Souhrn.....	69
8.Příloha.....	70
9.Seznam použité literatury.....	75

Seznam použitých zkratek

5' mC – 5'-methylcytosin

5-aza-2'-DC - 5-aza-2'-deoxycytidin

7 DG - 7-Desacetoxy-6,7-dehydrogedunin

ARCA - z anglického "Anti Reverse Cap Analog"

ATP, GTP, CTP, UTP - adenosin-5-trifosfát, guanosin-5-trifosfát, cytosin-5-trifosfát, uridin-5-trifosfát

bFGF - fibroblastový růstový faktor, z anglického „basic fibroblast growth factor“

BIX - 2-(hexahydro-4-methyl-1H-1,4-diazepin-1-yl)-6,7-dimethoxy-N-[1-(phenylmethyl)-4-piperidinyl]-4-quinazolinamine trihydrochloride hydrate

BSA - hovězí sérový albumín, z anglického „bovine serum albumin“

DAPI - 4,6-diamidino-2-fenylindol

DMEM - z anglického „Dulbecco's modified Eagle medium“

DNA - deoxyribonukleová kyselina, z anglického „deoxyribonucleic acid“

dNTP - deoxynukleosid trifosfát

EGF - epidermální růstový faktor, z anglického „epidermal growth factor“

FBS - fetální hovězí sérum, z anglického „fetal bovine serum“

HBSS - iontový roztok podle Hankse, z anglického „Hanks balanced salt solution“

HSA - lidský sérový albumin, z anglického „human serum albumin“

IGF - z anglického „insulin-like growth factor-1“

ITS - inzulín, transferin, selen

MafA - z anglického „v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A“

MEM - neesenciální aminokyseliny

mRNA - mediátorová RNA

NaBu - butyrát sodný

Ngn3 - neurogenin 3

PBS - fosfátový pufr, z anglického „phosphate buffered saline“

PCR - z anglického „Polymerase chain reaction“

Pdx1 - z anglického „pancreatic and duodenum homeobox 1“

RNA - ribonukleová kyselina, z anglického „ribonucleic acid“

RT-PCR - z anglického „reverse transcription polymerase chain reaction“

TAE - pufr, který se skládá z TRIS, kyseliny octové a EDTA

TBE - pufr, který se skládá z TRIS, kyseliny borité a EDTA

ψ – pseudouridin

Abstrakt

Diabetes mellitus 1. typu je závažné autoimunitní onemocnění, při kterém v pankreatu dochází k zániku β -buněk produkujících insulin. Pacienti postižené tímto onemocněním jsou odkázáni na celoživotní zevní podávání insulinu. V současné době je jedinou dostupnou léčebnou metodou buď transplantace celého orgánu pankreatu, nebo izolovaných Langerhansových ostrůvků. Kvůli nedostatku vhodné tkáně k transplantaci a náročné léčbě diabetu probíhá intenzivní výzkum nových alternativních zdrojů buněk produkujících insulin.

Jednou z metod přípravy buněk produkujících insulin je tzv. transdiferenciace pankreatických exokrinních buněk pomocí specifických transkripčních faktorů. V této práci byla k transdiferenciaci exokrinní buněčné linie AR42J použita *in vitro* synteticky připravená mRNA kódující transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA. Primární sekvence mRNA byla optimalizována pro přípravu velmi stabilní mRNA s vysokou mírou translace. Hlavními stabilizačními prvky mRNA byly 3' a 5' nepřekládaná oblast genu pro β -globinu, jehož mRNA vykazuje životnost až 24 hod. Na základě transfekce do buněk AR42J a následné imunofluorescenční detekce byla ověřena správná funkce synteticky připravené mRNA.

Synteticky připravené mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA byly následně použity k transdiferenciaci exokrinních buněk na buňky produkující insulin. Po opakované 10 denní transfekci těchto tří transkripčních faktorů došlo k přeměně exokrinních buněk na buňky produkující insulin. Míra exprese insulinu závisela na kultivačních podmínkách buněk. Transdiferenciace exokrinních buněk AR42J synteticky připravenou mRNA pro Pdx1, Ngn3 a MafA vedla ke vzniku insulin produkujících buněk s charakterem β -buněk.

Klíčová slova: pankreatické buňky, exprese proteinů, transfekce, proteinové kultury

Abstract

Diabetes mellitus type I is severe autoimmune disease which is caused by destruction of insulin-producing β -cells in pancreas. Diabetic patients are dependent on external usage of insulin during their whole life. Nowadays the only treatment of diabetes type I is transplantation of entire pancreas or isolated Langerhans islets. Due to the fact that this kind of treatment is very demanding and limited availability of suitable donors, the researchers are intensively working on development of new alternative ways how to produce the insulin-producing cells.

One of the possible approaches on producing insulin-positive cells is transdifferentiation of pancreatic exocrine cells via transcription factors. In this diploma thesis, the transdifferentiation of exocrine cells AR42J was carried out with *in vitro* synthesized mRNA encoding transcription factors Pdx1, Ngn3 and MafA. The primary mRNA structure was optimized in order to prepare highly stable mRNA which is correctly translated into the protein. The main stabilizing elements in mRNA structure include 3' and 5' untranslated region derived from highly stable β -globin mRNA. In order to verify the function of synthetic mRNA the immunofluorescence staining of transcription factors has been investigated.

Synthetic mRNAs encoding transcription factors Pdx1, Ngn3 and MafA were utilized for transdifferentiation of exocrine cells into insulin-producing cells. After 10 days of repeated transfection with these three transcription factors the exocrine cells became insulin-positive. The level of expression was dependent on the composition of cultivation media. Transdifferentiation of exocrine cells using mRNA for transcription factors Pdx1, Ngn3 and MafA allowed us to derive insulin-positive cells with characteristic features of pancreatic β -cells. (In Czech)

Key words: pancreatic cells, protein expression, transfection, cell culture

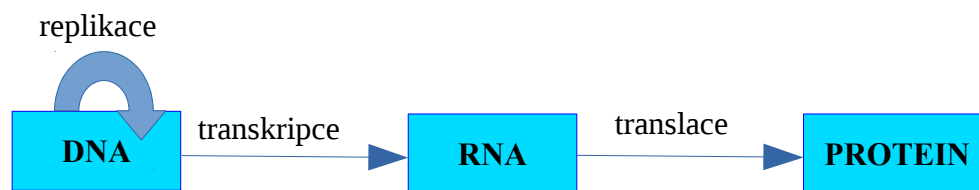
1. Teoretický úvod

1.1. Struktura a funkce mRNA v buňce

1.1.1. Centrální dogma molekulární biologie

Za základní kámen molekulární biologie se považuje centrální dogma, které F. Crick poprvé nastínil v roce 1956 (Obr. 1) a posléze publikoval v roce 1970¹. Centrální dogma molekulární biologie vysvětluje tok genetické informace v rámci biologického systému. Základní myšlenkou dogmatu postulovaného F. Crickem je, že molekula DNA je přepisována do molekuly RNA, která tvoří předlohu pro protein (Obr. 1). Realizace genetické informace tedy probíhá ve 2 fázích, transkripce a translace.

Krokem transkripce se rozumí přepis vlákna DNA do vlákna pre-mRNA, které je dále upraveno posttranskripčním mechanismem eukaryotní buňky do finální a plně funkční mRNA. Takto vzniklá maturovaná mRNA slouží poté jako předloha pro syntézu všech proteinů v buňce.



Obrázek 1. Centrální dogma molekulární biologie. Vlákno DNA se přepisuje do vlákna RNA, podle kterého následnou translací vzniká protein.

1.1.2. Stabilita mediátorové RNA v buňce

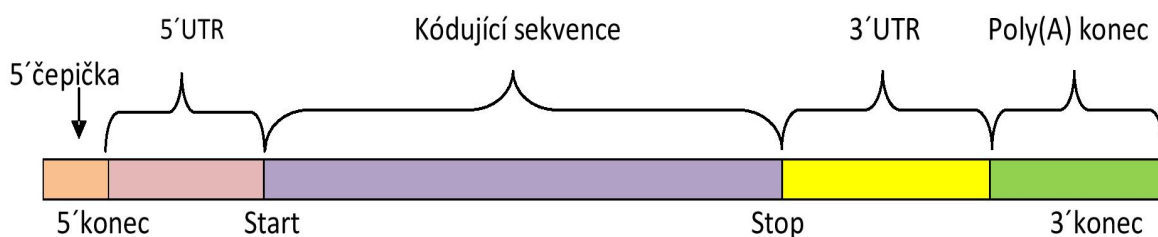
Stabilita jednotlivých mRNA je odlišná mezi organismy, např. v *E. coli*, typické mRNA mají poločas života mezi 1 až 2 minutami, zatímco její nejvíce stabilní mRNA má poločas okolo 15 minut. U kvasinek nejméně stabilní mRNA má poločas přibližně 2 až 3 minuty a naopak stabilní mRNA mají poločas života 90 a více minut. V savčích buňkách se poločas života málo stabilních mRNA pohybuje okolo 15 minut, zatímco například mRNA pro β -globin má poločas života přesahující až 24 hodin².

Z genové analýzy byly vyvozeny dva základní atributy. Prvním z nich je, že délka vlákna mRNA je nepřímo úměrná její stabilitě. Druhým z nich je, že transkripty genů z různorodých funkčních kategorií mají buď velmi krátké (biogeneze ribosomu, RNA helikasy), nebo naopak neobvykle dlouhé (oxidativní fosforylace) poločasy života. Není

tedy překvapením, že krátce se vyskytující mRNA obvykle kódují růstové faktory, cytokiny nebo transkripční faktory, které jsou exprimovány transientně v závislosti na extracelulárních vlivech. Z obecného hlediska můžeme tedy říci, že stabilita mRNA hraje významnou roli v regulaci genové exprese.

1.1.3. Regulace genové exprese pomocí mRNA

Regulace genové exprese může být dosaženo pomocí několika komplexních mechanismů, které můžeme rozdělit do dvou odlišných kroků. První krok zahrnuje kontrolu transkripce zprostředkovanou cis-regulačními DNA elementy, jako jsou promotory, enhancery, „locus control region“ a silencery k vytvoření vyzrálé mRNA. Tento mechanismus byl již velmi dobře charakterizován pro mnoho genů. Na druhou stranu krok zahrnující post-transkripční kontrolu nukleocytoplazmatického transportu mRNA, efektivitu translace, subcelulární lokalizaci a stabilitu zatím nebyl podrobně charakterizován. Nicméně hlavní úlohou v tomto druhém kroku hraje především 5' a 3' nepřekládaná oblast (5'UTR a 3'UTR), 5'methyl čepička a poly(A) 3' konec (Obr. 2). Na rozdíl od regulačních signálů na úrovni DNA, jejichž aktivita je závislá především na primární struktuře, biologická aktivita regulačních prvků na úrovni RNA závisí jednak na primární, ale hlavně na sekundární struktuře a jejich kombinaci. Tyto prvky jsou obecně rozpoznávány specifickými RNA-vazebnými proteiny³.



Obrázek 2. Základní strukturní znaky mRNA. Hlavní části vlákna mRNA tvoří na 5' konci 7-methyl guanosinová čepička, následuje 5' nepřekládaná oblast, vlastní kódující sekvence, která je ohraničena Start a Stop kodónem, dále pak navazuje 3' nepřekládaná oblast, která je zakončena polyadenylovaným 3' koncem.

1.1.4. Typy 5' čepiček, jejich struktura a syntéza

Guanosinová čepička je nedílnou součástí 5' konce většiny mRNA přítomných u eukaryotních organismů a u některých RNA a DNA virů^{4,5}. Nedávné studie 5' konce mRNA prokázaly přítomnost vícero druhů guanosinových čepiček⁶. Na základě struktury a výskytu rozlišujeme dva základní typy čepičky, typ 0 a 1 (Obr. 3). Čepička typu 0 se nachází především u jednobuněčných eukaryotních organismů jako např. kvasinky, zatímco čepička typu 1 se nachází u vyšších eukaryot včetně člověka a podléhá dalším modifikacím.

Oba dva typy čepiček obsahují m⁷G, který je spojený inverzním 5'-5'trifosfátovým můstkem k iniciačnímu nukleosidu transkriptu a vznikají enzymatickou modifikací pre-mRNA. Tyto pre-mRNA jsou syntetizovány pomocí buněčných nebo virových RNA polymeras v jádře buňky.

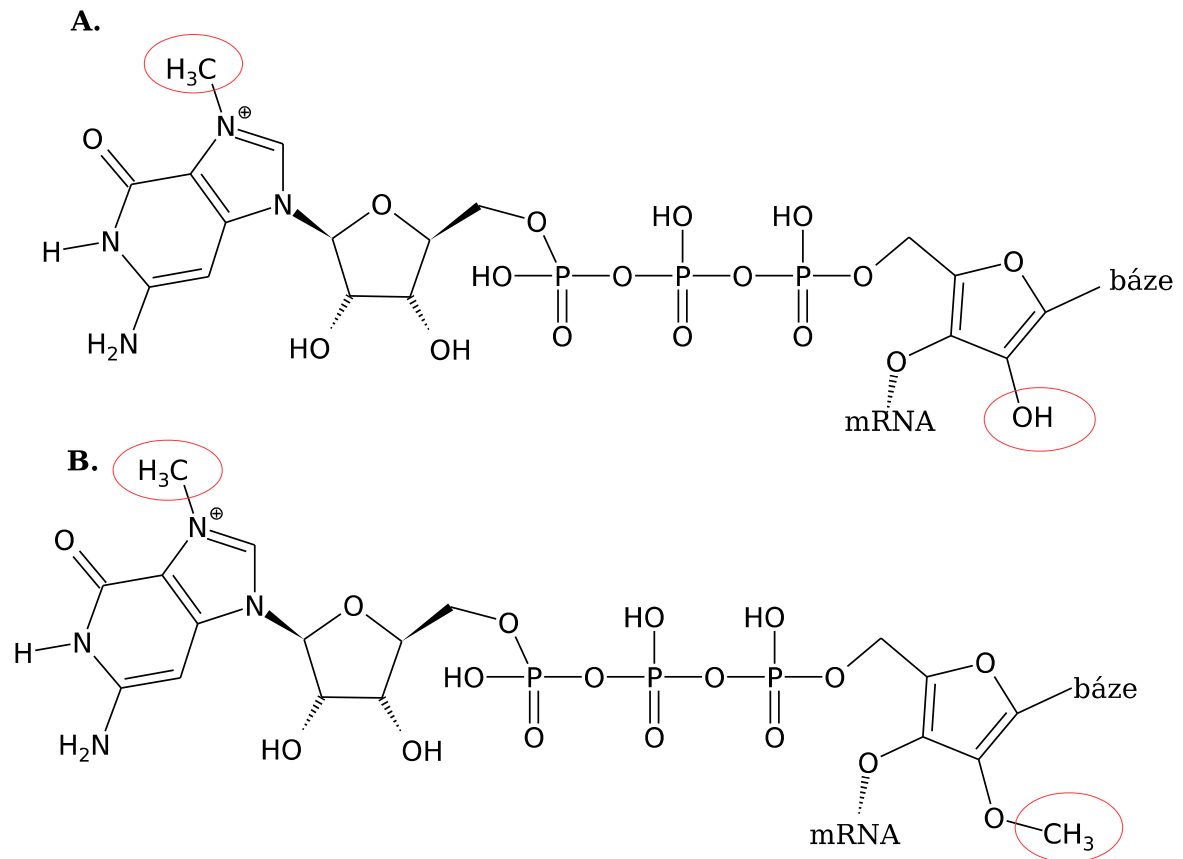
Proces čepičkování zahrnuje tři základní enzymatické reakce: v první reakci je trifosfátový 5' konec vznikající pre-mRNA hydrolyzován RNA 5' trifosfatasou za vzniku difosfátu; druhá reakce je katalyzována enzymem RNA guanylyltransferasou, která zajistí přenos GMP na difosfátový 5' konec pre-mRNA; v závěrečném třetím kroku, GpppN je methylován RNA methyltransferasou⁷.

U čepičky typu 1 navíc dochází k methylaci 2'-OH skupiny na nadcházejícím nukleosidu, kde atom vodíku je nahrazen CH₃ skupinou katalyzovanou enzymem 2'-O-methyltransferasou.

1.1.5. Hlavní úlohy čepičky v organismu

Čepička, jako posttranskripční modifikace pre-mRNA, je konzervována u většiny eukaryotních organismů. U prokaryotních organismů je mRNA bez čepičky a její absence, tudíž i rozpoznání je zajištěno párováním osmi-nukleotidové Shine-Dalgarnovy sekvence⁷. Jelikož eukaryotní mRNA neobsahuje žádnou iniciační sekvenci, m⁷G čepička je využívána jako alternativní signál pro nasměrování translačního aparátu k 5' konci protein-kódujících RNA. Čepička je v organismu rozpoznána translačním iniciačním faktorem eIF4E, se kterým společně tvoří stabilizační komplex⁸. Tento komplex, čepička-eIF4E, je dále rozpoznán 43S pre-iniciačním komplexem (složený z 40S ribosomální podjednotky a iniciačních faktorů eIF3, eIF1, eIF1A, eIF5 a eIF2-GTP-met-tRNA)⁹. Iniciační faktor eIF4E má za příznivých podmínek helikasovou aktivitu a tím napomáhá celému

iniciačnímu komplexu postupovat po vlákne přes 5'UTR až ke start kodónu, odkud se zahájí samotný proces translace¹⁰.



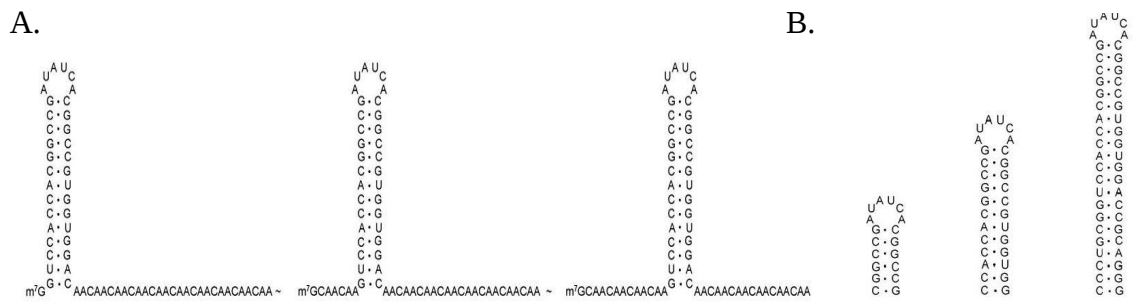
Obrázek 3. Typy guanosinových čepiček na 5' konci mRNA u eukaryot a některých virových RNA. A. Typ 0 – N7-methyl guanosinová čepička, výskyt především u jednobuněčných eukaryot. B. Typ 0 – N7-methyl, 2'-O-methyl guanosinová čepička, nejhojněji zastoupený typ čepičky u vyšších eukaryot.

Vedle interakce m⁷G čepičky s ribosomální RNA, plní ještě další velmi významnou funkci, a to ochranu mRNA před degradací 5' exonukleasami, čímž dochází k podstatnému zvýšení stability mRNA. Na mnoha *in vitro* experimentech byla přítomnost čepičky na 5' konci vlákna mRNA klíčová, jelikož v její nepřítomnosti docházelo k výraznému poklesu, či absenci translace⁵.

1.1.6. 5' nepřekládaná oblast (5'UTR) mRNA

Sekvence 5'UTR oblasti spolu s m⁷G čepičkou význačně přispívají ke stabilitě vlákna mRNA a především jeho translatovatelnosti⁸. Hlavní úlohu hraje délka sekvence, poměr

zastoupení jednotlivých nukleotidů a v neposlední řadě také sekundární struktura.

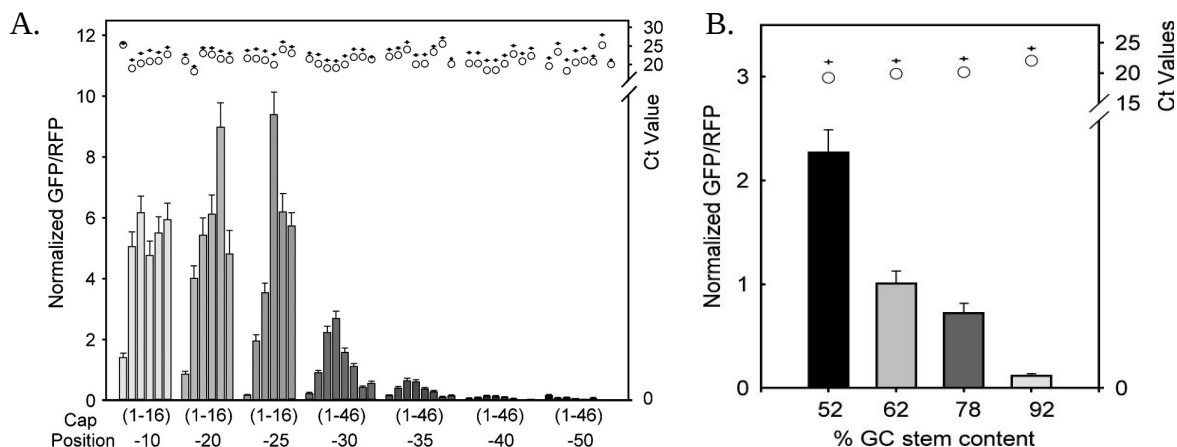


Obrázek 4. Sekundární struktura 5'UTR mRNA v blízkosti m⁷G čepičky. (A) Vlásenky s predikovanou termální stabilitou $\Delta G = -30 \text{ kcal mol}^{-1}$ umístěné do pozic + 1, + 7 a + 13 za čepičku. (B) Vlásenky s predikovanou termální stabilitou - 10, - 25 a - 50 kcal mol⁻¹. Převzato a upraveno dle¹¹.

Nejvhodnější konformací sekundární struktury v 5'UTR oblasti je přítomnost vlásenky s predikovanou termální stabilitou (ΔG) mezi - 25 a - 35 kcal mol⁻¹ a s lokalizací v pozici mezi + 7 a + 10 za čepičkou¹¹. Na obrázku 4 jsou znázorněny příklady sekundárních struktur o variabilním umístění vlásenky (A), buď v pozici + 1, + 7 nebo + 13 a $\Delta G = -30 \text{ kcal mol}^{-1}$, nebo o variabilní ΔG (B), buď - 10, - 25, nebo -50 kcal mol⁻¹. Analýza takovýchto struktur prokázala, že umístění a termální stabilita silně ovlivňují míru translace mRNA. Z obrázku 5 je patrné, že například vlásenka s $\Delta G = -25 \text{ kcal mol}^{-1}$ umístěná do pozice + 1 vykazuje 10 krát menší translaci, než vlásenka umístěná do pozice + 10. V případě umístění velmi stabilní vlásenky ($\Delta G > -35 \text{ kcal mol}^{-1}$) do jakékoliv vzdálenosti od čepičky, se míra translace rapidně snižuje, či dochází k její inhibici.

Začlenění startovního AUG kodónu do struktury středně stabilní vlásenky ($\Delta G \sim -30 \text{ kcal mol}^{-1}$) neovlivňuje míru translace, zatímco začlenění velmi stabilní vlásenky ($\Delta G \sim -50 \text{ kcal mol}^{-1}$) způsobuje značné snížení translace¹². Pravděpodobné vysvětlení je, že velmi stabilní struktura vlásenky blokuje rozvinutí vlákna 43S iniciačního komplexu a tím nezačíná translaci.

Další faktor, který ovlivňuje efektivitu translace je obsah CG párů v sekvenci. Vlásenka například umístěná v pozici + 4 za čepičkou s $\Delta G \sim -30 \text{ kcal mol}^{-1}$ v 5'UTR oblasti obsahem 92 % GC párů vykazovala až 18 krát nižší translační aktivitu oproti 5'UTR oblasti s 52 % GC páry¹¹.



Obrázek 5. (A) Přehled různých kombinací pozic a termálních stabilit vlásenky. Jednotlivé sloupce značí umístění vlásenky v pozici + 1, + 4, + 7, + 10, + 11 a + 13. Navíc, v každé pozici byla analyzována vlásenka o termální stabilitě - 10, - 20, - 25, - 30, - 35, - 40 a -50 kcal mol⁻¹. (B) Ovlivnění míry translace v závislosti zastoupení GC párů v sekvenci 5'UTR oblasti. Převzato z ¹¹.

Obecně 5'UTR oblasti obsahují menší počet nukleotidů než oblasti 3'UTR¹³. V tabulce 1 je uveden přehled délek 5'UTR oblastí mezi taxonomickými kategoriemi. Autoři analyzovali určitý počet sekvencí, z něhož určili minimální, maximální a průměrnou délku 5'UTR.

Tabulka 1. Průměrná, maximální a minimální délka 5'UTR oblasti mRNA náležící různým taxonomickým skupinám. Převzato z ¹³

	Počet sekvencí	Průměrná délka	Max. délka	Min. délka
Člověk	1203	210,3	2803	18
Další savci	142	141,3	936	20
Hlodavci	638	186,3	1786	16
Ptáci	59	126,4	620	17
Další obratlovci	105	164,0	1154	15
Jednoděložné rostliny	144	129,8	715	17
Bezobratlí	5464	221,9	4498	14
Houby	388	134,0	1088	16

1.1.7. 3' nepřekládaná oblast (3'UTR) a poly(A) konec

Oblast 3'UTR eukaryotní mRNA obsahuje regulační elementy, které mají vliv na translaci, stabilitu a transport nově vznikající mRNA. Výsledná podoba 3'UTR oblasti je formována procesem polyadenylace pre-mRNA v buněčném jádře, která zahrnuje 2 kroky,

endonukleolytické štěpení a následnou syntézu poly(A) řetězce.

Přesné místo štěpení na 3' konci a následná polyadenylace jsou závislé na přítomnosti několika základních sekvenčních prvků. V 3'UTR oblasti se vyskytují dva hlavní polyadenylační signály, buď hojně zastoupená sekvence AAUAAA (až v 80 % všech genů), nebo méně častá AUUAAA. Obě tyto sekvence jsou evolučně velmi stálé a záměnou již jednoho nukleotidu dochází k částečné anebo úplné inhibici polyadenylace či štěpení¹⁴. U některých organismů byl prokázán také výskyt méně konzervované AU- nebo A-bohaté oblasti (konsenzuální sekvence UAUUUUAU), která se vyskytuje u velmi labilních mRNA jako je například mRNA kódující *c-fos* protoonkogen^{15,16}. U této mRNA byla nalezena sekvence, která obsahuje 75-ti nukleotidovou oblast bohatou na AU páry. Například začleněním této sekvence do 3'UTR oblasti velmi stálé mRNA pro β -globin, došlo k výraznému poklesu její stability z původních více jak 24 hodin na 30 minut¹⁶.

Dalším sekvenčním prvkem je přítomnost oblasti bohaté na GU nebo U nukleotidy, které se obvykle nacházejí 10-30 bází od štěpného místa směrem k 5' konci u kvasinek^{17,18}. Tato poly(U) oblast plní úlohu stabilizačního prvku tím, že pravděpodobně vytváří stabilní sekundární strukturu s poly(A) koncem v podobě vlásenky. Nicméně vyšší stabilizační efekt než poly(U)-poly(A) vlásenka prokázala sekundární struktura formovaná vlásenkou bohatou na GC páry¹⁹. Lze tedy usuzovat, že sekundární struktura 3'UTR oblasti opět hraje důležitou roli tak jako v případě oblasti 5'UTR.

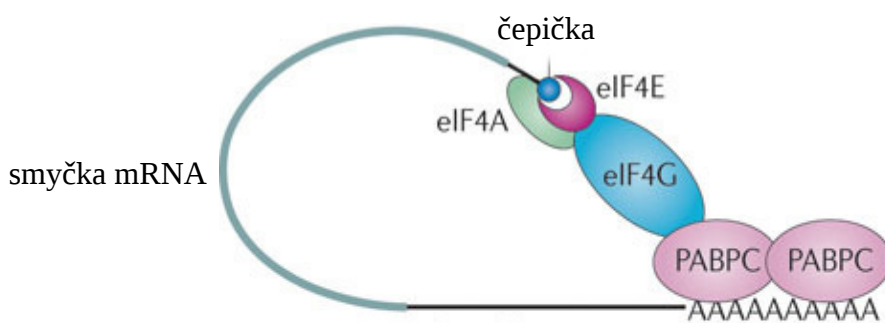
V porovnání s 5'UTR oblastí se oblast 3'UTR naopak liší v počtu nukleotidů. V tabulce 2 je uveden výsledek analýzy délek 3'UTR určitého počtu sekvencí mezi různými taxonomickými kategoriemi.

Tabulka 2. Průměrná, maximální a minimální délka 3'UTR oblasti mRNA náležících různým taxonomickým skupinám. Převzato z ¹³

	Počet sekvencí	Průměrná délka	Max. délka	Min. délka
Člověk	1203	1027,7	8555	21
Další savci	142	441,1	3324	37
Hlodavci	638	607,3	3354	19
Ptáci	59	651,9	3990	21
Další obratlovci	105	446,4	2858	31
Jednoděložné rostliny	144	273,3	1605	22
Bezobratlí	5464	444,5	9142	15
Houby	388	237,1	1142	25

1.1.8. Role poly(A) konce při translaci mRNA

Hlavní rolí poly(A) konce spolu s 5' čepičkou je napomáhání opětovné iniciaci translace. Tato funkce je zprostředkována interakcí mezi poly(A) vazebným proteinem (PABP) a velkým počtem transkripčních faktorů zahrnujících faktor eIF4A, eIF4G a terminační faktor eRF-3. Vazbou faktoru eIF4G s čepičku-vazebným faktorem eIF4E a PABP dochází k formování tzv. „komplexu uzavřené smyčky“ (Obr. 6). Za hlavní funkce tohoto komplexu je považována stabilizace a usnadnění recyklace ribosomů, které právě dokončily translaci mRNA. Délka poly(A) konce se liší jednak v závislosti na druhu organismu, ale také na typu mRNA. Ve většině případů, na rozdíl od krátkých (20-50 A) poly(A) konců, dlouhé poly(A) konce (80-500 A) dosahují vyšší translatovatelnosti. ²⁰



Obrázek 6. Zjednodušené schéma opětovné iniciace translace. Na základě interakce mezi poly(A) vazebných proteinů a čepičku-vazebného proteinu dochází ke stočení vlákna mRNA a vzniku smyčky. Tato konformace zvyšuje efektivitu translace. Upraveno dle²¹

1.2. Výskyt a použití modifikovaných nukleosidů v rámci RNA

1.2.1. Využití mRNA pro přenos genetické informace

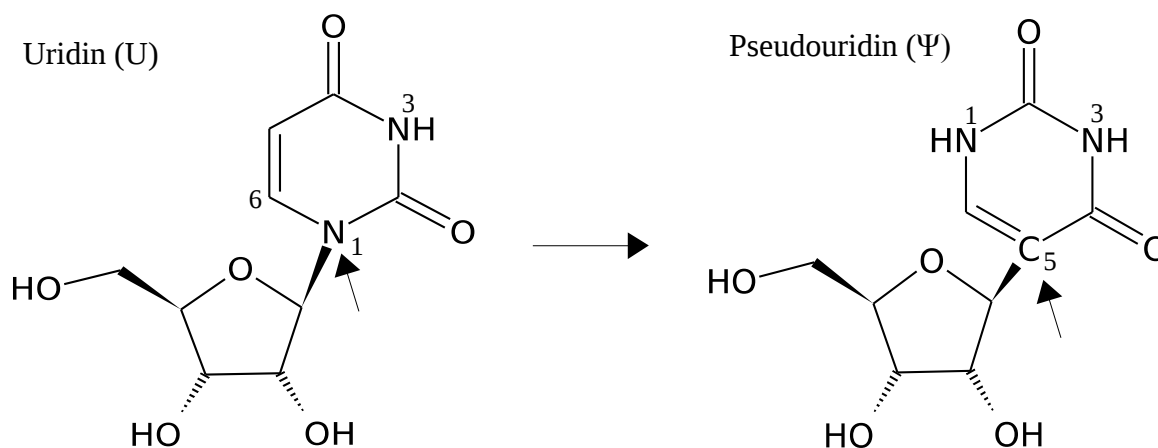
Metoda *in vitro* přenosu protein-kódujících DNA sekvence do buňky byla poprvé publikována v roce 1973 a v průběhu let se stala zavedenou technikou. Vedle toho použití mRNA pro přenos genetické informace byl do značné míry utlumen²². Pravděpodobné důvody, které ovlivnily využití mRNA v laboratorních technikách pro přenos genetické informace do buněk nebo jako terapeutika, jsou především její nestabilita, nízká efektivita translatovatelnosti, obtížná manipulace a v neposlední řadě imunogenicitá²³.

I přes počáteční obtíže s přípravou, manipulací a dopravou mRNA do buněk se stala *in vitro* připravená mRNA velmi důležitým alternativním nástrojem pro realizaci genetické informace v ní obsažené. Zatímco exogenní DNA musí být nejprve přenesena skrze buněčnou cytoplazmu a umístěna do jádra buňky, exogenní mRNA stačí dopravit pouze do buněčné cytoplazmy. Tato výhoda vede k vysoce uniformní expresi exogenní mRNA, které je někdy velmi obtížné docílit u exogenní DNA. Využitím mRNA namísto DNA se v klinické aplikaci zvyšuje bezpečnost, protože u mRNA nedochází k možnému zabudování genetické informace do hostitelského genomu, jako je tomu v případě DNA. Přítomnost modifikovaných nukleosidů ovlivňuje vlastnosti syntetické mRNA. Pro zvýšení efektivity stálosti mRNA v buňkách a následné translace genu na protein se využívá při *in vitro* transkripci mRNA modifikovaných nukleosidů, které zvyšují stabilitu a zmírňují nespecifickou imunitní odpověď buňky vůči cizorodé mRNA. V přírodě se modifikované nukleosidy vyskytují ve formě pseudouridinu (ψ), 5-methylcytidinu (m^5C), N6-methyladenosinu (m^6A), 5-methyluridinu (m^5U) nebo 2-thiouridinu (s^2U).

1.2.2. Modifikovaný nukleosid pseudouridin (Ψ)

Pseudouridin, 5-ribosyl isomer uridinu (Obr. 7), je nejhojněji se vyskytující modifikovaný nukleosid u nekódujících RNA. V největší míře se vyskytuje u rRNA nebo tRNA, zatímco u mRNA bylo jeho zastoupení prokázáno teprve nedávno²⁴. Ψ je unikátní mezi modifikovanými nukleosidy, jelikož namísto běžné N-C glykosylové vazby obsahuje C-C vazbu, která spojuje bázi a sacharid (Obr. 7). Díky zvýšené rotační volnosti C-C vazby ve srovnání s N-C glykosylovou vazbou, Ψ vykazuje větší konformační flexibilitu než uridin. Přítomnost další N^1-H skupiny přináší možnost nového donoru vodíkové vazby, a

pravděpodobně z toho důvodu se Ψ může účastnit nových interakcí RNA.



Obrázek 7. Srovnání chemických struktur uridinu (U, 1- β -D-ribofuranosyluracil) a pseudouridinu (Ψ , 5- β -D-ribofuranosyluracil). Uracilová báze v uridinu je spojena skrze atom dusíku (N^1) k uhlíku ribosy (C^1). Báze v uridinu může tedy sloužit jako donor jednoho atomu vodíku či jako akceptor. V pseudouridinu je uhlík (C^5) uracilu spojen s uhlíkem ribosy (C^1), čímž dochází ke zvýšení donor-vodíkové kapacity na dvě donorová místa oproti U.

1.2.3. Rozložení a lokalizace pseudouridinu v RNA

1.2.3.1. Výskyt pseudouridinu v transferové RNA

Ψ se nachází téměř ve všech molekulách tRNA, jejichž součástí je T Ψ C smyčka pojmenována právě po Ψ 55. Dalšími oblastmi přirozeného výskytu Ψ je oblast D smyčky a antikodónové smyčky u všech živých organismů (archaeobakterie, eubakterie a eukaryota) a organel (mitochondrie a chloroplasty). V ostatních částech tRNA se Ψ vyskytuje velice zřídka. Přítomnost Ψ výrazně přispívá ke stabilizaci specifických strukturních motivů, kterých je součástí, například již zmíněná T Ψ C smyčka (Ψ 55), D smyčka (Ψ 13) nebo antikodónová smyčka (Ψ 38, Ψ 39)²⁵.

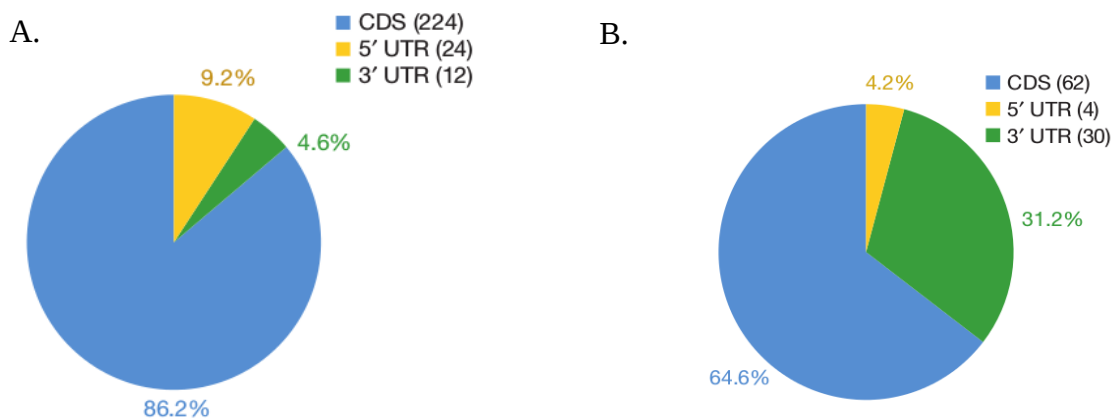
1.2.3.2. Výskyt pseudouridinu v ribosomální RNA

V rámci velké podjednotky rRNA se Ψ seskupují do skupin, čímž vytvářejí důležité funkční domény (II, IV, V). Například doména V představuje centrum pro peptidyltransferasu nebo doména IV tvoří dekódující centrum velké ribosomální podjednotky, které je význačné pro interakci podjednotky rRNA s mRNA a antikodónovou smyčkou tRNA²⁵.

Na rozdíl od velké podjednotky rRNA, u malé podjednotky zatím přítomnost Ψ zbytků a jejich funkce nebyla prokázána.

1.2.3.3. Výskyt pseudouridinu v messenger RNA

U mRNA byly v rámci kódující sekvence zatím identifikovány tři přirozeně se vyskytující modifikované nukleosidy, N⁶-methyladenosin, 5-methylcytosin a inosin. Výskyt pseudouridinu byl prokázán díky vysoce citlivé metodě Pseudo-seq, která umožňuje celkovou analýzu pseudouridinylace RNA s jednonukleotidovým rozlišením²⁴. Tato komplexní analýza prokázala skutečnost, že endogenní mRNA je specificky pseudouridinylována vysoce regulovaným způsobem jak u kvasinek, tak také i u lidských buněk (Obr. 8)²⁴. Jelikož Ψ stabilizuje RNA strukturu, pseudouridinylace mRNA by mohla ovlivňovat efektivitu iniciace translace, ribosomální „pausing“, RNA lokalizaci nebo také regulaci na úrovni RNA interference.



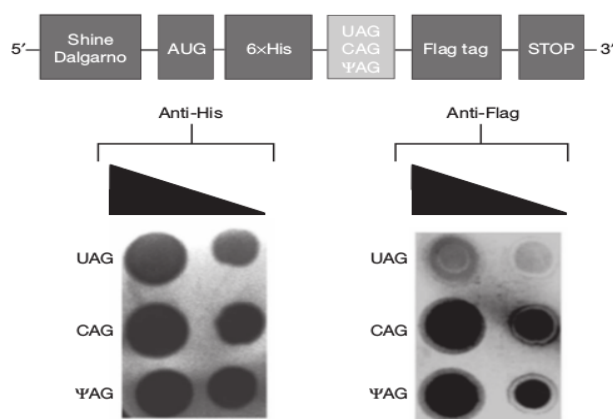
Obrázek 8. Rozložení pseudouridinu v rámci sekvence mRNA u kvasinek *S. cerevisiae* (A) a lidských HeLa buněk. (B) CDS - kódující sekvence, 5'UTR – 5' nepřekládaná oblast, 3'UTR – 3' nepřekládaná oblast. Převzato z ²⁴.

Teprve nedávno bylo prokázáno, že pseudouridin výrazně ovlivňuje dekódování pomocí ribosomu u různých organismů^{26,27}.

Terminace translace závisí na přítomnosti jednoho ze tří terminačních kodónů UAA, UGA nebo UAG v sekvenci mRNA. Záměna počátečního uridinu za pseudouridin způsobí změnu v translační terminaci. Fernández *et al.* připravili několik variant mRNA

obsahujících jednak přirozeně se vyskytujícího terminačního kodónu UAG, jeho modifikovanou variantu Ψ AG a poté mRNA s kodónem CAG, který přirozeně kóduje aminokyselinu glutamin. Z výsledku na obrázku 9 je patrné, že přítomnost terminačního kodónu UAG způsobila terminaci translace a následné zabránění exprese peptidu Flag „tag“, kdežto u jeho modifikované varianty Ψ AG nedošlo k terminaci, ale k pokračování translace a tudíž k expresi peptidu Flag „tag“. Kontrolní varianta s kodónem CAG vykazovala také expresi peptidu Flag „tag“.

Analýza pomocí LC-MS/MS prokázala, že pseudouridylované terminační kodóny UAA a UAG (Ψ AA a Ψ AG) oba řídili inkorporaci buď serinu, nebo threoninu. Jelikož třetí báze je obvykle nescifická („wobble“ párování), je zřejmé, že oba tyto kodóny,



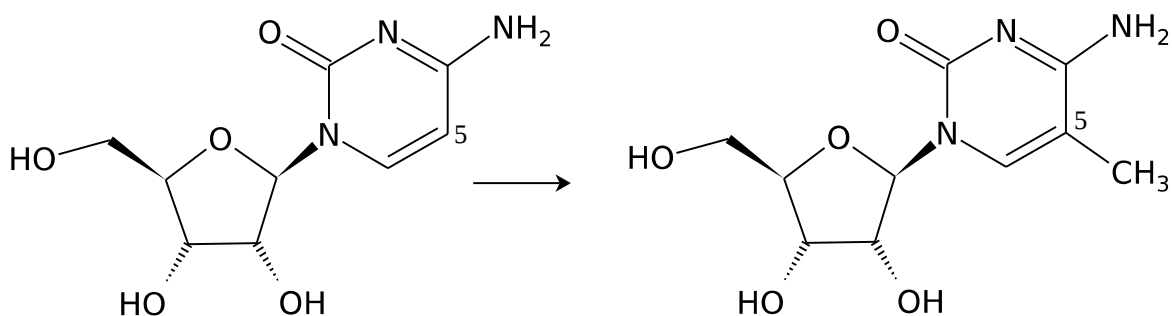
Obrázek 9. Schéma syntetických mRNA kódující 6xHis-tag a Flag-tag s přirozeným terminačním kodónem UAG, jeho modifikovanou variantou Ψ AG a kontrolním kodónem CAG. Dole, analýza „immunoblot“ *in vitro* transkripce mRNA v *E. coli*. Převzato z ²⁶.

obsahující Ψ , mohou kódovat stejnou aminokyselinu. Třetí pseudouridylovaný terminační kodón UGA (Ψ GA) umožňuje inkorporaci tyrosinu či fenylalaninu. Stejný účinek Ψ v terminačních kodónech na ukončení translace byla prokázán nejenom u *in vitro*, ale také i u *in vivo* pokusů.

1.2.4. Modifikovaný nukleosid 5-methylcytosin (m^5C)

Další modifikovaný nukleosid, který se vedle Ψ v přirozené RNA uplatňuje je m^5C (Obr. 10). Přítomnost methylové skupiny na C^5 zvyšuje elektronovou denzitu v aromatickém kruhu díky indukčnímu efektu, čímž se zvýhodňují reakce typu oxidace nebo elektrofilního

ataku, zatímco reakce nukleofilního ataku jsou utlumené.



Obrázek 10. Strukturální vzorec cytidinu a 5-methylcytidinu.

1.2.5. Rozložení a lokalizace m^5C v RNA

1.2.5.1. Výskyt m^5C v transferové RNA

Zatímco eubakteriální tRNA m^5C neobsahují, u archaeálních či eukaryotních tRNA můžeme m^5C nalézt ve značném zastoupení. Nejčastěji se m^5C vyskytuje ve variabilní oblasti TΨC smyčky, ale můžeme i některé modifikované cytosiny nalézt v oblasti antikodónové smyčky²⁸.

Hlavní rolí modifikovaných nukleosidů u tRNA je strukturální a metabolická stabilizace. Strukturální stabilizace tRNA pomocí m^5C byla ověřena četnými fyzikálně-chemickými technikami, jako například cirkulární dichroismus nebo NMR. Vedle strukturální stabilizace, m^5C má také vliv na aminoacylaci či rozpoznávání kodónu²⁹.

1.2.5.2. Výskyt m^5C v ribosomální RNA

Přítomnost m^5C byla prokázána u bakterií, kde se jeho zastoupení liší v závislosti na druhu organismu. Například u *E.coli* se v rRNA nachází pouze tři m^5C , zatímco rRNA u *Thermus thermophilus* jich obsahuje pět nebo šest. Lokalizace modifikace cytosinu v rRNA jsou poměrně dobře zachovány od bakterií až po člověka²⁸.

Eukaryotní rRNA obsahuje v porovnání s bakteriální menší počet m^5C , například lidská 28S rRNA obsahuje pouze dva m^5C nebo eukaryotní 18S rRNA neobsahuje m^5C žádný.

Za hlavní funkci m^5C v organismu se považuje především účast při rozeznávání tRNA a transferu peptidylu při translaci. I když je umístění m^5C v rámci rRNA sekvence daleko od sebe, všechny tři m^5C přítomné u bakteriální 16S a 23S rRNA jsou lokalizovány vzájemně v těsné blízkosti díky trojrozměrné struktuře ribosomu²⁸.

1.2.5.3. Výskyt m^5C v messenger RNA

Na rozdíl od Ψ , který se hojně vyskytuje v kódující sekvenci mRNA, byl m^5C lokalizován především v nekódujících oblastech mRNA (5' a 3'UTR) a pouze v nepatrném zastoupení byl identifikován v kódující sekvenci²⁹. Analýzou cis-regulačních motivů v sekvenci RNA byla potvrzena přítomnost m^5C právě v těchto regulačních oblastech v rámci 3'UTR nebo v blízkosti oblasti vazby Argonaut proteinu.

Tudíž lze usuzovat, že nejenom Ψ , ale také m^5C jsou velice důležité modifikované nukleosidy obsažené ve všech druzích RNA a jsou nepostradatelné pro jejich stabilitu a správnou funkci.

1.3. Imunitní odpověď buňky na přítomnost cizorodé RNA

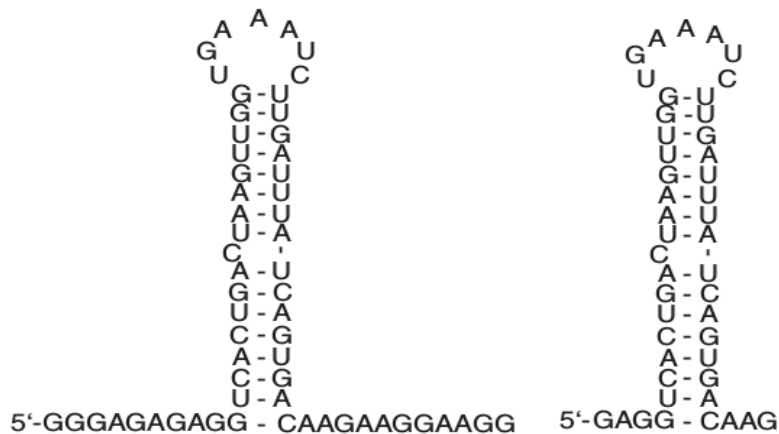
1.3.1. Přirozená imunitní odpověď buňky na cizorodou mRNA

Vysoce účinná obranyschopnost hostitelské buňky proti virové infekci striktně závisí na několika faktorech. Jednak na identifikaci virových částic řadou rozpoznávacích mechanismů, ale také na správné funkci vrozených imunitních efektorů, které potlačují virovou replikaci. V případě RNA virů, je cizorodá dsRNA rozpoznána buněčnými receptory jako například „retinoic acid inducible gene-1“ (RIG-I), „melanoma differentiation-associated gene 5“ (MDA5) nebo „Toll-like receptors 3“ (TLR3), které stimulují expresi interferonu I ($INF\alpha/\beta$). Exprimované $INF\alpha/\beta$ cytokiny jsou vylučovány do extracelulárního prostoru buňky, kde stimulují interferonové receptory buď autokrinním, nebo parakrinním způsobem. Následně dochází k aktivaci signální dráhy JAK/STAT, která spouští expresi interferon-stimulovaných genů. Mezi tyto geny patří například RIG-I, MDA5, antivirové proteiny oligoadenylát synthasa (OAS) nebo proteinkinasa R (PKR), které potlačují globální syntézu proteinů a ustavují antivirový stav^{30,31}.

1.3.2. Aktivace proteinkinasy R pomocí „single-stranded“ RNA

PKR je cytoplasmatická Ser/Thr proteinkinasa, která hraje velice důležitou úlohu při ustavování antivirového a antiproliferačního stavu buňky v odpovědi na virovou infekci. K aktivaci PKR dochází za přítomnosti ssRNA obsahující vlásenkovou strukturu s jednovláknovým koncem a 5' volným trifosfátovým zbytkem (Obr. 11)^{32,33}. Většina

virových a bakteriálních RNA obsahují na 5' konci právě 5' trifosfátový zbytek, zatímco většina buněčných transkriptů obsahují m⁷G čepičku nebo 5' monofosfát. Tudíž je možné, že PKR využívá 5' konec mRNA jako součást kontrolního mechanismu, čímž detekuje přítomnou cizorodou mRNA v buňce. Odstraněním 5' trifosfátového zbytku pomocí telecí intestinální fosfatasy (CIP) z uměle připravené jednovláknové RNA došlo k výraznému potlačení aktivace PKR v transfekovaných buňkách³².



Obrázek 11. Vlásenkové struktury RNA s jednovláknovým koncem a 5' volným trifosfátovým zbytkem způsobující aktivaci PKR. Převzato z ³².

1.3.2.1. Inkorporace pseudouridinu ovlivňuje aktivaci proteinkinasy R

Inkorporací pseudouridinu při *in vitro* transkripci mRNA je možné dosáhnout vyšší efektivity následné translace nežli mRNA obsahující uridin³⁴. Analýza čtyř různých variant mRNA (pseudouridin vs. uridin a s přítomnosti či absencí 5' čepičky) prokázala, že mRNA s 5' trifosfátovým koncem a přirozeným uridinem aktivuje PKR v mnohem větší míře nežli varianta s pseudouridinem³⁵.

1.3.3. Protein B18R zabraňuje aktivaci interferonů alfa a beta

Interferony (IFN) tvoří heterogenní rodinu cytokinů, které byly zpočátku definovány pro jejich schopnost indukovat rezistenci vůči virové infekci. Rozmanité podrodiny IFN- α a IFN- β (IFN typu I) sdílejí sekvenční podobnost a vážou různé, druhově-specifické receptory hostitelských buněk. Na druhou stranu, INF- γ (INF typu II) je sekvenčně odlišný od IFN typu I a váže jiné druhy receptorů. Vedle antivirových vlastností, IFN vykazují další biologické vlastnosti zahrnující regulaci proliferace, imunomodulace a buněčné

diferenciace³⁶.

Vaccinia virus (VV) je typický člen rodiny, cytoplasmatických DNA poxvirů. Proti působení INF mají poxviry několik obranných strategií. Jednou z nich je sekrece proteinu VVK3L, který váže dsRNA, čímž ji chrání před detekcí proteinkinasy R. PKR může být aktivována buď právě dsRNA, nebo IFN. Protein VVK3L má vysokou sekvenční podobnost s eukaryotním iniciačním faktorem eIF-2 α a kompetitivně se váže na PKR, čímž blokuje fosforylaci a inaktivuje hostitelský eIF-2 α . Druhou obrannou strategií poxvirů proti IFN je exprese rozpustných cytokinových receptorů kódovaných genem B18R^{36,37}. Glykoprotein B18R má velikost mezi 60 až 65 kDa a obsahuje tři domény podobné imunoglobulinu (Ig). Jeho exprese probíhá na buněčném povrchu s následnou sekrecí do média. Exprese B18R probíhá již v rané fázi infekce a vykazuje vysokou afinitu k lidskému IFN- α a IFN- β .

Protein B18R je velice užitečný IFN receptor, jelikož jeho přidavek do kultivačního média při přenosu mRNA do buněk napomáhá k potlačení nespecifické imunitní odpovědi a zvýšení exprese cíleného proteinu³⁸.

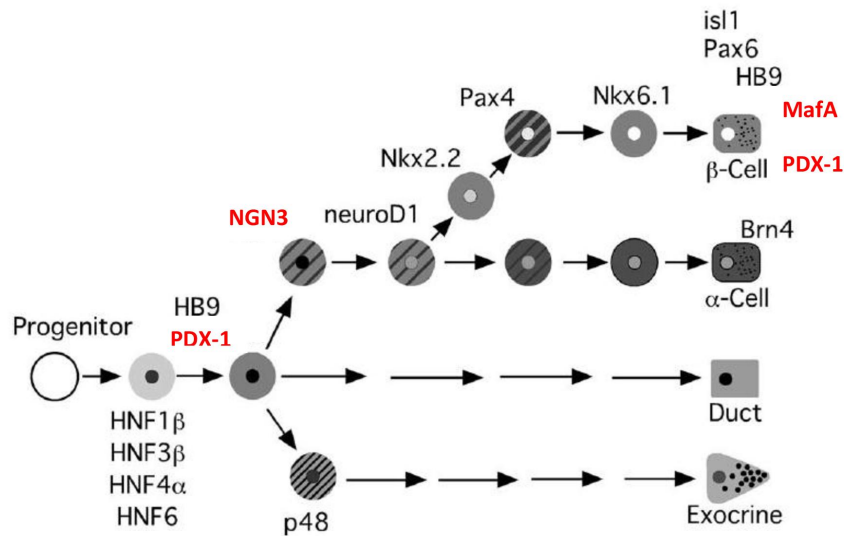
1.4. Pankreatické buňky a jejich transkripční faktory

1.4.1. Vývoj pankreatických buněk

Během embryonálního vývoje vzniká pankreas z buněk zárodečné endodermální lišty. Spojením dorsální a ventrální části budoucího pankreatu, které vznikají jako výchlipky formujícího se střeva, vzniká později výsledný pankreas. V průběhu vývoje pankreatu se specializované pankreatické buňky diferencují z multipotentních progenitorových buněk, které exprimují transkripční faktory Pdx-1 a Ptf1³⁹. Mezi základní pankreatické buňky patří exokrinní, duktální a endokrinní buňky. Endokrinní buňky jsou v pankreatu lokalizovány v rámci buněčných shluků tzv. Langerhansových ostrůvků. Pankreatické endokrinní buňky se dělí na čtyři buněčné subtypy (α , β , δ a PP), které exprimují řadu podobných genů. Tyto geny se účastní především regulované sekrece hormonů z intracelulárních vesikulů (glukagon, insulin, somatostatin a pankreatický polypeptid)⁴⁰.

Vývoj a diferenciace pankreatických endokrinních buněk je dynamický proces, který je regulovaný na úrovni genové exprese. K vývoji rozdílných buněčných typů s jejich jedinečnými fenotypy je vyžadována iniciace a udržení specifických programů genové exprese. Na průběh programu genové exprese může být nahlíženo jako na změny

v klíčových hráčích - transkripčních faktorech, které tento proces kontrolují (Obr. 13).

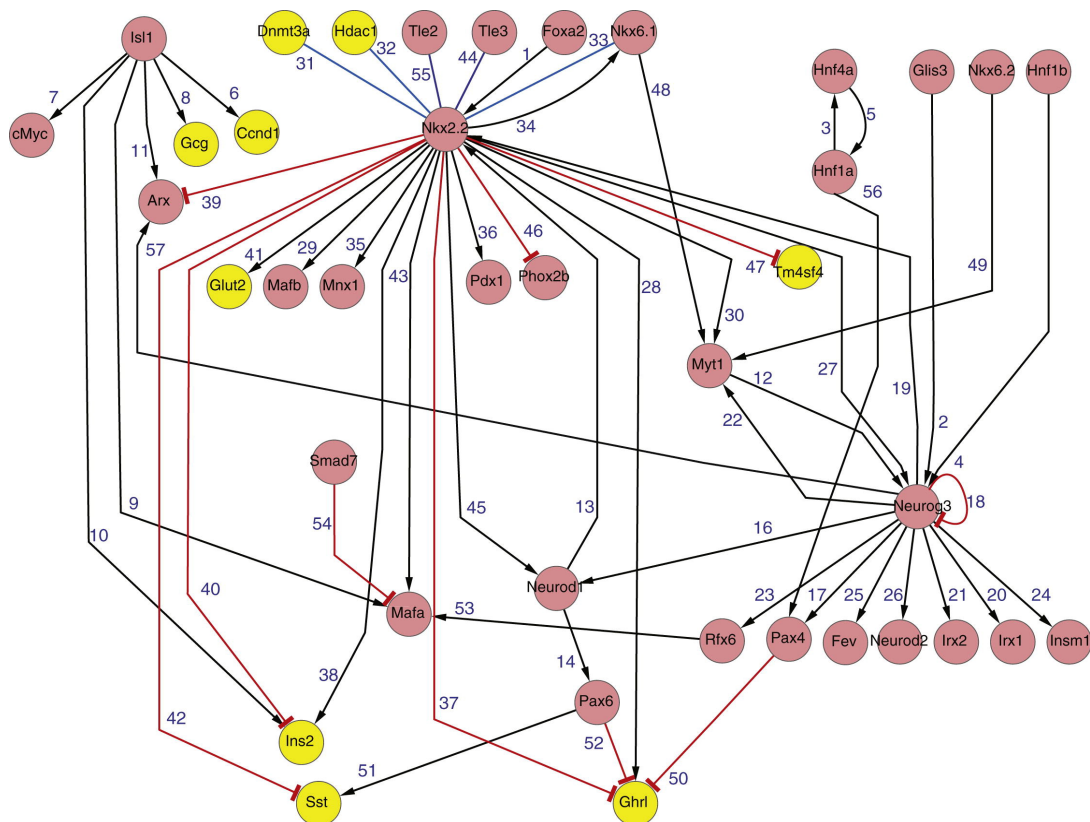


Obrázek 13. Zjednodušený model kaskády transkripčních faktorů účastnících se vývoje pankreatických buněk. Červeně znázorněné transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA představují klíčové zástupce pro diferenciaci v β-buňku. Upraveno dle⁴⁰.

Studium diferenciačního procesu jako lineární kaskády genů, které jsou indukované, nebo potlačené by bylo ideální, nicméně skutečnost je mnohem komplikovanější. Celková síť transkripčních faktorů v dospělé buňce se skládá z několika interagujících drah. Například faktory zahrnuté v pankreatickém vývoji jsou exprimované ve více časových intervalech a hrají více než jednu úlohu^{40,41}. Na obrázku 14 je uveden příklad vzájemného ovlivňování transkripčních faktorů, které působí při vývoji pankreatických buněk⁴². Vývojově velice důležitými transkripčními faktory, původně identifikovanými díky jejich reakci s insulinovým genovým promotorem jsou Isl1, Pdx1 a NeuroD⁴³⁻⁴⁵.

Pankreatické endokrinní buňky, které jsou schopné vnímat změny v přítomnosti živin a odpovídat na ně vesikulární sekrecí bioaktivních peptidů, mají více společného s neurálními buňkami než s jejich sousedními exokrinními nebo duktálními buňkami. Tato skutečnost je dána tím, že pankreatické endokrinní buňky exprimují mnoho genů, které byly původně identifikovány u neuronů, jako např. tyrosin hydroxylasa, neuron-specifická enolasa nebo glutamát dekarboxylasa^{40,46,47}.

Není tedy žádným překvapením, že při vývoji pankreatických endokrinních buněk se uplatňuje mnoho transkripčních faktorů, které se také účastní neurálního vývoje.



Obrázek 14. Vzájemné ovlivňování transkripčních faktorů během vývoje pankreatických endokrinních buněk. Červeně jsou označeny transkripční faktory a žlutě jsou označeny funkční hormony. Převzato z⁴²

Příkladem mohou být transkripční faktory Pax4 a Pax6⁴⁸, které jsou členy rodiny „paired homeodomain“, dále pak Nkx2.2 nebo Nkx6.1⁴⁹, které jsou členy rodiny „NK homoedomain“ nebo pro-endokrinní bHLH transkripční faktory Neurogenin3 a NeuroD^{50,51}.

Při vývoji pankreatických buněk se uplatňují nejen transkripční faktory příbuzné neurálním buňkám, ale také i tzv. hepatocytární nukleární faktory (HNF). Původně byly tyto faktory identifikovány jako regulátory transkripce specifických genů pro jaterní buňky, avšak dnes je již známo, že hrají roli také při vývoji a funkci pankreatu.

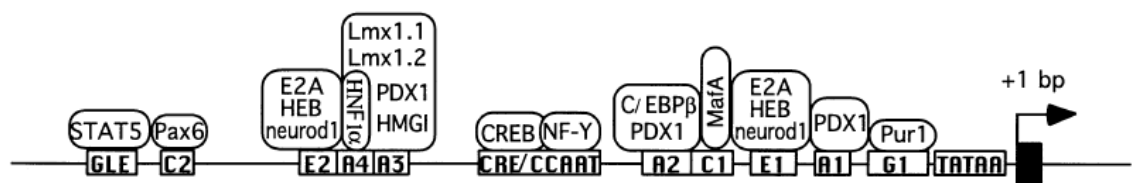
1.4.2. Pankreatické transkripční faktory

1.4.2.1. Transkripční faktor „Pancreatic duodenal homeobox-1“ (Pdx1)

Vývoj pankreatu je více než 15 let studován pomocí transkripčních faktorů a jejich

hierarchií během vývoje. Centrálním a nejvíce studovaným transkripčním faktorem je „pancreatic duodenal homeobox-1“ (Obr. 13), který byl původně identifikován na základě jeho schopnosti se vázat na geny pro insulin a somatostatin. Vedle označení Pdx1 se můžeme v literatuře také setkat s dalšími názvy, jako jsou IUF-1, IPF-1, IDX-1, STF-1 a GSF. Protein Pdx1 obsahuje 283 aminokyselin s predikovanou molekulární hmotností 31 kDa. Jako většina transkripčních faktorů i Pdx1 obsahuje oddělené funkční domény, z nichž homodoména se účastní vazby na DNA a protein-proteinové interakce. Řadou DNA vazebných experimentů se prokázalo, že Pdx1 reguluje velký počet genů zahrnutých do zajišťování funkce a identity β -buněk jako jsou insulin, glukosový transportér 2 (Glut2), glukokinasa a ostrůvkový amyloidní polypeptid. Pdx1 také reguluje genovou expresi somatostatinu v δ -buněkách Langerhansových ostrůvků a ve vyvíjejícím se mozku.

Expresí Pdx1 během embryonálního vývoje pankreatu je zaznamenána již ve dni E8.5 pouze v předním střevě⁴⁵. Tato velice raná exprese Pdx1 potvrzuje skutečnost, že tento transkripční faktor hraje klíčovou roli během pankreatické specifikace. Nicméně v dalším průběhu vývoje je jeho exprese potlačena v buňkách, které se diferencují buď v buňky exokrinní, duktální nebo endokrinní^{41,52}. Jedinou výjimkou jsou endokrinní, insulin-pozitivní β -buňky, u kterých se Pdx1 začne znovu exprimovat. Pdx1 v maturovaných β -buněkách je nezbytný především pro aktivaci exprese genů zodpovědných za glukosou stimulovanou sekreci insulinu a také vlastní expresi insulinu (Obr. 15).



Obrázek 15. Promotorová oblast genu pro ostrůvkový hormon insulin. Promotorová oblast genu pro potkaní insulin I se známými sekvenčními elementy a vázajícími se faktory. Rámečky znázorňují charakteristické sekvenční elementy. Ostrůvkové transkripční faktory, které se váží na vazebné místo, jsou ohraničeny oválně nad promotorem. Převzato z⁴⁰

Rozsáhlá studie mutantních myší, které měly umlčený gen pro Pdx1 prokázala buď

kompletní pankreatickou agenezi, nebo vytvoření pankreatu s velmi rozsáhlým poškozením a vzniku pouze glukagon-exprimujících buněk⁵³. Studie promotorové oblasti genu *pdx1* byly využity k vyhledání faktorů, které regulují jeho expresi, a tudíž se v pankreatickém vývoji uplatňují dříve než Pdx1. Na základě těchto studií bylo objasněno, že v regulační oblasti Pdx1 leží vazebná místa pro zástupce transkripčních faktorů rodiny HNF, transkripční faktory Pax6 („paired box protein 6“) a rovněž i samotný Pdx1^{54,55}. Nicméně transkripční faktor Pax6 a HNF1 α nejsou při vývoji exprimovány v tak hojné míře, aby spustily expresi Pdx1. Tudíž za hlavní aktivátor exprese Pdx1 se považuje transkripční faktor HNF3 β , jehož delece u mutančních myší způsobila inhibici exprese Pdx1.

1.4.2.2. *Transkripční faktor Neurogenin 3*

Endokrinní buňky dospělého pankreatu vznikají z nediferenciovaných progenitorových buněk v průběhu pankreatického embryonálního vývoje ve dnech E12.5 až E16.5. Diferenciace těchto pankreatických progenitorových buněk je primárně regulována pomocí Notch laterální inhibice^{56,57}. Notch-laterální inhibice je zprostředkována prostřednictvím δ ligandů a Notch receptorů, které fungují na základě výběru jediné buňky. U této buňky je aktivována exprese transkripčního faktoru Neurogenin3 (Ngn3) a tím i program endokrinní diferenciace, zatímco u sousedních buněk dojde v důsledku aktivace Notch signální dráhy k zamezení aktivace endokrinní diferenciace. Tímto způsobem je z tak velkého počtu progenitorových buněk vybráno pouze malé procento, které se stane endokrinními buňkami, zatímco zbytek progenitorových buněk zůstane nediferenciovaný. Základním cílem této buněčné specifikace je tedy indukce exprese transkripčního faktoru Neurogenin3, který je hlavním regulátorem endokrinního vývoje buňky⁵⁰.

Ngn3 patří do rodiny helix-loop-helix (bHLH) transkripčních faktorů a funguje primárně jako aktivátor genové transkripce v endokrinních progenitorových buňkách. Ngn3 je exprimován pouze v malé míře v rámci vyvíjejícího se pankreatu a jeho úlohou je zvýšení exprese dalších transkripčních faktorů jako je NeuroD, Nkx6.1, Pax4 a Pax6, které usměrňují vývoj buňky v β -buňky a produkci insulinu⁴⁰.

Navíc význam Ngn3 ve vývoji endokrinní buňky je zdůrazněn skutečností, že nedostatek Ngn3 zabraňuje vzniku prakticky všech pankreatických a střevních endokrinních buněk. V opačném případě, nadměrná exprese Ngn3 vede také ke zmenšení počtu endokrinních buněk, proto je během vývoje striktně vyžadována přesná regulace exprese Ngn3 pro

udržení správné velikosti a buněčného složení endokrinního pankreatu.

1.4.2.3. *Transkripční faktor MafA*

V sekvenci insulinového promotoru (Obr. 15) se nachází mnoho vazebných míst pro četné transkripční faktory, které hrají kritickou roli při genové expresi insulinu. Do oblasti A1, GG2 a A3 se váže již zmíněný transkripční faktor Pdx1 a do oblasti E1 se váže transkripční faktor NeuroD, který patří do rodiny bHLH. Dalším důležitým vazebným místem je oblast označovaná u člověka C1 nebo RIPE3b u potkana, na které se váže transkripční faktor MafA, člen proteinové Maf rodiny⁵⁸.

Maf proteinová rodina transkripčních faktorů tvoří podskupinu rodiny základního leucinového zipu. Maf proteiny jsou homologní k virovému Maf (v-Maf) onkoproteinu, který je původním členem této rodiny. Maf proteinová rodina je rozdělena na základě jejich struktury a funkce na velké Maf a malé Maf proteiny. MafA patří do skupiny velkých Maf proteinů společně s MafB, c-Maf a Nrl. MafA je výhradně exprimována v β -buňkách a nikoliv v α -, γ -, δ -buňkách pankreatických ostrůvků⁵⁹. Pokud je MafA (podobně jako Pdx1 nebo NeuroD) exprimován pouze samostatně, jedná se o slabý transaktivátor insulinového promotoru. Nicméně v případě, kdy jsou tyto tři transkripční faktory exprimovány současně dochází k silné synergické aktivaci exprese insulinového genu⁶⁰. Tudíž účast všech těchto třech transkripčních faktorů je nezbytná pro dostatečnou expresi insulinu v β -buňkách.

Studii knockout myši s umlčeným genem pro MafA byl prokázán vývoj věkově závislého diabetu⁶¹. Po narození mají Langerhansovy ostrůvky knockout myši standardní morfologii, nicméně s postupem věku mají poškozenou glukosou stimulovanou sekreci insulinu a vykazují abnormální architekturu. Navíc u těchto myši dochází ke snížení exprese glukosového transportního přenašeče 2 (Glut2), který je důležitou součástí systému odpovědi β -buněk na změnu hladiny glukosy v krvi.

Hlavní úlohu transkripčního faktoru MafA je nejenom regulace exprese insulinu, ale rovněž regulace dalších genů důležitých pro správnou funkci β -buňky. Jedná se o geny zahrnuté do biosyntézy insulinu, insulinové sekrece nebo metabolismu glukosy, jako například prohormon konvertasa (Pcsk1), podjednotky K^+ kanálu (Kir6.2 a SUR1), „glucagon-like peptide 1 receptor“ (GLP1-R), Glut2, glukokinasa a pyruvát karboxylasa (Tab. 3)⁶². MafA také reguluje expresi dalších transkripčních faktorů v β -buňkách jako je

Pdx1, NeuroD a Nkx6.1. Je tedy zřejmé, že MafA je klíčovým regulačním prvkem genů, které jsou nezbytné pro správnou funkci β -buněk⁶³.

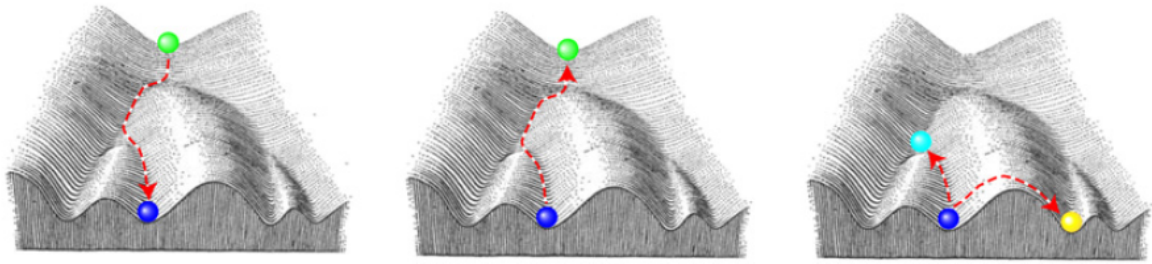
Tabulka 3. Seznam genů regulovaných transkripčním faktorem MafA a jejich funkce v β -buňkách. Upraveno dle⁶³.

Gen	Funkce
Preproinsulin Prohormon konvertasa	biosyntéza insulínu
SUR1 Kir6.2. GLP1-receptor	sekrece insulínu
Glukosový transportér 2 Glukokinasa Pyruvát karboxylasa	metabolismus glukosy
Pdx1 Nkx6.1 NeuroD	transkripční faktory

1.5. Buněčný reprogramming

Primárním cílem regenerativní medicíny je příprava nových buněk, které by mohly sloužit k opravě či náhradě nemocné nebo poškozené tkáně. Mezi velkým počtem inovativních myšlenek, které se snaží dosáhnout tohoto cíle je přístup, který zahrnuje přeměnu jednoho typu dospělých buněk na typ odlišný. Například široce rozšířené lidské dermální fibroblasty a adipocyty mohou být přeměněny na jiné, lékařsky významné buňky, jako jsou například neurony, kardiomyocyty nebo pankreatické β -buňky. Výhodou tohoto přístupu je příprava imunologicky vhodných buněk, jelikož by pacientovi byly transplantovány jeho vlastní buňky.

Všechny buňky jsou během svého vývoje řízeny přísnými pravidly, podle kterých se z pluripotentní embryonální buňky stane dospělá a plně diferencovaná buňka. Přední embryolog Conrad H. Waddington znázornil tento proces vývoje buňky jako kuličku, která se kutálí z vrcholu hory do údolí⁶⁴. Jednotlivé větvení údolí představují možné vývojové směry, po kterých se kulička postupně ubírá a kde na konci zaujme stabilní diferencovaný



Obrázek 16. Buněčný vývoj a reprogramming. Schématické diagramy vývoje a reprogrammingu buněk (A) V normálním vývoji, pluripotentní buňka, jako například embryonální kmenová buňka (zelená kulička), se kutálí dolů větveným údolím, které reprezentuje všechny možné vývojové směry. Buňka během vývoje podlehne řadě rozhodnutí a změnám, čímž se dostane do stavu dospělosti na konci údolí (modrá kulička). (B) Během pluripotentního reprogrammingu, který zahrnuje buněčný somatický jaderný transfer (SCNT) a formování indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC), je celý proces obrácen a diferencovaná buňka je vrácena do původního pluripotentního stavu. Tento proces je znázorněn kuličkou (buňkou), která vystoupá ze dna údolí na jeho vrchol. (C) Přístup „lineage reprogramming“ zahrnuje dediferenciaci a transdiferenciaci, kdy se dospělá buňka buď vrátí do progenitorového stavu (světle modrá kulička), nebo se přemění rovnou v jinou dospělou buňku (žlutá kulička). Převzato a upraveno dle⁶⁵.

stav. (Obr. 16A)

V takovémto stavu se buňka již dále nedělí a nachází se ve stavu tzv. terminální diferenciaci, který je většinou permanentní. Opačný proces přirozeného vývoje, kdy se kulička (buňka) vrátí zpět do svého původní stavu embryonální pluripotence se označuje jako pluripotentní reprogramming (Obrázek 16B). Yamanaka a jeho kolegové⁶⁶ dokázali pomocí metody pluripotentního reprogrammingu vytvořit tzv. indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC) z buněk pokožky dospělého člověka. Za tuto metodu obdržel v roce 2012 Nobelovu cenu za medicínu⁶⁷.

Mezi další metodu pluripotentního reprogrammingu patří somatický buněčný jaderný transfer (SCNT), při kterém je injektováno jedno jádro ze somatické buňky do vajíčka zbaveného jádra ve stavu druhé meiotické metafáze⁶⁸. Kromě pluripotentního reprogrammingu existují i další přístupy, při kterých dochází k přeměně dospělé diferencované buňky buď na buňku progenitorovou anebo buňku se zcela odlišným fenotypem, bez potřeby návratu do stavu pluripotence. Mezi přístupy tzv. „lineage reprogramming“ patří proces dediferenciaci a transdiferenciaci (Obrázek 16C), které

nesou značné výhody oproti metodě pluripotentního reprogramingu⁶⁵.

Dediferencované či transdiferencované buňky mohou být využity v regenerativní medicíně k opravě či regeneraci tkání. Například přeprogramované pankreatické exokrinní buňky mohou sloužit jako zdroj nových β -buněk, které byly poškozené autoimunitním atakem diabetu typu 1.

Hlavní převrat v buněčném reprogramingu β -buněk představuje práce Zhou a kol.⁶⁹, kteří prokázali, že pankreatické exokrinní buňky mohou být přeměněny na buňky endokrinní. Pomocí adenovirových nosičů vnesli do myšího pankreatu směs genů pro pankreatické transkripční faktory. Z této skupiny určili tři transkripční faktory Neurogenin3, Pdx1 a MafA, které byly schopné vyvolat transdiferenciaci pankreatických exokrinních buněk na buňky produkující insulin s charakterem β -buněk. Takto vzniklé β -buňky nevykazovaly expresi duktálních či exokrinních markerů, čímž bylo vyloučeno, že se nejedná o hybridní či smíšené buněčné fenotypy. Z výsledků této studie se dá usuzovat, že fenotyp terminálně diferenciovaných dospělých pankreatických buněk může být za určitých okolností pozměněn.

2. Cíl práce

Hlavním cílem této diplomové práce byla příprava syntetické mRNA kódující pankreatické transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA a dále ověřit schopnost synteticky připravených mRNA stimulovat transdiferenciaci pankreatické exokrinní buněčné linie AR42J na buňky produkující insulin.

Dílčí cíle:

- příprava DNA templátů pro *in vitro* syntézu mRNA kódující transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA
- ověření správné funkce mRNA pomocí transfekce do buněk AR42J
- transdiferenciace exokrinních pankreatických buněk na buňky produkující insulin pomocí opakované transfekce mRNA kódující Pdx1, Ngn3 a MafA

3. Použitý materiál

Abcam (UK) - rabbit Anti-MafA antibody, rabbit Anti-Pdx1 antibody, rabbit Anti-insulin antibody, mouse Anti-insulin, mouse Anti-glucagon antibody, rabbit Anti- α -amylase antibody

Amresco (USA) - glycin, glycerol, tris base

B. Braun Medical (ČR) - aqua pro injectione

Cellscript (USA) - T7 mScript™ Standard mRNA Production System

Clonetech (USA) - plasmid pAcGFP1-N3, In-fusion®Cloning Plus

Developmental Studies Hybridoma Bank (USA) - mouse Anti-Neurogenin3 antibody

Fermentas (Kanada) - 6X DNA Loading Dye, GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Top Vision LM GQ Agarose

IDT (USA) - primery

Life Technologies (USA) - Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG, Alexa Fluor 647 donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse IgG, NucBlue® Fixed Cell Stain ReadyProbes™ reagent - DAPI Special Formulation, Glutamax, ITS, MEM, RPMI medium, Ham's F12-K (Kaighn's) Medium, OptiMEM®, Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit, Qubit® RNA BR Assay Kit, Lipofectamine® MessengerMAX™ Reagent mRNA Transfection kit, BigDye Sequencing RR-24 Terminator, v3.1, Ambion® Anti-Reverse Cap Analog (ARCA), MEGAclear™ Kit, RNasecure™

New England Biolabs (USA) - Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, NEbuffer 4, antarktická fosfatasa, restriční enzymy

Polysciences, Inc. (USA) - paraformaldehyd EM Grade Powder

Peptidech (USA) - bFGF, EGF, IGF

Qiagen (SRN) - RNeasyPlus® Mini Kit, QIAGEN® Plasmid Midi Kit, QIAprep® Spin Miniprep Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit

Roche (SRN) - FastStart PCR Master, Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit, FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)

Sigma-Aldrich (SRN) - isopropanol, 2-merkapt ethanol, Accutasa, 5'-aza-2'-deoxycytidin, BIX01294, Betacellulin, dabco-mowiol, dimethylsulfoxid, EDTA, ethanol, ethidium bromid, exendin-4, FBS, BSA, HBSS, SOC médium, chlorid sodný, kyselina

boritá, nikotinamid, Triton X-100, Tris-HCl, trypsin

Složení roztoků

SOC médium: 2% zeleninový pepton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukosa

TAE: na 1000 ml 48,4 g tris base, 11,4 ml koncentrované kyseliny octové (17,4 M), 3,7 g EDTA

TBE: na 500 ml 27 g tris base, 13,75 g kyseliny borité a 10 ml 0,5 M roztoku EDTA

Použité přístroje

Sekvenátor 3130 Genetic Analyzer - Life Technologies (USA)

Analytické váhy - OHAUS Corp., VP64C (USA)

Aparatura pro elektroforézu - Appalex, Minigel 2, Midigel 2 (Francie)

Automatické mikropipety - BioHit (Finsko)

Centrifugy - Hettich Micro 200, 220 R, Universal 320R, Rotanta 460R (Švýcarsko)

CO₂ inkubátor - MCO17-AIC, Sanyo (Japonsko)

Dokumentační systém - Syngene, G:Box (Velká Británie)

Inkubátor - HeraTherm, Thermo Scientific (SRN)

Laminární box - ESCO, Airstream PCR (Singapur), HeraSafe KS, Thermo Scientific (SRN)

Mikroskopy - Olympus, BX41FL (Japonsko), Evos FL Auto, Life Technologies (USA)

PCR termocykléry - Applied Biosystems, Veriti (USA), Biometra Tpersonal (SRN)

pH metr - Eutech, pH 2700 (Nizozemsko)

Předvážky - Ohaus, Scout (Švýcarsko)

Vodní lázeň - Julabo, TW12 (SRN)

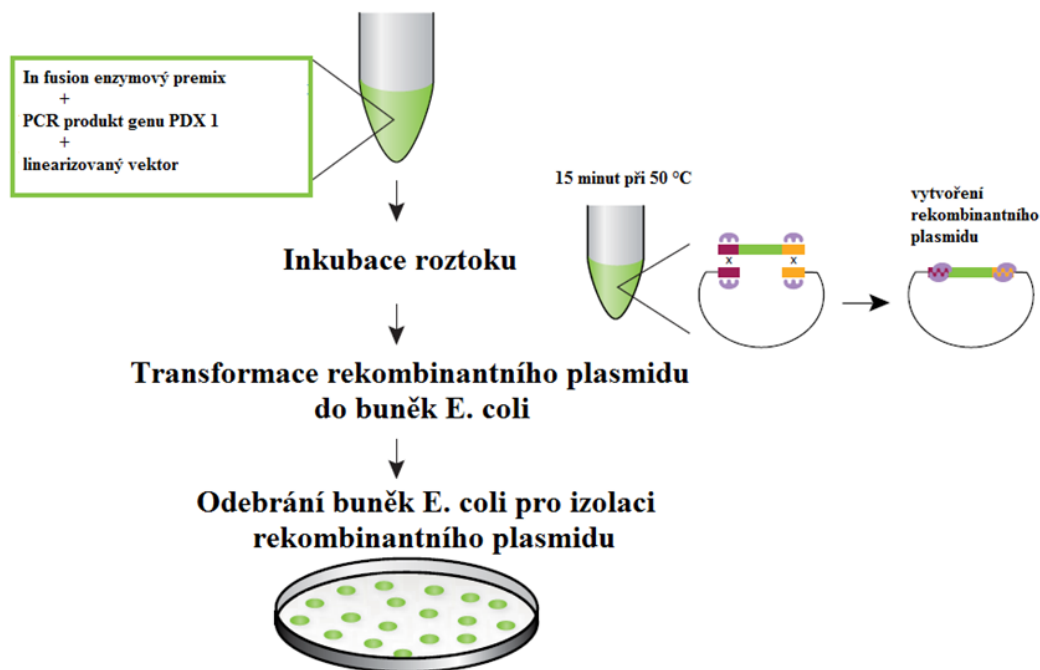
4. Metody

4.1. Metoda homologní rekombinace In-fusion®

Metoda In-fusion® reakce slouží ke vkládání úseku DNA do vektoru (Obr. 17). Hlavním principem této metody je homologní rekombinace jednovláknových 3' konců DNA molekul, které vzniknou působením DNA polymerasy s 3' exonukleasovou aktivitou.

V této práci byl připraven DNA templát pro přípravu syntetické mRNA kódující transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA (Příloha 1). Restriktivními endonukleasami *NheI* a *BamHI* se nejprve přes noc naštěpil cirkulární DNA plasmid pAcGFP1-N3 (Příloha 2), do kterého se pomocí homologní rekombinace vnesla sekvence DNA konstrukt, který obsahoval sekvenci pro T7 promotor, 5' a 3' nepřekládanou oblast pro β -globin a restriktivní místa pro enzym *PstI* (Obr. 17). In-Fusion® reakce byla sestavena podle manuálu In-Fusion® HD Cloning Kit (150 ng linearizovaného plasmidu v molárním poměru s DNA templátem 1:2), teplotní program byl zvolen 50°C 15 min, poté 30°C 3 min.

Vytvoření roztoku pro reakci In fusion



Obrázek 17. Schéma vložení úseku DNA do vektoru pomocí In-fusion® reakce. Na základě homologní rekombinace se inkorporuje DNA templát do linearizovaného plasmidu, čímž dojde ke vzniku rekombinovaného cirkulárního plasmidu, který je transformován do buněk *E. coli*. Upraveno dle protokolu In-Fusion® HD Cloning Kit.

Nově vzniklý cirkulární plasmid pAcGFP1-N3-konstrukt byl vložen ke 100 μ l *E. coli* Stellar kompetentních buněk pomocí teplotního šoku (42°C, 1 min) a následně ponechán 2 min při 0 °C. Nakonec bylo ke směsi přidáno na 37°C vytemperované SOC médium do konečného objemu 500 μ l. Inkubace probíhala po dobu jedné hodiny při 37°C. Na mikrobiologické misky s agarem (obsahující 50 μ g/ml kanamycin) byla vyseta inkubovaná směs ředěná v poměru 1:10 v SOC médiu, která se nechala inkubovat přes noc při 37°C. Následující den se z mikrobiologické misky přeneslo 8 kolonií do 1 ml LB-média s 0,1% kanamycinem, ve kterém se nechaly inkubovat 1 hodinu při 37°C (280 rpm). Následně se odebral 20 μ l vzorek na PCR pro kontrolu úspěšné transformace. Na závěr byly přidány k pozitivně transformovaným koloniím 3 ml LB-média s 0,1% kanamycinem a nechaly se inkubovat přes noc při 37°C.

4.2. Amplifikace plasmidů s DNA konstrukty - kontrola úspěšnosti transformace

PCR pro ověření úspěšnosti transformace byla provedena pomocí protokolu FastStart PCR Master s teplotním programem uvedeném v tabulce 4 a primery v tabulce 5. Poté byla provedena TBE gelová elektroforéza při konstantním napětí 60 V po dobu 1 hodiny.

Tabulka 4. Teplotní program kontrolní PCR pro ověření úspěšnosti transformace

95°C	2' 30"
95°C	25"
61°C	15"
72°C	1' → 40x
72°C	5'
4°C	∞

Tabulka 5. Použité primery pro ověření účinnosti transformace

Název	Sekvence
MafA forward	GCCATCGAGTACGTCAAC
MafA reverse	CAGCTTCTCGTATTTCTCCTTGTA
Pdx1 forward	ACCAAATCAACGGGACTTTC
Pdx1 reverse	CGCTCACGCTGAACTTGTG
Ngn3 forward	ACCAAATCAACGGGACTTTC
Ngn3 reverse	CGCTCACGCTGAACTTGTG

4.3. Izolace plasmidů pAcGFP1-N3 s DNA konstruktem

Narostlá bakteriální kultura byla centrifugována 7 min při 2300 g a 18°C. Izolace plasmidu

byla provedena dle návodu CompactPrep®Plasmid Midi kit (25). Po izolaci byla stanovena koncentrace plasmidu fluorometricky pomocí kitu Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit (směs: 200 µl pufru, 1 µl fluoroforu, 1 µl plasmidové DNA).

Takto připravený rekombinantní plasmid byl dále štěpen restriční endonukleasou *Pst*I. Směs štěpených produktů byla nanášena na TAE gelovou elektroforézu (60 V, 2 hodiny) a následně pomocí kitu QIAquick® Gel Extraction Kit byla izolována a pomocí Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit kvantifikována.

4.4. Příprava plasmidu pAcGFP1-N3 s DNA konstruktem a genem pro mRNA kódující transkripční faktory

Pomocí druhé homologní rekombinace byl do linearizovaného plasmidu s DNA konstruktem zanesen stejným způsobem (viz. kapitola 4.1, str. 37) již samotný gen pro příslušný transkripční faktor (Pdx1, Ngn3 nebo MafA).

4.5. Sekvence plasmidů Sangerovou metodou

Pro ověření správnosti DNA sekvence kódující jednotlivé transkripční faktory byla provedena sekvenace příslušné části plasmidu. Před samotnou sekvenační analýzou byla nejprve připravena reakční směs podle návodu BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit s koncentrací DNA templátu 200 ng na reakci. Teplotní program byl zvolen 96°C 1 min, poté 40x 96°C 10 min, 50°C 5 min, 60°C 4 min⁷⁰. Použité primery jsou uvedeny v tabulce 6.

Po dokončení sekvenační reakce byla výsledná reakční směs přenesena do „stop“ roztoku (3 M octan sodný, 100 mM EDTA a 20 mg/ml glykogen) a následně produkt amplifikace byl vysrážen 95% ethanolem, centrifugován při 4°C a 14 000 g po dobu 15 min. Peleta byla nakonec třikrát omyta 70% ethanolem a vysušena 10 min při 65°C.

Přečištěný produkt byl denaturován 3 minuty ve 20 µl formamidu při 95°C. Analýza sekvenace byla provedena na přístroji 3130 Genetic Analyzer a data vyhodnocena pomocí programu UGENE.

Tabulka 6. Sekvence primerů použitých při sekvenaci

Název	Sekvence
Pdx1 forward	ATGAACGGCGAGGAGCAGTACTACG
Pdx1 reverse	TCGTGGTTCCTGCGGTCG
Ngn3 forward	ATGACGCCTCAACCCTTGGATGC
Ngn3 reverse	GAAAATCTGAGAAAGCCAGGGTGCC
MafA forward	GCCATCGAGTACGTCAAC
MafA reverse	CAGCTTCTCGTATTTCTCCTTGTA

4.6. Příprava templátu pro syntézu mRNA

Plasmid nesoucí sekvenci kódující celou mRNA pro příslušný transkripční faktor byl štěpen pomocí restriční endonukleasy *NheI* přes noc při 37°C a následně druhý den nanesen na TAE gelovou elektroforézu. Po izolaci pomocí kitu QIAquick® Gel Extraction Kit byl templát pro syntézu mRNA amplifikován pomocí PCR reakce (Tabulka 7). Reakce byla připravena podle protokolu výrobce kitu Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, použité primery jsou uvedeny v tabulce 8. Na závěr byla provedena kontrolní TBE gelová elektroforéza při konstantním napětí 60 V po dobu 1 hodiny.

Tabulka 7. Složení reakční PCR směsi pro přípravu konečného DNA templátu. (Qiagen)

Složení reakční směsi	objem
5X Q5 reakční pufr	30 µl
5X Q5 „High GC Enhancer“	30 µl
10 mM dNTP	3 µl
10 µM forward primer	6 µl
10 µM reverse primer	6 µl
templát cDNA (Pdx1, Ngn3, MafA)	1 µl (100 ng)
„nuclease-free“ H ₂ O	70 µl
Q5 DNA polymerasa	4 µl

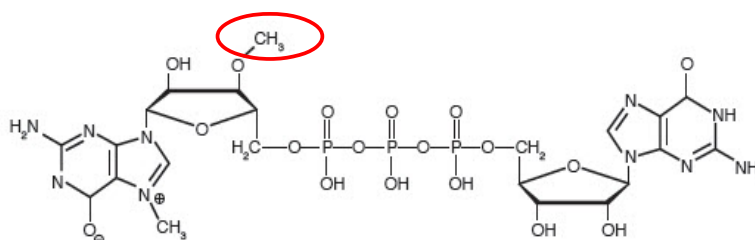
Tabulka 8. Sekvence primerů použitých pro přípravu konečného templátu pro syntézu mRNA pro Pdx1, Ngn3 a MafA

Název	Sekvence
Primer forward 5'UTR	TAGCAGAAGCTAATAC
Primer reverse 3'UTR	TTTTTTTTTTTTGTTCTCGCATACGTGTATAGCATG

4.7. Syntéza a purifikace mRNA

In-vitro syntéza mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA probíhala pomocí kitu T7 mScript™ Standard mRNA Production System s určitými obměnami. Syntetická mRNA obsahovala 5' čepičku zavedenou pomocí ARCA analogu (Anti-reverse Cap Analog) (Obr. 18) a poly(A) konec byl syntetizován pomocí polymerasy izolované ze *Saccharomyces cerevisiae*.

Na obrázku 19 je znázorněno schéma *in vitro* transkripce (IVT), podle kterého byla syntetická mRNA připravena. Prvním krokem je příprava reakce, při které dochází pomocí T7 polymerasy k přepisu templátové DNA do vlákna RNA obsahující 5'UTR, kódující oblast a 3'UTR. Pro snížení toxicity mRNA a imunitní odpovědi buňky na syntetickou mRNA, byly pro výrobu mRNA použity modifikované nukleosidy pseudouridin a 5-methylcytidin.



Obrázek 18. Anti-reverse Cap Analog (ARCA). ARCA je analog 5'čepičky využívaný při *in vitro* transkripci za účelem produkce čepičkovaného transkriptu. Ve své modifikované struktuře má 3'-OH skupinu nahrazenou -OCH₃ (zvýrazněné červeně). Díky této substituci, RNA polymerasa může zahájit transkripci pouze se zbývající hydroxylovou skupinou a tudíž inkorporaci ARCA pouze v přímém směru. Upraveno dle⁷¹.

V reakční směsi bylo zastoupení uridinu vůči pseudouridinu (resp. cytidinu vůči 5-methylcytidinu) vždy 3:1. Celkové množství nukleosidů nebylo přidáno do počáteční

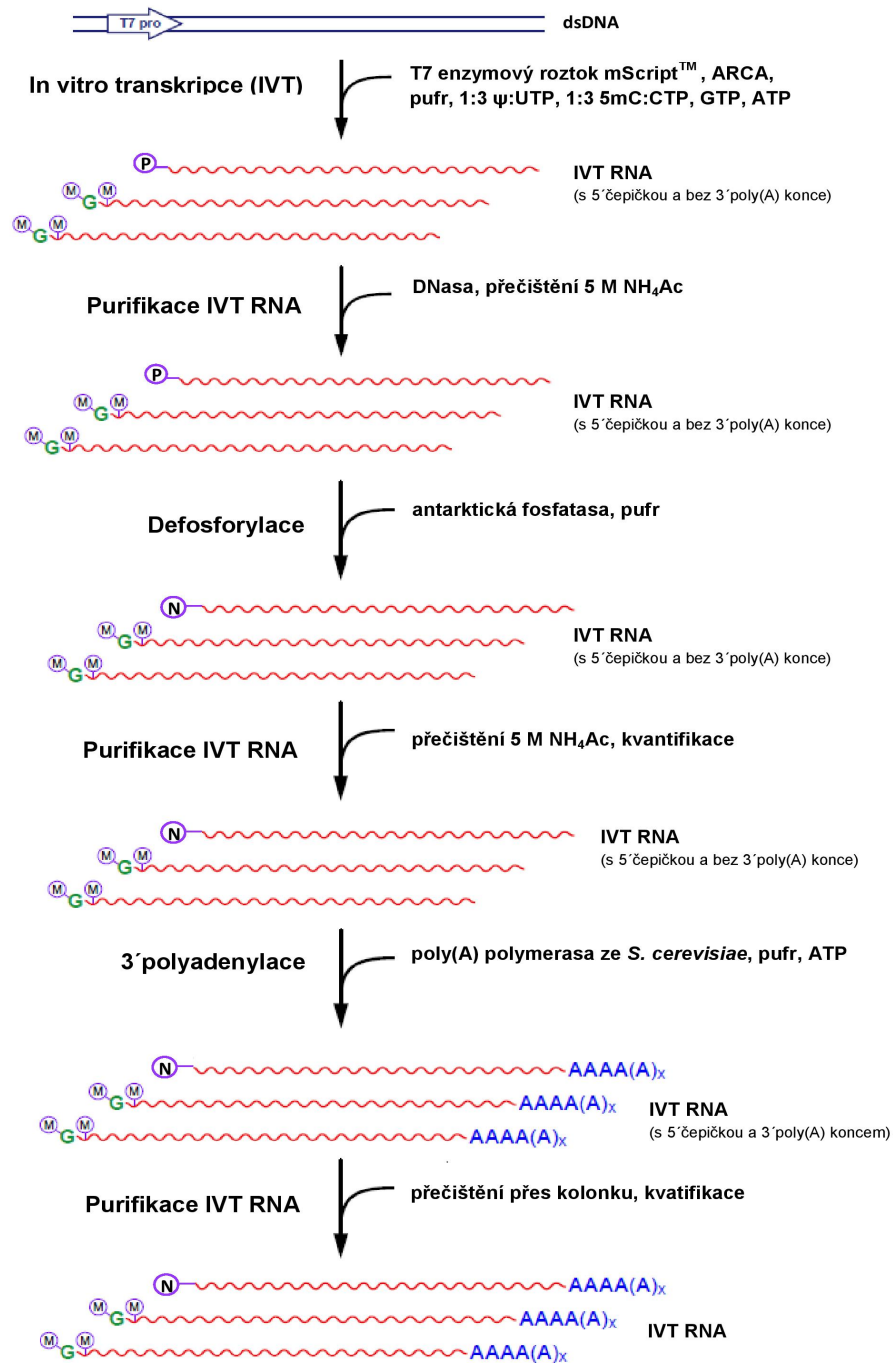
reakce, nýbrž byly rozděleny do čtyř alikvot a přidány ve 20 minutových intervalech, tudíž syntéza probíhala celkem 80 minut při 37°C.

V následujícím kroku byla z reakční směsi odstraněna DNA pomocí Dnasy I po dobu 20 minut a následně byla reakční směs přečištěna precipitací 5 M octanem amonným při 4 °C. Po 20 minutách inkubace byl roztok centrifugován 10 000 g 20 min při 4°C. Peleta byla omyta 70 % ethanolem a následně rozpuštěna na 65°C vytemperovanou vodou (RNase free).

Následně bylo provedeno odstranění volných 5' fosfátových zbytků z případně se vyskytujících vláken mRNA bez 5' čepičky pomocí enzymu antarktická fosfatasa (5 U/μl). Reakční směs se nechala inkubovat 250 minut při 37°C, poté přes noc při 4°C.

Pro polyadenylaci 3' konce vlákna byla použita polymerasa ze *Saccharomyces cerevisiae* (60 U/μl) ve směsi s 50 nM ATP a 50 μg syntetické mRNA po dobu 200 minut při 37°C. Takto synteticky připravená mRNA s 5' čepičkou, kódující sekvencí a 3' poly(A) koncem byla na závěr přečištěna přes kolonku pomocí kitu MEGAclean™. Přečištěná mRNA byla z kolonky eluována při 60°C roztokem RNAsecure™ pro inaktivaci případné RNasové kontaminace.

Po syntéze byla stanovena finální koncentrace mRNA fluorometricky pomocí kitu Qubit® RNA BR Assay Kit (směs: 200 μl pufru, 1 μl fluoroforu, 1 μl mRNA).



Obrázek 19. Schéma *in vitro* syntézy mRNA. Prvním krokem je transkripce DNA templátu do vlákna RNA a zároveň inkorporace 5' čepičky v podobě ARCA analogu. Takto vzniklá vlákna mRNA jsou vystavena působení antarktické fosfatasy. Na závěr se vlákno polyadenyluje pomocí poly(A) polymerasy ze *Saccharomyces cerevisiae*, která připojí poly(A) konec o přibližném počtu 300 A. Posledním krokem je přečištění finálního produktu přes kolonku. Upraveno dle protokolu T7 mScript™ Standard mRNA Production System.

4.8. Kultivace buněk

K experimentům byla použita potkaní pankreatická exokrinní buněčná linie AR42J, která byla kultivována při 37°C, 5 % CO₂ buď v médiu Ham's F12-K (Kaighn's) Medium s přidavkem 1 % GlutaMAXTM Supplement a 15 % Fetal Bovine Serum (FBS), nebo v bezsérovém médiu (složení uvedeno v tabulce č. 9. K pasážování AR42J buněk byla použita enzymová směs Akutasa po dobu 15 min při pokojové teplotě.

Jako druhá buněčná linie byly použity HTB9 buňky odvozené z tumoru lidského močového měchýře. Ke kultivaci buněk HTB9 bylo použité RPMI 1640 médium s přidavkem 1 % GlutaMAXTM Supplement a 10 % FBS. K pasážování HTB9 buněk byl použit 0,05 % roztok trypsinu v PBS po dobu 5-10 min při 37°C.

Tabulka 9. Složení média a suplementů pro kultivaci buněčné linie AR42J.

složka	množství	složka	množství
F12-K	9,5 ml	F12-K	0,76 ml
Albumin	250 µl	betacellulin (2 uM)	20 µl
MEM 100x	100 µl	exendin-4 (10 uM)	20 µl
Glutamax 100x	100 µl	nicotinamid (1 uM)	200 µl
ITS 100x	100 µl	5-Aza-2'-DC (20 mM)	0,5 µl
IGF (80 ng/ml)	10 µl		
EGF (50 ng/ml)	1 µl		
bFGF (10 ng/ml)	2 µl		
gastrin (20 ng/ml)	1 µl		
B18R (20 µg/ml)	100 µl		
7DG (10 µM)	10 µl		

4.9. Příprava extracelulární matrix pro kultivaci buněk AR42J

Pro kultivaci AR42J buněk v 96-ti a 48-ti jamkových destičkách byla využita extracelulární matrix produkovaná buňkami HTB9. Extracelulární matrix je složená především z kolagenů, proteoglykanů a glykoproteinů, které napomáhají buňkám ke stabilizaci jejich struktury, migraci, proliferaci, diferenciaci a přežití.

Buňky HTB9 se nechaly narůst do 100 % konfluency a následně byly kultivovány po dobu 3 dnů v příslušné destičce. Před přidáním vytemperovaného lyzačního roztoku (20 mM NH₄OH, 0,1 % Triton X-100 v aqua pro Injectione) se buňky omyly od média roztokem

PBS. Buněčná lýza probíhala 5 minut v inkubátoru při 37°C. Na závěr byl lyzační roztok odmyt a destička byla 4x promyta roztokem PBS. Na závěr byly do destiček nasazeny AR42J buňky tak, aby zaujímaly 30-50 % povrchu.

4.10. Transfekce syntetické mRNA do buněčné linie AR42J

Buněčná linie AR42J ve 48 nebo 96 jamkové destičce s konfluencí 30-50 % byla transfekována podle protokolu Lipofectamine® MessengerMAX™ Reagent mRNA Transfection. Transfekční činidlo MessengerMAX™ bylo naředěno v médiu Opti-MEM® v poměru 1:33 a nechalo se inkubovat 10 minut při pokojové teplotě. Poté byl roztok média Opti-MEM® s transfekčním činidlem smíchán v poměru 1:1 s mRNA o koncentraci 200 ng/μl v Opti-MEM® médiu a inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Výsledný poměr transfekčního činidla vůči množství mRNA odpovídal 1,5 μl messengerMAX™:1 μg mRNA. Po inkubaci byla takto připravená směs aplikována v příslušném množství do kultivačního média a posléze přidána k buňkám.

4.11. Imunochemické stanovení s fluorescenčním vyhodnocením

Pro imunochemické stanovení s fluorescenčním vyhodnocením byly použity vzorky obsahující transfekované buňky AR42J v 96 jamkové destičce. Buňky byly třikrát promyty od média roztokem Hank's balanced salt solution (HBSS) s přidávkem 1 % FCS a následně fixovány 20 min 4 % formaldehydem v PBS při pokojové teplotě. Po fixaci byly buňky třikrát promyty roztokem PBS. Poté k buňkám byl přidán blokovací roztok (PBS s 0,1 M glycinem, 0,05 % Triton X-100 a 5 % oslí sérum) po dobu 30 min při pokojové teplotě.

Po odstranění blokovacího roztoku byla do jamek aplikována primární protilátka ředěná v „antibody diluent“ (1 % BSA, 0,2 % Cold fish skin gelatin, 0,5 % Triton X-100, 0,01 % azid sodný v PBS o pH 7,2 - 7,4), pro TF Pdx1 1:200, pro TF Ngn3 1:300 a pro TF MafA bylo ředění 1:250. Primární protilátka pro insulin byla ředěna 1:300, glukagon 1:1000 a pro α-amylasu 1:200. Inkubace probíhala po dobu 30 min v inkubátoru při 37°C.

Následně primární protilátka byla třikrát promyta roztokem PBS. Sekundární protilátky byly ředěny v blokovacím roztoku v poměru 1:400 a jejich inkubace probíhala opět 30 minut při 37°C v inkubátoru. Pro detekci jader byla použita fluorescenční barva NucBlue® Fixed Cell Stain ReadyProbes™ reagent - DAPI Special Formulation ředěná 1:10 v PBS,

doba inkubace byla 5 minut.

Po závěrečném proplachu 3x roztokem PBS, obarvené buňky byly převrstveny roztokem Dabco-Mowiol v glycerolu (2,5 % 1,4-diazabicyclo-octane (DABCO), 10 % Mowiol 4-88, 25 % glycerol a 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5).

Pro zobrazení fluorescence byl použit fluorescenční mikroskop EVOS®FL Auto.

4.12. Izolace celkové RNA a kvantitativní PCR s reversní transkripcí (qRT-PCR)

Před izolací RNA byly buňky opláchnuty od média roztokem PBS. Poté proběhla izolace RNA pomocí kitu RNeasy® Plus Mini. Po izolaci byla fluorometricky změřena koncentrace získané RNA pomocí kitu Qubit® RNA BR Assay Kit (směs: 200 µl pufru, 1 µl fluoroforu, 1 µl buněčné RNA).

Kvantitativní RT-PCR byla provedena ve dvou krocích. První krokem byl přepis izolované celkové RNA do cDNA. Reakční směs byla sestavena podle návodu kitu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit s použitím zakotvených-oligo(dT)₁₈ primerů a náhodných hexamerových primerů v poměru 1:5. Pro rozvolnění sekundární struktury RNA byl roztok RNA, primerů a vody zahříván 10 min při 65°C. Teplotní program reakce pro přepis do cDNA byl zvolen 10 min 25°C a následně 60 min při 50°C. Inaktivace reversní transkriptasy proběhla zahřátím roztoku na 5 min při 85°C a uložením na led.

Ve druhém kroku byla provedena kvantitativní PCR. Reakční směs byla sestavena podle protokolu Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX). Teplotní program je uveden v tabulce 10. Pro analýzu bylo použito 22 genů, jejich seznam a použité specifické primery jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 10. Teplotní program zvolený pro kvantitativní PCR.

50°C	2'
95°C	10'
95°C	15"
62°C	1' → 40x
95°C	15"
60°C	1'

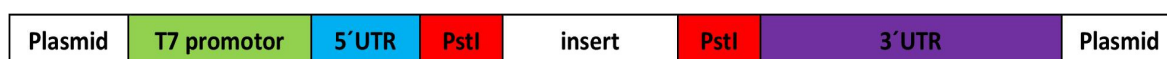
Tabulka 11. Sekvence primerů pro 22 genů testovaných při qRT-PCR. Primery pro transkripční faktory jsou specifické pro identifikaci endogenní mRNA

Název	Sekvence	Název	Sekvence
<i>ACTB forward</i>	TATCGGCAATGAGCGGTTCC	<i>Nkx2.2 forward</i>	ACCGAGGGCCTCCAATACTC
<i>ACTB reverse</i>	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC	<i>Nkx2.2 reverse</i>	GGCACGTTTCATCTTGTAGCG
<i>GCG forward</i>	AGACCGTTTACATCGTGGCT	<i>Nkx6.1 forward</i>	AGAGAGCACGCTTGGCCTATT
<i>GCG reverse</i>	GGCAATGTTGTTCCGGTTCC	<i>Nkx6.1 reverse</i>	AATAGTAAAGCCGGGCGAGCA
<i>Gck forward</i>	TGCCGAGATGCTCTTTGACTACA	<i>Pax4 forward</i>	CAATCGAGTCCTTCGGGCAC
<i>Gck reverse</i>	GGGTTGCTGAGCTTTCATCC	<i>Pax4 reverse</i>	GCCCACGCTGGAAGTCTTTC
<i>GLP1R forward</i>	TGGAGAGAGTATCGGCACCA	<i>Pax6 forward</i>	GGTATCCCGGGACGTCAGTA
<i>GLP1R reverse</i>	CAGAACCGGTACACATGCCC	<i>Pax6 reverse</i>	GCCCAACATGGAACCCGATG
<i>GLUT2 forward</i>	TTGAGACAACAACCTCCGCAC	<i>PC1/3 forward</i>	CCTCCTAGCTCTAGTAAAGCAACC
<i>GLUT2 reverse</i>	TGGAGCAATCTCGCCAATGT	<i>PC1/3 reverse</i>	TGTTGTTCCGCCCATATCAC
<i>INS1 forward</i>	CCCTAAGTGACCAGCTACAATCAT	<i>PC2 forward</i>	GCTATGCGTCAAGCATGTGG
<i>INS1 reverse</i>	CGGGACTTGGGTGTGTAGAAG	<i>PC2 reverse</i>	CTCTCCTGGTTGCGTTGACT
<i>INS2 forward</i>	AAGTGACCAGCTACAGTCGG	<i>Pdx1 forward</i>	TTCCCGAATGGAACCGAGACT
<i>INS2 reverse</i>	ACCTCCAGTGCCAAGGTCTG	<i>Pdx1 reverse</i>	GCTGTTATGGGACCGCTCAAG
<i>Isl1 forward</i>	TCCCTATGTGTTGTTGCGGT	<i>SST forward</i>	CCCCAGACTCCGTCAGTTTC
<i>Isl1 reverse</i>	GCGCATCACGAAGTCGTTCTT	<i>SST reverse</i>	CGCAGGGTCTAGTTGAGCAT
<i>Kir6.2 forward</i>	CCAGGTGACCATTGGTTTCGG	<i>SUR1 forward</i>	AGGAATGTGCCCTGGACCAAT
<i>Kir6.2 reverse</i>	GAGTGGTGTGGGCACTTTAACG	<i>SUR1 reverse</i>	GGAACACAGGCGTGACGTAG
<i>MafA forward</i>	GCCCCGAGAACGGTGAATAC	<i>UCN3 forward</i>	CTAGAGCAAAGTCTCTTACAGGGA
<i>MafA reverse</i>	AGGGAGTTCCTCCGGGTTTT	<i>UCN3 reverse</i>	CCCCGGTCGTTTTTGGACCTT
<i>NeuroD forward</i>	GGCTCCAGGTTATGAGATCG	<i>ZnT8 forward</i>	AGCACTGATGTAGGACGCACT
<i>NeuroD reverse</i>	CTTTTTGGGGCCCCGTCTCT	<i>ZnT8 reverse</i>	CACTTGCTTGCTCGACCTGTTT
<i>Neurog3 forward</i>	CCTAGCCCCACTCTCGTACC		
<i>Neurog3 reverse</i>	CATCCAGCGCGGAGTTAAG		

5. Výsledky

5.1. Příprava DNA templátů pro syntézu mRNA transkripčních faktorů Pdx1, Neurogenin3 a MafA

Pomocí metody homologní rekombinace byl zaveden do plasmidu pAcGFP-N3 univerzální DNA konstrukt pro transkripční faktor Pdx1, Ngn3 a MafA (Příloha 1). Na obrázku 19 je znázorněna sekvence plasmidu s jednotlivými složkami včetně DNA konstruktů. Sekvence DNA konstruktů obsahovala na 5' konci sekvenci pro T7 promotor, 5' nepřekládanou oblast (5'UTR) potkaní mRNA pro β -globin a restrikční místo pro enzym *PstI*. Na 3' konec byla zavedena sekvence pro 3' nepřekládanou oblast (3'UTR) lidské mRNA pro β -globin a další restrikční místo pro enzym *PstI*. Cirkulární plasmid nesoucí DNA konstrukt byl transformován do bakterií *E. coli*. Kontrola správnosti transformace plasmidu byla ověřena amplifikací vybraných osmi klonů pomocí PCR za použití specifických primerů.

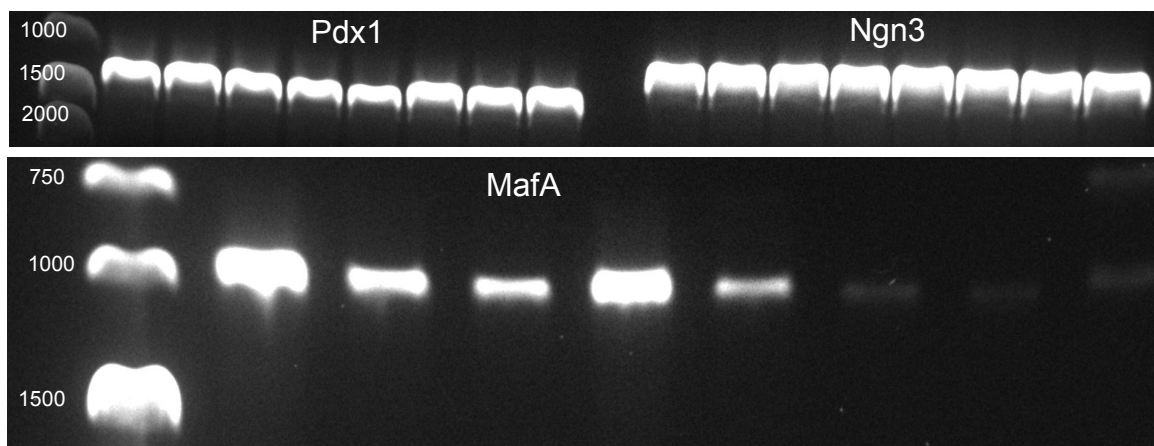


Obrázek 19. Sekvence cirkulárního plasmidu pAcGFP-N3 s DNA konstruktem obsahující T7 promotor, 5'UTR, restrikční místa pro *PstI* a 3'UTR.

Ze čtyř úspěšně vybraných klonů byl izolován plasmid a druhou reakcí homologní rekombinace byla zavedena kódující sekvence pro konkrétní transkripční faktor. Na obrázku 20 je opět znázorněna sekvence plasmidu již se sekvencí pro mRNA kódující Pdx1, Ngn3 a MafA. Na obrázku 21 se nachází snímek osmi vybraných klonů amplifikovaných pomocí PCR pro ověření správnosti transformace. Následně byl izolován plasmid jednoho z úspěšně transformovaných klonů, u kterého byla ověřena správnost DNA sekvence. Izolovaný plasmid by použit pro finální přípravu templátu pro syntézu mRNA.



Obrázek 20. Sekvence plasmidů pAcGFP-N3 včetně kompletní sekvence kódující mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA.



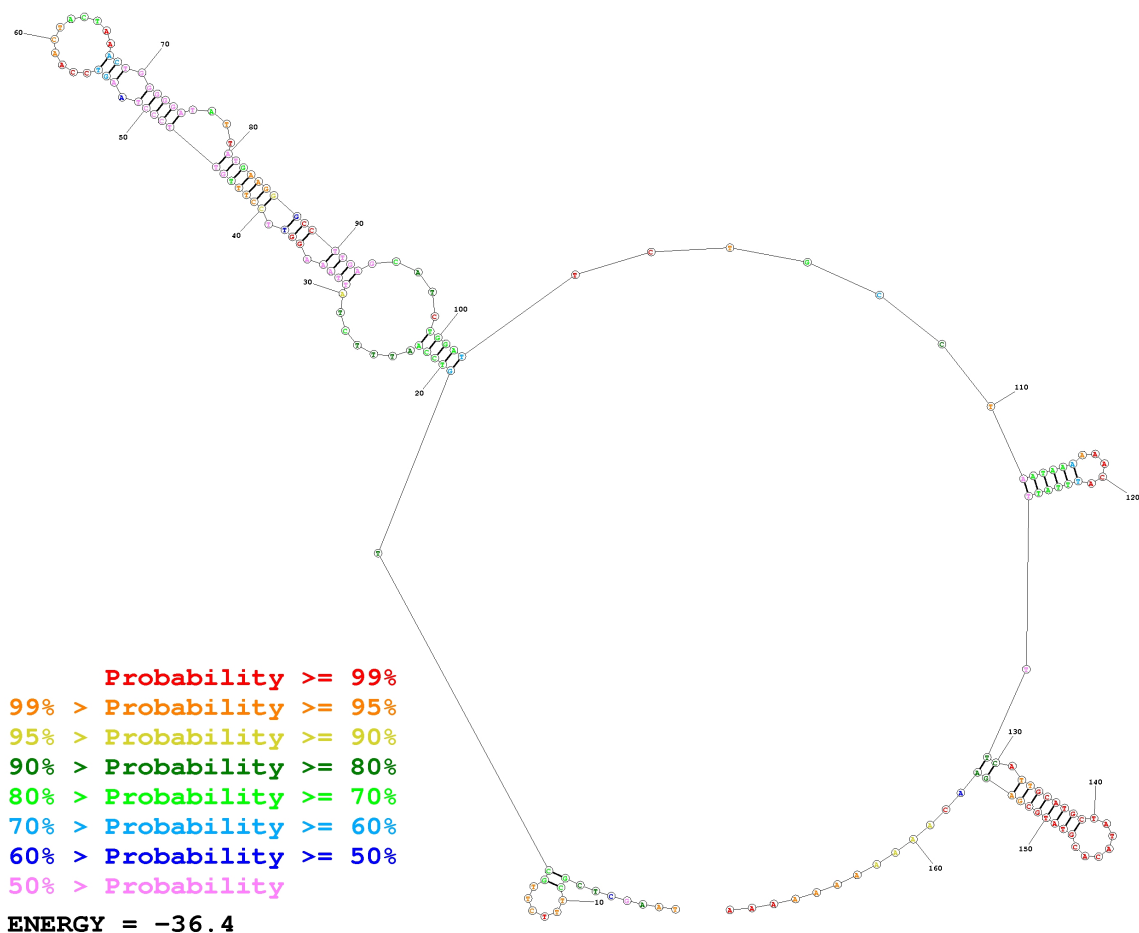
Obrázek 21. Ověření úspěšnosti transformace bakterií *E. coli* plasmidem pAcGFP-N3 obsahující kompletní sekvenci mRNA pro Pdx1, Ngn3 a MafA. V prvním sloupci se nachází DNA marker molekulových velikostí, ve sloupci 2-9 se nacházejí vybrané klony 1-8 pro jednotlivé transkripční faktory.

Konečná podoba DNA templátu pro syntézu mRNA vznikla štěpením plasmidu restriční endonukleasou *NheI* a následnou amplifikací štěpeného produktu pomocí PCR. Na Obr. 22 je znázorněna sekvence finálních produktů mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA, které byly použity pro syntézu.



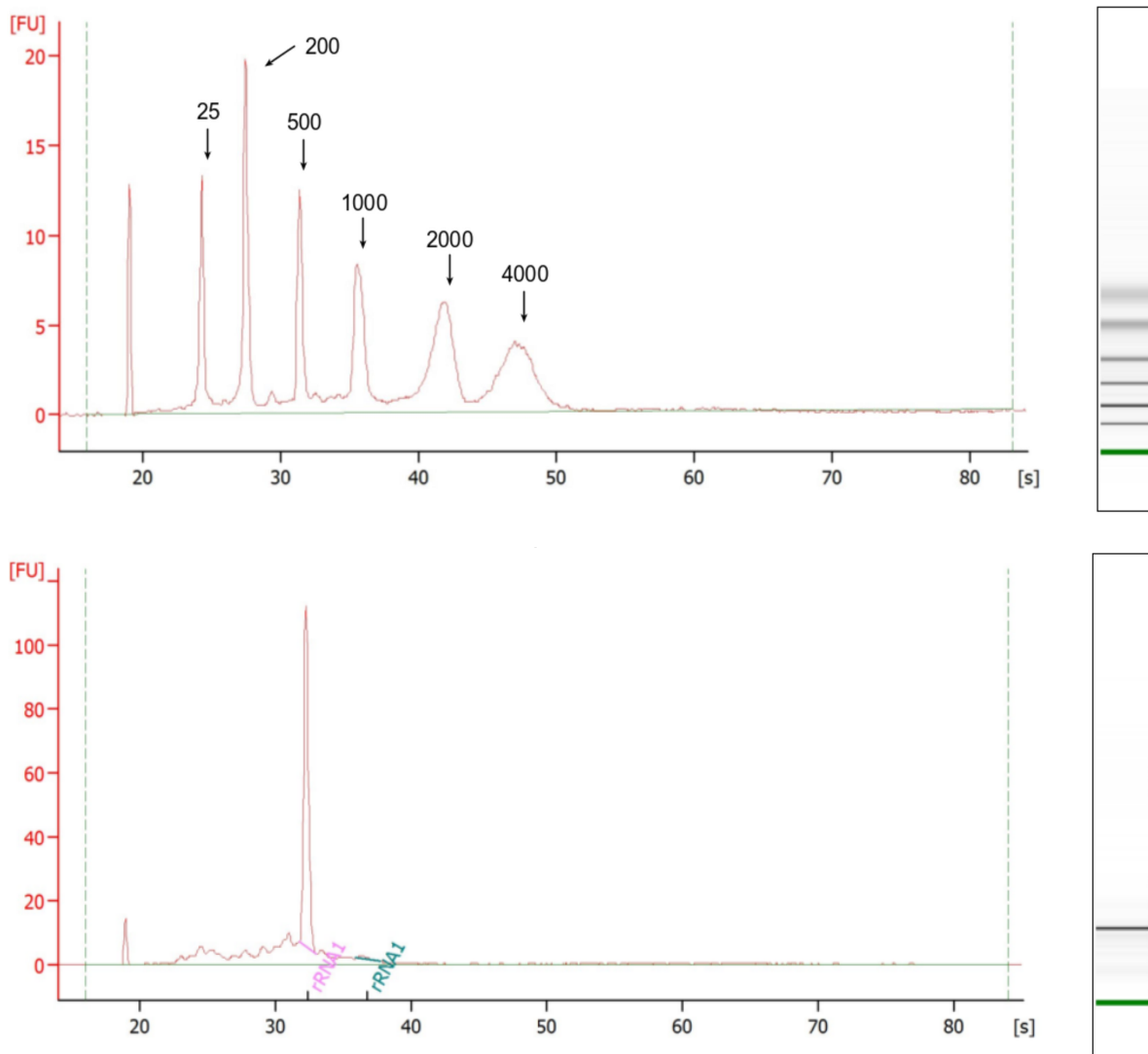
Obrázek 22. Konečné templáty k syntéze mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA

Stabilita mRNA je dána nejenom nukleotidovou sekvencí 5'UTR a 3'UTR oblasti, ale také sekundární strukturou vlákna mRNA. Na obrázku 23 se nachází model predikce sekundární struktury 3'UTR oblasti pro lidský β -globin se stabilizačními prvky. Na základě optimalizace nukleotidové sekvence a následným testováním účinku míry exprese na úrovni proteinu byla tato kombinace zvolena jako nejvhodnější a nejúčinnější pro další manipulace. Termální stabilita této struktury je $\Delta G = -36,4 \text{ kcal mol}^{-1}$, která odpovídá stabilní struktuře mRNA.



Obrázek 23. Predikce sekundární struktury sekvence 3' nepřekládané oblasti pro lidský β -globin se stabilizačními prvky. Barevné odlišení nukleotidů znázorňuje s jakou pravděpodobností se budou jednotlivé nukleotidy vyskytovat v dané konformaci. Zdroj: <http://rna.urmc.rochester.edu>

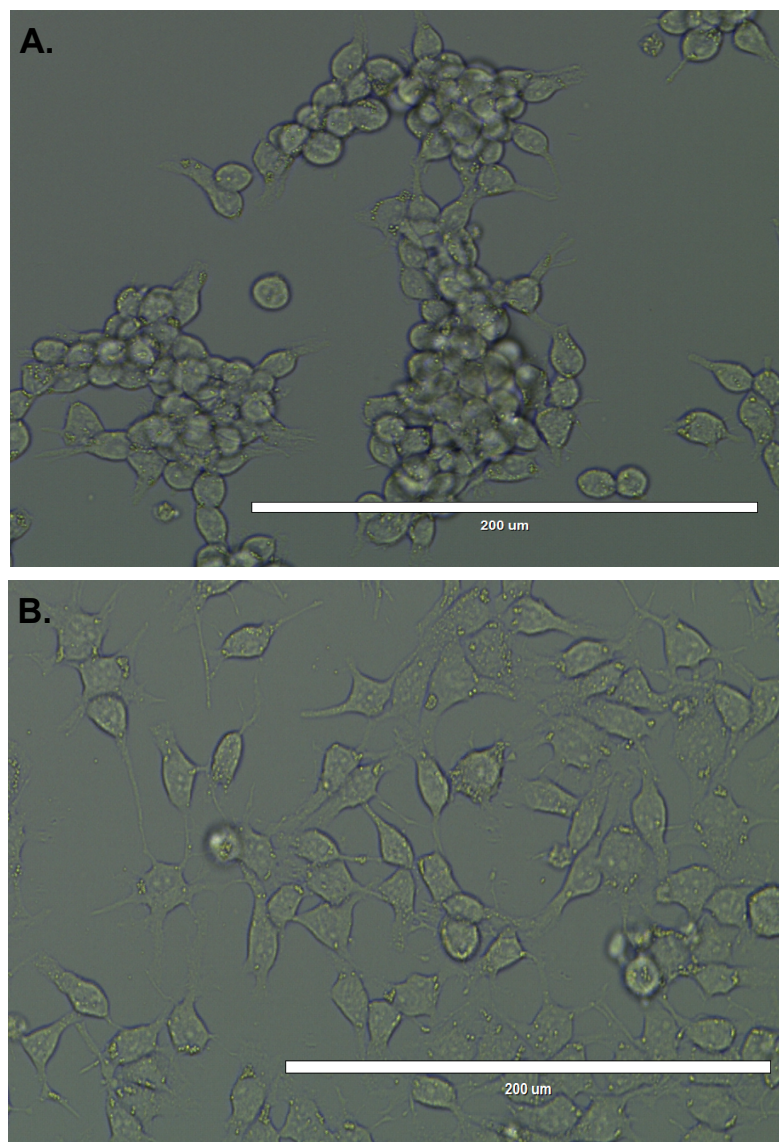
Analýza synteticky připravených mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA byla provedena pomocí elektroforetické separace. Na obrázku 24 jsou znázorněné elektroforeogramy standardů a syntetické mRNA pro Ngn3. Tato analýza poskytla informace o velikosti, čistotě a koncentraci mRNA. Z elektroforeogramu je patrné, že při přípravě mRNA došlo k syntéze i nesespecifických produktů o menších velikostech (25-200 nukleotidů). Nicméně hlavní zastoupení ve směsi měla mRNA pro Neurogenin3.



Obrázek 24. Elektroforeogram standardu a synteticky připravené mRNA pro transkripční faktor Ngn3. Jako standard byl použitý vzorek obsahující směs RNA o velikostech 25, 200, 500, 1000, 2000 a 4000 nukleotidů.

5.2. Vliv extracelulární matrix na morfologii buněčné linie AR42J

Extracelulární matrix nádorové buněčné linie močového měchýře HTB9 byla použita pro kultivaci buněk AR42J. Na obrázku 25 jsou znázorněné snímky buněk AR42J kultivovaných za standardních podmínek (A) a kultivovaných na extracelulární matrix produkované buňkami HTB9 (B). Z morfologického hlediska je jednoznačné, že buňky kultivované na extracelulární matrix zaujímají větší povrch a na rozdíl od standardně kultivovaných AR42J vytvářejí výběžky, které dosahují až desítky nm. Další výhodou extracelulární matrix je zvýšená proliferace a viabilita buněk.



Obrázek 25. Kultivace buněk AR42J za standardních podmínek (A) a kultivace na extracelulární matrix produkované buněčnou nádorovou linií HTB9 (B).

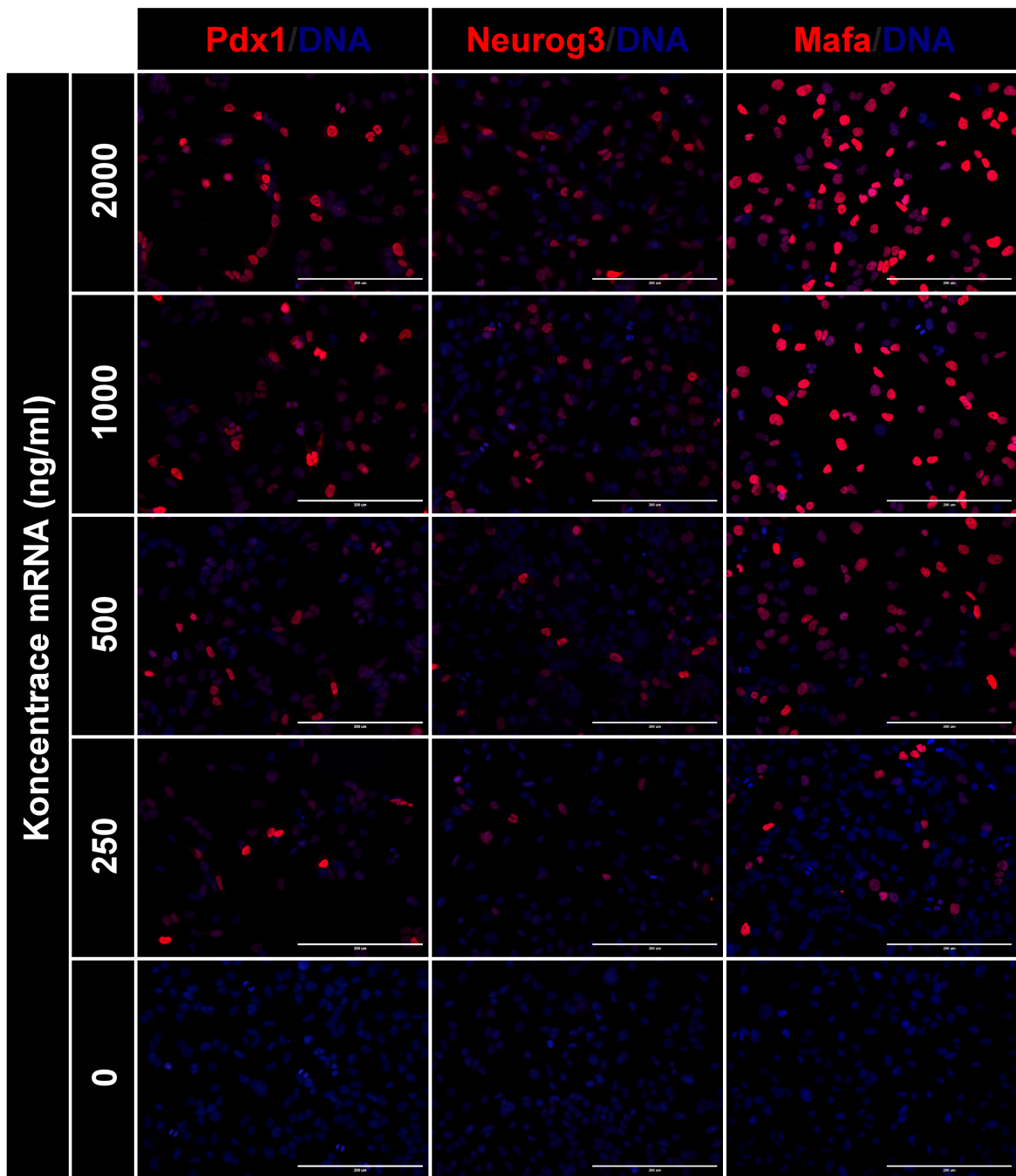
5.3. Transfekce synteticky připravené mRNA pro Pdx1, Ngn3 a MafA do buněk AR42J

Pro ověření funkce synteticky připravených mRNA pro Pdx1, Ngn3 a MafA byla sledována exprese proteinu pomocí imunochemického stanovení s fluorescenčním vyhodnocením. I přes stabilizační prvky ve struktuře synteticky připravené mRNA dochází k aktivaci mechanismů imunitní odpovědi buňky. Tyto mechanismy zahajují degradaci přítomné exogenní mRNA nebo aktivují buněčnou apoptózu. Z tohoto důvodu je tedy nutné optimalizovat množství transfekované mRNA za účelem snížení nespecifické

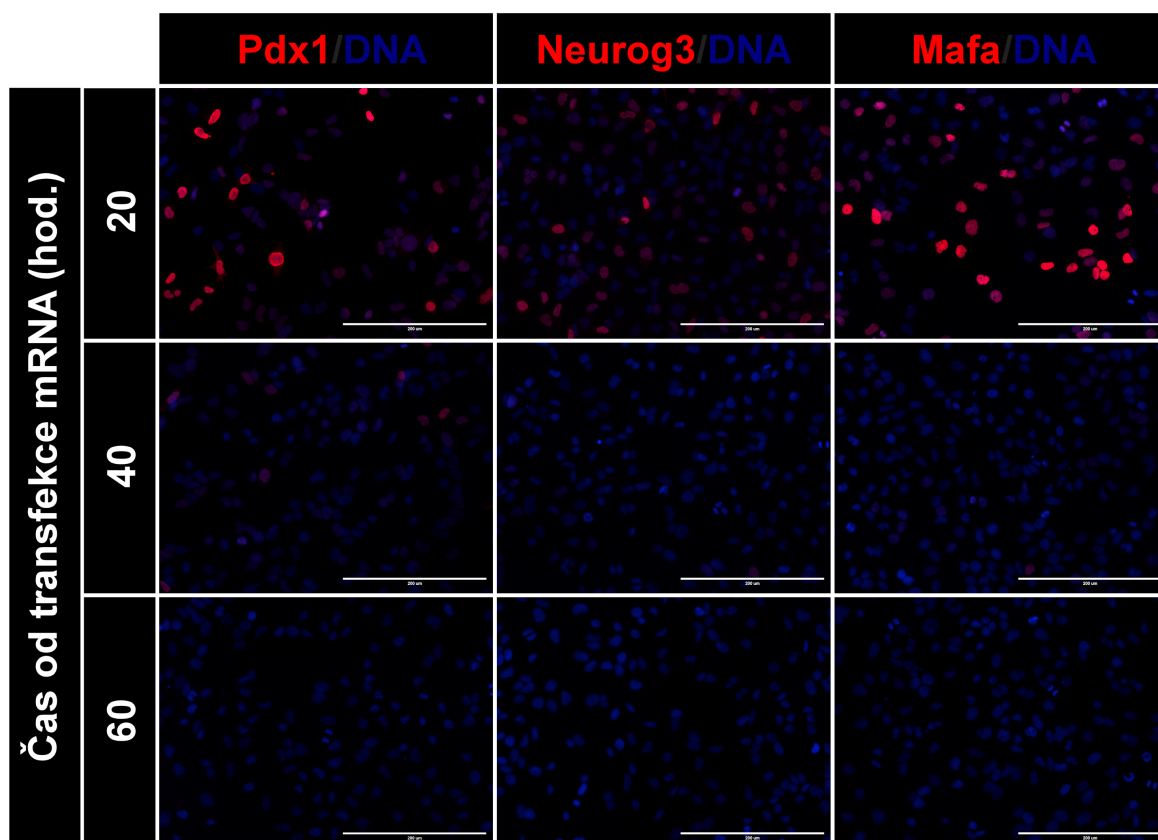
imunitní odpovědi buňky, ale současně i zajištění dostatečné míry exprese proteinu. Na obrázku 26 jsou uvedeny snímky imunofluorescenčně značených buněk AR42J, které byly transfekované mRNA buď pro Pdx, Ngn3 nebo MafA o koncentraci 0, 250, 500, 1000 a 2000 ng/ml. Z této koncentrační závislosti je patrné, že míra exprese Pdx1 a Ngn3 roste se zvyšující se koncentrací, zatímco exprese MafA roste pouze do koncentrace 1000 ng/ml a po dalším dvojnásobném zvýšení množství mRNA (2000 ng/ml) exprese zůstává již neměnná.

5.4. Životnost transkripčních faktorů ve formě proteinu v buňkách AR42J po transfekci syntetickou mRNA

Pro zjištění životnosti transkripčních faktorů Pdx1, Ngn3 a MafA na proteinové úrovni, byla provedena imunofluorescenční detekce v časových intervalech 20, 40 a 60 hodin od transfekce mRNA do buněk AR42J. Výsledky na obrázku 27 vypovídají, že životnost a zároveň největší exprese jednotlivých transkripčních faktorů v buňkách AR42J je pouze 20 hodin po transfekci. Po 40 hodinovém intervalu byl detekován ve velmi malé míře pouze transkripční faktor Pdx1 a po 60 hodinách již přítomnost všech transkripčních faktorů nebyla detekována. Tudíž lze usuzovat, že nejenom životnost proteinu, ale i samotné mRNA v buňce není více jak 24 hodin. Z tohoto důvodu je tedy pro transdiferenční experimenty nutná každodenní aplikace mRNA, která zajistí kontinuální expresi transkripčních faktorů.



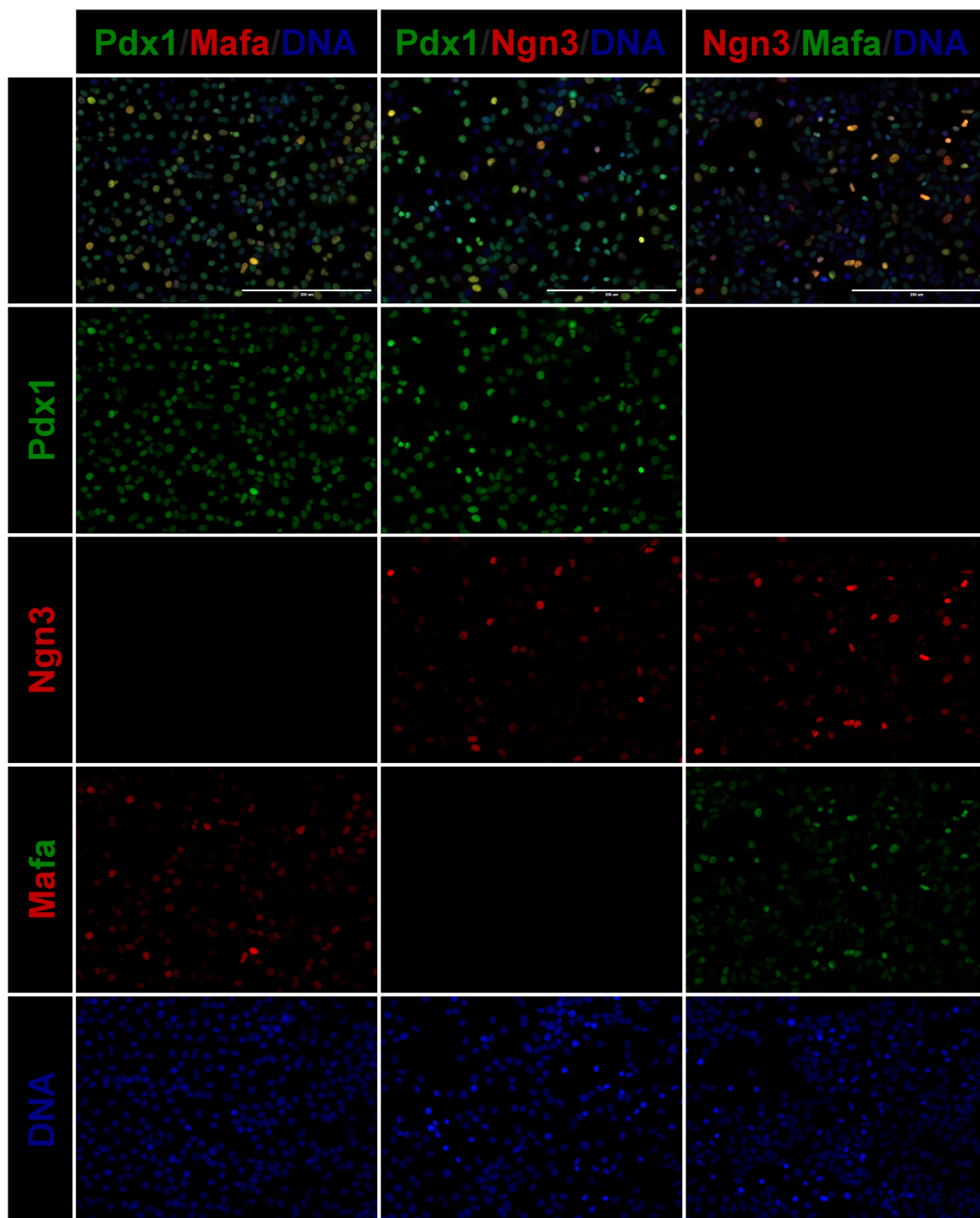
Obrázek 26. Závislost koncentrace transfekované mRNA pro Pdx1, Ngn3a MafA. Po 20 hodinách od transfekce mRNA byly buňky AR42J imunofluorescenčně značeny. Modře jsou značena jádra (DNA), červeně jsou značeny příslušné transkripční faktory. Uvedené měřítko odpovídá velikosti 200 μm .



Obrázek 27. Závislost exprese transkripčních faktorů Pdx1, Ngn3 a MafA na časovém intervalu po transfekci syntetické mRNA (20, 40 a 60 hodin). Červeně jsou značeny jednotlivé transkripční faktory a modře, jsou značeny buněčná jádra (DNA). Uvedené měřítko odpovídá velikosti 200 μm .

5.5. Detekce koexprese transkripčních faktorů Pdx1, Ngn3 a MafA

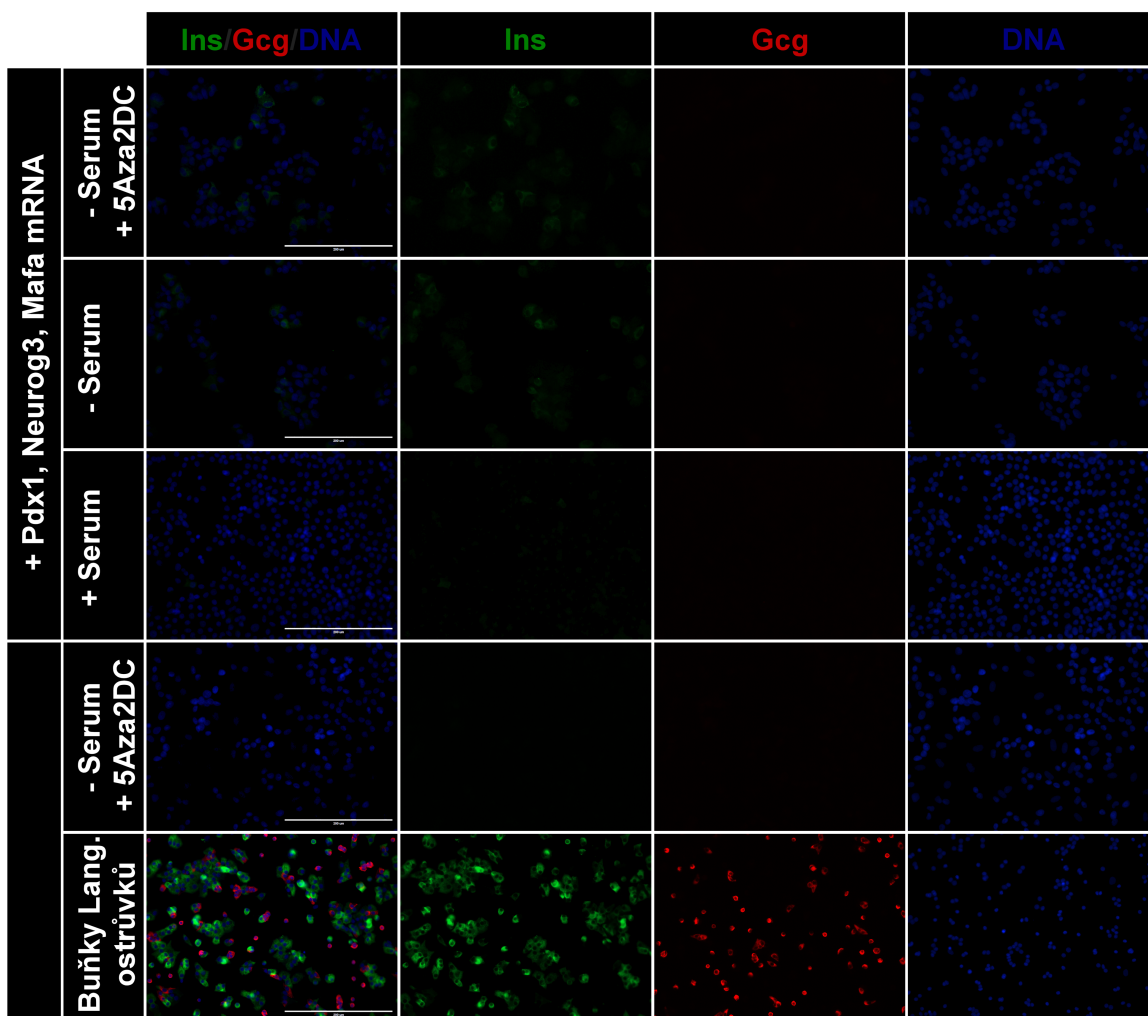
Transdiferenciace exokrinních buněk na buňky produkující insulin vyžaduje přítomnost všech tří transkripčních faktorů Pdx1, Ngn3 a MafA v buněčném jádře. Buňky AR42J byly transfekovány směsí mRNA pro všechny tři transkripční faktory o celkové koncentraci 1500 ng/ml. Po 20 hodinách od transfekce byly buňky imunofluorescenčně značeny na jednotlivé transkripční faktory. V prvním řádku na obrázku 28 se nachází pozitivní buňky značené na dvojici transkripčních faktorů (Pdx1 a Ngn3, Pdx1 a MafA nebo Ngn3 a MafA). Počet silně pozitivních buněk (žlutě zbarvených) na oba transkripční faktory se pohybuje pouze v řádu procent. Na druhou stranu buňky, které jsou slabě pozitivní (světle žlutě zbarvené) se vyskytují v hojném zastoupení. Tato skutečnost platí pro všechny imunofluorescenčně značené dvojice transkripčních faktorů. U buněk exprimující dva transkripční faktory se předpokládá exprese i třetího transkripčního faktoru.



Obrázek 28. Imunofluorescenční značení buněk AR42J na transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a Mafa po 20 hodinách od transfekce. Žlutě zbarvené pozitivní buňky v 1. řádku značí koexpresi dvou transkripčních faktorů (Pdx1 a Ngn3, Pdx1 a Mafa nebo Ngn3 a Mafa). Uvedené měřítko odpovídá velikosti 200 μm .

5.6. Transdiferenciace exokrinních buněk na buňky produkující insulin pomocí syntetické mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA a pozitivní účinek epigenetického modulátoru 5-aza-2'-deoxycytidin na míru exprese insulinu

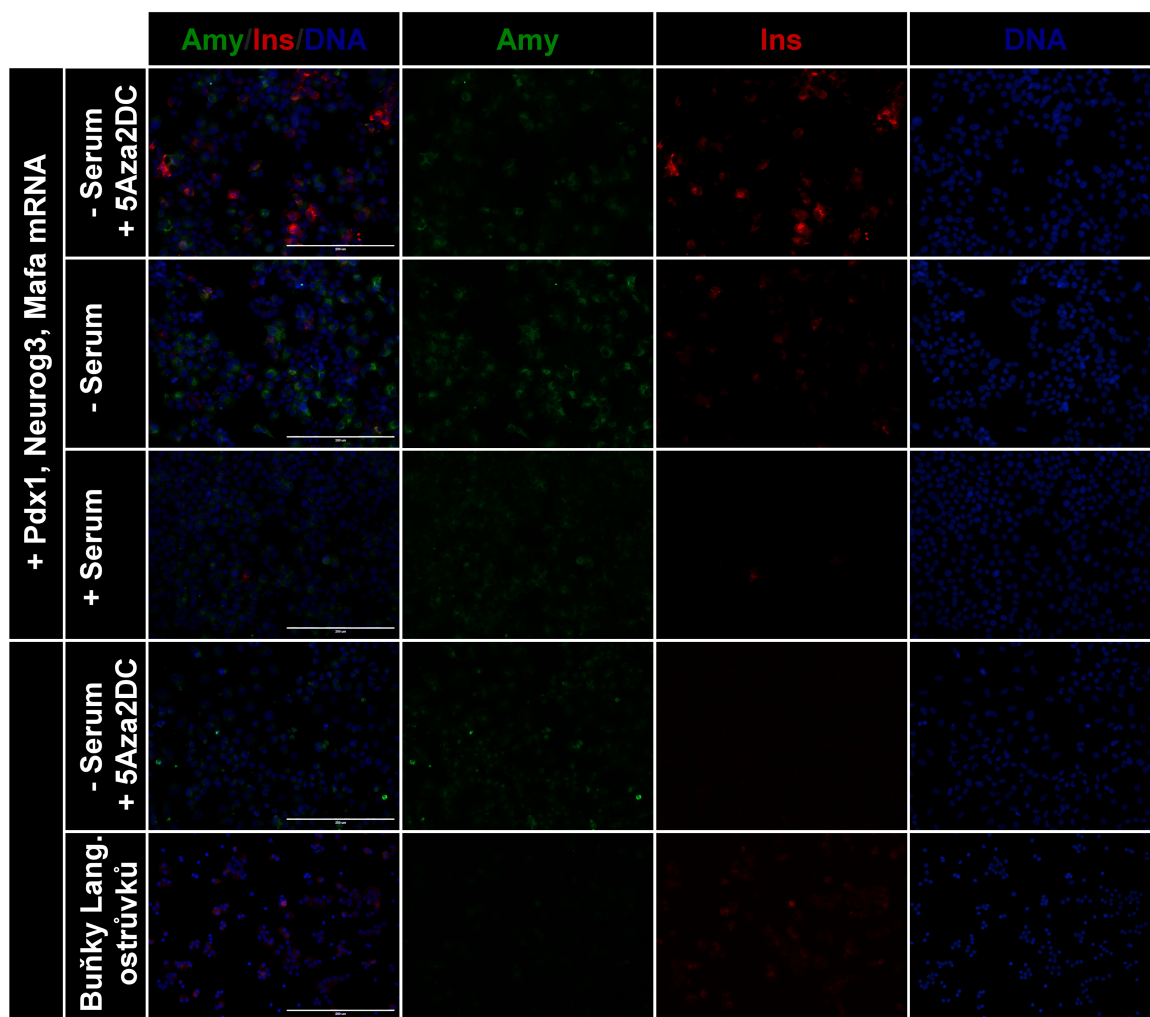
Buňky kultivované na extracelulární matrix byly transfekovány každých 24 hodin směsí transkripčních faktorů Pdx1, Ngn3 a MafA o jednotných koncentracích 500 ng/ml po dobu 10 dní. Po ukončení inkubace byly buňky imunofluorescenčně značeny na přítomnost hormonu insulin a glukagon. Navíc byl sledován účinek exogenního epigenetického modulátoru 5-aza-2'-deoxycytidin (5-aza-2'-DC), který byl aplikován do kultivačního média 3 dny před zahájením transfekce. Na obrázku 29 jsou zobrazeny výsledky z fluorescenčního mikroskopu. První sloupec znázorňuje složený snímek buněk pozitivních na insulin (zeleně) a glukagon (červeně), jádra buněk jsou značena modře (DNA). Druhý a třetí sloupec znázorňuje buňky pozitivní na insulin (Ins) a glukagon (Gcg). Nejvyšší exprese insulinu byla dosažena transfekcí buněk kultivovaných v bezsérovém médiu (složení v tabulce 8) a zároveň s přidavkem 5-aza-2'-DC (Obr. 29, 1. řádek). Buňky kultivované ve bezsérovém médiu a bez přidavku 5-aza-2'-DC exprimovaly insulin v podstatně menší míře než buňky kultivované v bezsérovém médiu s přidavkem 5-aza-2'-DC (Obr. 29, 2. řádek). Nejmenší počet buněk produkujících byl zaznamenán u buněk kultivovaných v 15 % FBS médiu bez přidavku 5-aza-2'-DC (Obr. 29, 3. řádek). Transfekce směsí mRNA pro Pdx1, Ngn3 a MafA nevyvolala žádnou expresi hormonu glukagon, který je markerem α -buněk Langerhansových ostrůvků. Negativní kontrola buněk kultivovaných v bezsérovém médiu s přidavkem 5-aza-2'-DC bez transfekce mRNA je znázorněna ve 4. řádku obrázku 29. Jako pozitivní kontrola byly použité potkaní buňky Langerhansových ostrůvků, které produkují jak insulin, tak i glukagon (Obr. 29, 5. řádek).



Obrázek 29. Imunofluorescenční značení transdiferenciovanych buněk AR42J na přítomnost insulinu (Ins) a glukagonu (Gcg). První sloupec znázorňuje složený snímek buněk pozitivních na insulin (zeleně) a glukagon (červeně). Buněčná jádra jsou značena modře (DNA). Druhý a třetí sloupec jednotlivě znázorňuje buňky pozitivní na insulin nebo glukagon. Míra exprese insulinu závisela na složení kultivačního média. V prvním řádku jsou transfekované buňky kultivované v bezsérovém médiu s přidavkem epigenetického modulátoru 5-aza-2'-DC a ve druhém řádku bez přidavku 5-aza-2'-DC. V třetím řádku jsou transfekované buňky kultivované v 15 % FBS médiu bez přidavku 5-aza-2'-DC. Negativní kontrolou byly buňky bez transfekce mRNA kultivované v bezsérovém médiu s přidavkem 5-aza-2'-DC (4. řádek). Jako pozitivní kontrola byly použity buňky potkaních Langerhansových ostrůvků (5. řádek). Uvedené měřítko odpovídá velikosti 200 μm .

Hlavním znakem, kterým se pankreatické exokrinní buňky liší od buněk endokrinních je exprese enzymu α -amylasy. Za účelem zjištění míry transdiferenciace exokrinních buněk

na buňky produkující insulin, byly transdiferenciované buňky AR42J imunofluorescenčně značeny na α -amylasu. Buňky, které silně exprimovaly insulin byly negativní na α -amylasu, zatímco buňky slabě pozitivní na insulin exprimovaly jak insulin, tak i α -amylasu (Obr. 30, 1. řádek). Pravděpodobně se tyto buňky nacházejí ve stavu neúplné transdiferenciace, a tudíž mají charakter jak exokrinních, tak i endokrinních buněk. Míra exprese insulinu opět závisela na složení kultivačního média.



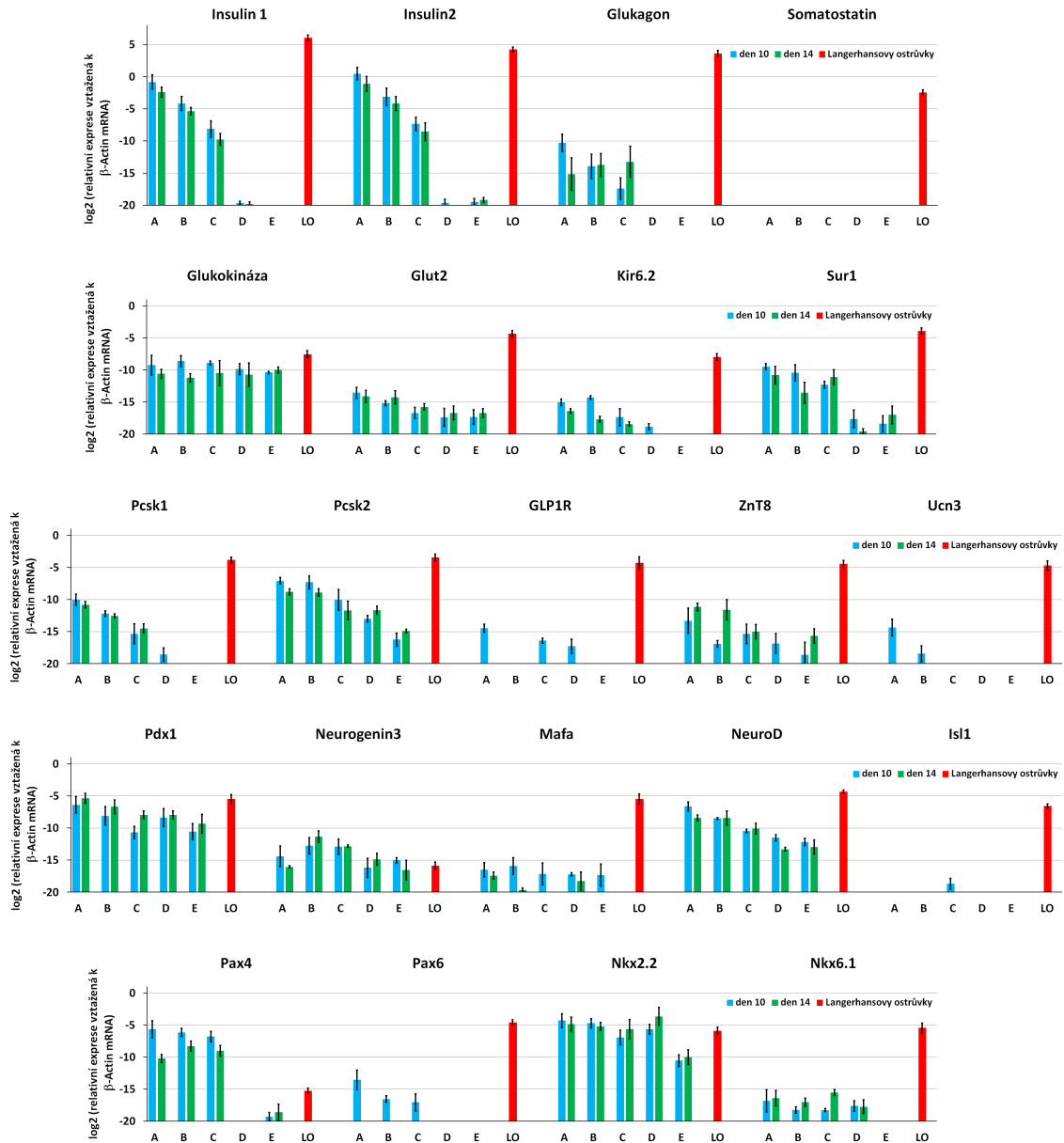
Obrázek 30. Imunofluorescenční značení transdiferenciovaných buněk AR42J na přítomnost insulinu (Ins) a α -amylasy (Amy). První sloupec znázorňuje složený snímek buněk pozitivních na insulinu (červeně) a α -amylasu (zeleně). Buněčná jádra jsou značena modře (DNA). Druhý a třetí sloupec jednotlivě znázorňuje buňky pozitivní na α -amylasu nebo insulinu. Míra exprese insulinu závisela na složení kultivačního média. V prvním řádku jsou transfekované buňky kultivované v bezsérovém médiu s přidavkem 5-aza-2'-DC a ve druhém řádku bez přidavku 5-aza-2'-DC. V třetím řádku jsou transfekované buňky kultivované v 15% FBS médiu bez přidavku 5-aza-2'-DC.

Jako negativní kontrola byly použity buňky potkaních Langerhansových ostrůvků neexprimující α -amylasu. Pozitivní kontrolou byly buňky bez transfekce mRNA kultivované v bezsérovém médiu s přidavkem 5-aza-2'-DC. Uvedené měřítko odpovídá velikosti 200 μ m.

5.7. Transfekce transkripčních faktorů Pdx1, Ngn3 a MafA aktivují expresi genů charakterizující β -buňky

Pomocí metody kvantitativní PCR s reversní transkripcí byla analyzována mRNA z transdiferenciovaných buněk. Pro objasnění pochodů a změn charakteru buňky před a po transdiferenciaci bylo analyzováno 22 genů typických pro endokrinní buňky, především β -buňky. Z grafu na obrázku 31 vyplývá, že buněk pozitivních na insulin bylo dosaženo za všech kultivačních podmínek. Avšak největší množství insulinu produkovaly buňky kultivované v bezsérovém médiu s přidavkem epigenetického modulatoru 5-aza-2'-DC. Tato skutečnost se shoduje s výsledky z imunofluorescenčního značení buněk, kde nejvíce buněk pozitivních na insulin bylo detekováno právě za kultivace v bezsérovém médiu s přidavkem 5-aza-2'-DC (Obr. 30). Kromě exprese genu pro insulin byla rovněž detekována exprese dalšího pankreatického hormonu glukagon, která byla ovšem výrazně nižší ve srovnání s množstvím mRNA detekované pro insulin. Tento výsledek je rovněž ve schodě s výsledky z imunofluorescenčního značení buněk, kde nebyla pozorována exprese glukagonu na proteinové úrovni u žádného ze vzorků (Obr. 29). Z výsledků analýzy exprese dalších genů je patrné, že v důsledku transfekce syntetickou mRNA pro Pdx1, Ngn3 a MafA došlo ke stimulaci exprese genů důležitých pro funkci β -buněk jako jsou podjednotky ATP senzitivního draselného transportéru Kir6.2 a SUR a rovněž i endoproteasy Pcsk1 a Pcsk2, které zajišťují konečné zpracování prohormonu proinsulin na insulin a jeho vedlejší produkt C-peptid. Exprese dalších genů důležitých pro funkci β -buněk jako jsou enzym glukokinasa, glukosový transportér 2 (Glut2), receptor Glp-1 peptidu GLP1R a zinkový přenašeč ZnT8 nebyla výrazně rozdílná mezi jednotlivými vzorky. Analýza exprese transkripčních faktorů účastnících se diferenciaci a genové exprese β -buněk prokázala výrazné zvýšení exprese transkripčních faktorů NeuroD a Pax4 u vzorků buněk transfekovaných syntetickou mRNA pro Pdx1, Ngn3 a MafA. Exprese dalších transkripčních faktorů byla zvýšena pouze částečně (Pdx1, Pax6, Nkx6.1) nebo nebyla zvýšena vůbec (Neurogenin3, MafA, Nkx2.2, Isl1). Z výsledků kvantitativní RT-PCR analýzy byly rovněž patrné částečné změny v míře exprese genů bezprostředně po

ukončení transfekce (den10) a 4 dny po ukončení transfekce (den14) syntetickou mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA. Především bylo detekováno částečné snížení exprese genů pro Insulin1 a Insulin2. Rovněž došlo k utlumení exprese genů pro receptor Glp-1 peptidu GLP1R a marker diferencovaných β -buněk urokortin3 (Ucn3).



Obrázek 31. Stanovení genové exprese pomocí kvantitativní PCR s reversní transkripcí. Exprese genů důležitých pro pankreatické hormony, funkci β -buněk a transkripční faktory byla stanovená u vzorků bezprostředně po ukončení transfekce syntetickou mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA (den10) a 4 dny po ukončení transfekce (den14). Jednotlivé vzorky, u nichž byla

provedena analýza genové exprese zahrnovaly AR42J buněčnou linii: (A) kultivovanou v bezsérovém médiu s přídavkem 5-aza-2'-DC a transfekovanou syntetickou mRNA, (B) kultivovanou v bezsérovém médiu a transfekovanou syntetickou mRNA, (C) kultivovanou v 15 % FBS médiu a transfekovanou syntetickou mRNA, (D) kultivovanou v bezsérovém médiu bez transfekce syntetickou mRNA a (E) kultivovanou v 15 % FBS médiu bez transfekce syntetickou mRNA. Jako pozitivní kontrola byly použity buňky potkaních Langerhansových ostrůvků (LO). Exprese jednotlivých genů byla vztažena k expresi mRNA pro β -aktin a vyhodnocena pomocí metody δ CT.

6. Diskuse

Diabetes mellitus je závažné onemocnění, které postihuje velkou část lidské populace. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) bylo v roce 2014 postiženo tímto onemocněním okolo 9 % z celkové lidské populace starších 18 let⁷². Převážná část diabetických pacientů trpí onemocněním diabetu 2. typu, který ve většině případů nevyžaduje pravidelné zevní podání insulínu. Přesto část pacientů s diabetem 2. typu a všichni pacienti s diabetem 1. typu jsou odkázáni na celoživotní podávání insulínu, nezbytného pro udržení stabilní hladiny glukózy v krvi. V současné době jediným dostupným způsobem léčby diabetu 1. typu je transplantace celého pankreatu nebo izolovaných Langerhansových ostrůvků. Hlavní nevýhodou tohoto způsobu léčby je však nedostatek vhodné tkáně k transplantaci a nedostatek dárců. Tudíž tento typ léčby je pouze dočasným stádiem v léčbě diabetu a pro získání dostatečného množství tkáně a eliminaci negativních efektů léčby musí být nalezeny alternativní zdroje insulín produkující tkáně. Dostupný a bezpečný alternativní zdroj by mohla představovat transdiferenciace exokrinní tkáně na tkáň endokrinní, produkující insulín. Výhoda tohoto přístupu je především použití pacientovy vlastní tkáně. V dnešní době již probíhá velmi intenzivní výzkum v oblasti alternativní léčby diabetu, nicméně doprovázený značnými obtížemi.

Hlavními průkopníky přístupu transdiferenciace exokrinních buněk na buňky produkující insulín byly Zhou a kol.⁶⁹, kteří použili směs adenovirových nosičů kódující transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA pro *in vivo* transdiferenciaci myší exokrinní tkáně. Transdiferenciace buněčné tkáně pomocí adenovirových nosičů nese s sebou jak výhody, tak i nevýhody. Jednou z výhod je vysoká exprese proteinu, jelikož adenovirové částice velmi snadno prostupují do buňky, což umožní přepis vysokého počtu adenovirových kopií. Na druhou stranu značnou nevýhodou v tomto přístupu je možná integrace virové DNA do genomické DNA buňky⁷³. Z tohoto důvodu by takto připravené buňky produkující insulín by nemohly být použity v klinické praxi. Další nevýhodou využití adenovirových nosičů pro přenos genetické informace je dlouhá životnost částice v buňce, která může dosáhnout více než 5 měsíců⁷⁴. Tudíž exprese proteinu kódovaného adenovirovým nosičem probíhá po dlouho dobu. Z tohoto důvodu je pravděpodobné, že exprese insulínu v buňkách pozitivních na insulín je pouze stimulována pomocí transkripčních faktorů adenovirového původu a nikoliv vlastní endogenní expresí. Proto v této diplomové práci

byl zvolen zcela jiný přístup dopravení genetické informace do buňky. Pro expresi transkripčních faktorů Pdx1, Ngn3 a MafA byla použita *in vitro* připravená syntetická mRNA.

Stabilita mRNA hraje klíčovou úlohu při buněčných manipulacích založených na použití syntetické mRNA. Cílem je tudíž připravit co nejstabilnější mRNA. Při návrhu sekvence mRNA pro všechny tři transkripční faktory byla použita sekvence 5' nepřekládané oblasti z mRNA pro potkaní β -globin a sekvence 3' nepřekládané oblasti mRNA pro lidský β -globin, které jsou dle literatury^{75,76} považovány za jedny z nejstabilnějších. Navíc byly sekvence oblasti 5'UTR a 3'UTR modifikovány. V průběhu syntézy vlákna mRNA částečně dochází ke vzniku nespecifických produktů obsahujících fosfátovou skupinu na 5' konci, která může být aktivátorem proteinkinasy R³². Aktivace proteinkinasy R iniciuje mechanismy vedoucí k degradaci cizorodné RNA. Z tohoto důvodu byl během syntézy mRNA začleněn krok zahrnující defosforylaci antarktickou fosfatasou, která degraduje volné fosfátové skupiny na 5' konci molekuly mRNA. Další modifikací nukleotidové sekvence bylo zahrnutí krátké jednovláknové struktury na 3' konci 3' UTR oblasti za účelem dosažení dostatečné míry polyadenylace 3' konce a eliminace tvorby nespecifických produktů. Při návrhu sekvence mRNA byla na 3' konec 3'UTR oblasti vložena sekvence ATGCTATACACGTATGCGAGAACAACAAAAAAAAAAAAA.

Na základě modelů predikce sekundární struktury by takto modifikovaná 3'UTR oblast měla poskytovat krátký jednovláknový konec, který je vyžadován pro správné nasednutí polymerasy při syntéze poly(A) konce. Délka tohoto jednovláknového 3' konce je důležitým faktorem, jelikož příliš dlouhé (50 nt) 3' konce mohou být využity jako templát pro T7 RNA polymerasu⁷⁷, čímž může docházet k syntéze nežádoucích produktů, které mohou stimulovat nespecifickou imunitní odpověď.

Pro syntézu poly(A) konce byla použita polymerasa izolovaná ze *Saccharomyces cerevisiae*. Tento eukaryotní enzym je schopný tvořit poly(A) konce o přibližně stejné délce⁷⁸. Na druhou stranu prokaryotní polymerasa izolovaná z *E. coli* tvoří poly(A) konce lišící se až ve stovkách inkorporovaných adeninových bází⁷⁸.

Ve většině typů přirozeně se vyskytujících RNA jsou v sekvenci přítomné přirozené a v malé míře i modifikované nukleosidy, které mnohdy plní zásadní funkci v RNA. Na základě přítomnosti modifikovaných nukleosidů může imunitní systém buňky rozlišit, zdali se jedná o RNA buňce vlastní nebo cizorodou. Začleněním modifikovaných

nukleosidů v synteticky připravené mRNA je možné dosáhnout snížení nespecifické imunitní odpovědi transfekovaných buněk³⁴. Navíc použití směsi o různém poměru modifikovaných a přirozených nukleosidů způsobilo ještě výraznější potlačení imunitní odpovědi buňky na cizorodou mRNA⁷⁹. Za účelem zvýšení stability a míry translace syntetické mRNA pro Pdx1, Ngn3 a MafA byla během jejich syntézy použita směs přirozených a modifikovaných nukleosidů (pseudouridin a 5'-methylcytidin) v poměru 3:1. Na základě elektroforetické separace synteticky připravené mRNA byla stanovena její čistota a velikost. Porovnáním elektroforeogramů standardu a syntetické mRNA byla zjištěna patrná nesrovnalost ve velikosti syntetické mRNA. Tuto skutečnost je možné vysvětlit přítomností modifikovaných nukleosidů a hojného zastoupení adeninových bází, které zapříčiňují pomalejší separaci⁷⁹. Hlavní frakce separace odpovídala synteticky připravené mRNA, nicméně analýzou byla také detekována nepatrná míra nespecifických produktů o menší velikosti než syntetická mRNA. Tyto nespecifické produkty mohou být odstraněny přečištěním přes chromatografickou kolonu metodou HPLC^{80,81}. Takto přečištěná syntetická mRNA výrazně sníží aktivaci nespecifické imunitní odpovědi buňky způsobenou nespecifickými produkty.

In vitro synteticky připravená mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA byla následně použita k transdiferenčním experimentům na exokrinní pankreatické buněčné linii AR42J. Pro zlepšení přežívání buněk AR42J a zvýšení míry transfekce během transdiferenciace byly buňky kultivovány na extracelulární matrix sekretované buňkami HTB9⁸². Z obecného hlediska je extracelulární matrix hmota produkovaná buňkami vykazujícími podpůrnou funkci především během vývoje embryonálních buněk. Extracelulární matrix rakovinných buněk močového měchýře HTB9 jsou složeny z glykoproteinů obsahující fibronectin, laminin, heparan sulfátové a dermatan sulfátové proteoglykany a kolageny. Dále jsou zde přítomné určité růstové faktory zahrnující například endoteliální buněčný růstový faktor ECGC, transformující růstový faktor β (TGF- β 1) a za určitých podmínek hepatocytární růstový faktor HGF/SF. Buňky kultivované na extracelulární matrix změnily kompletně svojí morfologii a chování. Již po několika hodinách po umístění buněk na extracelulární matrix buňky vytvořily výběžky dlouhé až několik desítek nm. Buňky se rovněž napnuly do prostoru a zaujaly co největší obsah plochy. Na druhou stranu buňky kultivované na povrchu bez extracelulární matrix, se po několika hodinách seskupily do buněčných shluků za vytvoření pouze krátkých

výběžků a zachování minimálního buněčného povrchu.

Buňky kultivované na extracelulární matrix byly transfekovány syntetickou mRNA pro Pdx1, Neurogenin3 a MafA. Po 20 hodinové inkubaci byly imunofluorescenčně detekovány buňky pozitivní na jednotlivé transkripční faktory. Lokalizace proteinu Ngn3 a MafA v rámci buňky byla výhradně v buněčném jádře, zatímco Pdx1 se nacházel jak v jádře, tak také i v cytoplazmě. Pro sledování závislosti míry exprese proteinu na koncentraci podávané mRNA, byly buňky transfekovány mRNA o koncentraci 0, 250, 500, 1000 a 2000 ng/ml. Z této koncentrační závislosti pro Ngn3 a Pdx1 vyplývá, že při zvyšující se koncentraci mRNA se zvyšuje míra exprese proteinu. Na rozdíl u transkripčního faktoru MafA dvojnásobné zvýšení koncentrace mRNA z 1000 na 2000 ng/ml zesílení exprese nezpůsobilo. Množství použité syntetické mRNA je velice důležitým faktorem při buněčné manipulaci, jelikož i přes stabilizační prvky ve struktuře mRNA dochází k aktivaci imunitní odpovědi buňky. Z tohoto důvodu je nutné přenést do buňky takové množství mRNA, které je dostačující pro transdiferenciaci buňky, ale zároveň nevyvolá její imunitní odpověď.

Transdiferenční experimenty byly prováděny po dobu 10 dní pomocí syntetické mRNA kódující transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA. Na základě zjištění zachování funkčnosti mRNA a proteinu v buňce byla vyžadována transfekce každých 24 hodin pro docílení kontinuální exprese transkripčních faktorů. Míra exprese insulinu u buněk pozitivních na insulin závisela na složení kultivačního média. Nejvíce buněk pozitivních na insulin bylo detekováno při kultivaci buněk v bezsérovém médiu s přidavkem 5-aza-2'-DC. Sloučenina 5-aza-2'-DC slouží k ovlivnění míry kondenzace buněčné DNA. Po navázání 5-aza-2'-DC na molekulu DNA dojde k rozvolnění struktury chromatinu na euchromatin, čímž se DNA stává přístupnější pro nasednutí transkripčních faktorů. Epigenetický modulátor 5-aza-2'-DC je neselektivní inhibitor methyltransferas, který po vazbě na DNA zamezuje metylaci DNA a tím způsobuje rozvolnění chromatinu⁸³. Vedle toho buňky kultivované v 15 % FBS médiu bez přidavku 5-aza-2'-DC exprimovaly insulin ve velmi malé míře.

Buňky Langerhansových ostrůvků produkují čtyři hlavní hormony specifické pro danou buňku. Jedná se o glukagon (α -buňky), insulin (β -buňky), somatostatin (δ -buňky) a pankreatický polypeptid PP (PP buňky). Transdiferenciace buněk mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA způsobila tvorbu buněk s charakterem β -buněk, jelikož

produkovaly pouze hormon insulin a nikoliv glukagon.

Transdiferenciace je pro buňky do značné míry velmi náročný a dlouhý proces, při kterém dochází postupně k inhibici exprese mnoha genů pro původní buňku vlastních a k aktivaci exprese mnoha genů pro původní buňku nevlastních. Pankreatické exokrinní buňky, na rozdíl od endokrinních produkují enzym α -amylasu. Na základě detekce tohoto enzymu byla ověřena míra transdiferenciace. Buňky, které byly silně pozitivní na insulin, nebyly pozitivní na α -amylasu, a tudíž ztratily charakter endokrinních buněk. Počet silně pozitivních buněk na insulin a zároveň negativních na α -amylasu bylo pouze v řádu procent. Nicméně značný počet slabě pozitivních buněk na insulin a α -amylasu svědčí o pouze částečné transdiferenciaci. U těchto buněk pravděpodobně došlo k nízké efektivitě transfekce současně všech tří transkripčních faktorů a tím i k omezenému zahájení procesu přeměny na endokrinní buňky. K dokončení transdiferenciačního procesu na buňky produkující pouze insulin by bylo zřejmě nutné prodloužit dobu nebo eventuálně zvýšit dávkování mRNA.

Imunochemické stanovení s fluorescenčním vyhodnocením vyžaduje pro detekci proteinu v buňce jeho poměrně vysokou koncentraci. Z tohoto důvodu byla provedena komplexní analýza transdiferenciovaných buněk pomocí kvantitativní PCR s reversní transkripcí. Analyzované geny (tabulka 11) zahrnovaly hormony, enzymy, strukturní proteiny, a transkripční faktory charakteristické pro endokrinní pankreatické buňky. Analýza genové exprese potvrdila výsledky získané imunochemickým stanovením s fluorescenčním vyhodnocením. Byla prokázána stimulace exprese obou genů pro insulin u vzorků AR42J buněk transferovaných syntetickou mRNA kódující transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA. Nejvyšší míra exprese genů pro insulin byla detekována u vzorku kultivovaného v bezsérovém médiu s přídavkem 5-Aza-2'-DC a syntetickou mRNA. Kromě exprese genů pro insulin byla rovněž detekována exprese dalšího pankreatického hormonu glukagonu. Avšak exprese hormonu glukagon byla výrazně nižší u všech stanovovaných vzorků, proto také nebyl detekován na proteinové úrovni pomocí imunofluorescenčního značení. Exprese dalšího pankreatického hormonu somatostinu nebyla detekována vůbec. Z těchto výsledků je patrné, že transdiferenciace pankreatických exokrinních buněk pomocí syntetické mRNA kódující transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA vede k přeměně především na buňky produkující insulin a nikoliv jiné typy pankreatických endokrinních buněk.

Z výsledků analýzy genové exprese je dále patrné, že syntetická mRNA kódující

transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA rovněž výrazně zvýšila míru exprese genů důležitých pro funkci a genovou expresi pankreatických β -buněk. Jedná se především o geny zajišťující glukosou stimulovanou sekreci insulinu (Kir6.2 a SUR)⁸⁴ a endoproteasy (Pcsk1 a Pcsk2)⁸⁵, které zajišťují konečné zpracování prohormonu proinsulinu na insulin a jeho vedlejší produkt C-peptid. Exprese dalších dvou genů (glukokinasa a Glut2) důležitých pro citlivost β -buněk na změny v koncentraci extracelulární glukosy nebyla výrazně ovlivněna syntetickou mRNA kódující transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA. V případě enzymu glukokinasa tomu bylo patrně z důvodu již poměrně vysoké míry exprese tohoto genu u buněčné linie AR42J.

V důsledku transdiferenciace AR42J buněk syntetickou mRNA kódující transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA došlo rovněž ke stimulaci exprese Pax4 a NeuroD transkripčních faktorů účastnících se diferenciace a genové exprese β -buněk. Exprese dalších transkripčních faktorů důležitých především pro samotnou funkci β -buněk byla zvýšena pouze částečně (Pdx1, Pax6, Nkx6.1) nebo nebyla zvýšena vůbec (Neurogenin3, MafA, Nkx2.2, Isl1).

Především exprese transkripčního faktoru Pax4^{48,86}, který je ve zvýšené míře exprimován v průběhu diferenciace pankreatických β -buněk a částečná exprese markeru diferencovaných β -buněk urokortin3 (Ucn3)⁸⁷ svědčí o stále probíhající a nekompletní přeměně transdiferencovaných buněk na zralé beta-buňky.

7. Souhrn

V této diplomové práci byly *in vitro* připraveny syntetické mRNA kódující pankreatické transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA. Stabilita mRNA byla zajištěna použitím několika sekvenčních prvků. Pro 5' a 3' nepřekládanou oblast byla zvolena sekvence stabilní mRNA pro β -globin. 3' konec 3'UTR oblasti byl modifikován pro docílení volné jednovláknové struktury, která umožňuje snazší nasednutí poly(A) polymerasy a následnou syntézu poly(A) konce.

Funkce takto připravené mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA byla ověřena imunochemickým stanovením s fluorescenčním vyhodnocením u buněčné linie AR42J. Buňky transfekované syntetickou mRNA byly pozitivní na jednotlivé transkripční faktory. Transdiferenciací exokrinních buněk AR42J pomocí syntetické mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Ngn3 a MafA byly získány buňky produkující insulin. Rovněž byl prokázán vliv složení kultivačního média na míru exprese insulinu a efektivitu transdiferenciace. Na základě komplexní analýzy 22 genů pomocí qRT-PCR byl určen charakter transdiferenciovaných buněk. Bylo prokázáno, že transdiferenciované buňky produkující insulin částečně vykazovaly charakter β -buněk, neexprimovaly ve zvýšené míře další pankreatické hormony, ale vykazovali některé znaky nezralých β -buněk.

8. Příloha

Příloha č. 1

Sekvence DNA konstruktů v plasmidu pAcGFP-N3 (295 bp):

CGTCAGATCCGCTAGCAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGAAACAAAGCAA
TCTATTCTGATAGACTCAGGAAGCAAACCTGCAGCCGAATCCACTGCTGGGTC
TGGACTCTACCCTGCAGTAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTTAAA
GGTTCCTTTGTTCCCTAAGTCCAATACTAACTGGGGGATATTATGAAGG
GCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCATG
CTATACACGTAAGCTAGCTGGATCCATCATGGTGA

T7 promotor, Potkaní betaGlobin 5UTR, restrikční místa pro PstI, Lidský betaGlobin 3UTR

Sekvence genu pro Pdx1 a DNA konstruktů

CGTCAGATCCGCTAGCAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGAAACAAAGCAA
TCTATTCTGATAGACTCAGGAAGCAAACATGAACGGCGAGGAGCAGTACTA
CGCGGCCACACAGCTCTACAAGGACCCGTGCGCATTCCAGAGGGGTCCGG
TGCCAGAGTTCAGTGCTAATCCCCCTGCGTGCCTGTACATGGGCGCCAG
CCCCACCTCCGCGCCACCCAGTTTGCAGGCTCGCTGGGAACGCTGGA
ACAGGGAAGTCCCCCGGACATCTCCCCATACGAAGTGCCCCCGCTCGCCG
ATGACCCGGCTGGCGCGCACCTCCACCACCACCTCCAGCTCAGCTCGGG
CTCGCCCATCCACCTCCCGGACCTTTCCCGAATGGAACCGAGACTGGGGG
CCTGGAAGAGCCAGCCGCGTTCATCTCCCTTTCCCGTGGATGAAATCCAC
CAAAGCTCACGCGTGGAAGCCAGTGGGCAGGAGGTGCATACGCAGCA
GAACCGGAGGAGAATAAGAGGACCCGTACAGCCTACACTCGGGCCAGCT
GCTGGAGCTGGAGAAGGAATTTCTTATTTAACAATAACATCTCCCGGCCTCG
CCGGGTGGAGCTGGCAGTGATGCTCAACTTGACTGAGAGACACATCAAAA
TCTGGTTCCAAAACCGTCGCATGAAGTGGAAGAAAGAGGAAGATAAGAAA
CGTAGTAGCGGGACAACGAGCGGGGGCGGTGGGGGCGAAGAGCCGGAGC
AGGATTGTGCCGTAACCTCGGGCGAGGAGCTGCTGGCATTGCCACCGCCA
CCACCTCCCGGAGGTGCTGTGCCCTCAGGCGTCCCTGCTGCTGCCCGGGA
GGGCCGACTGCCTTCCGGCCTTAGTGCGTCCCCACAGCCCTCCAGCATCG
CGCCACTGCGACCGCAGGAACCAGATAGTAAGCTCGCTTTCTTGCTGTC
CAATTTCTATTAAGGTTCCCTTTGTTCCCTAAGTCCAATACTAACTGGGG
GATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTA
TTTTTCATTGCATGCTATACACGTAAGCTAGCTGGATCCATCATGGTGA

T7 promotor, Potkaní betaGlobin 5UTR, Potkaní gen pro PDX1, Lidský betaGlobin 3UTR, restrikční místa pro NheI

Sekvence genu pro Ngn3 a DNA konstruktů

CGTCAGATCCGCTAGCAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGAAACAAAGCAA

TCTATTCTGATAGACTCAGGAAGCAAACATGACGCCTCAACCCTTGGATGC
GCCACCATCCAAGTGTCCCAAGAGACCCAGCAACCCTTTCCCGGAGCCT
CGGACCACGAAGTGCTCAGTTCCAATTCCACCCACCTAGCCCCACTCTC
GTACCGAGGGACTGCTCCGAAGCAGAAGCAGGTGACTGCCGAGGGACAT
CGAGGAAGCTCCGTGCGCGGGCGGGAGGGCGCAACAGGCCCAAGAGCGA
GTTGGCACTGAGCAAGCAGCGACGAAGCCGGCGCAAGAAGGCCAACGAC
CGGGAGCGCAACC GCATGCACAACCTTAACTCCGCGCTGGATGCGCTGCG
CGGTGTCCTGCCACCTTCCCGGATGACGCCAAACTTACAAAGATCGAGA
CCCTGCGCTTCGCCACAACCTACATTTGGGCACTGACTCAGACGCTGCGC
ATAGCGGACCACAGCTTCTACGGCCCCGAGCCCCCTGTGCCCTGTGGGGA
GCTGGGAAGCCCGGGAGGGGGCTCCAGCGGCGACTGGGGCTCTATCTACT
CCCCAGTTTCCCAAGCTGGTAGCCTGAGCCCCACAGCCTCATTGGAGGAG
TTCCCTGGCCTGCAGGTGCCAGCTCCCCATCCTGTCTGCTCCCGGGCAC
CCTGGCTTTCTCAGATTTTCTGTAGTAAGCTCGCTTCTTGCTGTCCAATT
CTATTAAGGTTCCCTTTGTTCCCTAAGTCCAACCTACTAAACTGGGGGATATT
ATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCA
TTGCATGCTATACAGTACTGCTAGCTGGATCCATCATGGTGA

T7 promotor, Potkaní betaGlobin 5UTR, Potkaní gen pro NGN3, Lidský betaGlobin 3UTR, restrikční místa pro NheI

Sekvence genu pro MafA a DNA konstruktů

CGTCAGATCCGCTAGCAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGAAACAAAGCAA
TCTATTCTGATAGACTCAGGAAGCAAACATGGCGGCAGAAGTGGCTATGGG
CGCCGAGCTGCCCAGCAGCCACTCGCCATCGAGTACGTCAACGACTTCG
ACCTGATGAAGTTCGAGGTGAAGAAGGAGCCGCCCGAGGCCGAGCGCTT
CTGCCACCGCCTGCCACCCGGCTCGCTATCCTCGACGCCCTCAGCACGC
CCTGCTCCTCGGTGCCCTCTTCGCCAGCTTCTGCGCACCCAGCCCCGGC
ACCGGCAGCAGCGCGGGCGGGGGGTAGCGCGGCTCAGGCCGGGGGC
GCCCCGGGGCCGCCGAGTGGAGGCCCGGCACTGTGGGGGGCGCCTCAG
GAAAAGCGGTGCTGGAGGATCTGTACTGGATGAGCGGGTATCAGCACCAC
CTGAACCCCGAGGCGCTCAACCTGACGCCGGAGGACGCGGTGGAGGCGC
TCATCGGCAGCGGCCACCACAGCGCGCACCCACGGCGCGCATCACCCAGCG
GCTGCTGCGGCCTATGAGGCCTTCCGGGGCCAGAGCTTCGCGGGCGGGC
GCGGGCGGCGGGCGGGACGACATGGGTGCCGGCCACCACCACGGCGCACA
CCACACTGCACACCACCACCTCTGCCACCATCACCATCATCACCACCA
CCACCACGGAGGCTCTGGCCACCACGGTGGAGGCGCGGGTCACGGTGGA
GGCGGGCGGGCCACCACGTGCGCTTGGAGGAGCGCTTCTCCGACGACC
AGCTGGTGTCCATGTCAGTGCGGGAGCTGAACCGGCAGCTCCGCGGGCTTC
AGCAAGGAGGAGGTCATCCGACTGAAACAGAAGCGGCGCACGCTCAAGA
ACCGCGGCTACGCGCAGTCGTGCCGCTTCAAGCGGGTGCAGCAGCGGCA
CATTCTGGAGAGCGAGAAGTGCCAGCTCCAGAGCCAGGTGGAGCAGCTG
AAGCTGGAGGTGGGGCGTTTGGCCAAGGAGCGGGACCTGTACAAGGAGA
AATACGAGAAGCTGGCGGGTCGTGGTGGCCCTGGTTCTGCTGGTGGTGCA
GGTTTCCACGTGAACCTTCTCCACCTCAGGCTGGTCCAGGTGGCGCTAA
AGGCACTGCTGACTTCTTCTGTAGTAAGCTCGCTTCTTGCTGTCCAATT

TCTATTAAAGGTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAACACTAAACTGGGGGATAT
TATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTC
ATTGCATGCTATACACGTAAGTCTGCTAGCTGGATCCATCATGGTGA

T7 promotor, Potkaní betaGlobin 5UTR, Potkaní gen pro MafA, Lidský betaGlobin 3UTR, restrikční místa pro NheI

Sekvence templátu pro syntézu mRNA pro Pdx1 (1089bp):

TAGCAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGAAACAAAGCAATCTATTCTGATA
GACTCAGGAAGCAAACATGAACGGCGAGGAGCAGTACTACGCGGCCACAC
AGCTCTACAAGGACCCGTGCGCATTCCAGAGGGGTCCGGTGCCAGAGTTC
AGTGCTAATCCCCCTGCGTGCCTGTACATGGGCGCCAGCCCCACCTCC
GCCGCCACCCAGTTTGCAGGCTCGCTGGGAACGCTGGAACAGGGGAAGT
CCCCCGGACATCTCCCATAACGAAGTGCCCCCGCTCGCCGATGACCCGGC
TGGCGCGCACCTCCACCACCACCTCCAGCTCAGCTCGGGCTCGCCATC
CACCTCCCGGACCTTTCCCGAATGGAACCGAGACTGGGGGCCTGGAAGAG
CCCAGCCGCGTTCATCTCCCTTTCCCGTGGATGAAATCCACCAAAGCTCAC
GCGTGGAAGCCAGTGGGCAGGAGGTGCATACGCAGCAGAACCGGAGG
AGAATAAGAGGACCCGTACAGCCTACACTCGGGCCAGCTGCTGGAGCTG
GAGAAGGAATTCTTATTTAACAATAACATCTCCCGGCCTCGCCGGGTGGAG
CTGGCAGTGATGCTCAACTTGACTGAGAGACACATCAAAATCTGGTTCCAA
AACCGTCGCATGAAGTGGAAGAAAGAGGAAGATAAGAAACGTAGTAGCGG
GACAACGAGCGGGGGCGGTGGGGGCGAAGAGCCGGAGCAGGATTGTGCC
GTAACCTCGGGCGAGGAGCTGCTGGCATTGCCACCGCCACCACCTCCCGG
AGGTGCTGTGCCCTCAGGCGTCCCTGCTGCTGCCCGGGAGGGCCGACTG
CCTTCCGGCCTTAGTGCGTCCCCACAGCCCTCCAGCATCGCGCCACTGCG
ACCGCAGGAACCACGATAGTAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATT
AAAGGTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAACACTAAACTGGGGGATATTATGA
AGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGC
ATGCTATACACGTATGCGAGAACAACAAAAAAAAAAAA

T7 promotor, Potkaní betaGlobin 5UTR, Potkaní gen pro PDX1, Lidský betaGlobin 3UTR

Sekvence templátu pro syntézu mRNA pro Ngn3 (882):

TAGCAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGAAACAAAGCAATCTATTCTGATA
GACTCAGGAAGCAAACATGACGCCTCAACCCTTGGATGCGCCCACCATCC
AAGTGTCCAAGAGACCCAGCAACCCTTTCCCGGAGCCTCGGACCACGAA
GTGCTCAGTTCCAATTCACCCACCTAGCCCCACTCTCGTACCGAGGGAC
TGCTCCGAAGCAGAAGCAGGTGACTGCCGAGGGACATCGAGGAAGCTCC
GTGCGCGGCGCGGAGGGCGCAACAGGCCCAAGAGCGAGTTGGCACTGAG
CAAGCAGCGACGAAGCCGGCGCAAGAAGGCCAACGACCGGGAGCGCAAC
CGCATGCACAACCTTAACTCCGCGCTGGATGCGCTGCGCGGTGTCTGCC
CACCTTCCCGGATGACGCCAACTTACAAAGATCGAGACCCTGCGCTTCG
CCCACAACACTACATTTGGGCACTGACTCAGACGCTGCGCATAGCGGACCAC

AGCTTCTACGGCCCCGAGCCCCCTGTGCCCTGTGGGGAGCTGGGAAGCCC
GGGAGGGGGCTCCAGCGGGCGACTGGGGCTCTATCTACTCCCCAGTTTCCC
AAGCTGGTAGCCTGAGCCCCACAGCCTCATTGGAGGAGTTCCCTGGCCTG
CAGGTGCCCAGCTCCCCATCCTGTCTGCTCCCGGGCACCCCTGGCTTTCTC
AGATTTTCTGTAGTAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAGGTT
CCTTTGTTCCCTAAGTCCAATACTAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCT
TGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCATGCTATA
CACGTATGCGAGAACAACAAAAA

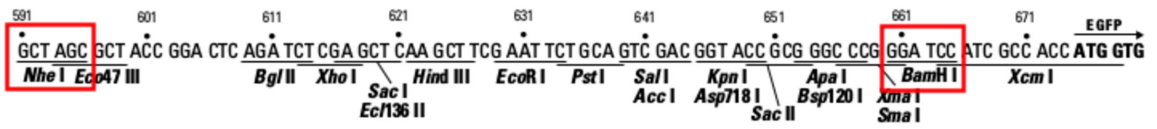
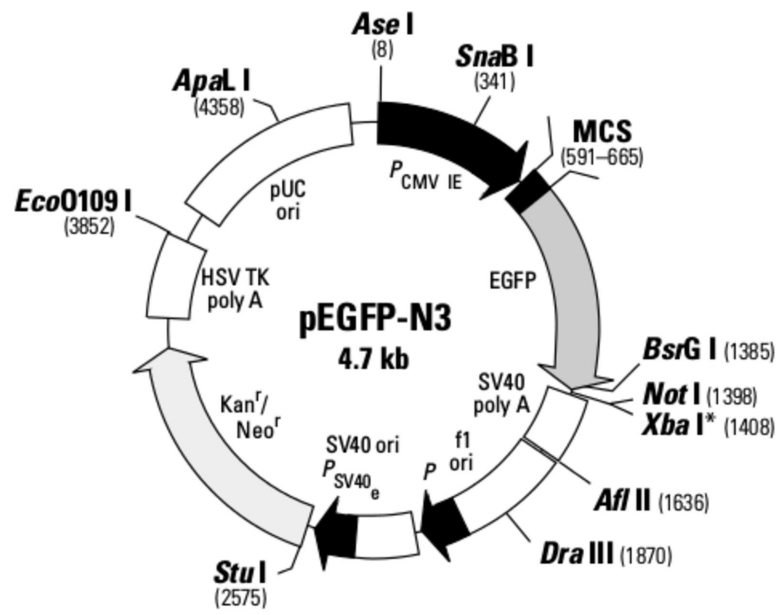
T7 promotor, Potkaní betaGlobin 5UTR, Potkaní gen pro NGN3, Lidský betaGlobin 3UTR

Sekvence templátu pro syntézu mRNA pro MafA (1323):

TAGCAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGAAACAAAGCAATCTATTCTGATA
GACTCAGGAAGCAAACATGGCGGCAGAACTGGCTATGGGCGCCGAGCTGC
CCAGCAGCCCACTCGCCATCGAGTACGTCAACGACTTCGACCTGATGAAG
TTCGAGGTGAAGAAGGAGCCGCCCGAGGCCGAGCGCTTCTGCCACCGCC
TGCCACCCGGCTCGCTATCCTCGACGCCCTCAGCACGCCCTGCTCCTCG
GTGCCCTCTTCGCCAGCTTCTGCGCACCCAGCCCCGGCACCGGCAGCAG
CGCGGGCGGGGGGTAGCGCGGCTCAGGCCGGGGGGCGCCCCGGGGCC
GCCGAGTGGAGGCCCGGCACTGTCGGGGGGCGCCTCAGGAAAAGCGGTTG
CTGGAGGATCTGTACTGGATGAGCGGGTATCAGCACCACTGAACCCCGA
GGCGCTCAACCTGACGCCGGAGGACGCGGTGGAGGGCGCTCATCGGCAGC
GGCCACCACAGCGCGCACCAACGGCGCGCATCACCCAGCGGCTGCTGCGG
CCTATGAGGCCTTCCGGGGCCAGAGCTTCGCGGGCGGCGGCGGCGGCGG
CGCGGACGACATGGGTGCCGGCCACCACCAGGCGCACACCACACTGCA
CACCACCACCACTCTGCCACCATCACCATCATCACCCACCACCACCACGGA
GGCTCTGGCCACCACGGTGGAGGCGCGGGTACGGTGGAGGGCGGCGCGG
GCCACCACGTGCGCTTGGAGGAGCGCTTCTCCGACGACCAGCTGGTGTCC
ATGTCAGTGCGGGAGCTGAACCGGCAGCTCCGCGGCTTCAGCAAGGAGG
AGGTCATCCGACTGAAACAGAAGCGGCGCACGCTCAAGAACCGCGGCTAC
GCGCAGTCGTGCCGCTTCAAGCGGGTGCAGCAGCGGCACATTCTGGAGA
GCGAGAAGTGCCAGCTCCAGAGCCAGGTGGAGCAGCTGAAGCTGGAGGT
GGGGCGTTTGCCAAGGAGCGGGACCTGTACAAGGAGAAATACGAGAAG
CTGGCGGGTCGTGGTGGCCCTGGTTCTGCTGGTGGTGCAGGTTTCCACG
TGAACCTTCTCCACCTCAGGCTGGTCCAGGTGGCGCTAAAGGCACTGCTG
ACTTCTTCTGTAGTAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAGGT
TCCTTTGTTCCCTAAGTCCAATACTAACTGGGGGATATTATGAAGGGCC
TTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCATGCTAT
ACACGTATGCGAGAACAACAAAAA

T7 promotor, Potkaní betaGlobin 5UTR, Potkaní gen pro MafA, Lidský betaGlobin 3UTR

Příloha č. 2:



9. Seznam použité literatury

- (1) Crick, F. *Nature* **1970**, 227, 561–563.
- (2) Meyer, S.; Temme, C.; Wahle, E. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, 39, 197–216.
- (3) Ross, J. *Microbiol. Rev.* **1995**, 59, 423–450.
- (4) Wei, C. M.; Gershowitz, a; Moss, B. *Cell* **1975**, 4, 379–386.
- (5) Banerjee, A. K. *Microbiol. Rev.* **1980**, 44, 175–205.
- (6) Abdelhamid, R. F.; Plessy, C.; Yamauchi, Y.; Taoka, M.; De Hoon, M.; Gingeras, T. R.; Isobe, T.; Carninci, P. *PLoS One* **2014**, 9, 1–12.
- (7) Shuman, S. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 619–625.
- (8) Guhaniyogi, J.; Brewer, G. *Gene* **2001**, 265, 11–23.
- (9) Gingras, A.-C.; Raught, B. R.; Sonenberg, N. *Annu. Rev.* **1999**, 68, 913–963.
- (10) Kozak, M. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 19867–19870.
- (11) Babendure, J. R.; Babendure, J. L.; Ding, J.-H.; Tsien, R. Y. *RNA* **2006**, 12, 851–861.
- (12) Kozak, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, 83, 2850–2854.
- (13) Pesole, G.; Mignone, F.; Gissi, C.; Grillo, G.; Licciulli, F.; Liuni, S. *Gene* **2001**, 276, 73–81.
- (14) Beaudoin, E.; Freier, S.; Wyatt, J. R.; Claverie, J. M.; Gautheret, D. *Genome Res.* **2000**, 10, 1001–1010.
- (15) Fort, P.; Rech, J.; Vie, A.; Piechaczyk, M.; Bonnieu, A.; Jeanteur, P.; Blanchard, J. M. *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 5657–5667.
- (16) Shyu, a. B.; Greenberg, M. E.; Belasco, J. G. *Genes Dev.* **1989**, 3, 60–72.
- (17) Edwalds-Gilbert, G.; Veraldi, K. L.; Milcarek, C. *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 2547–2561.
- (18) Humphrey, T.; Proudfoot, N. J. *Trends Genet.* **1988**, 4, 243–245.
- (19) Geisberg, J. V.; Moqtaderi, Z.; Fan, X.; Ozsolak, F.; Struhl, K. *Cell* **2014**, 156, 812–824.
- (20) De Moor, C. H.; Meijer, H.; Lissenden, S. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2005**, 16, 49–58.
- (21) Huntzinger, E.; Izaurralde, E. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, 12, 99–10.
- (22) Melton, D. A.; Krieg, P. A.; Rebagliati, M. R.; T.Maniatis; K.Zinn; Green, M. R. *Nucleic Acids Res.* **1984**, 12, 7035–7056.

- (23) Pardi, N.; Muramatsu, H.; Weissman, D.; Karikó, K. In *Synthetic messenger RNA and cell metabolism modulation*; Ribanovich, P. M., Ed.; Springer, 2013; pp. 29–42.
- (24) Carlile, T. M.; Rojas-Duran, M. F.; Zinshteyn, B.; Shin, H.; Bartoli, K. M.; Gilbert, W. *Nature* **2014**, *515*, 143–146.
- (25) Charette, M.; Gray, M. W. *J. Neurol. Psychopathol.* **2000**, *49*, 341–351.
- (26) Fernández, I. S.; Ng, C. L.; Kelley, A. C.; Wu, G.; Yu, Y.-T.; Ramakrishnan, V. *Nature* **2013**, *500*, 107–110.
- (27) Karijolic, J.; Yu, Y.-T. *Nature* **2011**, *474*, 395–398.
- (28) Motorin, Y.; Lyko, F.; Helm, M. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *38*, 1415–1430.
- (29) Squires, J. E.; Patel, H. R.; Nusch, M.; Sibbritt, T.; Humphreys, D. T.; Parker, B. J.; Suter, C. M.; Preiss, T. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 5023–5033.
- (30) Peisley, A.; Hur, S. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 1949–1963.
- (31) García, M. a.; Meurs, E. F.; Esteban, M. *Biochimie* **2007**, *89*, 799–811.
- (32) Nallagatla, S. R.; Hwang, J.; Toroney, R.; Zheng, X.; Cameron, C. E.; Bevilacqua, P. *C. Science* **2007**, *318*, 1455–1458.
- (33) Zheng, X.; Bevilacqua, P. C. *RNA* **2004**, *10*, 1934–1945.
- (34) Karikó, K.; Muramatsu, H.; Welsh, F. a.; Ludwig, J.; Kato, H.; Akira, S.; Weissman, D. *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 1833–1840.
- (35) Anderson, B. R.; Muramatsu, H.; Nallagatla, S. R.; Bevilacqua, P. C.; Sansing, L. H.; Weissman, D.; Karikó, K. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 5884–5892.
- (36) Symons, J. a.; Alcamí, a; Smith, G. L. *Cell* **1995**, *81*, 551–560.
- (37) Colamonici, O. R.; Domanski, P.; Sweitzer, S. M.; Larner, A.; Buller, R. M. L. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 15974–15978.
- (38) Warren, L.; Manos, P. D.; Ahfeldt, T.; Loh, Y. H.; Li, H.; Lau, F.; Ebina, W.; Mandal, P. K.; Smith, Z. D.; Meissner, A.; Daley, G. Q.; Brack, A. S.; Collins, J. J.; Cowan, C.; Schlaeger, T. M.; Rossi, D. J. *Cell Stem Cell* **2010**, *7*, 618–630.
- (39) Gu, G.; Brown, J. R.; Melton, D. A. *Mech. Dev.* **2003**, *120*, 35–43.
- (40) Wilson, M. E.; Scheel, D.; German, M. S. *Mech. Dev.* **2003**, *120*, 65–80.
- (41) Gittes, G. K. *Dev. Biol.* **2009**, *326*, 4–35.
- (42) Arda, H. E.; Benitez, C. M.; Kim, S. K. *Dev. Cell* **2013**, *25*, 5–13.
- (43) Karlsson, O.; Thor, S.; Norberg, T.; Ohlsson, H.; Edlund, T. *Nature* **1990**, *344*, 879–

- (44) Naya, F. J.; Stellrecht, C. M. M.; Tsai, M.-J. *Genes Dev.* **1995**, *9*, 1009–1019.
- (45) Ohlsson, H.; Karlsson, K.; Edlund, T. *EMBO J.* **1993**, *12*, 4251–4259.
- (46) Buckley, K.; Kelly, R. B. *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 1284–1294.
- (47) Teitelman, G.; Alpert, S.; Polak, J. M.; Martinez, A.; Hanahan, D. *Development* **1993**, *118*, 1031–1039.
- (48) Mansouri, A.; Hallonetl, M.; Gruss, P. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 851–857.
- (49) Sander, M.; Sussel, L.; Connors, J.; Scheel, D.; Kalamaras, J.; Cruz, F. Dela; Schwitzgebel, V.; Hayes-Jordan, A.; German, M. *Development* **2000**, *127*, 5533–5540.
- (50) Grawohl, G.; Dierich, A.; LeMeur, M.; Guillemot, F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 1607–1611.
- (51) Naya, F. J.; Huang, H.; Qiu, Y.; Mutoh, H.; Demayo, F. J.; Leiter, A. B.; Tsai, M. *Genes Dev.* **1997**, 2323–2334.
- (52) Meulen, T. Van Der; Huising, M. O. *J. Mol. Endocrinol.* **2015**, *54*, 103–117.
- (53) Johnson, J. D.; Ahmed, N. T.; Luciani, D. S.; Han, Z.; Tran, H.; Fujita, J.; Mislser, S.; Edlund, H.; Polonsky, K. S. *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, 1147–1160.
- (54) Wu, K.-L.; Gannon, M.; Peshavaria, M.; Offield, M. F.; Henderson, E. V. A.; Ray, M.; Marks, A.; Gamer, L. W.; Wright, C. V. E.; Stein, R. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 6002–6013.
- (55) Ben-shushan, E.; Marshak, S.; Shoshkes, M.; Cerasi, E.; Melloul, D. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 17533–17540.
- (56) Baeyens, L.; Bonn e, S.; Bos, T.; Rooman, I.; Peleman, C.; Lahoutte, T.; German, M.; Heimberg, H.; Bouwens, L. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 1750–1760.
- (57) Swales, N.; Martens, G. a.; Bonn e, S.; Heremans, Y.; Borup, R.; van de Castele, M.; Ling, Z.; Pipeleers, D.; Ravassard, P.; Nielsen, F.; Ferrer, J.; Heimberg, H. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–11.
- (58) Shieh, S.; Tsais, M. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 16708–16714.
- (59) Kataoka, K.; Shioda, S.; Ando, K.; Sakagami, K.; Handa, H.; Yasuda, K. *J. Mol. Endocrinol.* **2003**, *32*, 9–20.
- (60) Aramata, S.; Han, S.; Yasuda, K.; Kataoka, K. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1730*, 41–46.

- (61) Zhao, L.; Guo, M.; Matsuoka, T.; Hagman, D. K.; Parazzoli, S. D.; Poitout, V. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 11887–11894.
- (62) Matsuoka, T.; Kaneto, H.; Stein, R.; Miyatsuka, T.; Kawamori, D.; Henderson, E.; Kojima, I.; Matsuhisa, M.; Hori, M.; Yamasaki, Y. *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21*, 2764–2774.
- (63) Aramata, S.; Han, S.; Kataoka, K. *Endocr. J.* **2007**, *54*, 659–666.
- (64) Waddington, C. H. *The strategy of the genes*; George Allen & Unwin Ltd.: London, 1957.
- (65) Zhou, Q.; Melton, D. a. *Cell Stem Cell* **2008**, *3*, 382–388.
- (66) Takahashi, K.; Yamanaka, S. *Cell* **2006**, *2*, 663–676.
- (67) http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/yamanaka-facts.html ke dni 25.7.2015
- (68) Gurdon, J. B.; Melton, D. a. *Science* **2008**, *322*, 1811–1815.
- (69) Zhou, Q.; Brown, J.; Kanarek, A.; Rajagopal, J.; Melton, D. a. *Nature* **2008**, *455*, 627–632.
- (70) http://mvz.berkeley.edu/egl/inserts/Big_Dye_v3.1_Protocol_Manual.pdf ke dni 15.5.2015
- (71) <http://www.trilinkbiotech.com/cart/Scripts/prodView.asp?idproduct=4912> ke dni 16.7.2015
- (72) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> ke dni 3.8.2015
- (73) Stephen, S. L.; Al-dhalimy, M.; Kestler, H. A.; Finegold, M.; Grompe, M.; Kochanek, S. *J. Virol.* **2010**, *84*, 9987–9994.
- (74) Lee, J.; Sugiyama, T.; Liu, Y.; Wang, J.; Gu, X.; Lei, J.; Markmann, J. F.; Miyazaki, S.; Miyazaki, J. I.; Szot, G. L.; Bottino, R.; Kim, S. K. *Elife* **2013**, *2013*, 1–22.
- (75) Jiang, Y.; Xu, X.-S.; Russell, J. E. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 2419–2429.
- (76) Russell, J. E.; Information, S. A. L.; Society, A.; Dc, W.; Society, T. A. *Blood* **2012**, *87*, 5314–5323.
- (77) Triana-Alonso, F. J.; Dabrowski, M.; Wadzack, J.; Nierhaus, K. H. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 6298–6307.
- (78) Sano, H.; Feix, G. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *71*, 577–583.
- (79) Karikó, K.; Buckstein, M.; Ni, H.; Weissman, D. *Immunity* **2005**, *23*, 165–175.

- (80) Karikó, K.; Muramatsu, H.; Ludwig, J.; Weissman, D. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1–10.
- (81) Karikó, K.; Muramatsu, H.; Keller, J. M.; Weissman, D. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 948–953.
- (82) Beattie, G. M.; Cirulli, V.; Lopez, A. D.; Hayek, A. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, *82*, 1852–1856.
- (83) Christman, J. K. *Oncogene* **2002**, *21*, 5483–5495.
- (84) Ashcroft, F. M. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 2047–2058.
- (85) Davidson, H. W. *Cell Biochem. Biophys.* **2004**, *40*, 143–158.
- (86) Collombat, P.; Mansouri, A.; Hecksher-Sørensen, J.; Serup, P.; Krull, J.; Gradwohl, G.; Gruss, P. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 2591–2603.
- (87) Blum, B.; Hrvatin, S.; Schuetz, C.; Bonal, C.; Rezanian, A.; Melton, D. a. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 261–264.