

UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

STUDIJNÍ PROGRAM: BIOCHEMIE

STUDIJNÍ OBOR: BIOCHEMIE



Bc. Anna Volejníková

Stimulace proliferace pankreatických β -buněk pomocí syntetické mRNA

Stimulation of pancreatic β -cells proliferation by synthetic mRNA

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Konzultant: RNDr. Tomáš Koblas, PhD.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Tomáše Koblase, Ph.D. a prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a že jsem všechny použité informační zdroje řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Anna Volejníková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda vyjádřila své poděkování RNDr. Tomáši Koblasovi, PhD. za odborné vedení mé diplomové práce, jak během experimentální části, tak při závěrečném sepsování. Nemohu opomenout mimořádnou vstřícnost a lidský přístup, kterého se mi vždy dostalo. Děkuji Mgr. Šárce Loukotové a Mgr. Ivanu Leontovyčovi za pomoc při experimentální činnosti.

Mé díky dále patří RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za konzultace v průběhu vypracování mé práce a za finální korekturu.

Tato práce by nemohla vzniknout bez pomoci celé mé nejbližší rodiny, proto jim rovněž patří mé upřímné poděkování. V úplném závěru bych chtěla poděkovat mé malé dceři, která pro mě byla v průběhu studia mojí největší motivací.

ABSTRAKT

Diabetes mellitus je závažné metabolické onemocnění spojené s téměř úplnou ztrátou insulin-produkujících β -buněk nebo s výrazným snížením jejich funkčnosti. Předmětem současného výzkumu je proto hledání efektivních způsobů regenerace β -buněk. Jedním z možných způsobů je stimulace jejich proliferace.

Jako potenciálně vhodná molekula pro stimulaci proliferace pankreatických β -buněk se jeví transkripční faktor c-Myc. Navýšení exprese tohoto onkoproteinu formou adenovirových nosičů s sebou ovšem nese riziko dediferenciace buněk a rozvoje nádorového bujení. Z tohoto důvodu byla v předkládané diplomové práci ověřena možnost využití synteticky připravené mRNA pro expresi proteinu c-Myc. Použití *in vitro* připravené c-Myc-mRNA umožňuje v cílové buňce dosáhnout krátkodobé, avšak vysoké míry exprese transkripčního faktoru c-Myc. Po transfekci syntetické c-Myc-mRNA do buněk disociovaných potkaních Langerhansových ostrůvků byla v buňkách pomocí metody nepřímé imunofluorescence detekována exprese c-Myc na proteinové úrovni ve vysoké míře. Po 48 hodinách od transfekce buněk nebyla již exprese c-Myc v tak vysoké míře detekována. Právě fyziologická degradace c-Myc-mRNA cílovou buňkou je faktor, který výrazně snižuje riziko rozvoje nádorového bujení.

Transfekce c-Myc-mRNA do potkaních ostrůvkových buněk způsobila prokazatelný nárůst počtu proliferujících β -buněk. Zatímco za fyziologického stavu proliferuje maximálně 3 % potkaních β -buněk, míra proliferace β -buněk indukovaná pomocí c-Myc-mRNA se pohybovala v rozmezí 35-70 % v závislosti na koncentraci syntetické mRNA. Dále bylo zjištěno, že přidání sloučeniny CHIR99021, inhibitoru GSK3 β , zvyšuje počet proliferujících β -buněk o dalších 5-13 %. Po transfekci c-Myc-mRNA byla v pankreatických β -buňkách analýzou genové exprese zjištěna vyšší míra exprese genů stimulujících buněčné dělení (cykliny a cyklin-dependentní kinasy). Dále byla v ostrůvkových buňkách transfekovaných c-Myc-mRNA prokázána zvýšená exprese genů kódujících pankreatické hormony; genů regulujících expresi insulinu a metabolismus glukosy, a genů pro některé transkripční faktory.

Klíčová slova:

pankreatické β -buňky, proliferace, c-Myc, *in vitro* transkripce

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a severe metabolic disease associated either with loss or functional impairment of insulin-producing β -cells. A major goal in diabetes research is to develop effective ways of pancreatic β -cells restoration. One of the possible approaches is the stimulation of β -cell proliferation.

Transcription factor c-Myc is one of the promising targets for stimulation of β -cell proliferation. However, the adenovirus-mediated long-term overexpression of this oncoprotein is associated with risk of cellular dedifferentiation, apoptosis and development of cancer. Therefore, the applicability of an alternative approach for the c-Myc ectopic expression, based on the in-vitro transcribed synthetic mRNA, was verified in this thesis. Use of in vitro transcribed c-Myc-mRNA allows achieving short-term overexpression of transcription factor c-Myc in host cells. High level of c-Myc expression by the β -cells, was detected following the transfection with c-Myc-mRNA. However, within the 48 hours the expression level of c-Myc protein declined to the basic level. The physiological degradation of c-Myc-mRNA by the host cells is a key factor that reduces the risk of cancer development.

Transfection of rat islet cells with c-Myc-mRNA resulted in a significantly increased β -cell proliferation. Under the physiological conditions, the proliferation rate of adult rat β -cells achieves 3 %, whereas c-Myc-mRNA induced β -cells proliferation ranged from 35 to 70 % depending on the concentration of applied synthetic mRNA. Furthermore, addition of CHIR99021, GSK3 β inhibitor, increased the number of proliferating β -cells by additional 5-13 %.

In addition it was revealed that synthetic mRNA based overexpression of c-Myc led to the increased expression of cell cycle regulators (cyclin and cyclin-dependent kinases) in pancreatic islets cells. Furthermore, the expression of genes encoding pancreatic hormones, genes that regulate insulin secretion and glucose metabolism and genes encoding certain transcription factors has also increased in islet cells transfected with c-Myc-mRNA. (In Czech)

Key words:

pancreatic β -cells, proliferation, c-Myc, *in vitro* transcription

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1	ÚVOD	10
1.1	Obecné vlastnosti β -buněk.....	10
1.1.1	Role insulinu v metabolismu glukosy	11
1.1.2	Diabetes mellitus I. a II. typu	12
1.2	Molekulární regulace buněčného cyklu β -buněk.....	13
1.2.1	Proliferace lidských β -buněk v průběhu života.....	13
1.2.2	Regulátory buněčného cyklu a přechod z G_1 do S fáze	14
1.2.3	Intracelulární signalizace.....	17
1.2.4	Transkripční faktor c-Myc.....	19
1.2.5	Pravděpodobné příčiny nízkého počtu proliferujících lidských β -buněk.....	21
1.3	Použití syntetické mRNA pro účely buněčné terapie	23
1.3.1	Základní strukturní elementy mRNA	23
1.3.2	Princip terapeutického využití syntetické mRNA	27
1.3.3	Imunitní odpověď buňky na přítomnost exogenní mRNA	29
1.3.4	Strukturní modifikace ovlivňující stabilitu syntetické mRNA a účinnost translace v cílové buňce	29
2	CÍL PRÁCE	33
3	MATERIÁL A METODY	34
3.1	Použité přístroje a materiál	34
3.1.1	Přístrojové vybavení a nástroje	34
3.1.2	Použité chemikálie a biologický materiál	34
3.1.3	Použité komerční kity.....	35
3.2	Příprava DNA templátu pro <i>in vitro</i> transkripci mRNA	37
3.3	Příprava syntetické mRNA kódující transkripční faktor c-Myc.....	38
3.3.1	<i>In vitro</i> transkripce	40
3.3.2	Purifikace syntetické mRNA.....	40
3.3.3	Posttranskripční enzymatické čepičkování	40
3.3.4	Defosforylace antarktickou fosfatasou.....	41
3.3.5	Polyadenylace.....	41
3.3.6	Izolace IVT mRNA	41

3.4	Stanovení koncentrace mRNA	42
3.5	Transfekce syntetické mRNA pro c-Myc do potkaních buněk Langerhansových ostrůvků	42
3.6	Detekce proliferujících buněk pomocí fluorescenčního značení.....	43
3.7	Izolace celkové buněčné RNA	45
3.8	Kvantitativní PCR s reversní transkripcí	45
4	VÝSLEDKY	48
4.1	Příprava DNA templátu pro syntézu mRNA	48
4.2	<i>In vitro</i> syntéza mRNA kódující transkripční faktor c-Myc.....	49
4.2.1	Detekce proteinu c-Myc v disociovaných buňkách Langerhansových ostrůvků po transfekci c-Myc-mRNA.....	51
4.2.2	Transfekce syntetické mRNA do potkaních buněk disociovaných Langerhansových ostrůvků	53
4.2.3	Stanovení genové exprese po transfekci buněk disociovaných LO syntetickou c-Myc-mRNA	56
5	DISKUSE	63
6	SOUHRN	69
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	70

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACTB	β -aktin
ADP	adenosindifosfát
ARCA	syntetický analog 5' čepičky (anti-reverse cap analogue)
AREs	oblasti bohaté na AU páry (AU-rich elements)
ATP	adenosintrifosfát
BMI1	methylační enzym (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog)
bp	pár bází (base pair)
CBP	čepičku vázající proteiny (cap binding proteins)
CDK	cyklin-dependentní kinasa (cyclin-dependent kinase)
CIP/KIP	proteiny interagující s CDK/proteiny inhibující kinasy (CDK interacting protein/kinase inhibitory protein)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
dH₂O	destilovaná voda
DM	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dNTPs	deoxyribonukleotidy
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylendiamintetraacetic acid)
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridin
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
EZH2	methylační enzym (enhancer of zeste homolog 2)
GIT	gastrointestinální trakt
GSK-3	kinasa glykogensynthasy 3
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
CHREBP	transkripční faktor (carbohydrate response element-binding protein)
IGF	insulinový růstový faktor (insulin growth factor)
INK4	inhibitory kinasy 4
IRE	iron response elements
IRES	internal ribosome entry side

IRS	insulin receptor substrate
IVT	<i>in vitro</i> transkripce (<i>in vitro</i> transcription)
MAX	protein vázající Myc proteiny (Myc-associated protein)
MDA5	RNA helikasa (melanoma differentiation-associated protein)
miRNA	mikroRNA
MREs	sekvence vázající mikroRNA (microRNA responsive elements)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
mTOR	regulační protein (mammalian target of rapamycin)
Myc, c-Myc	skupina transkripčních faktorů (název odvozen z homologie s onkogenem přítomným u viru Myelocytomatosis); c-Myc (cellular Myc)
ORF	otevřený čtecí rámec (open reading frame)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa (phosphatidylinositol 3-kinase)
PKB	proteinkinasa B
pRb	protein retinoblastoma
RE	restrikční endonukleasy
RIG-I	RNA helikasa (retinoic acid-inducible gene I protein)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
rNTPs	ribonukleotidy
SAM	S-adenosylmethionin
T1DM	diabetes mellitus 1. typu
T2DM	diabetes mellitus 1. typu

1 ÚVOD

Dle současných odhadů je na celém světě asi 425 milionů lidí s diabetem mellitus (Piemonte, 2019). Jedná se o souhrnné označení pro chronická metabolická onemocnění, jejichž společným rysem je hyperglykémie. Nejčastěji se setkáváme s tzv. diabetem prvního (T1DM) nebo druhého typu (T2DM). V případě T1DM se jedná o geneticky podmíněné, autoimunitní onemocnění provázené selektivní destrukcí insulin-produkujících buněk – tzv. β -buněk, což vede k absolutnímu nedostatku insulinu. K rozvoji T2DM (tj. „non-insulin dependentní diabetes mellitus“) dochází až v průběhu života, patrně díky kombinaci vnějších vlivů a genetických predispozicí. Přibližně 90 % diabetiků trpí tímto typem diabetu. T2DM je spojen s tzv. insulinovou rezistencí a rovněž s dysfunkcí či sníženým počtem β -buněk (Cho et al, 2011; Cnop et al., 2005).

Díky nedostatečné produkci insulinu jsou tak pacienti celoživotně odkázáni na jeho injekčním podávání. Jediná, v současnosti dostupná léčba, je nahrazení chybějících β -buněk transplantací buď celého pankreatu, nebo izolovaných Langerhansových ostrůvků. Tento způsob s sebou však nese řadu potenciálních komplikací, ať už se jedná o alloimunitní reakce na transplantovanou tkáň nebo následné zatížení organismu imunosupresivními léky. Významnou komplikací je trvalý nedostatek tkáně vhodné k transplantaci. Uvedené důvody vedou k intenzivnímu studiu vhodných alternativ. Možným přístupem je buněčná terapie založená buď na diferenciaci lidských embryonálních nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk na insulin produkující β -buňky, či na transdiferenciaci jiných endokrinních nebo exokrinních buněk pankreatu (Zhou et al., 2008). V současné době dochází k obrovskému rozvoji výzkumu orientujícího se na regeneraci β -buněk prostřednictvím indukce jejich proliferace. Pro tyto účely je klíčová detailní znalost molekulárních mechanismů průběhu buněčného cyklu a s ním spjatých regulačních molekul pankreatických β -buněk .

1.1 Obecné vlastnosti β -buněk

β -buňky jsou jedním z druhů endokrinních buněk nacházejících se v morfoloicky i funkčně odlišných částech pankreatu – v tzv. Langerhansových ostrůvcích. Tyto buněčné shluky zaujímají jen asi 1-2% z celkového objemu pankreatu. Většina tkáně je tvořena buňkami produkujícími trávicí enzymy. Úkolem endokrinních pankreatických buněk je obecně produkce

látek hormonální povahy do krevního oběhu. Vlastní β -buňky tvoří asi 70-80 % z celkového počtu buněk ostrůvků a jejich hlavní úlohou je prostřednictvím sekrece insulínu snižovat koncentraci glukosy v krvi a tím zajišťovat konstantní hodnoty glykémie. Dalším buněčným typem jsou α -buňky produkující glukagon, který svými účinky působí jako antagonist insulínu (Robb, 1961). V menším zastoupení jsou v Langerhansových ostrůvcích přítomny δ -buňky produkující somatostatin a PP buňky, které sekretují tzv. pankreatický polypeptid (Adrian et al., 1976).

1.1.1 Role insulínu v metabolismu glukosy

Insulín je v organismu syntetizován ve formě preproinsulínu, který je následně v endoplasmatickém retikulu proteolyticky štěpen na proinsulín. Po transportu do Golgiho aparátu je proinsulín po odštěpení tzv. spojovacího peptidu (tj. C-peptid) přeměněn na insulín. Působením Zn^{2+} insulín precipituje za vzniku mikrokryсталů skladovaných v sekrečních granulích. Molekula insulínu je složena ze dvou polypeptidových řetězců; řetězců A tvořeného 21 aminokyselinami a řetězce B o délce 30 aminokyselin. Řetězce jsou navzájem spojeny dvěma disulfidickými můstky (Ryle et al., 1955).

V organismu dochází v průběhu dne ke kontinuální, tzv. bazální sekreci insulínu, která zaujímá přibližně 50 % veškerého množství vyloučeného insulínu. Při náhlém nárůstu glykémie (nutriční stimul) dochází k tzv. stimulované sekreci insulínu. Glukosa vstupuje skrze glukosový transportér GLUT-1 do lidské β -buňky, kde je po sérii katabolických kroků finálně oxidována v rámci Krebsova cyklu. Důsledkem toho dochází v buňce k nárůstu poměru koncentrace ATP/ADP (adenosintrifosfát, resp. adenosindifosfát), což způsobí uzavření ATP-senzitivního K^+ kanálu a uvolnění draselných iontů z buňky. Následkem depolarizace jsou otevřeny napětově řízené Ca^{2+} kanály, čímž dojde k vzestupu intracelulární koncentrace vápníku v cytosolu a konečnému uvolnění insulínu ve formě sekrečních granulí. Kromě glukosy existuje řada jiných látek, které mohou rovněž stimulovat β -buňky k sekreci insulínu. Jedná se například o aminokyseliny leucin (Floyd et al., 1963), arginin a s ním spojené oxidy dusíku (Schmidt et al., 1992) nebo acetylcholin.

Biologický efekt insulínu je založen na vazbě na insulínový receptor (IR) nacházející se na membráně cílových buněk. IR je dimer složený z α -podjednotky a β -podjednotky s tyrosin-kinasovou aktivitou (Kasuga et al., 1982). Po vazbě insulínu na α -podjednotku IR přítomnou na extracelulární straně dochází k autofosforylaci β -podjednotky uvnitř buňky. V buňce poté dochází k fosforylaci proteinů známých jako IRS (insulin receptore substrates) a

následné aktivaci specifických signálních drah, mj. PI3K-Akt signální dráhy (viz dále kap. 1.2.3). V konečném důsledku dochází k translokaci glukosového transporteru GLUT4 ve formě vesikulu z intracelulárního prostoru na buněčný povrch myocytů a adipocytů (Suzuki a Kono, 1980). Glukosa pak může vstupovat prostřednictvím tohoto přenašeče do svalové a tukové tkáně, což má za následek snížení její koncentrace v krevním oběhu. Kromě regulace glukosového metabolismu se insulin dále nepřímo podílí na metabolismu lipidů a proteinů. Rovněž funguje jako stimul pro buněčný růst a proliferaci.

1.1.2 Diabetes mellitus I. a II. typu

Jako diabetes mellitus se souhrnně označují taková metabolická onemocnění, která jsou provázena hyperglykemií způsobenou ztrátou produkce insulinu (T1DM) nebo defektem v sekreci insulinu a jeho následnými účinky (T2DM). Následkem chronické hyperglykémie může docházet k multiorgánovému poškození organismu; převážně ledvin, periferní nervové soustavy, zrakového ústrojí, srdce a cév. Dle etiopatogenetických mechanismů lze rozdělit diabetes na diabetes mellitus 1. typu (T1DM), 2. typu (T2DM), gestační diabetes a ostatní specifické typy diabetu (dané např. genetickým defektem β -buněk) (American Diabetes Association, 2014). Valná většina případů diabetu přitom spadá do prvních dvou uvedených typů. Zatímco u dětí a adolescentů trpících diabetem se z 90% jedná o T1DM, prevalence T2DM výrazně vrůstá až s pokročilým věkem jedince.

T1DM je charakterizován naprosto minimálním až absolutním nedostatkem endogenního insulinu z důvodu selektivní destrukce β -buněk imunitním systémem. U většiny diabetiků 1. typu se v krevním oběhu nachází specifické autoprotilátky, konkrétně se jedná o protilátky proti ostrůvkům, insulinu a glutamátdekarboxylase (Pihoker et al., 2005). Na rozvoji T1DM mají prokazatelně vliv genetické faktory, především polymorfismus genů v HLA oblasti. Kromě dědičných faktorů jsou diskutovány i potenciální exogenní vlivy, jako například destrukce β -buněk spojená s virovou infekcí. V současné době dosud neexistuje efektivní léčba tohoto typu diabetu. Pacienti jsou zatím odkázáni na celoživotní exogenní podávání insulinu, buď pomocí insulinových per nebo insulinové pumpy.

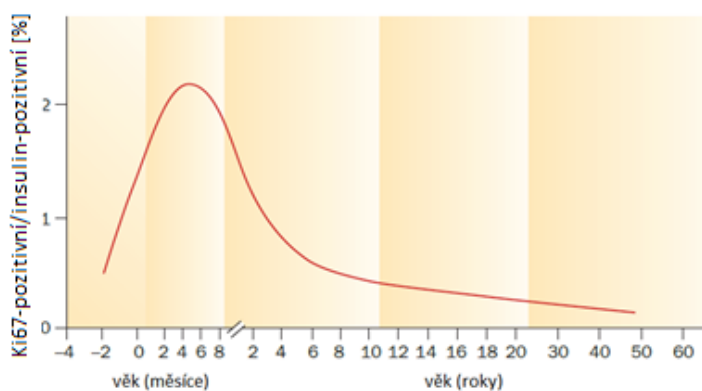
T2DM je multifaktoriální onemocnění, na jehož rozvoji mají vliv jak genetické predispozice, tak životní styl – z tohoto důvodu bývá T2DM někdy řazen mezi tzv. civilizační choroby. Naprostá většina pacientů trpících T2DM má tělesnou nadváhu nebo obezitu. Tento typ diabetu je spojen s termínem „insulinová rezistence“. Jde o patologický stav, kdy fyziologické množství insulinu produkuje subnormální biologickou odpověď. Nedochozí

k dostatečnému transportu glukosy z krevního oběhu do cílových tkání, v důsledku čehož vzniká relativní hyperglykémie. Následkem chronické hyperglykémie může rovněž dojít ke snížení funkčnosti či ztrátě β -buněk (Leibowitz et al., 2011). Základem úspěšné léčby je v první řadě redukce tělesné váhy.

1.2 Molekulární regulace buněčného cyklu β -buněk

1.2.1 Proliferace lidských β -buněk v průběhu života

Během embryonálního vývoje dochází k diferenciaci pankreatických buněk z epitelové tkáně tvořící základ budoucího gastrointestinálního traktu (GIT). Uvedeným procesem, označovaným také jako neogeneze, vzniká většina embryonálních a fetálních β -buněk. Během gestačního vývoje získávají buňky postupně schopnost proliferovat (Meier et al., 2010). Dříve se věřilo, že je lidský pankreas od okamžiku narození jedince tvořen určitým počtem β -buněk a v průběhu života se jejich počet již nadále nezvyšuje. Řada současných studií však prokázala, že β -buňky jsou během života nadále schopny vznikat jak procesem neogeneze, tak proliferací již existujících buněk. V postnatálním období je již míra neogeneze β -buněk v podstatě zanedbatelná, nové buňky vznikají tak výhradně dělením (Gregg et al., 2012). I přesto je ale proliferační index velmi nízký a s přibývajícím věkem jedince dále strmě klesá (viz obr. 2). Celkový počet β -buněk v pankreatu je rovněž mezi jedinci vysoce individuální, udávané rozmezí nejčastěji kolísá mezi 0,1 až 2,0 g (Saisho et al., 2013). S tím mimo jiné značně souvisí i individuální riziko pozdějšího propuknutí diabetu druhého typu.



Obrázek 1: Proliferace lidských β -buněk v průběhu života. V podmínkách *ex vivo* byla pomocí proliferačního markeru Ki67 detekována buněčná proliferace. Nejsnáze buňky proliferují v prvním

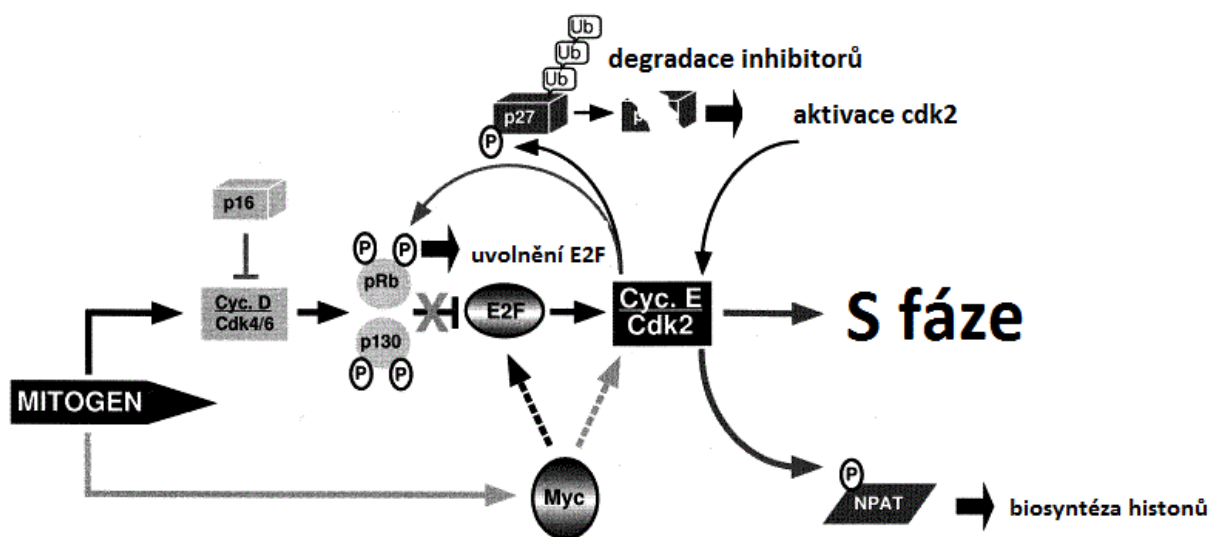
roce života, i tak dosahuje proliferační index však pouhých 2%. Později je proliferace β -buněk již na hranici detekce. Převzato a upraveno z (Wang et al, 2012).

Jak je patrné z předešlého grafu, nejnáze β -buňky proliferují v prvním roce života. Toto období se však pro rozsáhlé klinické studie nejeví jako příliš vhodné. Naproti tomu většina dostupné pankreatické tkáně použitelné k transplantaci pochází od dárců v pokročilém dospělém věku. U těchto stárnoucích buněk je však již velmi obtížné aktivně navodit jejich proliferaci. V současné době nejsou stále ještě detailně známy veškeré regulační mechanismy řídící proliferaci β -buněk. Z tohoto důvodu je indukce proliferace těchto buněk v podmínkách *in vitro* stále poměrně obtížná a doposud nepříliš efektivní.

1.2.2 Regulátory buněčného cyklu a přechod z G_1 do S fáze

Jako buněčný cyklus se obecně označuje sled přísně koordinovaných procesů, kterými buňka prochází od svého vzniku po své rozdělení na dvě totožné buňky dceřiné. Předpokladem úspěšného rozdělení buňky je zdvojení genetického materiálu během syntetické fáze cyklu (S) a následné rozdělení jádra a celé buňky během mitosy (M). Cyklus je dále tvořen dvěma přípravnými fázemi G_1 a G_2 , během nichž dochází k syntéze proteinů potřebných pro optimální průběh replikace DNA a následné mitosy. Buňka může eventuálně vstoupit do tzv. klidové, G_0 fáze. V tomto okamžiku se buněčný cyklus zastaví a buňka se již nadále nedělí (Vermeulen et al, 2003). Mezi hlavní regulátory procesů probíhajících během všech fází buněčného cyklu patří hlavně tzv. **cyklin-dependentní kinasy** (CDK). CDK vykazují aktivační kinasovou aktivitu, jak plyne z názvu, pouze v komplexu s aktivačními proteiny zvanými **cykliny**. Zatímco koncentrace CDK je v průběhu buněčného cyklu prakticky konstantní, hladina cyklinů se průběžně mění a tak periodicky aktivují CDK (Morgan, 1995). Aby nedocházelo k nadměrné expresi cyklinů a CDK, což by mohlo potenciálně vést k nádorovému bujení, je jejich aktivita přísně regulována specifickými inhibitory – CDKI (cyclin-dependent kinase inhibitor). Jsou známy dvě skupiny těchto inhibitorů, označované jako **CIP/KIP** (CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein) a **INK4** (inhibitors of CDK4) proteiny, které se navzájem liší svou specifitou. Inhibitory ze skupiny CIP/KIP se s různou afinitou váží na všechny cyklin-CDK komplexy, přičemž nejvyšší inhibiční efekt vykazují při vazbě na CDK2. Naopak INK4 inhibitory striktně interagují pouze s CDK4 nebo s CDK6 (Vidal a Koff, 2000).

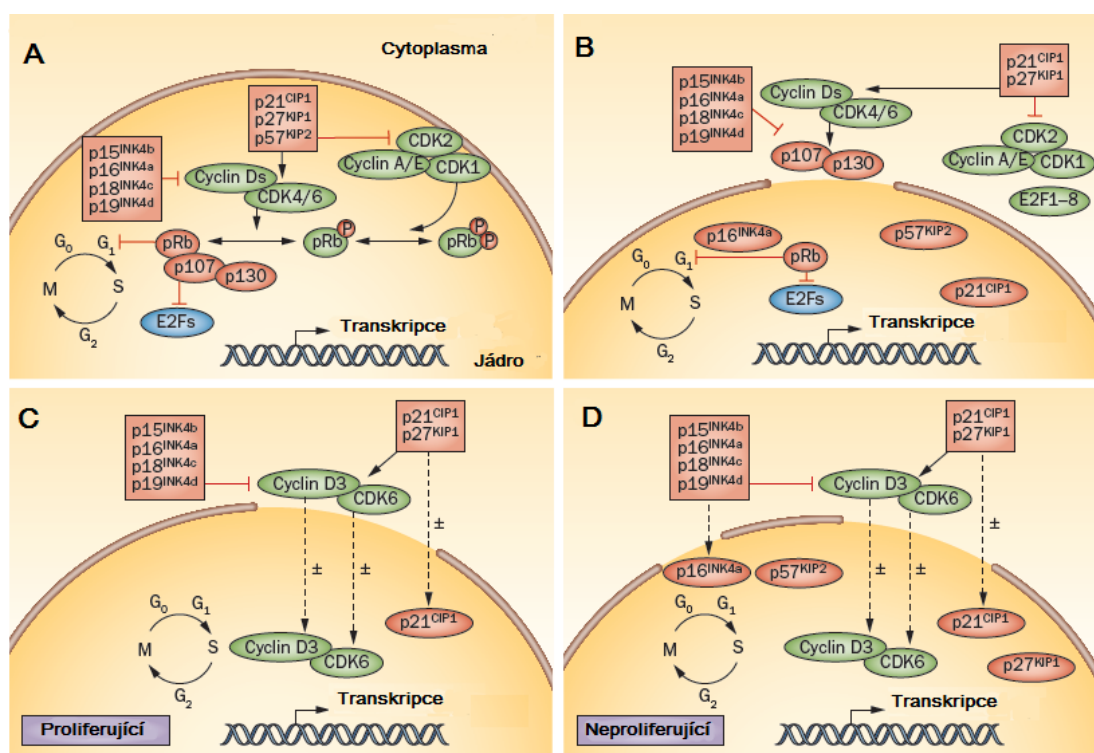
Během G_1 fáze dochází k syntéze proteinů potřebných pro replikaci DNA během S fáze. Pouze v průběhu této fáze může buňka reagovat na extracelulární podněty. Právě přechod z G_1 do S fáze je pro možné rozdělení buňky naprosto zásadní. Jedná se o hlavní kontrolní uzel buněčného cyklu, který rozhoduje o tom, zda buňka vstoupí do klidové fáze nebo se rozdělí. Klíčovým regulačním proteinem, který potlačuje buněčné dělení, je retinoblastoma protein, pRb. Jedná se o jeden z nejznámějších tumor-supresorových proteinů. Společně s proteiny p107 a p130, které s ním interagují, patří do další skupiny regulátorů buněčného cyklu, tzv. „pocket“ proteinů (Cobrinik, 2005). Funkce pRb je regulována na úrovni posttranslační modifikace, především fosforylace. V hypofosforylovaném stavu je navázán na transkripční faktor E2F a přechod z G_1 do S fáze je znemožněn. Pakliže dojde k fosforylaci pRb, změní se jeho konformace a dojde k disociaci E2F z tohoto komplexu. E2F dále řídí transkripci genů nezbytných pro replikaci DNA (mj. i syntézu cyklinu E) a směřuje buňku do S fáze (viz obr).



Obrázek 2: Regulace přechodu z G_1 do S fáze. V pozdní G_1 fázi dojde k navýšení hladiny cyklinu D a cyklinu E. Komplex cyklin D-CDK4/6 dále fosforyluje pRb. Tento komplex má kromě kinasové aktivity schopnost uvolnit inhibitory p21^{CIP1}, p27^{KIP1} a p57^{KIP2} z komplexu cyklin E-CDK2. Tento aktivovaný komplex pak ještě dále zvyšuje fosforylaci pRb. Po fosforylaci pRb dochází k uvolnění E2F, který má pozitivně zpětnovazebný účinek na syntézu cyklinu E, čímž dochází k další amplifikaci signálu. Jedním z aktivátorů exprese cyklinů a CDK je transkripční faktor c-Myc. Převzato a upraveno z (Bartek a Lukas, 2001).

1.2.2.1 Specifika regulátorů buněčného cyklu u β -buněk

Dle dosavadních poznatků disponují lidské β -buňky stejnými klíčovými regulačními molekulami G1/S fáze jako jiné buňky. Jedná se především o již zmíněné tzv. „pocket“ proteiny (pRb, p107 a p130), cykliny D1 a D3; CDK1, CDK2 a CDK4/6 a inhibitory ze skupiny INK4 a KIP/CIP. Zásadní rozdíl v porovnání s jinými buněčnými typy spočívá v přítomnosti těchto cyklinů a CDK v cytoplasmě, nikoliv v jádře. Během aktivace buněčného cyklu dochází k translokaci všech aktivačních molekul a některých inhibitorů směrem do jádra – viz obr. 3 (Fiaschi-Taesch et al., 2013). Mechanismy regulující translokaci cyklinů a CDK z cytoplasmy do jádra nejsou však stále ještě kompletně objasněny.



Obrázek 3: Regulace buněčného cyklu v G1/S fázi. A) U většiny buněčných typů jsou aktivační (znázorněny zeleně) a inhibiční molekuly G1/S fáze (znázorněny červeně) přítomny v jádře, kde se mohou přímo podílet na regulaci buněčného cyklu. B) U neproliferujících β -buněk jsou všechny cykliny a CDK přítomny v cytoplasmě, zatímco pRb a některé další inhibitory se po celou dobu nachází v jádře. C) Po zvýšené expresi některých cyklinů a CDK dochází k jejich translokaci, společně s některými inhibitory, do jádra. Proliferace β -buněk je v omezené míře umožněna. D) Při nadměrném přesunu inhibičních molekul směrem do jádra je aktivace buněčného cyklu potlačena.

Převzato a upraveno dle (Wang et al., 2015).

Vzhledem k dostupnosti celé řady experimentů studujících možnou indukci proliferace β -buněk na myších modelech je vhodné uvést některé zásadní rozdíly mezi lidskými β -buňkami a β -buňkami hlodavců. Lidské β -buňky obsahují v principu téměř stejné molekuly G1/S fáze jako ty hlodavčí až na dvě výjimky. Zaprvé, u lidských β -buněk je na rozdíl od myších buněk přítomna CDK6 (Fiaschi-Taesch et al., 2009). Druhou odlišností je absence cyklinu D2 u β -buněk člověka, který na druhé straně funguje u hlodavců jako hlavní regulační molekula (Georgia et al., 2010).

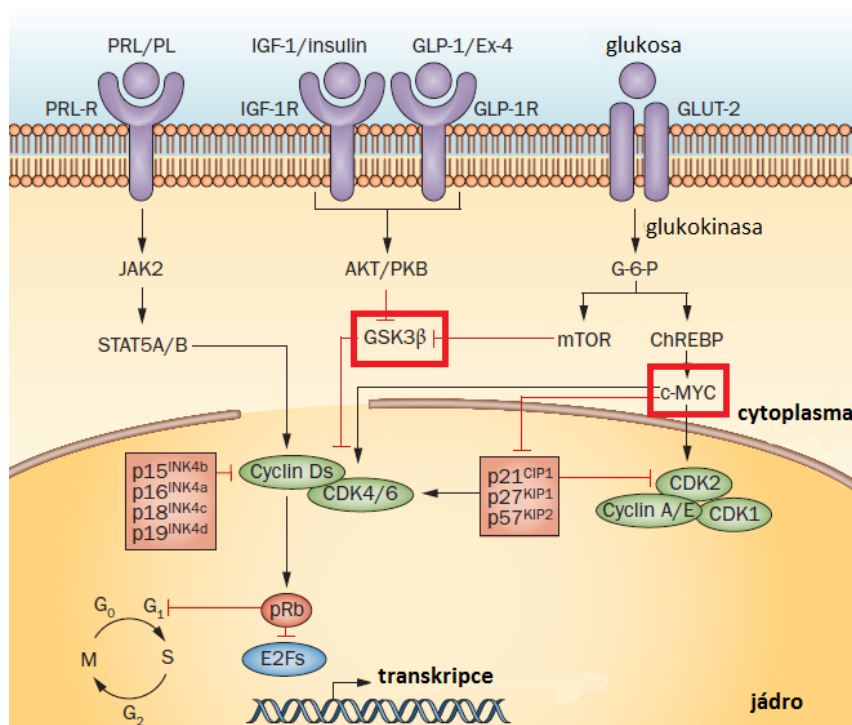
Role cyklinů a CDK během aktivace buněčného cyklu je známa již poměrně dlouhou dobu. Zvýšená exprese těchto molekul jak samotných, tak v různých kombinacích, vede k prokazatelnému nárůstu proliferujících β -buněk. Již před více než 20 lety (Dunlop, 1996) byl pozorován nárůst proliferujících β -buněk po zvýšené expresi molekul CDK4 v kombinaci s cyklinem D1, čehož bylo navozeno mitogenní signalizací prostřednictvím lysofosfatidové kyseliny. Schopnost CDK4 aktivovat buněčný cyklus β -buněk byla následně potvrzena během *in vivo* experimentů s knock-out a knock-in myšími modely (Rane et al 1999, Tsutsui et al. 1999). V práci (Cozar-Castellano et al., 2004) byla prokázána spojitost mezi pRb a aktivací buněčného cyklu β -buněk. Prostřednictvím adenovirových nosičů byla v buňkách potkaních a lidských ostrůvků zvýšena exprese CDK4 a cyklinu D1, což prokazatelně vedlo k fosforylaci pRb a následnému nárůstu počtu proliferujících β -buněk.

Vzhledem k uvedeným důvodům je proto snahou stimulovat proliferaci β -buněk zvýšením exprese právě těchto klíčových aktivačních molekul.

1.2.3 Intracelulární signalizace

V předchozí kapitole (1.2.2) byly stručně popsány klíčové aktivační a inhibiční regulátory buněčného cyklu. Pro detailní porozumění mechanismům, které proliferaci řídí, je však třeba se zaměřit i na intracelulární signalizaci, která po mitogenní stimulaci zvyšuje expresi již zmíněných cyklinů, CDK a inhibitorů. U myších a potkaních experimentálních modelů existují poměrně detailní studie buněčné signalizace. Po indukci různými stimulačními molekulami (např. prolaktin, glukosa, růstové faktory) se podařilo navodit proliferaci u poměrně vysokého procenta (uváděno až 10-15 %) potkaních β -buněk. U lidských β -buněk se však doposud nepodařilo i přes použití stejných stimulačních molekul takovýchto výsledků dosáhnout (Kulkarni et al., 2012). Přesto se předpokládá, že lidské β -buňky obsahují stejné signální molekuly jako β -buňky hlodavců a obecně jako kterékoliv jiné buněčné typy. Omezená schopnost lidských β -buněk proliferovat je zřejmě zapříčiněna inaktivací některých

klíčových signálních molekul. Popis konkrétních signálních drah je velmi komplexní problematika a byl by nad rámec této práce. Z tohoto důvodu budou v této kapitole ve stručnosti zmíněny ty nejvýznamnější signalizační molekuly, případně molekuly, se kterými bylo pracováno v experimentální části této práce. Následující obrázek 4 velmi stručně zachycuje některé vybrané mitogenní molekuly, které prokazatelně vedou k proliferaci u β -buněk hlodavců.



Obrázek 4: Schematicky znázorněná intracelulární signalizace spojená s aktivací buněčného cyklu β -buněk. Některé molekuly mohou po vazbě na membránový receptor schopné spustit signalizační kaskádu a aktivovat proliferaci. V obrázku zdůrazněna GSK3 β (kinasa glykogensynthasy 3, inhibuje cykliny a cyklin-dependentní kinas) a c-Myc (významný onkoprotein, funguje jako aktivátor buněčného cyklu). Převzato z (Wang et al., 2015)

Jedna z hlavních regulačních signálních drah, která kromě buněčné proliferace řídí i diferenciaci či apoptosu, se zkráceně označuje jako **PI3K/Akt**. K aktivaci této signální dráhy může dojít po vazbě např. insulinu nebo IGF (insulin growth factor) na jejich specifický membránový receptor. Akt (tj. proteinkinasa B, PKB) funguje jako jeden z dominantních regulátorů proliferace β -buněk skrze interakce s molekulami, které řídí buněčný cyklus. Jako příklad lze uvést interakci Akt s cykliny a cyklin-dependentními kinasami, které fungují jako aktivátory buněčného cyklu (Fatrai et al., 2006). Vedle toho také Akt inaktivuje molekuly, které fungují jako negativní regulátory (např. GSK3) buněčného cyklu. Další významná

regulační molekula, nepřímo aktivovaná Akt signální dráhou, se nazývá mTOR (mammalian target of rapamycin). Rapamycin patří mezi běžně užívaná imunosupresiva, mj. také při transplantaci právě Langerhansových ostrůvků. V poslední době se však ukazuje, že rapamycin je pro β -buňky poměrně toxický, neboť skrze inhibici mTOR prokazatelně narušuje buněčný růst a proliferaci (Barlow et al., 2013).

Za určitých fyziologických podmínek byla prokázána schopnost **glukosy** vyvolat v potkaních β -buňkách replikaci DNA. Po fosforylaci glukokinasou na glukosa-6-fosfát je glukosa oxidována během glykolysy, čímž dojde v buňce k vzestupu koncentrace ATP. Změna poměru ADP/ATP pak vyvolá buď aktivaci mTOR vedoucí k proliferaci (popsáno výše) nebo aktivaci molekuly CHREBP (carbohydrate response element-binding protein). CHREBP funguje jako transkripční faktor a je schopen spustit expresi významného aktivátoru buněčného cyklu – proteinu c-Myc (viz dále kap. 1.2.4).

Mezi doposud popsané mitogeny, schopné aktivovat proliferaci β -buněk dále patří EGF (epidermal growth factor), GLP-1 (glukagon-like peptid), ligandy Wnt signalizační dráhy a některé hormony (leptin, estrogen, progesteron) (Mizrachi-Bernal et al., 2014). Je však nutno znovu zdůraznit, že i přesto, že se podařilo v *in vitro* podmínkách proliferaci navodit, stále se jedná o navýšení v pouhých jednotkách procent.

1.2.4 Transkripční faktor c-Myc

Protein c-Myc se řadí do skupiny strukturně podobných transkripčních faktorů Myc, které fungují jako velmi významné buněčné regulátory. Dalšími dosud popsanými Myc proteiny jsou n-Myc, l-myc a s-Myc. Vzájemně se liší především typem tkáně, kterou jsou exprimovány. Protein c-Myc je exprimován ve všech typech proliferujících buněk (Stine et al., 2015).

c-Myc po vazbě na cílovou sekvenci DNA indukuje expresi genů, které kódují proteiny nezbytné nejen pro buněčný růst, proliferaci a diferenciaci, ale také apoptosu a dediferenciaci. Udává se, že c-Myc ovlivňuje expresi až 10% genomu a vykazuje jak aktivační, tak represivní účinky (Fernandez et al., 2003). Vzhledem k velmi širokému spektru cílových genů je nutné, aby syntéza c-Myc proteinu probíhala přísně regulovanými mechanismy. Případná deregulace exprese c-Myc proteinu jinak snadno vede k maligní transformaci. Za fyziologických podmínek je c-Myc protein produkován buňkami ve velmi nízké koncentraci a již po 30 minutách je degradován ubikvitin-proteasomovým systémem (Gregory a Hann, 2000).

1.2.4.1 *Struktura a tvorba dimeru*

Hlavními strukturními motivy jsou tzv. „helix-loop-helix“ a leucinový zip, které umožňují tvorbu dimeru s transkripčním faktorem MAX (Myc-associated factor X). Tento heterodimer se pak váže na sekvenci DNA označovanou jako E-box (enhancer box, konkrétně CACGTG) a tak reguluje expresi cílových genů (Walhout et al, 1997).

Jednou z hlavních funkcí c-Myc proteinu je podpora buněčné proliferace, konkrétně přechod buňky z G0 do G1 a S fáze. Po vazbě c-Myc/MAX heterodimeru na E-box sekvenci dojde k zahájení transkripce genů pro cyklin D2 a CDK4. C-Myc rovněž aktivuje komplex cyklin E-CDK2 degradací inhibitorů tohoto komplexu, p21^{CIP1} a p27^{KIP1} (Yang et al., 2001; Perez-Roger et al., 1999). Výsledným efektem navýšení koncentrace CDK2 a CDK4 je hyperfosforylace Rb, uvolnění faktoru E2F a indukce proliferace. Uvedené fosforylační kaskády jsou zjednodušeně znázorněny na již dříve uvedeném obrázku intracelulární signalizace (obr. 4, strana 19). Studie (Karslioglu et al., 2011) sledovala účinky proteinu c-Myc na proliferaci konkrétně potkaních a lidských β -buněk. Po zvýšené expresi c-Myc byly ve větší míře exprimovány aktivátory buněčného cyklu (konkrétně CDK1, CDK2, CDK4, CDK6 a cykliny A, E a D3). O tom, zda bude mít c-Myc proliferační účinky, aniž by došlo k dediferenciaci a apoptose buněk, do značné míry rozhoduje jeho koncentrace.

c-Myc rovněž ovlivňuje řadu metabolických procesů provázejících buněčný růst, což je prvotním předpokladem pro možné rozdělení buňky. Replikace DNA je spojená se zvýšenou potřebou dNTP (deoxyribonukleotidy), které jsou produkovány prostřednictvím pentosofosfátové dráhy, jež je rovněž prokazatelně ovlivněna právě prostřednictvím c-Myc. Kromě schopnosti indukovat replikaci nukleární DNA, byla u proteinu c-Myc prokázána schopnost aktivovat replikaci i mitochondriální mRNA (tj. biogeneze mitochondrií). Konkrétně c-Myc aktivuje například mitochondriální syntézu acetyl-CoA (acetylkoenzym A), což umožňuje navýšení syntézy lipidů v dělicích se buňkách. Kromě metabolismu lipidů ovlivňuje c-Myc i zpracování glukosy a to především prostřednictvím stimulace exprese enzymů účastnících se glykolysy (Miller et al, 2012).

1.2.4.2 *Kinasa glykogensynthasy 3 ovlivňuje proteolysu c-Myc*

Kinasa glykogensynthasy 3 (GSK3) je příkladem serinové/threoninové kinasy, která fosforyluje celou řadu proteinů účastnících se rozličných metabolických pochodů. Prokazatelně fosforyluje až na 40 různých proteinů (některé zdroje uvádí dokonce až 600)

a obecně vykazuje inhibiční účinky. Enzym se vyskytuje ve dvou isoformách označovaných GSK3 α a GSK3 β (Jope a Johnson, 2004).

Vzhledem k vysoké rozmanitosti cílových substrátů je GSK3 považována za potenciálně významný terapeutický cíl u řady závažných onemocnění, jmenovitě DM, Alzheimerova choroba či bipolární porucha (Cohen a Goedert, 2004). Inhibitory GSK3 proto vykazují značný potenciál pro klinickou praxi. Potenciálně významná je syntetická sloučenina CHIR99021. Jedná se o derivát aminopyridinu s doposud nejvyšší prokázanou selektivitou vůči právě GSK3 β (Cohen a Goedert, 2004).

1.2.5 Praviděpodobné příčiny nízkého počtu proliferujících lidských β -buněk

Jak již bylo vícekrát zmíněno, proliferační aktivita lidských β -buněk je ve srovnání s jinými buněčnými typy v podstatě zanedbatelná. Pro porovnání je možné uvést například T-lymfocyty, buňky kostní dřeně nebo gastrointestinálního traktu, u nichž může za fyziologických podmínek proliferovat 20 až 50 % veškerých buněk. V případě β -buněk i po stimulaci mitogenními molekulami však stále zůstává více než 99,5 % β -buněk v klidové fázi. Molekulární příčiny tohoto jevu nebyly doposud uspokojivě objasněny.

Jedno z možných vysvětlení je zvýšená koncentrace některých CDKI ve stárnoucích β -buňkách způsobena **epigenetickými modifikacemi**. Konkrétně se jedná například o modifikaci histonů, které regulují přístup k DNA kódující tyto inhibitory a ovlivňují její transkripci. Poměrně detailně je tento jev vysvětlen ve studii (Chen et al., 2009). Přístup k promotoru genů kódujících inhibitory p15^{INK4b}, p16^{INK4a} a p27^{KIP1} může být omezen trimethylací H3K27 (lysin v pozici 27 histonu 3). Methylocí ztrácí lysin kladný náboj, což způsobí tvorbu kondenzované formy chromatinu, která je transkripčně neaktivní. Expresi zmíněných inhibitorů je tímto způsobem potlačena a buňka může vstoupit do buněčného cyklu. Enzymy, které tuto methylocí katalyzují, se nazývají EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) a BMI1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog) a jsou ve vysoké koncentraci přítomné v mladých β -buňkách, jak u hlodavců, tak u člověka. Naopak, v β -buňkách dospělého organismu je hladina těchto enzymů snížena, což umožňuje expresi CDKI a omezení proliferace.

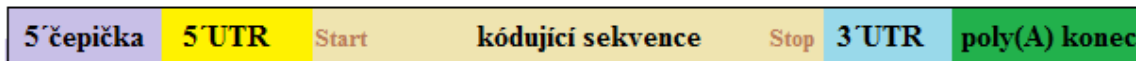
V kapitole 1.2.2.1 byla popsána specifika cyklinů a CDK u β -buněk. Právě přítomnost těchto regulačních molekul v cytoplasmě β -buněk, a nikoliv v jádře, může být jedno z dalších vysvětlení, proč většina β -buněk zůstává v G₀ fázi. Právě tato skutečnost vyvolává řadu

otazníků. Proč buňky, které se po dosažení prvního roku života již v podstatě dále nedělí, nadále exprimují proteiny, jejichž primárním úkolem je aktivovat buněčnou proliferaci? Proč se tyto molekuly nacházejí v cytoplasmě a do jádra vstupují jen minimálně? Jedna z teorií je, že tyto molekuly plní v cytoplasmě ještě další funkce, nezávislé na regulaci buněčného cyklu. Tato situace byla již popsána u jaterních buněk, kde komplex cyklin D1-CDK4 reguluje kromě buněčného dělení i metabolismus glukosy (Lee et al., 2014).

Uvedené důvody jsou jen jedny z mnoha diskutovaných faktorů. V úvahu dále přichází inaktivace či absence klíčových molekul intracelulární signalizace, věkem podmíněné poškození membránových receptorů pro růstové faktory a signální molekuly apod. Identifikace molekul schopných navodit proliferaci lidských β -buněk je v současnosti předmětem intenzivního výzkumu (Wang et al., 2015).

1.3 Použití syntetické mRNA pro účely buněčné terapie

Přepis (transkripce) genetické informace z DNA do molekuly RNA a následný překlad (translace) do struktury proteinu je základním principem přenosu genetické informace známé jako tzv. centrální dogma molekulární biologie (Crick, 1970). Iniciačním krokem transkripce je vazba RNA polymerasy za účasti specifických transkripčních faktorů na konkrétní vazné místo v molekule DNA, tzv. promotor. Za současného rozvolňování duplexu DNA katalyzuje RNA polymerasa nukleofilní atak 3' OH skupiny na fosfát připojujícího se ribonukleotidu (rNTP), čímž dochází k postupné elongaci vlákna ve směru 5'→3'. Po dosažení tzv. terminální sekvence dojde k uvolnění vlákna nasyntetizované mRNA z molekuly RNA polymerasy, která následně disociuje z templátu DNA. Regulace na úrovni transkripce je zajištěna transkripčními faktory, RNA polymerasou a *cis*-regulačními elementy (promotory, enhancery, silencers). Takto vzniklá mRNA se nazývá primární transkript (pre-mRNA) a po sérii posttranskripčních úprav se jako plně funkční mRNA účastní procesu syntézy proteinů. Význam posttranskripčních úprav spočívá především ve zvýšení stability mRNA, usnadnění jejího transportu z jádra do cytoplasmy a následně vyšší efektivity translace. Jednotlivé strukturní elementy molekuly mRNA jsou znázorněny na obrázku 5 a jejich role v regulaci translace podrobněji popsána v následujících kapitolách.



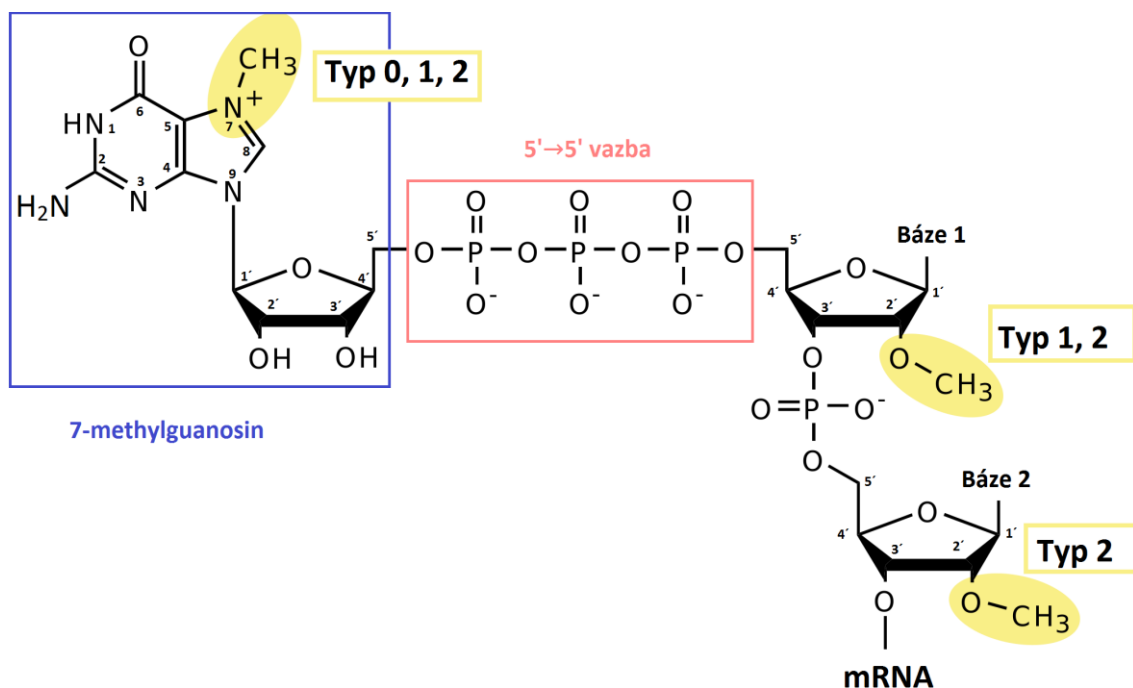
Obrázek 5: Struktura eukaryotické mRNA. Na 5' konci se nachází methylguanidinová čepička, následuje 5' nepřekládaná oblast (5' UTR), kódující sekvence, 3' nepřekládaná oblast (3' UTR) a poly(A) konec. Do podoby proteinu je překládána pouze kódující sekvence. Tato sekvence je ohraničena start kodonem, který slouží ribosomu jako iniciační místo pro zahájení translace, a stop kodonem, který funguje jako terminační signál pro ukončení translace proteinu.

1.3.1 Základní strukturní elementy mRNA

Téměř u všech eukaryotních pre-mRNA dochází v rámci posttranskripčních úprav nejprve k syntéze tzv. **5' čepičky** na jejich 5' konci. Prvním krokem čepičkování (tzv. capping) je odštěpení fosfátu z volného trifosfátu na konci pre-mRNA enzymem RNA trifosfatasa. Na vzniklý bifosfát je následně pomocí mRNA guanylyltransferasy přenesen fosfát z GTP za vzniku 5'→5' vazby. Finálním krokem je methylace na dusíku 7 guaninu prostřednictvím

mRNA-methyltransferasy, kde jako donor methylové skupiny slouží koenzym S-adenosylmethionin (SAM). Uvedeným mechanismem je syntetizována 7-methylguanosi-
 čepička (m^7G), která je základním strukturním elementem všech eukaryotních mRNA,
 s výjimkou mitochondriální a chloroplastové mRNA (Temperley et al., 2010; Monde et al.,
 2010). Dále rozlišujeme tzv. čepičky typu 0, 1 a 2. Čepička typu 0 vzniká výše popsaným
 způsobem a je typická pro jednobuněčné eukaryotní organismy. U vícebuněčných eukaryot a
 některých virů se majoritně vyskytuje čepička typu 1 a 2, u nichž je navíc přítomna
 methylovaná 2' OH skupina ribosy na následujícím prvním (resp. prvním a druhém)
 ribonukleotidu (Shatkin, 1976). Uvedené typy čepiček jsou znázorněny na následujícím
 obrázku

6.



**Obrázek 6: Typy methylguanosi-
 5'čepiček.** Nejjednodušším typem čepičky, přítomné u
 nižších eukaryot (např. kvasinky), je čepička typu 0. V tomto případě je methylován guanosin v pozici
 7. U složitějších organismů nacházíme čepičky typu 1 a 2, kde dochází navíc k methylaci 2' OH
 skupiny u první a druhé ribosy v polynukleotidovém řetězci.

5'čepička plní v eukaryotním organismu řadu funkcí v závislosti na tom, kterým konkrétním
 proteinem je rozpoznána. Tyto vazebné proteiny se souhrnně označují jako tzv. „cap-binding
 proteins“ – čepičku vázající proteiny (CBP). Rozpoznání a vazba čepičky s eukaryotickým
 translačním iniciačním faktorem 4E (eIF4E) je klíčovým regulačním krokem translace. eIF4E
 je díky své helikasové aktivitě schopen rozvolnit sekundární struktury v 5'UTR oblasti
 mRNA a následně tak umožnit vazbu tzv. pre-iniciačního komplexu (tj. 40S ribosomální

podjednotky, eIF2-GTP-methionin-tRNA a dalších iniciačních faktorů). Posunem komplexu přes 5'UTR až na AUG iniciační kodon může posléze dojít k zahájení translace. (Marcotrigiano, 1997).

Vazebný protein eIF4E je převážně přítomný v cytoplasmě, jsou však také známy CBP lokalizované přímo v buněčném jádře. Tyto proteiny se v komplexu s čepičkou účastní procesu splicingu pre-mRNA (Konarska et al., 1984), polyadenylaci mRNA, či exportu RNA z jádra do cytoplasmy (Jarmolowski, 1994).

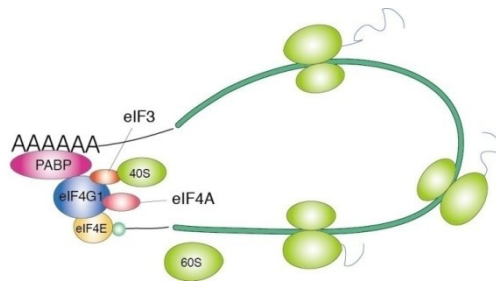
Dále slouží 5'čepička také jako ochrana před 5'exonukleasami, čímž výrazně přispívá ke zvýšení stability mRNA. Nelze také opomenout rozpoznání čepičky specifickými degradačními enzymy DCP (mRNA decapping enzymes), které slouží organismu k fyziologickému rozkladu mRNA (La Granduer a Parker, 1998).

5' Nepřekládaná oblast (5'UTR) obsahuje celou řadu strukturních elementů, které se významnou měrou podílí na regulaci translace. U prokaryotních organismů se v oblasti 5'UTR nachází tzv. Shine-Dalgarnova sekvence (AGGAGGU). Párování této sekvence s 3' koncem 16S rRNA (ribosomální RNA) slouží u bakterií jako iniciační signál pro zahájení translace (Steitz a Jakes, 1975). U eukaryotních organismů slouží k podobnému účelu tzv. sekvence Kozakové, jejíž součástí je právě iniciační kodon AUG (Kozak, 1987). Zajímavá je přítomnost struktur nazývaných IRES (internal ribosomes entry sides). Jedná se o alternativní způsob iniciace translace bez nutnosti rozpoznání 5'čepičky. Ačkoliv se IRES nachází převážně v 5'UTR oblasti mRNA u RNA virů, bylo již popsáno na několik desítek výskytu IRES i u eukaryotních organismů. IRES byly nalezeny u mRNA kódujících některé růstové faktory a regulační proteiny, jako je např. právě c-myc (Stoneley et al., 2000). Efektivita translace je značně ovlivněna přítomností sekundárních struktur, např. vlásenek, v 5'UTR oblasti. Zde se míra efektivy translace odvíjí od jejich vzdálenosti vzhledem k 5'čepičce, termodynamické stabilitě (ΔG) a poměrovém zastoupení GC párů ve struktuře vlásenky (Babendure et al., 2006). U některých mRNA kódujících proteiny, které se účastní procesů metabolismu železa (např. ferritin), se v 5' UTR nacházejí regulační elementy s vlásenkovou strukturou známé jako IRE (iron response elements). V závislosti na aktuální koncentraci železa může pak dojít k potlačení či naopak zvýšení exprese proteinů účastnících se metabolického zpracování železa.

Dalším nástrojem pro regulaci translace v 5' UTR oblasti jsou tzv. „upstream open reading frames“ (uORF). Jedná se kódující sekvence s vlastním iniciačním kodonem (uAUG, „upstream AUG“), které se nachází před hlavní kódující sekvencí. Translací uORF typicky

vzniká protein, který následně snižuje genovou expresi primární kódující sekvence (Calvo et al., 2009).

Na 3'konci mRNA, v 3' **nepřekládané oblasti (3' UTR)** se nacházejí regulační sekvence, které ovlivňují polyadenylaci, efektivitu translace a stabilitu mRNA. V 3'UTR jsou přítomny sekvence specificky rozpoznávané miRNA (microRNA). Tyto krátké, jednovláknové mRNA se podílí na procesu nazývaném jako tzv. „umlčení“ RNA. Jedná se o cílenou destabilizaci molekuly RNA, snížení efektivitu translace, případně až úplnou degradaci mRNA. MREs sekvence (microRNA response elements) jsou významným regulačním prvkem genové exprese a v 3' UTR tvoří převládající strukturní motiv. Deregulace miRNA je prokazatelně spojena s některými typy nádorů a neurodegenerativními chorobami (Lu et al., 2005). Práce (O'Donnell et al., 2005) popisuje mechanismus regulace exprese proteinu E2F, jednoho z aktivátorů buněčného cyklu, onkoproteinem c-Myc (již zmíněno v 1.2.4.1). Bylo prokázáno, že c-Myc aktivuje expresi několika strukturně odlišných miRNA, které následně slouží jako negativní regulátory exprese E2F. Uvedený příklad slouží jako jedna z ukázek přísně regulovaného mechanismu, kterým c-Myc řídí buněčné dělení. V 3' UTR se dále nacházejí sekvence bohaté na AU páry (AREs, AU-rich elements). Obvykle se jedná o opakování pentanukleotidu AUUUA, přičemž tyto sekvence slouží jako nejběžnější strukturní prvek determinující stabilitu mRNA (Chen a Shyu, 1995). V této nepřekládané oblasti se dále vyskytují sekvence, které slouží jako polyadenylační signály (typicky AUUAAA). Při dosažení této sekvence v průběhu transkripce dochází k disociaci RNA polymerasy II z transkriptu a RNA je v tomto místě rozštěpena. Na 3' konci dochází následně k připojování molekul AMP (adenosinmonofosfát) enzymem polyadenylát polymerasa. Tímto způsobem je syntetizován tzv. **poly(A) konec** mRNA, který chrání mRNA před degradací buněčnými exonukleasami. Vedle toho slouží poly(A) jako signál pro opětovnou iniciaci translace. Tento proces je umožněn díky interakci mezi poly(A) vazebným proteinem (PABP) a translačním iniciačním faktorem eIF4E, čímž dojde k vytvoření tzv. uzavřené smyčky (viz obr. 7, strana 27). Tento systém mimojiné umožňuje opětovné využití ribosomální podjednotky 40 S.



Obrázek 7: Mechanismus opětovné iniciace translace. Poly(A) konec je rozpoznán poly(A) vazebným proteinem (PABP), který skrz interakci s translačními faktory eIF4G1 a eIF4E formuje mRNA do struktury tzv. „uzavřené smyčky“. Tento mechanismus umožňuje opětovné využití ribosomů, které právě dokončily translaci. Převzato z <http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/product/epigenetics/RNAworld.html>.

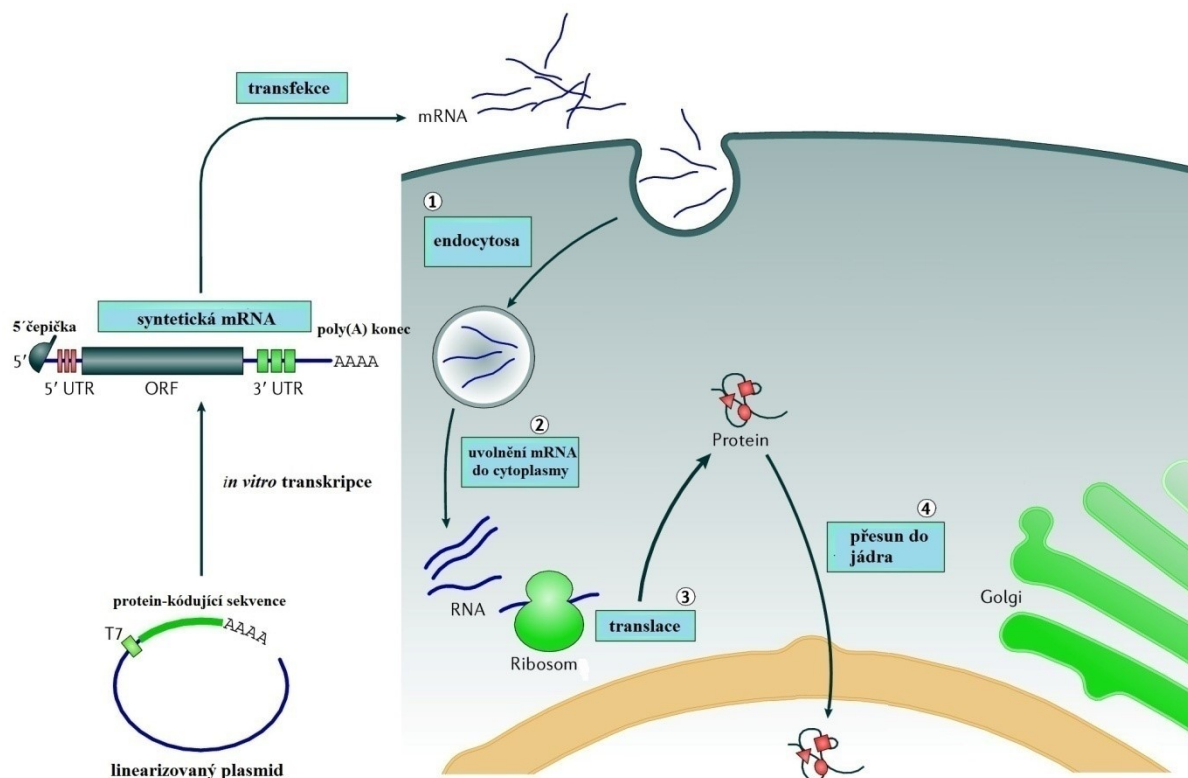
1.3.2 Princip terapeutického využití syntetické mRNA

Poslední přibližně tři desetiletí dochází k intenzivnímu studiu možností použití syntetických nukleových kyselin k produkci klinicky významných proteinů v cílových buňkách (tzv. genová terapie). K tomuto účelu se nejčastěji používá DNA kódující protein, který je v cílové buňce, např. z důvodu mutace příslušného genu, nefunkční. Zásadním problémem manipulace s exogenní DNA však stále zůstává její obtížný transport přes jadernou membránu, neboť pouze v jádře je umožněna její transkripce do mRNA a následně i její translace. Obvykle se pro tento účel používají rekombinantní virové přenašeče či přímá transfekce cirkulární plasmidové DNA do buněk. Uvedené kroky s sebou však nesou rizika imunologické reakce a přenos navíc často nebývá příliš efektivní. Vzhledem k začlenění exogenní DNA do hostitelského genomu navíc vzrůstá riziko vzniku inzerčních mutací.

Výhodou práce s IVT mRNA je její okamžitá translace již v cytoplasmě, není tedy nutný transport přes jadernou membránu. Nedochozí k začleňování této mRNA do genomu hostitelských buněk a nevyužitá mRNA je z buňky posléze přirozenými degradačními kroky odstraněna. V zásadě jsou testovány dva možné přístupy k praktickému využití IVT mRNA. První je transfekce patientských buněk v podmínkách *ex vivo* a tyto buňky jsou poté transplantovány zpět do těla pacienta. Druhou možností je vpravení připravené mRNA přímo do cílového organismu (Sahin, 2014).

IVT mRNA je syntetizována tak, aby se svou strukturou co nejvíce podobala přirozené mRNA. Syntéza mRNA *in vitro* probíhá dle DNA templátu, v němž jsou zaneseny sekvence jak pro nepřekládané oblasti, tak pro konkrétní kódující region ohraničený start a stop kodony. Samotná transkripce probíhá za katalýzy vhodnou RNA polymerasou, obvykle se pro tento

účel používá T7 nebo SP6 polymerasa. Rovněž také 5' čepička je do IVT mRNA začleňována pomocí enzymů, popř. se využívají různé syntetické analogy. Poly(A) konec je buď již zanesen v sekvenci DNA templátu nebo je dodatečně syntetizován rekombinantně připravenou poly(A)polymerasou. Stejně jako přirozená mRNA je i IVT mRNA extrémně náchylná k degradaci extracelulárními RNasami, což ji činí ve srovnání s DNA podstatně méně stabilní. Proto se při práci s mRNA navíc využívají tzv. „RNase-free“ roztoky v kombinaci s inhibitory RNas. Do cílové buňky je IVT mRNA dopravena v kombinaci s vhodným transfekčním činidlem, obvykle se používají nejrůznější kationtové liposomální nosiče (Malone, 1989). Další, velmi hojně využívanou metodou genového přenosu je elektroporace. V cytoplasmě již mRNA podléhá tentýž molekulárním mechanismům, které řídí translaci, post-translační modifikaci a transport výsledného proteinu i za fyziologických podmínek. Princip terapie pomocí syntetické mRNA je přehledně shrnut na obrázku 8.



Obrázek 8: Princip použití synteticky připravených mRNA. Pro *in vitro* transkripci je použit DNA templát obsahující kódující sekvenci pro konkrétní protein. IVT mRNA obsahuje 5' čepičku, 5'UTR, kódující sekvenci, 3'UTR a poly(A) konec. IVT mRNA je transfekována do cílové buňky, kde podléhá již stejným intracelulárním mechanismům jako nativní mRNA. Převzato a upraveno z (Sahin et al., 2014).

1.3.3 Imunitní odpověď buňky na přítomnost exogenní mRNA

Přítomnost cizorodé RNA aktivuje v hostitelské buňce mechanismy nespecifické imunity. Jedná se o buněčnou schopnost rozpoznávat fylogeneticky vysoce konzervované struktury typické pro patogeny. Jedním z příkladů je rozpoznání dsRNA (dvouvláknové, „double-strand“), což je struktura typická pro některé viry. V buňce jsou z tohoto důvodu přítomny receptory, které dsRNA specificky rozpoznávají a následně zabraňují virové replikaci. Jedním z příkladů je receptor TLR3 (Toll-like receptor 3) nebo některé enzymy s RNA helikasovou aktivitou, jako je například RIG-I (retinoic acid-inducible gene I protein) či MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) (Sahin et al., 2014;). Z uvedených důvodů je proto třeba během syntézy mRNA *in vitro* minimalizovat tvorbu vedlejších produktů obsahující sekundární struktury. Jednou z možností je purifikace syntetické mRNA chromatografickými metodami. dsRNA v kombinaci s volným trifosfátem na 5' konci aktivuje PKR (proteinkinasa R). Právě volný 5' trifosfátový konec je typickým strukturním znakem virových RNA, zatímco u eukaryot je 5' konec opatřen methylguanositovou čepičkou (Nallagatla et al., 2007). Po rozpoznání exogenní mRNA výše uvedenými receptory dochází k aktivaci NF- κ B (nukleární faktor κ B), která vede ke zvýšené expresi interferonů (IFN) a zánětlivých cytokinů. Aktivace těchto signálních kaskád nakonec vede k zabránění replikace m-RNA, potlačení translace a konečné degradaci exogenní RNA. Pro zvýšení stability IVT mRNA jsou proto do její struktury začleňovány různé stabilizační prvky, které budou ve stručnosti popsány v následující kapitole 1.3.4.

1.3.4 Strukturní modifikace ovlivňující stabilitu syntetické mRNA a účinnost translace v cílové buňce

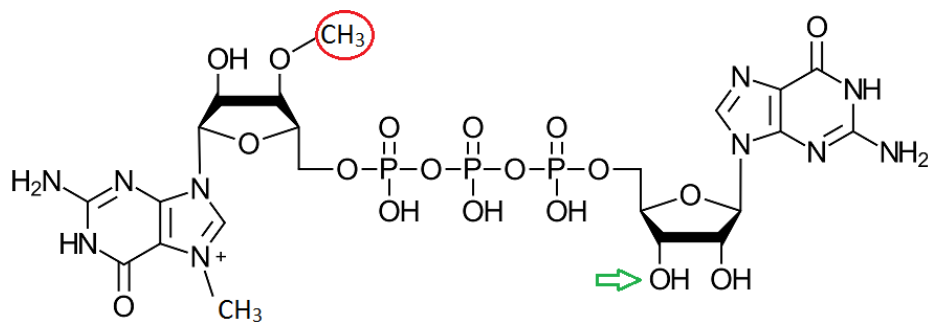
1.3.4.1 Modifikované nukleosidy

V předchozí kapitole (1.3.3) byla zmíněna schopnost buňky rozpoznávat exogenní RNA vazbou na receptory TLR. Kromě dsRNA jsou však tyto receptory schopny rozpoznat i jednovláknovou RNA (ssDNA, single-strand) a navodit tak imunitní reakci (Heil et al., 2004). Z tohoto důvodu se savčí organismus v průběhu evoluce naučil odlišovat vlastní RNA od virové a bakteriální a to prostřednictvím modifikací jednotlivých nukleosidů. Bylo popsáno více než 100 různých modifikací všech druhů přirozeně se vyskytující RNA (Rozenski et al., 1999). U eukaryotní mRNA se ve vyšší zastoupení objevují pseudouridin, 2-thiouridin, 5-methyluridin, 5-methylcytidin a N6-methyladenosin. IVT mRNA obsahující ve své sekvenci

tyto modifikované nukleosidy pak vykazují výrazně nižší imunogenní efekt, mimo jiné díky tomu, že se neváží na TLR (Karikó et al., 2005). Díky inkorporaci Ψ a 2-thiouridinu navíc IVT mRNA neaktivuje i RIG-I a PKR (Andersen et al., 2010).

1.3.4.2 Inkorporace čepičky do IVT mRNA

Jeden z možných způsobů inkorporace čepičky do struktury mRNA v podmínkách *in vitro* je její syntéza pomocí specifických enzymů (tzv. „capping enzymes“, čepičkovací enzymy), tak, jak se tomu děje *in vivo*. V jedné z prvních studií zabývajících se přípravou IVT mRNA byly pro tento účel použity enzymy získané izolací z *Vaccinia* viru, konkrétně guanylyltransferasa a methyltransferasa. Takto připravená čepička svou strukturou odpovídá přirozeně se vyskytujícím eukaryotickým 5' čepičkám (Martin, 1975). Další, v současné době běžněji využívanou metodou, je přidání synteticky připravených analogů čepičky do IVT reakční směsi a spojení tak procesu čepičkování a transkripce do jednoho kroku. Efektivitu následné translace zde ovšem snižuje fakt, že část z výsledného transkriptu obsahuje čepičku inkorporovanou v reversní orientaci. Děje se tak proto, že RNA polymerasy bakteriofágů využívají pro iniciaci transkripce navíc 3'OH skupinu na m^7G u dinukleotidového analogu čepičky se strukturou m^7GpppG . Dojde tak ke vzniku transkriptu s reversně orientovanou čepičkou – $GpppGm^7$, která nemůže být rozpoznána translačním faktorem eIF4E (Pasquinelli et al., 1995). Z tohoto důvodu byly vyvinuty analogy čepičky, tzv. ARCAs (anti reverse cap analogs) s modifikací na C3' u m^7G (viz obr. 9), při jejichž použití bylo dosaženo výrazně efektivnější translace ve srovnání se standardním analogem m^7GpppG (Stepinski et al., 2001). V současnosti se od použití analogů ARCA ustupuje, neboť jejich struktura není zcela totožná s čepičkou přítomnou u mRNA vyšších eukaryotických organismů. ARCA strukturálně odpovídá čepičce typu 0, což je čepička typická pro nejjednodušší organismy, např. kvasinky. V současné době jsou již dostupné analogy čepiček typu 1 a 2, které by měly činit IVT mRNA ještě výrazně stabilnější.



Obrázek 9: Syntetický analog čepičky ARCA. Methylace na C3 7-methylguanosinu (zvýrazněna červeně) zabráňuje připojování nukleotidů na tento hydroxyl a vzniku reverzně orientovaného transkriptu. RNA polymerasa tak může využít pouze 3'OH hydroxyl ribosy u první báze (zvýrazněno zeleně), čímž dojde k syntéze transkriptu se správně inkorporovanou čepičkou. Převzato a upraveno z (Stepinski et al., 2001).

1.3.4.3 Modifikace v 5' a 3'UTR

Další možností, jak zvýšit stabilitu syntetické mRNA, je inkorporace specifických stabilizačních sekvencí do 5' a 3' UTR. Hojně se využívá genové sekvence kódující lidský nebo potkaní α - a β -globin. Zatímco se průměrná životnost mRNA v savcích buňkách pohybuje okolo 15 min, u mRNA kódující β -globin dosahuje až 24 hodin (Ross a Sullivan, 1985). Kromě uvedeného β -globinu jsou popsány i další 5' a 3'UTR segmenty, které u virových i buněčných mRNA prokazatelně zvyšují její stabilitu a translatovatelnost. Lze uvést například regulační sekvence v 3'UTR oblasti mRNA kódující některé eukaryotické elongační faktory, které jsou schopny inhibovat degradační DCP a enzymy s 3'-5' exonukleasovou aktivitou (Zinckgraf a Silbart, 2003).

U některých proteinů je naopak žádoucí, aby k jejich expresi docházelo pouze po určitý časový úsek a jejich mRNA byla bezprostředně poté degradována. K tomuto účelu lze do 3'UTR vložit AREs sekvence, které slouží buňce jako signál k degradaci mRNA (Chen a Shyu, 1995).

1.3.4.4 Modifikace v oblasti poly(A) konce

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.3.2, poly(A) konec může být do IVT mRNA zanesen buď formou přímého přepisu z DNA templátu nebo enzymaticky pomocí rekombinantně připravené poly(A) polymerasy. Výhodou použití poly(A) polymeras při přípravě syntetické mRNA je možnost inkorporace modifikovaných nukleosidů, které slouží jako ochrana před depolyadenylačními enzymy. Důležitým faktorem ovlivňujícím efektivitu translace je délka

poly(A) konce. Optimální délka poly(A) konce se pohybuje mezi 120 až 150 nukleotidy. Translace mRNA s kratším poly(A) koncem bývá méně efektivní, zatímco u příliš dlouhých poly(A) konců dochází k nadměrné tvorbě nespecifických vedlejších produktů (Triana-Alonso et al, 1995).

2 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je studium potenciálního vlivu transkripčního faktoru c-Myc na proliferaci pankreatických β -buněk. Pro realizaci tohoto cíle bylo třeba splnit následující dílčí úkoly:

- příprava DNA templátu pro *in vitro* syntézu mRNA kódující transkripční faktor c-Myc
- *in vitro* transkripce c-Myc-mRNA dle připraveného DNA templátu
- transfekce připravené c-Myc-mRNA do buněk disociovaných potkaních Langerhansových ostrůvků a sledování jejího vlivu na proliferaci β -buněk
- sledování vlivu sloučeniny CHIR99021 na míru proliferace β -buněk stimulovanou c-Myc-mRNA
- izolace buněčné RNA a stanovení genové exprese u buněk LO transfekovaných c-Myc-mRNA

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité přístroje a materiál

3.1.1 Přístrojové vybavení a nástroje

centrifuga Mikro 200	<i>Hettich Zentrifugen, Německo</i>
centrifuga Mikro 220 R	<i>Hettich Zentrifugen, Německo</i>
centrifuga MPS 1000	<i>Labnet, USA</i>
centrifuga Universal 320R	<i>Hettich Zentrifugen, Německo</i>
kolonka NanosepCentrifugalDevice 30K	<i>Sigma, USA</i>
fluorescenční mikroskop EVOS Auto FL	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
inkubátor	<i>New Brunswick Scientific, USA</i>
laminární box Herasafe™	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
souprava na elektroforézu Minigel 2	<i>Apelex, Francie</i>
termocykler T-personal	<i>Biometra, Německo</i>
termocykler Veriti 96 Well Thermal Cycler	<i>Applied Biosystems, USA</i>

3.1.2 Použité chemikálie a biologický materiál

accutase	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
DABCO-Mowiol	<i>Carl Roth, Německo</i>
ethanol	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
formaldehyd	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
fosfátový pufr (PBS)	<i>lékárna IKEM, ČR</i>
GeneRuler DNA Ladder	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>

GlutaMAX Supplement	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
Hank's Balanced Salt Solution	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Human Serum Albumin	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
hydroxid amonný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
ITS Liquid Media Supplement	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
medium CMRL	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
medium RPMI	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
MEM® Non Essential AA medium	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
NEBuffer™	<i>New England Biolabs, USA</i>
NucBlue™ Fixed Cell Stain ReadyProbes™ reagent	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
protilátka Goat Anti-Mouse IgG (Alexa Fluor® 647)	<i>Abcam, UK</i>
protilátka Goat Anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor® 555)	<i>Abcam, UK</i>
protilátka Mouse Monoclonal to Insulin IN-05	<i>EXBIO, Česká republika</i>
protilátka Rabbit anti-c-Myc antibody	<i>Abcam, UK</i>
protilátka Rabbit Anti-Insulin antibody	<i>Abcam, UK</i>
pyruvát	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
restrikční endonukleasa BamHI	<i>New England Biolabs, USA</i>
restrikční endonukleasa HindIII	<i>New England Biolabs, USA</i>
Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>

3.1.3 Použité komerční kity

Click-iT® Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Alexa Fluor™ 647 dye	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox)	<i>Roche Applied Science, Německo</i>
Lipofectamine® MessengerMAX Transfection Reagent	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
MEGAclean™ Kit	<i>Life Technologies, USA</i>
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	<i>Macherey-Nagel, Německo</i>

Qubit® RNA BR Assay Kits

Thermo Fisher Scientific, USA

RNeasy® Plus Mini Kit

Qiagen, Německo

T7 mScript™ Standard mRNA Production System

CELLSCRIPT™, USA

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit

Roche Applied Science, Německo

3.2 Příprava DNA templátu pro *in vitro* transkripci mRNA

Cirkulární plasmid nesoucí sekvenci pro protein c-Myc byl štěpen restrikními endonukleasami (RE) *BamHI* (20 U/ μ l) a *HindIII* (20 U/ μ l). K 15 μ g plazmidu byl současně přidán 1 μ l RE *BamHI* a 1 μ l RE *HindIII*. Reakční směs byla doplněna 10X koncentrovaným „reakčním pufrem NEB®“ na celkový objem 70 μ l. Inkubace probíhala 16 hodin při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby byl celý objem vzorku nanesen na TAE gelovou elektroforézu (2h, 60 V). Po extrakci vzorku z gelu byla DNA izolována dle postupu uvedeného v protokolu ke kitu NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Na 100 mg vzorku v gelu bylo použito 200 μ l „vazného pufru NTI“. Vzorek byl v tomto pufru zahříván po dobu 10 min při 50 °C. Následně byl vzorek nanesen na kolonku, na které dojde k zachycení DNA (součást kitu), a centrifugován (Hettich Zentrifugen MICRO 220R, 30 s, 10 000 \times g). Na kolonku bylo poté aplikováno 700 μ l „pufru NT3“ a vzorek byl opět centrifugován (30 s, 11 000 \times g). Pro odstranění ethanolu, který je součástí pufru NT3, byl vzorek 5 minut zahříván při 70 °C. V závěru bylo na kolonku nanesen 30 μ l elučního „pufru NE“ a DNA eluována centrifugací (1 min, 11 000 \times g).

Získaný DNA templát pro syntézu mRNA byl následně amplifikován pomocí PCR („polymerase chain reaction“) reakce, která byla provedena dle protokolu ke kitu Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (NEB). Primery specifické pro DNA templát kódující protein c-Myc jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Sekvence použitých primerů pro amplifikaci DNA templátu kódujícího transkripční faktor c-Myc

„forward primer“	GACTTCGAAATTAATACGACTCACTAT
„reverse primer“	TTTCGGTTTGGCTCTGAAAAGAGCCTTTGG

Složení reakční směsi pro PCR reakci je uvedeno v následující tabulce 2.

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro PCR reakci.

Reakční komponenty	Objem [μ l]
5X Q5 reakční pufr	32
5X Q5 „High GC enhancer“	32
Q5 DNA polymerasa	4
10 μ M „forward primer“	8
10 μ M „reverse primer“	8
dNTPs	3
templát DNA (c=200 ng/ μ l)	1
dH ₂ O (bez nukleas)	74

V termocykleru (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) byl nastaven teplotní program, jehož schéma je shrnuto v tabulce 3.

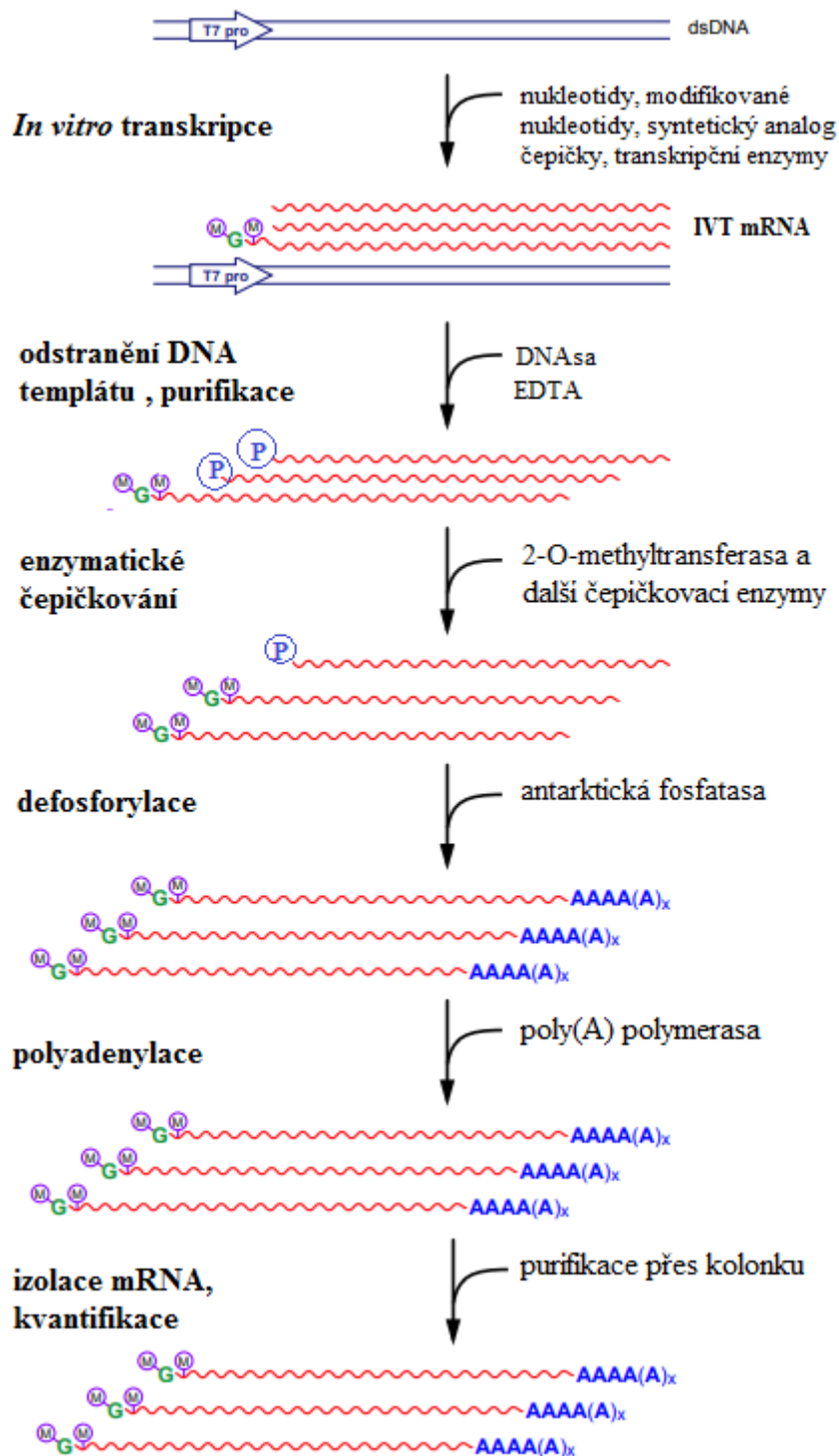
Tabulka 3: Teplotní program pro PCR reakci.

1.	95 °C	90 s
2. →30×	95 °C	15 s
	55 °C	30 s
	72 °C	90 s
3.	72 °C	120 s

Pro ověření účinnosti PCR byla opět provedena TAE elektroforéza (2h, 60 V).

3.3 Příprava syntetické mRNA kódující transkripční faktor c-Myc

In vitro transkripce (IVT) mRNA kódující transkripční faktor c-Myc probíhala s drobnými modifikacemi dle protokolu ke kitu T7 mScript™ Standard mRNA Production System (CELLSCRIPT™). Schematické zobrazení přípravy syntetické mRNA je znázorněno na obrázku 8 (strana 38). Jako syntetický analog čepičky byla testována ARCA („antireverse cap analog“) a nově vyvinutý analog čepičky CleanCap® (TriLink Biotechnologies, USA). Efektivita začleňování čepičky typu ARCA dosahuje 60-80 %, u čepičky CleanCap® je udáváno 90-99 %. Během přípravy c-Myc mRNA s 5' čepičkou ARCA bylo navíc provedeno enzymatické čepičkování pomocí „čepičkovacích enzymů“. Do reakční směsi byly zároveň přidány i modifikované nukleotidy – methylcytidin (mC) a methylpseudouridin (mpU), které mají za úkol snížit imunitní odpověď v cílové buňce.



Obrázek 10: Schéma přípravy syntetické mRNA. Prvním krokem syntézy je přepis DNA templátu pomocí T7 polymerasy do vlákna mRNA se současným zavedením syntetického analogu 5' čepičky. Nepřepsaná vlákna templátové DNA jsou odstraněna pomocí DNasy I. V dalším kroku se provádí posttranskripční enzymatické čepičkování pro zajištění maximální inkorporace čepičky na 5' konec syntetizované mRNA. Následně jsou pomocí antarktické fosfatasy odstraněny volné fosfátové skupiny na 5' konci vláken mRNA, u nichž nedošlo k inkorporaci čepičky. Nakonec je na 3' konec

syntetizovaného vlákna pomocí poly(A) polymerasy zaveden poly(A) konec a vzniklá mRNA izolována. Upraveno dle protokolu ke kitu T7 mScript™ Standard mRNA Production System.

3.3.1 *In vitro* transkripce

V prvním kroku syntézy byla připravena reakční směs dle tabulky 4:

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro IVT

Reakční komponenty	Objem [μl]
templát DNA (1000 ng/reakční směs)	3,5
100 mM ATP	1,0
100 mM ARCA/ CleanCap	0,8
30 mM GTP	0,5
100 mM 5-mC/CTP (1:3)	1,0
100 mM mPU/U (1:3)	0,6
100 mM DTT (dithiothreitol)	1,1
inhibitor RNAs	0,5
10X mScript™ T7 reakční pufr	1,1
mScript™ T7 enzymatická směs	0,5

Reakční směs byla následně inkubována 30 minut při 37 °C, poté bylo do směsi přidáno 0,5 μl 30% roztoku GTP. Tento roztok byl do reakční směsi přidán ještě dvakrát, vždy po 30 minutových intervalech (celkem 90 minut). Po posledním přidavku byl do směsi přidán 1 μl DNAsy I (1U/ μl).

3.3.2 Purifikace syntetické mRNA

Do reakční směsi byl přidán 1 μl 500 mM EDTA a spolu s 500 μl vody (bez obsahu nukleas) byl vzorek nanesen na kolonku s filtrem Nanosep 30K® (Sigma). Vzorek byl extrahován centrifugací při 5000 g po dobu 20 minut. Následně byl vzorek ještě dvakrát purifikován 500 μl vody bez přidavku EDTA (20 min, 5000×g). Po ukončení purifikace byla mRNA resuspendována ve 20 μl vody, zahřívána 5 minut při 65 °C a následně rychle zchlazena na ledu.

3.3.3 Posttranskripční enzymatické čepičkování

Enzymatická čepičkovací směs byla připravena dle tabulky 5:

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro fázi enzymatického čepičkování

Reakční komponenty	Objem [μl]
20 mM GTP	2,5
20 mM SAM (S-adenosylmethionin)	1,3
10X ScriptCap™ „capping buffer“	5,0
inhibitor RNAs	0,5
ScriptCap™ 2-O-methyltransferasa (100 U/ μl)	2,0
ScriptCap™ „capping enzyme“ (10 U/ μl)	2,0

Připravená enzymatická směs byla přidána k 20 μl roztoku c-Myc-ARCA-mRNA ve vodě a ponecháno inkubovat 30 minut při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby byla reakční směs purifikována postupem popsáním v kap. 3.3.2 s tím rozdílem, že přečištěná mRNA byla v závěru převedena do výsledného objemu 40 μl.

3.3.4 Defosforylace antarktickou fosfatou

K 40 μl vzorku mRNA bylo přidáno 5 μl antarktické fosfatasy (5 U/ μl), 5 μl reakčního pufru pro AP a 1 μl inhibitoru RNAs. Reakční směs byla inkubována při 37 °C 120 minut a poté přes noc při 10 °C. Druhý den byla mRNA purifikována (kap. 3.3.2) a zakoncentrována do výsledného objemu 38 μl.

3.3.5 Polyadenylace

Ke vzorku mRNA byla přidána adenylační reakční směs připravená dle tabulky 6:

Tabulka 6: Reakční směs pro polyadenylaci syntetické mRNA

Reakční komponenty	Objem [μl]
100 mM ATP	0,8
10X A-Plus™ polyadenylační pufr	10,0
inhibitor RNAs	0,5
A-Plus™ Poly(A) polymerasa (4 U/μl)	1,0

Polyadenylační reakce probíhala při 37 °C 120 min.

3.3.6 Izolace IVT mRNA

Finálním krokem je purifikace vzniklého produktu přes kolonku a získání tak IVT mRNA s minimálním množstvím vedlejších produktů. Izolace mRNA byla provedena dle experimentálního

protokolu k MEGA Clear Kit® (Life Technologies, USA). Získaný vzorek mRNA byl doplněn roztokem „Elution Solution“ na objem 100 µl. Ke vzorku bylo dále přidáno 350 µl „Binding Solution“ a 250 µl 100% ethanolu. Reakční směs byla nanášena na kolonku (součást kitu) a centrifugována (Hettich Zentrifugen MICRO 220R, 1 min, 10 000×g). Kolonka byla poté dvakrát promyta 500 µl „Wash Solution“ (1 min, 10 000×g). RNA byla z kolonky eluována 50 µl „Elution Solution“ (1 min, 10 000×g).

3.4 Stanovení koncentrace mRNA

Koncentrace mRNA byla stanovována fluorimetricky pomocí kitu Qubit® RNA BR Assay Kits. Byl připraven „pracovní roztok“ (199 µl „Qubit® RNA BR pufri“ a 1 µl „Qubit® RNA BR Reagent“/1 vzorek). Dále je třeba připravit 2 vzorky standardu ke kalibraci. Na každý bylo použito 190 µl pracovního roztoku a 10 µl roztoku konkrétního typu Standardu. Standard 1 neobsahuje žádnou mRNA a je použit jako „blank“. Standard 2 obsahuje přesně definované množství RNA (100 ng/µl). Pro stanovení RNA v jednom vzorku bylo použito 198 µl pracovní směsi a 2 µl vzorku, ve kterém je stanovována koncentrace RNA. Měření fluorescence probíhalo na přístroji Qubit (Invitrogen).

3.5 Transfekce syntetické mRNA pro c-Myc do potkanních buněk Langerhansových ostrůvků

K experimentům byly použity Langerhansovy ostrůvky izolované z potkanů kmene Brown Norway (stáří 2-5 měsíců). Langerhansovy ostrůvky byly následně kultivovány v mediu CMRL s 10% přídavkem FBS, při 37 °C a 5% CO₂. Pro vlastní experiment byly Langerhansovy ostrůvky disociovány enzymem „accutase“ a poté nasazeny do 96-jamkové destičky, jejíž povrch byl pokryt extracelulární matrix produkovanou buněčnou linií HTB9. Jedná se o buňky odvozené z karcinomu močového měchýře, které právě produkcí velkého množství mezibuněčné hmoty poskytují β-buňkám optimální podmínky pro růst, diferenciaci a proliferaci.

HTB9 buňky byly ponechány narůst v mediu RPMI (s obsahem 10 % FBS a 10 % GlutaMAX) v 96-jamkové destičce do 100% konfluencí. Po odstranění kultivačního média byly buňky promyty roztokem PBS a následně k nim byl přidán lyzační roztok (20 mM

NH₄OH, 0,1% Triton X100 v dH₂O). Buňky byly poté lyzovány při 37 °C po dobu 5 minut. Lyzační roztok byl odstraněn a buňky důkladně promyty PBS.

Langerhansovy ostrůvky byly z kultivační lahve přeneseny do sterilní plastové zkumavky a centrifugovány (Hettich Zentrifugen 220, 1 min, 400×g). K peletě buněk bylo poté přidáno 2 ml roztoku „accutase“, aby došlo k disociaci ostrůvků na jednotlivé buňky. Po 15 minutové inkubaci při 37 °C byly buňky centrifugovány (1 min, 400×g) a promyty kultivačním médiem pro potkaní ostrůvky (složení viz tabulka 7).

Tabulka 7: Složení kultivačního media pro potkaní Lanherhansovy ostrůvky.

Složka	Objem
CMRL médium	9,0 ml
Albumin	500 µl
„MEM® Non Essential Amino Acids“	100 µl
„GlutaMAX Supplement“	100 µl
„ITS Liquid Media Supplement“	100 µl
Pyruvát	100 µl
HEPES pufr	100 µl

Buňky byly transfekovány postupem uvedeným v protokolu ke kitu Lipofectamine® MessengerMAX™ Reagent mRNA Transfection (Thermo Fisher Scientific). Transfekční činidlo MessengerMAX™ bylo naředěno médiem Opti-MEM® v poměru 1:26. Připravená mRNA byla naředěna na koncentraci 40 ng/µl a dále smíchána s médiem s obsahem transfekčního činidla v poměru 1:2,3. Dále byl připraven roztok EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin) smícháním 15 µl 10mM EdU s 1 ml kultivačního media pro potkaní ostrůvky. K buňkám, u nichž byla sledována proliferace, bylo přidáváno 20 µl roztoku EdU. Případně bylo k buňkám ještě přidáno 3µl 250 µM roztoku CHIR99021.

3.6 Detekce proliferujících buněk pomocí fluorescenčního značení

Princip detekce proliferujících β-buněk spočívá v navázání fluorescenční sondy na nukleotidový analog EdU, který je během dělení buněk inkorporován do nově syntetizovaného vlákna DNA. EdU byl k disociovaným Langerhansovým ostrůvkům přidáván již během transfekce syntetickou mRNA. Inkorporovaný EdU byl detekován fluorescenční sloučeninou na bázi azidu, která je spolu s EdU součástí kitu Click-iT® Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Alexa Fluor™ 647 dye (Thermo Fisher Scientific). Detekce

byla provedena dle protokolu k výše uvedenému kitu. Vedle toho byly v buňkách pomocí značení specifickou primární protilátkou a dále sekundární protilátkou detekovány různé proteiny produkované β -buňkami (např. insulin).

Použité protilátky:

- primární protilátka proti insulinu: králičí „Anti-Insulin antibody“ (Abcam), ředění 1:400/ myší „Monoclonal to Insulin IN-05“ (EXBIO), ředění 1:100
- primární protilátka proti c-Myc: králičí „Anti-c-Myc antibody“, ředění 1:100
- sekundární protilátka: „anti-rabbit“ protilátka Alexa Fluor® 555
- sekundární protilátka: „anti-mouse“ protilátka Alexa Fluor® 647

Transfekované buňky v 96-jamkové destičce byly po cca 50 hodinové kultivaci nejdříve třikrát promyty od média roztokem HBBS („Hank's balanced salt solution“) s 1% obsahem FBS (fetal bovine serum). Následně byly buňky po dobu 20 minut fixovány 100 μ l 4% roztokem formaldehydu v PBS a poté třikrát promyty pufrům PBS. Po fixaci bylo k buňkám přidáno 100 μ l permeabilizačního pufru (0,5% Triton X-100 v PBS). Po 20 minutách byl permeabilizační pufr odstraněn, jamky třikrát promyty PBS a poté do každé jamky přidáno 100 μ l Click-IT® reakčního mixu (složení viz protokol ke kitu). Destička byla poté inkubována 30 minut za laboratorní teploty bez přístupu světla. V závěru byly jamky ještě třikrát promyty pufrům PBS. V této fázi lze pomocí fluorescenčního mikroskopu sledovat buňky, u nichž prokazatelně došlo k proliferaci, případně lze v imunochemickém značení dále pokračovat a pomocí protilátek detekovat specifické buněčné markery.

Před přidáním primární a sekundární protilátky je třeba přidat k buňkám blokovací roztok (5% kozí sérum v promývacím roztoku - 0,1M glycin + 0,5% Triton X-100 v PBS) pro vykrytí nespecifických interakcí. Do jamek bylo přidáno 100 μ l blokovacího roztoku a ponecháno inkubovat 30 min při laboratorní teplotě a za nepřístupu světla. Po uplynutí inkubační doby byl blokovací roztok odebrán a do jamek přidáno 100 μ l primární protilátky zředěné v „Antibody diluent“ (1% BSA, 0,2% „Cold fish skin“ želatina, 0,5% Triton X-100, 0,01% azid sodný v PBS; pH = 7,3). Vzorky byly s primárními protilátkami inkubovány 30 min při 37 °C a před přidáním sekundární protilátky třikrát promyty pufrům PBS. Poté bylo přidáno 100 μ l sekundární protilátky ředěné v poměru 1:1000 v blokovacím roztoku a inkubováno za stejných podmínek jako v případě primární protilátky. Nenavázané protilátky byly opět třikrát promyty pufrům PBS. Pro detekci buněčných jader bylo použito fluorescenční barvivo NucBlue™ Fixed Cell Stain ReadyProbes™ reagent (DAPI)

v přibližném množství 1 kapka/1 ml PBS. Do jamek bylo aplikováno 90 μ l připraveného roztoku DAPI, inkubace probíhala 5 minut ve tmě za laboratorní teploty. V závěru byly buňky opět třikrát promyty pufrům PBS a před mikroskopickým vyhodnocením převrstveny roztokem DABCO-Mowiol (2,5% 1,4-diazabicyclo-octane (DABCO), 10% Mowiol® 4-88, 25% glycerol a 0,1 M Tris-HCl; pH=8,5). Pozorování probíhalo na fluorescenčním mikroskopu EVOS®FL Auto (zvětšení 200 \times).

3.7 Izolace celkové buněčné RNA

Izolace celkové RNA z disociovaných potkaních buněk Langerhansových ostrůvků byla provedena dle kitu RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen). K buněčné peletě bylo přidáno 600 μ l „pufu RLT“ s přísávkem 10 μ l β -merkaptóethanolu. Buněčná suspenze byla poté nanášena na kolonku vázající DNA (součást kitu) a centrifugována (Hettich Zentrifugen MICRO 220R, 30 s, 8000 \times g). Do filtrátu bylo aplikováno 600 μ l 70% ethanolu a tento roztok aplikován na kolonku vázající RNA (součást kitu). Kolonka byla následně centrifugována (15 s, 8000 \times g). Poté bylo na kolonku přidáno 700 μ l „pufu RW1“ a opět centrifugováno (15 s, 8000 \times g). V dalším kroku byla kolonka dvakrát promyta 500 μ l „pufu RPE“ (15 s/2 min, 8000 \times g). Izolovaná RNA byla eluována vodou bez obsahu nukleas, celkem dvakrát po 50 μ l (1 min, 8000 \times g).

3.8 Kvantitativní PCR s reversní transkripcí

Přepis izolované buněčné RNA do cDNA byl proveden dle protokolu ke kitu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit. Byla připravena reakční směs dle tabulky 8:

Tabulka 8: Reakční směs pro reversní transkripci buněčné RNA (1)

Složka	Objem [μ l]
izolovaná buněčná RNA	20
zakotvené oligo(dT) ₁₈ primery (50 pmol/ μ l)	2
náhodné hexamerové primery (600 pmol/ μ l)	2
„PCR-grade water“ (bez obsahu nukleas)	2

Reakční směs byla následně zahřívána 5 minut při 65 $^{\circ}$ C a poté ihned uložena na led. Do reakční směsi byly následně přidány zbývající složky (viz tabulka 9).

Tabulka 9: Reakční směs pro reversní transkripci buněčné RNA (2)

Složka	Objem [μl]
reakční pufr „Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase”	8
inhibitor RNAs (4 U/ μl)	1
dNTP (jednotlivě 10 mM)	4
reversní transkriptasa (20 U/ μl)	1

Takto připravená reakční směs byla v termocykleru (T-personal, Biometra) zahřívána nejdříve 10 minut při 25 °C a poté 30 min při 55 °C. Reakce byla ukončena inaktivací reversní transkriptasy zahřátím reakční směsi na 85 °C po dobu 5 minut.

V druhém kroku byla provedena kvantitativní PCR (qPCR) dle instrukcí ke kitu Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Applied Science). Nejdříve byl pro každý analyzovaný gen připraven roztok s obsahem příslušných primerů (tabulka 10).

Tabulka 10: Složení reakční směsi pro kvantitativní PCR (1)

Složka	Objem [μl]
„forward primer“	0,6
„reverse primer“	0,6
„PCR-grade water“	3,8

Dále byla připravena další reakční směs obsahující cDNA získanou reversní transkripcí a fluorofor (tabulka 11).

Tabulka 11: Složení reakční směsi pro kvantitativní PCR (2)

Složka	Objem [μl]
„Fast Start Universal SYBR Green Master“	10
templát cDNA	1
„PCR-grade water“	4

Reakční komponenty uvedené v tabulce 10 a 11 byly smíchány dohromady a takto připravená reakční směs pro qPCR inkubována dle rozpisu v tabulce 12:

Tabulka 12: Teplotní program pro kvantitativní PCR.

1.	50 °C	2 min
2.	95 °C	10 min
3.	95 °C	15 s
→40×	62-64 °C	30 s

Pro analýzu genové exprese bylo vybráno 24 genů, jejichž jmenovitý seznam s konkrétními sekvencemi primerů je uveden v tabulce 13. Jako referenční gen byl použit ACTB (β -aktin). Míra exprese jednotlivých genů byla vypočítána metodou $\Delta\Delta CT$, s normalizací na expresi β -aktinu.

Tabulka 13: Sekvence primerů pro jednotlivé geny kódující vybrané proteiny typické pro β -buňky.

Gen	Sekvence primeru	Gen	Sekvence primeru
<i>INS1</i>	F: CCCTAAGTGACCAGCTACAATCAT	<i>PDX1</i>	F: TTCCCGAATGGAACCGAGACT
	R: CGGGACTTGGGTGTGTAGAAG		R: TCCACTTCATGCGACGGTTT
<i>INS2</i>	F: AAGTGACCAGCTACAGTCGG	<i>TFAM</i>	F: AGTACCCACGCGGCTTTCGTG
	R: ACCTCCAGTGCCAAGGTCTG		R: AAGCTCCCTCCACATGGCTGCAA
<i>GCG</i>	F: AGACCGTTTACATCGTGGCT	<i>HK3</i>	F: CCAAGGCCCTCAGGTAGCTTAGA
	R: GGCAATGTTGTTCCGGTTCC		R: CCCGTCAGTGTACCCACAACA
<i>GLUT2</i>	F: TTGAGACAACAACCTCCGCAC	<i>ENOL</i>	F: GATAAGACCCGCTTCATGGGGAA
	R: TGGAGCAATCTCGCCAATGT		R: CAGCATGAGAACCGCCGTTGAT
<i>GCK</i>	F: TGCCGAGATGCTCTTTGACTACA	<i>LDHA</i>	F: CCCTGAAGTCTCTGAACCCGCA
	R: GGGTTCGCTGAGCTTTCATCC		R: GAAATGGGATGCACCCGCCTAA
<i>UCN3</i>	F: CTAGAGCAAAGTCCTTACAGGGA	<i>EZH2</i>	F: CAGTTCGTGCCCTTGTGTGATA
	R: CCCC GGTCGTTTTTGACCTT		R: GGGTTGCATCCACCACAAAATC
<i>PC2</i>	F: GCTATGCGTCAAGCATGTGG	<i>CDKN2A</i>	F: GTCGTGCGGTATTTGCGGTATC
	R: CTCTCCTGGTTGCGTTGACT		R: TCTCGCGTTGCCAGAAGTGAAG
<i>PC1/3</i>	F: CCTCCTAGCTCTAGTAAAGCAACC	<i>CCND3</i>	F: GCGCAACTGCAGCTTCTAGGTA
	R: TGTTGTTCCGCCCATATCAC		R: GCACAGAGGGCCAAAAAGGTCT
<i>PAX6</i>	F: GGTATCCCGGGACGTCAGTA	<i>CCNE2</i>	F: CTACGCTCCCAAGCTCCAAGAG
	R: GCCCAACATGGAACCCGATG		R: CAAAAGGCACCATCCAGTCTACAC
<i>PAX4</i>	F: CAATCGAGTCCTTCGGGCAC	<i>CDK6</i>	F: CTTGGACGTCATCGGACTCCCA
	R: GCCCAGCTGGAACCTTTTC		R: TCAGGCTGTGTTGAGCTCCGAG
<i>NKX22</i>	F: ACCGAGGGCCTCCAATACTC	<i>CDK4</i>	F: GTCTATGGTCTGGCCCCGAGCG
	R: GGCACGTTTCATCTTGTAGCG		R: TACACCGTCCCATAGGCACCGA
<i>NeuroD</i>	F: GGCTCCAGGGTTATGAGATCG	<i>ACTB</i>	F: TATCGGCAATGAGCGGTTCC
	R: GCCAAGCGCAGTGTCTCTAT		R: TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC

4 VÝSLEDKY

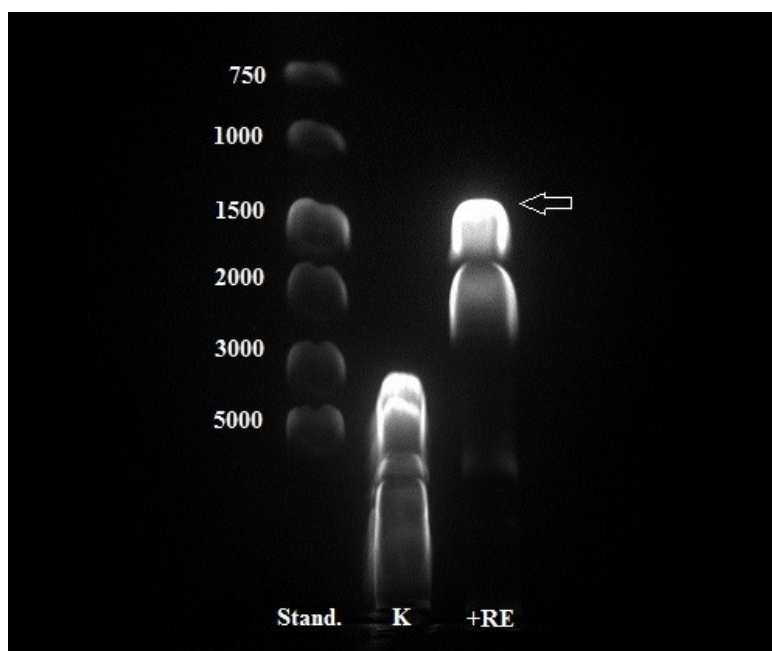
4.1 Příprava DNA templátu pro syntézu mRNA

K získání DNA templátu pro *in vitro* (IVT) transkripci mRNA byl použit cirkulární plasmid nesoucí DNA konstrukt pro transkripční faktor c-Myc. Součástí tohoto konstruktu byla restrikční místa pro endonukleasy *Bam*HI a *Hind*III, T7 promotor, 5' a 3' nepřekládané oblasti (UTR), polyA a polyC sekvence.



Obrázek 11: Schéma plasmidu obsahujícího DNA templát pro přípravu mRNA kódující c-Myc. Velikost překládané oblasti odpovídá přibližně 1500 bp (páry bazí). Velikost kódující sekvence pro c-Myc je 1323 bp.

Po štěpení restrikčními endonukleasami (RE) byl štěpný produkt elektroforeticky separován pomocí TAE gelové elektroforézy (viz obr. 12). Jako marker molekulové velikosti DNA byl použit GeneRuler DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).



Obrázek 12: Ověření účinnosti štěpení plasmidu nesoucího sekvenci pro transkripční faktor c-Myc. Ve sloupci vlevo se nachází DNA marker molekulových velikostí – v bp. V prostředním sloupci je kontrolní vzorek – cirkulární plasmid bez přidání RE. Ve sloupci napravo se nachází

rozštěpený plasmid. Štěpný produkt o velikosti 1500 bp odpovídá předpokládané velikosti DNA templátu.

Po izolaci z gelu byl štěpný produkt amplifikován pomocí PCR a v této finální podobě dále používán jako DNA templát pro *in vitro* syntézu mRNA.

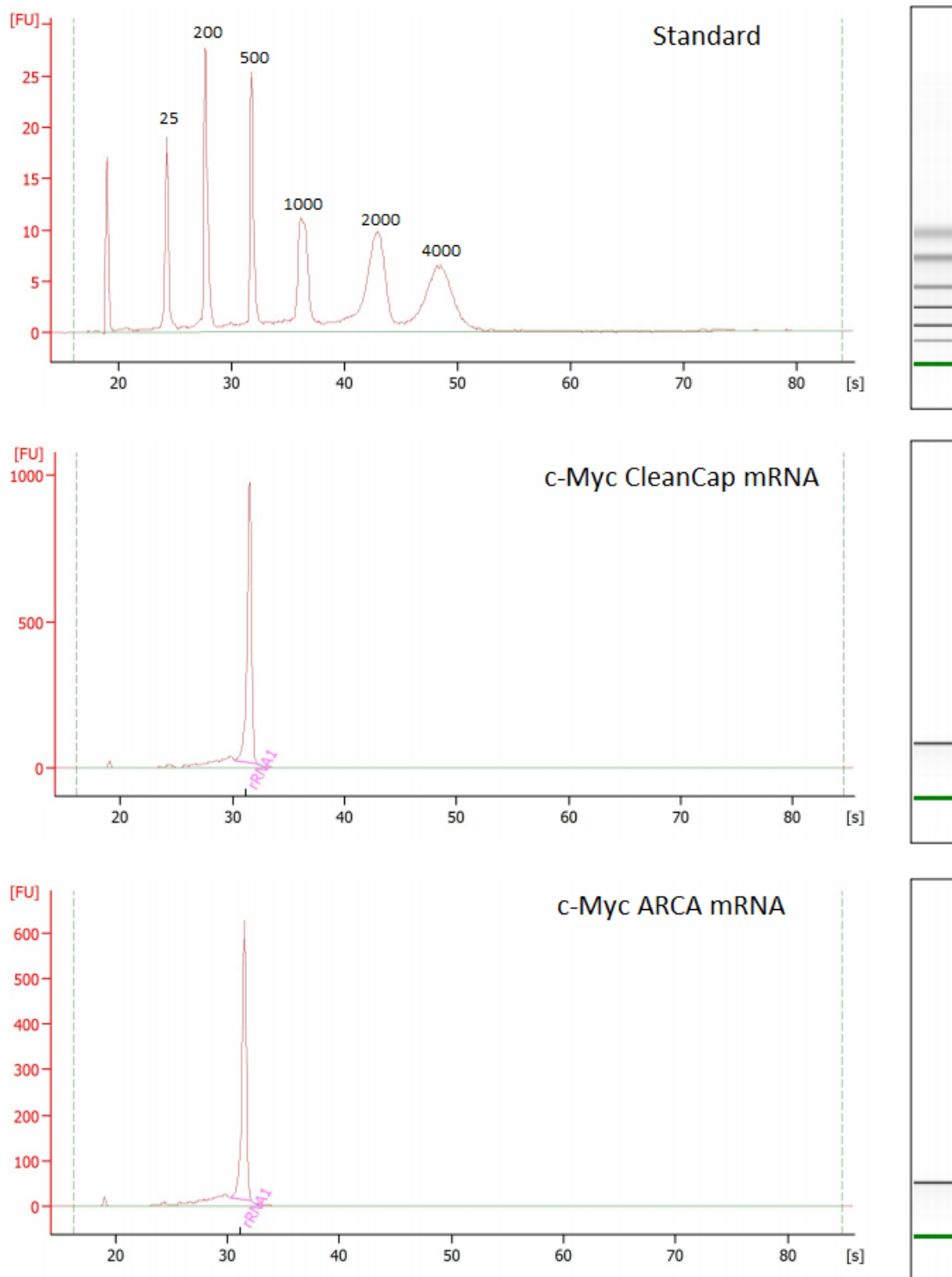
4.2 *In vitro* syntéza mRNA kódující transkripční faktor c-Myc

Příprava syntetické mRNA probíhala dle komerčního kitu (T7 mScriptTM Standard mRNA, CELLSRIPTTM) s několika modifikacemi. Pro zvýšení stability c-Myc-mRNA a úspěšnosti její následné translace byly do reakční směsi přidány modifikované nukleotidy, které snižují imunitní odpověď cílové buňky na cizorodou RNA. V tomto případě se jednalo o methylcytidin a methylpseudouridin. Dále byly testovány syntetické analogy čepičky – standardně užívaná ARCA („anti reverse cap analogue“) a nově vyvinutý analog CleanCap® (TriLink Biotechnologies). Pro získání maximálního množství mRNA obsahující 5'čepičku bylo v případě přípravy ARCA-mRNA navíc provedeno ještě čepičkování pomocí specifických enzymů. Na 3' konec byla pomocí poly(A)polymerasy izolované ze *Saccharomyces cerevisiae* zavedena poly(A) sekvence.

Takto připravená mRNA byla analyzována pomocí kapilární elektroforézy. Na obrázku 13 (strana 50) je zobrazen elektroforeogram synteticky připravené mRNA pro c-Myc v porovnání se vzorkem standardu (směs RNA o známých velikostech). Z elektroforeogramu je patrné, že došlo k syntéze mRNA o vysoké čistotě s minimálním množstvím nespecifických vedlejších produktů. Následující tabulka č. 14 uvádí koncentrace připravených mRNA, které byly stanoveny pomocí fluorimetru Qubit.

Tabulka 14: Koncentrace synteticky připravených mRNA kódujících c-Myc.

IVT mRNA	koncentrace [ng/μl]
c-Myc ARCA mRNA	1100
c-Myc CleanCap mRNA	1400

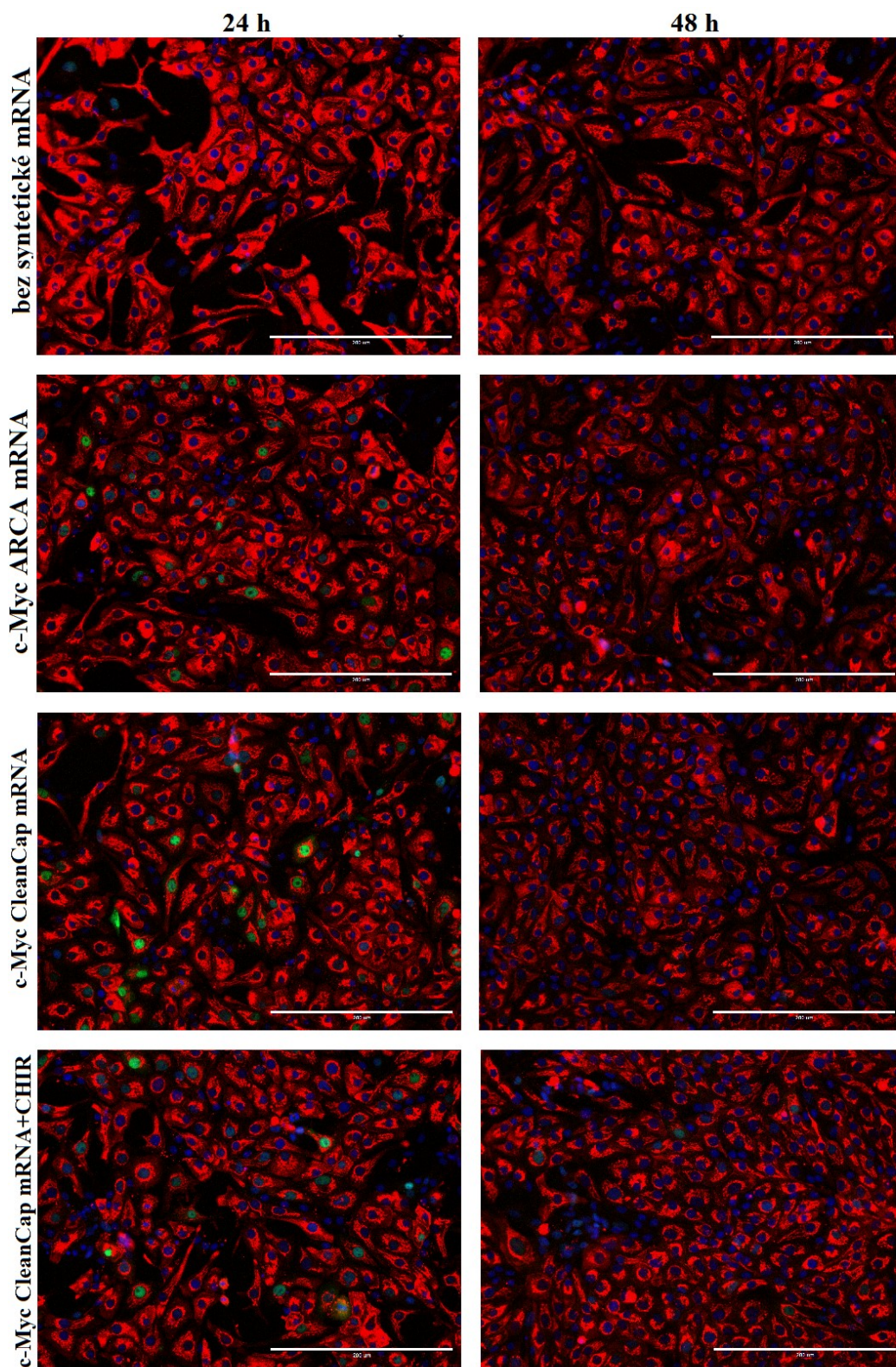


Obrázek 13: Elektroforeogram synteticky připravených mRNA pro c-Myc. Pro porovnání je v horní části obrázku zobrazen elektroforeogram vzorku standardu – směs RNA o konkrétních velikostech (25 až 4000 bp). [FU]- relativní fluorescence, [s]- čas

4.2.1 Detekce proteinu c-Myc v disociovaných buňkách Langerhansových ostrůvků po transfekci c-Myc-mRNA

Před transfekcí buněk Langerhansových ostrůvků (LO) byly v kultivační destičce nejdříve ponechány narůst HTB9 buňky odvozené z karcinomu močového měchýře. Tyto buňky produkují značné množství extracelulární matrix, která díky svému vysokému obsahu proteoglykanů, glykoproteinů a kolagenu poskytuje buňkám LO optimální růstové podmínky. Po vytvoření konfluentní vrstvy HTB9 buněk byla provedena buněčná lyze a na takto připravenou extracelulární matrix byly aplikovány disociované LO. Před transfekcí syntetickou mRNA byly disociované LO ponechány kultivovat 24 hodin.

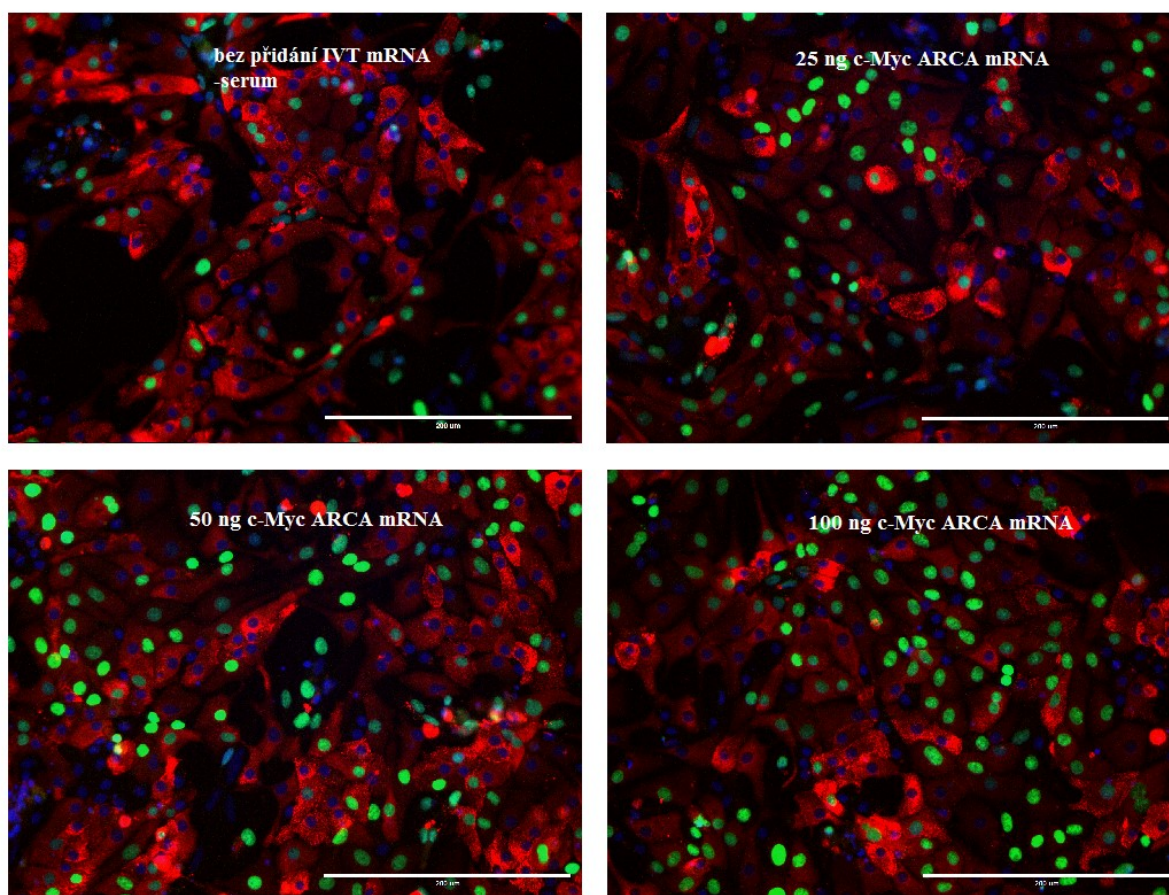
Disociované LO byly transfekovány množstvím 100 ng c-Myc-mRNA na jamku v 96-jamkové destičce. Jako transfekční činidlo byl použit kationtový liposom Lipofectamine® MessengerMAX™. Po transfekci buněk c-Myc-mRNA byl v buňkách pomocí imunoflorescenčního značení detekován c-Myc na proteinové úrovni. Zároveň byla sledována stabilita proteinu c-Myc v buňkách 24 hodin a 48 hodin po transfekci c-Myc-mRNA (viz obr. 14, str. 52). U kontrolního vzorku buněk (tj. bez přidání IVT mRNA) nebyl protein c-Myc detekován v žádném z uvedených časových intervalů. Dále byly testovány 2 syntetické mRNA pro c-Myc, které se vzájemně lišily inkorporovaným analogem čepičky (c-Myc ARCA mRNA/c-Myc CleanCap mRNA). Rovněž byl sledován vliv molekuly CHIR99021, která by měla zvyšovat stabilitu c-Myc. U všech použitých mRNA byla nejvyšší míra exprese c-Myc sledována 24 hodin po transfekci. Po 48 h bylo stopové množství c-Myc detekovatelné pouze u vzorku, k němuž byl přidán CHIR99021.



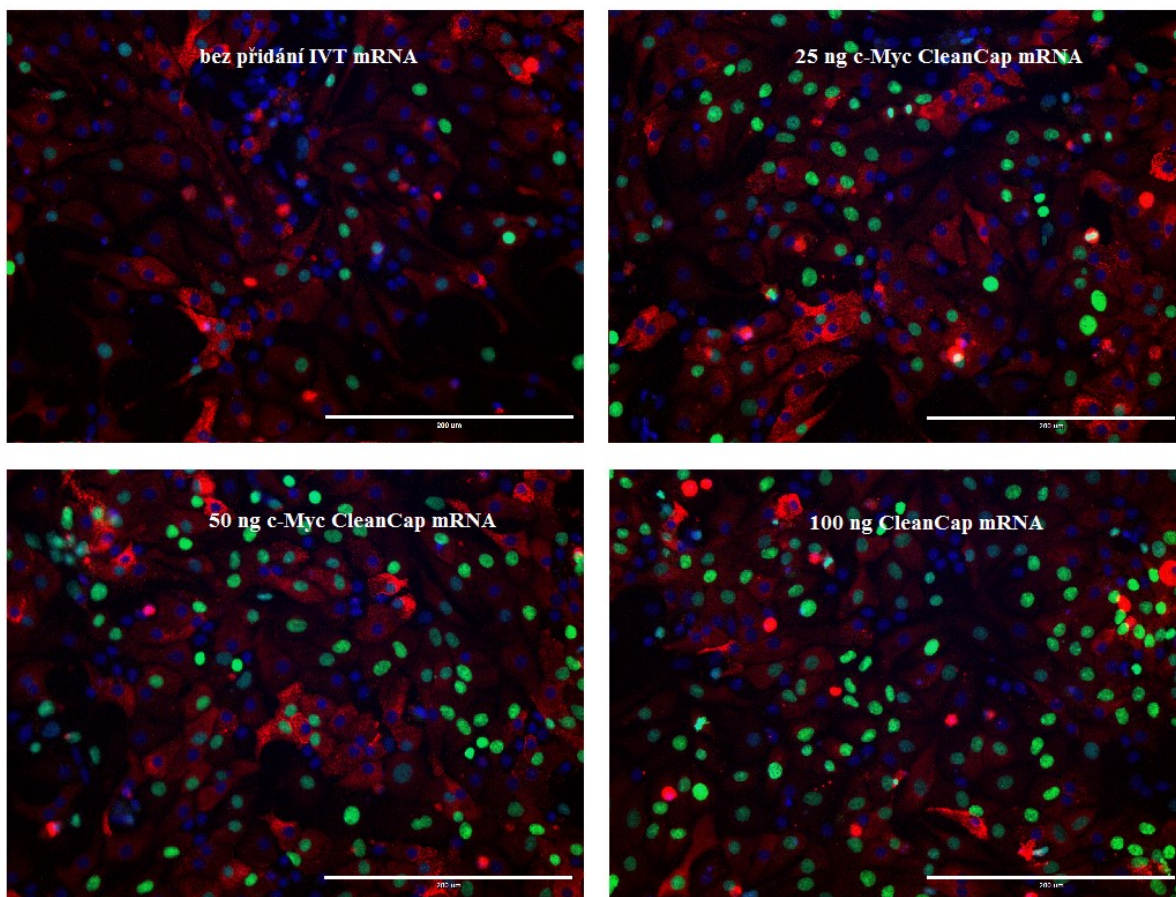
Obrázek 14: Detekce proteinu c-Myc 24 h a 48 h po transfekci buněk c-Myc-mRNA. Buňky disociovaných potkaních Langerhansových ostrůvků byly transfekovány 100 ng IVT mRNA. Buněčná jádra značena modře, buňky pozitivní na insulin červeně, buňky exprimující c-Myc značeny zeleně. Měřítko odpovídá 200 μm . Pozorováno na mikroskopu EVOS FL Auto (200 \times).

4.2.2 Transfekce syntetické mRNA do potkaních buněk disociovaných Langerhansových ostrůvků

c-Myc-mRNA byla transfekována do buněk disociovaných potkaních LO. Na následujících snímcích (obr. 15 a 16) jsou zachyceny buňky po uplynutí 50 hodin od transfekce. K transfekci buněk byly použity 2 typy c-Myc-mRNA: 1) c-Myc-mRNA s inkorporovaným analogem čepičky ARCA (obr. 15) 2) c-Myc-mRNA s analogem čepičky CleanCap (obr. 16, str. 54). Byla sledována závislost míry proliferace na množství přidané mRNA. c-Myc-mRNA byla k buňkám přidána v množství 0, 25, 50 a 100 ng na jamku obsahující 150 μ l media.



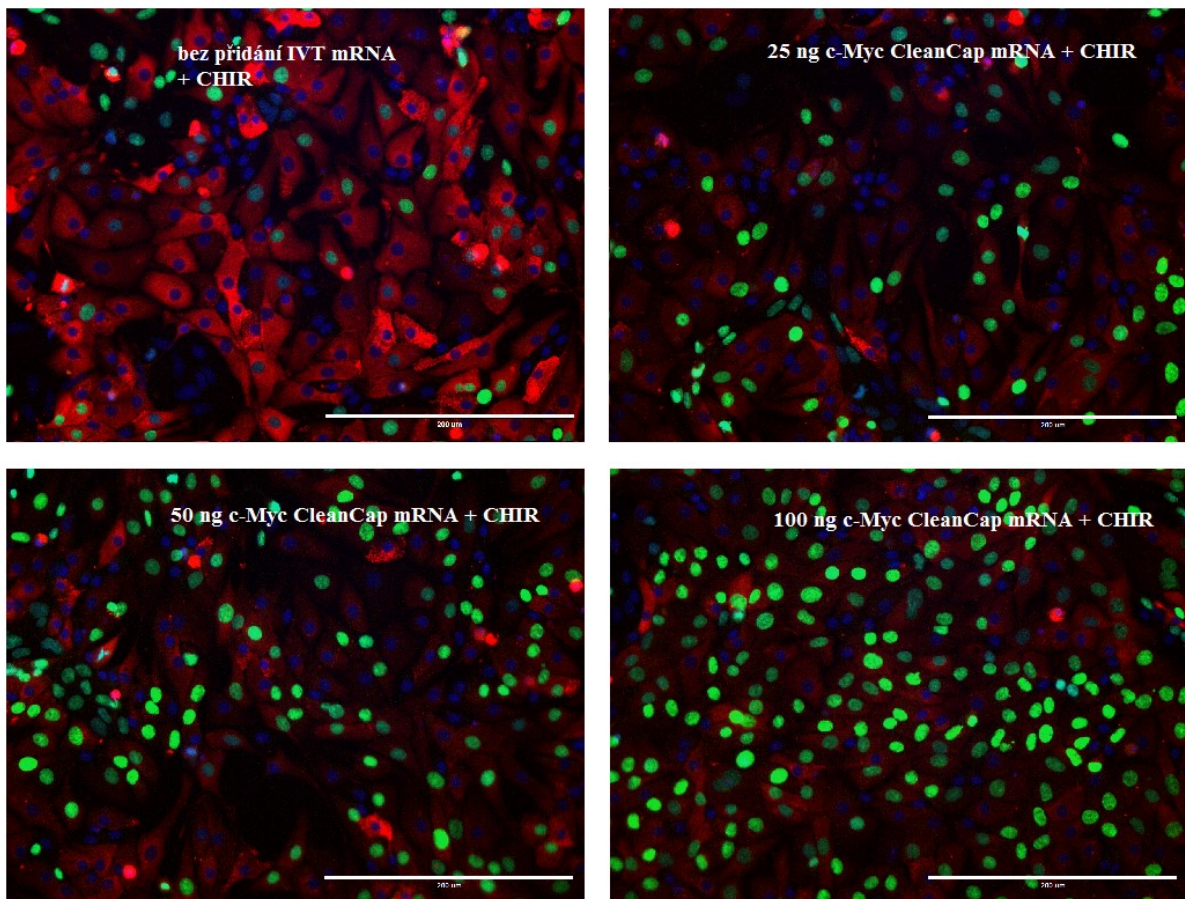
Obrázek 15: Transfekce buněk disociovaných LO pomocí c-Myc-mRNA se syntetickým analogem čepičky ARCA. β -buňky byly detekovány primární protilátkou proti insulinu (červeně), ředění 1:400. Zeleně jsou značeny buňky s inkorporovaným analogem deoxythymidinu - EdU, který slouží k průkazu buněčné proliferace. Bunečná jádra byla značena DAPI (modře). Měřítka odpovídá 200 μ m. Pozorováno na mikroskopu EVOS FL Auto (200 \times).



Obrázek 16: Transfekce disociovaných buněk LO pomocí c-Myc-mRNA se syntetickým analogem čepičky CleanCap. β -buňky byly detekovány primární protilátkou proti insulinu (červeně), ředění 1:400. Zeleně jsou značeny buňky s inkorporovaným analogem deoxythymidinu - EdU, který slouží k průkazu buněčné proliferace. Bunečná jádra byla značena DAPI (modře). Měřítka odpovídá 200 μ m. Pozorováno na mikroskopu EVOS FL Auto (200 \times).

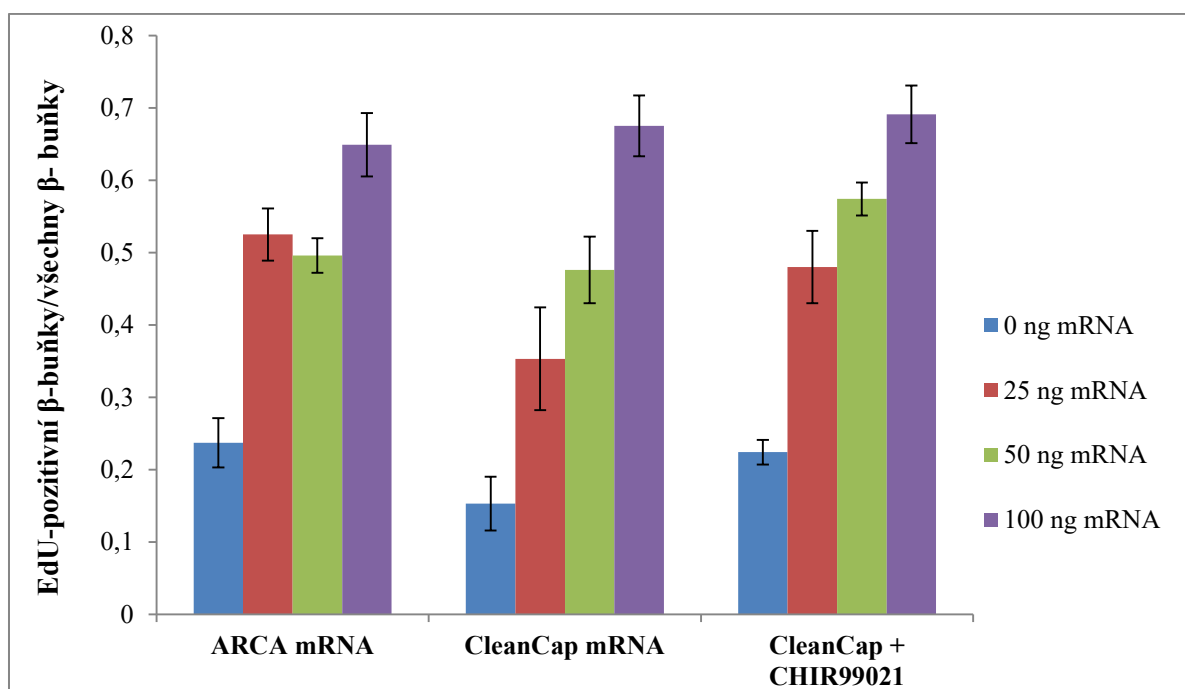
Z obrázků 15 a 16 je patrné, že po transfekci oběma typy c-Myc mRNA došlo k zvýšení proliferace potkaních β -buněk a také, že počet proliferujících β -buněk se s rostoucím množstvím transfekované c-Myc mRNA zvyšuje. Jako negativní kontrola sloužily disociované buňky LO bez přidání c-Myc mRNA.

Dále byla sledována míra proliferace β -buněk po přidání CHIR99021, sloučeniny, která by měla zvyšovat stabilitu proteinu c-Myc. Z obrázku 17 (str. 55) je patrné, že po přidání CHIR99021 dochází k dalšímu nárůstu počtu proliferujících buněk. Tento efekt je obzvláště patrný v případě použití 100 ng CleanCap c-Myc-mRNA v kombinaci s CHIR99021.



Obrázek 17: Ovlivnění míry proliferace pankreatických β -buněk po přidání CHIR99021 k c-Myc-mRNA během transfekce. β -buňky byly detekovány primární protilátkou proti insulinu (červeně), ředění 1:400. Zeleně jsou značeny buňky s inkorporovaným analogem deoxythymidinu - EdU, který slouží k průkazu buněčné proliferace. Bunečná jádra byla značena DAPI (modře). Měřítko odpovídá 200 μ m. Pozorováno na mikroskopu EVOS FL Auto (200 \times).

Následující graf (obr. 18, strana 56) detailněji přibližuje zastoupení proliferujících β -buněk ve zkoumaných vzorcích disociovaných β -buněk LO. Osa závisle proměnné vyjadřuje poměr buněk, u kterých došlo k inkorporaci EdU, analogu deoxythymidinu, a zároveň jsou pozitivní na insulin, ke všem insulin-pozitivním buňkám. Proliferující buňky, které nesekretují insulin, nebyly do kvantifikace zahrnuty, neboť se jedná patrně o ostatní pankreatické endokrinní či neendokrinní buňky.



Obrázek 18: Míra proliferace β -buněk po transfekci buněk disociovaných potkaních LO synteticky připravenými mRNA pro c-Myc. ARCA a CleanCap – strukturně odlišené analogy 5' čepičky. CHIR99021 – inhibitor kinasy GSK3 β , sloučenina potenciálně zvyšující stabilitu proteinu c-Myc. EdU – analog deoxythymidinu - slouží k průkazu replikace buněčné DNA. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (n=3).

Z grafu je zřejmé, že míra proliferace β -buněk úzce koreluje s množstvím transfekované mRNA. Dále je patrné, že c-Myc-mRNA s analogem čepičky ARCA vykazuje v porovnání s c-Myc-CleanCap-mRNA srovnatelnou účinnost, což se ovlivnění proliferace β -buněk týče. Přidání sloučeniny CHIR99021 podpořilo v závislosti na koncentraci c-Myc mRNA další nárůst proliferujících β -buněk v rozmezí 5-13 %.

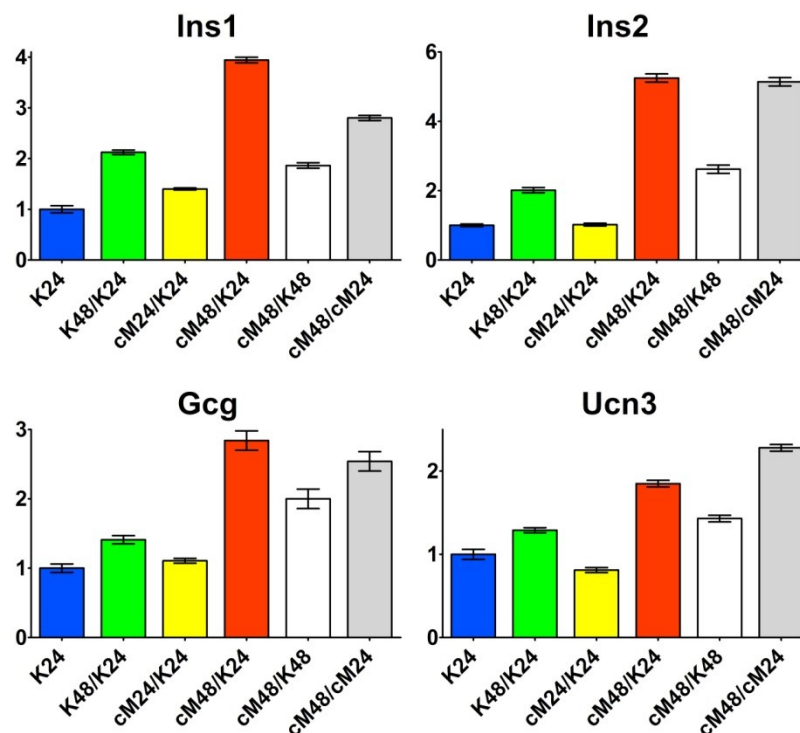
4.2.3 Stanovení genové exprese po transfekci buněk disociovaných LO syntetickou c-Myc-mRNA

Po transfekci buněk c-Myc mRNA byla po 24, resp. 48 hodinách izolována celková buněčná RNA. Pomocí metody kvantitativní PCR s reversní transkripcí byla následně tato RNA analyzována. Provedená analýza genové exprese by měla blíže objasnit molekulární pochody odehrávající se v buňce po navýšení exprese c-Myc.

Celkem bylo analyzováno 24 genů a dle jejich funkčních vlastností je lze rozdělit na:

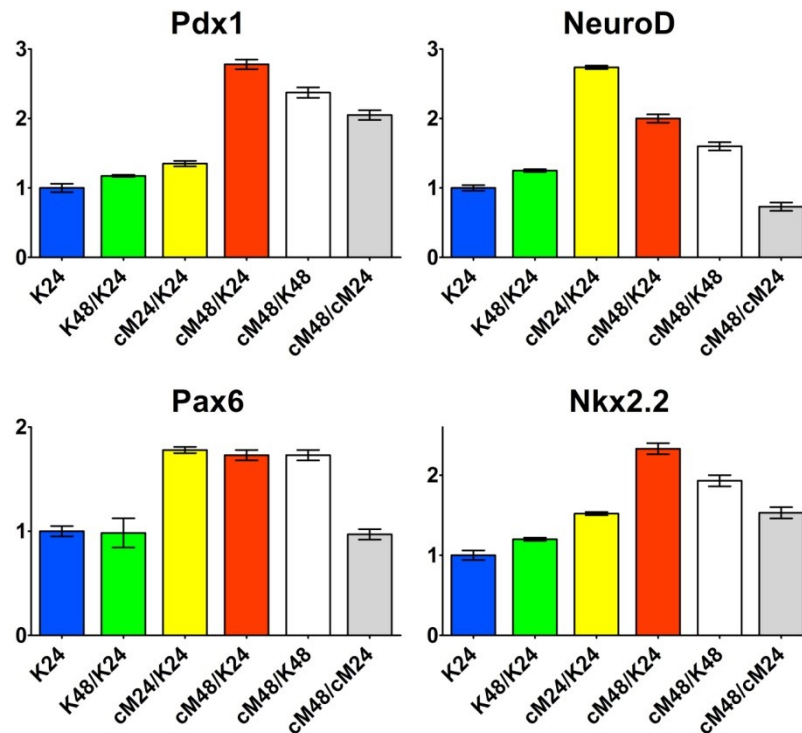
- hormony (obr. 19)
- transkripční faktory ovlivňující expresi insulinu a dalších genů důležitých pro funkci β -buněk (obr. 20, str. 58)
- geny důležité pro funkci β -buněk (obr. 21, str. 59)
- regulátory buněčného cyklu (obr. 22, str. 60)
- geny indukované pomocí c-Myc spojené s glykolysou (obr. 23, str. 61)
- specifické transkripční faktory a epigenetické regulátory (obr. 24, str. 62)

Genová exprese jednotlivých vzorků je vztažena ke kontrolnímu vzorku 24 hodin po nasazení buněk disociovaných LO. Míra exprese byla vypočítána metodou $\Delta\Delta CT$, s normalizací na expresi β -aktinu.



Obrázek 19: Stanovení exprese hormonů a markeru zralosti β -buněk u buněk disociovaných potkaních Langerhansových ostrůvků transfekovaných c-Myc-mRNA. K24 – kontrolní vzorek bez transfekce c-Myc-mRNA, 24 hodin po ukončení transfekce ostatních vzorků (exprese příslušného genu u tohoto vzorku odpovídá hodnotě 1). K48 - kontrolní vzorek buněk bez transfekce c-Myc-mRNA, 48 hodin po transfekci. cM24 – vzorek transfekovaný c-Myc-mRNA, 24 hodin po transfekci. cM48 – vzorek transfekovaný c-Myc-mRNA, 48 hodin po transfekci. *Ins1* - insulin I, *Ins2* - insulin II, *Gcg* – glukagon, *Ucn3* – urocortin 3. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (n=3).

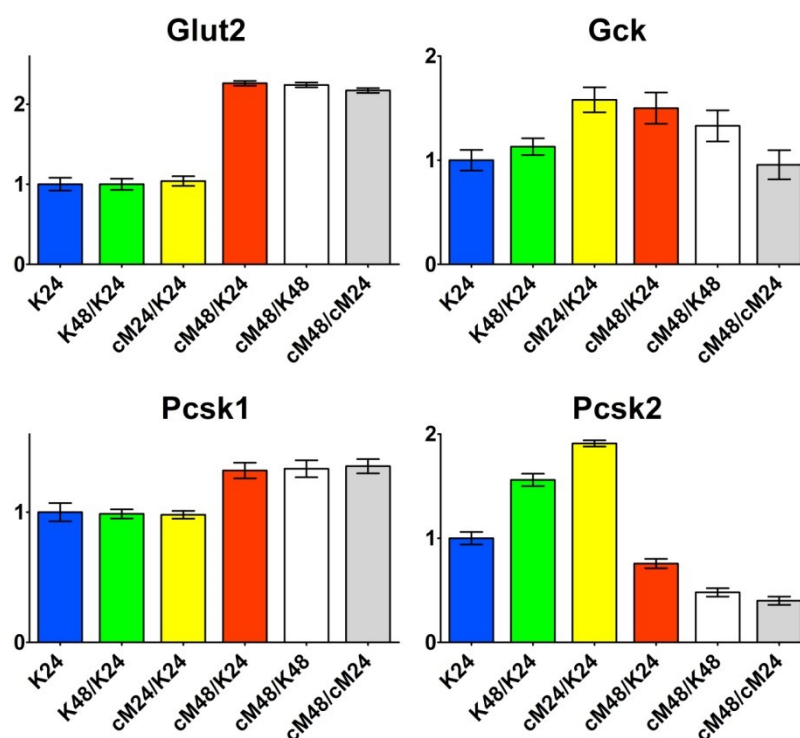
U genů kódujících potkaní insulin, glukagon a markeru zralosti β -buněk urocortin3 došlo po 24 hodinách od transfekce k velmi nízkému nárůstu genové exprese. Výraznější zvýšení exprese těchto genů bylo pozorovatelné až po 48 hodinách od transfekce ostrůvkových buněk c-Myc-mRNA.



Obrázek 20: Stanovení exprese transkripčních faktorů typických pro β -buňky u buněk disociovaných potkaních Langerhansových ostrůvků transfekovaných c-Myc-mRNA. K24 – kontrolní vzorek bez transfekce c-Myc-mRNA, 24 hodin po ukončení transfekce ostatních vzorků (exprese příslušného genu u tohoto vzorku odpovídá hodnotě 1). K48 - kontrolní vzorek buněk bez transfekce c-Myc-mRNA, 48 hodin po transfekci. cM24 – vzorek transfekovaný c-Myc-mRNA, 24 hodin po transfekci. cM48 – vzorek transfekovaný c-Myc-mRNA, 48 hodin po transfekci. *Pdx1*, *NeuroD*, *Pax6*, *Nkx2.2* – transkripční faktory. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (n=3).

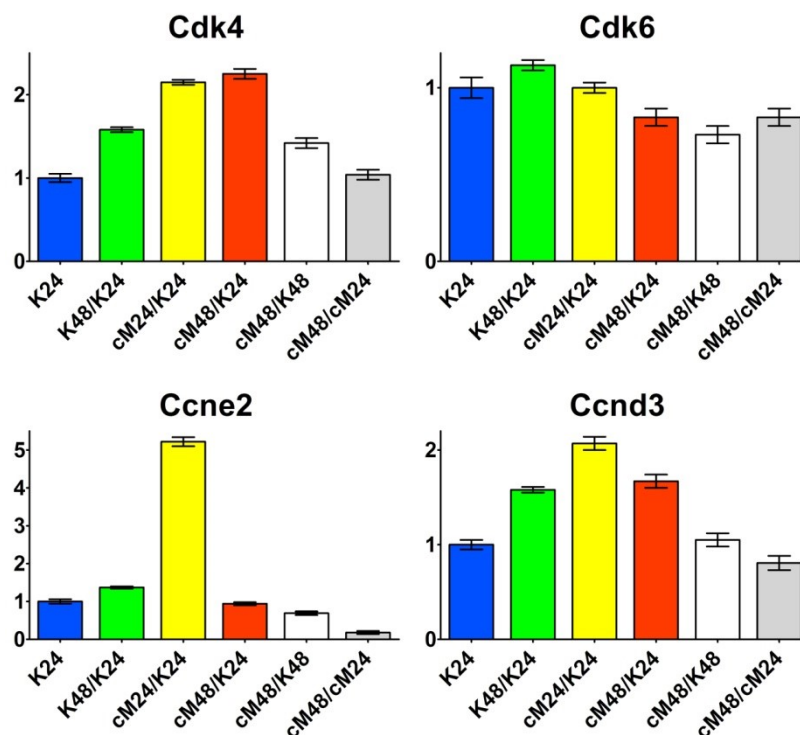
Transkripční faktory uvedené v grafu (obr. 20) se obecně podílí na diferenciaci pankreatických endokrinních buněk, zrání β -buněk a také regulují expresi insulinu a dalších genů důležitých pro funkci β -buněk. Z výsledků je patrné, že transfekce c-Myc-mRNA vyvolala zvýšení exprese všech detekovaných transkripčních faktorů. Zatímco v případě *Pdx1* a *Nkx2.2* došlo k výraznému nárůstu exprese až 48 hodin po transfekci, u *NeuroD* byla vyšší míra exprese prokázána již po 24 hodinách a s postupem času došlo k jejímu částečnému

poklesu. Míra exprese Pax6 byla oproti kontrolnímu vzorku rovněž zvýšená a ve sledovaném časovém úseku se udržovala na konstantní úrovni.



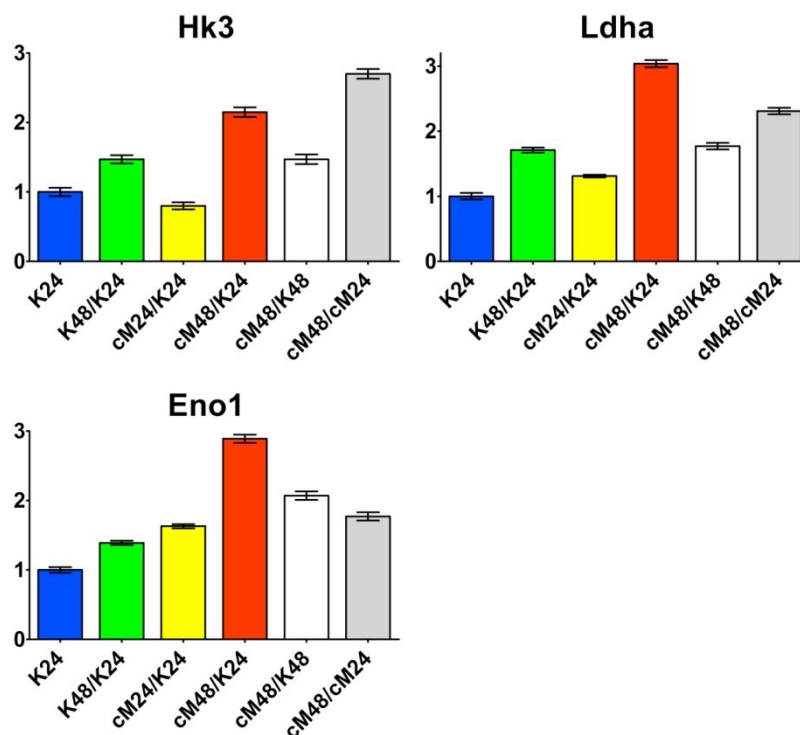
Obrázek 21: Stanovení exprese genů důležitých pro funkci β -buněk u buněk disociovaných potkaních Langerhansových ostrůvků transfekovaných c-Myc-mRNA. K24 – kontrolní vzorek bez transfekce c-Myc-mRNA, 24 hodin po ukončení transfekce ostatních vzorků (exprese příslušného genu u tohoto vzorku odpovídá hodnotě 1). K48 - kontrolní vzorek buněk bez transfekce c-Myc-mRNA, 48 hodin po transfekci. cM24 – vzorek transfekovaný c-Myc-mRNA, 24 hodin po transfekci. cM48 – vzorek transfekovaný c-Myc-mRNA, 48 hodin po transfekci. *Glut2* – glukosový transportér, *Gck* – glukokinasa, *Pcsk1* – proprotein konvertasa 1, *Pcsk2* – proprotein konvertasa 2. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (n=3).

Míra exprese genu pro GLUT2 byla po uplynutí 24 hodin od transfekce srovnatelná s kontrolním vzorkem, avšak po 48 hodinách byl sledován prudký nárůst exprese tohoto glukosového transportéru. Exprese glukokinasy byla po transfekci c-Myc-mRNA rovněž mírně zvýšena a to jak 24 hodin, tak 48 hodin po transfekci. Dále byla sledována exprese dvou genů kódujících proprotein konvertasy, účastníci se zpracování proinsulinu na výsledný insulin. Exprese *Pcsk1* nebyla transfekcí c-Myc-mRNA výrazněji ovlivněna. U *Pcsk2* byl po 48 hodinách patrný prudký pokles exprese v porovnání s kontrolním vzorkem.



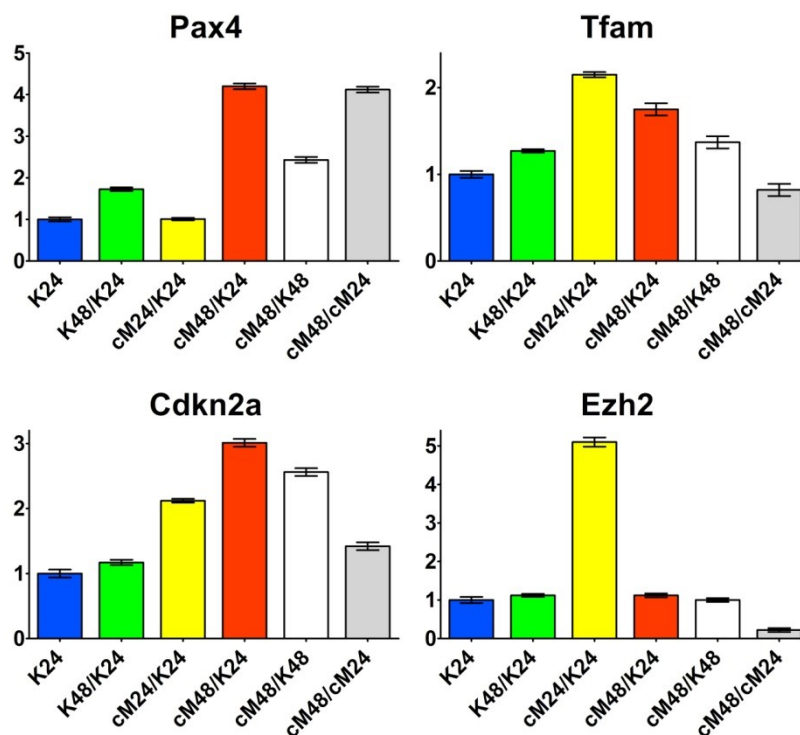
Obrázek 22: Stanovení exprese regulátorů buněčného cyklu u buněk disociovaných potkaních Langerhansových ostrůvků transfekovaných c-Myc-mRNA. K24 – kontrolní vzorek bez transfekce c-Myc-mRNA, 24 hodin po ukončení transfekce ostatních vzorků (exprese příslušného genu u tohoto vzorku odpovídá hodnotě 1). K48 - kontrolní vzorek buněk bez transfekce c-Myc-mRNA, 48 hodin po transfekci. cM24 – vzorek transfekovaný c-Myc-mRNA, 24 hodin po transfekci. cM48 – vzorek transfekovaný c-Myc-mRNA, 48 hodin po transfekci. *Cdk4* – cyklin-dependentní kinasa 4, *Cdk6* – cyklin-dependentní kinasa 6, *Ccne2* – cyklin E2, *Ccnd3* – cyklin D3. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (n=3).

Oba geny pro cykliny E2 a D3 byly po transfekci c-Myc-mRNA exprimovány ve zvýšené míře. V případě cyklinu E2 se dokonce jednalo o 5násobný nárůst oproti kontrolnímu vzorku v čase 24 hodin od transfekce. Po 48 hodinách byla již míra genové exprese cyklinu E2 srovnatelná s kontrolním vzorkem. Ve zvýšené míře byla exprimována také CDK4, zatímco u CDK6 nedošlo k výraznému ovlivnění genové exprese.



Obrázek 23: Stanovení exprese enzymů účastnících se glykolysy u buněk disociovaných potkaních Langerhansových ostrůvků transfekovaných c-Myc-mRNA. K24 – kontrolní vzorek bez transfekce c-Myc-mRNA, 24 hodin po ukončení transfekce ostatních vzorků (exprese příslušného genu u tohoto vzorku odpovídá hodnotě 1). K48 - kontrolní vzorek buněk bez transfekce c-Myc-mRNA, 48 hodin po transfekci. cM24 – vzorek transfekovaný c-Myc-mRNA, 24 hodin po transfekci. cM48 – vzorek transfekovaný c-Myc-mRNA, 48 hodin po transfekci. *Hk3* – hexokinasa 3, *Ldha* – laktátdehydrogenasa A, *Eno1* – enolasa 1. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (n=3).

V transfekovaných buňkách byla po 48 hodinách zjištěna výrazně vyšší exprese hexokinasy 3, laktátdehydrogenasy A a enolasy 1, enzymů účastnících se glykolysy.



Obrázek 24: Stanovení exprese dalších transkripčních faktorů a genů regulujících buněčný cyklus u buněk disociovaných potkaních Langerhansových ostrůvků transfekovaných c-Myc-mRNA. K24 – kontrolní vzorek bez transfekce c-Myc-mRNA, 24 hodin po ukončení transfekce ostatních vzorků (exprese příslušného genu u tohoto vzorku odpovídá hodnotě 1). K48 - kontrolní vzorek buněk bez transfekce c-Myc-mRNA, 48 hodin po transfekci. cM24 – vzorek transfekovaný c-Myc-mRNA, 24 hodin po transfekci. cM48 – vzorek transfekovaný c-Myc-mRNA, 48 hodin po transfekci. *Pax4* – transkripční faktor, *Tfam* – mitochondriální transkripční faktor A, *Cdkn2a* – inhibitor cyklin-dependentní kinasy 4, *EZH2* – „enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2“. Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (n=3).

Transkripční faktor Pax4 ovlivňuje diferenciaci pankreatických β -buněk a rovněž vykazuje protektivní efekt před apoptosou způsobenou stresovými vlivy. Exprese Pax4 se 24 hodin po transfekci c-Myc-mRNA výrazněji nezměnila, zvýšení míry genové exprese bylo patrné až 48 hodin po transfekci. Transkripční faktor A (Tfam) se podílí na replikaci mitochondriální DNA. Vyšší míra exprese Tfam byla detekována 24 hodin po transfekci a s postupem času došlo k jejímu částečnému poklesu. U tumor-supresorového genu *Cdkn2a*, inhibitoru CDK4, byl sledován postupný nárůst genové exprese s časem. Zvýšená exprese *EZH2*, transkripčního represoru inhibitorů buněčného cyklu, byla detekována pouze 24 hodin po transfekci buněk c-Myc-mRNA. Po 48 hodinách byla již míra exprese srovnatelná s kontrolním vzorkem.

5 DISKUSE

Diabetes mellitus je onemocnění, které v současné době celosvětově postihuje téměř půl miliardy lidí (Piemonte, 2019). Jedná se o chronické metabolické onemocnění, při kterém organismus není schopen optimálně regulovat hladinu glukosy v krvi. Přibližně 10% diabetiků trpí tzv. diabetem mellitus 1. typu (T1DM), autoimunitním onemocněním, při kterém dochází k zániku téměř všech insulin produkujících β -buněk. Diabetes 2. typu (T2DM) je spojen s tzv. insulinovou rezistencí, stavem, kdy β -buňky sice produkují insulin, ale z důvodu nedostatečného přesunu glukosy do cílových tkání nedochází k normalizaci glykémie. Oba uvedené typy jsou spojeny se ztrátou funkčnosti β -buněk a jejich následným úbytkem. T2DM je do určité míry možné léčit úpravou životosprávy, T1DM je v současnosti stále nevléčitelný. Předmětem současného výzkumu je proto hledání efektivních způsobů regenerace β -buněk.

Jedním z možných způsobů regenerace pankreatických β -buněk je stimulace jejich proliferace. Poslední přibližně dvě desetiletí jsou hledány způsoby, jak manipulací s molekulami, které řídí buněčný cyklus β -buněk, stimulovat jejich proliferaci. Ve studiích (Dunlop et al., 1996; Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999; Cozar-Castellano et al., 2004) byla pomocí adenovirových nosičů navozena vyšší míra exprese cyklinů a cyklin-dependentních kinas, klíčových aktivátorů buněčného cyklu, což vedlo ke zvýšené proliferaci jak potkaních, tak i lidských β -buněk.

Jedním z klíčových regulátorů buněčného dělení je onkoprotein c-Myc, exprimovaný téměř všemi typy buněk. Kromě proliferačních účinků však vykazuje c-Myc i schopnost navodit dediferenciaci buňky, případně až apoptosu (Prendergast, 1999). Práce (Karslioglu et al., 2011) sledovala vliv proteinu c-Myc přímo na proliferaci izolovaných potkaních a lidských β -buněk. Studie zdůrazňuje úzký vztah mezi koncentrací exprimovaného proteinu c-Myc a jeho biologickými účinky. Při mírném navýšení exprese c-Myc dochází prokazatelně k proliferaci β -buněk, aniž by došlo k jejich dediferenciaci nebo apoptose. Dediferenční a apoptické účinky vykazuje c-Myc až při překročení přibližně 150násobku množství proteinu exprimovaného za fyziologického stavu.

V dostupných studiích byly pro genový přenos většinou použity adenovirové nosiče. Ačkoliv má tento způsob nezpochybnitelné výhody, pojí se s ním i značná rizika. Tyto nosiče genetické informace dobře prostupují buněčnou membránou a zajišťují vysokou expresi genetické informace po relativně dlouhou dobu. Nevýhodou je potenciální riziko integrace virové DNA do genomu cílové buňky (Mitani a Kubo, 2002). Navíc konkrétně u β -buněk při

použití virových nosičů prudce vzrůstá riziko apoptosy (Karsioglu et al., 2011). β -buňky totiž vykazují ve srovnání s jinými druhy buněk zvýšenou citlivost na virové infekce. Následkem infekce pak může dojít k utlumení proteosyntézy, rozvoji zánětlivé reakce vedoucí potenciálně až apoptose (Beeck a Eizirik, 2016).

Z tohoto důvodu byla v této práci ověřena možnost použití synteticky připravené mRNA pro expresi transkripčního faktoru c-Myc. Syntetická mRNA je náchylná k degradaci jak extracelulárními RNAsami, tak imunitním systémem cílové buňky. Z tohoto důvodu byla za účelem zvýšení její stability struktura IVT mRNA modifikována. Během *in vitro* transkripce byl na 5' konec mRNA zaveden syntetický analog čepičky. Byly připraveny 2 frakce mRNA, které se vzájemně lišily typem syntetické čepičky. ARCA (anti-reverse cap analog) je standardně používaná čepička, která svou strukturou odpovídá nejjednoduššímu typu 0. Udává se, že při použití tohoto analogu obsahuje čepičku asi 70 % výsledného transkriptu. Maximálního počtu transkriptu c-Myc mRNA s inkorporovanou 5'čepičkou bylo dosaženo přídatným krokem enzymatického čepičkování během syntézy ARCA-mRNA. Dále byl testován nově vyvinutý analog CleanCap® (TriLink Biotechnologies), u kterého by měla efektivita čepičkování dosahovat 90-99 %. Navíc tento analog svou strukturou odpovídá čepičce typu 1, která je přirozeně zastoupena u mRNA vyšších eukaryot a je v menší míře rozpoznávána mechanismy nespecifické imunity (Shin et al., 2018). V případě, že by některá vlákna mRNA neobsahovala na 5'konci čepičku, byly tyto volné fosfátové skupiny odstraněny antarktickou fosfatasou. Na 3' konec byl poly(A) polymerasou izolované ze *Saccharomyces cerevisiae* zaveden poly(A) konec. Do celé sekvence syntetické mRNA byly inkorporovány modifikované nukleotidy, konkrétně 5'-methylcytidin a methylpseudouridin v poměru 1:3 k přirozeným nukleotidům. Díky použití uvedených způsobů přípravy byla získána syntetická mRNA, která výrazně snižuje aktivaci nespecifické imunitní odpovědi v transfekovaných buňkách, což zlepšuje její stabilitu a zvyšuje míru translace (Karikó et al., 2005).

Připravená mRNA byla analyzována pomocí kapilární elektroforézy. Ze získaného elektroforeogramu je patrné, že byla připravena mRNA o vysoké čistotě bez výrazných příměsí nespecifických produktů. Získaná informace o velikosti připravené mRNA však neodpovídá předpokládané velikosti, jakou by měla IVT mRNA získaná přepisem použitého DNA templátu teoreticky mít. Jednou z možných příčin je relativně vysoké zastoupení modifikovaných nukleotidů, které vykazují v porovnání s přirozenými nukleotidy rozdílnou migraci v elektrickém poli. Rovněž může být účinnost elektroforetické separace ovlivněna přítomností sekundárních struktur RNA, které vznikají jako vedlejší produkt během *in vitro*

transkripce. Přesnější informaci o velikosti a konkrétní struktuře by mohla potenciálně poskytnout metoda Northern Blot. I přes drobné nesrovnalosti ve velikosti se však připravená mRNA jeví jako plně funkční, neboť po její následné transfekci do buněk bylo možné pomocí primární protilátky detekovat protein c-Myc (viz dále).

Připravená mRNA byla transfekována do buněk disociovaných potkaních Langerhansových ostrůvků. Byla sledována závislost mezi množstvím transfekované mRNA a mírou proliferace potkaních β -buněk. Buňky byly transfekovány množstvím 0, 25, 50 a 100 ng mRNA na jamku (150 μ l). Ve všech případech byl s rostoucí koncentrací transfekované mRNA pozorován nárůst počtu proliferujících β -buněk. Výrazné rozdíly v počtu proliferujících β -buněk mezi vzorky transfekovaných IVT mRNA opatřenou čepičkou ARCA a mRNA s čepičkou CleanCap nebyly pozorovány. Vysvětlení tkví patrně ve způsobu přípravy těchto mRNA. V průběhu syntézy mRNA obsahující ARCA analog bylo navíc provedeno ještě enzymatické čepičkování, zatímco při přípravě mRNA s čepičkou CleanCap byl již tento krok vynechán. Použití analogu CleanCap by tedy mohlo proces *in vitro* transkripce významně zjednodušit i při zachování stejné efektivity jako v případě kombinace syntetického analogu ARCA a enzymatického čepičkování.

Nejvyšší počet proliferujících β -buněk byl zaznamenán u vzorků transfekovaných 100 ng mRNA/jamku, kde se proliferační index pohyboval okolo 65 %. Dle v současnosti dostupných zdrojů se míra uměle navozené proliferace potkaních β -buněk pohybuje maximálně mezi 20-25 % (Karslioglu et al., 2011). Příčinou tohoto výrazného nárůstu je patrně krátkodobá a velmi vysoká míra exprese c-Myc při použití syntetické mRNA kódující tento protein (Magadum et al., 2019).

Dále bylo sledováno potenciální ovlivnění proliferace β -buněk po přidání sloučeniny CHIR99021 během transfekce IVT mRNA. CHIR99021 je v současné době považován za nejúčinnější inhibitor molekuly GSK3 β (kinasa glykogensythasy 3) (Cohen a Goedert, 2014). Tato kinasa fosforyluje kromě celé řady jiných substrátů i c-Myc a tím ho inaktivuje (Jope a Johnson, 2004). Přídavek CHIR99021 k IVT mRNA způsobil ve srovnání s transfekcí samotnou mRNA nárůst počtu proliferujících β -buněk o dalších 5-13 %.

Poměrně překvapivé bylo zjištění, že i β -buňky bez přidané mRNA pro c-Myc vykazovaly relativně vysokou míru proliferace – v průměru okolo 20 %. Tento jev bude patrně souviset s věkem experimentálních potkanů, z nichž byly Langerhansovy ostrůvky izolovány. Dle (Finegood et al., 1995) je u potkaních mláďat, ve srovnání s dospělými jedinci, detekována výrazně vyšší míra proliferace β -buněk. U mláďat dosahuje až 20%, zatímco u dospělých jedinců jsou to pouhá 2 %. S rostoucím věkem totiž dochází k aktivaci exprese

tumor-supresorových genů u pankreatických β -buněk, které je zapříčiněno epigenetickými modifikacemi. V případě β -buněk získaných od potkanů starých 6 měsíců se již míra přirozené proliferace pohybovala na hranici 2 % (data neuvedena), což je v souladu s výše uvedenými studiemi. Alternativním vysvětlením může být i způsob kultivace izolovaných potkaních buněk, kdy kultivační podmínky (např. použití extracelulární matrix) nejsou zcela totožné se situací *in vivo*.

c-Myc je klinicky významný onkoprotein, udává se, že jeho zvýšená exprese provází výskyt až 40 % nádorů (Miller et al., 2012). c-Myc ovlivňuje řadu navzájem úzce spjatých buněčných dějů, proto je regulace jeho exprese přísně koordinovaný proces. Nabízí se proto otázka, zda navození proliferace β -buněk v takovéto míře nemůže potenciálně vést k nádorovému bujení. Ve studiích, kde byly pro expresi c-Myc použity adenovirové nosiče (Cheung et al., 2010) nebo transgenní myši (Laybutt et al., 2002) vyústila snaha o navození proliferace β -buněk ve většině případů v apoptosu, rozvoj tumoru nebo diabetes. Nevýhodou použití adenovirových nosičů pro navození umělé exprese c-Myc je následná dlouhodobá a poměrně vysoká míra exprese tohoto proteinu v cílové buňce. Výhodou přenosu genetické informace ve formě mRNA je skutečnost, že po translaci proteinu v cytoplasmě je mRNA po určité době degradována. Z tohoto důvodu nedochází ke dlouhodobé expresi proteinu, což bylo v rámci této práce ověřeno imunofluorescenčním průkazem c-Myc na proteinové úrovni. c-Myc byl detekován v relativně vysokém množství 24 hodin po transfekci buněk, po uplynutí 48 hodin již nebyla jeho exprese ve zvýšené míře prokázána. Dále je třeba brát v potaz, že deregulace buněčného cyklu spojená s rozvojem nádorového bujení je proces ovlivněný celou řadou faktorů (Miller et al., 2012).

Jak již bylo několikrát zmíněno, c-Myc ovlivňuje kromě proliferace i celou řadu dalších buněčných pochodů. Pro detailnější přiblížení těchto mechanismů byla stanovována exprese vybraných genů. Bylo potvrzeno, že c-Myc indukuje expresi regulátorů buněčného cyklu, především molekul, které směřují buňku z G₁ do S fáze (Karslioglu et al., 2011). Konkrétně se jednalo o CDK4, cyklin D3 a cyklin E2, u nichž byla zjištěna zvýšená exprese po 24 hodinách od transfekce c-Myc mRNA. U CDK6 byla naopak v čase 24 i 48 hodin po transfekci c-Myc-mRNA míra exprese srovnatelná s kontrolním vzorkem. Rovněž byla zjištěna zvýšená exprese CDKN2A, tumor-supresorového genu kódujícího inhibitor p16^{INK4A}. Míra exprese tohoto genu byla nejvyšší po uplynutí 48 hodin od transfekce, což lze vysvětlit jako kompenzační mechanismus reagující na zvýšenou expresi pro-mitotických faktorů bezprostředně po transfekci buněk c-Myc-mRNA.

c-Myc dále indukuje expresi enzymů účastnících se glykolysy. Tento jev souvisí s tzv. Warburgovým efektem, stavem, kdy nádorové buňky z důvodu vyšších energetických nároků ve vysoké míře metabolizují glukosu. Nádorové buňky jsou schopny metabolizovat glukosu i za anaerobních podmínek prostřednictvím glykolysy a enzymu laktátdehydrogenasy (Miller et al, 2012). U β -buněk je z důvodu zajištění efektivní citlivosti na extracelulární koncentraci glukosy výrazně utlumena exprese některých glykolytických enzymů (Sekine et al., 1994). Konkrétně se jedná například o hexokinasu 3 nebo laktátdehydrogenasu A (LDHA). Bylo prokázáno, že akutní navýšení exprese LDHA může u β -buněk potenciálně vést k porušení glukosou stimulované sekrece insulínu (Ainscow et al., 2000). Právě schopnost sekrece adekvátního množství insulínu v závislosti na aktuální koncentraci glukosy je znakem zralých, plně funkčních β -buněk. Studie (Puri et al., 2018) uvádí, že β -buňky, u nichž byla stimulována proliferace *in vitro*, vykazují nezralý fenotyp spojený mimo jiné právě s nekontrolovanou sekrecí insulínu. V této práci byla zjištěna vyšší míra exprese jak obou potkaních genů pro insulín, tak právě hexokinasu 3 a LDHA. Z uvedených důvodů by proto bylo v rámci dalšího výzkumu vhodné sledovat, zda zvýšená proliferace β -buněk navozená pomocí c-Myc skutečně vede v podmínkách *in vivo* k normalizaci glykémie.

Jedním z dalších markerů zralosti β -buněk je peptid urocortin3 (Ucn3) (Blum et al., 2012). Zvýšená exprese genu pro Ucn3 byla pozorována po uplynutí 48 hodin od transfekce buněk c-Myc mRNA, což patrně souvisí právě s procesem postupného dozrávání buněk po prodělaném buněčném dělení. Dále byla sledována exprese genů důležitých pro tvorbu funkčního insulínu. Konkrétně se jedná o prohormon konvertasu 2 (Pc2) a prohormon konvertasu 1 (Pc1/3). Po 48 hodinách byl zaznamenán pokles exprese Pc2, zatímco v případě Pc1/3 nebyla exprese výrazně ovlivněna. Toto zjištění odpovídá výsledkům práce (Puri et al., 2018), kde bylo prokázáno, že proliferující β -buňky vykazují do jisté míry nezralý fenotyp. Právě díky nižší expresi uvedených hormonů lze u nezralých β -buněk sledovat nahromaděná granula proinsulínu (Furuta et al., 1998).

Jak již bylo zmíněno výše, v rámci analýzy genové exprese byl v průběhu 48 hodin od transfekce pozorován kontinuální nárůst exprese genů *Ins1* a *Ins2* kódujících potkaní insulín. Exprese insulínu je na transkripční úrovni regulována transkripčními faktory Pdx-1, NeuroD, Nkx2.2 a Pax6 (Fu et al., 2013). Vyšší míra exprese genu pro insulín tak může být způsobena právě nárůstem genové exprese uvedených transkripčních faktorů.

Po 48 hodinách od transfekce c-Myc mRNA byl sledován výrazný nárůst exprese genu pro transkripční faktor Pax4. Krátkodobě zvýšená exprese Pax4 prokazatelně stimuluje proliferaci

β -buněk a rovněž vykazuje protektivní efekt před apoptosou způsobenou stresovými vlivy. V případě trvale zvýšené exprese má však dediferenciační účinky (Lorenzo et al., 2015).

Jedním z dalších prokázaných účinků c-Myc je schopnost stimulace exprese mitochondriálních genů (Li et al., 2005). V této diplomové práci byla v rámci analýzy genové exprese sledována exprese konkrétně mitochondriálního transkripčního faktoru A (Tfam), který se podílí na replikaci mitochondriální DNA. Bylo zjištěno, že po transfekci buněk c-Myc-mRNA byla míra exprese Tfam zvýšena.

Jedna z teorií, proč stárnoucí β -buňky proliferují v téměř zanedbatelné míře, je zvýšená koncentrace inhibitorů buněčného cyklu. V této spojitosti byl v úvodu této práce zmíněn protein EZH2, který pomocí epigenetických mechanismů potlačuje expresi některých inhibitorů buněčného cyklu a je ve zvýšené míře přítomen u nezralých proliferujících β -buněk. V rámci analýzy genové exprese byl po 24 hodinách od transfekce pozorován až 5násobný nárůst EZH2 oproti kontrolnímu vzorku. Tato skutečnost může částečně vysvětlit vyšší míru proliferace u buněk transfekovaných c-Myc-mRNA.

Vzhledem k poměrně detailně popsanému a širokému spektru cílových účinků se transkripční faktor c-Myc jeví jako vhodný prostředek pro stimulaci proliferace pankreatických β -buněk. Terapie založená na synteticky připravené mRNA se v současné době dostává stále více do popředí zájmu a své uplatnění našla již v řadě preklinických a klinických studiích. Z uvedených důvodů se indukce proliferace pankreatických β -buněk pomocí c-Myc IVT mRNA jeví jako mimořádně slibná možnost, jak zajistit regeneraci

6 SOUHRN

- metodou *in vitro* transkripce byla připravena syntetická mRNA kódující transkripční faktor c-Myc
- po transfekci c-Myc-mRNA do buněk disociovaných potkaních Langerhansových ostrůvků byla v buňkách detekována vysoká míra exprese c-Myc na proteinové úrovni
- transfekce c-Myc-mRNA do buněk potkaních Langerhansových ostrůvků způsobila prokazatelný nárůst počtu proliferujících β -buněk. Míra proliferace se pohybovala mezi 35-70 % v závislosti na koncentraci použité c-Myc-mRNA.
- bylo zjištěno, že přidání sloučeniny CHIR99021, inhibitoru GSK3 β , zvyšuje počet proliferujících β -buněk o dalších 5-13 %
- analýzou genové exprese byla v buňkách transfekovaných c-Myc-mRNA prokázána vyšší míra exprese genů regulátorů buněčného dělení; dále genů kódujících některé pankreatické hormony; genů transkripčních faktorů ovlivňujících expresi insulinu a genů kódujících enzymy metabolismus glukosy

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

Adrian, T. E., Bloom, S. R., Bryant, M. G., Polak, J. M., Heitz, P. H. a Barnes, A. J. Distribution and release of pancreatic polypeptide. *Gut*. **17**, 940-944 (1976)

Ainscow, E. K., Zhao, Ch. a Rutter, G. A. Acute overexpression of lactate dehydrogenase-A perturbs β -cell mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Diabetes*. **49**, 1149-1155 (2000)

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. **31**, 81-89 (2014)

Andersen, B. R., Muramatsu, H., Nallagatla, S. R., Bevilacqua, P. C, Sansing, L. H., Weissman, D. a Karikó, K. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acid Research*, **38**, 5884-5892 (2010)

Babendure, J. R., Babendure, J. L., Ding, J. H. a Tsien, R. Y. Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA*. **12**, 851-861 (2006)

Barlow, A. D., Nicholson, M. L. a Herbert, T. P. Evidence for Rapamycin Toxicity in Pancreatic β -Cells and a Review of the Underlying Molecular Mechanisms. *Diabetes*. **62**, 2674-2682 (2013)

Bartek, J. a Lukas, J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Letters*. **490**, 117-122 (2001)

Beeck, A. O. a Eizirik, D. L. Viral infection in type 1 diabetes mellitus – why the β -cells? *Nature Reviews Endocrinology*. **12**, 263-273 (2016)

Bernal-Mizrachi, E., Kulkarni, R. N., Donald, K. S., Mauvais-Jarvis, F., Stewartm A. F. a Garcia-Ocaña. Human β -Cell Proliferation and Intracellular Signaling Part 2: Driving in the Dark Without a Road Map. *Diabetes*. **63**, 819-831 (2014)

Blum, B., Hrvatin, S., Schutz, Ch., Bonal, C., Rezaniaand, A. a Melton, D. A. Functional β -cells maturation is marked by an increase in the glucose threshold for insulin secretion and by expression of urocortin3. *Nature*. **30**, 261-264 (2012)

Calvo, S. E., Pagliarini, D. J. a Mootha, V. K. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **106**, 7507–12 (2009)

Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J. Ch., Jörns, A., Lenzen, S. a Eizirik, D. L. Mechanism of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes*. **54**, 97-107 (2005)

Cobrinik, D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*. **24**, 2796-2809 (2005)

Cohen, P. a Goedert, M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *National Reviews Drug Discovery*. **3**, 479-487 (2004)

Cozar-Castellano, I., Takane, K. K., Bottino, R., Balamurugan, A. N. a Stewart, A. F. Induction of beta-cell proliferation and retinoblastoma protein phosphorylation in rat and human islets using adenovirus-mediated transfer of cyclin-dependent kinase-4 and cyclin D1. *Diabetes*. **53**, 149-159 (2004)

- Crick, F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*. **227**, 561-563 (1970).
- Dajani, R., Fraser E., Roe, S. M., Young N., Good V., Dale, T. C. a Pearl, L. H. Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell*. **105**, 721–32 (2001)
- Dunlop, M., Muggli, E. a Clark, S. Association of Cyclin-Dependent Kinase-4 and Cyclin D1 in Neonatal β Cells after Mitogenic Stimulation by Lysophosphatidic Acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **218**, 132-136 (1996)
- Fatrai, S., Elghazi, L., Balcazar, N., Cras-Méneur, C., Krits, I., Kiyokawa, H. a Bernal-Mizrachi, E. Akt induces β -cell proliferation by regulating cyclin D1, cyklin D2, and p21 levels and cyklin-dependent kinase-4 activity. *Diabetes*. **55**, 318-325 (2006)
- Fernandez, P. C., Frank, S. R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A. a Amati, B. Genomic Targets of The Human C-Myc protein. *Genes and Development*. **17**, 1115-1129 (2003)
- Fiaschi-Taesch, N. M., Kleinberger, J. W., Salim, F. G., Troxell R., Wills, R., Tanwir, M., Casinelli, G., Cox, A. E., Takane, K. K., Srinivas, H., Scott, D. K. a Stewart, A. F. Cytoplasmic-nuclear trafficking of G1/S cell cycle molecules and adult human β -cell replication: a revised model of human β -cell G1/S control. *Diabetes*. **58**, 2460-2470 (2013)
- Fiaschi-Taesch, N., Bigatel, T. A., Sicari, B., Takane, K. K., Salim, F., Velazquez-Garcia, S., Harb, G., Selk, K., Cozar-Castellano, I. a Stewart, A. F. Survey of the Human Pancreatic Beta Cell G1/S Proteome Reveals a Potential Therapeutic Role for Cdk-6 and Cyclin D1 in Enhancing Human Beta Cell Replication and Function in Vivo. *Diabetes*. **58**, 882-893 (2009)
- Finegood, D. T., Scaglia, L., Bonner Weir, S. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas: estimation with a simple mathematical model. *Diabetes*. **44**, 249 –256 (1995)
- Floyd, J. C., Fajans, S. S., Knope, R. F. a Conn, J. W. Evidence that insulin release is the mechanism for experimentally induced leucine hypoglycemia in man. *The Journal of Clinical Investigation*. **42**, 1714-1719 (1963)
- Frame, S., Cohen, P., Biondi, R. M. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Molecular Cell*. **7**, 1321-1327 (2001)
- Fu, Z., Gilbert, E. R. a Liu, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. *Current Diabetes Reviews*. **9**, 25-53 (2013)
- Georgia, S., Hinault, Ch., Kawamori, D., Hu, J., Meyer, J., Kanji, M., Bhushan, A. a Kulkarni, R. N. Cyclin D2 Is Essential for the Compensatory β -Cell Hyperplastic Response to Insulin Resistance in Rodents. *Diabetes*. **59**, 987-996 (2010)
- Gregg, B. E., Moore, P. C., Demozay, D., Hall, B. A., Li, M., Husain, A., Wright, A. J., Atkinson, M. A. a Rhodes, Ch. J. Formation of a Human β -Cell Population within Pancreatic Islets Is Set Early in Life. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **97**, 3197-3206 (2012)
- Gregg, B. E., Moore, P. C., Demozay, D., Hall, B. A., Li, M., Husain, A., Wright, A. J., Atkinson, M. A. a Rhodes, Ch. J. Formation of human β -cell population within pancreatic

- islets is set early in life. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **97**, 3197-3206 (2012)
- Gregory, M. A. a Hann, S. R. C-Myc Proteolysis by the Ubiquitin-Proteasome Pathway: Stabilization of C-Myc in Burkitt's Lymphoma Cells. *Molecular and Cellular Biology*. **20**, 2423-2435 (2000)
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. a Bauer, S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. **303**, 1526-1529 (2004)
- Chen, H., Gu, X., Su, I., Bottino, R., Contreras, J. L., Tarakhovskiy, A. a Kim, S. K. Polycomb protein Ezh2 regulates pancreatic β -cell *Ink4a/arf* expression and regeneration in diabetes mellitus. *Genes and Development*. **23**, 975-985 (2009)
- Chen, Ch. Y. A. a Shyu, A. B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences*. **20**, 465-470 (1995)
- Cheung, L., Zervou, S., Mattsson, G., Abouna, S., Zhou, L., Ifandi, V., Pelengaris, S. a Khan, M. c-Myc directly induces both impaired insulin secretion and loss of β -cell mass, independently of hyperglycemia *in vivo*. *Islets*. **2**, 37-45 (2010)
- Cho, J. H., Kim, J. W., Shin, J. A. a Yoon, K. H. β -Cell Mass In People With Type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes Investigation*. **2**, 6-17 (2011)
- Jarmolowski, A., Boelens, W. C., Izaurralde, E. a Mattaj, I. W. Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *Journal of Cell Biology*. **125**, 627-635 (1994)
- Jope, R. S. a Johnson, G. V. W. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *TRENDS in Biochemical Sciences*. **29**, 95-102 (2004)
- Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H. a Weissman, D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*. **23**, 166-175 (2005)
- Karslioglu, E., Kleinberger, J. W., Salim, F. G., Cox, A. E., Takane, K. K., Scott, D. K. a Stewart, A. F. c-Myc is a principal upstream driver of β -cell proliferation in rat insulinoma cell lines and is an effective mediator of human β -cell replication. *Molecular Endocrinology*. **25**, 1760-1772 (2011)
- Kasuga, M., Hedo, J. A., Yamada, K. M. a Kahn, C. R. The Structure of Insulin Receptor and Its Subunits. *The Journal of Biological Chemistry*. **257**, 10392-10399 (1982)
- Kasuga, M., Zick, Y., Blith, D. L., Karlsson, F. A., Häring, H. U. a Kahn, C. R. Insulin stimulation of the beta subunit of the insulin receptor. Formation of both phosphoserine and phosphotyrosine. *Journal of Biological Chemistry*. **257**, 9891-9894 (1982)
- Konarska, M. M., Padgett, R. A. a Sharp, P. A. Recognition of Cap Structure in Splicing In Vitro of mRNA Precursors. *Cell*. **38**, 731-736 (1984)
- Kozak, M. At least six nucleotids preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*. **196**, 947-950 (1987)

- Kulkarni, R. N., Mizrachi, E. B., Ocana, A. G. a Stewart, A. F. Human β -Cell Proliferation and Intracellular Signaling: Driving in the Dark Without a Road Map. *Diabetes*. **61**, 2205-2213 (2012)
- LaGrandeur, T. E a Parker, R. Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. *The EMBO Journal*. **17**, 1487-1496 (1998)
- Laybutt, D. R., Weir, G. C., Kaneto, H., Lebet, J., Palmiter, R. D., Sharma, A. a Bonner-Weir, S. Overexpression of c-Myc in β -cells of transgenic mouse causes proliferation and apoptosis, downregulation of insulin gene expression, and diabetes. *Diabetes*. **51**, 1793-1804 (2002)
- Lee, Y., Dominy, J. E., Choi, Y. J., Jurczak, M., Tolliday, N., Camporez, J. P., Chim, H., Lim, J. H., Ruan, H. B., Yang, X., Vazquez, F., Sicinski, P., Shulman, G. I. a Puigserver, P. Cyclin D1-Cdk4 controls glucose metabolism independently of cell cycle progression. *Nature*. **26**, 547-551 (2014)
- Leibowitz, G., Kaiser, N. a Cerasi, E. β -Cell failure in type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Investigation*. **2**, 82-91 (2011)
- Li, F., Wang, Y., Zeller, K. I., Potter, J. J., Wonsey, D. R., O' Donnell, K. A., Kim, J., Yustein, J. T., Lee, L. A. a Dang, Ch. V. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. **25**, 6225-6234 (2005)
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., H. Horvitz, R. a Golub, T. R. microRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. **435**, 834-838 (2005)
- Magadum, A., Kaur, K. a Zangi, L. mRNA-based protein replacement therapy for the heart. *Molecular Therapy*. **27**, 1-9 (2019)
- Malone, R. W., Felgner, P. L. a Verma, I. M. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proceeding of The National Academy of Sciences of The United States of America*. **86**, 6077-6081 (1989)
- Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N. a Burley, S. K. Cocystal Structure of the Messenger RNA 5' Cap-Binding Protein (elf4E) Bound to 7-methyl-GDP. *Cell*. **89**, 951-961 (1997)
- Martin, S. A., Paoletti, E. a Moss, B. Purification of mRNA Guanylyltransferase and mRNA(guanine-7-) methyltransferase from Vaccinia Virions. *The Journal of Biological Chemistry*. **250**, 9322-9329 (1975)
- Meier, J. J., Köhler, Ch. U., Alkhatib, B., Sergi, C., Junker, T., Klein, H. H., Schmidt, W. E. a Fritsch, H. β -cell development and turnover during prenatal life in humans. *European Journal of Endocrinology*. **162**, 559-568 (2010)
- Miller, D. M., Thomas, S. D., Islam, A., Muench, D. a Sedoris, K. c-Myc and cancer metabolism. *American Association for Cancer Research*. **18**, 5546-5553 (2012)
- Mitani, K. a Kubo, S. Adenovirus as an integrating vector. *Current Gene Therapy*. **2**, 135-144 (2002)
- Monde, R. A., Schuster, G. a Stern, D. B. Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie*. **82**, 573-582 (2000)

- Morgan, D. O. Principles of CDK Regulation. *Nature*. **374**, 131-134 (1995)
- Nallagatla, S. R., Hwang, J., Toroney, R., Zheng, X., Cameron, C. E. a Bevilacqua, P. C. 5'-Triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with Short Stem-Loops. *Science*. **318**, 1455-1458 (2007)
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, Ch. V. a Mendell, J. T. c-Myc regulated microRNA modulate E2F1 expression. *Nature*. **435**, 839-843 (2005)
- Pasquinelli, A. E., Dahlberg, J. E. a Lund, E. Reverse 5' caps in RNAs made in vitro by phage RNA polymerases. *RNA*. **1**, 957-967 (1995)
- Perez-Roger, I., Kim, S. H., Griffiths, B., Sewing, A. a Land, H. Cyclins D1 a D2 mediate Myc-induced proliferation via sequestration of p27^{KIP1} a P21^{CIP1}. *The EMBO Journal*. **18**, 5310-5320 (1999)
- Piemonte, L. About diabetes. *International Diabetes Federation*. Dostupné z <https://idf.org/52-about-diabetes.html>; červenec 2019
- Pihoker, C., Gilliam, L. K., Hampe, C. S. a Lernmark, A. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes*. **54**, 52-61 (2005)
- Prendergast, G. C. Mechanism of apoptosis by c-Myc. *Oncogene*. **18**, 2967-2987 (1999)
- Puri, S., Roy, N., Russ, H. A., Leonhardt, L., French, E. K., Roy, R., Bengtsson, H., Scott, D. K., Stewart, A. F. a Hebrok, M. Replication confers β -cell immaturity. *Nature*. **9**, 1-11 (2018)
- Rezania, A., Bruin, J. E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., O'Dwyer, S., Quiskamp, N., Mojibian, M., Albrecht, T., Yang, Y. H. C., Johnson, J. D. a Kieffer, T. J. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived *in vitro* from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*. **32**, 1121-1133 (2014)
- Robb, P. The development of the islets of Langerhans in the human foetus. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*. **46**, 335-343 (1961)
- Robb, P. The development of the islets of Langerhans in the human foetus. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*. **46**, 335-343 (1961)
- Ross, J. a Sullivan, T. Half-lives of β and γ globin messenger RNAs and of protein synthetic capacity in cultured human reticulocytes. *Blood*. **66**, 1149-1154 (1985)
- Rozenski, J., Crain, P. F. a McCloskey, J. A. The RNA modification database: 1999 update. *Nucleic Acid Research*. **27**, 196-197 (1999)
- Ryle, A. P., Sanger, F., Smith, L. F. a Kitai, R. The Disulphide Bonds of Insulin. *Biochemical Journal*. **60**, 541-556 (1955)
- Sahin, U., Karikó, K. a Türeci, T. mRNA-based therapeutics – developing a new class of drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. **13**, 759-780 (2014)
- Saisho, Y., Butler, A. E., Manesso, E., Elashoff, D., Rizza, R. A. a Butler, P. C. β -Cell mass and turnover in humans. *Diabetes Care*. **36**, 111-117 (2013)
- Shatkin, A. J. Capping of Eucaryotic mRNAs. *Cell*. **9**, 645-653 (1976)

- Shin, D. Azizian, K. T., Henderson, J. M., Lebedev, A., Hogrefe, R. I., Houston, M. a McCaffrey, A. P. Exploring the Messenger RNA Capping Code: CleanCap Co-transcriptional Capping Allows Synthesis of Cap 0, Cap 1, Cap and ^{m6}A_m Capped RNAs. *TriLink BioTechnologies*. (2018)
- Schmidt, H. H., Warner, T. D., Ishii, K., Sheng, H. a Murad, F. Insulin Secretion from Pancreatic B Cells Caused by L-Arginine-Derived Nitrogen Oxides. *Science*. **255**, 721-723 (1992)
- Steitz, J. A. a Jakes, K. How ribosomes select initiator regions in mRNA: base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in Escherichia coli. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*. **72**, 4734-4738 (1975)
- Stepinski, J., Waddel, C., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E. a Rhoads, R. E. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel „anti-reverse“ cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG. *RNA*. **7**, 1486-1495 (2001)
- Stine, Z. E., Walton, Z. E., Altman, B. J., Hsieh, A. L. a Dang, C. V. MYC, Metabolism and Cancer. *American Association for Cancer Research*. **5**, 1024-1039 (2015)
- Stoneley, M., Subkhankulova, T., Le Quesne, J. P. C., Coldwell, M. J., Jopling, C. L., Belsham, G. J. a Willis, A. E. Analysis of the c-myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic Acids Research*. **28**, 687-694 (2000)
- Suzuki, K. a Kono, T. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*. **77**, 2542-2545 (1980)
- Temperley, R. J., Wydro, M., Lightowlers, R. N. a Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. Human mitochondrial mRNAs-like members of all families, similar but different. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. **1797**, 1081-1087 (2010)
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. a Berneman, Z. N. The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer. *Cell Proliferation*. **36**, 131-149 (2003)
- Vidal, A. a Koff, A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene*. **247**, 1-15 (2000)
- Walhout, A. J., Gubbels, J. M., Berbards, R., van der Vliet, P. C. a Timmers, H. T. C-Myc/Max Heterodimers Bind Cooperatively to the E-box Sequences Located in the First Intron of the Rat Ornithine Decarboxylase (ODC) gene. *Nucleic Acid Research*. **25**, 1493-1501 (1997)
- Wang, P. Fiaschi-Taesch, N. M., Vasavada, R. C., Scott, D. K., Garcia-Ocaña, A. a Stewart, A. F. Diabetes mellitus – advances and challenges in human β-cell proliferation. *Nature Reviews Endocrinology*. **11**, 201-212 (2015)
- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsur, M., Gerald, M. F. , Suldán, Z., Kim, D. W., Hofmann, C. S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., Freedman, L. P. Sonenshein, G. E. Repression of transcription of the p27^{KIP1} cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Nature*. **20**, 1688-1702 (2001)

Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J. a Melton, D. A. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*. **455**, 627-633 (2008)

Zinckgraf, J. W. a Silbart, L. K. Modulating gene expression using DNA vaccines with different 3'UTRs influences antibody titer, seroconversion and cytokine profiles. *Vaccine*. **21**, 1640-1649 (2003)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka