



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Anežka Vacková

Termodynamika tvorby komplexů miRNA

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná fyzika

Praha 2019

Ráda bych tímto poděkovala prof. RNDr. Josefu Štěpánkovi, CSc. za skvělé vedení bakalářské práce, RNDr. Kateřině Hofbauerové, Ph.D. za podnětné rady při psaní práce i v laboratoři a celému Oddělení fyziky biomolekul FÚUK za přátelskou atmosféru. Též bych chtěla vyjádřit díky své rodině a přátelům za podporu nejen při psaní práce, ale i v průběhu celého studia.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne

Anežka Vacková

Název práce: Termodynamika tvorby komplexů miRNA

Autor: Anežka Vacková

Katedra / Ústav: Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc., Fyzikální ústav
Univerzity Karlovy

Abstrakt:

Práce se týká mikroRNA (miRNA), což jsou krátké řetězce RNA, které svou vazbou na cílovou mRNA molekulu regulují expresi genetické informace. Vzniklé komplexy miRNA a mRNA mají zpravidla podobu neúplného duplexu, kde jsou krátké úseky Watson-Crickových bázevých párů přerušovány vnitřními smyčkami, nekomplementárními páry nebo výdutěmi.

Obsahem práce je studium vlivu anomálních strukturních útvarů, vnitřní smyčky a výdutě, na strukturní stabilitu komplexu tvořeného miRNA označované *Let7* s jejím cílovým úsekem *LCSI* na mRNA *lin-41* z *Caenorhabditis elegans*.

Řešení práce spočívalo ve změření teplotních závislostí UV absorpčních spekter směsných roztoků výše uvedených RNA sekvencí a jejich mutovaných analog a v analýze spektrálních změn pomocí metody singulárního rozkladu a následným fitováním s použitím termodynamického modelu. Výsledkem jsou určené termodynamické charakteristiky komplexů a spektrální změny spojené se zvýšením teploty komplexu a s jeho rozpadem.

Klíčová slova: RNA, miRNA, UV absorpce, tání nukleových kyselin

Title: Thermodynamics of complex formation by miRNA

Author: Anežka Vacková

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc., Institute of Physics of Charles University

Abstract:

The bachelor thesis concerns microRNA (miRNA), short RNA molecules that mediate post-transcriptional regulation of gene expression by binding to a target mRNA. They usually form extended duplexes consisted of short tracks of Watson-Crick basepairs separated by internal loops, mismatched pairs, or bulges.

The thesis represents a study of the effect of structural anomalies, the internal loop and the bulge, on the structural stability miRNA *Let7* complex with its target *LCSI* sequence at mRNA *lin-41* from *Caenorhabditis Elegans*.

The task was solved by recording temperature dependent UV absorption spectra of solutions containing mixtures of the mentioned above RNA sequences and their mutated analogs, analysis of the spectral changes by using a singular decomposition method followed by fitting to a thermodynamic model. The determined thermodynamic characteristics of the complexes and spectral changes caused by a temperature increase or the complex dissociation are the outcome of the work.

Keywords: RNA, miRNA, UV absorption, melting of nucleic acid

Obsah

Úvod.....	1
1 Nukleové kyseliny.....	3
1.1 Struktura DNA a RNA.....	3
1.2 Genová exprese.....	5
2 MikroRNA.....	7
2.1 Historie objevu miRNA.....	7
2.2 Názvosloví.....	7
2.3 Biosyntéza.....	8
2.4 Regulace genové exprese.....	9
2.5 Rozdělení miRNA.....	10
2.6 Let-7.....	10
3 Spektroskopie.....	13
3.1 Molekulární optická spektroskopie.....	13
3.2 Spektrum elektromagnetického záření.....	13
3.3 Absorpční spektroskopie.....	13
3.4 Hyperchromní efekt.....	14
3.5 Absorpční spektrometr.....	15
4 Metody zpracování dat.....	17
4.1 Faktorová analýza.....	17
4.2 Termodynamický model.....	18
5 Popis experimentu.....	21
5.1 Vzorky oligonukleotidů.....	21
5.2 Odblokování a odsolení vzorků.....	22
5.3 Měření UV spekter.....	23
6 Výsledky UV spektroskopie.....	26

6.1	Zpracování UV spekter	26
6.2	Výsledky samostatných oligonukleotidů	28
6.3	Výsledky směsí	34
7	Diskuze výsledků	43
7.1	Samostatné oligonukleotidy	43
7.2	Směsi oligonukleotidů.....	43
	Závěr	46
	Seznam použité literatury	48
	Seznam použitých zkratk.....	51

Úvod

MikroRNA (miRNA) jsou speciální krátké řetězce RNA, které svou vazbou na cílovou mRNA molekulu regulují expresi genetické informace na stupni translace. Vzhledem k této své funkci jsou považovány za významnou součást buněčných procesů, a to i z hlediska diagnostických či terapeutických aplikací. Proto jsou řetězce miRNA již od svého objevení a popisu v 90. letech cílem mnoha biolékařských výzkumů. Neméně důležitý je však i výzkum zaměřený na fyzikálně-chemické vlastnosti tvorby komplexů miRNA a mRNA. Tyto komplexy mají totiž zpravidla podobu neúplného duplexu, kde jsou krátké úseky Watson-Crickových báзовých párů přerušovány vnitřními smyčkami, nekomplementárními páry nebo výdutěmi. Studium termodynamické stability komplexů umožňuje dosáhnout nejen hlubšího pochopení vlivu strukturního uspořádání komplexu na jeho stabilitu, ale přináší i nové informace o celkovém mechanismu tvorby těchto vazeb.

Náplní práce bylo studium vlivu anomálních strukturních útvarů na strukturní stabilitu komplexu tvořeného miRNA označované *Let7* s jejím cílovým úsekem *LCSI* na mRNA *lin-41* z *Caenorhabditis elegans* s cílem rozšířit a kompletovat současné výsledky studia interakce. *Let7* a *LCSI* spolu vytvářejí neúplný duplex, který kromě 17 komplementárních párů obsahuje vnitřní smyčku a výduť. Řešení práce se opírá o změření teplotních závislostí UV absorpčních spekter směsných roztoků těchto RNA sekvencí a jejich mutovaných analog a o podrobnou analýzu teplotně indukovaných spektrálních změn.

Samotná práce začíná teoretickými kapitolami (první až čtvrtá) věnovanými nukleovým kyselinám, zejména miRNA a její roli v regulaci genové exprese, a dále vztahům důležitým pro popis interakce látky s optickým zářením a metodami zpracování experimentálních dat.

Výsledkům experimentální práce a jejich následné diskuzi se věnují kapitoly pět až sedm. Jsou zde popsány detaily přípravy vzorků a prováděných měření; dále jsou uvedené výsledky měření teplotních závislostí UV absorpce samostatných RNA vláken a jejich směsí analyzované pomocí metody singulárního rozkladu. Výsledky měření směsí byly následně vyhodnoceny fitováním naměřených dat pomocí termodynamického modelu, což umožnilo určit termodynamické parametry charakterizující jednotlivé komplexy, spektrální změny způsobené rozpadem

komplexu i změny ve spektru komplexu vyvolané zvýšením teploty. Tyto výsledky jsou diskutovány společně s výsledky dosaženými v rámci nedávno obhájené diplomové práce, jež tato práce doplňuje.

1 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou dlouhé, nevětvené polymery sestávající z monomerních jednotek, nukleotidů, vzájemně navázaných kovalentními fosfodiesterovými vazbami. Jsou zodpovědné za uchování a přenos dědičné informace a umožňují produkovat funkční biomolekuly. V živých organismech se vyskytují dva typy nukleových kyselin s rozdílným chemickým složením: deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a ribonukleové kyseliny (RNA) (Bruce et al. 2002).

1.1 Struktura DNA a RNA

Při dělení buňky dochází k přenosu genetické informace do dceřiných buněk. Nositelem dědičné informace je molekula DNA uvnitř jádra buňky. DNA je nezbytná pro vývoj organismu a je schopna přesné replikace (Bruce et al. 2002; Saenger 1984).

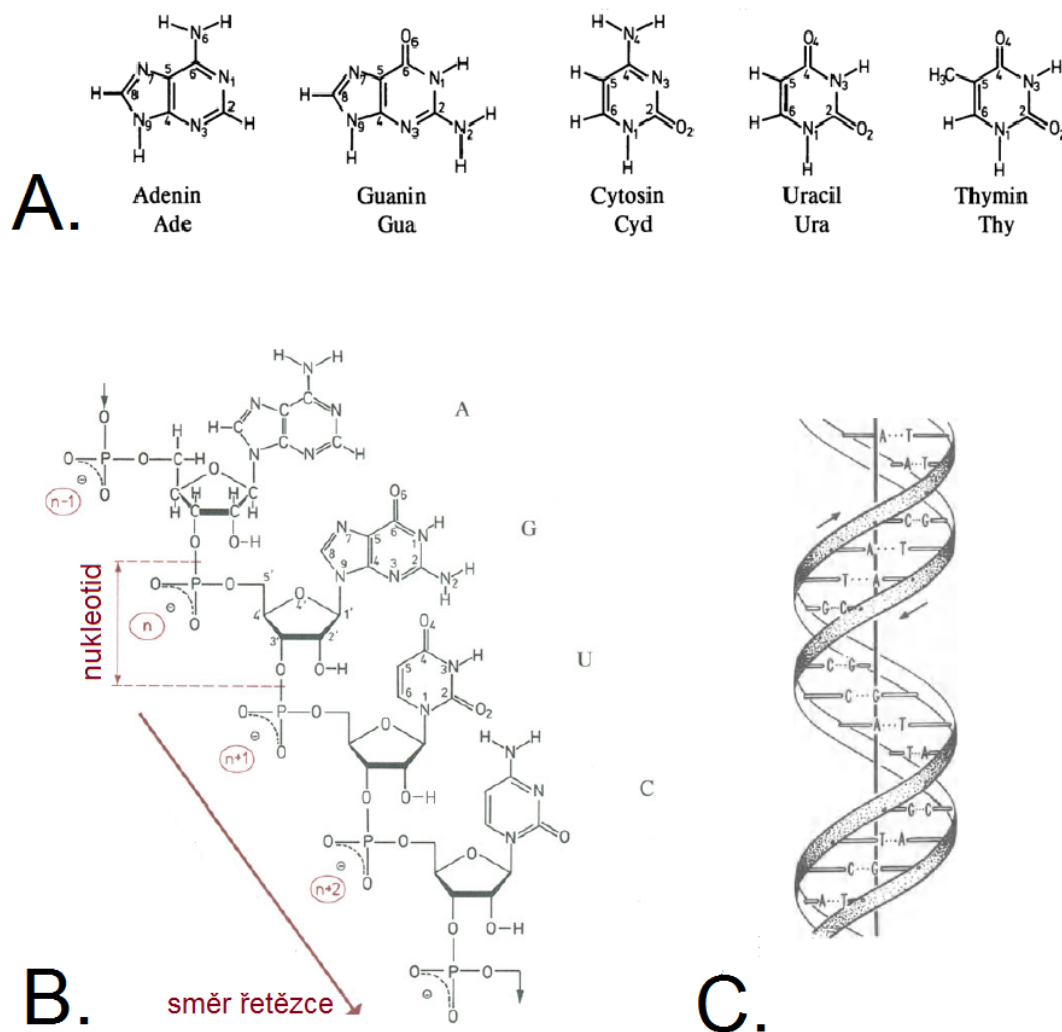
DNA je tvořena dvěma vlákny tvaru šroubovice, obě vlákna se stáčí kolem stejné osy a jsou vzájemně opačně orientovaná. Každé vlákno je tvořeno sekvencí nukleosidů propojených fosfodiesterovou vazbou na 3' a 5' uhlíku cukru β -D-deoxyribosy. Nukleosid je kromě cukerné složky s furanosovou cyklickou strukturou tvořen ještě dusíkatou bází, přičemž u DNA se báze orientují dovnitř vlákna a fosfáty společně s cukrem vytváří vnější cukr-fosfátovou kostru (Watson, Crick 1953).

K udržení dvoušroubovicové struktury dochází díky interakcím mezi dusíkatými bázemi. Báze mají planární strukturu a jejich vzájemné interakce jsou vlivem vodíkových můstků velmi specifické – dochází ke komplementárnímu párování bází a to vždy mezi purinovou a pyrimidinovou bází. V DNA se majoritně vyskytují čtyři báze, deriváty purinu adenin (A), guanin (G) a deriváty pyrimidinu cytosin (C), thymin (T). K párování dochází mezi A, T a mezi G, C. Vlivem párování je vždy v dané dvoušroubovicové struktuře DNA zachován poměr komplementárních bází, zároveň je sekvencí bází jednoho řetězce určena sekvence na řetězci druhém, což tvoří základní princip mechanismu pro přenos genetické informace (Watson, Crick 1953).

RNA se od DNA liší jak primární strukturou, kdy cukernou složkou RNA je ribosa a namísto thyminu se mezi její dusíkaté báze řadí uracil (U), tak strukturou sekundární. RNA se nejčastěji vyskytuje ve formě jednoduchého vlákna, které může navazovat samo na sebe a vytvářet tak různé smyčky, vlásenky a výdutě. Délka RNA je mnohem kratší než DNA. Funkce RNA spočívá zejména v genové expresi, kdy mRNA (messenger RNA) z jaderné DNA přenáší informaci o struktuře proteinů, rRNA

(ribozomální RNA) se účastní tvorby ribozomů, kde dochází k syntéze proteinů, a samotný vznik proteinu v ribozomech přikládáním aminokyselin řídí tRNA (transferová RNA). Neméně významný je podíl RNA na regulacích translací (Bruce et al. 2002; Saenger 1984).

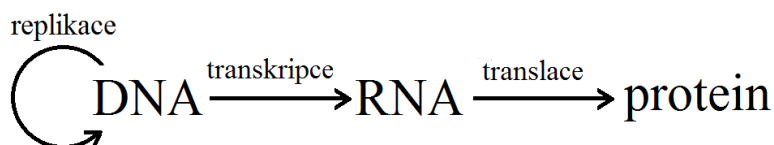
Chemickou strukturu dusíkatých bází, sekvenci RNA nukleotidů a schéma dvoušroubovicové struktury DNA uvádíme na obr. 1.



Obrázek 1. A. Dusíkaté báze – adenin (A), guanin (G), cytosin (C), uracil (U), thymin (T); B. Část RNA, kde je sekvence dusíkatých bází A, G, U, C navázána na 1' uhlík ribosy. Ribosy jsou vzájemně propojeny fosfodiesterovými vazbami na 5' a 3' uhlíku cukru. Směr vzniklého řetězce od 5' k 3' konci ukazuje šipka; C. Schéma struktury DNA dvoušroubovice. Vyznačena je opačná orientace vláken, jež se stáčí kolem společné osy. Vně dvoušroubovice je cukr-fosfátová kostra, uvnitř dochází k párování bází A-T a C-G. Upraveno dle (Saenger 1984).

1.2 Genová exprese

Část DNA, jež kóduje určitý protein, se nazývá gen. Přesun genetické informace z genu jaderné DNA do ribozomu zakončený syntézou proteinů nazýváme genovou expresí. Tento proces má dva stupně – transkripci a translaci. Průběh genové exprese popisuje centrální dogma molekulární biologie, jehož schéma uvádíme na obr. 2.



Obrázek 2. Centrální dogma molekulární biologie

Transkripce je děj, při kterém je enzymem RNA polymerasou nasyntetizováno RNA vlákno komplementární k příslušnému úseku v kódujícím vlákně DNA, tzv. primární transkript. V eukaryotních buňkách prochází transkript procesem zrání a jádro buňky opouští až zralá, maturovaná forma, tzv. messenger RNA (mRNA) (Bruce et al. 2002).

Proces, při kterém je využívána informace z mRNA k syntéze proteinů, nazýváme translaci. Translace probíhá v ribozomech. Pomocí tRNA dochází k přepisu sekvence nukleotidů na sekvenci aminokyselin (Bruce et al. 2002).

Nukleotidy v mRNA jsou čteny po trojicích zvaných kodony, přičemž každý kodon odpovídá určité aminokyselině. Pro čtyři možné dusíkaté báze existuje celkem 64 možných kodonů. Kódovaných aminokyselin je 20, z čehož vyplývá, že jednu aminokyselinu může kódovat více kodonů. K přepisu nukleotidů na sekvenci aminokyselin dochází navázáním tRNA na kodony v mRNA, kdy na jedné části tRNA je navázána aminokyselina a na jiné části je tzv. antikodon, který je komplementární k příslušnému kodonu. Jednotlivé aminokyseliny jsou navazovány na konec vznikajícího polypeptidového řetězce. Syntéza proteinu končí po navázání posledního, tzv. stop kodonu (Bruce et al. 2002). Schéma kodonů tvořených trojicí nukleotidů a jim odpovídající aminokyseliny uvádíme na obr. 3.

K přenosu dědičné informace při vzniku nových buněk dochází replikací dvoušroubovice DNA. Replikace začíná lokální separací dvou jejích komplementárních vláken, kdy obě oddělená vlákna jsou zdrojem stejné informace pro nově vznikající komplementární sekvenci. Z původní DNA dvoušroubovice tak vznikají dvě identické dceřiné DNA dvoušroubovice (Bruce et al. 2002).

		druhý nukleotid				
		U	C	A	G	
první nukleotid	U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
		Phe	Ser	Tyr	Cys	C
		Leu	Ser	STOP	STOP	A
		Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U	
	Leu	Pro	His	Arg	C	
	Leu	Pro	Gln	Arg	A	
	Leu	Pro	Gln	Arg	G	
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U	
	Ile	Thr	Asn	Ser	C	
	Ile	Thr	Lys	Arg	A	
	Met	Thr	Lys	Arg	G	
G	Val	Ala	Asp	Gly	U	
	Val	Ala	Asp	Gly	C	
	Val	Ala	Glu	Gly	A	
	Val	Ala	Glu	Gly	G	

Obrázek 3. Tabulka trojic nukleotidů kódujících aminokyseliny. Pro každou aminokyselinu je určující pořadí nukleotidů. Syntetizovaný protein začíná vždy kodonem AUG pro methionin (Met) a končí jedním ze tří stop kodonů. Kódování probíhá směrem od 5' k 3' konci mRNA. Upraveno dle (Voet et al. 1995).

2 MikroRNA

MikroRNA (zkráceně miRNA) jsou krátké jednovláknové řetězce nekódující RNA, které prostřednictvím vazby na cílovou mRNA post-transkripčně regulují genovou expresi, a tak se účastní řady fyziologických procesů důležitých pro vývoj organismu, od rostlin až po živočichy včetně člověka. Odhaduje se, že v lidském genomu je využitím miRNA regulováno přes 60% genů kódujících proteiny (Catalanotto et al. 2016). Taktéž byla popsána miRNA jako signální molekula, jejíž funkcí je zprostředkovávání mezibuněčné komunikace. Rovněž byla nalezena přímá souvislost mezi nesprávnou expresí miRNA a patologickými onemocněními, např. svalovou dystrofií, diabetem či mnoha typy rakoviny, z čehož vyplývá využití miRNA jako potenciálního biomarkeru onemocnění (Catalanotto et al. 2016; O'Brien et al. 2018).

2.1 Historie objevu miRNA

miRNA byla poprvé popsána v 90. letech týmy V. Ambrose a G. Ruvkuna, jež sledovaly geny *lin-4* a *lin-14* u modelového organismu *Caenorhabditis elegans* (hád'átka obecné). Oba uvedené geny se podílejí na regulaci přechodu vývojových stádií *C. elegans*, a to tak, že gen *lin-4* produkuje krátké nekódující RNA řetězce, které vazbou na gen *lin-14* zabrání jeho translaci v protein (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993). V roce 2000 byl popsán další typ miRNA, *let-7*, jež se vazbou na mRNA *lin-41* podílí na vývoji organismu nejen u *C. elegans*, ale i u dalších druhů organismů včetně člověka (Reinhart et al. 2000; Paquinelli et al. 2000). Od té doby bylo objeveno a popsáno velké množství miRNA v různých organismech. V současnosti, v poslední verzi 22.1 vydané v říjnu 2018, databáze *miRBase* (Griffiths-Jones et al. 2006), shromažďující všechny publikované miRNA sekvence, obsahuje pro 271 druhů organismů 38 589 vlásenkových prekurzorů a 48 860 maturovaných miRNA, z toho 1917 prekurzorů a 2564 maturovaných sekvencí náleží člověku (Kozomara et al. 2019).

2.2 Názvosloví

Systematické názvosloví, jež je mimo jiné dodržováno i databází *miRBase*, bylo ustanoveno téměř na počátku existence tohoto oboru a jedinou výjimku

v pojmenování tvoří z historických důvodů miRNA *lin-4*, *-14*, *-41* a *let-7*. Názvosloví má tři části – předponu, vnitřní část a číselnou příponu.

Třípísmenná předpona vyjadřuje druh organismu, např. *hsa* pro *Homo sapiens* či *cel* u *C. elegans*, vnitřní část určuje, zda se jedná o maturovanou formu, kdy nabývá tvaru *miR*, nebo o formu prekurzoru, potom je používán tvar *mir*. Velikost číselné přípony zpravidla odpovídá pořadí objevení a popisu, tedy např. po objevení a popisu *miR-129* bude následovat *miR-130*, přičemž v případě existence dvou sekvencí z jednoho prekurzoru přiřazujeme k číselné příponě ještě koncovku tvaru *-5p* nebo *-3p*, podle toho, z kterého konce prekurzoru maturovaná forma pochází. U číselné přípony dále rozlišujeme ortologní, paralogní sekvence a stejné sekvence maturované miRNA pocházející z různého prekurzoru (Griffiths-Jones 2004).

Ortologní sekvence jsou takové, jež mají velmi podobný nebo stejný tvar, ale pochází z různých druhů organismů. Dle pravidel názvosloví jim přiřazujeme stejné číslo, např. miRNA *hsa-miR-101* u člověka a *mmu-miR-101* u myši. Pokud jsou sekvence velmi podobné a v rámci jednoho druhu se liší v jedné nebo dvou pozicích, říkáme, že tyto sekvence jsou paralogní, a tuto vlastnost rozlišujeme malým písmenem za číselnou příponou, např. *mmu-miR-10a* a *mmu-miR-10b*. Číselnou koncovkou tvaru *dme-mir-281-1* a *dme-mir-281-2* u *Drosophila melanogaster* (octomilka obecná) rozlišujeme různý prekurzor, který vede ke stejné sekvenci maturované miRNA (Griffiths-Jones 2004).

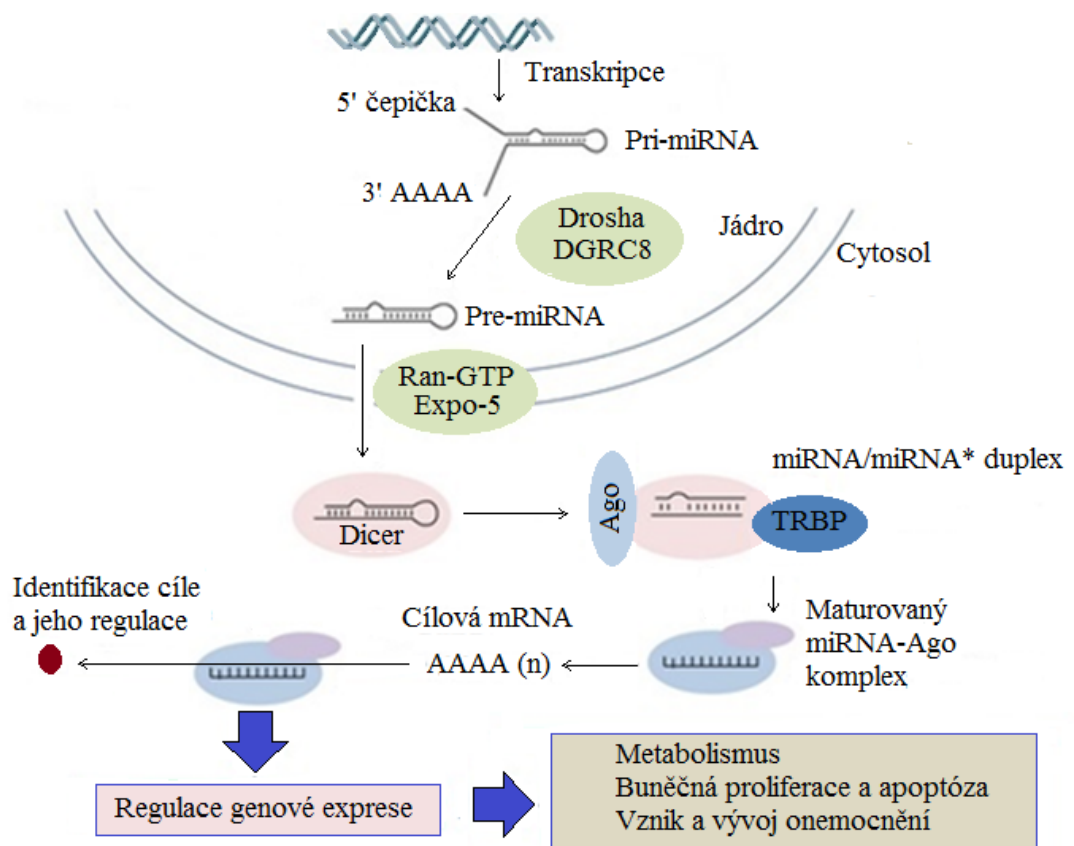
Popsané názvosloví je platné u živočichů a člověka, v případě miRNA u rostlin a virů dochází k mírným odlišnostem, např. ve velikosti písmen ve vnitřní části názvu (Griffiths-Jones 2004).

2.3 Biosyntéza

miRNA je kódována z DNA sekvencí RNA polymerázou II/III do formy primárních transkriptů, pri-miRNA, jež jsou dále štěpeny do forem prekurzorů, pre-miRNA, obsahujících kolem 70 nukleotidů uspořádaných do vlásenkové struktury (Catalanotto et al. 2016). Štěpení probíhá v buněčném jádře za účasti proteinu DGCR8 vázajícího se na dvouvláknovou RNA a enzymu ribonukleázy III Drosha, jež jsou součástí většího proteinového komplexu, tzv. „microprocessor complex“. Následuje přesun do cytoplasmy vyvolaný proteinem exportinem 5 za účasti proteinového komplexu Ran-GTP, odštěpení vlásenky endonukleázou Dicer a vznik zralé,

maturované miRNA o délce asi 22 nukleotidů. Tato miRNA je dvouvláknová. Jedno z vláken, tzv. „guide“, nově vzniklého duplexu za interakce se skupinou proteinů z rodiny Ago (Argonaut) formuje miRNA-proteinový komplex, RISC („RNA-induced silencing complex“), zatímco druhé vlákno, tzv. „passenger“, je eliminováno. Takovýto průběh biosyntézy miRNA nazýváme kanonický a vzhledem k ostatním možným biosyntézám je dominantním procesem (O’Brien et al. 2018). Průběh kanonické biosyntézy a následné genové exprese přibližuje schéma na obr. 4.

K nekanonické biosyntéze miRNA dochází v mnohem menší míře, v podstatě se jedná o záměnu pořadí proteinů Drosha, Dicer, exportin 5 a Ago účastnících se kanonické biosyntézy (O’Brien et al. 2018).



Obrázek 4. Biosyntéza a genová exprese miRNA, upraveno dle (Hirabara et al. 2012)

2.4 Regulace genové exprese

K regulaci genové exprese dochází navázáním miRNA-proteinového komplexu RISC prostřednictvím vlákna miRNA na cílovou mRNA. Mechanismy, díky nimž

tento proces může nastat, jsou různorodé a silně závislé na míře komplementarity mezi bázemi miRNA a mRNA (O'Brien et al. 2018).

Pokud je vazba miRNA na mRNA téměř komplementární, což nastává zpravidla u buněk rostlinného původu, dochází k odštěpení mRNA pomocí Ago proteinu z RISC komplexu a její následné degradaci. Jestliže vazba miRNA:mRNA obsahuje výdutě, vnitřní smyčky či nespárované báze, a tedy není zcela komplementární, pak je štěpení mRNA zabráněno a je nahrazeno inhibicí translace mRNA. Zprostředkovatelem tohoto procesu, dominantnějšího u živočišných buněk, je opět komplex RISC, který se prostřednictvím miRNA naváže na oblast 3'UTR („untranslated region“) mRNA vlákna (Humphreys et al. 2008).

2.5 Rozdělení miRNA

Uspořádání miRNA do rozdílných skupin, tzv. miRNA rodin, je prováděno na základě maturovaných miRNA, jejich sekvence či struktury pre-miRNA. V rámci jedné rodiny může být zachována jak celková sekvence maturované miRNA, tak pouze tzv. „seed region“, který je situován na pozici 2. - 8. nukleotidu maturované miRNA. Taktéž byla popsána souvislost mezi miRNA náležející k jedné rodině a jejich lokalizaci kolem genů zapojených do infekčního, imunitního i sensorického systému či patologických onemocnění, takže je zjevné, že miRNA z jedné rodiny zastávají podobnou funkci v rozdílných biologických procesech napříč všemi druhy organismů (Kamanu et al. 2013).

2.6 Let-7

Let-7 patří mezi nejvýraznější miRNA rodiny, poprvé byla popsána u modelového organismu *C. elegans* v souvislosti s jeho vývojovými stádii. V současnosti (tj. k říjnu 2018) databáze *miRBase* uvádí 401 sekvencí náležejících do této rodiny napříč všemi druhy, u člověka je jich popsáno 12 – *let-7a-1*, *7a-2*, *7a-3*, *7b*, *7c*, *7d*, *7e*, *7f-1*, *7f-2*, *7g*, *7i* a *miR-98* (Griffiths-Jones et al. 2006).

Rodina *let-7* se podílí na regulaci mnoha buněčných procesů a je spojena s proliferací a diferenciací buněk, účastní se např. embryonálního či mozkového vývoje, kde prokazatelně dochází k nárůstu exprese *let-7* (Boyerinas et al. 2010; Wang et al. 2012). Klasický a dominantní mechanismus, kterým *let-7* reguluje expresi, je dán jeho navázáním na 3'UTR cílové mRNA, což způsobuje inhibici translace nebo degradaci mRNA (Boyerinas et al. 2010; Humphreys et al. 2008).

V mnoha výzkumech bylo poukázáno na spojitost nesprávné regulace *let-7* s výskytem a vývojem rakoviny (Wang et al. 2012), exprese *let-7* je v případě výskytu a vývoje rakovinných buněk vzhledem ke zdravým buňkám ve většině případů snížena. Byla popsána spojitost mezi nízkou hladinou některého ze členů *let-7* rodiny a typem rakoviny, např. snížení *hsa-let-7a* souvisí s vývojem rakoviny prsu, plic, melanomu či pankreatu (Boyerinas et al. 2010). *Let-7* se tedy účastní buněčné diferenciace a proliferace nejen u zdravých, ale i rakovinných buněk, jejichž vznik a rozvoj zpravidla inhibuje, proto je považována za nádorový supresor (Wang et al. 2012). K inhibici dochází navázáním *let-7* na cílovou mRNA onkogenů, kdy hlavním cílem miRNA *let-7* je onkogen RAS, jehož mutace stojí za vznikem mnoha druhů rakoviny, či např. onkogen HMGA2, zodpovědný za vznik nádorů během embryonálního vývoje. Roli *let-7* jako nádorového supresoru potvrzuje mimo jiné experiment, kdy byl růst nádoru plic u myši potlačen inhibicí RAS genu pomocí *let-7g* (Boyerinas et al. 2010; Wang et al. 2012).

Nicméně členy rodiny *let-7* nelze považovat za nádorový supresor za všech okolností, v některých případech výskytu rakoviny bylo pozorováno i zvýšení hladiny *let-7* v buňce. V současné době není známo, jakým způsobem k této rozdílné funkci *let-7* dochází, zda jednotliví členové rodiny mohou zastávat více funkcí v rámci jedné buňky, nebo je-li typ regulace a tedy i funkce *let-7* podřízena danému prostředí, takže se funkce jednotlivých *let-7* vyvíjí v závislosti na něm. Vzhledem ke spojitosti *let-7* se vznikem a vývojem nádorů a jejich suprese i k možnému zapojení do klinické praxe však nabývá znalost průběhu regulace *let-7* a jejich příčin na stále větším významu, proto je cílem stále většího počtu výzkumů (Boyerinas et al. 2010; Wang et al. 2012).

Změna v expresi miRNA *let-7* tedy způsobuje normální, ale i abnormální reakce, proto v buňce existují regulační cykly, jejichž úkolem je udržení stabilní hladiny *let-7* v buňce regulací v jednotlivých fázích její biosyntézy. Byly popsány dva proteiny Lin28 a Lin28B, jež blokovaly vývoj miRNA *let-7*. Na významnou spojitost těchto proteinů s *let-7* ukazuje i to, že jsou oba zapojeny do vývoje kmenových a zárodečných buněk včetně buněk nádorových, stejně jako členové rodiny *let-7* (Boyerinas et al. 2010; Wang et al. 2012).

Velký terapeutický potenciál *let-7* pro léčbu různých patologických onemocnění pramení také ze zjištění, že úbytek *let-7* zvyšuje rezistenci na určitá chemoterapeutická léčiva a ionizující záření, např. byla nalezena spojitost mezi expresí *let-7i* a citlivostí

či dokonce rezistencí na jistý druh chemoterapeutického léčiva, přičemž mechanismus tohoto procesu není přímo známý (Boyerinas et al. 2010).

Jak vyplývá z výše uvedeného, rodina miRNA *let-7* hraje významnou roli v celé řadě buněčných funkcí, což z ní činí nejen zajímavý předmět vědeckého výzkumu, ale i užitečný nástroj klinické praxe, takže si velkou pozornost udílenou z řad odborné veřejnosti jistě zaslouží.

3 Spektroskopie

3.1 Molekulární optická spektroskopie

Molekulární optická spektroskopie studuje závislost odezvy vzorku na spektrálním složení dopadajícího záření, čímž zkoumá strukturu energetických hladin molekul. Každá molekula je charakterizována konkrétním vibračním stavem, jenž je dán rozložením, pohybem a vzájemnými interakcemi mezi nabitými částicemi tvořícími molekulu. Při interakci s optickým zářením dochází k přechodům mezi vibračními stavy molekuly. Rozlišujeme tři základní druhy přechodů, absorpci, stimulovanou emisi a spontánní emisi, přičemž nejpravděpodobnější je takový přechod, při kterém se energie fotonu shoduje s energetickým rozdílem ΔE dvou stacionárních stavů molekuly, mezi nimiž k přechodu dochází:

$$\Delta E = E_1 - E_2, \quad (3.1)$$

kde E_1, E_2 jsou energie příslušející dvěma různým stacionárním stavům (Prosser et al. 1989).

3.2 Spektrum elektromagnetického záření

Energie fotonu souvisí s parametry elektromagnetického záření vztahem:

$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda}, \quad (3.2)$$

kde h je Planckova konstanta, c rychlost světla, ν frekvence a λ vlnová délka dopadajícího záření (Prosser et al. 1989).

Elektromagnetické spektrum zahrnuje elektromagnetické záření všech možných vlnových délek, přičemž pro absorpční spektroskopii je významné optické záření, které se dále dělí na infračervené záření (IR) s vlnovými délkami $800 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$, viditelné záření (VIS) v intervalu $400 - 800 \text{ nm}$ a ultrafialové záření (UV) v rozmezí $10 - 400 \text{ nm}$ (Voet et al. 1995).

3.3 Absorpční spektroskopie

Absorpce je takový děj, kdy dochází k přechodu molekuly z nižšího do vyššího stavu za ztráty energie procházející elektromagnetické vlny.

Při průchodu elektromagnetické vlny absorbujiacím prostředím dochází ke snížení její intenzity, velikost útlumu je charakterizována propustností (transmitancí) T , definovanou jako podíl propuštěného ϕ a dopadajícího ϕ_0 záření:

$$T = \frac{\phi}{\phi_0}. \quad (3.3)$$

Záporným logaritmem z propustnosti T definujeme absorbanci:

$$A = -\log T = \log \frac{\phi_0}{\phi}. \quad (3.4)$$

Absorbance A je přímo úměrná délce optické dráhy L , kterou záření musí v daném prostředí urazit, a počtu absorbujících molekul, který je u roztoků charakterizován molární koncentrací c látky:

$$A = \varepsilon c L. \quad (3.5)$$

ε je molární extinkční koeficient, což je veličina charakteristická pro danou molekulu.

Měření absorbance je nejpoužívanější metodou pro stanovení absorpčních spekter, která získáme vynesemím závislosti absorbance na vlnové délce záření. Každé absorpční spektrum přináší informace o rezonančních frekvencích a intenzitách absorpčních přechodů (Prosser et al. 1989).

Rozlišujeme dva druhy absorpční spektroskopie složitých molekul, elektronovou a vibrační, kdy na základě intervalu použitých vlnových délek dochází k různým druhům molekulárních přechodů. Pro elektronovou absorpční spektroskopii je využíváno záření z blízké IR, VIS nebo UV oblasti elektromagnetického spektra, vibrační absorpční spektroskopie je spojena s IR zářením (Prosser et al. 1989).

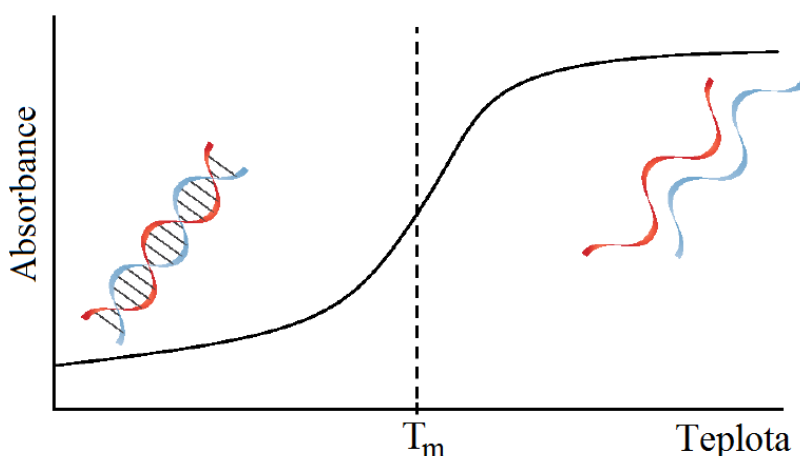
UV absorpční spektroskopie je velmi účinný nástroj pro pozorování strukturálních změn nukleových kyselin a vykazuje velkou citlivost na párování bází a hyperchromní efekt, proto patří mezi nejužívanější metody molekulární optické spektroskopie (Saenger 1984). Pro nukleové kyseliny nastává maximum absorpce při 260 nm (Voet et al. 1995). Molární extinkční koeficient nukleových kyselin je závislý nejen na teplotě, ale i sekvenci dané kyseliny či její konformaci (Prosser et al. 1989).

3.4 Hyperchromní efekt

Při zahřívání nukleových kyselin dochází k postupnému oddělování komplementárně navázaných vláken, až dojde k úplnému rozpadu dvouvláknové struktury. Denaturace, jak tento proces nazýváme, je velmi dobře pozorovatelná při sledování UV absorpčního spektra nukleových kyselin, protože vlivem denaturace prudce vzrůstá absorbance, jedná se o tzv. hyperchromní efekt (Voet et al. 1995).

Nárůst absorbance až o 40% nastává zejména přerušением elektrických interakcí mezi sousedními dusíkatými bázemi, nicméně ovlivňují ji i další faktory jako hydrofobní interakce, pořadí nukleotidů, druh použitého rozpouštědla či koncentrace a *pH* roztoku (Saenger 1984, Voet et al. 1995).

Denaturace nukleové kyseliny vykazuje podobné vlastnosti jako tání jednorozměrného tuhého tělesa, proto závislost absorbance na teplotě nazýváme křivkou tání. Schéma křivky tání uvádíme na obr. 5. Křivka tání obsahuje specifický bod, teplotu tání T_m („melting temperature“). Hodnota T_m odpovídá situaci, kdy je právě polovina z maximálního množství komplexů denaturována, a je tak charakteristická pro vyjádření stability dané nukleové kyseliny. Při postupném snižování teploty jsou denaturované nukleové kyseliny schopny renaturace, tedy opětovného spojování komplementárních vláken (Voet et al. 1995).



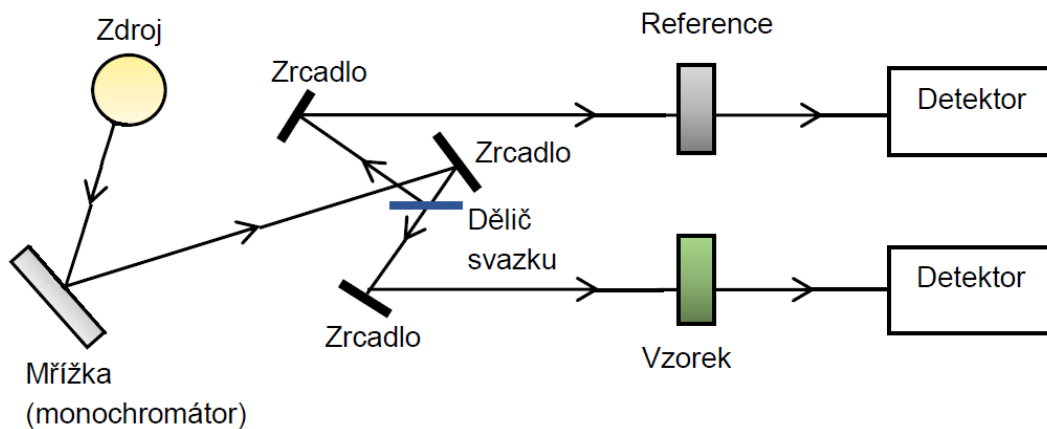
Obrázek 5. Křivka tání nukleové kyseliny s vyznačenou teplotou tání, upraveno dle (Homolka 2018)

3.5 Absorpční spektrometr

Jednotlivé absorpční spektrometry se mohou lišit počtem používaných paprsků, rozsahem vlnových délek či používanými detektory. Při našem měření jsme používali dvoupraskový UV/VIS spektrometr, proto se budeme dále zabývat právě jeho popisem.

Zdroj záření tvoří žárovka pro viditelné spektrum a deuteriová výbojka pro UV oblast, k následnému výběru záření vhodné vlnové délky dochází využitím mřížkového monochromátoru. Rozdělení paprsku na dvě části provede dělič paprsků, kdy je jedna část paprsku vedena do prostoru s kyvetou se vzorkem a druhá část na

referenční kyvetu. Po detekci prošlého záření je výstupní signál dále zpracováván počítačovým programem (Prosser et al. 1989). Schéma uspořádání používaného spektrometru uvádíme na obr. 6.



Obrázek 6. Schéma dvoupaprskového spektrometru, převzato z (Homolka 2018)

4 Metody zpracování dat

4.1 Faktorová analýza

Faktorová analýza (FA) je vícerozměrná statistická metoda, jejímž použitím dochází k redukci souboru experimentálních dat bez ztráty informace. Obecným úkolem FA je tedy nahrazení souboru náhodných veličin Y_1, \dots, Y_N menším souborem, přičemž nejjednodušší řešení tohoto úkolu je postupné vyhledávání nových náhodných veličin, jež by byly lineárními kombinacemi veličin původních a zároveň by vyčerpaly co největší část jejich variability. Takto nalezené náhodné veličiny nazýváme faktory (Anděl 1985, Řezáčová 2009).

Jednou ze základních matematických procedur FA je singulární rozklad (SVD), který umožňuje rozložení série $i = 1, \dots, N$ naměřených spekter $Y_i(\lambda_k)$, kde λ_k pro $k = 1, \dots, K$ jsou body daného spektra, do báze ortonormálních komponent $U_j(\lambda_k)$, kde $j = 1, \dots, N$. Komponenty $U_j(\lambda_k)$ nazýváme subspektra. Pro i -té naměřené spektrum $Y_i(\lambda_k)$ pak platí:

$$Y_i(\lambda_k) = \sum_{j=1}^N W_j V_{ij} U_j(\lambda_k), \quad (4.1)$$

kde W_j jsou singulární čísla jednotlivých subspekter a V_{ij} je unitární matice normalizovaných koeficientů. V_{ij} udává relativní zastoupení j -tého subspektra $U_j(\lambda_k)$ v i -tém naměřeném spektru $Y_i(\lambda_k)$ (Anděl 1985, Řezáčová 2009).

Každý prvek sumy (4.1) tvoří nezávislou část informace obsažené v dané sérii spekter, statistickou váhu této informace udává W_j . Singulární hodnoty W_j jsou upořádané sestupně:

$$W_\alpha < W_\beta; \beta < \alpha, \quad (4.2)$$

V_{ij} a $U_j(\lambda_k)$ splňují relace ortonormality:

$$\sum_{j=1}^N V_{ij} V_{im} = \delta_{jm}, \quad (4.3)$$

$$\sum_{j=1}^K U_j(\lambda_k) U_m(\lambda_k) = \delta_{jm}, \quad (4.4)$$

kde δ_{jm} je Kroneckerovo delta, pro které platí $\delta_{jm} = 0$, pokud $j \neq m$, a $\delta_{jm} = 1$ pro $j = m$.

Redukci dat provedeme omezením sumy (4.1) na $M < N$ členů:

$$Y_i(\lambda_k) \approx \sum_{j=1}^M W_j V_{ij} U_j(\lambda_k). \quad (4.5)$$

Tato aproximace nám umožňuje ze série spekter získat hlavní informační obsah za současného omezení šumu, takže docílíme snížení objemu dat bez ztráty důležitých informací (Anděl 1985, Řezáčová 2009).

Nejnižší hodnota M , která již umožňuje dostatečně přesně aproximovat naměřená spektra, protože se hodnoty na obou stranách rovnice (4.5) liší pouze o experimentální chybu, udává faktorovou dimenzi. K jejímu určení můžeme využít například závislost reziduální chyby σ_R :

$$\sigma_R = \sqrt{\frac{\sum_{j=M+1}^N W_j^2}{K(N-M)}}. \quad (4.6)$$

Faktorová dimenze analyzovaných dat by měla korespondovat s počtem nezávislých složek ve studovaném systému, lze ji odhadnout na základě poklesu posloupnosti singulárních hodnot či nárůstu šumu v subspektrech (Malinowski 1984, Řezáčová 2009).

4.2 Termodynamický model

Při zvyšování teploty dochází u komplexů nukleových kyselin k jejich tání, tedy k rozpadu dvouvláknových struktur na jednovláknové, přičemž stabilita komplexů je silně ovlivněna jejich strukturou. Vliv anomálních strukturních útvarů, stejně jako celý proces tání, se projeví v termodynamických parametrech komplexu za předpokladu, že můžeme zanedbat přítomnost částečně rozpadlých komplexů (tzv. yes-no model). Hodnoty charakteristických termodynamických parametrů pro daný komplex získáme analýzou naměřených dat aplikací vhodného termodynamického modelu.

Rozpad dvouvláknové struktury na jednovláknovou popisujeme:



kde ds („double strand“) označuje duplex, tvořený samostatnými vlákny („single strand“) ss_1 a ss_2 , na která se vlivem rostoucí teploty duplex rozpadá. K je rovnovážná asociační konstanta, jež lze vyjádřit poměrem:

$$K = \frac{C_{ds}}{C_{ss1} \cdot C_{ss2}}, \quad (4.8)$$

C_{ds} je aktuální koncentrace duplexů a C_{ss1} , C_{ss2} koncentrace volných vláken. Pokud předpokládáme, že komplex vzniká v molekulárním poměru 1:1, tedy že pro celkovou koncentraci samostatných oligonukleotidů platí rovnost $C_{ss1} = C_{ss2} = C_{ss}$, pak rovnovážnou asociační konstantu K vyjádříme:

$$K = \frac{C_{ds}}{C_{ss}^2}. \quad (4.9)$$

Uvážením celkové koncentrace jednoho typu vláken ve vzorku C_{vz} :

$$C_{vz} = C_{ss} + C_{ds}, \quad (4.10)$$

můžeme využitím vztahů (4.9) a (4.10) vyjádřit koncentrace C_{ss} a C_{ds} :

$$C_{ss} = \frac{\sqrt{1 + 4K \cdot C_{vz}} - 1}{2K}, \quad (4.11)$$

$$C_{ds} = C_{vz} + \frac{1 - \sqrt{1 + 4K \cdot C_{vz}}}{2K}. \quad (4.12)$$

Souvislost rovnovážné konstanty K s termodynamickými charakteristikami komplexu lze popsat van't Hoffovým vztahem:

$$K = \frac{1}{c_0} e^{-\frac{\Delta G}{RT}}, \quad (4.13)$$

kde $c_0 = 1 M$ je referenční koncentrace, R molární plynová konstanta, T absolutní teplota a ΔG změna Gibbsovy volné energie, kterou vyjadřujeme využitím Legendreovy transformace:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (4.14)$$

ΔH je změna entalpie a ΔS změna entropie při vzniku komplexu.

Využitím vztahů (4.11) – (4.14) a fitováním matice V_{ij} , určené z FA, dle vztahu:

$$V_{ij} = (a_j^0 + t_i \cdot a_j^1)C_{ds}(t_i) + (b_j^0 + t_i \cdot b_j^1)C_{ss}(t_i) \quad (4.15)$$

získáme konstanty lineárního nárůstu $a_j^0, a_j^1, b_j^0, b_j^1$, popisující lineární změny absorpčního spektra komplexů (levý sčítanec) a směsi samostatných vláken (pravý sčítanec) s teplotou t_i , a termodynamické parametry ΔH , ΔS teplotně indukovaného přechodu. Matice V_{ij} je unitární s normalizovanými koeficienty, její dimenze odpovídá dimenzi analyzovaných dat.

Jako parametr stability komplexu je brána teplota tání, již získáme uvážením vztahů (4.10) a (4.13):

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S - R \ln \left(\frac{2c_0}{c_{vz}} \right)}. \quad (4.16)$$

Jednou z možností vyhodnocení je nezávislé fitování jednotlivých sloupců matice V_{ij} . Potom dostaneme hodnoty termodynamických parametrů pro jednotlivá j , tedy ΔH_j , ΔS_j . Z nich můžeme získat realistické odhady ΔH a ΔS jako vážených průměrů termodynamických parametrů ΔH_j , ΔS_j s váhou $\sqrt{W_j}$. Vážený průměr $\Delta \bar{H}$ vyjádříme pro M fitovaných řádků matice V_{ij} :

$$\Delta \bar{H} = \frac{\sum_j^M \sqrt{W_j} \Delta H_j}{\sum_j^M \sqrt{W_j}}, \quad (4.17)$$

Střední kvadratická odchylka váženého průměru je dána:

$$\sigma^2(\Delta \bar{H}) = \frac{\sum_j^M \sqrt{W_j} (\Delta \bar{H} - \Delta H_j)^2}{\sum_j^M \sqrt{W_j}}. \quad (4.18)$$

Vážený průměr $\Delta \bar{S}$ a jeho střední kvadratickou odchylku $\sigma^2(\Delta \bar{S})$ určíme analogicky.

Spektrum čistých forem získáme na základě znalosti rovnic (4.15) vyjadřujících závislost V_{ij} na teplotě, po řadě uvádíme spektrum pro čistý duplex Z_{ds} a spektrum pro samostatná vlákna Z_{ss} :

$$Z_{ds}(t_i, \lambda_k) = \sum_{j=1}^M [a_j^0 + t_i \cdot a_j^1] U_j(\lambda_k), \quad (4.19)$$

$$Z_{ss}(t_i, \lambda_k) = \sum_{j=1}^M [b_j^0 + t_i \cdot b_j^1] U_j(\lambda_k), \quad (4.20)$$

5 Popis experimentu

5.1 Vzorčky oligonukleotidů

Pro vlastní experiment jsme použili RNA oligonukleotidy nasyntetizované firmou Dharmacon. Oligonukleotidy přečištěné pomocí PAGE byly dodány zablockované (2'-ACE®), aby se tak předešlo jejich možné degradaci. Sekvenci použitých oligonukleotidů a jejich délku danou počtem nukleotidů uvádíme v tabulce 1, molární hmotnost a extinkční koeficient pro jednotlivé vzorky pro vlnovou délku 260 nm uvádíme v tabulce 2.

Tabulka 1 Použité RNA oligonukleotidy, jejich sekvence (řazená od 5' konce k 3' konci) a délka v počtech nukleotidů

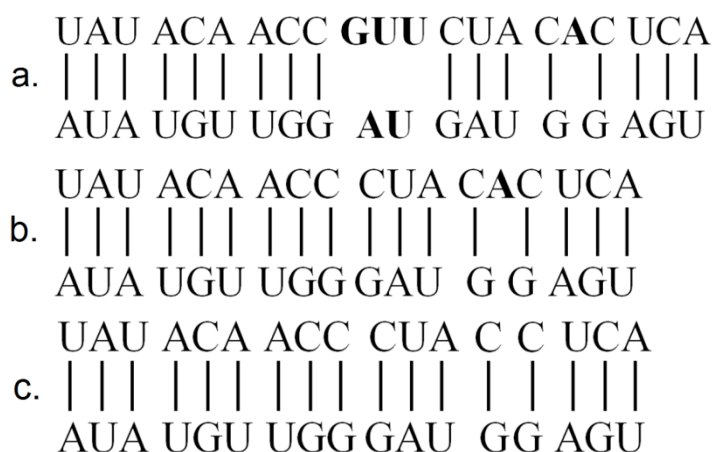
Označení oligonukleotidu	Sekvence	Délka
LCS1	UAU ACA ACC GUU CUA CAC UCA	21
Let7	UGA GGU AGU AGG UUG UAU A	19
LCS1wL	UAU ACA ACC CUA CAC UCA	18
LCS1sh	UAU ACA ACC CUA CCU CA	17
Let7sh	UGA GGU AGG GUU GUA UA	17

Tabulka 2 Molární hmotnost a extinkční koeficient použitých vzorků RNA oligonukleotidů

Oligonukleotid	Molární hmotnost (g/mol)	Extinkční koeficient (L/mol·cm)
LCS1	6561,0	208000
Let7	6143,7	208700
LCS1wL	5603,4	177700
LCS1sh	5274,2	165300
Let7sh	5508,3	184800

Tyto sekvence byly zvoleny tak, abychom mohli po smíchání příslušných dvojic roztoků získat komplexy (duplexy), jejichž zjištěné charakteristiky doplní výsledky získané v práci (Homolka, 2018). Struktura těchto komplexů je schematicky znázorněná na obr. 7. Přirozený komplex miRNA *Let7* s cílovou sekvencí mRNA *LCS1* není plně komplementární – obsahuje vnitřní smyčku a výduť. Tento komplex

jsme použili jako referenci ke sledování vlivu strukturních útvarů na termodynamické parametry – další dva komplexy byly totiž strukturně modifikovány. Směs vzorků s označením *LCS1wL* („without loop“, tj. bez vnitřní smyčky) a *Let7sh* („shortened“, tj. kratší vzhledem k ostatním oligonukleotidům) obsahovala pouze výduť, komplex vzorků *LCS1sh* a *Let7sh* byl zcela komplementární, tedy neobsahoval ani výduť, ani vnitřní smyčku.



Obrázek 7. Schéma měřených komplexů RNA oligonukleotidů s vyznačením (tučným písmem) nespárovaných nukleotidů. Horní řetězec je řazen od 5' k 3' konci, spodní od 3' k 5' konci. (a) komplex *LCS1* a *Let7*, (b) komplex *LCS1wL* a *Let7sh*, (c) komplex *LCS1sh* a *Let7sh*

Oligonukleotidy byly rozpouštěny v kakodylátovém pufru, tvořeném 20 mM kakodylátem sodným o molární hmotnosti 138,0 g/mol a 20 mM chloridem sodným o molární hmotnosti 58,44 g/mol. Navážky jsme provedli využitím analytických vah *Metler Toledo AG 245*. Dále jsme pomocí pH metru *PerpHecT LogR 350* upravili pH pufru tak, aby bylo blízké jeho maximální pufrací kapacitě, dosáhli jsme hodnoty pH 6,82.

5.2 Odblokování a odsolení vzorků

Nejprve bylo třeba dodané oligonukleotidy odblokovat a odsolit, při odblokování jsme postupovali dle protokolu dodaného firmou Dharmacon (Dharmacon 2018), v případě odsolování jsme využili postupu uvedeného v (Davis et al. 1986).

Pro odblokování jsme nejprve jednotlivé oligonukleotidy ve zkumavkách stočili na centrifuze, do každé zkumavky přidali 400 μl odblokovacího pufru (100 mM kyselina octová, pH 3,4 – 3,8, upraveno TEMED), jenž nám byl dodán společně s oligonukleotidy, poté jsme roztoky krátce vortexovali a znovu stočili, abychom tak dosáhli úplného rozpuštění oligonukleotidů v pufru. Takto upravené roztoky jsme

vložili na 30 min do termomixéru *Thermomixer Confort* firmy *Eppendorf*, kde byly při 60 °C a 300 rpm inkubovány. Na závěr odblokovacího procesu jsme zkumavky s oligonukleotidy nechali po dobu 3 hodin lyofilizovat.

Pro odsolení již odblokovaných oligonukleotidů jsme do každé ze zkumavek napipetovali postupně 400 μ l deionizované vody, 50 μ l 3M acetátu sodného pH 5,2 a 1,5 ml ethanolu, mezi přidáním jednotlivých složek jsme roztok vortexovali a stočili na centrifuze. Výsledný roztok jsme vložili na 2 hodiny do mrazicího boxu o teplotě -80 °C. Poté jsme zkumavky vložili do centrifugy *MIKRO 220R Hettich* a nechali je při otáčkách 18 000 g a teplotě 4 °C po dobu 20 min. Na závěr jsme z jednotlivých zkumavek odpipetovali roztok a vzniklý pelet opláchli vychlazenými 200 μ l 95% ethanolu. Takto odblokované a odsolené oligonukleotidy jsme nechali po dobu 30 min lyofilizovat.

5.3 Měření UV spekter

Měření UV absorpčních spekter na dvoupaprskovém spektrometru *Perkin-Elmer* typu *Lambda 12* probíhalo s rychlostí 120 nm/min v rozsahu vlnových délek 220 – 340 nm. Pro dostačující stabilizaci spektrometru byl přístroj 2 hodiny před začátkem měření zapnut. Vzorky byly umísťovány do křemenných kyvet *114-QS* firmy *Hellma Analytics*, optická dráha těchto kyvet činila 1 cm. Kyvety používané při měření byly předem naloženy v kyselině chromsírové, následně prošly opláchnutím deionizovanou vodou a vysoušením v pínce při 100 °C, čímž jsme předcházeli případnému kontaktu vzorku s nečistotami a možné degradaci oligonukleotidů. Společně se vzorkem byla v kyvetovém prostoru umístěna i referenční kyveta, která obsahovala námi připravený pufr (20 mM kakodylát sodný, 20 mM NaCl, pH 6,82) o objemu 1200 μ l. Roztoky v obou kyvetách byly převrstveny 150 μ l minerálního oleje, abychom omezili jejich vypařování a nedocházelo tak ke změnám jeho koncentrace.

Při přípravě jednovláknových vzorků jsme do zkumavky s lyofilizovaným, odblokovaným a odsoleným oligonukleotidem nepipetovali 1210 μ l kakodylátového pufru. Vzorek jsme krátce vortexovali a poté vložili do centrifugy. Takto upravený roztok o objemu 1200 μ l jsme umístili do kyvety a využitím spektrometru změřili jeho absorbanci při laboratorní teplotě (20 °C). Nejmenší zatížení chybou vykazuje spektrometr u absorbancí pohybujících se kolem hodnoty 0,7, pokud tedy hodnota

absorbance daného vzorku nebyla vyhovující, museli jsme upravit jeho koncentraci. Po dosažení vhodné absorbance jsme vzorek převrstvili 150 μl minerálního oleje a přistoupili k měření spekter.

Pro měření UV absorpčních spekter směsi dvou oligonukleotidů jsme přípravu finálního vzorku začali se dvěma zkumavkami, v každé z nich jsme měli připravený lyofilizovaný, odblokovaný a odsolený oligonukleotid, který s oligonukleotidem z druhé zkumavky bude tvořit požadovaný komplex. Do každé zkumavky jsme napipetovali 610 μl kakodylátového pufru, roztok zvortexovali, stočili na centrifuze a využitím spektrometru změřili jeho absorbanci při laboratorní teplotě (20 °C). Poté jsme upravovali koncentraci obou oligonukleotidů tak, aby jejich vzájemná koncentrace byla molárně 1:1 a zároveň aby výsledná absorbance byla blízká hodnotě 0,7. Konečné koncentrace jednotlivých vláken oligonukleotidů i jejich směsí uvádíme v tabulce 3. U směsí uvádíme koncentraci pouze pro jeden z oligonukleotidů, koncentrace druhého je stejná (s chybou menší než 1%). Pro dosažení co největší přesnosti při závěrečné přípravě finálního vzorku, kdy jsme přepipetovali oba roztoky s oligonukleotidy do jedné zkumavky, jsme jednotlivé složky směsi vážili na analytických vahách *Metler Toledo AG 245*. Poté jsme zkumavku s finálním vzorkem vložili do termomixéru na 10 *min* při třepání 450 *rpm* a teplotě 95 °C, následně jsme vypnuli třepání a nechali vzorek po 10 *min* temperovat při teplotě 95 °C, na závěr jsme zkumavku vložili do směsi vody a ledu a nechali vzorek během 10 *min* ustálit při teplotě 0 °C. Po přepipetování do kyvety jsme vzorek o objemu 1200 μl převrstvili 150 μl minerálního oleje a začali měření na spektrometru.

Absorpční spektra jsme měřili v teplotním rozsahu od 9 do 96 °C s krokem 3 °C. Při počáteční teplotě 9 °C byl vzorek nejprve 30 *min* temperován a až poté proběhlo měření prvního spektra, mezi dalšími měřeními spekter byla doba temperace námi stanovena na 10 *min*. K měření teploty jsme používali teplotní sondu umístěnou v kyvetě se vzorkem, teplotu jsme regulovali využitím vodní lázně *Haake F3*. Abychom zamezili kondenzaci vodních par na stěnách kyvet, profukovali jsme kyvetový prostor suchým vzduchem.

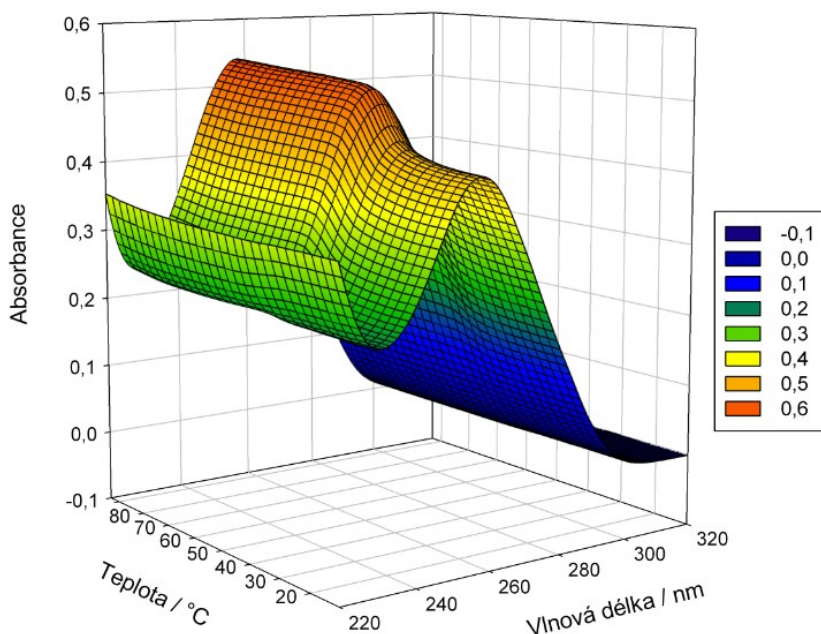
Tabulka 3 Koncentrace oligonukleotidů při měření UV spekter

vzorek	koncentrace (nmol/ml)	směs	koncentrace jedné složky směsi (nmol/ml)
LCS1	3,461	LCS1+Let7	1,23
Let7	3,257	LCS1wL+Let7sh	1,54
LCS1wL	3,485	LCS1sh+Let7sh	1,76
LCS1sh	3,391		
Let7sh	3,961		

6 Výsledky UV spektroskopie

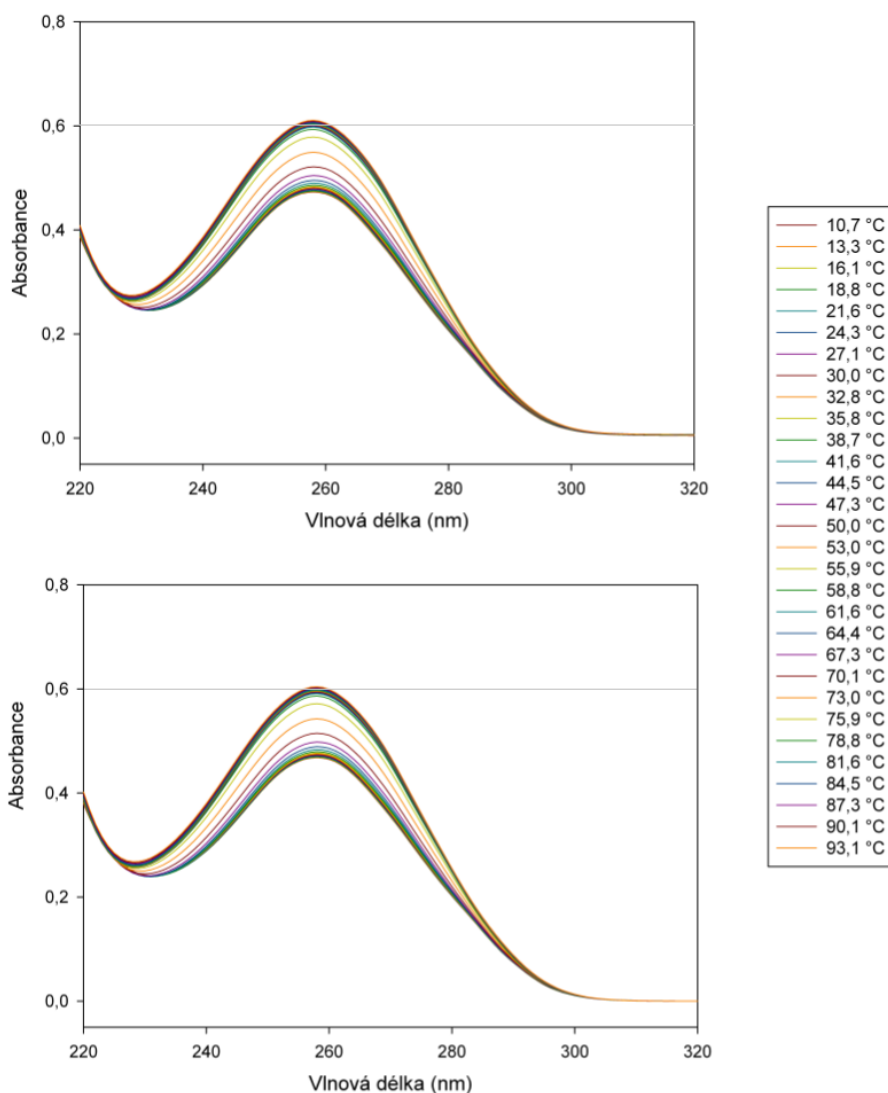
6.1 Zpracování UV spekter

Využitím UV absorpčního spektrometru jsme naměřili teplotně závislé série spekter oligonukleotidů a jejich směsí. Průběh měřených absorpčních spekter ilustrujeme na obr. 8 pro směs *LCSI* a *Let7*.



Obrázek 8. Absorbance směsi *LCSI* a *Let7* v závislosti na vlnové délce a teplotě. Řez naměřené závislosti při konstantní vlnové délce představuje tzv. křivku tání. Hodnota konstantní vlnové délky je zvolena tak, aby absorbance byla maximální, což u nukleových kyselin odpovídá 260 nm.

Pro vyhodnocení získaných spekter jsme omezili naměřené hodnoty na interval 220 – 320 nm. Abychom eliminovali fluktuaci pozadí, od každého spektra jsme odečetli hodnotu absorbance při 320 nm, takže při dalším zpracování je tato hodnota rovna nule. Tento postup uvádíme na obr. 9. Z obrázku je patrné, že efekt fluktuace pozadí spekter není při UV absorpční spektroskopii nijak zvlášť výrazný.

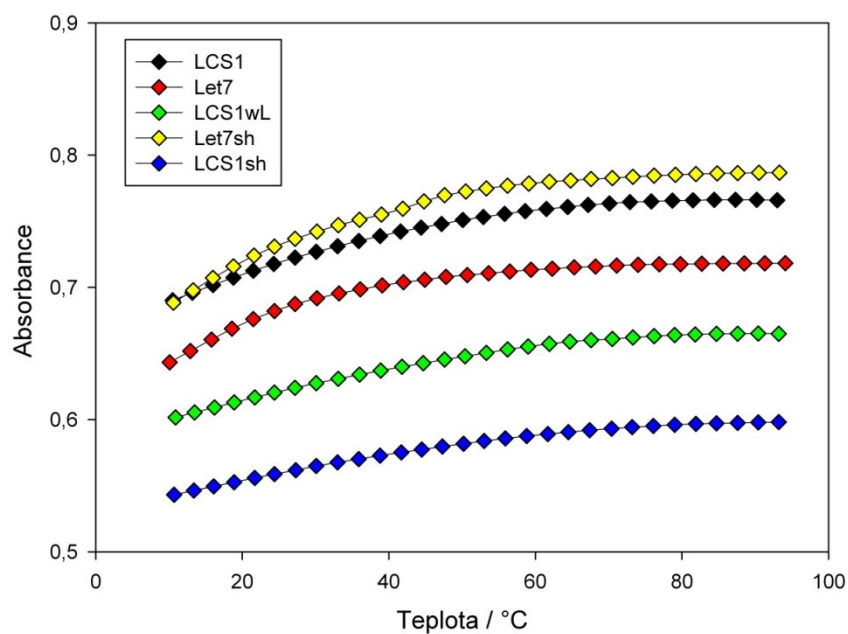


Obrázek 9. Série UV absorpčních spekter směsi *LCS1wL+Let7sh* před odečtením (nahore) a po odečtení příspěvku pozadí (dole). Pro ilustraci vlivu fluktuace pozadí je přímkou vyznačena hodnota absorbance 0,6.

Takto upravená absorpční spektra samostatných oligonukleotidů a jejich směsí jsme zpracovávali metodou SVD využitím vztahů (4.1) – (4.6). U směsí jsme navíc proložili teplotní závislost jednotlivých koeficientů matice V_{ij} křivkou, získanou aplikací termodynamického modelu popsaného v kapitole 4.2. Následně jsme pro dané směsí vyjádřili hodnoty termodynamických parametrů ΔH a ΔS , a to na základě vážených průměrů termodynamických parametrů ΔH_j , ΔS_j , získaných fitováním pro jednotlivá j , s uvážením jejich váhy $\sqrt{W_j}$.

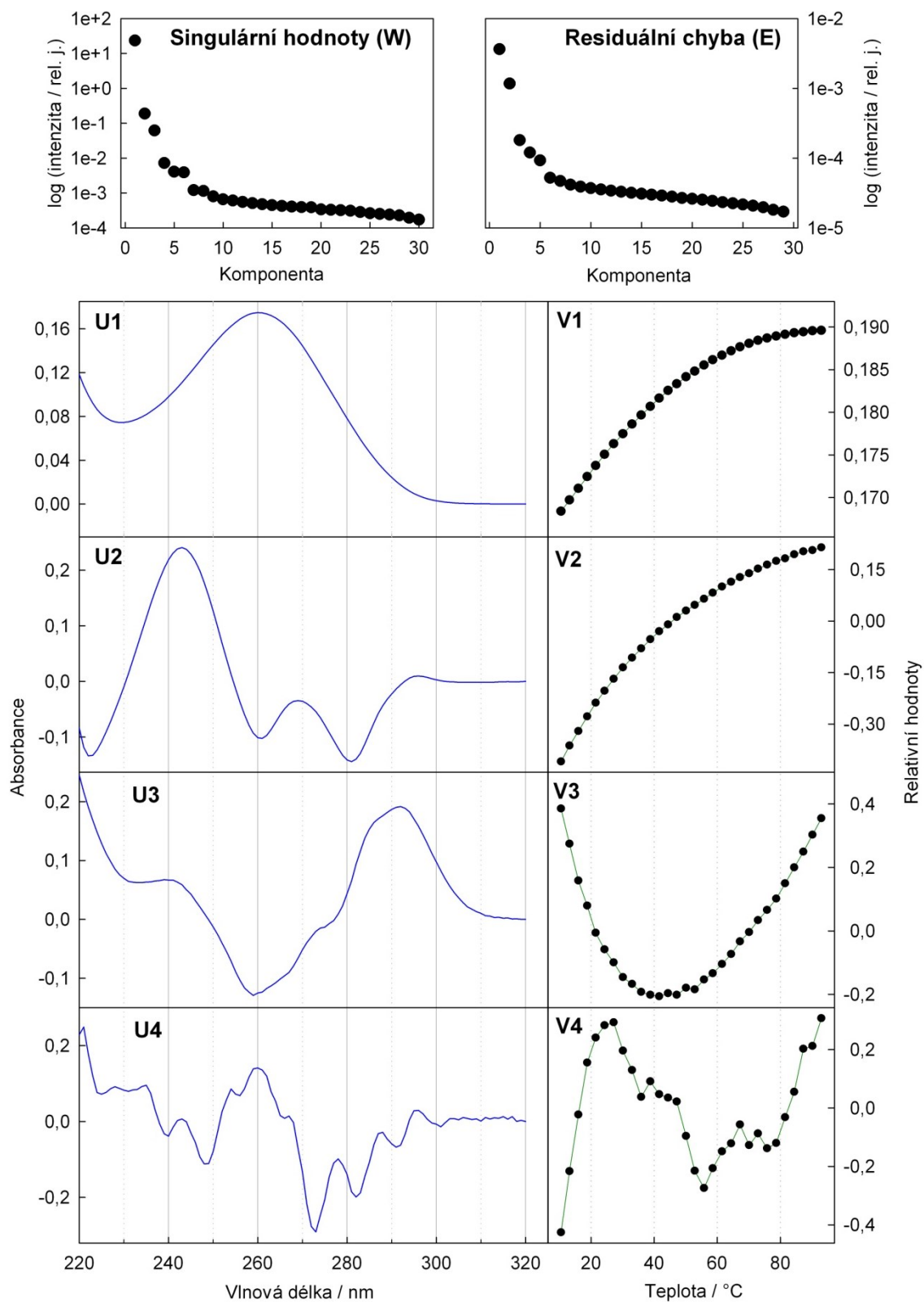
6.2 Výsledky samostatných oligonukleotidů

Průběh naměřené teplotní závislosti absorpance u samostatných oligonukleotidů uvádíme na obr. 10, SVD pro jednotlivé vzorky pak na obr. 11. – 15.



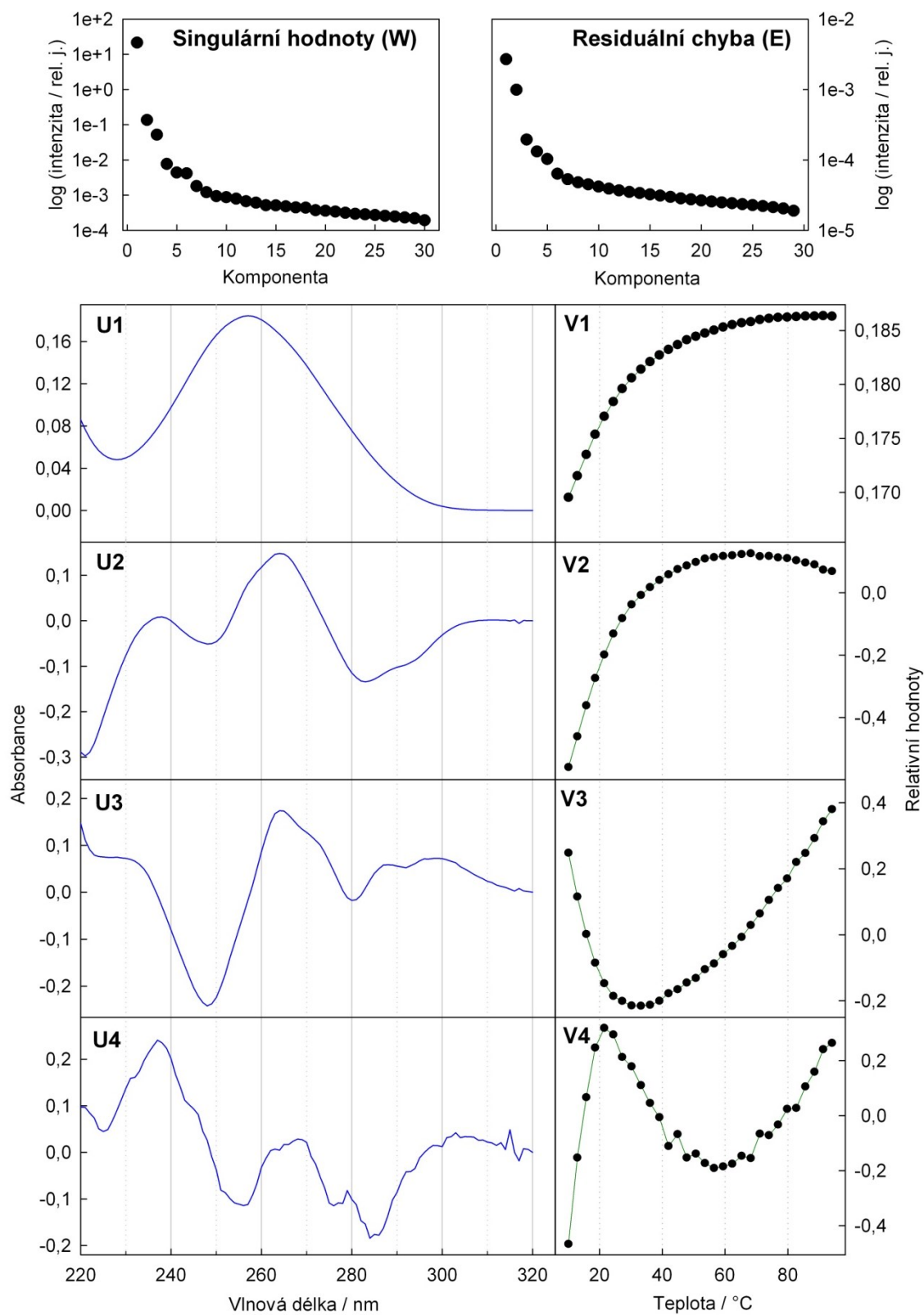
Obrázek 10. Absorbance samostatných oligonukleotidů v závislosti na teplotě při vlnové délce 260 nm

LCS1



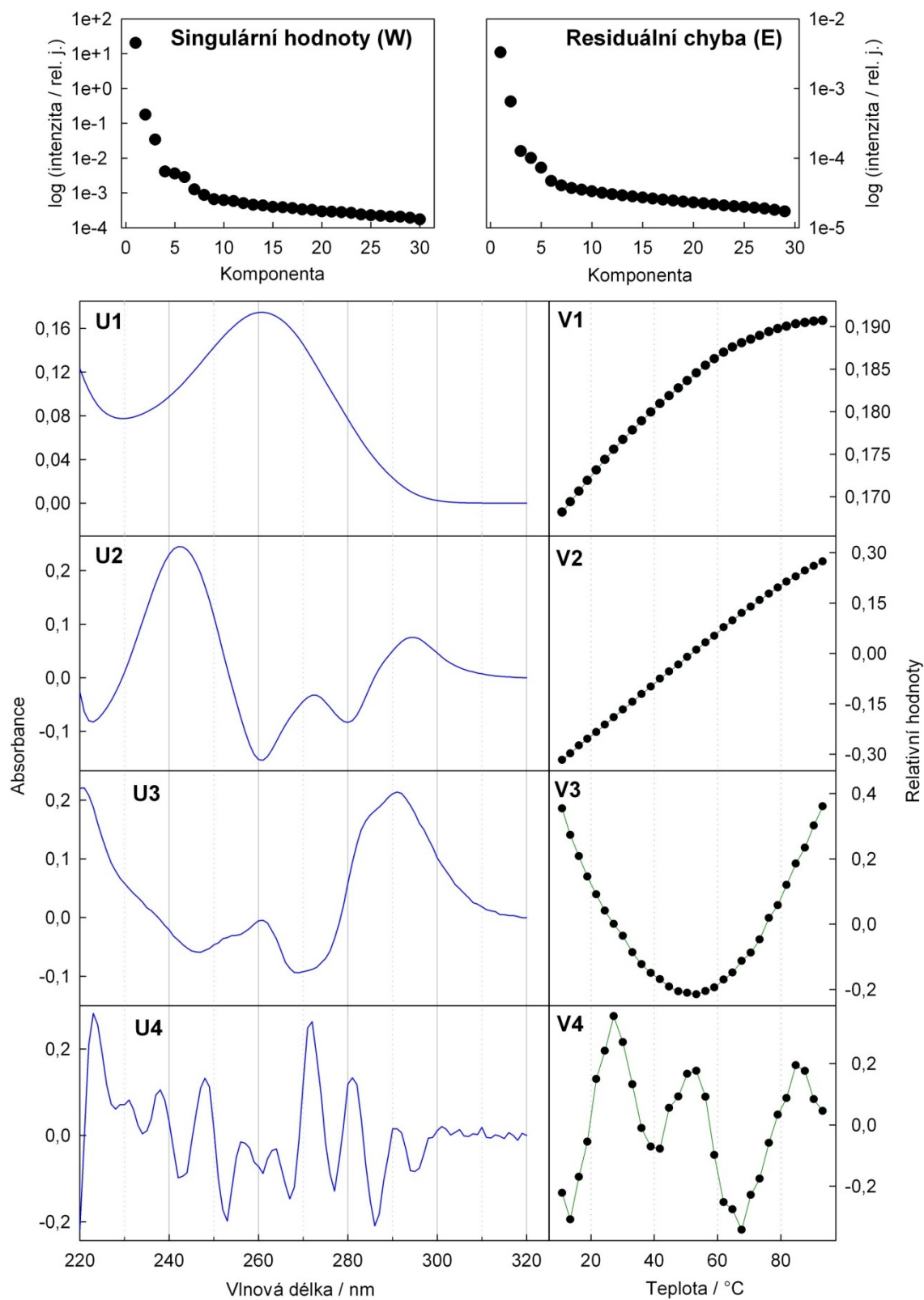
Obrázek 11. Výsledky SVD analýzy série teplotně závislých spekter UV absorpce vzorku LCS1. Jsou uvedena první čtyři subspektra a jim příslušné koeficienty V.

Let7



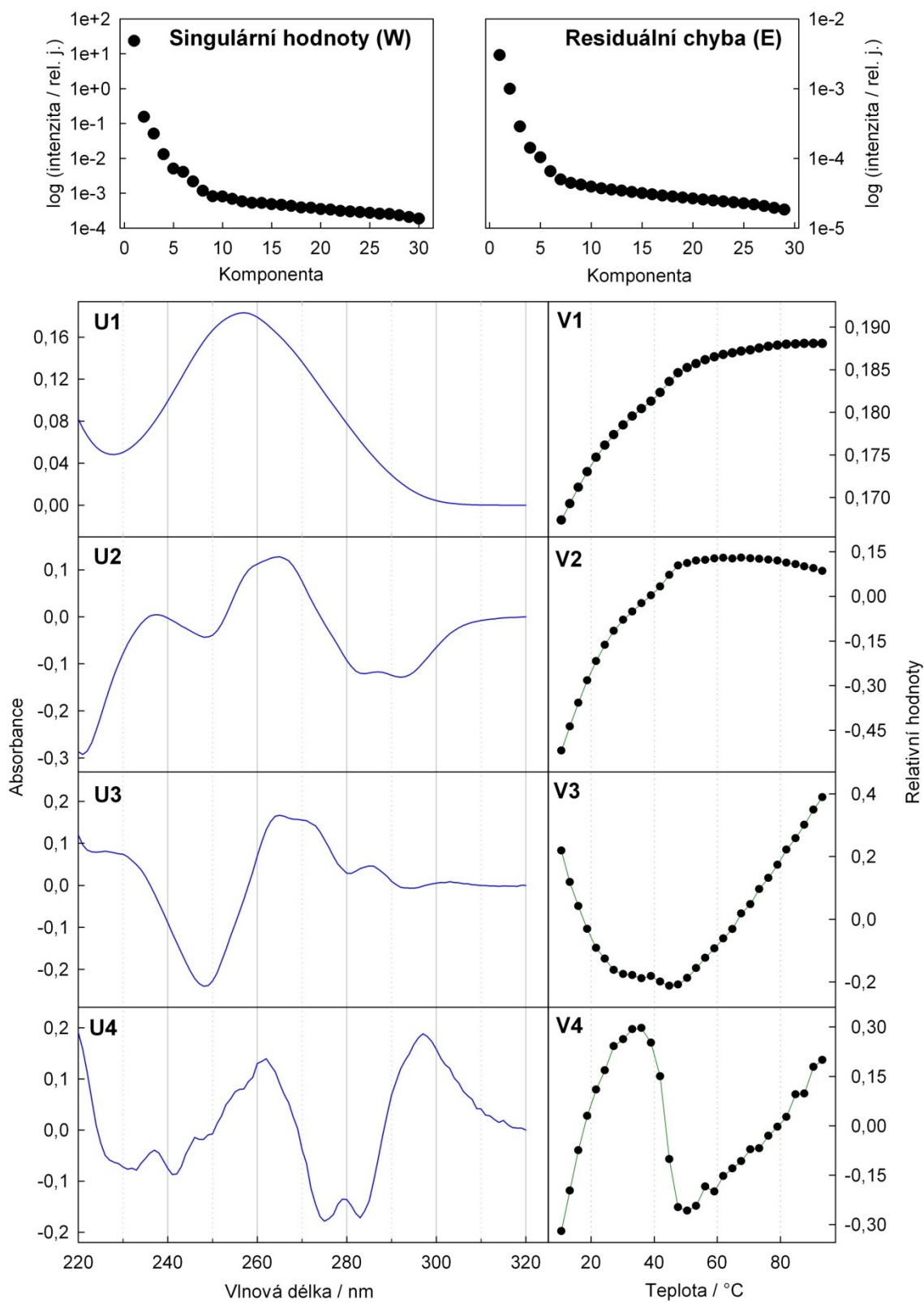
Obrázek 12. Výsledky SVD analýzy série teplotně závislých spekter UV absorpce vzorku *Let7*. Jsou uvedena první čtyři subspektra a jim příslušné koeficienty V.

LCS1wL



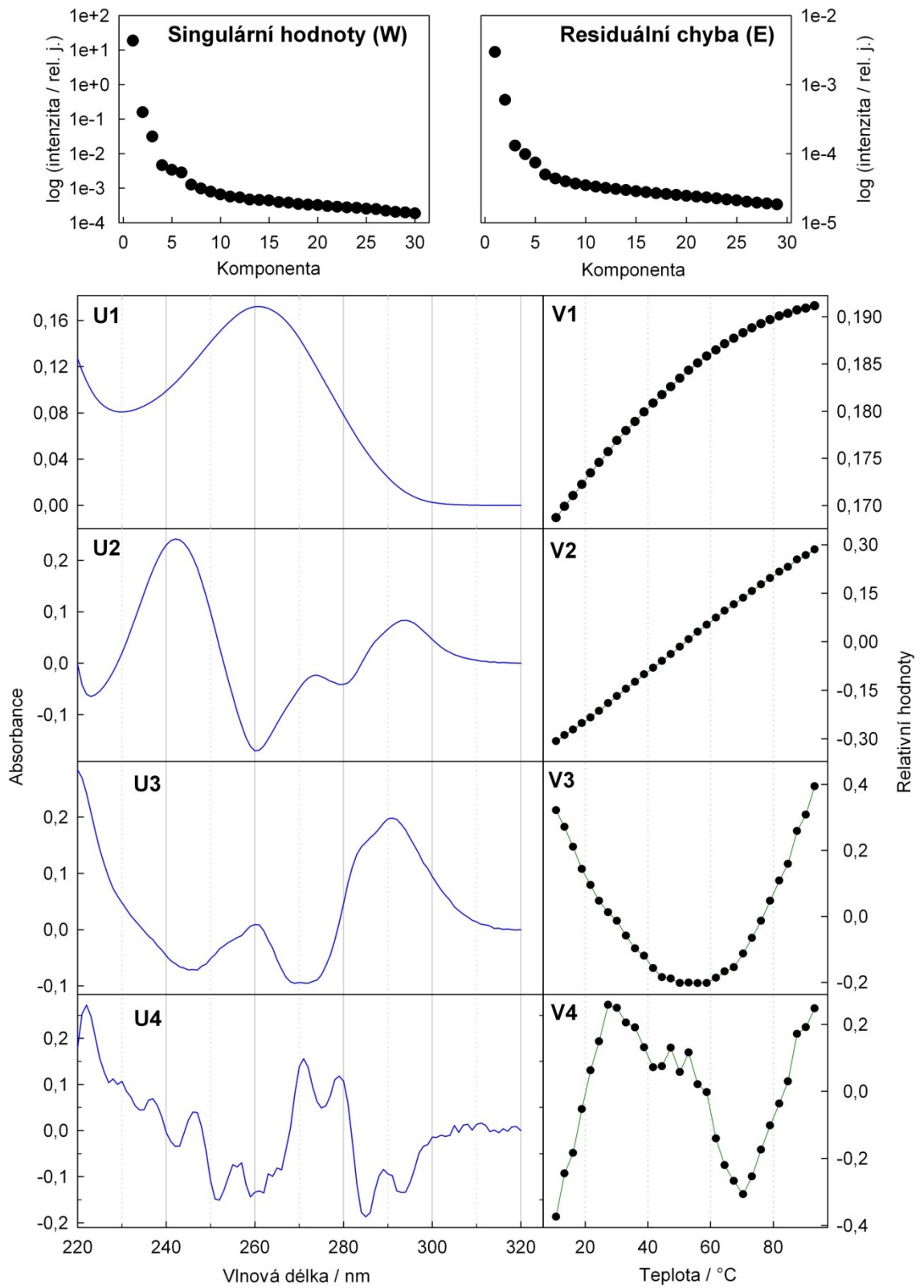
Obrázek 13. Výsledky SVD analýzy série teplotně závislých spekter UV absorpce vzorku LCS1wL. Jsou uvedena první čtyři subspektra a jim příslušné koeficienty V.

Let7sh



Obrázek 14. Výsledky SVD analýzy série teplotně závislých spekter UV absorpce vzorku *Let7sh*. Jsou uvedena první čtyři subspektra a jim příslušné koeficienty V.

LCS1sh

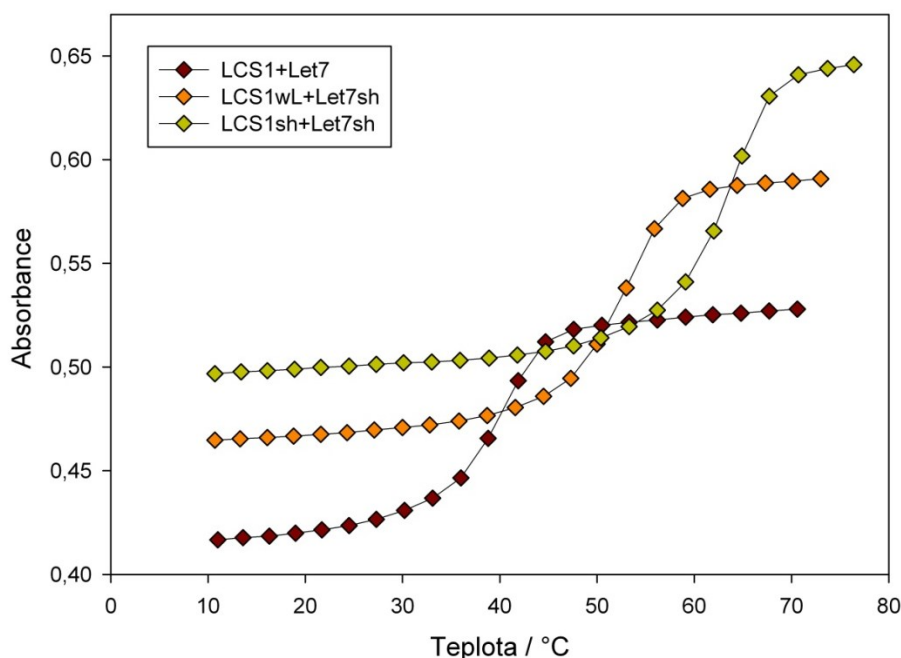


Obrázek 15. Výsledky SVD analýzy série teplotně závislých spekter UV absorpce vzorku *LCS1sh*. Jsou uvedena první čtyři subspektra a jim příslušné koeficienty V.

6.3 Výsledky směsí







Průběh naměřené teplotní závislosti absorbance u směsí oligonukleotidů uvádíme na obr. 16, SVD pro jednotlivé směsi pak na obr. 18. – 20.

Absorpční spektra směsí byla změřena ve stejném teplotním rozsahu jako spektra samostatných řetězců, tedy 9 – 96 °C. Při vyšších teplotách (nad 70 °C) se však objevily u koeficientů V z SVD rozkladu atypické změny s teplotou, které neodpovídaly očekávané závislosti na základě chování samostatných vláken (ta by měla být za těchto teplot už zcela oddělená). Jedním z možných vysvětlení je uvolňování nějaké složky krycího minerálního oleje do vodného roztoku, k němuž dochází za vysokých teplot. Abychom mohli získaná data analyzovat, bylo nutné omezit teplotní rozsah zpracovávaných dat do cca 70 °C.



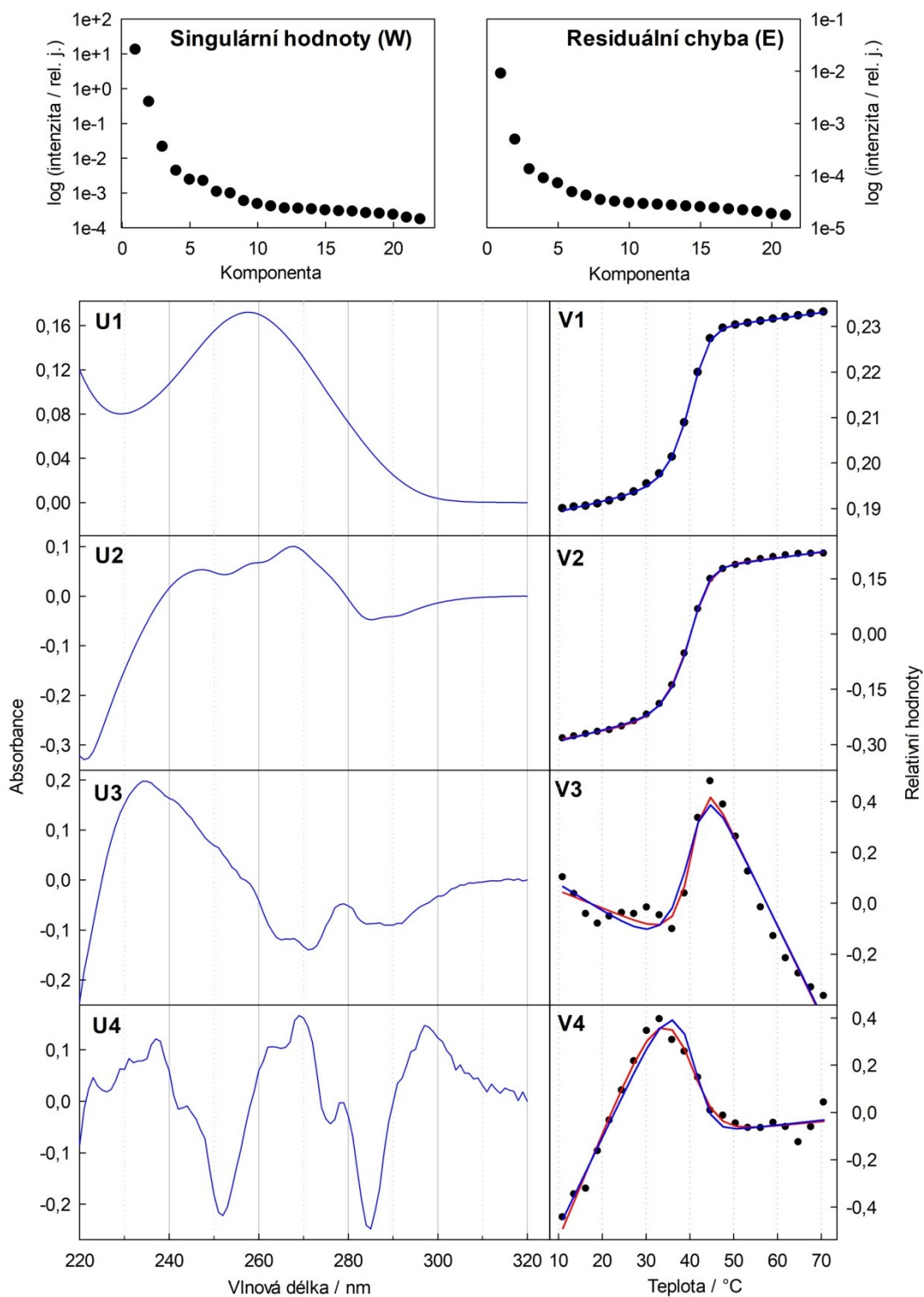
Obrázek 16. Absorbance směsí oligonukleotidů v závislosti na teplotě při vlnové délce 260 nm

Získané výsledky z měření směsí budeme porovnávat s výsledky diplomové práce Radima Homolky (Homolka 2018), na kterou tato práce navazuje. Základní srovnání vytvářených komplexů z hlediska počtu nukleotidů, vlastní struktury a odchylek od plně komplementárního duplexu uvádíme na obr. 17.

Směs	Počet nukleotidů	Schéma	Odchylka od úplného duplexu
LCS1+Let7	40		výduť, vnitřní smyčka
LCS1wL+Let7sh	35		výduť
LCS1sh+Let7sh	34		
LCS1+Let7	40		výduť, vnitřní smyčka
LCS1wB+Let7	39		vnitřní smyčka
LCS1wL+Let7wL	36		dvě výdutě

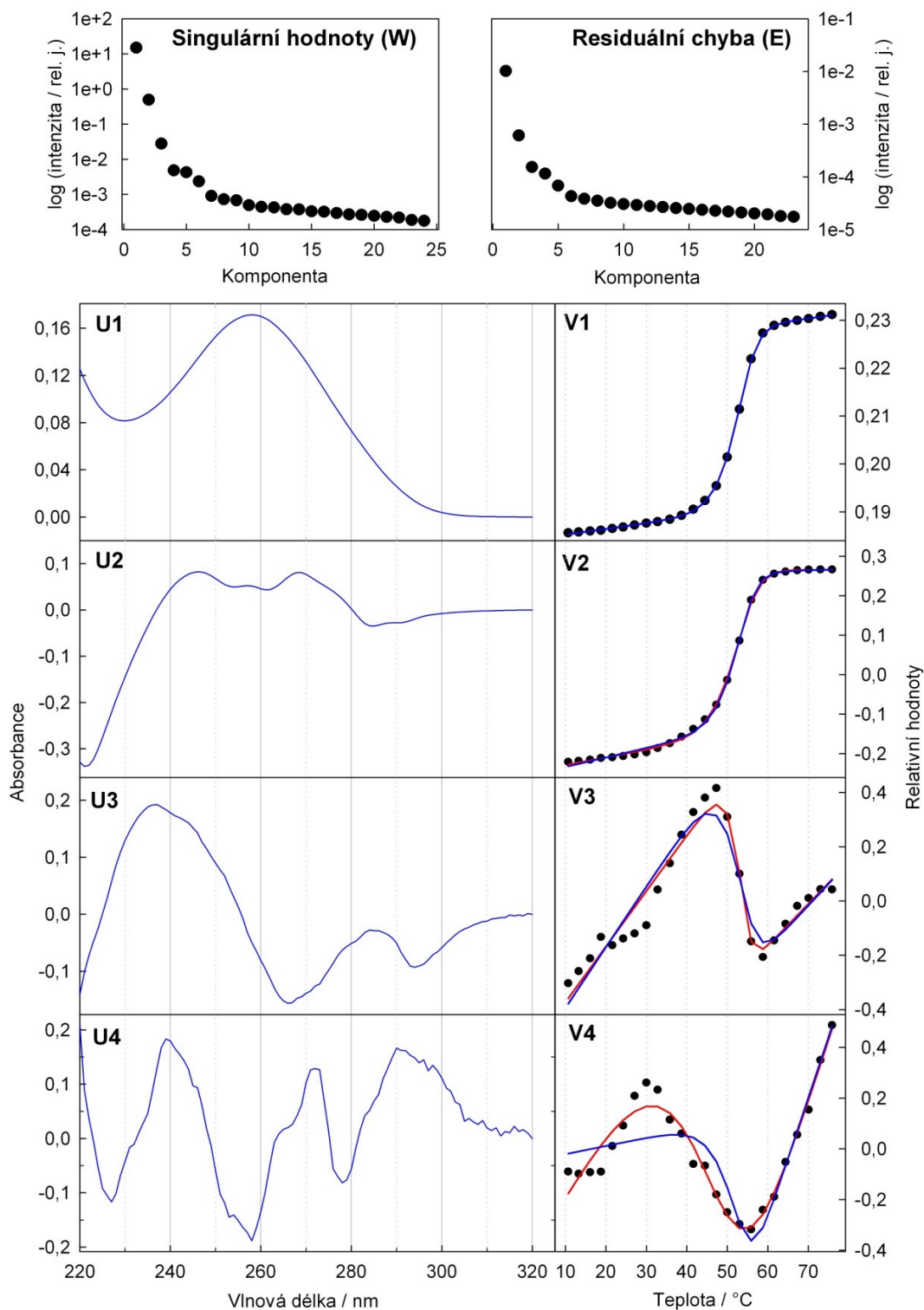
Obrázek 17. Srovnání struktury komplexů měřených v rámci této práce (tučným písmem) a v rámci diplomové práce Radima Homolky (Homolka 2018)

LCS1+Let7



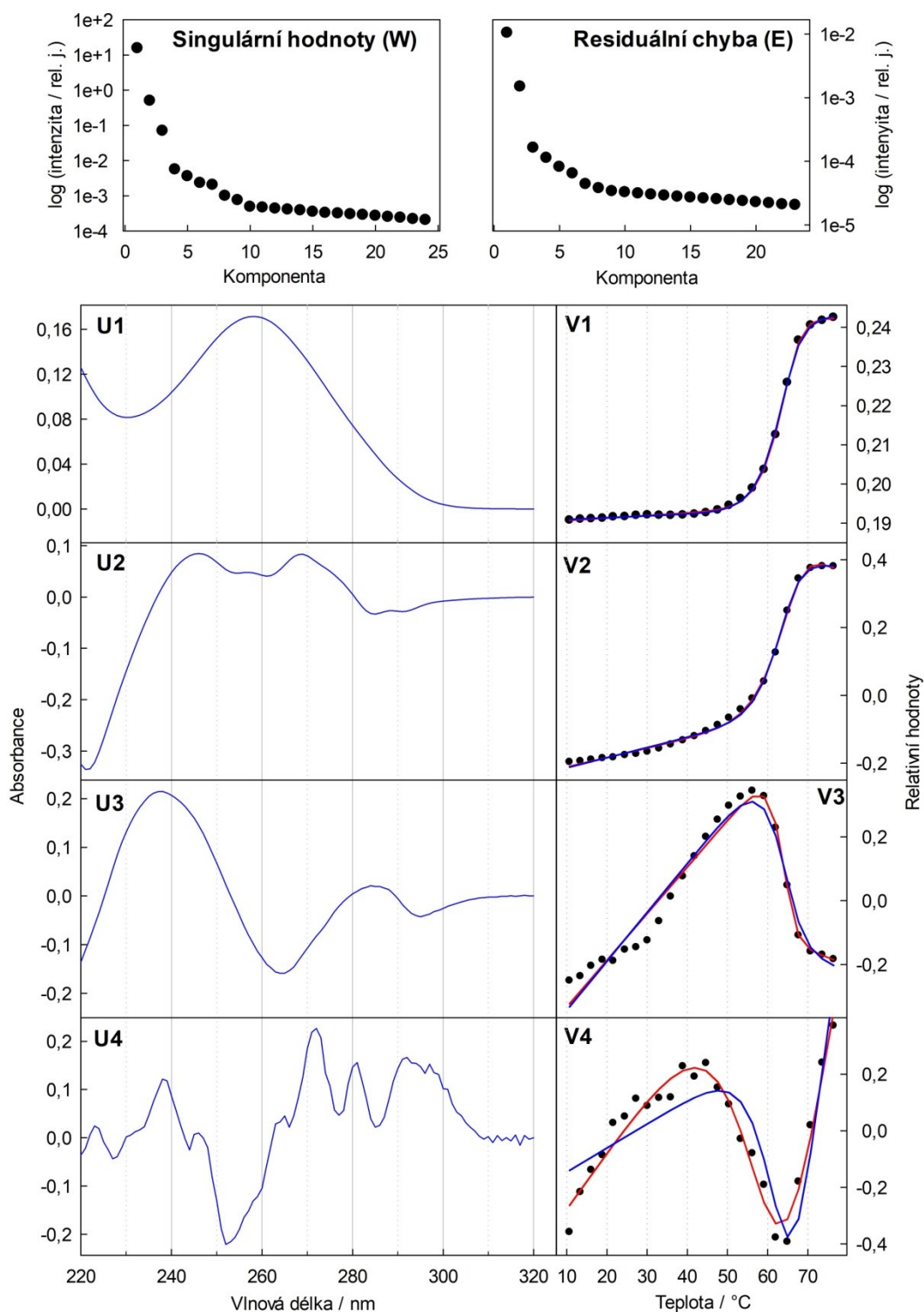
Obrázek 18. Výsledky SVD analýzy série teplotně závislých spekter UV absorpce směsi *LCS1* a *Let7*. Jsou uvedena první čtyři subspektra a jim příslušné koeficienty *V*. Červeně je zakreslena teplotní závislost koeficientů *V* podle 1. fitu termodynamického modelu, výsledek 2. fitování je zakreslen modře.

LCS1wL+Let7sh



Obrázek 19. Výsledky SVD analýzy série teplotně závislých spekter UV absorpce směsi *LCS1wL* a *Let7sh*. Jsou uvedena první čtyři subspektra a jim příslušné koeficienty V . Červeně je zakreslena teplotní závislost koeficientů V podle 1. fitu termodynamického modelu, výsledek 2. fitování je zakreslen modře.

LCS1sh+Let7sh



Obrázek 20. Výsledky SVD analýzy série teplotně závislých spekter UV absorpce směsi *LCS1sh* a *Let7sh*. Jsou uvedena první čtyři subspektra a jim příslušné koeficienty *V*. Červeně je zakreslena teplotní závislost koeficientů *V* podle 1. fitu termodynamického modelu, výsledek 2. fitování je zakreslen modře.

Proložením teplotních závislostí koeficientů V_{ij} dle vztahu (4.15) jsme získali 6 parametrů fitu - $a_j^0, a_j^1, b_j^0, b_j^1, \Delta H_j, \Delta S_j$. Popsaný fit je na obrázcích vyznačen červeně, označujeme ho jako 1. fitování. Na základě 1. fitování jsme určili vážené průměry a standardní odchylky termodynamických parametrů $\Delta H, \Delta S, T_m$. Teplota tání je závislá na koncentraci oligonukleotidů ve směsi, proto jsme teplotu tání získanou 1. fitováním přepočítávali na jednotkovou koncentraci $1 \mu M$, abychom mohli získané hodnoty teploty tání T_m porovnávat vzájemně i s výsledky diplomové práce (Homolka 2018).

Získané hodnoty $\Delta H, \Delta S$ a teplotu tání T_m přepočítanou na jednotkovou koncentraci, včetně chyb daných rozptylem hodnot jednotlivých koeficientů V při 1. fitu, uvádíme v tabulce 4. V tabulce 4 jsou dále uvedeny základní charakteristiky komplexů a jejich termodynamické parametry získané v rámci diplomové práce (Homolka 2018). Hodnoty výsledků termodynamických charakteristik této práce odlišujeme od výsledků z diplomové práce (Homolka 2018) tučným písmem.

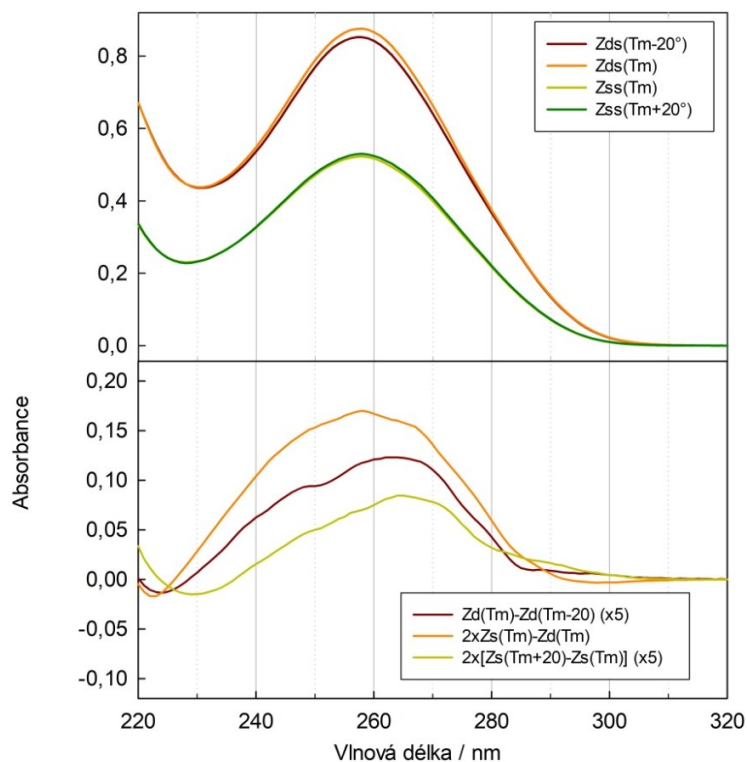
Tabulka 4 Srovnání termodynamických parametrů teplotně indukovaných přechodů komplexů LCS1+Let7 a jejich analog

Směs	T_m ($^{\circ}C$)	ΔH ($kcal \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$)	ΔS ($cal \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$)
LCS1+Let7	$39,5 \pm 0,3$	-121 ± 9	-358 ± 27
LCS1wL+Let7sh	$51,5 \pm 0,8$	-119 ± 18	-337 ± 55
LCS1sh+Let7sh	$62,2 \pm 0,7$	-121 ± 17	-331 ± 49
LCS1+Let7	$39,5 \pm 0,4$	$-121,9 \pm 2,5$	-361 ± 2
LCS1wB+Let7	$49,4 \pm 0,2$	-117 ± 3	-333 ± 9
LCS1wL+Let7wL	$42,3 \pm 0,3$	$-114,8 \pm 1,3$	-335 ± 3

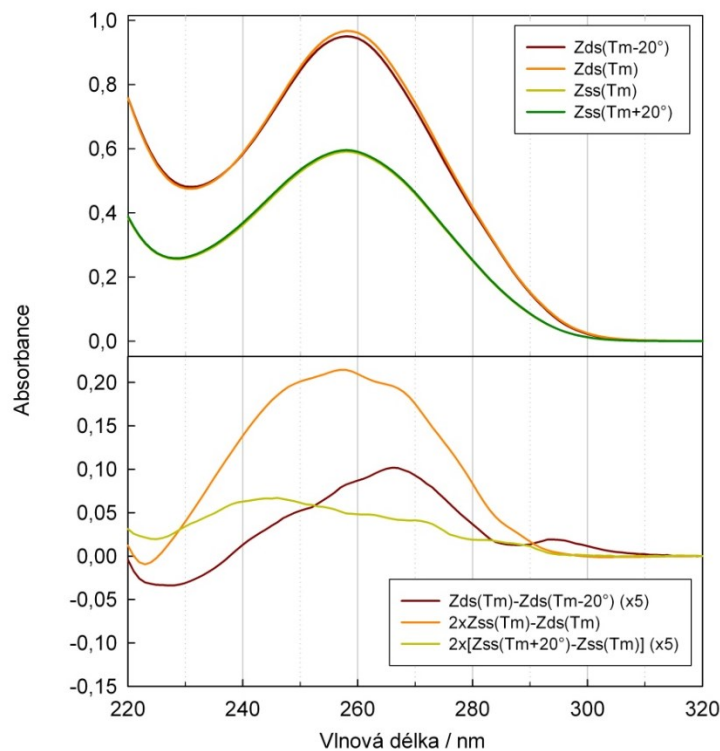
Námi naměřená data jsme dále zpracovávali využitím vztahu (4.15), kdy jsme provedli 2. fitování pro pevné $\Delta H, \Delta S$, odpovídající hodnotám uvedeným tučně v tabulce 4, na obr. 18. – 20. je vyznačeno modře. Tímto fitováním jsme získali 4 parametry - $a_j^0, a_j^1, b_j^0, b_j^1$, jež byly následně použity pro konstrukci UV absorpčních spekter a jejich diferencí.

Uvážením vztahů (4.19) a (4.20) jsme konstruovali UV absorpční spektra směsí oligonukleotidů ve formě komplexů Z_{ds} a v disociované formě Z_{ss} , a to při teplotě tání T_m a dále při teplotách $T_m - 20 ^{\circ}C$ a $T_m + 20 ^{\circ}C$. Rozdílem spekter daných forem

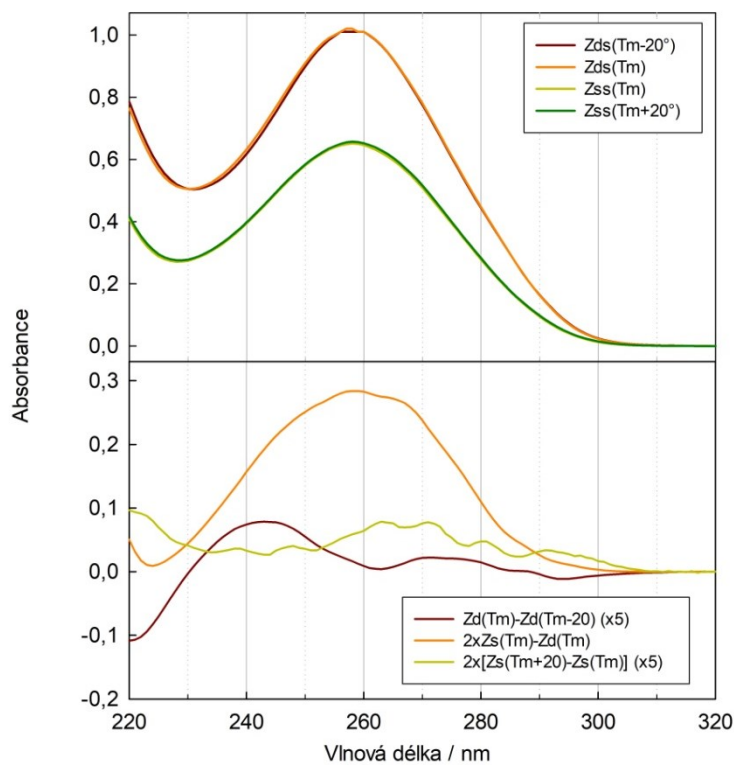
jsme získali diferenční spektra. UV absorpční spektra a diferenční spektra pro směsi měřené v rámci této práce uvádíme na obr. 21. – 23.



Obrázek 21. Spektra jednotlivých forem komplexů *LCS1* a *Let7* (nahore), jim odpovídající diferenční spektra (dole). Diferenční spektra v rámci jedné formy jsou pro přehlednost vynásobeny koeficientem 5.

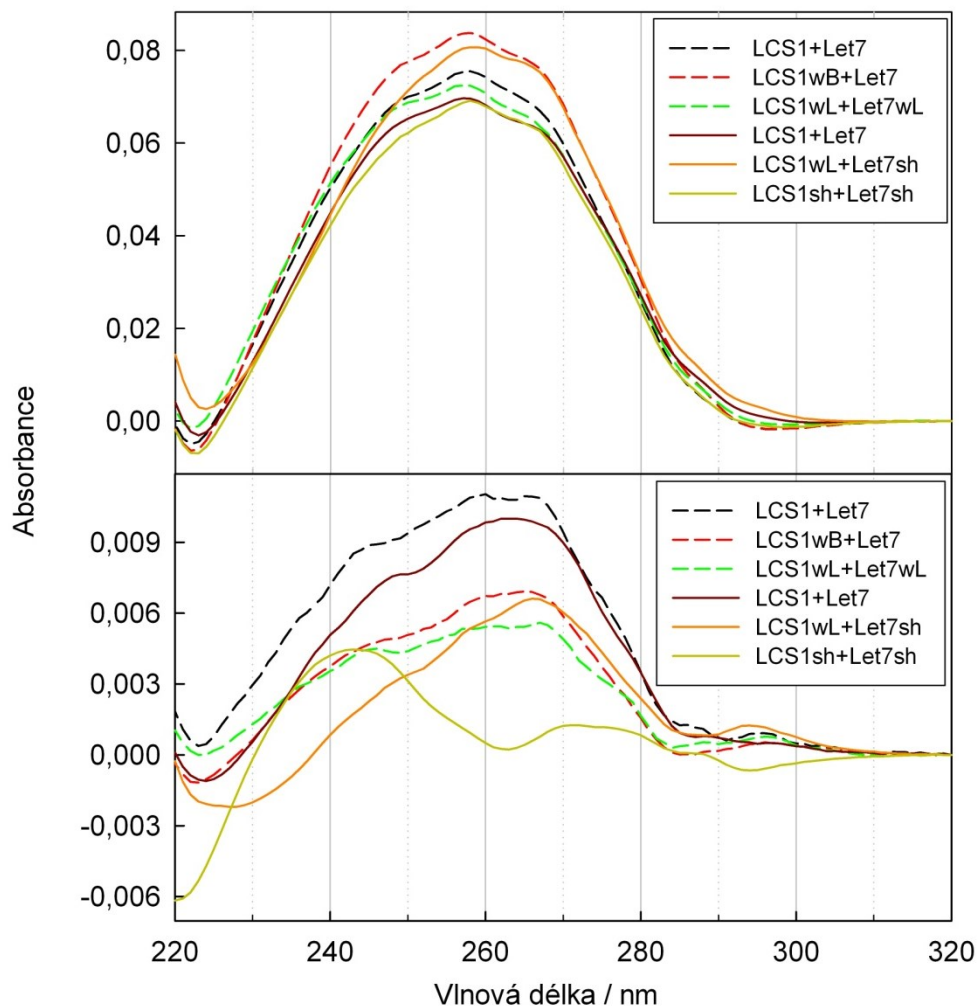


Obrázek 22. Spektra jednotlivých forem komplexů *LCS1wL* a *Let7sh* (nahore), jim odpovídající diferenční spektra (dole). Diferenční spektra v rámci jedné formy jsou pro přehlednost vynásobeny koeficientem 5.



Obrázek 23. Spektra jednotlivých forem komplexů *LCS1sh* a *Let7sh* (nahore), jim odpovídající diferenční spektra (dole). Diferenční spektra v rámci jedné formy jsou pro přehlednost vynásobeny koeficientem 5.

Pro posouzení vlivu modifikací v sekvencích na teplotní závislosti UV absorpčních spekter byla diferencní spektra, získaná ze vztahů (4.19) a (4.20) a odpovídající vlivu rozpadu komplexu (diference $2 \cdot Z_{ss}(T_m) - Z_{ds}(T_m)$) a změně spekter komplexů při zvýšení teploty o $20\text{ }^\circ\text{C}$ (diference $Z_{ds}(T_m) - Z_{ds}(T_m - 20\text{ }^\circ\text{C})$), zakreslena do jednoho obrázku – viz obr. 24. Pro srovnání uvádíme i diferencní spektra pro komplexy měřené v práci (Homolka 2018). Všechna spektra byla normována na jednotkovou $1\ \mu\text{M}$ koncentraci.



Obrázek 24. Normovaná diferencní spektra jednotlivých komplexů vyjadřující vliv rozpadu komplexu při teplotě tání T_m (nahore) a vliv vzrůstu teploty o $20\text{ }^\circ\text{C}$ u směsí ve formě duplexů (dole). Vlastní výsledky jsou uvedeny plnými čarami, výsledky z diplomové práce (Homolka 2018) čárkovaně.

7 Diskuze výsledků

7.1 Samostatné oligonukleotidy

Měření teplotních závislostí UV absorpčních spekter samostatných oligonukleotidů má z hlediska naší studie význam především jako kontrola jednotlivých složek použitých pro přípravu směsí. Nicméně i tyto závislosti přinášejí zajímavá zjištění. Především je zřejmé jak z obr. 10, tak z výsledků SVD analýzy, že teplotní změny jsou poměrně výrazné – jsou sice několikrát menší než změny UV absorpce při rozpadu komplexů, ale ne řádově. Tyto změny naznačují, že při nízkých teplotách existuje jistý druh uspořádanosti struktury jednoduchého řetězce, který se snižuje při růstu teploty. Přitom s výjimkou *LCSI* neobsahují ostatní oligonukleotidy buď guanin, nebo cytosin, takže nemůže docházet při nízkých teplotách ke vzniku homokomplexů stabilizovaných guanin-cytosinovými páry.

Z výsledků SVD vyplývá, že teplotní změny UV spekter samostatných řetězců mají faktorovou dimenzi 3, neboť hodnota čtvrtého singulárního čísla je již podstatně menší než jedna tisícina hodnoty prvního singulárního čísla, takže je pod limitem přesnosti spektrometru. Rovněž spektrální tvar čtvrté komponenty U_4 představuje spíše softwarově vyhlazené nahodilé změny než reálný průběh. Můžeme tedy konstatovat, že teplotní změny jsou vyjádřené superpozicí tří spektrálních tvarů. Zatímco první komponenta U_1 má tvar celkového spektra absorbance a příslušná teplotní závislost koeficientu V_1 vyjadřuje změny velikosti absorbance, druhý a třetí spektrální profil (U_2 a U_3) vystihují změny tvaru spektra. Příslušné koeficienty V_2 a V_3 ukazují, že ke změnám dochází postupně a že s výjimkou vysokých teplot tyto změny rozhodně nejsou lineární.

Je možné také vysledovat podobnost těchto změn u dvojic oligonukleotidů, které se jen málo liší v sekvencích bází. Konkrétně velmi podobné jsou změny u *LCSI* a *LCSIsh*, které se liší jen přítomností jednoho adeninu, a u *Let7* a *Let7sh*, které odlišuje pouze přítomnost dvou za sebou jdoucích bází, uracilu a adeninu (viz tabulka 1).

7.2 Směsi oligonukleotidů

Z tabulky 4 je především vidět výborná shoda údajů pro komplex *LCSI* a *Let7*, který byl měřen v obou studiích. Protože se jednalo o nezávisle syntetizované,

připravené a měřené vzorky, potvrzuje tato shoda spolehlivost použitého metodického postupu. Z hodnot teplot tání je zřejmé, že všechny odchylky od struktury úplného duplexu vedou ke snížení stability komplexu, přičemž vliv výdutě a vnitřní smyčky je srovnatelný. Při současné přítomnosti dvou strukturních odchylek se jejich vliv přibližně sčítá, což je vidět z toho, že teploty tání komplexů jen s vnitřní smyčkou ($LCSI_{wB}+Let7$) nebo jen s výdutí ($LCSI_{wL}+Let7sh$) mají teplotu tání přibližně na průměru teploty tání úplného duplexu ($LCSI_{sh}+Let7sh$) a komplexů se dvěma výdutěmi ($LCSI_{wL}+Let7wL$) nebo přirozeného komplexu s výdutí a vnitřní smyčkou ($LCSI+Let7$).

Přes omezenou přesnost určených změn entalpie a entropie při vzniku komplexu je zřejmé, že hlavním faktorem při snížení stability přirozeného komplexu je jeho větší entropická nevýhodnost, což může znamenat, že současná přítomnost výdutě i vnitřní smyčky je spojená s určitým strukturním omezením komplexu. Jasnější interpretaci by v budoucnu mohly přinést počítačové simulace dynamiky komplexu a jejího porovnání s úplným duplexem.

Diferenční spektrum (viz obr. 24) odpovídající rozpadu komplexu je ve všech případech velmi podobné, což ukazuje na to, že hlavní podíl na změně spektra má rozpad komplementárních párů, jejichž počet a složení je u všech měřených komplexů stejné.

Drobné rozdíly jsou způsobeny jednak nepřesnostmi v koncentracích, což dokumentuje přibližně 8% rozdíl ve výšce maxima pásu u komplexu $LCSI+Let7$ měřeného v rámci této práce a v diplomové práci (Homolka 2018). Dalším faktorem je příspěvek bází ve vnitřní smyčce a/nebo výdutí, jejichž poloha vzhledem k ostatním bázím se při rozpadu komplexu mění.

Tvar pásu diferenčního spektra je, na rozdíl od celkových spekter UV absorpce, mírně strukturovaný – vedle hlavního maxima při 258 nm jsou vidět slabě rozlišená vedlejší maxima v polohách přibližně 250 a 266 nm. Při srovnání absorpčních spekter mononukleotidů a RNA homopolymerů (Řezáčová 2009) je možné interpretovat tento tvar diferenčního spektra jako důsledek rozdílné hypochromicity jednotlivých bází spojené s možnými spektrálními posuny při rozpadu komplexu. Přitom v oblasti 250 nm by se měl nejvíce projevit guanosin, u 258 nm uridin a adenosin a u 266 nm cytidin (Řezáčová 2009).

Změna teploty o 20 °C vyvolává u komplexů samozřejmě menší změny UV absorpčního spektra než rozpad komplexu (přibližně 8x menší maximální změna), nicméně se jedná o signifikantní charakteristiku. Reprodukovatelnost diferenčního spektra dobře demonstruje srovnání diferenčních spekter komplexu *LCSI+Let7* ze dvou prací, která se při uvážení přibližně 8% nesrovnalosti v koncentracích velmi dobře shodují. Na rozdíl od změny spektra při rozpadu komplexů (viz obr. 24 nahoře) se změny s růstem teploty (viz obr. 24 dole) od sebe poměrně výrazně liší, a to jak celkovou velikostí, tak tvarem spektrálního průběhu. Pokud budeme tyto změny interpretovat poklesem stacking interakce (tj. přitažlivé síly mezi π -elektrony planárních dusíkatých bází) jednotlivých bází v důsledku zvětšení teploty, ukazují na vliv vnitřní smyčky či výdutě na flexibilitu struktury v určitých částech komplexu. V oblasti 258 nm, kde se domníváme, že dominuje adenosin, je největší změna u přirozeného komplexu *LCSI+Let7* (obsahuje dva adenosiny mimo komplementární páry), přibližně poloviční u dalších komplexů obsahujících jeden adenosin (*LCSIwB+Let7*, *LCSIwL+Let7sh*) a téměř nulová u úplného duplexu. Poněkud se však tomuto pořadí vymyká komplex *LCSIwL+Let7wL* se dvěma výdutěmi tvořenými adenosiny – to naznačuje, že závislost na odchylkách od sekvence úplného duplexu je složitější. To je dobře patrné v oblasti kolem 245 nm, kde je nejmenší změna u komplexu *LCSIwL+Let7sh*, obsahujícího jednu výdut'. To naznačuje, že v určitých ohledech může přítomnost výdutě i zvýšit rigiditu geometrie komplexu. Podobně jako v případě zjištěných termodynamických parametrů, i zde lze očekávat zpřesnění interpretace při porovnání s výsledky počítačových molekulárně-dynamických simulací.

Závěr

V rámci předkládané práce byla proměřena teplotní závislost UV absorpčních spekter miRNA *Let7*, její cílové sekvence v mRNA označené *LCSI* a jejich analog s mutovanými sekvencemi, a to jak jednotlivě, tak ve směsích v poměru 1:1. Výsledky měření byly zpracovány pomocí faktorové analýzy (SVD rozklad) a v případě směsí analyzovány fitováním s použitím termodynamického modelu pro dvoumolekulární reakci podle van't Hoffovy rovnice.

Výsledky práce doplnily měření a výsledky získané v diplomové práci Radima Homolky (Homolka 2018). Tím vznikl ucelený soubor experimentálních dat, který umožnil porovnání vlivu přítomnosti odchylek od sekvence úplného duplexu v komplexu *Let7* a *LCSI*, jmenovitě vnitřní smyčky a výdutě, na termodynamickou stabilitu a flexibilitu komplexu. Za hlavní výsledky práce lze považovat:

- 1) Bylo zjištěno, že UV absorpční spektra samostatných řetězců vykazují relativně výrazné plynulé změny s teplotou, které s výjimkou nejvyšších teplot nejsou lineární. Tyto změny naznačují, že při nízkých teplotách existuje jistý druh uspořádanosti struktury jednoduchého řetězce.
- 2) Byly určeny velikosti poklesu entalpie a poklesu entropie při vzniku měřených komplexů. Z celkového porovnání výsledků vyplývá, že všechny odchylky od struktury úplného duplexu vedou ke snížení stability komplexu, přičemž vliv výdutě a vnitřní smyčky je srovnatelný. Hlavním faktorem při snížení stability přirozeného komplexu je jeho větší entropická nevýhodnost.
- 3) Byla zkonstruována diferenční spektra odpovídající rozpadu komplexu, která jsou ve všech případech velmi podobná. To ukazuje na to, že hlavní podíl na změně spektra při rozpadu komplexu má rozpojování komplementárních párů, jejichž počet a složení je u všech srovnávaných komplexů stejné.
- 4) Rovněž byla zkonstruována diferenční spektra ukazující vliv zvýšení teploty u komplexů o 20 °C. Tato spektra ukazují na odlišnou flexibilitu jednotlivých komplexů. Vliv přítomnosti vnitřní smyčky nebo výdutě není zřejmě triviální, protože velikost spektrálních změn závisí na vlnové délce. To ukazuje na různé podíly jednotlivých typů bází. Uplatňují se zde zřejmě i části řetězců vytvářejících komplementární páry.

Výsledky práce rovněž dobře demonstřují (díky srovnání s předchozí prací u nemutovaného komplexu) přesnost a reprodukovatelnost výsledků měření a ukazují

vhodnost použité metodiky vyhodnocení dat. Byl tak získán zkompletovaný soubor spektroskopických dat, který představuje vhodný experimentální podklad pro návržení a vyhodnocení budoucích počítačových simulací.

Seznam použité literatury

ALBERTS, B. et al. (2002). *Molecular biology of the cell*. 4th edition. Garland Science, New York. ISBN 0-8153-3218-1.

ANDĚL, J. (1985). *Matematická statistika*. SNTL, Praha.

BOYERINAS, B., PARK, S., HAU, A., MURMANN, A. E., PETER, E. M. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine-Related Cancer*, **17**(1), F19-F36. DOI: 10.1677/ERC-09-0184.

CATALANOTTO, C., COGONI, C., ZARDO, G. (2016). MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**(10). DOI: 10.3390/ijms17101712.

DAVIS, L. G., DIBNER, M. D., BATTEY, J. F. (1986). *Basic methods in Molecular Biology*. Elsevier, New York. ISBN 0-444-01082-3.

Dharmacon – RNAi, Gene Expression and Gene Editing [online]. Dharmacon, ©2018 [cit. 2019-04-21]. Deprotection of 2-ACE protected RNAi (protocol). Dostupné z: <https://dharmacon.horizondiscovery.com/uploadedFiles/Resources/deprotection-of-2-ace-protected-rnai-protocol.pdf>

GRIFFITHS-JONES, S. (2004). The microRNA Registry. *Nucleic Acids Research*, **32**, 109D-111. DOI: 10.1093/nar/gkh023.

GRIFFITHS-JONES, S., GROCOCK, R. J., van DONGEN, S., BATEMAN, A., ENRIGHT, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, **34**, D140-D144. DOI: 10.1093/nar/gkj112.

HOMOLKA, R. (2018). *Komplexy miRNA s cílovou RNA sekvencí*. Diplomová práce. MFF UK, Praha.

HIRABARA, S. M., GORJÃO, R., VINOLO, M. A., RODRIGUES, A. C., NACHBAR, R. T., CURI, R. (2012). Molecular Targets Related to Inflammation and Insulin Resistance and Potential Interventions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2012**, 1-16. DOI: 10.1155/2012/379024.

HUMPHREYS, D. T., WESTMAN, B. J., MARTIN, D. I. K., PREISS, T. (2008). *MicroRNAs: from basic science to disease biology*. Cambridge University Press. Cambridge. ISBN 978-0-521-86598-2.

KAMANU, T. K. K., RADOVANOVIC, A., ARCHER, J. A. C., BAJIC, V. B. (2013). Exploration of miRNA families for hypotheses generation. *Scientific Reports*, **3**(2940). DOI: 10.1038/srep02940.

KOZOMARA, A., BIRGAOANU, M., GRIFFITHS-JONES, S. (2019). MiRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, **47**(D1), D155-D162. DOI: 10.1093/nar/gky1141.

LEE, R. C., FEINBAUM, R. L., AMBROS, V. (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**(5), 843-854. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y

MALINOWSKI, E. R., (1991). *Factor Analysis in Chemistry*. Wiley, New York. ISBN 0471530093

MIZUNO, R., KAWADA, K., SAKAI, Y. (2018). The Molecular Basis and Therapeutic Potential of Let-7 MicroRNAs against Colorectal Cancer. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **2018**, 1-7. DOI: 10.1155/2018/5769591.

O'BRIEN, J., HAYDER, H., ZAYED, Y., PENG, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinolog* **2018**, 9. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402.

PASQUINELLI, A. E., REINHART, B. J., SLACK, F. et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, **408**(6808), 86-89. DOI: 10.1038/35040556.

PROSSER, V. et al. (1989). *Experimentální metody biofyziky*. Academia, Praha. ISBN 80-200-0059-3.

REINHART, B. J., SLACK, F. J., BASSON, M., PASQUINELLI, A. E., BETTINGER, J. C., ROUGVIE, A. E., HORVITZ, H. R., RUVKUN, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **403**(6772), 901-906. DOI: 10.1038/35002607.

ŘEZÁČOVÁ, B. (2009). *Strukturní flexibilita regulačního segmentu DNA*. Diplomová práce. MFF UK, Praha.

WIGHTMAN, B., HA, I., RUVKUN, G. (1993). Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *lin-14* by *lin-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans*. *Cell*, **75**, 855-862. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90530-4.

SAENGER, W. (1984). *Principles of nucleic acid structure*. Springer-Verlag, New York. ISBN 0387907610.

VOET, D., VOET, J. G. (1995). *Biochemie*. Victoria Publishing, Praha. ISBN 80-85605-44-9.

WANG, X., CAO, L., WANG, Y., WANG, X., LIU, N., YOU, Y. (2012). Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncology Letters*, **3**(5), 955-960. DOI: 10.3892/ol.2012.609.

WATSON, J. D., CRICK F. H. C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, **737**(4356).

Seznam použitých zkratek

A	adenin
AA	aminokyselina
Ago	argonaut
Ala	alanin (AA)
Arg	arginin (AA)
Asn	asparagin (AA)
Asp	kyselina asparagová (AA)
C	aytosin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> (hád'átko obecné)
Cys	cystein (AA)
DGRC8	(„DiGeorge chromosomal region 8“)
DNA	deoxyribonukleová kyselina („Deoxyribonucleid acid“)
Expo-5	exportin 5
FA	faktorová analýza
G	guanin
Gln	glutamin (AA)
Glu	kyselina glutamová (AA)
Gly	glycin (AA)
His	histidin (AA)
HMG2	(„High-mobility group AT-hook2“)
Ile	isoleucin (AA)
IR	infračervené záření („infrared“)
Leu	leucin (AA)
Lys	lysin (AA)
Met	methinonin (AA)
miRNA	mikroRNA
mRNA	messenger RNA
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
Phe	fenylalanin (AA)
pre-miRNA	prekurzor mikroRNA
pri-miRNA	primární mikroRNA
Pro	prolin (AA)
Ran-GTP	Ran-guanosintrifosfát
RISC	(„RNA-induced silencing complex“)
RNA	ribonukleová kyselina („Ribonucleic acid“)
rRNA	ribosomální RNA
Ser	serin (AA)
SVD	singulární rozklad („Singular Value Decomposition“)
T	thymin
TEMED	tetramethylethylendiamin
Thr	threonin (AA)
Tm	teplota tání („melting temperature“)

tRNA	transferová RNA
Trp	tryptofan (AA)
Tyr	tyrosin (AA)
UTR	(„untranslated region“)
UV	ultrafialové záření („ultraviolet“)
Val	valin (AA)
VIS	viditelné záření („visible“)