

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

Klonování a příprava plasmidů pro reportérový esej lidské GPx7

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

V Hradci Králové 2016

Bc. Barbora Hanousková

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum:

Podpis:

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za trpělivost, ochotu, odborné vedení, cenné rady a připomínky a hlavně velkou pomoc při zpracování diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Barbora Hanousková

Školitel: Ing. Petra Matoušková, PhD.

Název diplomové práce: **Klonování a příprava plasmidů pro reportérový esej lidské GPx7**

Glutathion peroxidázy (GPx), katalyzují redukci H_2O_2 a organických hydroperoxidů na vodu nebo odpovídající alkoholy. Odstraňují tak pro buňku nebezpečné sloučeniny a chrání ji před buněčným stresem. Zatím bylo objeveno v lidském genomu celkem 8 genů kódujících GPx.

GPx7, které se práce věnuje, je monomerní enzym, který má antioxidační účinky a účastní se skládání proteinů. Snížená exprese GPx7 byla zaznamenána u karcinomu prsu, Barrettovy dysplázie jícnu nebo karcinomu jícnu. Spekuluje se proto o GPx7 jakožto klasickém nádorovém supresoru, jehož inaktivace může vést k rozvoji rakoviny.

Diskutuje se působení mikroRNA (miRNA) v jehož důsledku dochází ke snížení exprese genu pro GPx7. MiRNA jsou malé jedno řetězcové nekódující molekuly RNA, které se významně podílejí na regulaci genové exprese. Jejich hlavní funkcí je inhibice genové exprese na post-transkripční úrovni, tedy zabraňují translaci mRNA do struktury proteinu. Děje se tak specifickou vazbou miRNA na vazebná místa hlavně ve 3'UTR oblasti mRNA.

Cílem této práce je příprava plasmidů, které budou obsahovat 3'UTR oblast GPx7, obsahující zmiňovaná vazebná místa pro miRNA a zmutování příslušných oblastí. Pro klonování byl použit vektor pmiR-GLO, který dále umožňuje luciferázovou esej. Takto připravené plasmidy budou sloužit pro další experimenty.

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Barbora Hanousková

Supervisor: Ing. Petra Matoušková, Ph.D

Title of diploma thesis: **Construction of plasmids for human GPx7 gene reporter assay**

Glutathione peroxidases (GPx) catalyze the reduction of H₂O₂ and organic hydroperoxides to H₂O or corresponding alcohols. GPx remove compounds dangerous for the cell and protect cells against oxidative stress. Until now, in human genome in total 8 GPx coding genes were identified.

Thesis deals with GPx7, a monomeric enzyme with antioxidant effect and that participates in protein folding. Lower expression of GPx7 was observed in breast cancer, Barrett's dysplasia and esophageal cancer. GPx7 might be a classic tumor marker and its inactivation can lead to cancer development.

Possibly, microRNAs (miRNAs) cause a low expression of the GPx7 gene. MiRNAs are small non-coding single stranded RNA molecules that are significantly involved in regulation of gene expression. Their main function is inhibition of gene expression at post-transcriptional level, thus prevention translation of mRNA into protein. It is caused by specific binding miRNA to binding sites in 3'UTR region of mRNA.

The aim of this thesis is the construction of plasmids with ligated 3'UTR region of GPx7 containing the miRNA binding sites and their mutated counterparts. Specific vector pmiR-GLO was used for cloning, suitable for subsequent luciferase assay. These plasmids will be used for further experiments.

Obsah

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1. GLUTATHION PEROXIDÁZY (GPx).....	10
2.1.1. GPx1.....	11
2.1.2. GPx2.....	13
2.1.3. GPx3.....	14
2.1.4. GPx4.....	14
2.1.5. GPx5.....	15
2.1.6. GPx6.....	15
2.1.7. GPx7.....	15
2.1.8. GPx8.....	18
2.2. MIKRORNA (miRNA).....	18
2.2.1. Kanonický model biogeneze a funkce miRNA.....	19
2.2.2. Tlumení exprese prostřednictvím miRNA.....	20
2.2.3. MiRNA v genomu.....	21
2.2.4. MiRNA v rakovině.....	21
2.2.5. MiRNA jako onkogen/nádorový supresor.....	22
2.3. BUNĚČNÉ LINIE.....	24
2.3.1. HT-29.....	24
2.3.2. Caco2.....	25
2.3.3. SW480.....	26
2.3.4. SW620.....	28
3. CÍL PRÁCE.....	29
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
4.1. MATERIÁLOVÉ A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	30

4.1.1.	Použité chemikálie a roztoky	30
4.1.2.	Enzymy, komerční kity, buňky	31
4.1.3.	Přístrojové vybavení.....	31
4.1.4.	Pomůcky.....	32
4.2.	METODIKA	32
4.2.1.	IZOLACE RNA	32
4.2.2.	MĚŘENÍ KONCENTRACE RNA	35
4.2.3.	AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA.....	36
4.2.4.	DNASE TREATMENT	39
4.2.5.	REVERZNÍ TRANSKRIPCE.....	40
4.2.6.	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....	43
4.2.7.	IZOLACE A PŘEČIŠTĚNÍ DNA.....	47
4.2.8.	IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA	48
4.2.9.	KLONOVÁNÍ.....	50
4.2.10.	MUTAGENEZE	55
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	58
5.1.	VÝBĚR PRO KLONOVÁNÍ	58
5.1.1.	Vytipování jednotlivých miRNA	58
5.2.	PŘÍPRAVNÉ KLONOVÁNÍ	63
5.3.	SPECIFICKÉ KLONOVÁNÍ	69
5.4.	MUTAGENEZE	72
5.4.1.	Mutace vazebného místa pro miR-137.....	72
5.4.2.	Mutace vazebné sekvence pro miR-29.....	75
6.	ZÁVĚR	79
7.	SEZNAM ZKRATEK	80
8.	POUŽITÁ LITERATURA	83

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění patří celosvětově k nejobávanějším nemocem a představují druhou nejčastější příčinu úmrtí. Příčinami zvyšujícího se výskytu rakoviny je zhoršení životního prostředí, prodloužení délky života a zlepšení včasné diagnózy. Ročně na nádorová onemocnění zemře více než 27 tisíc osob, to představuje zhruba 23% z celkové úmrtnosti.

Aerobní reakce v organismu vedou ke vzniku volných kyslíkových radikálů. Vznikající hydroperoxy jsou organismem využívány pro správnou funkci enzymů při skládání proteinů, při buněčné signalizaci a plní tak nezbytné fyziologické funkce. Při buněčném stresu však může dojít k dramatickému zvýšení tvorby a akumulaci těchto pro buňku toxických sloučenin. V této souvislosti si organismy vytvořily jak enzymatické, tak i neenzymatické systémy k detoxikaci těchto sloučenin. Do skupiny enzymatických systému patří také glutathion peroxidázy (GPx).

Dojde-li jakýmkoli způsobem ke snížení exprese nebo inaktivaci těchto enzymů, dochází k akumulaci těchto reaktivních látek a pro člověka to může znamenat nebezpečí vzniku nádorových onemocnění. Inaktivace nebo snížení exprese genů se mohou účastnit také malé jedno řetězcové nekódující molekuly RNA – mikroRNA (miRNA), MiRNA vystupují jako významné negativní regulátory exprese. Svoji vazbou na mRNA tlumí translaci příslušné mRNA do podoby proteinu.

Cílem této práce je vtypovat miRNA, které mohou způsobovat snížení množství GPx7 a připravit plasmidy obsahující zaligovanou 3'UTR oblast GPx7, jelikož právě tato 3'UTR oblast obsahuje vazebné sekvence pro miRNA. Na základě toho bude potom možné zkoumat vliv jednotlivých miRNA na aktivitu GPx7 a případně jejich účast na rozvoji nádorových onemocnění.

Experiment zahrnuje využití molekulárně biologických metod, jakými izolace RNA, PCR, gelová elektroforéza, samotné klonování a izolace plasmidů. Pro ověření sekvence 3'UTR genu GPx7 dostupné v databázi byl nejprve delší fragment, který obsahoval 3'UTR oblast a část kódující sekvence (CDS) namnožen a zaligován do plasmidu ZeroBlunt. Po úspěšném prvním klonování a ověření sekvence, následovalo

klonování, nyní již samotné 3'UTR oblasti, s využitím prvního plasmidu jako templátu, do specifického vektoru pmiR-GLO, který bude využit pro luciferázovou esej.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. GLUTATHION PEROXIDÁZY (GPx)

Aerobní reakce v organismu vedou k tvorbě volných kyslíkových radikálů, které mohou být ve zvýšeném množství pro buňku toxické. Zároveň ale plní v organismu i fyziologické funkce, jako je buněčná signalizace, nebo pomáhají enzymům při skládání proteinů. Jakýkoliv (biotický či abiotický) buněčný stres však může vyvolat dramatické zvýšení tvorby reaktivních kyslíkových radikálů v intracelulárním prostředí. V této souvislosti si aerobní organismy vyvinuly několik enzymatických a neenzymatických systémů k neutralizaci těchto sloučenin. Enzymové systémy zahrnují sadu genových produktů, mezi které patří superoxid dismutáza, kataláza, askorbát peroxidáza a právě také glutathion peroxidázy (GPx).

Glutathion peroxidáza (EC 1.11.1.9 a EC 1.11.1.12) je obecný název pro rodinu několika enzymů, které katalyzují redukci H_2O_2 nebo organických hydroperoxidů na vodu nebo na odpovídající alkoholy pomocí redukovaného glutathionu (GSH), thioredoxinu (Trx) nebo protein-disulfid izomerázy (PDI), které jsou využívány jako donory elektronů. Trx je přednostně využíván GPx většiny bakterií, bezobratlých živočichů, rostlin a hub. GSH nebo PDI jsou přednostně využívány GPx obratlovců [1].

GPx katalyzují redukci hydroperoxidů (ROOH) dvěma thiolovými skupinami podle obecné rovnice: $\text{ROOH} + 2\text{RSH} \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{RSSH}$. ROOH může být například H_2O_2 , peroxyinitrit nebo různé alifatické hydroperoxydy. Za RSH můžeme v závislosti na druhu GPx dosadit GSH, PDI, Glutaredoxin, sousedící Cys zbytky nebo thioly proteinů [2], [3].

Ačkoliv termín peroxidáza, který jednoznačně definuje enzymovou katalýzu k redukci ROOH, se vztahuje na všechny homology GPx, tak termín glutathion peroxidáza, jakožto funkční substrátové vymezení rodiny enzymů je zavádějící, jelikož GSH není specifický redukční substrát většiny GPx. Homology byly pojmenovány po první objevené glutathion peroxidáze (GPx1) na základě strukturální a konformační podobnosti. Označení glutathion peroxidáza se dnes vztahuje na enzymy, které sdílejí

strukturální podobnost a katalyzují přenos redukčních ekvivalentů z různých thiolů na ROOH [4].

GPx jsou monomerní nebo tetramerní enzymy, které obsahují vysoce konzervované katalytické místo, v němž je vždy specificky přítomna buď aminokyselina cystein (Cys), nebo selenocystein (Sec). Pouze několik glutathion peroxidáz jsou selenoproteiny, tedy obsahují ve svém katalytickém centru Sec. Ve většině případů je zde přítomný Cys. Toto katalytické centrum bylo charakterizováno jako triáda skládající se z glutaminu (Gln), tryptofanu (Trp) a buď Cys, nebo Sec. Později se ukázalo, že jde vlastně o tetrádu, kam náleží ještě asparagin (Asn). Zatím bylo objeveno celkem osm skupin GPx [5], [6].

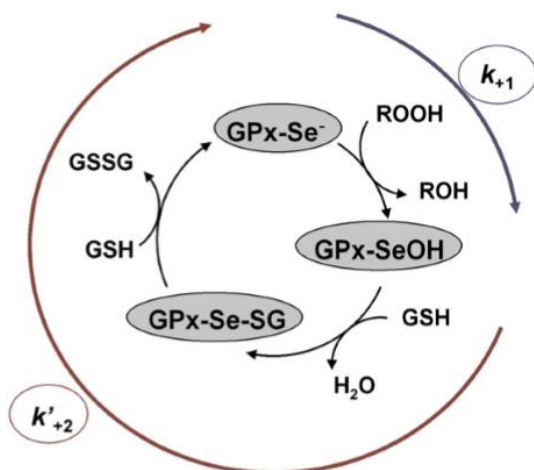
GPx1-3, GPx5 a GPx6 jsou strukturou tetramerní enzymy, které mají specifitu pro rozpustné hydroperoxy. Reagují s H_2O_2 , malými mastnými kyselinami nebo organickými hydroperoxy. Naproti tomu GPx4, GPx7 a GPx8 jsou monomery reagující převážně s komplexnějšími strukturami, kterými jsou například lipidové nebo fosfolipidové hydroperoxy. Reaktivita s fosfolipidovými hydroperoxy je podle všeho umožněna absencí smyčky přítomné v tetramerních GPx, která brání přístupu velkých molekul ke katalytickému centru. Vyjímkou je GPx3, která reaguje jak s monomery, tak i s komplexnějšími hydroperoxy [7], [8].

Přítomnost Sec jakožto katalytického zbytku má vliv na rychlost reakce s hydroperoxy a následně i na rychlost redukce pomocí GSH. Reaktivní Sec je u GPx1 obklopen 4 Argininy (Arg) a Lysinem (Lys) ze sousední podjednotky. Tyto zbytky zprostředkují vazbu s GSH. Všechny těchto 5 aminokyselin je přítomno pouze v GPx1 a v ostatních GPx se postupně ztrácí spolu se snižováním jejich specifity pro GSH. Oxidace GSH prostřednictvím GPx7 probíhá pomaleji než oxidace PDI [9].

2.1.1. GPx1

GPx1 byla identifikována jako první selenoprotein a klasifikována jako enzym působící proti oxidačnímu stresu. Nachází se v červených krvinkách, játrech, plicích a ledvinách. Na subcelulární úrovni se vyskytuje v cytosolu, jádru a mitochondriích. Jedná se o homotetramer reagující především s H_2O_2 a rozpustnými nízkomolekulárními hydroperoxy (t-butyl hydroperoxid, kumen hydroperoxid,

hydroperoxydů mastných kyselin). GPx1 má vzhledem k ostatním glutathion peroxidázám nejvyšší specifitu pro GSH. Nicméně za okolností, kdy není k dispozici GSH-syntetáza (GSS), jako například v mozku, kde mitochondrie GSS neexprimují, je tento enzym schopen využít při likvidaci H_2O_2 γ -glutamylcystein, jakožto reduktant [10], [11].



Obr. 1 Katalytický cyklus GPx1

Na obrázku je naznačen katalytický cyklus GPx1. Modrá šipka vymezuje fázi oxidace, červená šipka redukcí. V prvním kroku dochází k oxidaci Se v GPx1 za vzniku odpovídajícího alkoholu a detoxikaci hydroperoxidu. V dalším kroku přichází do reakce první GSH, kyslík je zde převeden na vodu a z enzymu vzniká selendisulfid. Následně druhá molekula GSH redukuje selendisulfid thiol-disulfátovou výměnou, uvolní se glutathion disulfid (GSSG) a dojde k regeneraci enzymu, který vstupuje do dalšího cyklu.

Bylo zjištěno, že u myši vystavených nadměrné expresi GPx1 dochází sice k ochraně proti akutnímu oxidačnímu stresu, ale tato nadměrná exprese zároveň způsobuje hyperglykémii, hyperinzulinémií, zvýšení buněčné hmoty β -buněk pankreatu, inzulinovou rezistenci a obezitu. Nedostatek H_2O_2 kvůli zvýšené expresi GPx1 může inhibovat inzulinovou signalizaci a pokusem o kompenzaci této nedostatečné signalizace dochází k nadprodukci inzulinu [12], [13].

Bylo prokázáno, že GPx1 je schopna chránit před oxidačními mutacemi DNA a předchází karcinogenezi již v její iniciační fázi. Dále zabraňuje produkci cyklooxygenáz

(COX) a lipooxygenáz (LOX), tudíž nedochází jejich činností k vyplavování prozánětlivých mediátorů, jako jsou prostaglandiny, prostacykliny a leukotrieny. Nedávno byla zjištěna asociace mezi GPx1 a selen-vázajícím proteinem 1 (SBP1). SBP1 interaguje s GPx1 a inhibuje její aktivitu, GPx1 potlačuje expresi SBP1. Ve vzorcích pacientů s hepatocelulárním karcinomem byla nízká hladina SBP1 spojena se zvýšenou aktivitou GPx1. Stejná situace nastala u vzorků karcinomu prostaty. GPx1 může také zprostředkovaně iniciovat apoptózu rakovinných buněk [14], [15],[16], [17].

Hydroperoxydy nejsou jenom škodlivé reaktivní formy kyslíku, ale plní také funkci mediátorů ve fyziologických procesech, například vliv GPx1 při inzulinové signalizaci. Aby mohly být hydroperoxydy využity v rámci signalizace, musí být odjímány proteiny s vysoce reaktivními thiolovými nebo selenolovými skupinami, které přenášejí informaci přes meziproducty k cílovému efektoru. Glutathion peroxidázy mohou jednoduše přenést oxidované ekvivalenty na cílové proteiny specifickou protein-protein interakcí [18], [19].

2.1.2. GPx2

GPx2 je homotetramer blízce příbuzný GPx1. V jeho aktivním místě dochází oproti GPx1 k substituci lysinu za glutamin a argininu za threonin. Specifita k GSH je ale stále vysoká. GPx2 je exprimován v gastrointestinálním traktu, epitelu jícnu a u lidí také v játrech. Tvoří bariéru proti vstřebávání hydroperoxidů z potravy a jeho vysoká koncentrace byla zaznamenána v bazích střevních krypt. Co se týče subcelulární lokalizace, GPx2 se hromadí v jádru a cytosolu. Zvýšená exprese byla zjištěna v rychle rostoucích tkáních a bylo prokázáno, že tento enzym hraje důležitou roli při organogenezi. Všechny nálezy byly vysvětleny potřebou chránit embryo proti reaktivním kyslíkovým radikálům [20], [21], [22].

Snížením GPx2 došlo ke zřetelně vyšší expresi COX2 společně se zvýšenou produkcí prostaglandinu PGE₂. V důsledku toho může mít enzym GPx2 i protizánětlivou funkci. Snížená exprese byla prokázána v buňkách kolorektálního karcinomu, karcinomu skvamózních buněk, adenokarcinomu plic u kuřáků a u Barrettova adenokarcinomu. GPx2 může zabránit iniciaci, ale naopak podpořit již probíhající nádor. To, jakým stylem bude na nádor reagovat, záleží na stádiu rakoviny,

na cestě, kterou došlo k iniciaci nádoru, a také zda je nádor asociován se zánětem či nikoliv [23],[24],[25].

2.1.3. GPx3

GPx3 je stejně jako GPx2 blízka GPx1. Strukturou se jedná o tetramer obsahující dva ze čtyř argininů odpovědných za vazbu GSH. GPx3 je extracelulární protein aktivně vylučovaný do plasmy, kde ho najdeme bez vedoucí sekvence jako glykosylovaný protein. Poprvé byla popsána jeho syntéza v proximálních tubulech ledvin s bazolaterální sekrecí do plasmy. Dále se vyskytuje v plicích, chámovodu, nadvarleti, placentě, semenných váčcích, srdci, svalech a nejrůznějších tělních tekutinách [26], [27].

2.1.4. GPx4

GPx4 je monomer, který postrádá dimerové a tetramerové rozhraní. I přes ztrátu vazebných míst stále reaguje s GSH a ne s thioredoxinem. GPx4 bývá někdy označována jako fosfolipidová PHGPx4, jelikož se vyskytuje i ve formě vázané na plasmatické membrány. Z hlediska buňky se nachází v jádře, cytosolu a mitochondriích. Původně byla GPx4 charakterizovaná jako protein inhibující peroxidaci lipidů, a to díky své jedinečné schopnosti snižovat kromě H_2O_2 a malých hydroperoxidů i hydroperoxydy obsažené v komplexních lipidech. Jedná se o fosfolipidy, hydroperoxydy cholesterolu a estery cholesterolu, a to i v případě, že jsou přítomny v biomembránách nebo lipoproteinech [28], [29], [30].

GPx4 může vystupovat buď jako GSH peroxidáza, nebo thiol peroxidáza. Vyskytuje se ve třech různých izoformách – cytosolické, mitochondriální a izoformě vyskytující se v jádru spermie (snGPx4). Všechny izoformy jsou produktem jednoho genu. GPx4 je nejúčinnější enzym co se týče snižování 12,15-lipooxygenáz a při následném odstraňování produktů lipooxygenáz [31].

2.1.5. GPx5

GPx5 se vyskytuje ve formě tetrameru, v jehož aktivním místě se nachází místo Sec aminokyselina Cys. Jedná se o specifickou glutathion peroxidázu nadvarlat, kde spolu s GPx3 představuje více než 95% nadvarlatové GPx. Enzym se vyskytuje v epiteliálních buňkách lumen nadvarlete, a to hlavně v části hlavy, kde je vyšší koncentrace GSH. Zároveň zde udržuje i optimální koncentraci izoenzymu snGPx4. Exprese je zde pod kontrolou androgenů, testikulárních hormonů a nadvarlatových specifických transkripčních faktorů [32], [33].

GPx5 je uvolněna z epiteliálních buněk do lumen nadvarlete, zde se váže na hlavičky spermií, které doprovází do ocasu nadvarlete. Tam zabrání tomu, aby byly spermie poškozeny působením hydroperoxidů. Kromě toho může GPx5 zabránit předčasné akrozomové reakci během skladování spermií [34].

2.1.6. GPx6

GPx6 je tetramer obsahující Sec ve svém aktivním centru. Je blízký GPx3 a je lokalizován v čichovém epitelu lidí a prasat [35].

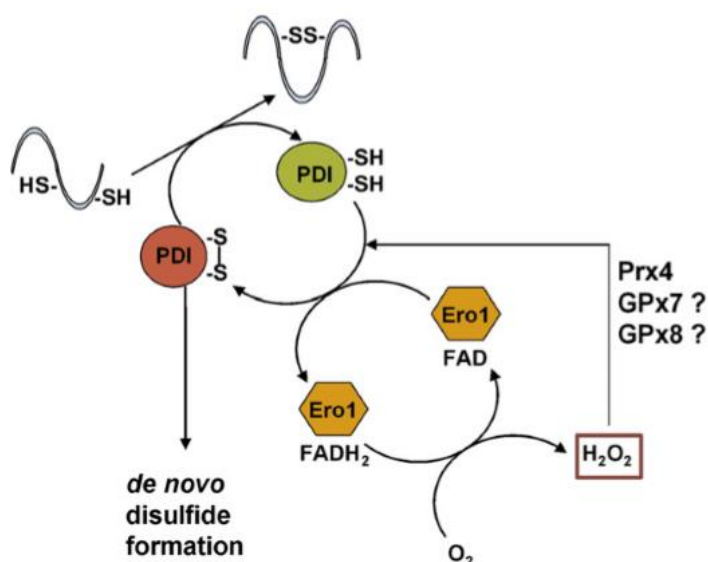
2.1.7. GPx7

GPx7 byla poprvé popsána v roce 2004 jako nová glutathion peroxidáza obsahující v katalytickém místě Cys místo Sec. Vzhledem k homologii s PHGPx4 bývá také nazývána non-seleno-cystein PHGPx – NPHGPx. Strukturně se jedná o monomer o molekulové hmotnosti kolem 22kDa. Vyznačuje se nízkou glutathion peroxidázovou aktivitou *in vitro*. Exprese NPHGPx byla potvrzena v mnoha tkáních včetně vyvíjející se prsní tkáně. Hraje zásadní roli při zmírnění oxidačního stresu vznikajícího z metabolismu polynenasycených mastných kyselin v prsních nádorových buňkách. Má vysokou substrátovou specifitu pro peroxidované fosfolipidy a cholesterol, ve kterých snižuje počet hydroxidových sloučenin [36], [37], [38].

GPx7 je indukována prostřednictvím siRNA, která běžně funguje jako negativní regulátor translace. Ovlivňuje totiž expresi tím, že se váže na mRNA a působí její

degradaci prostřednictvím RISC (RNA-induced-silencing complex), který štěpí mRNA a translaci tím blokuje. GPx7 kovalentně interaguje s XRN2, exoribonukleázou 2, podílející se na degradaci mRNA. Úspěšná interakce GPx7 a XRN2 vyžaduje tvorbu intermolekulárních disulfidů a výsledný komplex poté usnadní odstranění nahromaděné siRNA prostřednictvím XRN2. Jelikož se předpokládá, že nahromaděná siRNA způsobuje oxidační poškození DNA a apoptózu buněk, je v tomto kontextu diskutována funkce GPx7 jako antioxidantní ochrana [39].

GPx7 se dále účastní skládání proteinů. Reakční dráha je naznačena na následujícím obrázku.



Obr. 2 Skládání proteinů a zapojení GPx7 a GPx8 do cyklu

Správné skládání proteinů tvorbou disulfidů je redukční proces, který u eukaryotních buněk probíhá v endoplasmatickém retikulu (ER). Nově syntetizované proteiny vstupují do ER a dochází k jejich oxidaci pomocí protein disulfidových izomeráz (PDI). Redukované PDI jsou reoxidovány flavoproteiny (Ero1), které přenášejí elektrony na FAD za vzniku FADH₂. Flavoprotein poté přeneše 2 elektrony na kyslík za tvorby H₂O₂. H₂O₂ je následně použit k reoxidaci PDI, kterou zprostředkovává peroxiredoxin 4 (Prx4), GPx7 a GPx8. Kromě těchto enzymů existují ještě další

alternativní oxidanty PDI, například GSSG, dehydroaskorbát nebo vitamin K oxidoreduktáza [40].

Obecně platí, že redoxní stav buňky je pod kontrolou Rac-rodiny GTPáz. Hromadí se důkazy o tom, že Rac signalizace je důležitá při nádorovém růstu, a to zejména v trávicím traktu. GPx7 je pravděpodobně inhibitor Rac-dependentní signalizace. Bylo prokázáno, že nadměrná exprese Rac1b vyvolává vznik adenokarcinomu u myši cestou obcházení stárnutí buněk [41], [42].

GPx7 nebyla, nebo byla jen velmi málo, exprimována v buněčných liniích karcinomu prsu. U myši byl zjištěn nepřímý vztah mezi expresí GPx7 a stupněm proliferace mléčné žlázy během těhotenství a kojení. U většiny buněčných linií karcinomu prsu dochází až k úplnému vymizení GPx7 [43], [44].

Bylo prokázáno, že GPx7 pravděpodobně snižuje rychlost rozvoje adenokarcinomu v epitelu Barrettova jícnu. V případě Barrettovy dysplázie a rakoviny jícnu docházelo ke snižování hladiny GPx7. Studie publikované Peng *et al* poukazují na to, že GPx7 se chová jako klasický nádorový supresor, který po rozpuštění v buněčných liniích jícnového karcinomu vyvolává stárnutí buněk a zástavu buněčného cyklu. Experiment byl proveden v buněčných liniích, které nebyly vystaveny oxidačnímu stresu. Předpokládá se, že funkce GPx7 nesouvisí přímo s detoxikací kyslíkových radikálů, ale zahrnuje modulaci intracelulární signalizace. Patří tedy do nové třídy tumor supresorových genů zvláště důležitých při omezení růstu adenokarcinomu v trubicové části trávicího traktu [45], [46].

V buňkách Barrettova adenokarcinomu jícnu docházelo ke snížení GPx7 v důsledku hypermethylace v promotorové oblasti. Na základě analýzy methylace je specifické umístění této hypermethylované oblasti pozorováno u Barrettovy dysplázie a rakoviny jícnu, ale již ne v přilehlém zdravém dlaždicovém epitelu jícnu. Úroveň methylace v postižené oblasti je nepřímo úměrná míře exprese GPx7. Methylace nádorového supresoru se objevuje jako hlavní protinádorový mechanismus vyskytující se u rakoviny trávicího traktu. Tato situace by mohla poukazovat na nádorovou supresi zprostředkovanou GPx7 [47],[48], [49], [50].

Bez ohledu na přesný biologický mechanismus působí GPx7 jako klasický nádorový supresor v jícnu a jeho inaktivace je běžnou a podstatnou událostí v rozvoji jícnových nádorů.

2.1.8. GPx8

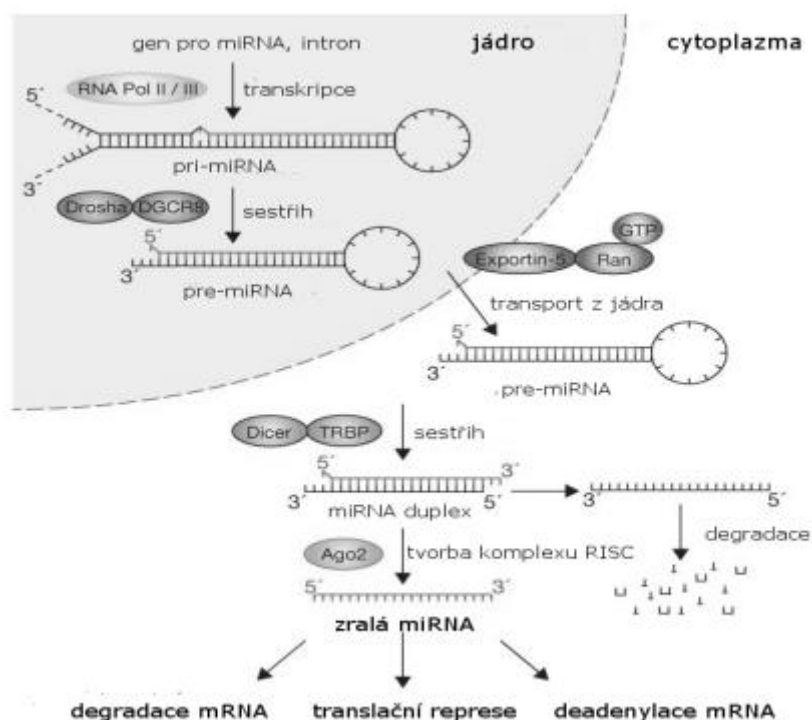
GPx8 byla zatím identifikována jako poslední glutathion peroxidáza v řadě, proto jí bylo přiřazeno číslo 8. Strukturně jde o monomer, ve kterém došlo v katalytické tetradě k záměně glutaminu (Gln) za serin (Ser). Tato záměna ale nemá velký vliv v katalýze enzymu, jelikož jak dusík obsažený v Gln, tak i kyslík v Ser mohou fungovat jako příjemci protonu v aktivním centru pro interakci s hydroperoxydy [51].

GPx8 je membránový protein, který obsahuje C-terminální peptid lokalizovaný v membráně endoplasmatického retikula a N-terminální signální peptid. Patří mezi enzymy hojně se vyskytující v plicích, kde je jejich hladina snížena během chřipkových zápalů plic a zvyšuje se poté při regeneraci tkáně. Spolu s GPx7 tento enzym podporuje reoxidaci PDI při skládání proteinů v ER. Jeho funkce však stále nebyla plně objasněna [52], [53].

2.2. MIKRORNA (miRNA)

MiRNA jsou malé, evolučně vysoce konzervované jedno řetězcové nekódující molekuly RNA, které se významně podílejí na regulaci genové exprese. MiRNA, původně objevena u háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*), se nachází u většiny eukaryot, včetně člověka. Předpovídá se, že miRNA zahrnuje 1-5 % lidského genomu a reguluje nejméně 30 % genů kódujících proteiny. Hraje rozhodující roli v regulaci genové exprese ovládající rozmanité buněčné a metabolické dráhy. Detailní znalost biochemických drah miRNA je nezbytná pro pochopení jejich fyziologické role a důsledků spojených s jejich dysfunkcí a dysregulací [54], [55], [56].

2.2.1. Kanonický model biogeneze a funkce miRNA



Obr. 3 Biogeneze miRNA [57]

Geny pro miRNA obsahují vlastní promotory a přepisovány jsou většinou pomocí RNA polymerázy II do struktury primárních transkriptů – pri-miRNA. Ty jsou dále podrobeny sestřihu za vzniku pre-miRNA, které jsou dlouhé přibližně 70 nukleotidů a mají vlásenkovou strukturu. Sestřih pri-miRNA provádí ribonukleázy Drosha a Pasha (neboli DGCR8). Tyto dva enzymy vytvářejí společně multiproteinový komplex, tzv. mikroprocesor. Následuje aktivní transport pre-miRNA z jádra do cytoplasmy prostřednictvím GTP-dependentního transportního proteinu Exportin 5 (XPO5). XPO5 při transportu rozeznává dvounukleotidový přesah přítomný na pre-miRNA, který zde vznikl působením enzymu Drosha [58].

Pre-miRNA jsou dále zpracovány v plasmě endonukleázou Dicer do dvouřetězcových maturovaných miRNA. Toto zpracování dále zahrnuje rozvinování dvouřetězce miRNA, přičemž jeden řetězec, označovaný jako „guide strand“, je začleněn do multiproteinového komplexu miRISC (miRNA induced silencing complex)

a řetězec druhý, označován jako „passenger strand“, je uvolněn a degradován. Komplex miRISC obsahuje ve své centrální části proteiny Ago1-4, GEMIN3 a GEMIN4. Maturovaná miRNA potom může ve spojení s tímto komplexem realizovat svoji funkci, a to vazbou na komplementární místa 3'UTR oblasti příslušné mRNA. MiRISC je identický s komplexem RISC užívaným v rámci dráhy RNA [59], [60].

2.2.2. Tlumení exprese prostřednictvím miRNA

Funkcí miRNA je negativní regulace exprese cílové mRNA, a to posttranskripčně, na úrovni translace. Existují dva rozdílné typy tlumících mechanismů, přičemž oba vedou ke snížení exprese příslušného genu.

První, irreverzibilní, cestou tlumení exprese je štěpení mRNA. Degradace je katalyzovaná proteinem s endonukleázovou aktivitou AGO2, který je součástí komplexu RISC. Štěpení je umožněno úplnou komplementaritou miRNA s cílovou mRNA, a to v 10-11 bp. Štěpné produkty jsou dále degradovány běžným způsobem.

Druhou cestou snížení exprese je reverzibilní inhibice translace. Tento regulační efekt je v živočišných buňkách majoritní. Inhibice translace je spojena s neúplnou komplementaritou mezi miRNA a mRNA. Stabilní mRNA může být po odstranění translačního represoru opět přeložena. Inhibice translace se odehrává na úrovni iniciace nebo elongace.

Dále může dojít vlivem miRNA k prostorovému oddělení mRNA od translačního aparátu do cytoplasmatického ohniska označovaného P-bodies. Jedná se o malé dynamické cytoplasmatické proteiny, které zprostředkují různými mechanismy reverzibilní represi mRNA. MiRNA může také indukovat deadenylaci mRNA [61], [62], [63], [64].

2.2.3. MiRNA v genomu

Prekurzory miRNA jsou běžně nalézány ve shlucích v různých oblastech genomu, nejčastěji v rámci intronových oblastí genů kódujících proteiny a v oblastech intergenových. Méně často se objevují v rámci exonů a v antisense vlákních transkriptů. Transkripční jednotky miRNA a jejich regulace se liší podle genové lokalizace. Intronové miRNA, nacházející se v hostitelském genu ve stejné orientaci, jsou přepisovány společně s primárním transkriptem za použití stejného promotoru. Intergenové miRNA mají pravděpodobně své vlastní promotory [65], [66], [67].

Povaha transkripčních jednotek intergenových miRNA se právě začíná rozvíjet a objevovat. Nedávná genomová analýza ukazuje, že primární prekurzory miRNA jsou dlouhé polycystronní transkripty, které jsou podobné mRNA a obsahují také posttranskripční úpravy jejich 5' a 3' konců. 5' konec pri-miRNA je zakončen 7-methyl guaninem, 3' konec je polyadenylován – poly(A) [68], [69].

Objev intergenových a intronových miRNA ukázal, že většina miRNA je přepisována RNA polymerázou II. RNA polymeráza II je katalytickou komponentou komplexu proteinů zodpovědných za přepis DNA do mRNA. Nicméně část miRNA může být přepisována i pomocí RNA polymerázy III. Ta specificky syntetizuje malé nekódující RNA, které jsou odpovědné za regulaci buněčného cyklu a růst buněk. Ze syntézy miRNA prostřednictvím RNA polymerázy II a III vyplývá, že miRNA je základní regulační element tvořený z rozmanitých lokusů lidského genomu a podílející se na regulaci genové exprese nezbytné pro normální buněčnou funkci. Exprese miRNA je pod kontrolou transkripčních faktorů a pravděpodobně i ostatních miRNA v závislosti na různorodosti endogenních a exogenních stimulů. Vliv mohou mít také hypoxie či hormonální a dietetické změny [70], [71], [72], [73], [74].

2.2.4. MiRNA v rakovině

Dysregulace genů zapojených do buněčné proliferace, diferenciaci nebo apoptózy je spojena se vznikem rakoviny, jejím růstem a šířením do ostatních tkání.

Geny spojené s rozvojem rakoviny jsou charakterizovány jako onkogeny a tumor supresorové geny. Nadměrná exprese genových produktů onkogenů poskytuje buňkám selektivní výhodu růstu, umožňuje jejich neomezenou proliferaci a omezení vstupu do apoptózy, což může vést ke vzniku nádoru. Naopak produkty tumor supresorových genů mají v biologických procesech regulační funkci a případná ztráta nebo snížení jejich exprese a funkce má za následek dysregulaci spojenou taktéž s možným rozvojem rakoviny [75], [76], [77].

MiRNA hrají důležitou roli v regulaci řady metabolických a buněčných drah, a to zejména těch, které kontrolují a řídí buněčnou proliferaci, diferenciaci a přežití buněk. Porucha regulace exprese miRNA byla prokázána u většiny zkoumaných nádorů [78], [79].

Konkrétní klasifikace miRNA jakožto onkogenů nebo nádorových supresorů je obtížná z důvodu složitých vzájemných vztahů. Exprese miRNA se liší v závislosti na druhu tkáně a diferenciačním stavu buněk. Navíc jedna miRNA může regulovat více cílových mRNA. Tato skutečnost spolu se specifickou tkáňovou expresí může znamenat, že jedna miRNA vystupuje v jednom případě jako nádorový supresor, v případě jiném jako onkogen. Navíc není vždy jasné, zda změna exprese miRNA je přímou příčinou rakoviny nebo spíše nepřímým efektem v souvislosti se změnami ve fenotypu buněk [80], [81], [82].

2.2.5. MiRNA jako onkogen/nádorový supresor

Nedávné studie prokázaly, že některé miRNA snižují expresi čtyř tumor supresorových genů tím, že se přímo váží na 3'UTR oblast transkriptů a brání tak jejich translaci. Jedná se o mipsin, PDCD4 (programmed cell death 4), tropomyosin 1, PTEN (phosphatase and tensin homolog). Potlačením těchto nádorových supresorů miRNA podporuje buněčnou transformaci, růst nádoru, jeho invazivitu a případné metastazování [83], [84], [85], [86].

Let-7 miRNA

Let-7 miRNA je skupina vysoce konzervovaných sekvencí nacházejících se u bezobratlých i obratlovců, včetně člověka. Vyskytuje se celkem dvanáct let-7 miRNA genů, kódujících devět příslušných miRNA. Dva dobře definované cílové geny let-7 jsou známé onkogeny Ras a HMGA2 (high mobility group AT-hook2)

Konstitutivně aktivní Ras (H-Ras, K-Ras a N-Ras) se objevují v souvislosti s různými lidskými nádory, jako jsou nádory pankreatu, tlustého střeva, plic nebo štítné žlázy. Let-7 miRNA regulují expresi Ras prostřednictvím jejich vazby na 3'UTR oblast, touto vazbou dochází k inhibici translace. HMGA2 je transkripční faktor, který mění konformaci DNA a způsobuje aktivaci transkripce. Má vliv na transkripci různých genů zapojených do buněčného růstu, diferenciaci, proliferace a přežívání buněk. HMGA2 není detekovatelný v normální dospělé tkáni, ale vysoce exprimován je v tkáni embryonální. Dále se vyskytuje při rakovině plic nebo děložních nádorech [87], [88], [89].

Let-7 miRNA reguluje HMGA2 destabilizací mRNA prostřednictvím vazby na 3'UTR oblast, stejně jako při inhibici Ras. Ztráta let-7 miRNA funkce způsobuje zvýšený růst a proliferaci buněk [90], [91].

MiR15 a miR16

Rodina miR15 a miR16 je tvořena čtyřmi členy, které mají pravděpodobné tumor supresorové funkce. Všechny čtyři sdílejí devíti nukleotidovou sekvenci, kterou se váží na 3'UTR oblast anti-apoptického proteinu BCL2 a působí tak post-transkripční represí. Onkogenní protein BCL2 bývá nadměrně exprimován u různých nádorů a hematopoetických malignit, podporuje přežívání buněk a umožňuje jim vyhnout se vstupu do apoptózy [92], [93], [94].

MiR21

MiR21 je relativně nový člen miRNA skupiny onkogenů a byl popsán jako anti-apoptotický faktor. Jeho nadměrná exprese byla pozorována u různých lidských nádorů zahrnující tlusté střevo, pankreas, prsní žlázu, játra, mozek nebo prostatu [95].

Tento mladý a vzrušující obor molekulární biologie týkající se miRNA pokračuje stále ve svém rozvoji. Má a pravděpodobně bude mít dalekosáhlé důsledky v medicíně. Současné a doufejme i budoucí výzkumy budou odhalovat potřebné informace pro charakterizaci a pochopení funkčních mechanismů a cílových molekul. Mechanistické detaily biogeneze miRNA a příslušné tlumení genů stále není úplně jasné, avšak i přes omezené poznatky miRNA molekul se ukázalo, že jejich základní expresní profily bývají změněny u některých nádorů. Z toho vyplývá zapojení miRNA do rozvoje rakoviny a jiných onemocnění. MiRNA jsou proto klinicky důležité při diagnostice, klasifikaci, prognóze, léčbě onemocnění nebo sledování jejího průběhu [96], [97], [98], [99].

2.3. BUNĚČNÉ LINIE

Pro experiment jsme použili čtyři buněčné linie pocházející z nádorové tkáně kolorektálního karcinomu, případně jeho metastáz do lymfatických uzlin. Byly použity linie HT-29, Caco-2, SW480 a SW620. Buněčné linie mají obecně charakter nádorových buněk, neomezeně se dělí a jsou adaptovány na podmínky *in vitro*.

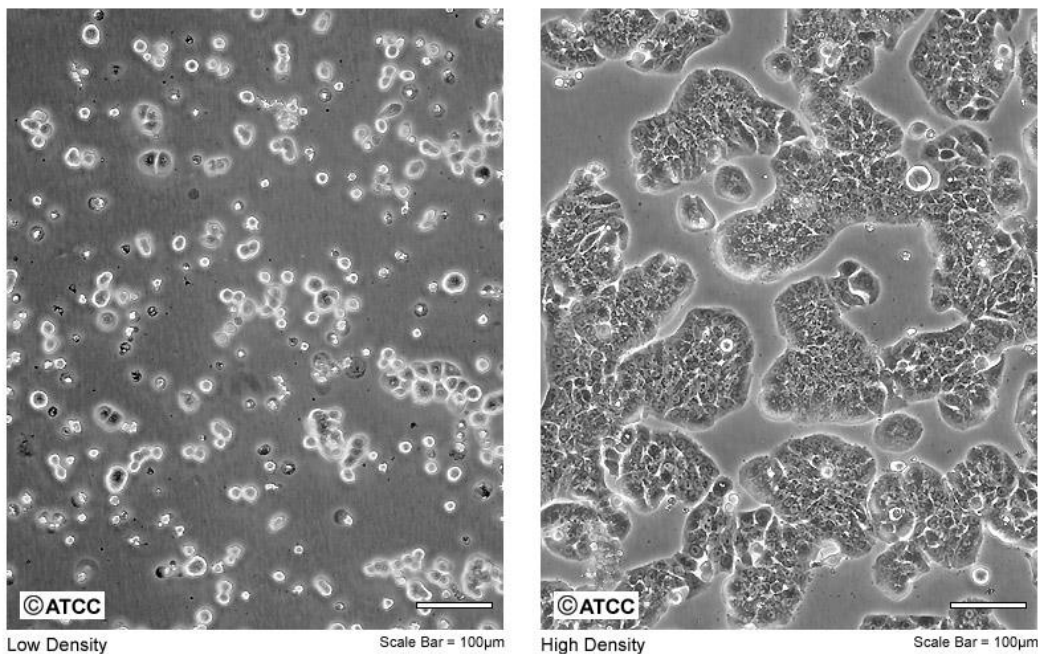
2.3.1. HT-29

Buněčná linie HT-29 byla izolována v roce 1964 z tkáně primárního kolorektálního adenokarcinomu 44leté ženy. Jedná se o adheze schopné epiteliální buňky, které exprimují urokinázové receptory, sekreční komponentu IgA, karcinoembryonální antigen (CEA), transformující protein vázající růstový faktor beta a

mucin. Buňky dále exprimují onkogeny myc, ras, myb, sis a fos, jsou CD4 negativní, ale na svém povrchu vykazují expresi galaktosylceramidu, který může být alternativním receptorem pro HIV.

Dále se vyznačují mutací v kodonu 273 genu pro protein p53, konkrétně dochází k záměně G → A a následné substituci Arg → His. V důsledku této mutace dochází ke zvýšené produkci proteinu p53. Mutovaný p53 ztrácí své nádorově-supresorové vlastnosti a může aktivovat geny, které se podílejí se na nádorovém bujení [100].

ATCC Number: **HTB-38**
Designation: **HT-29**



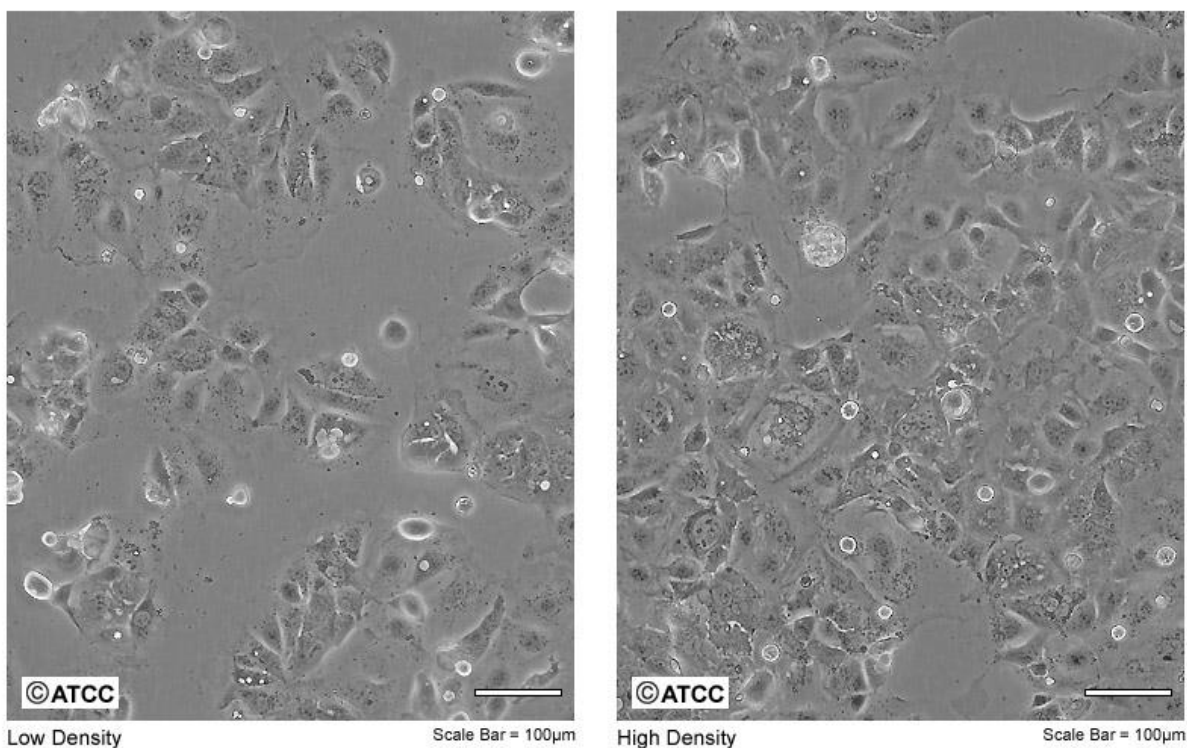
Obr. 4 Buňky linie HT-29 v nízké (vlevo) a vysoké (vpravo) denzitě [100]

2.3.2. Caco2

Další buněčnou linií je Caco2. Buňky byly izolovány z nádorové tkáně kolorektálního adenokarcinomu 72letého muže. Jsou to epiteliální buňky schopné adheze, které po dosažení konfluence (tj. stav, kdy buňky zaplní povrch dna nádoby, vytvoří se hustá, souvislá vrstva, ve které se buňky dostanou do vzájemného kontaktu a

dále se nemnoží) exprimují znaky diferencovaných enterocytů. Caco2 exprimují protein 1 vázající retinol a protein 2 vázající kyselinu retinovou, teplotně stabilní enterotoxin, epidermální růstový faktor a keratin [101].

ATCC Number: **HTB-37**
Designation: **Caco-2**



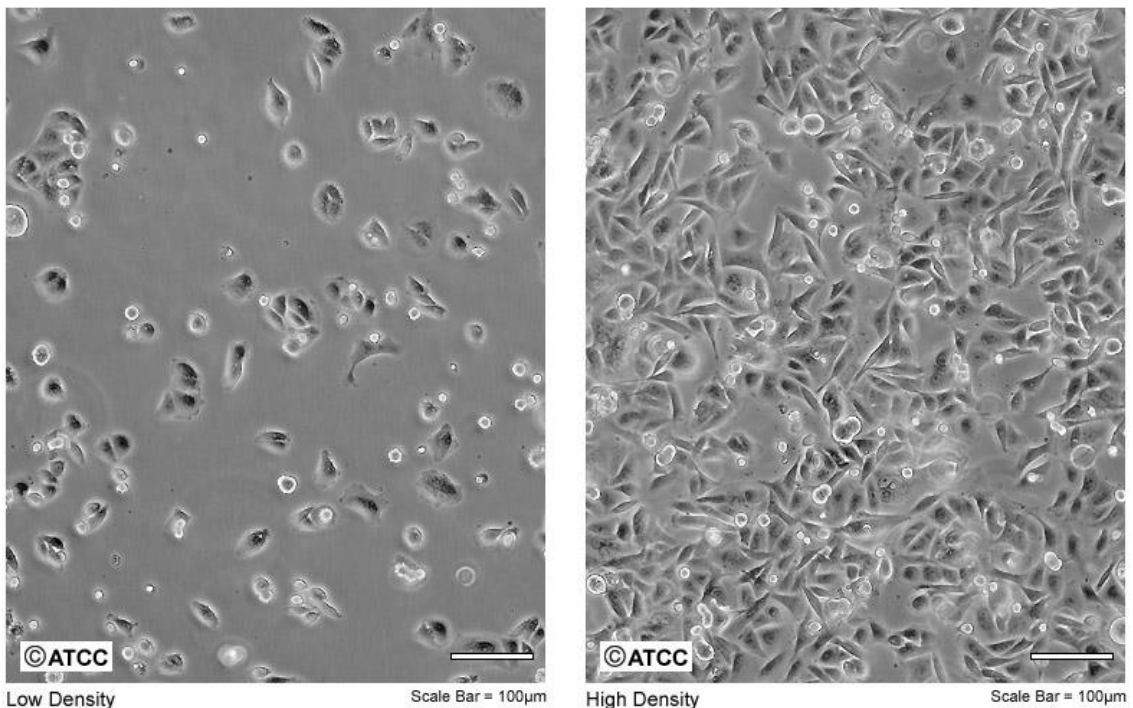
Obr. 5 Buňky linie Caco2 v nízké (vlevo) a vysoké (vpravo) denzitě [101]

2.3.3. SW480

SW480 byla izolována z primárního adenokarcinomu střeva 50letého muže a jedná se též o epiteliální buňky schopné adheze. Vyskytuje se také u stádia kolorektálního karcinomu označovaného jako druhé stádium neboli Dukes' type B. Dukesova klasifikace se používá k popisu rozsahu onemocnění od stadia A (ranná fáze) po stádium D (pokročilá fáze). Dukes' type B stádium se vyznačuje schopností nádoru šířit se svalovou vrstvou a serosou střevní stěny a stěny rekta do blízkých orgánů, přičemž nezasahuje lymfatické uzliny [102].

Tato buněčná linie obsahuje mutaci v kodonu 12 ras protoonkogenu a může být použita jako pozitivní kontrola při PCR u mutace v tomto kodonu. Nacházíme zde dvě mutace v genu p53, v důsledku kterých dochází ke zvýšené hladině proteinu p53. Mutace G→A v kodonu 273 a následná substituce Pro→Ser a mutace C→T v kodonu 309 působící záměnu aminokyselin Pro → Ser. Linie se vyznačuje expresí epidermálního růstového faktoru (EGF), karcinoembryonálního antigenu (CEA), keratinu a transformujícího růstového faktoru beta. Z onkogenů jsou pozitivní myc, myb, ras, fos, sis, p53 [103].

ATCC Number: **CCL-228**
Designation: **SW 480**



Obr. 6 Buňky linie SW480 v nízké (vlevo) a vysoké (vpravo) denzitě [103]

2.3.4. SW620

Buněčná linie SW620 byla izolována o rok později od stejného pacienta jako linie SW480. Buňky byly získány z lymfatických uzlin, kam metastazoval primární kolorektální adenokarcinom, ze kterého pocházely linie SW480. Buňky syntetizují transformující růstový faktor alfa a menší množství CEA. Vykazují stejnou mutaci v kodonu 273 genu p53 jako SW480 a jsou pozitivní v expresi onkogenů myc, ras, Myb, sis a fos. Buněčná linie se skládá hlavně z jednotlivých malých kulovitých a bipolárních buněk, které chybí v mikrokleích [104].

3. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo:

- Vytipování jednotlivých miRNA, které rozpoznávají a váží se na určité sekvence ve 3'UTR oblasti GPx7
- Stanovení koncentrace GPx7 a vybraných miRNA v buněčných liniích kolorektálního karcinomu – HT29, Caco-2, SW480, SW620
- Na základě toho se provede výběr reprezentativní linie, ze které se získá pomocí PCR příslušný fragmentu pro klonování
- Klonování delšího fragmentu, obsahujícího 3'UTR oblast a část CDS genu, do ZeroBlunt plasmidu
- Příprava plasmidu obsahujícího pouze 3'UTR sekvenci ve vektoru pmiR-GLO
- Mutageneze vazebných míst pro miRNA ve 3'UTR oblasti GPx7

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. MATERIÁLOVÉ A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

4.1.1. Použité chemikálie a roztoky

Agaróza – Serva

Ampicilin – Sigma Aldrich

Bromfenolová modř – Sigma Aldrich

ddH₂O – redestilovaná H₂O

Diethylpyrokarbonát (DEPC) – Sigma Aldrich

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) – Sigma Aldrich

Ethanol (absolutní) – Sigma Aldrich

Chloroform – Serva

Isopropanol – Sigma Aldrich

Kanamycin – Sigma Aldrich

Kyselina boritá – Sigma Aldrich

Kyselina octová – Lachema

Ladder – 100bp, 1kb – NEB

LB médium – Duchefa biochemie

Loading Dye Solution (6x) – NEB

NaOH – Penta

PBS (fosfátový pufovaný fyziologický roztok) – Sigma Aldrich

PmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector – Promega Corporation

Směs dNTPs – Eurogentec

SOC médium – Invitrogen

SYBR Safe DNA Gel Stain – Invitrogen

TRIS(hydroxymethyl)aminomethan – Sigma Aldrich

TRIzol (TriReagent) – Molecular Research Centre

4.1.2. Enzymy, komerční kity, buňky

Buněčné linie (HT-29, Caco-2, SW-480, SW-620) – ATCC

DNáza I – NEB

Escherichia coli TOP10 – Invitrogen

Gen Elute PCR Clean-Up Kit – Sigma Aldrich

Phusion HF DNA polymeráza - NEB

QIAGEN Plasmid Midi Kit - QIAGEN

qPCR Core kit for SYBR green I – Eurogentec

Restrikční endonukleázy (*DpnI*, *NdeI*, *XbaI*, *XhoI*) – NEB

RNaseIN – NEB

Taq DNA polymeráza – Jena Bioscience

T4 DNA Ligáza – Jena Bioscience

Zero Blunt PCR Cloning Kit – Invitrogen

Zyppy Plasmid Miniprep Kit – Zymo research

4.1.3. Přístrojové vybavení

Analytické váhy – Scaltec SBC 22

Autokláv – Vaposteri

Centrifuga – Eppendorf 5810R

CO₂ inkubátor – Hera Cell

Horizontální elektroforéza Mini Horizontal HE33 – Hoefer

Horkovzdušný sterilizátor BD 400 – Binder

Inkubátor – Eppendorf Theremomixer Comfort

Inkubátor s třepací jednotkou NB-205 – n-Biotek

Kývačka – BioSan MR-12

Laminární box – BioAir AURA 2000 M.A.C.

Magnetické míchadlo – Biosan

Mikroskop – Nikon Eclipse TS 100

Mikrovlnná trouba – Zanussi

Mini centrifuga – Sprout
Mrazicí box – HeraFreeze
PCR cyklér – MJ mini, Bio-Rad
Real-Time PCR přístroj – QuantStudio 6, Applied Biosystems
Spektrofotometrický analyzátor – NanoDrop 2000 Thermo Scientific
Třepačka – BioSan Vortex V1 plus
Třepačka – IKA MS2 Minishaker
UV transluminátor s kamerou GelDoc XR – Bio-Rad
Vodní lázeň – Memmert
Zdroj pro elektroforézu Power Pac Universal – Bio-Rad

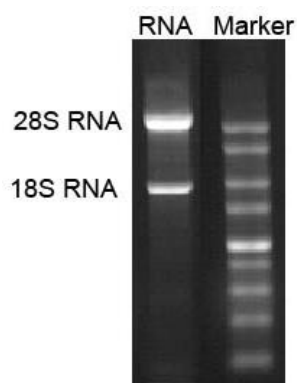
4.1.4. Pomůcky

Pipety, sterilní pipetovací špičky, multikanálová pipeta, skleněná pipeta s širším průměrem, skleněná pipeta s užším průměrem, latexové rukavice, mikro-zkumavky, skalpel, Petriho misky, Erlenmeyerovy baňky, odměrné válce, kádinky, stopky, nůžky, pasteurovy pipety, plastové škrabky, stojan na mikro-zkumavky, mikrotitrační destičky, Bürkerova komůrka, aparatura na elektroforézu, parafilm, led.

4.2. METODIKA

4.2.1. IZOLACE RNA

RNA je citlivá na působení ribonukleáz, které se vyskytují všude v okolí. Proto je při izolaci RNA velmi důležité dodržování čistoty, používání rukavic, špiček s filtrem a práce v digestoři. Působením RNáz dochází k nežádoucí degradaci RNA. Správnost izolace se kontroluje elektroforetickou separací, kdy po proběhlé elektroforéze vidíme na gelu dva jasné proužky. Pokud došlo k degradaci RNA, nejčastěji právě působením RNáz, na gelu se objeví nejasné nebo rozmazané proužky, popřípadě tzv. ohon, který je tvořen molekulami RNA o různé velikosti.



Obr. 7 Elektroforetická separace vzorku celkové RNA

Příprava:

Sklo, které budeme při izolaci používat (petriho misky, erlenmeyerova baňka, malý válec), je nutné vypéct na 150°C/4 hod. Dále si připravíme DEPC vodu – jedná se o redestilovanou vodu (ddH₂O) ošetřenou diethylpyrokarbonátem (DEPC). Do redestilované vody přidáme 0,1% (v/v) DEPC (uchovává se v ledničce), důkladně protřepeme a necháme stát na stole přes noc. Následně sterilizujeme v autoklávu 120°C/20 minut (tj. do 1L ddH₂O přidat 1ml DEPC).

V našem případě jsme k izolaci celkové RNA použili TRIzol, což je směs fenolu a guanidin isothiokyanátu, který se používá k selektivní izolaci celkové RNA z malého množství tkání či buněk. Přídavkem chloroformu a následným stočením se směs rozdělí na vodnou a organickou fázi, přičemž RNA se bude nacházet v horní vodné fázi a směs proteinů na rozhraní vodné a organické fáze. Isopropanol následně umožní selektivní vysrážení RNA a izolaci čisté RNA. Podle množství tkáně lze zmenšit nebo zvětšit množství použitého TRIzolu. Úměrně tomu je třeba změnit i množství ostatních reagensů.

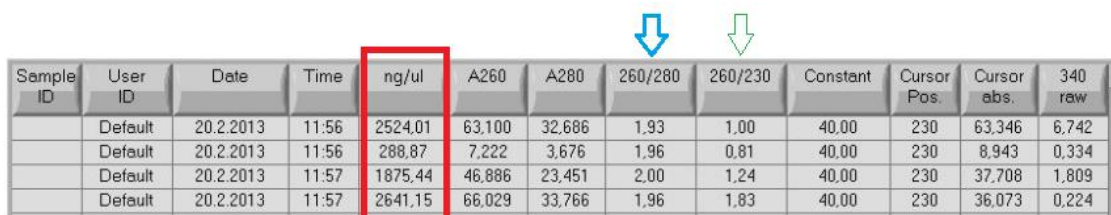
Postup:

1. Buňky pro izolaci RNA sklízíme z misek, ze kterých nejprve odsajeme médium, poté přidáme 2 ml ledového PBS a kýváním buňky opláchneme. Následně PBS odsajeme pomocí pipety.
2. Přidáme 500 μ l TRIzolu, necháme působit asi 2 minuty a poté buňky seškrabeme pomocí plastové škrabky a přeneseme do 1,5ml zkumavek.
3. Na objem 500 μ l TRIzolu přidáme 100 μ l chloroformu, 15 sekund v ruce protřepeme a necháme inkubovat 2-3 minuty při laboratorní teplotě.
4. Dále vzorky stočíme ve vychlazené centrifuze: 15 minut, 12.000g, 4°C. Po tomto kroku dojde k rozdělení vodné a organické fáze.
5. Přepipetujeme přibližně 250 μ l horní vodné fáze, ve které se nachází RNA, do čisté 1,5ml zkumavky. Pipetujeme velmi opatrně, aby se špička pipety nedotkla mezifáze nebo organické fáze a nedošlo ke kontaminaci genomovou DNA a proteiny.
6. K přepipetované vodní fázi přidáme 250 μ l isopropanolu a důkladně promícháme. Poté necháme vzorky inkubovat při laboratorní teplotě 10 minut a následně centrifugujeme: 10 minut, 12.000g, 4°C. (Zkumavky nastavíme v centrifuze všechny stejně, otvíráním ke středu, aby bylo jasné, kde můžeme předpokládat peletu RNA).
7. Skleněnou pipetou odstraníme supernatant, možno také opatrně odlít, přičemž dáváme velký pozor, abychom neodsáli i samotnou peletu. Peletu potom omyjeme 0,5ml 75% ethanolem (čerstvě ředěný DEPC vodou z absolutního ethanolu), zamícháme na vortexu a stočíme 5 minut, 7.500g, 4°C.
8. Skleněnou pipetou opět odstraníme větší množství supernatantu, na odběr zbytkového množství použijeme pipetu s menším průměrem. Peletu necháme usušit na vzduchu cca 10 minut (peletu je třeba hlídat, kdyby začala dříve zprůhledňovat, je třeba ji rozpustit dříve).
9. Následně peletu rozpustíme v 50 μ l DEPC, důkladně promícháme na vortexu a změříme koncentraci a čistotu RNA na Nanodropu.

4.2.2. MĚŘENÍ KONCENTRACE RNA

Koncentrace izolované RNA se měří Nanodropem – spektrofotometrem pro měření absorpance ve velmi malých objemech. Připravíme si příslušný počet 1,5ml zkumavek a do každé napipetujeme 27 μ l DEPC vody a 3 μ l RNA a vzniklý 10x ředěný roztok důkladně promícháme. Přístroj nejprve vynulujeme oproti slepému vzorku, tzv. blanku, kterým bývá voda použitá k ředění vzorku. Poté měříme koncentraci vzorku při 260nm a 280, případně i 230nm.

Příklad výstupu z Nanodropu:



Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
	Default	20.2.2013	11:56	2524,01	63,100	32,686	1,93	1,00	40,00	230	63,346	6,742
	Default	20.2.2013	11:56	288,87	7,222	3,676	1,96	0,81	40,00	230	8,943	0,334
	Default	20.2.2013	11:57	1875,44	46,886	23,451	2,00	1,24	40,00	230	37,708	1,809
	Default	20.2.2013	11:57	2641,15	66,029	33,766	1,96	1,83	40,00	230	36,073	0,224

Obr. 8 Příklad výstupu z Nanodropu

V červeném boxu je znázorněna koncentrace RNA v ng/ μ l, jedná se o 10x ředěný vzorek. Ve sloupci označeném modrou šipkou je čistota I, která udává případnou kontaminaci vzorku proteiny. Poměr absorbancí A260(DNA)/A280(proteiny) by měl být $>1,8$. Sloupec označený zelenou šipkou znázorňuje čistotu II a zobrazuje kontaminaci vzorku fenolem. Hodnota v tomto sloupci by se měla blížit dvěma.

Pro lepší manipulaci s RNA naředíme RNA na výslednou koncentraci 1 μ g/ μ l (předejde zdlouhavé manipulaci s jednotlivými RNA. Zatímco pipetujeme různé objemy vody, RNA zůstává na ledu a poté přidáme 30 μ l RNA). Podle změřených koncentrací dopočítáme množství potřebné vody pro vznik této koncentrace při použití 30 μ l RNA.

$$\underline{V(\text{vody}) = (c(\text{RNA}) * 10 * 30) - 30}$$

$c(\text{RNA})$ v $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -změřené/1000

*10(korekce ředění)

*30 μl /1000(převod) - 30 μl (použité RNA)

Pokud budeme s neředěným vzorkem tentýž den ještě pracovat, uchováváme ho na ledu. Pokud ne, zmrazíme vzorek na -70°C pro pozdější použití.

4.2.3. AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA

Kvalita a integrita RNA se kontroluje pomocí agarózové elektroforézy v 1,5% gelu. Agaróza se vyrábí z agaru, který byl izolován z mořské řasy, a jedná se o lineární sacharidový polymer D-galaktosidázy a 3,6-anhydro-L-galaktopyranozy.

Elektroforéza je založena na rozdílné pohyblivosti fragmentů nukleových kyselin v gelu v elektrickém poli. Díky záporně nabitým fosfátům nese nukleová kyselina záporný náboj a v přítomnosti elektrického pole se proto pohybuje od záporného pólu ke kladnému. Fragmenty nukleových kyselin se separují podle své délky a konformace, přičemž platí, že kratší fragmenty migrují v gelu rychleji než fragmenty delší.

Důležitým separačním faktorem při elektroforéze je koncentrace gelu (koncentrace agarózy), která ovlivňuje rychlost a rozlišení. Čím koncentrovanější gel je, tím probíhá separace pomaleji a má proto lepší rozlišovací schopnost pro kratší fragmenty. Pro lepší separaci dlouhých fragmentů je vhodný méně koncentrovaný gel.

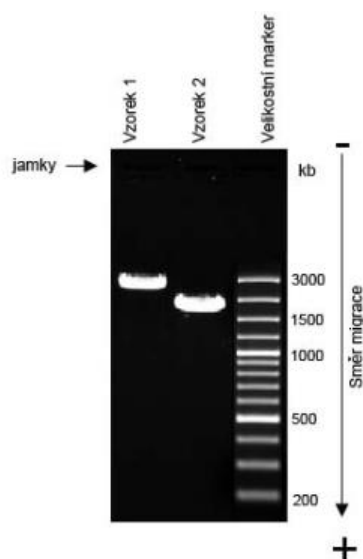
Účinnost závisí také na velikosti elektrického napětí. Platí, že čím vyšší napětí vkládáme mezi elektrody, tím se zvyšuje rychlost dělení. Při příliš vysokém napětí však dochází ke zhoršení separace dlouhých fragmentů, klesá kvalita rozlišení a jelikož dochází k produkci tepla, může dojít k deformaci gelu. Naopak při nízkém napětí mohou nukleové kyseliny difundovat do gelu a výsledkem jsou rozmazané, neostře proužky. Optimálně se udává velikost napětí mezi elektrodami 5-8 V/cm.

Dalším důležitým faktorem je přítomnost solí. Bez přítomnosti solí se nukleové kyseliny v gelu prakticky nepohybují. Při vysoké koncentraci solí však dochází také k uvolňování tepla a deformaci gelu. Pro agarózovou elektroforézu se používá buď TAE (Tris-Acetate-EDTA), nebo TBE (Tris-Borate-EDTA) pufr.

Ke snadnější aplikaci vzorku do jamek v gelu a ke kontrole průběhu elektroforézy se používají nanášecí pufrы, které se přidávají k jednotlivým vzorkům. Nanášecí pufr obsahuje barvivo, například bromfenolovou modř, které vzorek obarví, a glycerol, díky kterému vzorek snadněji klesne na dno jamky.

Co se týče vizualizace molekul po elektroforetické separaci, můžeme použít například fluorescenční barviva, jako jsou etidium bromid či SYBR Green. Barvivo se přidává do gelu buď již při jeho přípravě, nebo je obsažen v nanášecím pufru, případně se po proběhlé elektroforéze gel vloží na 10 minut do lázně s barvivem. Vizualizace se provádí fluorescenční lampou. V případě použití těchto barviv však musíme brát v potaz, že se jedná o potenciální mutageny a dodržovat bezpečnost práce.

Pro odhad velikosti jednotlivých fragmentů po separaci se do jedné jamky v gelu aplikuje velikostní marker, tzv. ladder. Ladder bývá připraven z nukleové kyseliny štěpené několika restrikčními enzymy. Např.: 100bp ladder se použije, jestliže předpokládáme fragmenty o velikosti 100-1000bp, 1kb ladder pro fragmenty o očekávané velikosti 1-10kb.



Obr. 9 Příklad elektroforetického gelu – velikostní marker (ladder) a směr migrace fragmentů

Pufry:

TBE 10x (zásobní roztok)

- Tris Base 890 mM
- Boric Acid 890 mM
- EDTA (pH 8.0) 20 mM
- 108g Tris Base, 55g kyseliny borité rozpustíme v cca 800ml DEPC H₂O a přidáme 40ml 0,5M EDTA pH8, DEPC vodu doplníme na 1l.

0,5M EDTA pH 8,0

- Do cca 80ml ddH₂O (nebo ideálně do DEPC) přidáme 18,61g EDTA (ethylendiamintetraacetát) a cca 2g NaOH pelet. Směs zamícháme, změříme pH a postupně přidáváme NaOH. Až se pH začne blížit 8, EDTA se rozpustí. Zbytek doplníme vodou na 100ml.

TBE 1x

- Pufř připravíme ze zásobního roztoku ředěním 1:9 tím, že smícháme 450ml DEPC H₂O a 50 ml zásobního TBE 10x.

6x nanášecí pufř

- 1 ml směsi xylene cyanol + bromphenol blue (10x) + 2 ml glycerol + 7 ml H₂O (aliquoty se uchovávají při -20°C).

Postup:

Pro přípravu 1,0% gelu navážíme 0,4g agarózy do 250ml Erlenmeyerovy baňky, přidáme 40ml 1x TBE pufř, rozmícháme a zahříváme 1-1,5 min v mikrovlnné troubě. Poté necháme chvíli zchladnout (dáváme pozor, aby gel nezačal tuhnout) a přidáme 4μl SYBR Safe barviva (interkalační činidlo pro vizualizaci RNA). Takto připravenou směs vlijeme do předem omyté aparatury a vložíme hřeben, který ve ztuhlém gelu vytvoří jamky.

Poté, co gel úplně zatuhne, vyjmeme hřeben, gel otočíme a zalijeme ho celý po rysku 1x TBE pufřem. Na parafilm si připravíme kapky nanášecího pufř, cca 1μl na

5 μ l nanášeného vzorku. Každý vzorek smícháme s jednou kapkou nanášecího pufru a celý objem přeneseme do jamky gelu. Aparaturu spustíme na cca 30 minut na 100V a v průběhu sledujeme první modrý pás. Elektroforézu ukončíme, když doputuje modrý pás přibližně do poloviny gelu. Nakonec gel vyfotíme.

Pokud provádíme agarózovou elektroforézu pro vzorek DNA, metoda se mění v použití pufru, kdy místo TBE použijeme TAE pufr. Příprava zásobního roztoku TAE se oproti TBE pufru liší jen v použití Acetic Acid (890mM) namísto Boric Acid stejné koncentrace.

4.2.4. DNASE TREATMENT

Jelikož budeme později převádět RNA na cDNA pomocí reverzní transkripce, je důležité, aby náš vzorek neobsahoval genomovou DNA. „DNase treatment“ se provádí k odstranění případné kontaminace vzorku RNA genomovou DNA. K ošetření vzorku se použije DNáza I, která selektivně degraduje pouze DNA, RNA zůstává nezměněna.

Příprava roztoků:

0,1M EDTA pH 8,0

- Roztok dostaneme zředěním zásobního 0,5M roztoku 1:4 - 100 μ l zásobního roztoku + 400 μ l ddH₂O.

Zásobní 0,5M EDTA pH 8,0

- Připravíme stejně jako při agarózové elektroforéze (viz výše)

DEPC H₂O

- Připravíme stejně jako při izolaci RNA (viz výše).

Postup:

Reakční směs 30 μ l:

10x DNase buffer (dodáván spolu s enzymem)	3 μ l
DNáza I	1 μ l
RNA (přepočítat podle změřené koncentrace)	10 μ g
DEPC H ₂ O	dopočítat do 30 μ l

Připravíme si mastermix pro požadovaný počet vzorků +1. Mastermix obsahující vodu, pufr a DNázu dobře promícháme, mírně stočíme a rozpipetujeme do připravených 0,5ml zkumavek. Do každé z nich potom přidáme 10 μ l RNA. Směs promícháme a necháme inkubovat 25 minut při 37°C v inkubátoru. Následně přidáme 1,5 μ l 0,1M EDTA a inkubujeme 10 minut při 75°C – dochází k inaktivaci DNázy. Na závěr přidáme 18,5 μ l DEPC H₂O. Výsledná koncentrace takto ošetřené RNA je 0,2 μ g/ μ l a je připravena na reverzní transkripci. Pro pozdější použití uchováváme zmraženou na -70°C.

4.2.5. REVERZNÍ TRANSKRIPCE

Reverzní transkripce je metoda, pomocí které je RNA převedena reverzní transkriptázou, neboli RNA-dependentní DNA polymerázou, na jedno řetězcovou cDNA (complementary DNA). V závislosti na tom, zda je jako templát pro reakci použita mRNA nebo miRNA, se liší použití primerů. Je-li templátem mRNA, použijeme jako primery náhodné hexamery nebo univerzální primer UniR, v případě miRNA jsou do reakce přidány specifické RT primery. Činností reverzní transkriptázy vzniká nejprve hybridní dvouvláknová molekula RNA-DNA. Použitím RNázy H se templátová RNA odstraní a získáme tak jedno řetězcovou molekulu cDNA.

Reverzní transkripce mRNA

Reagencie:

- reverzní transkriptáza (RT) – ProtoScript II (NEB), Superscript II (Invitrogen)
- reakční pufr (je dodáván spolu s RT)
- DTT (10x dodáván spolu s RT)
- směs dNTP (každý deoxyribonukleotid fosfát koncentrace 5mM)
- RNaseIN (inhibitor RNáz – používá se při menším množství RNA)
- oligo(dT)₁₈ o koncentraci 100μM; nebo náhodné hexamery
- DEPC H₂O nebo nuclease free H₂O

Nejprve si připravíme dvě paralelní sady RNA vzorků - jednu na reverzní transkripci a druhou na noRT kontrolu bez přidávané RT. Do všech mikrozkušavek napipetujeme vždy 5μl RNA ředěné na 0,2μg/μl a 1μl oligo(dT)₁₈. Pro každý vzorek tak připravíme i jeho negativní kontrolu, se kterou provádíme stejný postup jako s testovanými vzorky. Všechny takto připravené směsi zahřejeme v PCR cykléru na 5 minut na 65°C, kdy dochází k odstranění sekundárních struktur. Potom dáme zkumavky alespoň na 1 minutu na led a mírně stočíme.

Dále si připravíme mastermix pro reverzní transkripci, který napipetujeme do jedné sady, a mastermix pro noRT kontrolu do druhé sady zkumavek. Mastermixy připravíme podle následující tabulky a násobíme počtem vzorků +1.

RT +	noRT
4μl pufr 5x	4μl pufr 5x
2μl DTT	2μl DTT
4μl dNTPs	4μl dNTPs
0,5μl RT	-
3,5μl H ₂ O	4 μl H ₂ O

Tuto reakční směs o celkovém objemu 20 μ l zahříváme v PCR cykléru 50 minut na 42°C, kdy probíhá syntéza příslušné cDNA (při použití náhodných hexamerů vzorky nejdříve zahřejeme 10 minut na 25°C), a dále 20 minut na 65°C, kdy proběhne denaturace RT (závisí na použité RT). Po reakci do směsi přidáme 80 μ l ddH₂O (stačí jen redestilovaná, DEPC H₂O už zde není potřeba). Tím zředíme vzniklou cDNA 5x a dále budeme do následných PCR přidávat vždy 5 μ l takto ředěné cDNA. Sníží se tím chyba pipetování většího množství templátu. 5 μ l odpovídá 50ng RNA. Takto připravenou cDNA uchováváme při -20°C.

Reverzní transkripce miRNA

Za použití jednoho specifického RT primeru je každá miRNA reverzní transkriptázou převedena na jedno řetězcovou cDNA (complementary DNA). Reverzní transkripce miRNA se z důvodu šetření materiálem provádí v podobě „multiplex“. To znamená, že použijeme více primerů, které aplikujeme najednou v jedné reakci, a vzniklá cDNA bude tudíž směsí několika sekvencí. Protokol je závislý na použité transkriptáze.

Postup:

1. Připravíme si “multiplex” směs pěti RT primerů. Množství se dopočítá podle počtu vzorků, na každou reakci jsou potřeba 2 μ l.
 - Např.: smícháme 2 μ l pěti primerů o koncentraci 5 μ M, získáme tak 10 μ l směsi, kde každý RT primer bude obsažen v koncentraci 1 μ M
2. Připravíme směs:
 - 2,5 μ l RNA + H₂O (odpovídající 250ng – nutné dopočítat ze změřené koncentrace)
 - 2 μ l multiplex

V PCR cykléru tuto směs zahřejeme 5 minut na 65°C, potom dáme zkumavky na chvíli na led a mírně stočíme.

3. Připravíme si mastermix, který obsahuje příslušné komponenty násobené počtem vzorků +1, a ke směsi ho přidáme v objemu 5,5 μ l.

Mastermix pro RT:

Pufr 5x	2 μ l
DTT	1 μ l
dNTPs	2 μ l
RT	0,3 μ l
RNaseIN	0,2 μ l

Následně směs 10 μ l zahříváme v PCR cykléru:

- 30 minut na 16°C – nasedání primerů
- 30 minut na 42°C – syntéza cDNA
- 5 minut na 95°C – denaturace RT

Po reakci do směsi přidáme 90 μ l ddH₂O a zředíme tím připravenou cDNA 10x. Do následných PCR budeme přidávat 5 μ l ředěné cDNA, čímž se opět sníží chyba pipetováním většího množství templátu. cDNA lze uchovávat při -20°C. 5 μ l odpovídá 12,5ng RNA

4.2.6. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

PCR je metoda, používaná k amplifikaci (zmnožení) požadovaného úseku DNA. Reakce probíhá v termocykléru, který umožňuje zvýšit nebo snížit teplotu během pár sekund o několik desítek stupňů. Vybraný úsek je ohraničený dvojicí primerů (f- forward a r- reverse), které nasedají díky své komplementaritě na určitou část řetězce a vytyčují tak úsek, který má být zmnožen. Reakce je katalyzována termostabilní DNA polymerázou, izolovanou například z bakterie *Thermus aquaticus*, odtud se označuje jako *Taq* polymeráza. Její výhodou je stabilita i při vysokých teplotách a proto při PCR není nutné po každém teplotním cyklu přidávat novou polymerázu.

Princip metody spočívá v mnohonásobném opakování teplotního cyklu, který se skládá ze tří kroků – denaturace, annealing a vlastní amplifikace. První krok reakce probíhá po dobu 20-30 sekund při teplotě 95-98°C, kdy dojde k porušení vodíkových můstků a následnému rozvolnění neboli denaturaci obou řetězců DNA. Při druhém kroku – annealingu – dochází snížením teploty na 40-60°C k nasednutí primerů na specifická místa jednovláknové DNA. Teplota annealingu se odvíjí od teploty tání primerů. Nastavíme-li příliš vysokou teplotu, může nastat, že primery nebudou vůbec nasedat na vlákno. Pokud bude teplota příliš nízká, může docházet k nespecifickému nasednutí primerů. Třetím krokem je vlastní amplifikace, kdy dochází k syntéze DNA ve směru 5'→3'. Teplota amplifikace závisí na použité polymeráze, *Taq* polymeráza má teplotní optimum kolem 72°C. Podle délky amplifikovaného úseku DNA se může měnit délka jednotlivých kroků. Pro běžnou amplifikaci obvykle stačí 30 cyklů.

Reagencie:

- DNA polymeráza (př. Phusion – NEB)
- reakční pufr HF (dodáván spolu s enzymem)
- směs dNTP (každý o koncentraci 5mM)
- forward primer 5μM
- reverse primer 5 μM
- ddH₂O
- templát DNA (nebo cDNA – po reverzní transkripci ředěná 2x)

Postup:

Nejprve si připravíme mastermix pro odpovídající počet vzorků +1. 19 μl mastermixu, který obsahuje vše kromě templátu, napipetujeme do 0,2ml mikrokumavek a následně přidáme 1 μl templátu.

Mastermix 20μl:

ddH ₂ O	10 μl
HF pufr	4 μl
dNTPs	0,8 μl

Forward primer	2 μ l
Reverse primer	2 μ l
<i>Phu</i> DNA polymeráza	0,2 μ l
Templát (cDNA ředěná 2x)	1 μ l

Tuto směs vložíme do PCR cykléru a spustíme přednastavený program:

98°C	98°C	60°C	72°C	72°C	4°C
30''	10''	15''	60''	5'	∞
		30 cyklů			

Colony PCR

Ke kontrole kolonií využíváme modifikaci klasické PCR - Colony PCR. Nejprve si do mikro-zkumavek napipetujeme 10 μ l vody, do které přeneseme sterilní špičkou část kolonie a necháme inkubovat 10 minut při 95°C. Během této doby dojde k lýze buněk a uvolnění plasmidů, které tak mohou sloužit jako templát pro PCR. Používáme primery cíleně navržené na průkaz insertu v plasmidu.

Dále si připravíme mastermix o stejném složení jako je uvedeno výše, ale v objemu pouze 10 μ l a přidáváme 10 μ l vody obsahující uvolněné plasmidy. Směs vložíme do PCR cykléru a spustíme PCR podle přednastaveného programu. Amplifikace probíhá ve 20-30 cyklech. Nakonec necháme směs inkubovat ještě 10 minut při 72°C a poté skladujeme při 4°C.

PCR pro Pfu mutagenezi

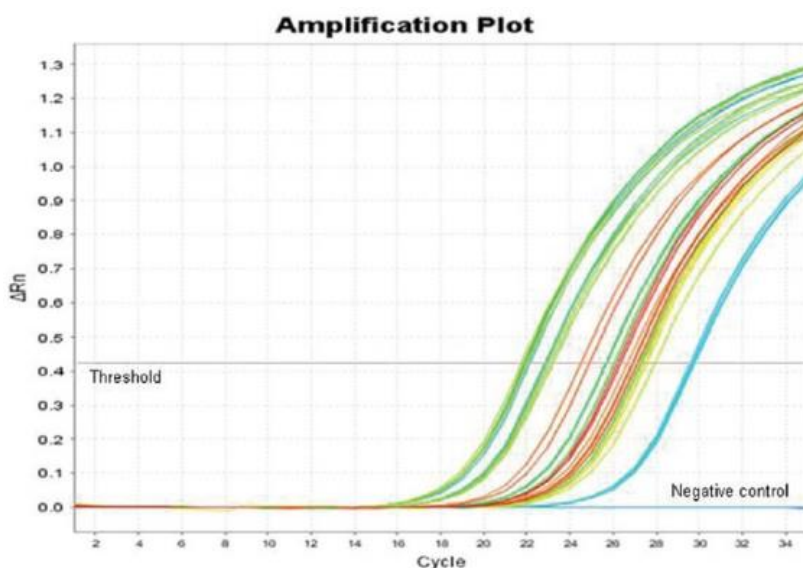
Při Pfu mutagenezi se při amplifikaci oproti klasické PCR používá několik změn. Oproti klasické PCR snížíme počet cyklů z původních 30 na 18 a při třetí části cyklu, samotné amplifikaci, prodloužíme reakční čas z 20 sekund na 4-5 minut.

Real time PCR

Další modifikace PCR, kterou jsme použili, je real time PCR. Real time PCR (nebo také qPCR; kvantitativní PCR) slouží ke kvantitativnímu stanovení výchozího počtu molekul ve vzorku. U běžné PCR se uplatňuje tzv. end-point detekce, kdy je analyzován až výsledný produkt. Jedná se o semikvantitativní hodnocení a metoda nás informuje spíše o délce produktu. Oproti tomu real-time PCR umožňuje přesnou kvantifikaci, zaznamenává totiž každý cyklus reakce v reálném čase pomocí narůstající fluorescence. Používají se specifické fluorescenční sondy, které se váží na amplifikovanou DNA. Tyto sondy musí mít teplotu tání o 10°C vyšší, než je teplota tání použitých primerů. Oproti klasické PCR je zde potřeba ještě excitační zdroj a fotonásobič pro záznam emise záření.

Kvantitativní informace nalezneme v exponenciální části amplifikační křivky. Platí, že čím nižší je hodnota Ct, tím více molekul DNA bylo ve vzorku na začátku reakce. Dojde totiž k dřívějšímu nárůstu fluorescence a amplifikační křivka dříve překročí určitý fluorescenční práh, tzv. treshold.

V našem případě používáme relativní kvantifikaci, kdy porovnáváme množství transkriptu mezi několika vzorky. K normalizaci dat jsme použili beta-2-mikroglobulin (B2M) pro vyhodnocení množství mRNA a miR16 pro vyhodnocení množství stanovovaných mikroRNA.



Obr. 10 Příklad záznamu amplifikace z real-time PCR

4.2.7. IZOLACE A PŘEČIŠTĚNÍ DNA

Produkty PCR kontrolujeme agarózovou elektroforézou (viz výše). Jestliže potřebujeme použít rozdělené produkty z agarózové elektroforézy, je namísto izolace DNA vyříznutím příslušného proužku skalpelem z gelu, rozpuštění gelu a izolace na kolonkách. K tomu jsme použili GenElute PCR Clean-Up kit od Sigma-Aldrich. Tato souprava slouží jak k izolaci DNA z gelu, tak i k přečištění vzorku po PCR.

Postup izolace:

Separční kolonku vložíme do zkumavky, na membránu pipetujeme 0,5ml „Column Preparation Solution“ a centrifugujeme 30 sekund při 12 000g. Tím se kolonka připraví, řetězce obsažené v membráně se napřímí a maximalizuje se tak vazba DNA k membráně. Zvýšíme tak výtěžnost izolace.

Dále vytvoříme směs smícháním „Binding Solution“ a vzorku v poměru 5:1, nanese ji na kolonku, centrifugujeme 1 minutu při 12 000g a eluát vylijeme (např. 500ml Binding Solution + 100ml vzorku).

V dalším kroku nanese na kolonku 0,5ml dilučního promývacího roztoku, centrifugujeme 1 minutu při 12 000g, eluát opět vylijeme a centrifugujeme další 2 minuty, abychom se zbavili všech zbytků promývacího roztoku. V tomto kroku se z kolonky vymyjí všechny nežádoucí složky.

Následuje vlastní eluce DNA z kolonky. Kolonku přeneseme do čisté 2ml mikro-zkumavky, na střed membrány napipetujeme 50 μ l elučního roztoku nebo vody a inkubujeme při laboratorní teplotě 1 minutu. Poté centrifugujeme 1 minutu při 12 000g.

Výsledná přečištěná DNA se nachází v eluátu a je připravena k okamžitému použití, popřípadě ji skladujeme při -20°C . Její koncentrace se změří spektrofotometricky při 260 nm a čistota se určí z poměru absorbance při 260/280 nm.

4.2.8. IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA

Mini purifikace

Pro izolaci plasmidové DNA mini purifikací jsme použili Zyppy Plasmid Miniprep kit a řídili se příslušným návodem.

Nejprve si připravíme suspenzi buněk, kdy zaočkujeme vybranou kolonii kompetentních buněk *E. Coli* do připravené mikro-zkumavky s 5 ml LB média s ampicilinem o koncentraci 50 μ g/ml. Směs inkubujeme přes noc na třepačce při 37°C, 200 rpm. Druhý den kulturu centrifugujeme při 13 000g, 1 minutu při 4°C, odstraníme supernatant a peletu resuspendujeme ve 200 μ l chladného P1 roztoku.

Dále přidáme 100 μ l modrého lyzačního roztoku „7x Lysis Buffer“, promícháme a necháme 3 minuty inkubovat. Poté přidáme 350 μ l chlazeného neutralizačního roztoku a kývavými pohyby promícháme. Ke kompletní neutralizaci dojde, když se obsah zkumavky zbarví žlutě.

Následně centrifugujeme 2-4 minuty při 13 000g. Sloupec, ve kterém jsou usazeny Zymo-Spin IIN kolonky, umístíme do připravené jímací mikro-zkumavky. Po centrifugaci přeneseme supernatant na kolonky, centrifugujeme po dobu 15 sekund a obsah spodní zkumavky vyprázdníme.

Přidáme 200 μ l promývacího „Endo“ roztoku, centrifugujeme 30 sekund, poté přidáme 400 μ l promývacího „Zyppy“ roztoku a centrifugujeme ještě 1 minutu.

Nyní umístíme sloupec s kolonkou do čisté 1,5ml mikro-zkumavky, pipetujeme 30 μ l elučního roztoku do středu membrány a necháme 1 minutu stát při laboratorní teplotě. Po centrifugaci 30 sekund při 13 000g je plasmidová DNA obsažena v eluátu. Koncentraci a čistotu DNA měříme spektrofotometricky.

Midi purifikace

Tato metoda slouží k přípravě většího množství plasmidové DNA o větší koncentraci a čistotě. Pro izolaci byl použit QIAGEN Plasmid Midi Kit.

Vybranou kolonii kompetentních buněk *E.Coli* přeneseme špičkou pipety do 50ml LB média obsahující ampicilin o koncentraci 50 μ g/ml a inkubujeme přes noc na třepačce při 37°C, 200 rpm.

Kulturu centrifugujeme 15 minut při 6 000g, odstraníme supernatant a peletu resuspendujeme ve 4ml P1 roztoku obsahujícím 50mM Tris-Cl, 10mM EDTA a 100 μ g/ml RNázu. Dále přidáme 4 ml lyzačního roztoku, suspenzi promícháme kývavými pohyby a inkubujeme při laboratorní teplotě 5 minut. Poté přidáme 4 ml chlazeného neutralizačního roztoku, okamžitě promícháme převrácením zkumavky 4-6krát a inkubujeme 15 minut na ledu.

Následně suspenzi centrifugujeme při 20 000g, 30 minut při 4°C a okamžitě oddělíme supernatant, který obsahuje plasmidovou DNA, znovu centrifugujeme 15 minut a též oddělíme supernatant.

Na řadu přichází příprava izolační kolonky, na kterou nanese 4 ml ekvilibračního roztoku a necháme projít roztok kolonkou bez centrifugace. Dále na kolonku nanese supernatant získaný z přechozích kroků a opět necháme projít bez centrifugování. Poté na kolonku nanese 2x 30ml promývacího roztoku a v dalším kroku provedeme eluci DNA použitím 5ml elučního roztoku.

Přidáním 3,5ml isopropanolu k eluátu, který obsahuje DNA, dojde k precipitaci DNA. Suspenzi promícháme a ihned centrifugujeme při 15 000g, 4 °C, 30 minut. Opatrně odstraníme supernatant. Peletu DNA promyjeme 70% ethanolem a centrifugujeme při 15 000g 10 minut. Opět odstraníme supernatant bez narušení pelety.

Peletu necháme usušit 5-10 minut na vzduchu a následně rozpustíme ve 200 μ l H₂O. Koncentraci a čistotu změříme spektrofotometricky.

4.2.9. KLONOVÁNÍ

Klonování do Zero Blunt plasmidu

Zero Blunt PCR Cloning Kit je určen pro klonování fragmentů s tupými konci. pCR-Blunt vektor obsahuje *ccdB* gen fúzovaný s C-koncem genu *LacZα*. Ligací fragmentu do plasmidu dojde k narušení genové exprese *LacZα-ccdB* genu a po transformaci do buněk *E.Coli* a přenesení na Petriho misky dojde k selekci buněk, které obsahují plasmid s insertem. Na Petriho miskách proto budou růst pouze buňky, které tento plasmid s insertem obsahují, ostatní buňky zahynou.

Na pCR-Blunt plasmidu rozlišujeme několik částí:

P_{lac} – umožňuje expresi fúzovaného genu *lacZα-ccdB*

lacZα-ccdB gen – zajišťuje pozitivní selekci vektorů s insertem a obsahuje místa M13 forward a reverse, kam nasedají primery M13r/f, a jsou důležitá pro sekvenování insertu

Kanamycin rezistentní gen, Zeocin rezistentní gen – umožňuje selekci a udržení plasmidu v buňkách *E.Coli*

pUC ori – umožní mnohonásobnou replikaci a udržení plasmidu v buňkách *E.Coli*

T7 promotor – důležitý pro *in vivo* a *in vitro* transkripci a translaci

T7, M13 forward a M13 reverse vazebná místa – umožňují sekvenování insertu

Map and Features of pCR[®]-Blunt

pCR[™]-Blunt map

The following map summarizes the features of the pCR[®]-Blunt vector. Restriction sites that are only found in the polylinker are shown. The complete sequence of the vector is available from www.lifetechnologies.com/support or by contacting Technical Support (page 27).



Comments for pCR[™]-Blunt 3512 nucleotides

Lac promoter/operator region: bases 95-216
M13 Reverse priming site: bases 205-221
LacZ-alpha ORF: bases 217-570
T7 promoter priming site: bases 400-419
M13 Forward (-20) priming site: bases 427-442
Fusion joint: bases 571-579
codB lethal gene ORF: bases 580-882
Kanamycin resistance ORF: bases 1231-2025
Zeocin resistance ORF: bases 2231-2905
pUC origin: bases 2673-3386

Obr. 11 pCR-Blunt plasmid použitý pro klonování

Postup:

Nejprve si připravíme 10 μ l ligační směsi:

pCR-Blunt (5ng)	0,5 μ l
PCR produkt	4 μ l
5x T4 DNA Ligase Buffer	2 μ l
sterilní H ₂ O	2,5 μ l
T4 DNA Ligáza (5U/ μ l)	1 μ l

Směs necháme inkubovat při laboratorní teplotě minimálně 5 minut (prodloužením ligačního času zvyšujeme účinnost ligace). Poté skladujeme při -20°C .

Následuje transformace rekombinantního plasmidu do kompetentních buněk *E.Coli*. Použijeme k tomu One Shot TOP10 *E.Coli*.

Nejdříve pro každou reakci rozmrazíme 50 μl vialku s buňkami One Shot TOP10 a po úplném rozmražení pipetujeme 2 μl ligační směsi přímo do vialky a zamícháme. Poté směs inkubujeme 30 minut na ledu. Zbytek ligační směsi skladujeme při -20°C . Po inkubaci provedeme heat shock, kdy vialky vložíme na 45 sekund do 42°C bez třepání a poté ihned zpět na led, kde je necháme po dobu 2 minut. Následně přidáme 250 μl SOC média o laboratorní teplotě a vložíme do inkubátoru s třepáním na 37°C , 1 hodinu, 225rpm.

Po hodině třepání přeneseme 10-100 μl směsi z vialky na Petriho misky obsahující agar s Kanamycinem a inkubujeme přes noc při 37°C dnem vzhůru.

Druhý den se provede kontrola narostlých kolonií, kde se pomocí Colony PCR (viz výše) potvrdí, zda buňky obsahují plasmid se zaligovaným insertem. U pozitivních kolonií se izolují plasmidy a pošlou se na sekvenaci s dvojicí primerů M13f/r.

Specifické klonování do pmiR-GLO plasmidu

PmiR-GLO vektor je navržen pro kvantitativní hodnocení aktivity miRNA, kdy je cílové místo miRNA vloženo do vektoru za gen pro luciferázu. Tato cílová místa mohou být zavedena klonováním buď samostatně, nebo se vkládá celá 3'UTR oblast genu zájmu. V našem případě vkládáme do vektoru celou 3'UTR oblast GPX7.

Na vektoru můžeme rozlišit několik částí:

PGK promotor – promotor lidské fosfoglycerát kinázy, který zajišťuje snížení translace, což je výhodné v případě, kdy je žádoucí reakcí snížení signálu

luc2 gen – reportérový gen kódující luciferázu

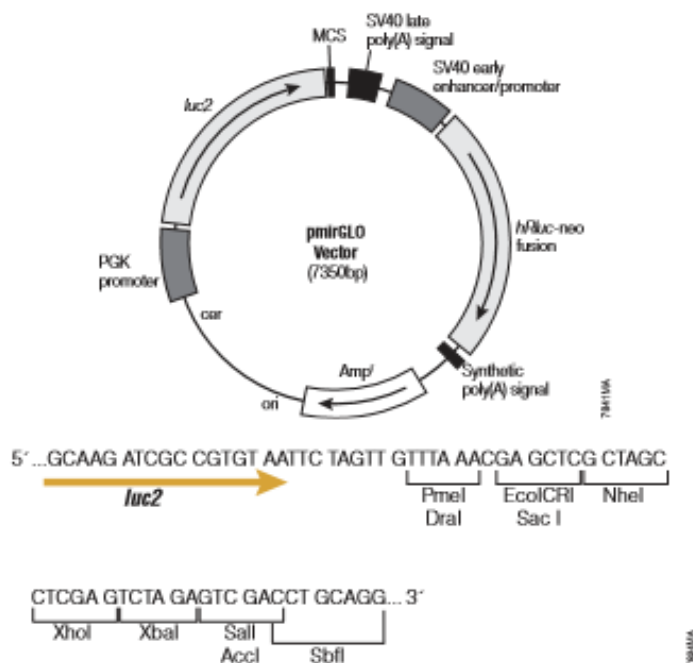
MCS – mnohonásobné klonovací místo, nachází se za 3' koncem *luc2* genu

amp gen – umožňuje bakteriální selekci

SV40 – signální sekvence, zajišťuje efektivní ukončení transkripce a polyadenylaci
- mRNA

Features List and Map for the pmirGLO Vector

SV40 late poly(A) signal	106–327
SV40 early enhancer/promoter	426–844
<i>hRluc</i> -neo fusion protein coding region	889–2664
Synthetic polyadenylation signal	2728–2776
β -lactamase (<i>Amp^r</i>) coding region	3037–3897
<i>ColE1</i> -derived plasmid origin of replication	4052–4088
Human phosphoglycerate kinase promoter	5094–5609
<i>luc2</i> reporter gene	5645–7297
Multiple cloning site (MCS, Figure 1)	7306–7350



Obr. 12 pmiR-GLO plasmid použitý pro klonování

Fragment, který budeme ligovat, amplifikujeme pomocí PCR za použití primerů obsahující štěpná místa. Tato štěpná místa jsou identická se štěpnými místy v plasmidu pmiR-GLO. Jedná se o místa rozpoznávaná restrikčními enzymy *XhoI* a *XbaI*. PCR reakcí tak dojde k amplifikaci a zároveň k vnesení štěpných míst do fragmentu. Dvojice

primerů je specificky navržena tak, aby ohraničovala 3'UTR oblast GPX7, kterou budeme do plasmidu vnášet.

Primery:

h_gpx7_3U_F: ATG **CTC GAG** CCA CCG CGT CTC

- Červeně značená sekvence je sekvence primeru, kterou se komplementárně váže na začátek 3'UTR oblasti. Žlutě zbarvená je sekvence rozpoznávaná a štěpená restrikcčním enzymem *XhoI*.

h_gpx7_3U_R: GGA CGT **TCTA GAG** GAT ACT TTC AT

- Červeně značená je opět sekvence primeru komplementární k druhému konci 3'UTR oblasti a žlutě zbarvená je sekvence štěpená restrikcčním enzymem *XbaI*.

Postup:

Provedeme štěpení amplifikovaného fragmentu i vektoru pmiR-GLO restrikcčními enzymy *XhoI* a *XbaI*. Tím se ve dvou řetězcovém plasmidu vytvoří lepidivé konce s jedno řetězcovým přesahem, které jsou komplementární k jedno řetězcovým přesahům v insertu, a může tak dojít k ligaci.

Směs:

Fragment : 50 µl

5 µl pufr

43 µl přečištěný 3'UTR

1 µl *XhoI*

1 µl *XbaI*

-

Plasmid: 30 µl

3 µl pufr

6 µl plasmid (~ 1 µg)

1 µl *XhoI*

1 µl *XbaI*

19 µl H₂O

Štěpení při 37°C 20 minut a poté při 65°C 20 minut. Oba vzorky se následně přečistí na kolonkách a měří se koncentrace.

Dále si připravíme 20 μ l ligační směsi a necháme inkubovat při 16°C cca 1,5-2 hodiny:

Pufr	2 μ l
T4 DNA Ligáza	1 μ l
Plasmid pmiR-GLO	8,5 μ l
Fragment	8,5 μ l

Pro každou reakci opět rozmrazíme 50 μ l vialku s buňkami *E.Coli* (TOP10) a připipetujeme 2 μ l ligační směsi. Inkubujeme 15 minut na ledu, provedeme heat shock, kdy na 45 sekund vložíme vialky do 42°C a poté ihned znovu na led na 2 minuty. Poté přidáme 250 μ l SOC média a necháme třepat v inkubátoru 45 minut na 37°C, 225rpm.

Po inkubaci přeneseme 250 μ l směsi na předeřáté Petriho misky obsahující agar s ampicilinem a inkubujeme při 37°C dnem vzhůru do druhého dne. Vyroslé kolonie následně kontrolujeme pomocí Colony PCR za použití dvojice primerů GPX7-3U f/r. U kolonií, kde se potvrdila přítomnost plasmidu obsahujícího insert, provedeme izolaci plasmidů a posíláme na sekvenování s primery GPX7-3U f/r.

4.2.10. MUTAGENEZE

Mutagenese vazebného místa pro miR-137 a miR-29 na 3'UTR GPX7

Postup:

Nejdříve připravíme mastermix pro PCR reakci za použití speciálně navržených primerů, které obsahují změněnou sekvenci nukleotidů, kterou chceme cíleně zanést do fragmentu DNA.

Mastermix 25 μ l:

HF pufr	5 μ l
dNTPs	1 μ l
Forward primer	1 μ l
Reverse primer	1 μ l
<i>Phu</i> HF DNA polymeráza	0,25 μ l
Templát (10x)	1 μ l
H ₂ O	15,75 μ l

Směs vložíme do PCR cykléru a spustíme přednastavený program:

98°C	98°C	62°C	72°C	72°C
30''	10''	20''	4'	5'
		18 cyklů		

Následně provedeme štěpení *DpnI* z důvodu odstranění mateřských plasmidů, které neobsahují změněnou sekvenci. Původní plasmidy byly izolovány z buněk *E.Coli*, ve kterých došlo působením enzymu DAM methylázy k methylovanému adeninu. Nově vzniklé amplikony tyto methylované adeniny neobsahují. Restriční enzym *DpnI* rozpoznává a štěpí DNA pouze v místě methylovaného adeninu a dojde tak k selektivní degradaci pouze mateřských plasmidů.

- K reakční směsi přidáme 1 μ l *DpnI*, suspenzi promícháme pipetou, mírně stočíme a necháme inkubovat 1 hodinu při 37°C.

Poté provedeme transformaci rekombinantního plasmidu do buněk *E.Coli*, které jsou ve stavu kompetence. Buňky *E.Coli* jsou schopné u vložených fragmentů opravit jedno řetězcový zlom a vytvořit tak zpět kruhovou molekulu. Po proběhlém štěpení přidáme 5 μ l směsi do TOP10 buněk a necháme inkubovat 30 minut na ledu. Poté provedeme Heat shock, kdy zkumavku vložíme na 45 sekund do 42°C a poté ihned zpět na led. Po přibližně 2 minutách na ledu přidáme 250 μ l rozeřátého SOC média a necháme v inkubátoru 1 hodinu třepat při 37°C.

Po hodinové inkubaci přeneseme 100 μl směsi na předem připravené Petriho misky obsahující agar s ampicilinem a necháme přes noc kultivovat dnem vzhůru v inkubátoru. Druhý den provedeme kontrolu narostlých kolonií pomocí Colony PCR. U kolonií, kde se potvrdila přítomnost plasmidu obsahujícího insert, provedeme izolaci plasmidů a podrobíme je štěpení restrikcí enzymem *NdeI*.

Směs 30 μl pro štěpení *NdeI*:

Pufr „4“	3 μl
<i>NdeI</i>	0,5 μl
Produkt z PCR	15 μl
H ₂ O	11,5 μl

Směs inkubujeme 15 minut při 37°C. Tento enzym specificky štěpí plasmidy v místě vnesené mutace. Štěpené fragmenty potom rozdělíme elektroforeticky na gelu, kde podle délky fragmentů zjistíme, zda ke štěpení (a zároveň mutagenезi) došlo. Úspěšně mutované plasmidy izolujeme a pošleme na sekvenování.

Mutované plasmidy jsou následně přečištěny a namnoženy pomocí Midi purifikace. Mutovaný plasmid miR-137* se potom využívá jako kontrola jednotlivých kroků mutagenезe vazebného místa pro miR-29 a jako jeho pozitivní kontrola.

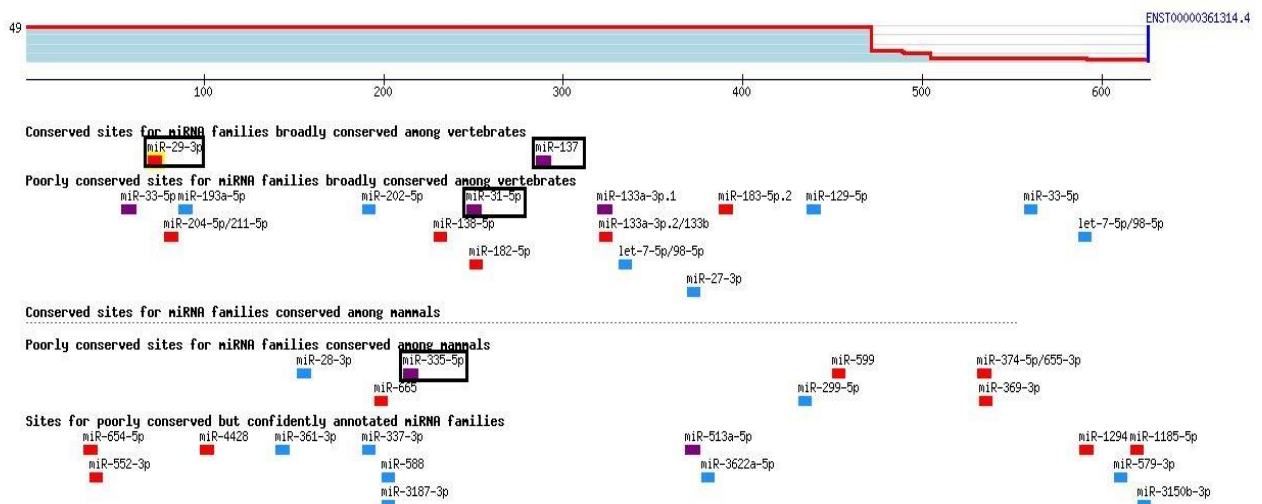
5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. VÝBĚR PRO KLONOVÁNÍ

5.1.1. Vytipování jednotlivých miRNA

V programu TargetScan jsme si vyhledali 3'UTR oblast GPx7. Tento program nám zobrazí možné regulující miRNA i s nukleotidovou sekvencí, kterou se váží na příslušnou oblast GPx7. Pro náš experiment jsme si vytipovali tyto miRNA - miR-29a, miR-29b, miR-137, miR-31 a miR-335.

Human GPX7 ENST00000361314.4 3' UTR length: 626



Obr. 13 3'UTR oblast lidské GPx7 a její regulující miRNA – výřez z programu Targetscan (<http://www.targetscan.org>)

Následující obrázek nám ukazuje část 3'UTR oblasti GPx7 se zvýrazněným zakonzervovaným úsekem u různých živočišných druhů, na který se váže miR-29, a tím se zapojuje do regulace transkripce GPx7. Pomocí programu TargetScan si můžeme prohlédnout jednotlivé regulující oblasti i pro ostatní miRNA. Vidíme, že se během

sloupci, druhý sloupec udává koncentraci celkové RNA v jednotlivých vzorcích a třetí a čtvrtý sloupec čistotu vzorku.

Čistota je stanovena vždy z poměru absorbance při vlnové délce 260 nm, při které absorbují příslušná RNA, a 280 nebo 230 nm. Poměr absorbancí při vlnových délkách 260/280 nm, uveden ve třetím sloupci, ukazuje kontaminaci vzorku proteiny. Při 280 nm totiž záření absorbují hlavně proteiny a tato hodnota by měla být vyšší než 1,8. Při vlnové délce 230 nm absorbují zejména organické látky. Poměr absorbance při vlnových délkách 260/230 nm udává čistotu vzorku vůči kontaminaci organickými látkami – fenolem. Tato hodnota je uvedena ve čtvrtém sloupci a měla by se pohybovat kolem hodnoty 2. Kontaminace vzorku proteiny a organickými látkami byla malá, vzorky proto můžeme bez omezení použít pro experiment.

Tabulka 1: Koncentrace miRNA a čistota vzorků vůči kontaminaci proteiny a organickými látkami

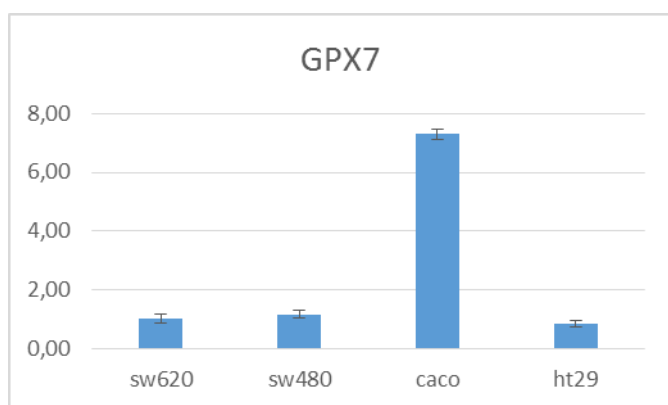
Sample ID	Koncentrace vzorku (ng/ul)	Poměr absorbance při vlnové délce 260/280 nm	Poměr absorbance při vlnové délce 260/230
SW620-1	648,50	1,99	2,03
SW620-2	2100,60	1,93	2,08
SW620-3	1710,10	1,98	1,92
SW480-1	1465,90	1,95	1,94
SW480-2	1562,80	1,97	2,05
SW480-3	1389,50	1,98	2,02
HT29-1	317,35	1,98	2,13
HT29-2	450,39	1,90	2,01
HT29-3	442,51	1,92	2,05

Caco2-1	1602,70	2,00	1,80
Caco2-2	273,70	2,04	2,06
Caco2-3	107,75	2,02	1,88

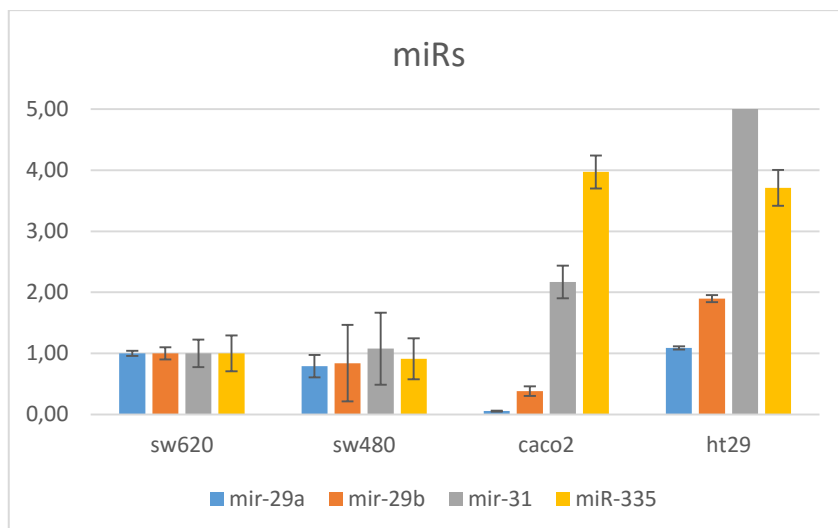
V dalším kroku jsme provedli „DNase treatment“. Vzorky RNA se ošetří DNázou I, která selektivně štěpí DNA a odstraní tak případnou kontaminaci vzorků genomovou DNA. S takto ošetřenou RNA můžeme provést reverzní transkripci.

Reverzní transkripci převádíme RNA pomocí reverzní transkriptázy na jedno řetězcovou cDNA (complementary DNA). Reakce se liší pouze použitím primerů v závislosti na tom, zda je templátem pro tuto reakci mRNA nebo miRNA. Při reverzní transkripci pro stanovení GPx7 se jako primery používají náhodné hexamery. Jako referenční gen pro porovnání koncentrací jsme zde použili beta-2-mikroglobulin (B2M). Pro převod jednotlivých miRNA se do reakce přidávají specifické RT primery a jako referenční gen byl použit miR-16.

Po reverzní transkripci jsme provedli qPCR a z výsledků vytvořili grafy. V případě miR-137 nedošlo k požadované amplifikaci. Z toho usuzujeme, že tato miRNA nebyla v těchto buněčných liniích přítomna.



Obr. 16 Relativní množství GPx7 ve 4 liniích buněk kolorektálního karcinomu



Obr. 17 Relativní množství stanovovaných miRNA ve 4 liniích buněk kolorektálního karcinomu

Na obrázku 16 vidíme relativní množství GPx7 obsažené v každé ze čtyř buněčných linií. Koncentrace je vztažena k hodnotám v buněčné linii SW620, které byla přiřazena hodnota 1. Obrázek číslo 17 udává relativní množství zkoumaných miRNA v každé ze čtyř buněčných linií, opět vztažené ke koncentraci miRNA v linii SW620, které byla taktéž přiřazena hodnota 1.

Porovnáním obrázků 16 a 17 se nám jeví zajímavé hodnoty a závislosti v buněčné linii Caco2. Množství GPx7 je zde oproti ostatním buněčným liniím výrazně vyšší. Naopak množství miR-29a a miR-29b v linii Caco2 vykazuje oproti ostatním liniím hodnoty nižší. To může znamenat možnou regulaci GPx7 těmito miRNA. Z tohoto důvodu jsme si pro další zkoumání vybrali tyto miRNA k provedení jejich funkční analýzy. Snažili jsme se naklonovat 3'UTR oblast GPx7 z linie Caco2, připravit reportérový systém a ověřit případnou regulaci pomocí miR-29a a miR-29b.

5.2. PŘÍPRAVNÉ KLONOVÁNÍ

Jak již bylo zmíněno, pro klonování jsme si vybrali 3'UTR oblast GPx7 z buněčné linie Caco2, abychom ověřili případnou regulaci miR-29a a miR-29b. První klonování je spíše orientační, slouží pro ověření sekvence a její porovnání se sekvencí GPx7 uvedenou v databázích. Získaný fragment klonujeme do vektoru ZeroBlunt. Druhé klonování bude již specifické, namnoží se pouze požadovaná 3'UTR oblast GPx7. Jako vektor zde použijeme reportérový plasmid pmiR-GLO, do kterého budeme klonovat příslušnou 3'UTR oblast. Takto vzniklá rekombinantní DNA bude vhodná pro luciferázovou esej.

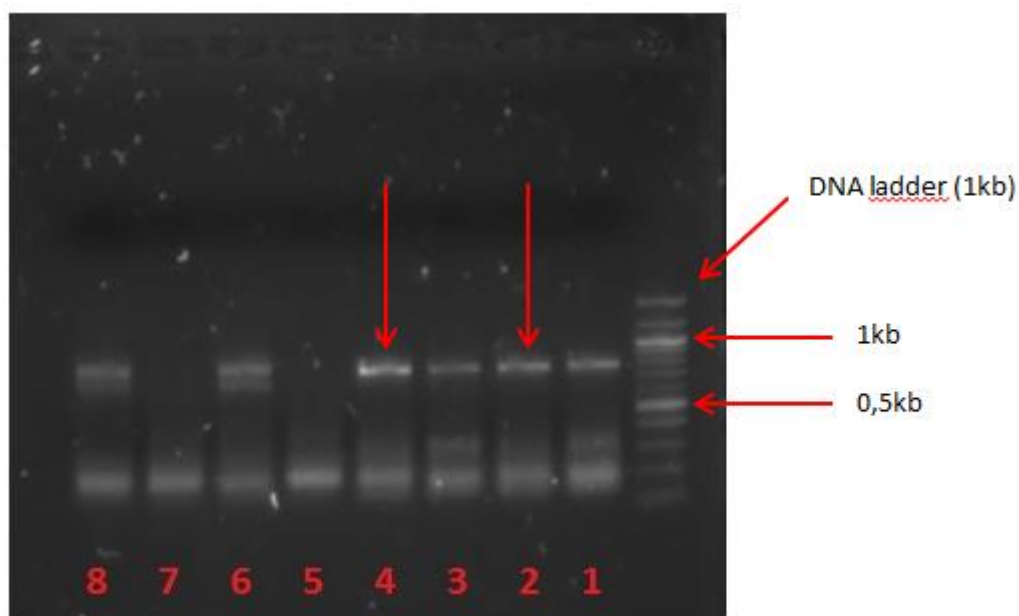
```
>gi|253314506|ref|NM_015696.4| Homo sapiens glutathione peroxidase 7  
(GPX7), mRNA  
GTCTTTGCCCTCGCGACGCCGCCACCTCCGGAACAAGCCATGGTGGCGGGCGACGGTGGCAGCGGGCGTGGC  
TGCTCCTGTGGGCTGCGGCCTGCGCGCAGCAGGAGCAGGACTTCTACGACTTCAAGGCGGTCAACATCCG  
GGGCAAACCTGGTGTGCTGGAGAAGTACCGCGGATCGGTGTCCCTGGTGGTGAATGTGGCCAGCGAGTGC  
GGCTTACAGACAGCACTACCGAGCCCTGCAGCAGCTGCAGCGAGACCTGGGCCCCACCCTTTAACG  
TGCTCGCCTTCCCCTGCAACCAGTTTGGCCAACAGGAGCCTGACAGCAACAAGGAGATTGAGAGCTTTGC  
CCGCCGCACCTACAGTGTCTCATTCCCCATGTTTAGCAAGATTGCAGTCACCGGTAAGTGGTGGCCATCCTT  
GCCTTCAAGTACCTGGCCCAGACTTCTGGGAAGGAGCCCACCTGGAACCTTCTGGAAGTACCTAGTAGCCC  
CAGATGGAAAGGTGGTAGGGGCTTGGGACCCAACTGTGTGAGTGGAGGAGGTGAGACCCAGATCACAGC  
GCTCGTGAGGAAGCTCATCCTACTGAAGCGAGAAGACTTATAACCACCGCGTCTCCTCCTCCACCACCTC  
ATCCCGCCACCTGTGTGGGGCTGACCAATGCAAACCTCAAATGGTGGCTTCAAAGGGAGAGACCCACTGAC  
TCTCCTTCCCTTACTCTTATGCCATTGGTCCCATCATTCTTGTGGGGGAAAAATTCTAGTATTTTGATTA  
TTTGAATCTTACAGCAACAATAAGGAACCTCCTGGCCAATGAGAGCTCTTGACCAGTGAATCACCAGCCGA  
TACGAACGTCTTGCCAACAATAATGTGTGGCAAATAGAAGTATATCAAGCAATAATCTCCCACCCAAGGC  
TTCTGTAACCTGGGACCAATGATTACCTCATAGGGCTGTTGTGAGGATTAGGATGAAATACCTGTGAAAG  
TGCCTAGGCAGTGCCAGCCAAATAGGAGGCATTCAATGAACATTTTTTGCATATAAAACCAAAAAATAACT  
TGTTATCAATAAAAACTTGCATCCAACATGAATTTCCAGCCGATGATAATCCAGGCCAAAGGTTTAGTTG  
TTGTTATTTCTCTGTATTATTTCTTCATTACAAAAGAAATGCAAGTTCATTGTAACAATCCAACAAT  
ACCTCACGATATAAAAATAAAAATGAAAGTATCCTCCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Obr. 18 Sekvence GPx7 – CDS sekvence, 3'UTR oblast, místa nasednutí primerů a vazebná místa pro miR-29 (a, b, c) a miR-137

Na obrázku 18 je zobrazena sekvence GPx7 stažená z databáze NCBI (Národní centrum pro biotechnologické informace; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_015696.4). Šedě zbarvená oblast značí kódující sekvenci – CDS. Za touto sekvencí následuje černě značená nepřekládaná 3'UTR oblast genu GPx7 zakončená polyA sekvencí. Červeně kurzívou jsou

zvýrazněny sekvence obsažené v primerech, které byly použity pro amplifikaci pouze 3'UTR oblasti (gpx7_3U_Xbal_F a gpx7_3U_Xho1_R). Žlutě zbarvená sekvence odpovídá vazebnému místu pro miR-29 (a, b, c) a modře zbarvená sekvence vazebnému místu pro miR-137. Zelenou barvou je označený primer GPx7-3u_f.

Nejprve jsme provedli amplifikaci delšího úseku GPx7, který zahrnoval jak 3'UTR oblast, tak i část CDS. Amplifikace se provedla pomocí PCR za použití primerů h_GPx7-3u_f / uniR. Očekávaná délka produktu by měla být kolem 850 nukleotidů. UniR primer je univerzální primer, který byl použit již při reverzní transkripci. Obsahuje polyT sekvenci a univerzální adaptor, který je tvořen náhodnou nespecifickou sekvencí nukleotidů. Svou PolyT sekvencí se selektivně váže na polyA konec GPx7. Pro amplifikační reakci byly vyzkoušeny různé podmínky a různé typy polymeráz, aby bylo dosaženo co největší výtěžnosti. Reakce byla nakonec provedena s polymerázou Q5. Připravilo se 50μl master mixu a spustila se PCR podle přednastaveného programu. Po proběhlé PCR se nanoslo 10μl na elektroforetický gel a spustila se horizontální gelová elektroforéza, abychom mohli zhodnotit produkty PCR.



Obr. 19 Elektroforéza amplifikovaných fragmentů GPx7 (očekávaná velikost 850kb)

Pro klonování byly kvůli vyšší koncentraci (výraznější fragmenty na gelu) vybrány fragmenty 2 a 4, jak naznačují červené šipky v obrázku 19. Tyto dva fragmenty jsme vyřízli z gelu a přečistili na kolonkách. Kolonky selektivně zachytí DNA, ostatní nežádoucí složky se z kolonek vymyjí a samotná DNA se nakonec eluuje elučním roztokem do čisté mikro-zkumavky. Nedojde jen k přečištění DNA, ale i k jejímu zakoncentrování.

Po přečištění se provedla další kontrolní elektroforéza samotných fragmentů 2 a 4, která je zobrazena na obrázku 20. Kvůli vyšší koncentraci byl pro ligaci použit fragment 4.



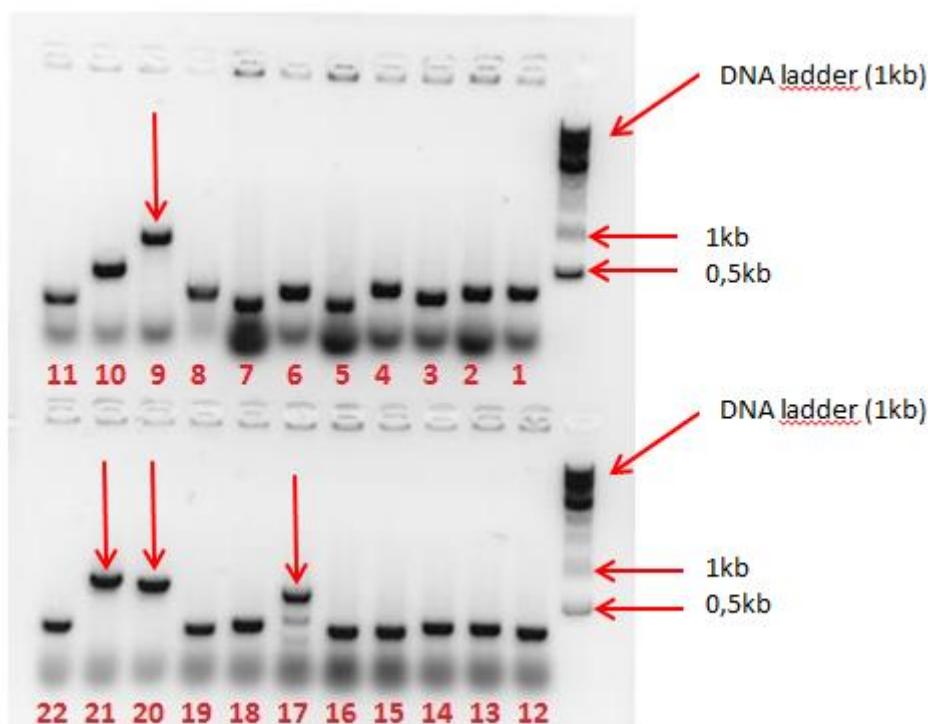
Obr. 20 Elektroforéza fragmentu 2 a 4

Dále se dostáváme už k jednotlivým krokům klonování. Prvním krokem je ligace tohoto vybraného přečištěného fragmentu, který obsahuje tupé konce, do plasmidu Zero Blunt. Mezi plasmidem a fragmentem dojde nejprve ke spojení navzájem komplementárních konců vodíkovými můstky a enzym T4-DNA ligáza následně katalyzuje vznik fosfodiesterové vazby a úplné spojení plasmidu a inzertu.

Po ligaci následuje transformace této rekombinantní DNA do buněk *E.Coli*. Při transformaci využíváme toho, že hostitelské buňky, nacházející se ve stavu kompetence, jsou schopné přijmout cizorodou DNA, dále se množit a vytvářet klon, který obsahuje

požadovanou rekombinantní DNA. Suspenzi takto připravených buněk nalijeme na Petriho misky obsahující půdu s kanamycinem a plastovou očkovací tyčinkou rozetřeme suspenzi po celém povrchu plotny do sucha. Poté Petriho misky necháme kultivovat v inkubátoru dnem vzhůru. Výhodou Zero Blunt plasmidu je tzv. modro-bílá selekce, kdy kolonie obsahující prázdný plasmid budou na agaru modře zbarvené a kolonie obsahující plasmid se zaligovaným fragmentem budou bílé.

Další den vidíme na plotnách narostlé kolonie. Na plotně vyrostou viditelné kolonie pouze z buněk, které obsahují plasmid, ostatní buňky nevyrostou. Úspěšnost ligace potvrdíme kontrolou těchto narostlých kolonií. Nejprve provedeme PCR za použití primerů M13r/f, kdy dojde k amplifikaci části plasmidu s inzertem, a následně provedeme rozdělení gelovou elektroforézou. Vybrali jsme celkem 22 kolonií, kdy část každé kolonie sterilní špičkou pipety přeneseme do mikro zkumavek obsahující 10 μ l vody. Kolonie, které jsme vybrali, si na dně Petriho misky označíme a očíslováme, abychom je mohli případně znovu použít, jestliže se u nich potvrdí správná ligace.

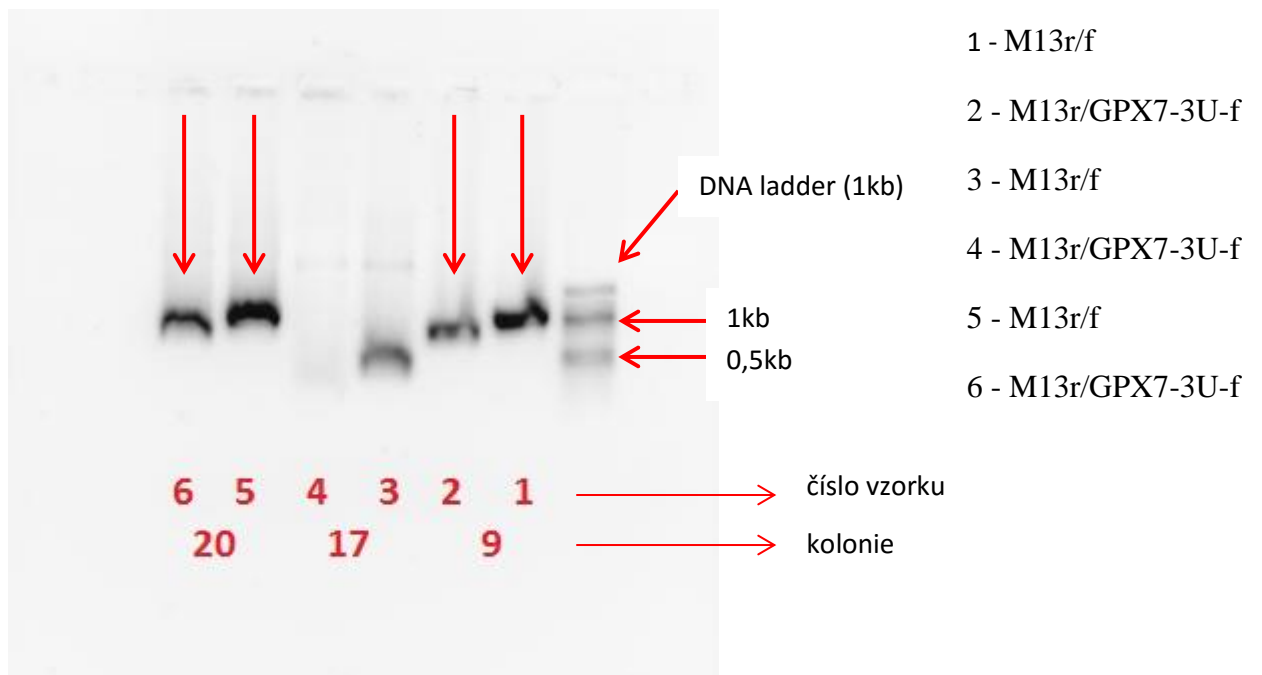


Obr. 21 Kontrola kolonií a potvrzení úspěšnosti ligace

Z obrázku 21 podle velikosti produktů vidíme, že kolonie 9, 17, 20 a 21 by měly obsahovat plasmid se zaligovaným inzertem. Tyto kolonie proto použijeme pro namnožení a izolaci plasmidů. Fragменты, které doputovaly při elektroforéze v gelu dál, obsahují pravděpodobně jen samotný plasmid bez inzertu a ligace zde neproběhla.

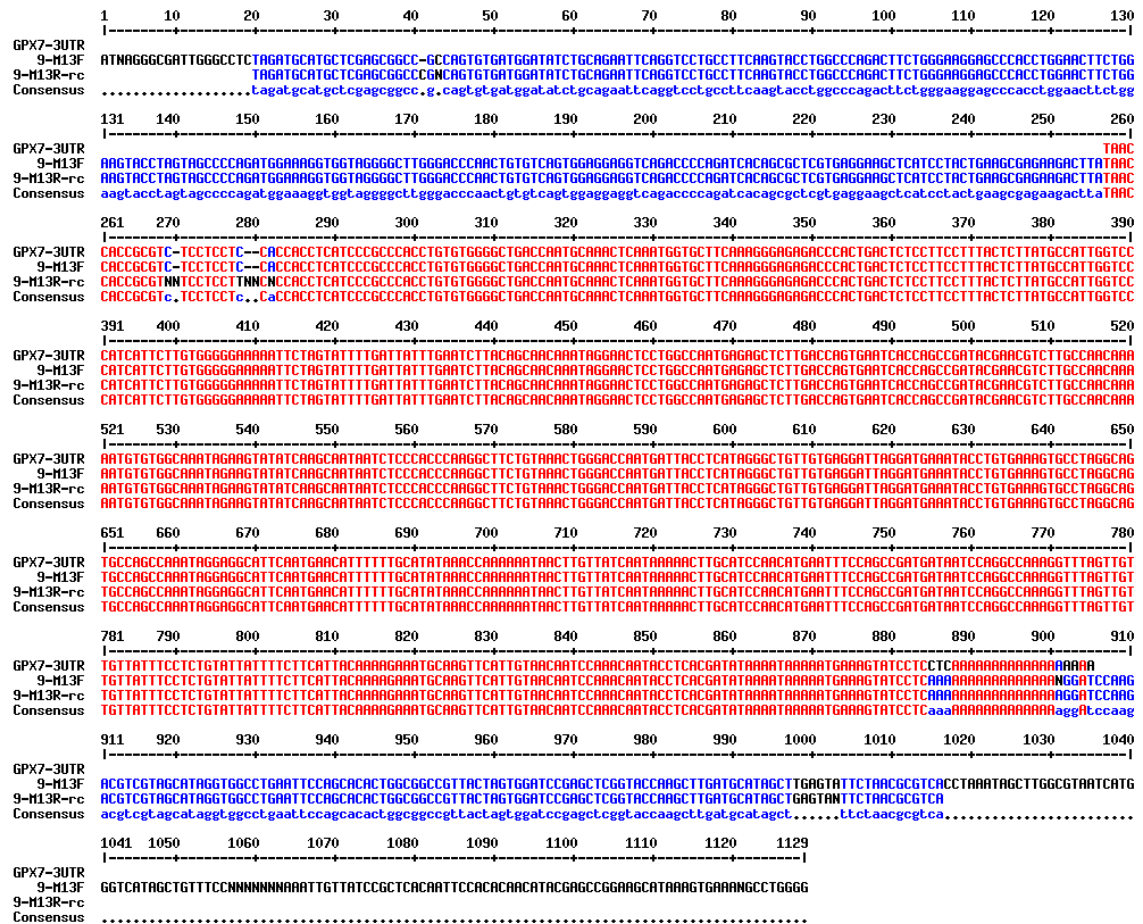
Pro namnožení plasmidu byly odpovídající kolonie sterilně přeneseny špičkou pipety do 5ml LB média obsahujícího kanamycin a inkubovány do druhého dne (při 37°C, 220rpm). Poté jsme provedli Mini purifikaci pomocí zymo kolonek. Kolonie 21 nenarostla.

Další kontrolu jsme provedli pomocí PCR za použití primerů M13r/GPX7-3U-f, abychom potvrdili konkrétně zaligovanou oblast. Jako templát pro reakci jsme použili izolované plasmidy. Primer GPX7-3U-f nasedá selektivně na začátek insertu a při amplifikační reakci tak vznikají kratší fragmenty než při použití primeru M13f v předchozí PCR.



Obr. 22 Elektroforéza fragmentů po PCR reakci za použití kombinace primerů pro zjištění přítomnosti insertu GPx7.

Potvrdilo se, že plasmidy z kolonií 9 a 20 obsahují požadovanou zaligovanou sekvenci GPx7 (obr. 22). Tuto skutečnost ověřujeme sekvenováním. Plasmidy z kolonie 17 tuto sekvenci neobsahují. Po izolaci plasmidů z kolonií 9 a 20 změříme jejich koncentraci a vzorky odesíláme na sekvenování dle požadavků (LightRUN sekvenování, GATC-Biotech, (<http://www.gatc-biotech.com>)).



Obr. 22 Porovnání sekvence plasmidu 9 se sekvencí 3'UTR oblasti GPx7 získané z databáze

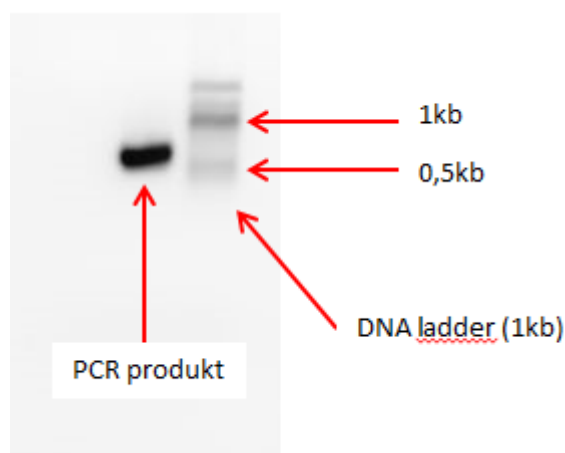
Plasmidy 9 a 20 byly osekvenovány z obou směrů za použití primerů M13r i M13f. Sekvence plasmidu 20 nebyla úspěšná, zřejmě mohlo dojít k jeho znečištění. Sekvence 9-M13r byla obrácena v programu „Reverse complement“ (https://sites.ualberta.ca/~stothard/javascript/rev_comp.html) na 9-M13R-rc (reverse complement), abychom ji mohli snáze porovnat se sekvencemi 9-M13f a GPx7-3UTR.

Z obrázku 23 vidíme, že sekvence plasmidu 9 zahrnuje červeně značenou 3'UTR oblast a modře značenou CDS oblast GPx7. Díky programu „Multalin“ (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) můžeme všechny tři sekvence srovnat nad sebou a vyvodit tak závěr o jejich shodě. Jak vidíme, obě sekvence 9-M13R i 9M13F se zcela shodují s hledanou sekvencí 3'UTR oblasti GPx7 získanou z databáze.

5.3. SPECIFICKÉ KLONOVÁNÍ

Po předchozím úspěšném klonování jsme pro další postup použili plasmid 9 a klonovali pouze 3'UTR oblast genu GPx7 do plasmidu pmiR-GLO. Tento plasmid dále umožňuje jeho použití pro luciferázovou esej.

Nejdříve jsme provedli PCR amplifikaci za použití Q5 polymerázy a primerů obsahujících štěpná místa. Jako templát jsme použili ředěný plasmid 9 a produkt zkontrolovali gelovou elektroforézou.

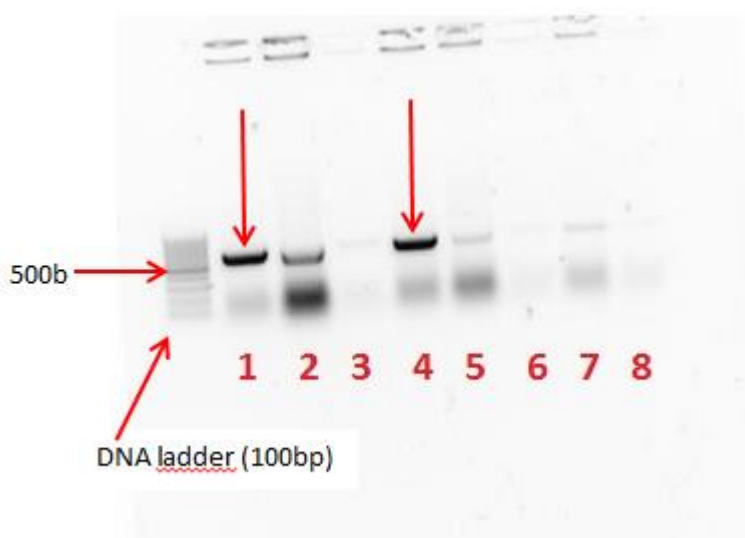


Obr. 24 Kontrola PCR za použití primerů se štěpnými místy

PCR produkt jsme přečistili na kolonkách a následovalo štěpení pomocí restričních endonukleáz. Restriční endonukleázy jsou enzymy, které jsou schopné hydrolyticky štěpit fosfodiesterové vazby v molekule DNA. V genovém inženýrství se nejčastěji využívají restriční endonukleázy II. typu. Jejich předností je, že štěpí řetězec přímo ve svém rozpoznávacím místě. Endonukleázy specificky štěpí amplifikovaný

fragment v místě přítomnosti primerů se štěpnými místy. Zároveň se štěpí také samotný plasmid pmiR-GLO. Díky tomuto štěpení vznikají na fragmentu a plasmidu lepivé (kohezní) konce, které jsou navzájem komplementární. Toho se potom využívá při ligaci. Po štěpení se produkt opět přečistí, změří se koncentrace a fragment je připraven k ligaci do plasmidu pmiR-GLO. Stejně jako při prvním klonování provedeme ligaci fragmentu do vektoru a transformaci rekombinantní kruhové DNA do buněk *E. Coli*, které jsou opět ve stavu kompetence a mohou přijmout cizorodou DNA. Získanou suspenzi buněk opět rozetřeme na Petriho misky obsahující agar s ampicilinem. Plotny necháme kultivovat dnem vzhůru v inkubátoru při požadované teplotě.

Na Petriho miskách nám vyrostlo 8 kolonií. Část každé kolonie přeneseme sterilní špičkou pipety do připravených mikro zkumavek obsahující 10μl vody. Ve vodě dojde k rozrušení buněk a uvolnění plasmidů. Poté opět provedeme kontrolní PCR za použití primerů se štěpnými místy, které byly použity již v předchozí PCR. Tím zjistíme, zda ligace proběhla úspěšně či nikoliv. Produkty PCR reakce necháme elektroforeticky rozdělit na gelu a vybereme vzorky vhodné k sekvenaci.



Obr. 25 Kontrola 8 narostlých kolonií a úspěšnost jejich ligace

Úspěšnost ligace se potvrdila v několika vzorcích. Díky vyšší koncentraci jsme vybrali kolonie 1 a 4, které jsme namnožili mini purifikací. Pro jistotu jsme zopakovali stejnou PCR pouze s jediným rozdílem, že jsme jako templát pro reakci použili čistý plasmid. Výsledek této PCR vidíme na obrázku 14 po rozdělení gelovou elektroforézou.

Jak vidíme z obrázku 27, sekvence p11-F a p11-R-rc se plně shodují se sekvencí GPX7-3UTR. Klonování i sekvenování bylo tedy úspěšné. Plasmid pmiR-GLO tedy obsahuje zaligovanou 3'UTR oblast GPx7. Takto připravenou rekombinantní DNA je možné použít pro luciferázovou esej.

5.4. MUTAGENEZE

Dále provedeme mutagenezi v místě vazebné sekvence pro miR-137 a miR-29 na 3'UTR oblasti GPx7, kterou jsme v předešlých krocích naklonovali do plasmidu pmiR-GLO. Mutovaný plasmid pmiR-GLO-GPX7*137 bude poté použit jako pozitivní kontrola a jako kontrola jednotlivých kroků mutageneze vazebné sekvence miR-29.

5.4.1. Mutace vazebného místa pro miR-137

```

                                     TAACCACCGCGTCTCCTCCTCCACCACCTC
ATCCCGCCACCTGTGTGGGGCTGACCAATGCAAACCTCAAATGGTGCTTCAAAGGGGAGAGACCCACTGAC
TCTCCTTCCTTACTCTTATGCCATTGGTCCCATTCTTGTGGGGGAAAAATTCTAGTATTTTTGATTA
TTTGAATCTTACAGCAACAAAATAGGAACTCCTGGCCAATGAGAGCTCTTGACCAGTGAATCACCAGCCGA
TACGAACGTCCTTGCCAACAAAAATGTGTGGCAAATAGAAGTATATCAAGCAATTAATCTCCCACCCAAGGC
TTCTGTAAACTGGGACCAATGATTACCTCATAGGGCTGTTGTGAGGATTAGGATGAAATACCTGTGAAAG
TGCCTAGGCAGTGCCAGCCAAAATAGGAGGCATTCAATGAACATTTTTTGCATATAAACCAAAAAATAACT
TGTTATCAATAAAAACTTGCAATCAACATGAATTTCCAGCCGATGATAATCCAGGCCAAAGGTTTAGTTG
TTGTTATTTCTCTGTATTATTTCTTCATTACAAAAGAAAATGCAAGTTCATTGTAACAATCCAACAAT
ACCTCACGATATAAAAATAAAAAATGAAAGTATCCTCCTC

```

Obr. 28 Sekvence 3'UTR oblasti GPx7 s modře značeným vazebným místem pro miR-137, u kterého je plánovaná mutageneze

Abychom mohli provést mutaci určité nukleotidové sekvence, potřebujeme nejprve navrhnout primery, které požadovanou mutovanou sekvenci obsahují. Vazebná sekvence pro miR-137 je na obrázku 28 zabarvena modře. Primery pro Pfu mutagenezi navrhujeme dva k sobě navzájem komplementární, nasedající na stejné místo na plasmidu, každý na jednom vlákně. Oba primery obsahují část sekvence pro vnášenou mutaci, která by se měla objevit přibližně uprostřed.

Primer navržený na tuto oblast by měl sekvenci:

CAAATAGAAGTATATCA **AGCAATA** ATCTCCCACCCAAG

Požadovaná mutace ve vazebném místě je znázorněná zeleně:

CAAATAGAAGTATATCA **catatg** ATCTCCCACCCAAG

Takto navržený primer zároveň obsahuje nově zavedené štěpné místo pro restriční endonukleázu *NdeI*, která neštěpí nikde v plasmidu pmiR-GLO-GPX7. Pro navržení mutačního primeru pro druhé vlákno plasmidu použijeme internetový program OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

Sekvence obou primerů budou tedy (*NdeI* štěpné místo je zapsáno kurzívou):

mutGPX7-137_F: CAA ATA GAA GTA TAT CAC *ATA TGT* ATC TCC CAC CCA AG

mutGPX7-137_R: CTT GGG TGG GAG ATA *CAT ATG* TGA TAT ACT TCT ATT TG

Program OligoCalc vypočítává i další parametry. Důležitá je teplota tání primerů, která je v tomto případě 62,3°C. Tato teplota je poté použita při PCR jako optimální teplota nutná k nasednutí primerů na templát. Dalšími parametry jsou například procentuální zastoupení GC bazí, délka primeru v bazích nebo molekulová hmotnost primeru.

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

Enter Oligonucleotide Sequence Below
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

Nucleotide base codes

CAA ATA GAA GTA TAT CAC ATA TGT ATC TCC CAC CCA AG

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

CTT GGG TGG GAG ATA CAT ATG TGA TAT ACT TCT ATT TG

5' modification (if any) 3' modification (if any) Select molecule

 ssDNA ▼

nM Primer Measured Absorbance at 260 nanometers

mM Salt (Na⁺)

Physical Constants		Melting Temperature (T _M) Calculations		
Length:	<input type="text" value="38"/>	Molecular Weight:	<input type="text" value="11582.6<sup>4</sup>"/>	
		GC content:	<input type="text" value="37%"/>	
1 ml of a sol'n with an Absorbance of	<input type="text" value="1"/> at 260 nm	1	<input type="text" value="62.3"/> °C (Basic)	
is	<input type="text" value="2.369"/> microMolar ⁵ and contains	<input type="text" value="27.4"/> micrograms.	2	<input type="text" value="72.5"/> °C (Salt Adjusted)
			3	<input type="text" value="62.09"/> °C (Nearest Neighbor)

Obr. 29 Ukázka výstupu z programu OligoCalc

Vhodnou teplotu tání (T_m) primerů pro Pfu mutagenezi lze vypočítat také podle následujícího vzorce, kde %GC = procentuální zastoupení GC bazí; N = délka primeru v bazích; a %mismatch = procentuální zastoupení zaváděné mutace:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - (675/N) - \% \text{ mismatch}$$

Dvou řetězcový plasmid pmiR-GLO se zaligovanou 3'UTR oblastí GPx7 použijeme jako templát pro PCR reakci s mutovanými primery a provedeme tak Pfu mutagenezi. Po proběhlé reakci je nutné odstranění mateřských řetězců, které provedeme štěpením pomocí restrikčního enzymu *DpnI*.

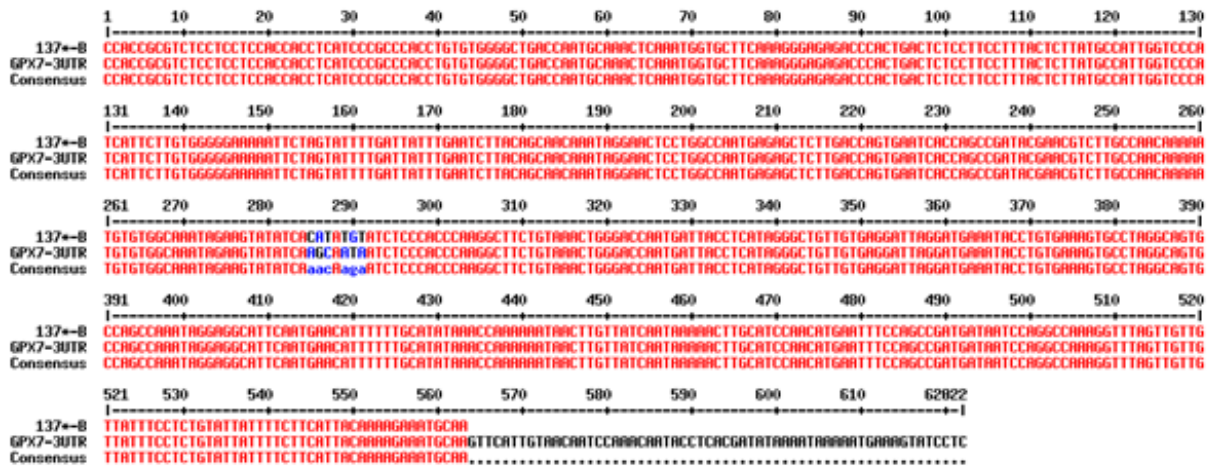
Většina kmenů *E.Coli* obsahuje DNA methylázy. U námi použitého kmenu *E.Coli* přenáší DAM methyláza, přítomná v těchto buňkách, methylovou skupinu z S-adenosylmethioninu na pozici N6 adeninu. Původní řetězce plasmidů izolovaných z *E.Coli* tedy obsahují methylované adeniny, kdežto u nově amplifikovaných řetězců k methylaci nedošlo. Této skutečnosti využíváme při štěpení za použití *DpnI*, jelikož tento restrikční enzym štěpí pouze tehdy, je-li jeho rozpoznávací místo methylováno. Tím dojde k degradaci pouze původního nemutovaného plasmidu.

Následně provedeme transformaci namnožených řetězců do kompetentních buněk *E.Coli* a směs přeneseme na předem připravené Petriho misky obsahující agar s ampicilinem. Buňky *E.Coli*, které insert přijmou, jsou samy schopné opravit jedno řetězcový zlom a uzavřít tak řetězce za opětovného vzniku kruhových plasmidů. Při amplifikaci totiž nedochází k nasyntetizování celé kruhové DNA.

Díky ampicilinu by na plotnách měly vyrůst pouze kolonie obsahující plasmid, ostatní buňky díky přítomnosti antibiotika odumírají. Plotny necháme inkubovat v inkubátoru s požadovanou teplotou dnem vzhůru do druhého dne. Druhý den jsme u třech vyrostlých kolonií provedli kontrolní PCR a amplifikované produkty nechali štěpit restrikčním enzymem *NdeI*. Tento enzym specificky rozpozná a štěpí DNA v místě vnesené mutace.

Produkty štěpení následně zkontrolujeme elektroforetickou separací, kdy podle délky fragmentů posoudíme, zda došlo ke štěpení *NdeI* a zároveň i k cílenému zanesení mutace. Jelikož je vazebné místo pro miR-137, a tedy i mutované místo, přibližně

v polovině délky 3'UTR, objeví se po proběhlém štěpení a separaci fragmenty poloviční délky. Po izolaci plasmidů jsme nakonec všechny tři poslali na sekvenaci. Sekvenování bylo úspěšné u plasmidu pmiR-GLO-GPX7*137B. Tuto sekvenci jsme porovnali se sekvencí GPX7-3'UTR. Jak vidíme na následujícím obrázku, mutageneze proběhla úspěšně. Mutovaná sekvence je značena modře.



Obr. 30 Srovnání sekvence plasmidu B obsahujícího požadovanou mutaci (vyznačenou modře) s GPx7-3'UTR

Plasmid pmiR-GLO-GPX7 a mutovaný pmiR-GLO-GPX7*137-B jsme pro pozdější využití namnožili metodou midi prep a změřili jejich koncentraci a čistotu.

5.4.2. Mutace vazebné sekvence pro miR-29

TAACCACCGCGTCTCCTCCTCCACCACCTC

ATCCCGCCACCTGTGTGGGGCTGACCAATGCAAACCTCAAATGGTGC TCAAAGGAGAGACCCACTGAC
TCTCCTTCTTTACTCTTATGCCATTGGTCCCATTCTTGTGGGGGAAAAATCTAGTATTTTGATTA
TTTGAATCTTACAGCAACAAATAGGAACTCCTGGCCAATGAGAGCTCTTGACCAGTGAATCACCAGCCGA
TACGAACGTCTTGCCAACAAAAATGTGTGGCAATAGAAGTATATCAAGCAATAATCTCCCACCCAAGGC
TTCTGTAACCTGGGACCAATGATTACCTCATAGGCTGTTGTGAGGATTAGGATGAAATACCTGTGAAAG
TGCTTAGGCAGTGCCAGCCAAATAGGAGGCATTCAATGAACATTTTTGCATATAAAACCAAAAAATAACT
TGTTATCAATAAAAACTTGCATCCAACATGAATTTCCAGCCGATGATAATCCAGGCCAAAGGTTTAGTTG
TTGTTATTTCTCTGTATTATTTTCTTATTACAAAAGAAATGCAAGTTTATTGTAACAATCCAACAAT
ACCTCACGATATAAAATAAAAAATGAAAGTATCCTCCTC

Obr. 31 Sekvence 3'UTR oblasti GPx7 se zeleně značeným vazebným místem pro miR-29, u kterého je plánovaná mutageneze

Nejdříve je opět nutné navrhnout příslušné primery obsahující změněnou sekvenci nukleotidů ve vazebném místě pro miR-29 (stejně jako v předchozím textu).

Sekvence primeru obsahujícího vazebnou sekvenci pro miR-29 (zeleně):

CAATGCAAACCTCAAA**TCGGTGC**TCAAAGGGAGAGAC

Změna sekvence vazebného místa (žlutě):

CAATGCAAACCTCAAA**catatg**TCAAAGGGAGAGAC

V programu OligoCalc opět vytvoříme sekvenci druhého primeru a zaznamenáme si teplotu tání primerů - $T_m = 62,2^\circ\text{C}$.

Sekvence obou primerů (*Nde*I štěpné místo je zapsáno kurzívou):

mutGPX7-29_F: CAA TGC AAA CTC AAA TCA *TAT* GTC AAA GGG AGA GAC

mutGPX7-29_R: GTC TCT CCC TTT GAC *ATA TGA* TTT GAG TTT GCA TTG

Stejně jako v případě předchozí mutace vazebného místa pro miR-135 provedeme PCR reakci s nově navrženými primery. Poté provedeme štěpení původních plasmidů enzymem *Dpn*I a zbylé neštěpené fragmenty transformujeme do kompetentních buněk *E.Coli*. Dále buňky rovněž přeneseme na plotny s ampicilinem a necháme kultivovat dnem vzhůru v inkubátoru do druhého dne.

Druhý den vybereme ze spousty narostlých kolonií celkem 8, kdy z každé pomocí sterilní špičky pipety odebereme část kolonie a přeneseme do mikro zkumavky s 10 μ l vody. Kontrolu provedeme pomocí colony PCR za použití primerů GPX7-3U F/R a následnou elektroforézou amplifikovaných fragmentů. Jako pozitivní kontrolu použijeme mutovaný plasmid pmiR-GLO-GPX7*135.

Po elektroforéze vidíme, že u všech 4 vzorků ke štěpení došlo, měla by proto být přítomna mutovaná sekvence vazebného místa pro miR-29. Provedeme izolaci plasmidů, změříme jejich koncentraci a na sekvenování posíláme všechny 4 vzorky. Po porovnání sekvencí plasmidů jsme jako reprezentativní zvolili plasmid 1. Na následujícím obrázku vidíme srovnání mutovaného GPx7-29b* a nemutované 3'UTR oblasti GPx7. Mutovaná sekvence je znázorněna černě.



Obr. 34 Porovnání sekvence mutované GPX7-29b* a GPX7-3'UTR s černě vyznačenou mutovanou sekvencí v první čtvrtině 3'UTR oblasti GPX7

Tento vybraný plasmid GPx7-29b* jsme namnožili a přečistili metodou midi prep. Tím získáme velké množství plasmidu, který bude sloužit k dalším experimentům, konkrétně pro luciferázovou esej.

6. ZÁVĚR

Cíl této práce byl splněn. Příprava rekombinantního plasmidu pmiR-GLO se zabudovanou 3'UTR oblastí GPx7 proběhla úspěšně a takto připravený plasmid bude možné využít pro luciferázovou esej.

Z dostupných buněčných linií kolorektálního karcinomu HT29, Caco-2, SW480 a SW620 byla na základě zajímavých výsledků a závislosti vybrána buněčná linie Caco-2. Z této buněčné linie byla izolována RNA, převedena reverzní transkripcí na cDNA a metodou PCR byl získán a namnožen požadovaný fragment. Při PCR byly použity primery, které nasedají na DNA specificky v místech, které ohraničují část fragmentu obsahující 3'UTR oblast GPx7. Tento fragment, obsahující 3'UTR sekvenci a část CDS sekvence se povedlo zaligovat do plasmidu ZeroBlunt a namnožit v buňkách *E. Coli*.

Po prvním úspěšném klonování jsme opět metodou PCR za použití specifických primerů získali samotnou 3' UTR oblast. Specifické primery nejen že umožnily získání 3'UTR oblasti, ale zároveň pomocí nich byla do fragmentu vnesena štěpná místa identická se štěpnými místy v plasmidu pmiR-GLO. Štěpením fragmentu a plasmidu pomocí restričních endonukleáz se v těchto místech vytvořily navzájem komplementární jedno řetězcové přesahy. Vznik těchto lepivých konců zajistí úspěšnou ligaci pro správné klonování.

Jako poslední krok experimentu byla provedena mutagenese vazebného místa pro miRNA (konkrétně miR-137 a miR-29) na 3'UTR oblasti GPx7. Mutagenese vazebného místa se využívá při dalších experimentech, souvisejících právě s luciferázovou aktivitou. Díky tomu můžeme zjišťovat, zda příslušná miRNA opravdu ovlivňuje expresi GPx7 vazbou na tuto sekvenci. V této práci jsme však zatím připravili potřebné podklady pro tyto další experimenty.

7. SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
AGO	proteiny Argonautové rodiny
Amp	ampicilin
Arg	arginin
Asn	asparagin
BCL2	B-cell lymphoma 2
bp	base pair
B2M	beta-2-mikroglobulin
C	cytosin
cDNA	complementary DNA
CDS	coding sequence (kódující sekvence)
CD4	cluster of differentiation 4
CEA	karcinoembryonální antigen
COX	cyklooxygenáza
Ct	cycle treshold
Cys	cystein
DAM	DNA-adenine-methylation
ddH ₂ O	redestilovaná voda
DEPC	diethylpyrokarbonát
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
DNáza	deoxyribonukleáza
dNTPs	deoxyribonucleotide triphosphates
DTT	1,4 - dithiothreitol
<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraacetát
EGF	epidermal grow factor
ER	endoplasmatické retikulum
Ero1	ER oxidoreduxin 1
EXPO5	exportin 5
f	forward
FAD	flavinadeninukleotid

G	guanin
Gln	glutamin
GPx	glutathion peroxidázy
GSH	glutathion
GSS	glutathion syntetáza
GSSG	glutathion disulfid
HF	High-Fidelity
His	histidin
HIV	human immunodeficiency virus
HMGA2	high mobility group AT-hook 2
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
IgA	imunoglobulin A
LB	Luria Bertani
LOX	lioxygenáza
Lys	lysin
miRNA	mikroRNA
mRNA	mediátorová RNA
NaOH	hydroxid sodný
NCBI	národní centrum pro biotechnologické informace
NPHGPx	non-selenocystein fosfolipidová glutathion peroxidáza
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PDCD4	programmed cell death 4
PDI	protein-disulfid isomerase
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PHGPx	fosfolipidová glutathion peroxidáza
<i>Phu</i>	<i>Phusion</i>
Pro	prolin
PTEN	phosphatase and tensin homolog
qPCR	kvantitativní PCR
r	reverse
rc	reverse complement
RISC	RNA-induced-silencing complex
RNA	ribonukleotidová kyselina

RNáza	ribonukleáza
RT	reverzní transkripce/reverzní transkriptáza
SBP1	selen-vázající protein 1
Sec	selenocystein
Ser	serin
siRNA	small interfering RNA
snGPx	sperm-nucleus glutathion peroxidáza
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression (speciální médium)
T	thymin
TAE	tris-Acetate-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-Borate-EDTA
Tm	teplota tání (melting temperature)
Trp	tryptophan
Trx	thioredoxin
UTR	untranslated region (nepřekládaná oblast)
XRN2	exoribonukleáza 2

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. R. C. Fink, J. G. Scandalios (2002). Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Arch Biochem Biophys* 399, 19–36.
2. L. Flohé, S. Toppo, G. Cozza, F. Ursini (2011). A comparison of thiol peroxidase mechanism. *Antioxid. Redox Signaling* 15, 763-780.
3. M. Deponce (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3217-3266.
4. G. C. Mills (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229, 189–197.
5. O. Epp, R. Ladenstein, A. Wendel (1983). The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution, *Eur. J. Biochem.* 133, 51-69.
6. S. C. Tosatto, V. Bosello, F. Foolari, P. Mauri, A. Roveri, S. Toppo, L. Flohe, F. Ursini, M. Maiorino (2008). The catalytic site of glutathione peroxidases, *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1515-1526.
7. F. Ursini, M. Maiorino, R. Brigelius-Flohé, K. D. Aumann, A. Roveri, D. Schomburg, L. Flohé (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* 252, 38-53.
8. G. Takebe, J. Yarimizu, Y. Saito, T. Hayashi, H. Nakamura, J. Yodoi, S. Nagasawa, K. Takahashi (2002). A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* 277, 41254-41258.
9. L. Flohé, S. Toppo, G. Cozza, F. Ursini (2011). A comparison of thiol peroxidase mechanisms; *Antioxid. Redox Signal.* 15, 763-780.

10. R. Quintana-Cabrera, S. Fernandez-Fernandez, V. Bobo-Jimenez, J. Escobar, J. Sastre, A. Almeida, J. P. Bolanos (2012). Gamma-glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase – 1 cofactor. *Nat. Commun.* 3, 718.
11. K. M. Brown, K. Pickard, F. Nicol, G. J. Beckett, G. G. Duthie, J. R. Arthur (2000). Effects of organic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes. *Clin Sci* 98, 593–599.
12. J. P. McClung, C. A. Roneker, W. Mu, D. J. Lisk, P. Langlais, F. Liu, X. G. Lei (2004). Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8852-8857.
13. D. E. Handy, E. Lubos, Y. Yang, J. D. Galbraith, N. Kelly, Y. Y. Zhang, J. A. Leopold, J. Loscalzo (2009). Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. *J. Biol. Chem.* 284, 11913-11921.
14. J. Liu, M. M. Hinkhouse, W. Sun, C. J. Weydert, J. M. Ritchie, L. W. Oberley, J. J. Cullen (2004). Redox regulation of pancreatic cancer cell growth: role of glutathione peroxidase in the suppression of the malignant phenotype. *Hum. Gene Ther.* 15, 239-250.
15. L. Flohé, R. Brigelius-Flohé (2006). Selenoproteins of the glutathione system, in: D. L. Hatfield (Ed.), *Selenium. Its Molecular biology and Role in Human Health*, 2nd edition, Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 161-172.
16. C. Huang, C. Ding, C. Gu, J. Zhou, M. Kuang, Y. Ji, Y. He, T. Kondo, J. Fan (2012). Decreased selenium-binding protein 1 enhances glutathione peroxidase 1 activity and downregulates HIF-1 alpha to promote hepatocellular carcinoma invasiveness. *Clin. Cancer Res.* 18, 3042-3053.
17. W. Fan, M. L. Goldberg, N. M. Pohl, X. Bi, C. Tong, B. Xiong, T. J. Koh, A. M. Diamond, W. Yang (2010). Functional and physical interaction between the

- selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein. *Carcinogenesis* 31, 1360-1366.
18. R. Brigelius-Flohé, L. Flohé (2011). Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors, *Antioxid. Redox Signal.* 15, 2335–2381.
 19. H. J. Forman, M. Maiorino, F. Ursini (2010). Signaling functions of reactive oxygen species, *Biochemistry* 49, 835–842.
 20. K. Wingler, M. Bocher, L. Flohé, H. Kollmus, R. Brigelius-Flohé (1999). mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur. J. Biochem.* 259, 149-157.
 21. S. Florian, K. Wingler, K. Schmehl, G. Jacobasch, Ol J. Kreuzer, W. Meyerhof, R. Brigelius-Flohé (2001). Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radic. Res.* 35, 655-663.
 22. I. J. Baek, J. M. Yon, S. R. Lee, M. R. Kim, J. T. Hong, B. J. Lee, Y. W. Yun, S. Y. Nam (2011). Differential expression of gastrointestinal glutathione peroxidase (GI-GPx) gene during mouse organogenesis. *Anat. Histol. Embryol.* 40, 210-218.
 23. M. Mörk, M. Scheurlen, O. Al-Taie, A. Zierer, M. Kraus, K. Schottker, F. Jakob, J. Köhrle (2003). Glutathione peroxidase isoforms as part of the local antioxidative defense system in normal and Barrett's esophagus, *Int. J. Cancer* 105, 300-304.
 24. A. Banning, S. Florian, S. Deubel, S. Thalmann, K. Müller-Schmehl, G. Jacobasch, R. Brigelius-Flohé (2008). GPx2 counteracts PGE(2) production by dampening COX-2 and mPGES-1 expression in human colon cancer cells, *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1491-1500.
 25. R. Brigelius-Flohé, A. Kipp (2009). Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1555-1568.

26. J. C. Whitin, S. Bhamre, D. M. Tham, H. J. Cohen (2002). Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283, 20-28.
27. L. Schombur, J. Köhrle (2008). On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 1235-1246.
28. G. Takebe, J. Yarimizu, Y. Saito, T. Hayashi, H. Nakamura, J. Yodoi, S. Nagasawa, K. Takahashi (2002). A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein. *P. J. Biol. Chem.* 277, 41254-41258.
29. F. Ursini, M. Maiorino, M. Valente, L. Ferri, C. Gregolin (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta* 710, 197-211.
30. J. P. Thomas, P. G. Geiger, M. Maiorino, F. Ursini, A. W. Girotti (1990). Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1045, 252-260.
31. R. Brigelius-Flohe, K. D. Aumann, H. Blocker, G. Gross, M. Kiess, K. D. Kloppel, M. Maiorino, A. Roveri, R. Schuckelt, F. Usani, et al. (1994). Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 269, 7342-7348.
32. N. Rigaudiere, N. B. Ghyselinck, J. Faure, J. P. Dufaure (1992). Regulation of the epididymal glutathione peroxidase-like protein in the mouse: dependence upon androgens and testicular factors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 89, 67-77.
33. J. Seligman, G. L. Newton, R. C. Fahey, R. Shalgi, N. S. Kosower (2005). Nonprotein thiols and disulfides in rat epididymal spermatozoa and epididymal fluid: role of gamma-glutamyl-transpeptidase in sperm maturation. *J. Androl.* 26, 629-637.
34. N. Okamura, Y. Iwaki, S. Hiramoto, M. Tamba, S. Bannai, Y. Sugita, P. Syntin, F. Dacheux, J. L. Dacheux (1997). Molecular cloning and characterization of the

epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. *Biochim. Biophys. Acta* 1336, 99-109.

35. C. Thisse, A. Degraeve, G. V. Kryukov, V. N. Gladyshev, S. Obrecht-Pflumio, A. Krol, B. Thisse, A. Lescure (2003). Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. *Gene Expr Patterns* 3, 525–532.
36. C. Thisse, A. Degraeve, G. V. Kryukov, V. N. Gladyshev, S. Obrecht-Pflumio, A. Krol, B. Thisse, A. Lescure (2003). Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. *Gene Expr Patterns* 3, 551-558.
37. J. P. Thomas, M. Maiorino, F. Ursini, A. W. Girotti (1990). Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione-peroxidase against membrane-damaging lipid-peroxidation – in situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J Biol Chem* 265, 454–461.
38. F. Ursini, M. Maiorino, C. Gregolin (1985). The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathioneperoxidase. *BBA* 839, 62–70.
39. P. C. Wei, W. T. Lo, M. I. Su, J. Y. Shew, W. H. Lee (2011). Non-targeting siRNA induces NPGPx expression to cooperate with exoribonuclease XRN2 for releasing the stress, *Nucleic Acids Res.* 40, 323–332.
40. J. Riemer, N. Bulleid, J. M. Herrmann (2009). Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process, *Science* 324, 1284–1287.
41. M. P. Perron, P. Provost (2008). Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Front. Biosci.* 13, 2537–2547.
42. B. R. Cullen (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol. Cell.* 16, 861–865.
43. A. Utomo, X. Jiang, S. Furuta, J. Yun, D. S. Levin, Y. C. Wang, K. V. Desai, J. E. Green, P. L. Chen, W. H. Lee (2004). Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from

- polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells, *J. Biol. Chem.* 279, 43522–43529.
44. A. Utomo, X. Jiang, S. Furuta, J. Yun, D. S. Levin, Y.-C. J. Wang, K. V. Desai, J. E. Green, P. L. Chen, W. H. Lee (2004). Identification of a novel putative nonselenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *J. Biol.Chem.* 279, 43522–43529.
45. D. Peng, T. Hu, M. Soutto, et al. (2014). Glutathione peroxidase 7 has potential tumour suppressor functions that are silenced by location-specific methylation in oesophageal adenocarcinoma. *Gut* 63, 540–551.
46. D. Peng, A. Belkhiri, T. Hu, et al. (2012). Glutathione peroxidase 7 protects against oxidative DNA damage in oesophageal cells. *Gut* 61, 1250–1260.
47. D. F. Peng, M. Razvi, H. Chen, K. Washington, A. Roessner, R. Schneider-Stock, W. El-Rifai (2009). DNA hypermethylation regulates the expression of members of the Mu-class glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in Barrett's adenocarcinoma, *Gut* 58, 5–15.
48. D. Peng, A. Belkhiri, T. Hu, R. Chaturvedi, M. Asim, K. T. Wilson, A. Zaika, W. El-Rifai (2011). Glutathione peroxidase 7 protects against oxidative DNA damage in oesophageal cells, *Gut*.
49. L. L. Kodach, R. J. Jacobs, P. W. Voorneveld, et al. (2011). Statins augment the chemosensitivity of colorectal cancer cells inducing epigenetic reprogramming and reducing colorectal cancer cell 'stemness' via the bone morphogenetic protein pathway. *Gut* 60, 1544–1553.
50. L. L. Kodach, R. J. Jacobs, J. Heijmans, et al. (2010). The role of EZH2 and DNA methylation in the silencing of the tumour suppressor RUNX3 in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 31, 1567–1575.
51. S. Toppo, L. Flohé, F. Ursini, S. Vanin, M. Maiorino (2009). Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1486–1500.

52. V. D. Nguyen, M. J. Saaranen, A. R. Karala, A. K. Lappi, L. Wang, I. B. Raykhel, H. I. Alanen, K. E. Salo, C. C. Wang, L. W. Ruddock (2010). Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. *J. Mol. Biol.* 406, 503-515.
53. Y. Yamada, G. V. Limmon, D. Zheng, N. Li, L. Li, L. Yin, V. T. Chow, J. Chen, B. P. Engelward (2012). Major shifts in the spatio-temporal distribution of lung antioxidant enzymes during influenza pneumonia. *PLoS One.* 7, 31494.
54. M. P. Perron, P. Provost (2008). Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Front. Biosci.* 13, 2537–2547.
55. B. R. Cullen (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol. Cell.* 16, 861–865.
56. V. Ambros (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature.* 431, 350–355.
57. J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, S. Diederichs (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* Mar;11(3), 228-34.
58. J. Hertel, P. F. Stadler (2006). Hairpins in a Haystack: Recognizing microRNA precursors in comparative genomics data. *Bioinformatics.* 22, 197-202.
59. M. Yousef, M. Nebozhyn, H. Shatkay et al. (2006). Combining multi-species genomic data for microRNA identification using a Naive Bayes classifier. *Bioinformatics.* 22, 1325-1334.
60. P. Jiang, H. Wu, W. Wang et al. (2007). MiPred: Classification of real and pseudo microRNA precursors using random forest prediction model with combined features. *Nucleic Acids Res* 35, W339-W344.
61. J. Liu, M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J. J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor, G. J. Hannon (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 305, 1437–1441.
62. M. A. Valencia-Sanchez, J. Liu, G. J. Hannon, R. Parker (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 20, 515–524.

63. P. A. Maroney, Y. Yu, T. W. Nilsen (2006). MicroRNAs mRNAs and Translation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 531–535.
64. J. Liu, F. V. Rivas, J. Wohlschlegel, J. R. Yates 3rd, R. Parker, G. J. Hannon (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat. Cell Biol.* 7, 1261–1266.
65. M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, J. Meyer, A. Borkhardt, T. Tuschl (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA.* 9, 175–179.
66. A. Rodriguez, S. Griffiths-Jones, J. L. Ashurst, A. Bradley (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 14, 1902–1910.
67. S. Y. Ying, C. P. Chang, S. L. Lin (2010). Intron-mediated RNA interference intronic microRNAs and applications. *Methods Mol. Biol.* 629, 205–237.
68. H. K. Saini, S. Griffiths-Jones, A. J. Enright (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 17719–17724.
69. B. R. Cullen (2004). Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res.* 102, 3–9.
70. Y. Lee, M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, V. N. Kim (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060.
71. P. Cramer (2004). Structure and function of RNA polymerase II. *Adv. Protein Chem.* 67, 1–42.
72. S. J. Goodfellow, R. J. White (2007). Regulation of RNA polymerase III transcription during mammalian cell growth. *Cell Cycle.* 6, 2323–2326.
73. Z. A. Felton-Edkins, N. S. Kenneth, T. R. Brown, N. L. Daly, N. Gomez-Roman, C. Grandori, R. N. Eisenman, R. J. White (2003). Direct regulation of RNA polymerase III transcription by RB p53 and c-Myc. *Cell Cycle.* 2, 181–184.

74. C. D. Davis, S. A. Ross (2008). Evidence for dietary regulation of microRNA expression in cancer cells. *Nutr. Rev.* 66, 477–482.
75. C. M. Croce (2008). Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med.* 358, 502–511.
76. J. B. Konopka, S. M. Watanabe, J. W. Singer, S. J. Collins, O. N. Witte (1985). Cell lines and clinical isolates derived from Ph1-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 1810–1814.
77. W. Wu, M. Sun, G. M. Zou, J. Chen (2007). MicroRNA and cancer: Current status and prospective. *Int. J. Cancer.* 120, 953–960.
78. A. Esquela-Kerscher, F. J. Slack (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 6, 259–269.
79. S. Volinia, G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris, C. M. Croce (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 2257–2261.
80. A. Krek, D. Grun, M. N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E. J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K. C. Gunsalus, M. Stoffel, N. Rajewsky (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 37, 495–500.
81. J. Lu, G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz, T. R. Golub (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 435, 834–838.
82. M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, T. Tuschl (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12, 735–739.
83. F. Meng, R. Henson, H. Wehbe-Janek, K. Ghoshal, S. T. Jacob, T. Patel (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology.* 133, 647–658.

84. I. A. Asangani, S. A. Rasheed, D. A. Nikolova, J. H. Leupold, N. H. Colburn, S. Post, H. Allgayer (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 27, 2128–2136.
85. Z. Lu, M. Liu, V. Stribinskis, C. M. Klinge, K. S. Ramos, N. H. Colburn, Y. Li (2008). MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*. 27, 4373–4379.
86. S. Zhu, M. L. Si, H. Wu, Y. Y. Mo (2007). MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1) *J. Biol. Chem.* 282(19), 14328–36.
87. J. L. Bos (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682–4689.
88. S. M. Johnson, H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K. L. Reinert, D. Brown, F. J. Slack (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 120, 635–647.
89. R. Reeves (2001). Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene*. 277, 63–81.
90. G. P. Flake, J. Andersen, D. Dixon (2003). Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ. Health Perspect.* 111, 1037–1054.
91. V. K. Sarhadi, H. Wikman, K. Salmenkivi, E. Kuosma, T. Sioris, J. Salo, A. Karjalainen, S. Knuutila, S. Anttila (2006). Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *J. Pathol.* 209, 206–212.
92. A. Cimmino, G. A. Calin, M. Fabbri, M. V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S. E. Wojcik, R. I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, C. M. Croce (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 13944–13949.
93. G. A. Calin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, C. M. Croce (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes

- miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 15524–15529.
94. S. Cory, J. M. Adams (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer.* 2, 647–656.
95. J. A. Chan, A. M. Krichevsky, K. S. Kosik (2005). MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 65, 6029–6033.
96. R. Garzon, M. Fabbri, A. Cimmino, G. A. Calin, C. M. Croce (2006). MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol. Med.* 12, 580–587.
97. C. Jay, J. Nemunaitis, P. Chen, P. Fulgham, A. W. Tong (2007). miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer. *DNA Cell Biol.* 26, 293–300.
98. E. Hernando (2007). microRNAs and cancer: role in tumorigenesis, patient classification and therapy. *Clin. Transl. Oncol.* 9, 155–160.
99. E. Barbarotto, T. D. Schmittgen, G. A. Calin (2008). MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int. J. Cancer.* 122, 969–977.
100. HT-29 [online]. Poslední revize 2/21/2014 [cit. 12/7/2016]. Dostupné na: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx#characteristics>
101. Caco-2 [online]. Poslední revize 3/27/2014 [cit. 12/7/2016]. Dostupné na: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-37.aspx#characteristics>
102. NATIONAL CANCER INSTITUT [cit. 12/7/2016]. Dostupné na: <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=520509>
103. SW-480 [online]. [cit. 12/7/2016]. Dostupné na: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-228.aspx#characteristics>
104. SW-620 [online]. [cit. 12/7/2016]. Dostupné na: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-227.aspx#characteristics>