

Abstrakt

miRNA jsou malé regulující RNA, které fungují jako posttranskripční regulátory mRNA. miRNA navigují ribonukleoproteinové komplexy na mRNA a umlčují je inhibicí translace a degradací. V savcích miRNA regulují tisíce různých mRNA a byly rozeznány jako regulující faktory ve většině buněčných a vývojových procesech. Poruchy v regulaci miRNA dráhy mohou vézt k závažným defektům a nemocem. V myších oocytech existuje unikátní situace, kdy všechny komponenty miRNA dráhy jsou přítomny, ale přesto je ona dráha zbytná a nefunkční. Molekulární podstata tohoto fenoménu a jeho významu zůstává stále nejasná.

I přes rozsáhlý účinek miRNA dráhy na genovou regulaci v somatických buňkách, strategie jak tuto dráhu studovat jsou limitované. Současné metody pro studium miRNA dráhy používají korelativní studie (jako například sekvenování nové generace) nebo využívají reporterových systémů, které studují pouze relativně malé množství molekul v daném čase a jsou náchylné k artefaktům. V této práci prezentuji návrh a vývoj nové strategie pro přímé monitorování aktivity a integrity miRNA dráhy v živých buňkách za podmínek blízkých fyziologickým podmínkám. Tato strategie by mohla být použita *in vivo* pro studie myších oocytů. Tato strategie je založena na endogenně fluorescenčně značených proteinech ribonukleového komplexu AGO2 a TNRC6C, které utváří biosenzor. Ten ukazuje formování a dynamiku efektorového komplexu miRNA dráhy. V této práci jsem navrhl knock-in strategii kódujících sekvencí fluorescenčních proteinů založenou na CRISPR/Cas9 technologii a vyřešil mnohé problémy spojené s vývojem biosenzoru. Dokázal jsem vytvořit *Ago2* knock-in buněčné linie a připravil a optimalizoval strategii pro knock-in *Tnrc6c*.