

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2019

Bc. Ondřej Jahoda

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Příprava a charakterizace buněčného modelu
Diamondovy-Blackfanovy anémie**

Diplomová práce

Bc. Ondřej Jahoda

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedoucí práce: Mgr. Katarína Kapraľová, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně za použití uvedených literárních zdrojů pod vedením Mgr. Kataríny Kapraľové, Ph.D.

V Olomouci dne 3. 5. 2019

Souhrn

Předložená diplomová práce je zaměřena na přípravu buněčného modelu Diamondovy-Blackfanovy anémie pomocí technologie CRISPR/Cas9 a jeho následnou charakterizaci. V teoretické části je popsán proces erythropoézy s zdůrazněním na rozvoj anémie při jeho narušení. Dále je v této části stručně charakterizována Diamondova-Blackfanova anémie. Cílem experimentální části práce bylo vytvořit cílené delece v genu *RPS19* v myší erytroleukemické buněčné linii (MEL) pomocí CRISPR/Cas9 technologie a následně u připravených mutovaných linií otestovat vliv jednotlivých mutací na buněčnou proliferaci a hladinu exprese mutovaného genu. Získané výsledky ukázaly všeobecné snížení proliferačního potenciálu u všech připravených testovaných mutantních linií. Exprese mutovaného genu na úrovni transkripce do mRNA byla snížena u dvou ze tří testovaných mutantních klonů. Připravené buněčné linie vykazovaly znaky přítomné u DBA pacientů a po další charakterizaci mohou být využity ke studiu DBA patofyziologie.

Summary

The presented diploma thesis is focused on production of cellular model of Diamond-Blackfan anemia using CRISPR/Cas9 technology and its subsequent characterization. The first part is theoretical background and describes the process of erythropoiesis, the development of anemia by disruption of erythropoiesis and a brief characterization of Diamond–Blackfan anemia. The aim of the experimental part was to generate targeted deletions of the *RPS19* gene in murine erythroleukemia cell line (MEL) using CRISPR/Cas9 technology and subsequently to test the effect of these mutations on the cell proliferation and expression level of the mutated gene. The results showed a decreased cell proliferation potential in all tested mutant cell lines. The expression of mutated gene at the mRNA transcription level was reduced in two of the three tested mutant clones. Prepared mutated cell lines showed the features presented in DBA patients and after further characterization could be used for studying the DBA pathophysiology.

Rád bych poděkoval své vedoucí Mgr. Kataríně Kapraľové, Ph.D. za její vstřícnost, ochotu a cenné rady, které mi poskytla při zpracování teoretické i experimentální části mé diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat celému kolektivu Ústavu biologie LF UPOL za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíle práce	2
3 Literární přehled	3
3.1 Erytropoéza	3
3.1.1 Transkripční faktory erytropoézy.....	4
3.1.1.1 Transkripční faktor GATA1	5
3.1.2 Růstové faktory erytropoézy	6
3.1.2.1 Erytropoetin.....	7
3.1.2.2 Erytropoetinový receptor.....	8
3.2 Anémie	10
3.2.1 Narušení erytropoézy jako příčina anémie.....	10
3.2.1.1 Vrozené aplastické anémie	12
3.3 Diamondova-Blackfanova anémie	13
3.3.1 Etiologie a dědičnost	13
3.3.2 Diagnostická kritéria DBA.....	14
3.3.3 Léčba DBA.....	15
3.3.4 Patofyziologie DBA	15
3.3.4.1 Úloha hematopoetického transkripčního faktoru GATA1 při DBA	16
3.3.4.2 Ribozomopatie – příklady dalších onemocnění	16
4 Materiál a metodika	18
4.1 Biologický materiál	18
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	18
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	21
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	23
4.4.1 Editace cílové sekvence exonu 4 genu <i>RPS19</i>	23
4.4.2 Práce s bakteriemi	24
4.4.2.1 Kultivace transformovaných bakterií	24
4.4.2.2 Izolace plazmidové DNA	25
4.4.3 Práce s izolovanými plazmidy.....	25
4.4.3.1 Sekvenování části sekvence kódující sgrRNA a sekvence rozeznávané sgrRNA	25
4.4.3.2 Štěpení plazmidů XPR a ART a analýza vzniklých restričních fragmentů ...	26

4.4.4 Práce se savčí buněčnou linií	28
4.4.4.1 Kultivace buněk.....	28
4.4.4.2 Pasážování buněk	28
4.4.4.3 Mražení buněk.....	28
4.4.5 Příprava buněčného modelu	29
4.4.5.1 Transfekce a sortování transfekovaných buněk	29
4.4.5.2 Selektce jednotlivých buněčných klonů	31
4.4.5.3 Izolace genomové DNA z jednotlivých klonů	31
4.4.5.4 Genotypizace jednotlivých klonů.....	31
4.4.6 Charakterizace pozitivních klonů.....	33
4.4.6.1 Rozmrazení buněk pozitivních klonů a příprava na jejich charakterizaci.....	33
4.4.6.2 Test buněčné proliferace	33
4.4.6.3 Studium genové exprese metodou real-time PCR.....	33
4.4.6.3.1 Extrakce RNA	33
4.4.6.3.2 Syntéza komplementární DNA	34
4.4.6.3.3 Real-time PCR zájmových genů <i>RPS19</i> a <i>RPL5</i>	35
4.4.7 Zpracování a vyhodnocení dat	36
5 Výsledky	37
5.1 Příprava a ověření plazmidů.....	37
5.2 Transfekce a analýza transfekovaných buněk průtokovou cytometrií	38
5.3 Sortování transfekovaných buněk a selektce jednotlivých buněčných klonů	40
5.4 Genotypizace MEL klonů	40
5.5 Charakterizace připravených mutantních buněčných linií	41
5.5.1 Vliv mutace na buněčnou proliferaci	42
5.5.2 Vliv mutace na expresi mutovaného genu	43
6 Diskuze	45
7 Závěr.....	48
8 Literatura.....	49

Seznam symbolů a zkratk

BFU-E (burst forming unit-erythroid)

CFU-E (colony forming unit-erythroid)

CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9)

DBA – Diamondova-Blackfanova anémie

DEPC voda – voda ošetřena dietylpyrokarbonátem

DMEM (Dublecco's modified Eagle's médium)

DMSO – dimetylsulfoxid

EPO – erytropoetin

EPOR – erytropoetinový receptor

FBS – fetální telecí sérum

GFP – zelený fluorescenční protein

HIF1 – hypoxií indukovaný faktor 1

HSC – hematopoetická kmenová buňka

JAK2 - Janusova kináza 2

LB médium – Luria-Bertani médium

MEL – myší erytrolekemická buněčná linie

MTT – 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid

PBS – fosfátový pufr

RFP – červený fluorescenční protein

RPL5 – gen pro ribozomální protein L5

RPS19 – gen pro ribozomální protein S19

SCF – faktor kmenových buněk

SDS – dodecylsírán sodný

sgRNA (single guide RNA) – malá vodící RNA

wt (*wild-type*) – standardní (kontrolní) genotyp

Seznam obrázků

Obrázek 1: Erytroidní vývojová řada.	4
Obrázek 2: Faktory působící v procesu erytropoézy.	6
Obrázek 3: Zjednodušené schéma tří nejvíce prostudovaných signálních drah aktivovaných interakcí EPO/EPOR.	9
Obrázek 4: Schéma plazmidového vektoru XPR.	23
Obrázek 5: Schéma plazmidového vektoru ART.	24
Obrázek 6: Specifický sekvenční motiv v plazmidu XPR a ART.	37
Obrázek 7: Elektroforetická analýza kontrolního restričního štěpení plazmidů XPR a ART pomocí 1% agarózové elektroforézy.	38
Obrázek 8: Stanovení účinnosti transfekce a funkčnosti CRISPR/Cas9 systému.	39
Obrázek 9: Sortování transfekovaných buněk.	40
Obrázek 10: Elektroforetická analýza PCR produktů získaných amplifikací části genu <i>RPS19</i> vybraných testovaných klonů pomocí 3% agarózové elektroforézy.	41
Obrázek 11: Elektroforetická analýza PCR produktů získaných amplifikací části genu <i>RPL5</i> vybraných testovaných klonů pomocí 3% agarózové elektroforézy.	41
Obrázek 12: Dynamika nárůstu buněk mutantních linií 10, 42, 84 a buněk standardního <i>wt</i> genotypu.	42
Obrázek 13: Dynamika nárůstu buněk mutantní linie 23 a buněk standardního <i>wt</i> genotypu.	43
Obrázek 14: Relativní exprese genu <i>RPS19</i> u testovaných mutantních buněčných linií 10, 42 a 84.	44
Obrázek 15: Relativní exprese genu <i>RPL5</i> u testované mutantní buněčné linie 23.	44

Seznam tabulek

Tabulka 1: Klasifikace vrozených anémií	11
Tabulka 2: Přehled genů s publikovanými mutacemi asociovanými s DBA.	14
Tabulka 3: Sekvence primerů pro sekvenaci příslušných míst plasmidů XPR a ART	26
Tabulka 4: Rozpis reakční směsi pro sekvenační reakci	26
Tabulka 5: Teplotní podmínky a časový profil sekvenační reakce	26
Tabulka 6: Rozpis reakčních směsí pro štěpení plasmidů jednotlivými restrikčními endonukleázami	27
Tabulka 7: Rozpis reakčních směsí pro transfekci MEL buněk plazmidy XPR a ART	30
Tabulka 8: Rozpis reakčních směsí pro transfekci MEL buněk plazmidem ART	30
Tabulka 9: Sekvence forward (F) a reverse (R) primeru pro amplifikaci cílové sekvence genu <i>RPS19</i>	32
Tabulka 10: Složení PCR reakční směsi	32
Tabulka 11: Teplotní podmínky a časový profil PCR	32
Tabulka 12: Složení reakční směsi pro syntézu cDNA	34
Tabulka 13: Teplotní podmínky a časový profil syntézy cDNA	34
Tabulka 14: Složení jedné real-time PCR reakce	35
Tabulka 15: Teplotní podmínky a časový profil real-time PCR	35
Tabulka 16: Signifikance změn proliferace testovaných mutantních linií proti <i>wt</i>	43

1 Úvod

Erytropoéza je klíčový pro život nezbytný proces, který zajišťuje produkci erytrocytů. Selhání erytropoézy má za následek vznik anémie, což je chorobný stav, který se vyznačuje poklesem hodnot hemoglobinu v krvi pod normální fyziologickou hodnotu. Vzhledem k složitému systému regulace erytropoézy, vedou defekty na různých úrovních tohoto procesu k vrozeným nebo získaným hematologickým onemocněním. Jedním z takových geneticky podmíněných anemických onemocnění je Diamondova-Blackfanova anémie. Diamondova-Blackfanova anémie vzniká v důsledku patologických mutací v genech, jež ve většině případů kódují ribozomální proteiny. Následkem těchto mutací dochází k narušení procesu proteosyntézy. Toto onemocnění se vyznačuje poklesem množství erytroidních prekurzorových buněk a v konečném důsledku rozvojem různě silné anémie.

Buněčné modely představují cenný nástroj pro studium molekulární patofyziologie řady chorob. V praxi se využívají především imortalizované buněčné linie, u kterých je možnost jejich dlouhodobé kultivace *in vitro*, nebo pluripotentní kmenové buňky. Poznatky získané na buněčných modelech mohou přispět k pochopení molekulární podstaty těchto onemocnění a také k navržení nových terapeutických postupů při jejich léčbě.

Objev místně specifických nukleáz (nukleázy zinkového prstu, TALEN a nejaktuálnější CRISPR/Cas9 systém) znamenal velký pokrok v oblasti genového inženýrství. Tyto nukleázy jsou schopny přerušit vlákno definované sekvence DNA v jádře živé buňky. V dnešní době se díky pokrokům v možnosti cílené editace genomu pomocí těchto nukleáz nabízí možnost cílené mutagenese za účelem přípravy modelů genetických onemocnění.

2 Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na téma diplomové práce.
- Příprava buněčného modelu Diamondovy-Blackfanovy anémie cílenou mutagenezí genu *RPS19* metodou CRISPR/Cas9.
- Testování a charakterizace připraveného buněčného modelu.
- Zvládnutí použitých metod: kultivace buněčných linií, transfekce savčích buněčných linií, izolace plazmidové DNA, editace genomu systémem CRISPR/Cas9, PCR, real-time PCR, sekvenování, testy proliferace připravených buněčných linií.

3 Literární přehled

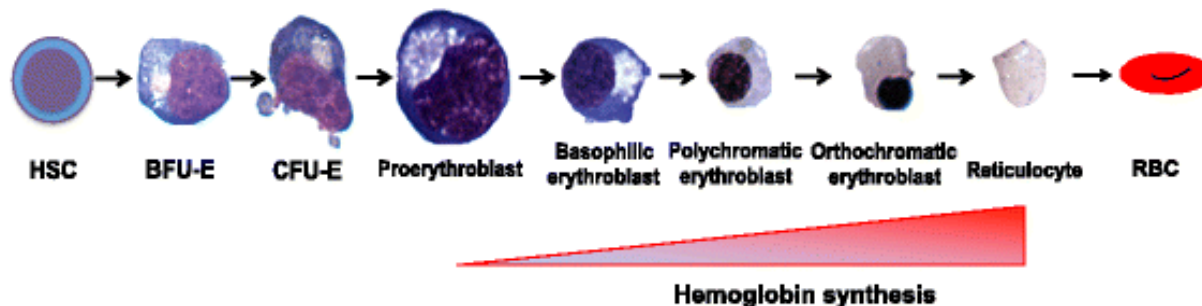
3.1 Erytropoéza

Erytropoéza je proces vzniku červených krvinek (erytrocytů) z **hematopoetických kmenových buněk** (HSC) v kostní dřeni. Její hlavní úlohou je produkovat a udržovat optimální množství erytrocytů, které díky obsahu hemoglobinu přenášejí v těle kyslík. Vznik erytrocytů je poměrně složitý přísně regulovaný proces, který probíhá od HSC přes několik vývojových buněčných stadií erytroidní řady. K rozpoznání různých stadií erytropoézy mohou být použity různé markery buněčného povrchu nebo hladiny exprese klíčových erytroidních transkripčních faktorů. Pro erytropoetickou diferenciaci je typická změna povrchového markeru CD34, který je charakteristický pro HSC na povrchový marker CD71, jež se exprimuje v pozdějších stádiích erytroidního vývoje (Lodish *et al.*, 2010).

Erytropoéza je první diferenciací řadou hematopoézy. Dochází k ní již v průběhu embryonálního vývoje. První primitivní erytrocyty vznikají ve **žloutkovém vaku** a k jejich cirkulaci dochází již kolem 21. dne vývoje lidského embrya. Tyto erytrocyty obsahují embryonální hemoglobin a mají zachované buněčné jádro (Tavian *et Péault*, 2005). Po 30 dnech těhotenství přebírají tvorbu erytrocytů **fetální játra**, která jsou obsazena hematopoetickými kmenovými buňkami, jež do fetálních jater migrují z aorto-gonádo-mezonefrosu (Nishikawa *et al.*, 2001). Na začátku třetího trimestru dochází k migraci HSC do **kostní dřene**, což vede k ústupu krvetvorby ve fetálních játrech. Po porodu se kostní dřev stává jediným a definitivním místem erytropoézy.

HSC jsou **pluripotentní**, což znamená, že v konečném důsledku mohou díky své diferenciací schopnosti dát vznik všem krevním buněčným liniím. V případě vývoje erytrocytů se HSC nejdříve diferencuje v **multipotentní společný myeloidní progenitor** (CMP). CMP mají schopnost multipotence, avšak proti HSC již mají sníženou schopnost proliferace za účelem sebeobnovy. CMP se mohou dále diferencovat do **GMP** (progenitor vedoucí k vzniku granulocytů a makrofágů) či v **MEP** (progenitor vedoucí k vzniku megakaryocytů a erytrocytů) (Akashi *et al.*, 2000). Při erytropoéze se MEP diferencuje v **erytroidní progenitor BFU-E** (burst forming unit-erythroid). BFU-E je unipotentní nejranější progenitor, který již nemůže diferencovat v jiné krevní buňky než erytrocyty. Růst a vývoj BFU-E je závislý na řadě růstových faktorů jako např. faktoru kmenových buněk (SCF) a interleukinu 3 (IL-3). Z BFU-E se vyvíjí **pozdní erytroidní progenitor CFU-E** (colony forming unit-erythroid), jehož růst, sebeobnova a vývoj v erytroidní prekurzory je závislý

především na erythropoetinu (EPO). CFU-E dále diferencuje v tzv. **erytroidní prekurzory**. V rámci jednotlivých vývojových stádií erytroidních prekurzorů je možné pozorovat trend postupné akumulace hemoglobinu, zmenšování buněčné velikosti, zvyšující se kondenzace jádra a snižování celkové RNA (Obr. č. 1). Prvním morfologicky identifikovatelným erytroidním prekurzorem je **proerythroblast**. Jde o prekurzor oválného tvaru, jehož jádro může představovat až 80% jeho povrchu. Dále následuje **bazofilní normoblast**, jehož jádro rovněž vyplňuje většinu buňky, ale v porovnání s proerythroblastem dochází k zmenšení buňky. Dalším vývojovým stádiem erytroidní řady je **polychromatofilní normoblast**. U polychromatofilního normoblastu dochází v porovnání s předchozím prekurzorem k redukci velikosti jádra, ztrátě jadérek a cytoplasma ztrácí vlivem kumulace hemoglobinu bazofilii, což vede k jejímu narůžovělému zbarvení. Posledním jaderným vývojovým stádiem erytroidní řady je **ortochromní normoblast**. V tomto stádiu dochází k piknóze jádra a jeho přípravě na vypuzení. Po enukleaci ortochromního normoblastu vzniká **retikulocyt**, který se uvolňuje do krevního oběhu. V oběhu dochází k procesu zrání retikulocytů, které trvá 24 až 48 hodin a poté, co se retikulocyt zbaví zbylých nadbytečných organel (mitochondrie, endoplasmatické retikulum, Golgiho komplex), vzniká **zralý erytrocyt** (Ney *et al.*, 2011).



Obrázek 1: Erytroidní vývojová řada.

Během vývoje dochází u erytroidních prekurzorů ke kondenzaci buněčného jádra, a nakonec i k jeho úplnému vypuzení. (převzato a upraveno dle Zivot *et al.*, 2018)

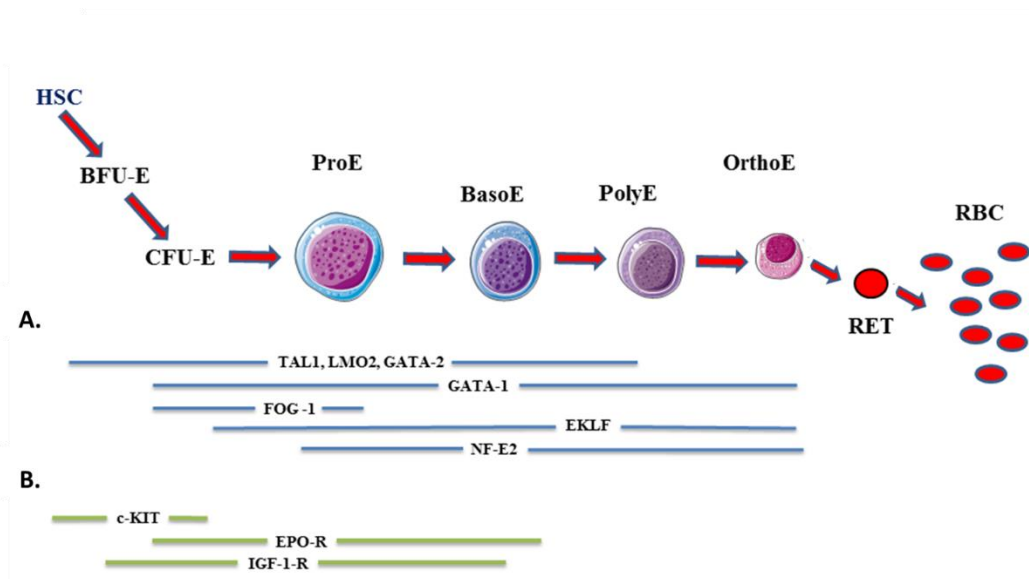
3.1.1 Transkripční faktory erytropoézy

Samotný proces erytropoézy je přísně regulován pomocí množství cytokinů a regulačních proteinů, které fungují jako transkripční nebo růstové faktory. Transkripční faktory důležité pro erytroidní diferenciaci ovlivňují expresi genů, které jsou nutné pro vývoj hematopoetické kmenové buňky do erytroidní linie a zabraňují jejímu vývoji do alternativních linií hematopoézy. Další transkripční faktory mají důležitou roli při samotné erytroidní diferenciaci a maturaci. Význam jednotlivých transkripčních faktorů byl objasněn především

díky analýzám myších „knock-out“ modelů, kdy nulová mutace v některém z transkripčních faktorů vedla k embryonální letalitě v důsledku narušení erythropoézy nebo i celé hematopoézy. K nejvýznamnějším transkripčním faktorům, jež se podílí na procesu erythropoézy, patří GATA1, GATA2, SCL/TAL-1 (stem cell leukemia/T-cell acute lymphoblastic leukemia), EKLF (erythroid Krüppel-like factor), FOG-1 (friend of GATA1), NF-E2 (nuclear factor erythroid-2) (Doré *et* Crispino, 2011) (Obr. č. 2).

3.1.1.1 Transkripční faktor GATA1

Proteiny z rodiny GATA konkrétně GATA1 a GATA2 jsou esenciální pro aktivaci exprese genů, jež vedou k erytroidní diferenciaci. Transkripční faktor GATA2 je exprimován v časných erytroidních progenitorech, avšak ve fázi CFU-E dochází k jeho nahrazení faktorem GATA1 (Bresnick *et al.*, 2010) (Obr. č. 2). Bylo zjištěno, že v embryonálních kmenových buňkách dochází v důsledku ztráty funkce genu kódujícího GATA1 k zastavení erytroidní diferenciace ve stádiu proerytroblastu (Pevny *et al.*, 1995) a v případě takto postižených myší dochází k úmrtí embrya 11. den v důsledku těžké anemie (Fujiwara *et al.*, 1996). Transkripční faktor GATA1 obsahuje dvě domény zinkových prstů (Martin *et* Orkin, 1990). Cílovou DNA sekvencí pro GATA1 je motiv 5'(A/T)GATA(A/G) 3' (Merika *et* Orkin, 1993). Tato nukleotidová sekvence se typicky nachází v regulačních oblastech erytroidně-specifických genů, což činí z GATA1 klíčový faktor erytroidní diferenciace. K takovým genům patří např. gen pro erythropoetinový receptor (EPOR), geny zodpovědné za biosyntézu globinů (Ferreira *et al.*, 2005) nebo geny kódující enzymy potřebné k syntéze hemu. Samotná aktivita GATA1 je regulována řadou faktorů, ke kterým patří také acetylace. Bylo publikováno, že acetylace GATA1 usnadňuje jeho interakci s cílovými DNA sekvencemi (Lamonica *et al.*, 2006), avšak tato acetylace vede také k degradaci GATA1 ubiquitin-proteasomovým systémem (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2006). Schopnost GATA1 aktivovat transkripci genů erytroidní diferenciace je rovněž ovlivněna kooperací s různými kofaktory jako např. s kotranskripčním faktorem FOG-1, či multiproteinovým komplexem zahrnujícím SCL, E2A, LMO2, LDB1 (Cantor *et* Orkin, 2002).



Obrázek 2: Faktory působící v procesu erytropoézy.

- A. Expresse transkripčních faktorů v průběhu erytropoézy
 B. Expresse receptorů pro růstové faktory v průběhu erytropoézy
 (převzato a upraveno dle Sposi, 2015)

3.1.2 Růstové faktory erytropoézy

Růstové faktory (cytokiny a hormony) hrají rozhodující roli v pozitivní regulaci erytropoézy. Působí na erytroidní progenitory a prekurzory ve všech stádiích zrání. Po interakci s příslušnými receptory vyvolávají v buňce signál, který skrz transkripční faktory vede k realizaci exprese genů, jež jsou nutné pro expanzi a vývoj erytroidní linie, a tím pádem i pro samotný vznik erytrocytů. Význam růstových faktorů na proces erytropoézy nepřímo potvrzuje i nutnost využití těchto faktorů při přípravě erytrocytů z hematopoetických kmenových buněk *ex vivo* (Giarratana *et al.*, 2005).

Většina cytokinů je produkována buňkami stromatu kostní dřeně nebo imunitními buňkami. Produkce hormonu EPO je zajištěna mimo kostní dřeň, a to v ledvinách. Jak již bylo výše řečeno, erytroidní progenitory reagují na růstové faktory SCF, IL3, IGF1 (insulin like growth factor 1) a EPO (Obr. č. 2). Analýza mutantních myší s nulovou mutací v genu pro EPO, SCF, či jejich receptory ukázala, že tyto signální dráhy jsou pro proces erytropoézy esenciální (Wu *et al.*, 1995; Broudy, 1997). V hierarchii buněčných populací, vedoucích k produkci erytrocytů, je přežívání a proliferace méně specializovaných typů buněk závislá na **SCF**, který je společným růstovým faktorem celé řady hematopoetických progenitorů. Percepce SCF je zprostředkována tyrosinkinázovým receptorem c-KIT. Výsledkem interakce SCF s c-KIT

receptorem je spuštění několika signálních kaskád, v jejichž důsledku dochází k aktivaci řady antiapoptických genů a genů podporujících proliferaci. Současně tato signalizace oddaluje diferenciaci, a tím umožňuje obnovení časných progenitorů (Muta *et al.*, 1995). Bylo rovněž zjištěno, že SCF signalizace působí synergicky s EPO signalizací, což je pravděpodobně zapříčiněno schopností SCF signalizace vyvolat fosforylaci EPOR, a tím pádem jej nepřímo aktivovat (Wu *et al.*, 1997). Po přechodu do stadia CFU-E a dalších specializovanějších typů buněk erytroidní řady pak přebírá roli ústředního růstového faktoru stimulujícího erytropoézu EPO.

3.1.2.1 Erythropoetin

Erythropoetin představuje hlavní hormonální regulátor tvorby červených krvinek. Jde o glykoprotein kódovaný genem na 7. chromozomu, který je během embryonálního vývoje syntetizován převážně v játrech a postnatálně je exprimován v peritubulárních buňkách kortexu ledvin. EPO mRNA kóduje protein dlouhý 193 aminokyselin, avšak po odštěpení signálního peptidu, který má roli v zařazení EPO do sekretorické dráhy, je konečný hormon tvořen řetězcem 165 aminokyselin. Hmotnost rekombinantního lidského erythropoetinu byla stanovena na 30,4 kDa (Davis *et al.*, 1987). Erythropoetin je posttranslačně modifikován glykosylací na asparaginu v polohách 24, 38 a 83 (N-glykosylace) a serinu v pozici 126 (O-glykosylace) (Dordal *et al.*, 1985). Cukernatá složka, tvoří přibližně 40 % hmotnosti molekuly hormonu a stupeň glykosylace významně ovlivňuje jeho stabilitu a aktivitu (Egrie *et Browne*, 2001). Sekundární struktura hormonu je tvořena 4 α -helixy a 2 β -listy a dále se v polypeptidovém řetězci nachází 2 disulfidové můstky mezi cysteiny Cys⁷-Cys¹⁶¹ a Cys²⁹-Cys³³. Hlavním místem působení EPO jsou buňky progenitorů CFU-E, ale hormon působí i na další buněčná stadia erytroidní vývojové řady. EPO signalizace vede u CFU-E ke kaskádě reakcí, jejímž výsledkem je zvýšená proliferace, diferenciaci, a především potlačení apoptózy (Wu *et al.*, 1995). Antiapopticky působí EPO nejen na erytroidní progenitory, ale např. i na nervové buňky (Sirén *et al.*, 2001).

Produkce EPO je pod kontrolou sofistikovaného regulačního systému schopného detekovat množství kyslíku v krvi, tzv. **hypoxickou signální drahou**. Hlavní roli v regulaci syntézy EPO hraje hypoxií indukovaný transkripční faktor 1 (HIF1) (Semenza, 2001). Tento transkripční faktor zahrnuje dvě podjednotky HIF1 α a HIF1 β . Podjednotka HIF1 α se nachází v cytosolu buněk produkujících EPO a její stabilita je závislá na parciálním tlaku kyslíku (pO₂) v buňce, zatímco podjednotka HIF1 β je lokalizovaná v jádře. V případě **hypoxie** dochází

k hromadění HIF1 α v cytoplazmě, což následně vede k jejímu pronikání do buněčného jádra. V jádře dochází k asociaci obou podjednotek za vzniku funkčního dimeru HIF1 α/β , který se spolu s kofaktorem p300 váže do **HRE** responzivních oblastí HIF cílových genů, čímž aktivuje jejich transkripci. Mezi takto ovládané geny patří gen pro EPO, ale i další geny zapojené do procesu erythropoézy, proliferace buněk nebo angiogeneze. V případě **normoxie** dochází k hydroxylaci HIF1 α za katalytického působení enzymu prolyl-hydroxylázy (PHD) (Ivan *et al.*, 2002). Hydroxylovaná podjednotka HIF1 α je pak rozeznávána a následně degradována ubiquitin-proteazomovým systémem (Huang *et al.*, 1998).

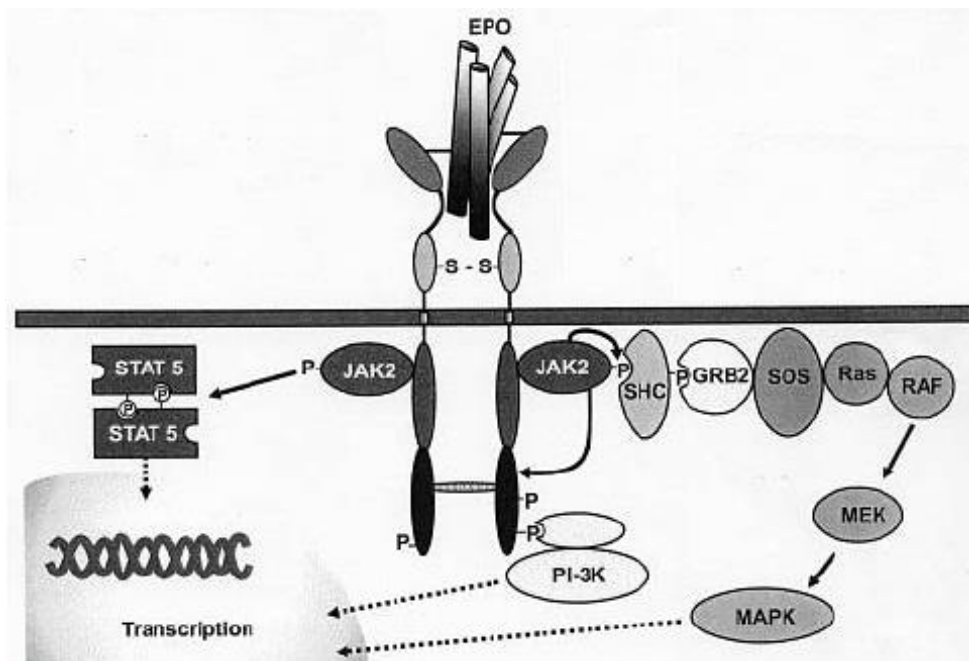
3.1.2.2 Erythropoetinový receptor

K zachycení EPO signálu exponují na svém povrchu hematopoetické progenitory i prekurzory erytroidní řady tzv. **erythropoetinový receptor**. Největší expresi vykazuje EPOR mezi stadii CFU-E a proerytroblastem. Naopak nejmenší počet EPOR je exprimován ve stádiu BFU-E, které vykazuje poměrně slabou odpověď na EPO. S narůstající diferenciací erytroidních prekurzorů se množství EPOR na buňku postupně snižuje. Retikulocyty i zralé erytrocyty již EPOR postrádají. Kromě exprese na hematopoetických buňkách je EPOR exprimován také v některých dalších tkáních např. ve svalové, kardiovaskulární či nervové tkáni.

EPOR je homodimer složený ze dvou glykoproteinových řetězců (Livnah *et al.*, 1999). Obsahuje extracelulární doménu uzpůsobenou pro vazbu EPO, transmembránovou doménu a intracelulární doménu, která je spojena s tyrosinkinázovým systémem. Po navázání erythropoetinu na extracelulární doménu dojde v receptoru ke konformační změně, jejímž výsledkem je aktivace **Janusovy kinázy 2** (JAK2), která je asociovaná s intracelulární doménou EPOR. JAK2 slouží k převodu signálu z EPOR a iniciaci jeho transdukce (Witthuhn *et al.*, 1993). JAK2 fosforyluje tyrozinové zbytky intracelulární domény EPOR, což umožní asociaci EPOR s dalšími proteiny jako např. s transkripčním faktorem STAT5, adaptorovým proteinem SHC (a komplexem proteinů dráhy Ras/MAPK), či enzymem fosfatidyl-inositol-3-kinázou (PI-3K). Interakce fosforylovaného EPOR a aktivované JAK2 s těmito proteiny má za následek iniciaci tří nejvýznamnějších EPO/EPOR signálních kaskád (Obr. č. 3), které kontrolují přežívání, proliferaci a diferenciaci erytroidních buněk.

K negativní regulaci EPO/EPOR signalizace dochází téměř okamžitě po její aktivaci v důsledku degradace signálních molekul aktivovaných pomocí EPOR. Po aktivaci JAK2 dochází také k ubikvitinaci intracelulární části receptoru, což vede k jeho degradaci v proteazomu.

Extracelulární část komplexu hormon-receptor je následně internalizována do buňky, kde podléhá lysozomální degradaci (Walrafen *et al.*, 2005).



Obrázek 3: Zjednodušené schéma tří nejvíce prostudovaných signálních drah aktivovaných interakcí EPO/EPOR.

1. **JAK2/STAT5 signální dráha.** Po nasazení proteinu STAT5 na fosforylovaný EPOR dochází k jeho fosforylaci, což vede k dimerizaci STAT5 a translokaci dimeru do jádra, kde působí jako transkripční faktor antiapoptotických a proliferačních genů.
2. **PI3K/Akt signální dráha.** Fosforylovaný receptor aktivuje lipidovou PI3-kinázu, která fosforyluje PIP2 na PIP3, jež aktivuje kinázu Akt. Aktivovaná Akt kináza přenáší signál až k příslušným transkripčním faktorům.
3. **Ras-MAPK signální dráha.** Adaptorový proteinový komplex SHC/GRB2, který je fosforylován kinázou JAK2, váže protein SOS. Ten následně aktivuje GTP-vázající protein Ras, což vede k aktivaci kaskády proteinových kináz Raf (MAPKKK), MEK (MAPKK) a ERK (MAPK). Poslední kináza v kaskádě pak fosforylaci působí na jaderné transkripční faktory. (převzato a upraveno dle Jelkmann, 2004)

3.2 Anémie

Anémie (chudokrevnost) patří mezi nejčastější hematologickou poruchu na světě. Jde o chorobný stav vyznačující se poklesem hodnot hemoglobinu a hematokritu v krvi pod mezní fyziologickou hranici. Snížený počet erytrocytů pro diagnózu anémie nemusí být vždy dostačující, neboť některé typy anémií mají jejich počet normální. U mužů je normální fyziologická hodnota hemoglobinu 136 až 176 g na litr krve, u žen tato hodnota činí 120 až 168 g na litr krve (Češka *et al.*, 2010). Příčiny poklesu hemoglobinu mohou být velmi různorodé. Pro klasifikaci anémií existuje několik klasifikačních systémů. V minulosti byla užívána Wintrobeho morfologická klasifikace dle velikosti erytrocytů, která rozděluje anémie na **mikrocytární, normocytární a makrocytární**. V současnosti se při řazení do systému zohledňují spíše etiologicko-patogenetická hlediska, podle kterých je anémie možné rozdělit do dvou velkých skupin. První skupina zahrnuje **anémie z nedostatečné, či porušené tvorby erytrocytů**. Druhou skupinu tvoří **anémie vznikající v důsledku zvýšeného zániku erytrocytů** (hemolytické anémie). K anemickému stavu může rovněž dojít i **v důsledku krevních ztrát** (Fábryová *et al.*, 2017).

3.2.1 Narušení erythropoézy jako příčina anémie

Na poruše tvorby erytrocytů může participovat poškození, či snížení počtu krvetvorných kmenových buněk, nebo poruchy proliferace, maturace a hemoglobinizace erytroidních prekurzorů. Postižení krvetvorných kmenových buněk vede ke vzniku aplastické anémie, která se projevuje pancytopenií (snížením počtu všech typů krevních buněk) v periferní krvi. V případě, že se narušení týká pouze erytroidní linie, hovoříme o izolované aplazii červené krevní řady. Poruchy erythropoézy mohou být vrozené, ale i získané během života.

Získané poruchy erythropoézy vznikají v důsledku nedostatku mikronutrientů nutných pro maturaci a proliferaci erytrocytů (např. železo, kyselina listová, vitamín B12) nebo v důsledku poškození HSC, či erytroidních progenitorů vlivem autoimunitního procesu nebo působením různých vnějších chemických, fyzikálních a biologických faktorů (např. vlivem ionizující záření, působením léků a chemikálií, vlivem virové infekce). Narušení tvorby erytrocytů může rovněž doprovázet různé chronické zánětlivé choroby jako např. nádorová onemocnění, chronické záněty, či chronické infekce (Češka *et al.*, 2010).

Vrozené poruchy erythropoézy představují značně heterogenní skupinu onemocnění. Příčinou jsou mutace v genech, jež kódují proteiny nutné pro proliferaci, diferenciaci nebo

maturaci erytrocytů, a které se podílejí na mnoha různorodých funkcích např. na reparaci poškozené DNA, biogenezi ribozomů, udržování telomer, regulaci buněčného cyklu, hemoglobinizaci erytroidních prekurzorů, vstřebávání či metabolismu železa a mnoha dalších. Změny genetické informace jsou přenášeny na další generace a mohou být děděny v heterozygotním nebo homozygotním stavu, případně může být dědičnost vázána na pohlaví. Vrozené poruchy erythropoézy jsou poměrně vzácná onemocnění, avšak mohou mít velmi závažný průběh a vliv na postiženého jedince. Přehled vrozených poruch erythropoézy poskytuje tabulka 1.

Tabulka 1: Klasifikace vrozených anémií

Vrozené poruchy erythropoézy
I. Způsobené sníženou produkcí červených krvinek
<p style="text-align: center;">A. <u>Anémie z důvodu poruchy v hematopoetické kmenové buňce</u></p> <p>1 Fanconiho anémie 2 Dyskeratosis congenita 3 Shwachman-Diamondův syndrom</p>
<p style="text-align: center;">B. <u>Anemie z důvodu poruchy v erytroidním progenitoru</u></p> <p>1 Diamond-Blackfanova anémie 2 Kongenitální dyserythropoetické syndromy</p>
<p style="text-align: center;">C. <u>Anemie z důvodu funkční nedostatečnosti erytroidních a jiných prekurzorů z nutričních a jiných příčin</u></p> <p>1 Megaloblastové anémie 2 Vrozené poruchy purinového a pyrimidinového metabolismu 3 Vrozené poruchy metabolismu železa - vrozená atransferinémie - hypochromní anémie způsobena mutací v DMT1 4 Vrozená sideroblastická anémie 5 Talasémie</p>
II. Způsobené zvýšenou destrukcí červených krvinek
<p>A. <u>Hemoglobinopatie</u> B. <u>Membránové defekty červených krvinek</u> C. <u>Enzymové defekty červených krvinek</u> D. <u>Porfyrie</u></p>

(převzato a upraveno dle Prchal, 2016)

3.2.1.1 Vrozené aplastické anémie

Vrozené aplastické anémie jsou vzácná život ohrožující onemocnění, která jsou zapříčiněna selháním krvetvorby v kostní dřeni. Pro aplastické anémie je typický pokles buněčnosti kostní dřene pod 30 % bez přítomnosti fibrózy. Onemocnění se většinou manifestují v průběhu dětství a postižení jedinci vykazují často různé fyzické anomálie. Všechna tato onemocnění jsou navíc spojena se zvýšeným výskytem myeloidních malignit i solidních nádorů (Dokal *et Vulliamy*, 2010).

Nejčastější vrozenou aplastickou anémií je **Fanconiho anémie (FA)**. Jde o vzácné geneticky i klinicky heterogenní onemocnění charakterizované fyzickými abnormalitami (přítomné u 70 % nemocných), selháním kostní dřene a zvýšeným rizikem k maligní transformaci. Příčinou onemocnění jsou mutace v řadě genů, jejichž produkty se podílejí na opravách DNA. V současné době je identifikováno a blíže zkoumáno 21 FA kauzálních genů. Dědičnost je většinou autozomálně recesivní, ale existuje i gonozomální dědičnost vázaná na chromozom X. Fyzické abnormality zahrnují malý vzrůst, abnormální pigmentaci kůže, malformace horních i dolních končetin a mikrocefalii. Selhání kostní dřene s pancytopenií se typicky projevuje v první dekádě života (Mamrak *et al.*, 2016).

Příkladem vzácné aplastické anémie je i tzv. čistá aplazie červené krevní řady, kdy v kostní dřeni dochází pouze k útlumu erythropoézy, přičemž granulopoéza i trombopoéza jsou zachovány bez známek dysplazie. Tato vrozená forma aplastické anémie je známa jako tzv. **Diamodova-Blackfanova anémie**.

3.3 Diamondova-Blackfanova anémie

Diamondova-Blackfanova anémie (DBA) patří mezi **syndromy selhaní kostní dřene**. Jde o vrozenou normochromní makrocytární anémii způsobenou aplazií nebo hypoplazií červené krevní řady bez postižení ostatních hemotopoetických buněčných linií. U 40 % pacientů s DBA se kromě anémie navíc objevují i různé přídatné vrozené anomálie v kraniofaciální oblasti, malformace horních končetin a palce, zpomalený růst, či vrozené srdeční vady (Pospíšilová *et* Čmejla, 2013). Byla rovněž zjištěna asociace onemocnění se zvýšeným rizikem akutní myeloidní leukémie, či osteogenního sarkomu (Lipton *et al.*, 2001; Vlachos *et al.*, 2012). Incidence onemocnění je 5 až 10 případů na milión živě narozených dětí (Vlachos *et al.*, 2008). Více než 90 % pacientů je diagnostikovaných před 1. rokem života.

3.3.1 Etiologie a dědičnost

Ačkoliv byla nemoc známa již od 40. let minulého století, teprve na přelomu tisíciletí byla popsána souvislost mezi onemocněním DBA a mutací v genu **RPS19** (Draptchinskaia *et al.*, 1999). Gen **RPS19** kóduje ribozomální protein S19. Po tomto průlomovém objevu následovala identifikace mutací dalších genů pro ribozomální proteiny, které byly u jejich nositelů spojeny s klinickými projevy DBA. Mutantní alela pro některý z genů kódujících ribozomální protein byla identifikována přibližně u poloviny postižených DBA. Následně bylo navrženo, že toto onemocnění vzniká v důsledku **haploinsuficience** ribozomálních proteinů v hematopoetických kmenových buňkách a řadí se tak mezi skupinu onemocnění nazývanou **ribozomopatie**. DBA je ve většině případů děděna dle autozomálně dominantního vzoru dědičnosti, což krom studia rodokmenů potvrzuje i fakt, že objevené mutantní alely jsou v heterozygotní konstituci s alelou standardní. Homozygotní mutace jsou patrně neslučitelné se životem. Vztahy mezi konkrétními mutacemi ribozomálních proteinů a fenotypovými projevy DBA zůstávají neobjasněné. Nebyla dosud nalezena žádná korelace mezi identitou genu podmiňujícího DBA a hematologickou závažností nemoci. Dokonce i v rámci jedné rodiny se DBA fenotyp může mezi jednotlivými postiženými rodinnými příslušníky značně odlišovat. Jediná doposud objevená korelace byla zjištěna u kraniofaciálních abnormalit, jež jsou asociovány s mutacemi v genech **RPL5** a **RPL11** (Gazda *et al.*, 2008).

Poměrně zajímavým objevem na poli poznatků o etiologii DBA bylo nalezení nové kauzální mutace v genu pro hematopoetický transkripční faktor **GATA1** (Sankaran *et al.*,

2012). Tento objev ukázal, že porucha erythropoézy spojená s DBA může vzniknout i z jiných příčin než z důvodu mutace genu pro ribozomální protein. Dalším identifikovaným kauzálním genem, který nekóduje ribozomální protein a jehož mutace byla objevena u pacienta postiženého DBA, je gen *TSR2* (Gripp *et al.*, 2014). Tento gen kóduje ribozomální maturační faktor a stejně jako ribozomální proteiny má vliv na biogenezi ribozomů. DBA související s mutací v genu pro GATA1 nebo TSR2 jsou jediné dva známé případy DBA, kdy je dědičnost vázaná na chromozom X.

Navzdory velkým pokrokům v identifikaci nových mutací zapříčiňujících DBA nebyla u více než 40 % pacientů s touto chorobou doposud nalezena žádná kauzální mutace. Přehled genů, jejichž mutované alely byly identifikovány ve spojení s DBA, shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2: Přehled genů s publikovanými mutacemi asociovanými s DBA.

Gen	Výskyt
<i>RPL5</i>	6,6 %
<i>RPL11</i>	4,8 %
<i>RPL35A</i>	3 %
<i>RPS10</i>	2,6 %
<i>RPS17</i>	1 %
<i>RPS19</i>	25 %
<i>RPS24</i>	2 %
<i>RPS26</i>	6,4 %
<i>GATA1, RPL15, RPL18, RPL26, RPL27, RPL31, RPL35, RPS7, RPS15A, RPS27, RPS28, RPS29, TSR2</i>	ojedinelý

(převzato a upraveno dle Clinton *et Gazda*, GeneReviews® [Internet])

3.3.2 Diagnostická kritéria DBA

Jak již bylo výše zmíněno, většina pacientů je diagnostikována před 1. rokem života. Prvními klinickými příznaky DBA jsou bledost a dušnost kojenců. U některých jsou pak patrné fyzické anomálie. Dalšími diagnostickými kritérii DBA je normochromní makrocytární anémie, snížený počet retikulocytů, snížený počet erytroidních prekurzorů v kostní dřeni a

negativní test na detekci chromozomálních zlomů (pro vyloučení Fanconioho anémie). Dalšími podpůrnými kritérii jsou zvýšená hladina fetálního hemoglobinu a zvýšená hladina enzymu adenosindeaminázy v erytrocytech. Diagnóza DBA může být podpořena i nálezem mutace v některém z kauzálních genů (Lipton *et* Ellis, 2009).

3.3.3 Léčba DBA

Pacienti, u nichž byla diagnostikována DBA, se léčí **transfúzí** erytrocytů. Po 1. roce života se nasazuje léčba **kortikosteroidy**. Přibližně 70 % pacientů na léčbu reaguje zvýšením koncentrace hemoglobinu, které je obvykle pozorováno po dvou až čtyřech týdnech od zahájení léčby. Při pravidelných transfúzích je zároveň potřeba zahájit léčbu **chelátory železa**, aby nedošlo v jejich důsledku k rozvinutí sekundární hemochromatózy. U pacientů závislých na transfúzích se rovněž může přistoupit k alogenní transplantaci kmenových buněk (Lipton *et* Ellis, 2009).

3.3.4 Patofyziologie DBA

V patofyziologii DBA dochází v důsledku aplazie erythropoézy ke zpomalení proliferace erytroidních prekurzorů a jejich apoptóze. To vede ke snížení počtu erytroidních prekurzorů v kostní dřeni pod 5 %. Bylo prokázáno, že k narušení erythropoézy při DBA dochází především **ve stádiu BFU-E a CFU-E progenitorů**, zatímco v terminální fázi erythropoézy nemá již tato deficiencie na vývoj erytrocytů vliv (Miyake *et al.*, 2008).

Molekulární podstata patofyziologie DBA není ještě zcela pochopena. Přesto mnoho publikovaných studií naznačuje, že poškození erythropoézy může být zapříčiněno ribozomálním stresem, který vede k aktivaci hlavního **nádorového supresoru p53**, a tím pádem i k zastavení buněčného cyklu a apoptóze. Podle klasického modelu dochází k **ribozomálnímu stresu** v důsledku nerovnováhy při biogenezi ribozomů, přičemž tato nerovnováha je zapříčiněna právě mutacemi v genech ribozomálních proteinů (Ellis *et* Gleizes, 2011). Ribozomální stres aktivuje dráhu p53 prostřednictvím ribozomálních proteinů L5, L11, L23, či S7, jež se v důsledku stresu uvolňují do jádra, kde interagují s MDM2, a tím blokují jeho enzymatickou aktivitu (Deisenroth *et* Zhang, 2010). **MDM2** je ubikvitin E3 ligáza, jejíž úlohou je snižování hladiny p53 v buňce. Aktivace dráhy p53 v důsledku mutace nebo snížení exprese některého ribozomálního proteinů byla potvrzena na mnoha různých buněčných i zvířecích modelech (McGowan *et al.*, 2008; Danilova *et al.*, 2008; Dutt *et al.*, 2010).

3.3.4.1 Úloha hematopoetického transkripčního faktoru GATA1 při DBA

Identifikace mutace hematopoetického transkripčního faktoru GATA1 jako kauzálního genu pro DBA naznačila, že porucha erythropoézy spojená s DBA může vzniknout i z jiné příčiny, než z důvodu haploinsuficience některého z ribozomálních proteinů a s ním spojeného ribozomálního stresu. Bylo zjištěno, že v hematopoetických buňkách s deficitem ribozomálního proteinu dochází ke **snížení hladiny GATA1** (Ludwig *et al.*, 2014). Mechanismus, kterým by mohlo docházet k tomuto snížení GATA1, se pokusili objasnit Bibikova *et al.*, kteří ve své práci navrhli, že k snížení GATA1 dochází působením prozánětlivých cytokinů. Ribozomální stres vede k zvýšené produkci **prozánětlivého TNF- α** , jehož signalizací přes **mitogen aktivovanou proteinkinázu p38** dochází k fosforylaci GATA1 a tato fosforylace pak usnadňuje jeho degradaci. Takto navržený model mimo jiné vysvětluje i příznivou odpověď některých pacientů s DBA na léčbu kortikoidy, jelikož tato léčiva vedou ke snížení hladiny TNF- α (Bibikova *et al.*, 2014). Zároveň byl také prokázán pozitivní vliv zvýšeného p53 na snížení GATA1. Tento fenomén byl v práci vysvětlen prostřednictvím interakce p53 s GATA1, která může vést k znemožnění pozitivní zpětnovazebné autoaktivační exprese GATA1 (Bibikova *et al.*, 2014).

3.3.4.2 Ribozomopatie – příklady dalších onemocnění

Genetické defekty, které mají za následek ribozomální dysfunkce, byly identifikovány i u řady dalších chorob kromě DBA jako např. u Treacherova-Collinsonova syndromu, Shwachmanova-Diamondova syndromu, či syndromu hypoplastických chrupavek a vlasů (cartilage-hair hypoplasie). Souhrnně se tyto nemoci se nazývají ribozomopatie.

Treacherův-Collinsův syndrom je autozomálně dominantní onemocnění charakteristické kraniofaciálními deformitami. Obdobně jako v některých případech DBA se mohou objevovat rozštěpy patra, avšak anémie není s tímto syndromem spojena. V 90 % případů za onemocnění odpovídá mutace v genu *TCOF1*, který kóduje jaderný fosfoprotein Treacle (TTCSC Group, 1996) zapojený do transkripce genů ribozomální DNA. **Shwachmanův-Diamondův syndrom** je vzácné autosomálně recesivní, multisystémové onemocnění charakterizované exokrinní insuficiencí pankreatu, poruchou hematopoézy a predispozicí k leukémii. Přibližně u 90 % pacientů se vyskytuje bíalelická mutace v genu *SBDS* (Boocock *et al.*, 2003). SBDS protein pak hraje roli v biogenezi ribozomů. **Syndrom hypoplastických chrupavek a vlasů** je autozomálně recesivně dědičné onemocnění, které se

typicky projevuje skeletální dysplazií, abnormálními vlasy a zhoršenou buněčnou imunitou. Ačkoliv anémie není univerzálním rysem tohoto syndromu, bylo zaznamenáno několik závažných makrocytárních anémií v kojeneckém věku s hematologickým projevem velmi podobným jako v případě DBA (Williams *et al.*, 2005). Toto onemocnění je zapříčiněno mutací v genu *MRP*, jež kóduje komponentu RNase MRP komplexu (Ridanpää *et al.*, 2001), který se mimo jiné podílí i na biogenezi ribozomů.

4 Materiál a metodika

4.1 Biologický materiál

Pro přípravu buněčného modelu Diamondovy–Blackfanovy anémie byla využita myší erytroleukemická buněčná linie (**MEL**). Jde o rychle se dělící suspenzní buněčnou kulturu tvořenou erytroidními progenitorovými buňkami odvozenými z myší sleziny. Buňky mají nízkou schopnost erytroidní diferenciaci, kterou je možné indukovat pomocí dimetylsulfoxidu (DMSO) (Singer *et al.*, 1974). Buňky byly získány z Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Německo).

Pro namnožení plasmidů byl použit kmen *Escherichia coli*: **One shot TOP10** genotypu F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139 Δ (*araleu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*. Bakteriální buňky byly dodány společností ThermoFisher Scientific (USA).*

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (Sigma Aldrich, kat. č. M2128)

agaróza (Sigma Aldrich, kat. č. A9539)

ampicilin (Sigma Aldrich, kat. č. A0166)

dietylpyrokarbonát (Sigma Aldrich, kat. č. D5758)

dihydrát etylendiamintetraacetátu sodného (Sigma Aldrich, kat. č. E5134)

dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Sigma Aldrich, kat. č. 71643)

dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma Aldrich, kat. č. 5655)

dimetylsulfoxid (Sigma Aldrich, kat. č. D8418)

dodecylsírán sodný (Lach-Ner, kat. č. 40089-AP0)

EcoRI Buffer (New England BioLabs, kat. č. B0101S)

EcoRI enzym (New England BioLabs, kat. č. R0101L)

EcoRV enzym (New England BioLabs, kat. č. R0195L)

etanol (Fagron, kat. č. 605456)

etidium bromid (SERVA, kat. č. 21251)

fetální telecí sérum (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 10270106)

formamid (Sigma Aldrich, kat. č. F9037)

HotStart Taq Master Mix Kit (QIAGEN, kat. č. 203445)
chlorid draselný (Lach-Ner, kat. č. 30076-AP0)
chlorid sodný (Lach-Ner, kat. č. 30093-AP0)
chloroform (Lach-Ner, kat. č. 20034-AT1)
isopropanol (Lach-Ner, kat. č. 20037-AT0)
kyselina boritá (Sigma Aldrich, kat. č. B7901)
LB Broth (Sigma Aldrich, kat. č. L7275)
LB medium s blasticidinem (InvivoGen, kat. č. fas-bl-l)
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, kat. č. 11668019)
médium DMEM (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 31966021)
médium Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 31985070)
NcoI enzym (New England BioLabs, kat. č. R0193L)
NEBuffer 3.1 (New England BioLabs, kat. č. B7203S)
penicilin a streptomycin (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 15140122)
polyakrylový nosič (MCR, kat. č. PC 152)
Quick-Load 2-Log DNA Ladder (New England BioLabs, kat. č. N0469S)
TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, kat. č. 4369016)
TaqMan sonda Actb (Applied Biosystems, kat. č. 4352933E)
TaqMan sonda RPL5 (Applied Biosystems, kat. č. Mm008447026-g1Rpl5Fa)
TaqMan sonda RPS19 (Applied Biosystems, kat. č. Mm01611010-g1Rps19)
tris(hydroxymethyl)aminomethanu (Lach-Ner, kat. č. 40159-CP0)
TRI reagent (Sigma Aldrich, kat. č. T9424)
Ultra load DNA ladder II (Peqlab, kat. č. 25-4110)

Použité komerční soupravy

QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, kat. č. 12145)
Gentra Puregene Cell Kit (QIAGEN, kat. č. 158767)
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, kat. č. 4337450)
SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, kat. č. 11754050)

Použité roztoky a jejich příprava

Standartní kultivační médium pro MEL buněčnou linii (500 ml)

- v laminárním boxu za sterilních podmínek smíchat 445 ml komerčního DMEM media, 50 ml fetálního telecího séra a 5 ml roztoku antibiotik (penicilin/streptomycin)
- směsný roztok přefiltrovat přes 0,2 mikrometrovou filtrační membránu

LB médium

- vložit LB Broth tablety do deionizované vody (48,3 ml vody na jednu tabletu)
- autoklávovat

Zásobní roztok 20x SB pufr

- rozpustit 8 g hydroxidu sodného a 47 g kyseliny borité v 900 ml deionizované vody
- doplnit deionizovanou vodou do objemu 1000 ml
- roztok přefiltrovat přes 0,2 mikrometrovou filtrační membránu

Zásobní roztok 20x TBE pufr

- navážit 216 g Tris, 110 g kyseliny borité a 14,8 g Na₂EDTA·2H₂O
- doplnit deionizovanou vodou do objemu 1000 ml a rozpustit
- upravit pH na 8,3 a roztok přefiltrovat přes 0,2 mikrometrovou filtrační membránu

10x PBS pufr

- rozpustit 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄·2H₂O a 2,4 g KH₂PO₄ v 800 ml deionizované vody
- upravit pH na 7,4 a doplnit deionizovanou vodou do objemu 1000 ml
- autoklávovat

MTT roztok

- rozpustit 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid (MTT) v sterilní deionizované vodě (5 mg MTT na 1 ml sterilní deionizované vody)
- roztok přefiltrovat přes 0,2 mikrometrovou filtrační membránu za sterilních podmínek v laminárním boxu

DEPC voda

- do 500 ml deionizované vody nanést 0,5 ml 0,1% dietylpyrokarbonátu
- vzniklý roztok promíchat alespoň 12 hodin na třepačce
- po promíchání autoklávovat

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

centrifuga C5C-08SU-15T3 (LW Scientific)

centrifuga KR 25i (Jouan)

centrifuga MPW 352R (MPW MED.Instruments)

centrifuga NF 400R (Nüve)

elektroforetická komora kuroGEL Midi 13 (VWR)

hlubokomrazicí box Lexicon ULT Freezer (ESCO)

inkubátor tkáňových kultur CCL-170T-8 (ESCO)

invertovaný mikroskop CKX41 (Olympus)

laboratorní lednice (Liebherr)

laboratorní mrazák (Liebherr)

laminární box AV-100 (Telstar)

laminární box MSC Advantage (Thermo Scientific)

mikrocentrifuga Micro Star 17R (VWR)

mikrocentrifuga MiniStar silverline (VWR)

mikrocentrifuga PRISM (Labnet)

mikrovlnná trouba (LG)

orbitální třepačka KS 130 basic (IKA)

pipetor Pipetus®Akku (Hirschmann)

průtokový cytometr FC500 (Beckman Coulter)

průtokový cytometr se sortrem (BD Influx)

sekvenátor ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

spektrofotometr Infinite 200 (TECAN)

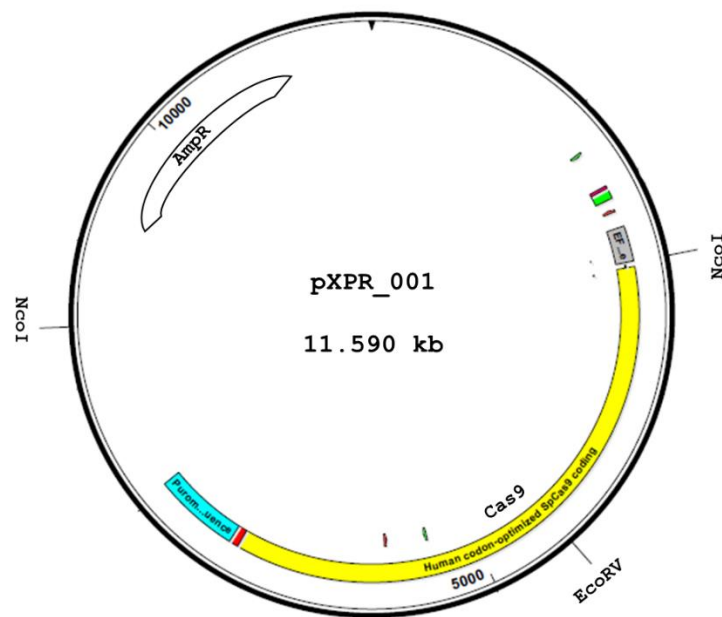
termoblok Bio TDB-100 (Biosan)

termocykler LightCycler 480 (Roche)
termocykler MJ Mini (Bio-Rad)
termostatovaná třepačka SI-600 (Lab Companion)
transiluminátor (Ultra Lum)
váha PEJ 4200-2M (KERN)
vodní lázeň Wisebath WB (Wisd)
vortex V-1 plus (Biosan)
výrobník ledu F100 compact (Icematic)
zdroj stejnosměrného napětí EV261 (Consort)

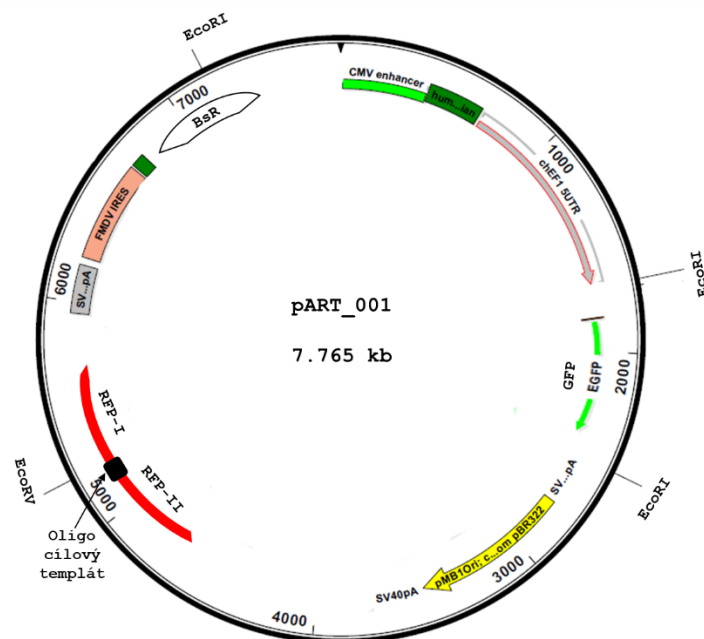
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Editace cílové sekvence exonu 4 genu *RPS19*

Buněčný model Diamondovy–Blackfanovy anémie byl připraven cílenou mutagenezí exonu 4 genu *RPS19* pomocí systému CRISPR/Cas9. Pro samotnou přípravu modelu byly užity dva rekombinantní plazmidy XPR a ART. Plazmid XPR nesl sekvenci kódující nukleázu Cas9 a sekvenci kódující vodící RNA (sgRNA) se specifitou k cílovému místu v exonu 4 genu *RPS19* (Obr. č. 4). Reportérový plazmid ART nesl sekvenci, kterou sgRNA rozeznává, a také obsahoval gen pro zelený a červený fluorescenční protein (GFP, RFP) (Obr. č. 5). Navržení příslušných oligonukleotidových sekvencí, jejich zaklonování do vektorů XPR (LentiCRISPR/Cas9 plazmid, Addgene) a ART (ARv-RFP plazmid, Addgene) a následná transfekce do kompetentních bakteriálních buněk *Escherichia coli* (One Shot TOP10 Chemically Competent *E.coli*, Invitrogen) bylo provedeno servisním pracovištěm Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Praze.



Obrázek 4: Schéma plazmidového vektoru XPR



Obrázek 5: Schéma plazmidového vektoru ART

4.4.2 Práce s bakteriemi

4.4.2.1 Kultivace transformovaných bakterií

Namnožení plazmidového vektoru XPR s CRISPR/Cas9 konstruktem a reportérového plazmidu ART bylo zajištěno kultivací bakterií *E. coli*, které byly těmito rekombinantními vektory transformovány. Byly připraveny dva 200ml roztoky standartního LB média. Jedno bylo ošetřeno ampicilinem tak, že jeho výsledná koncentrace byla 75 $\mu\text{g/ml}$ a druhé obsahovalo 100 $\mu\text{g/ml}$ blasticidinu. Antibiotika v LB médiích plnila úlohu faktorů selektujících bakterie transformované příslušným plazmidem. Následně byly z hlubokomrazícího boxu vyňaty konzervy s transformovanými bakteriemi a připravená LB média byla pomocí sterilních špiček naočkována příslušnou transformovanou bakteriální kulturou. Sterilita prostředí při transferu bakterií z konzervy do média byla zajištěna plamenem plynového kahanu. Zkumavky s naočkováným médiem byly kultivovány pomocí termostatované třepačky při 37 °C a 200 RPM přes noc.

4.4.2 Izolace plazmidové DNA

Izolace plazmidů byla provedena pomocí komerční soupravy QIAGEN Plasmid Midi Kit dle modifikovaného protokolu uvedeného výrobcem. Obsah falkon s narostnými bakteriálními kulturami byl slit do centrifugačních kyvet a byla provedena 15 min trvající centrifugace při 10 000 RPM v centrifuze předchlazené na 4 °C. Získaný bakteriální pelet byl resuspendován ve 4 ml P1 pufru a následovalo přidání 4 ml P2 pufru. Takto vzniklá směs se nechala 5 min vyvíjet. Po uplynutí této doby byl do směsi přidán P3 pufr v množství 4 ml a směs byla 15 min inkubována na ledě. Následovala centrifugace směsi na centrifuze předchlazené na 4 °C při 4 000 RPM po dobu 10 min. V průběhu centrifugace byla provedena ekvilibrace kolony (QIAGEN-tip) aplikováním 4 ml QBT pufru. Na ekvilibrovanou kolonu byl aplikován supernatant získaný centrifugací, přičemž nanášení supernatantu bylo prováděno přes filtrační papír, aby se předešlo ucpání kolony. Po prokapání supernatantu byla kolona promyta 2x10 ml QC pufru a eluce plazmidové DNA byla provedena aplikací 5 ml QF pufru na kolonu. K získanému eluátu bylo přidáno 3,5 ml isopropanolu a vzniklý roztok s vysráženou DNA byl 30 min centrifugován v předchlazené centrifuze při 6 500 RPM. Po centrifugaci byl opatrně odstraněn supernatant a usazený pelet byl promyt 2 ml 70% etanolu a znovu centrifugován. Po centrifugaci byl etanol odstraněn a pelet DNA byl v otevřené zkumavce několik minut sušen v digestoři. Vysušená plazmidová DNA byla rozpuštěna v 200 µl vody zbavené RNáz. Následovalo spektrofotometrické stanovení kvality a koncentrace izolované plazmidové DNA pomocí přístroje Infinite 200.

4.4.3 Práce s izolovanými plazmidy

4.4.3.1 Sekvenování části sekvence kódující sgRNA a sekvence rozeznávané sgRNA

Sekvenační reakce byly připraveny pomocí BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kitu. Pro reakce bylo použito 300 ng templátu plazmidu XPR a plazmidu ART. Sekvence primerů pro sekvenaci příslušných míst obou plasmidů uvádí tabulka 3. Rozpis pro sekvenační reakční směsi shrnuje tabulka 4. Podmínky a časový profil sekvenační reakce uvádí tabulka 5.

Po dokončení sekvenační reakce následovalo přečištění produktu. V 1,5ml mikrozkuhavce bylo protřepáním smícháno 25 µl vymraženého 96% etanolu, 1 µl roztoku octanu sodného a 10 µl produktu sekvenační reakce. Tato směs byla inkubována při -80 °C po

dobu 15 min. Po skončení inkubace byla provedena centrifugace směsi v centrifuze předchlazené na 4 °C při 13 000 RPM po dobu 15 min. Následovalo odstranění supernatantu, promytí peletu vymraženým 70% etanolem a další centrifugace s totožnými parametry. Po odstranění supernatantu bylo provedeno sušení peletu v otevřené mikrokumavce umístěné 60 sekund na termobloku temperovaném na 90 °C a vysušený přečištěný vzorek byl rozpuštěn ve 20 µl deionizovaného formamidu. Takto připravený vzorek byl sekvenován přístrojem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer na pracovišti Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc.

Tabulka 3: Sekvence primerů pro sekvenaci příslušných míst plasmidů XPR a ART

Primer	Sekvence (5' → 3')
pXPR guide (F)	ATCGTTTCAGACCCACCTCC
pART (F)	CGCAGTATACGCCACCATGAGCGAGC

Tabulka 4: Rozpis reakční směsi pro sekvenační reakci

Reagencie	Objem [µl]
2,5x Master mix	4
5x Sequencing buffer	2
primer (10 µM)	1
voda bez DNáz	do 20
templátová DNA – 300 µg	-
Celkový reakční objem	20

Tabulka 5: Teplotní podmínky a časový profil sekvenační reakce

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
96	1 min	1
96	10 s	25
50	5 s	
60	4 min	

4.4.3.2 Štěpení plasmidů XPR a ART a analýza vzniklých restričních fragmentů

Pro štěpení plasmidu XPR byly užity restriční endonukleázy *NcoI* a *EcoRV*. Pro plasmid ART byly užity restriční endonukleázy *EcoRI* a *EcoRV*. Pro každé štěpení bylo použito 300 ng plasmidové DNA. Rozpis pro jednotlivé štěpící směsi v objemu 20 µl shrnuje tabulka 6. Připravené štěpící směsi byly inkubovány 4 hodiny při 37 °C v termocykleru MJ Mini.

Tabulka 6: Rozpis reakčních směsí pro štěpení plazmidů jednotlivými restriktivními endonukleázami

	XPR+<i>NcoI</i>	XPR+<i>EcoRV</i>	ART+<i>EcoRI</i>	ART+<i>EcoRV</i>
pufř	2 μ l NEBuffer 3.1	2 μ l NEBuffer 3.1	2 μ l Buffer <i>EcoRI</i>	2 μ l NEBuffer 3.1
restriktáza	1 μ l <i>NcoI</i>	1 μ l <i>EcoRV</i>	1 μ l <i>EcoRI</i>	1 μ l <i>EcoRV</i>
plazmid	300 ng XPR	300 ng XPR	300 ng ART	300 ng ART
voda bez DNáz	do 20 μ l	do 20 μ l	do 20 μ l	do 20 μ l

Po naštěpení plazmidů byla provedena analýza vzniklých fragmentů elektroforetickou separací. Nejprve byl rozvařením 0,8 g agarózy v 100 ml 0,5x TBE pufřu připraven 0,8 % agarózový gel. Po jeho mírném ochlazení byl gel obarven přídavkem 20 μ l 1% roztoku etidium bromidu a následně byl nalit do připravené elektroforetické vaničky s plastovým hřebínkem. Po zatuhnutí gelu byla vanička s gelem umístěna do elektroforetické komory a gel byl převrstven 0,5x TBE pufřem. Následovalo nanesení standardu molekulové hmotnosti Quick-Load 2-Log DNA Ladder a jednotlivých vzorků naštěpených plazmidů v 6x LSB vzorkovacím pufřu. Konkrétně bylo do první jamky pipetováno 10 μ l roztoku, který obsahoval 9 μ l standardu molekulové hmotnosti s přídavkem 1 μ l štěpícího pufřu a do následujících jamek byly pipetovány celé objemy roztoků jednotlivých vzorků naštěpených plazmidů smíchaných s 6 μ l vzorkovacího pufřu. Samotná elektroforetická separace probíhala 1 h při konstantním napětí 100 V. Po ukončení elektroforézy byly separované restriktivní fragmenty vizualizovány a dokumentovány pomocí UV transiluminátoru s dokumentačním systémem.

4.4.4 Práce se savčí buněčnou linií

4.4.4.1 Kultivace buněk

K další části práce byla užitá buněčná linie MEL. Pro kultivaci buněk bylo užito Duplecco's modified Eagle's médium (DMEM) obohacené fetálním telecím sérem (FBS) v 10% koncentraci a směsí antibiotik (penicilin/streptomycin) v 1% koncentraci. Samotná kultivace probíhala v CO₂ buněčném inkubátoru temperovaném na konstantní teplotu 37 °C v atmosféře s obsahem 5 % CO₂.

4.4.4.2 Pasážování buněk

Z důvodu udržení buněčné kultury po dobu provádění experimentů bylo nutné buněčné linie každých 48 h pasážovat. Buňky byly pasážovány v poměru 1:10 až 1:20. Buňky s vyčerpaným médiem byly z kultivačních lahví přeneseny do 15ml plastové zkumavky, v níž byly centrifugovány 5 min při 1 500 RPM. Následně byl odstraněn supernatant a buněčný pelet byl suspendován v 1 ml čerstvého média, které bylo předehřáté na 37 °C. Z této koncentrované buněčné suspenze bylo odebráno příslušné množství a následně bylo přeneseno do nové kultivační láhve s obsahem předehřátého čerstvého média. Zpasážované zředěné buňky v novém médiu byly kultivovány v CO₂ buněčném inkubátoru do další pasáže 2 až 3 dny.

4.4.4.3 Mražení buněk

Před prováděním všech experimentů bylo zamraženo několik zásobních alikvotů buněk každé užitá buněčné linie. Nejprve bylo připraveno zamrazovací médium pro uchování buněk při nízké teplotě. Jednalo se o standardní kultivační médium obsahující DMSO ve výsledné 10% koncentraci. Následoval postup obdobný pasáži buněk, kdy byl po odstranění supernatantu buněčný pelet rozsuspendován v 1 ml zamrazovacího média a tato suspenze byla přenesena do kryozkumavky. Kryozkumavka byla vložena do zmrazovacího kontejneru Mr. Frosty™ Freezing Container a ten byl přenesen do hlubokomrazícího boxu, kde byly jednotlivé buněčné linie udržovány při -80 °C.

4.4.5 Příprava buněčného modelu

4.4.5.1 Transfekce a sortování transfekovaných buněk

Dvojice plazmidů XPR i ART byla transfekována do MEL buněk kultivovaných na dvou plastových Petriho miskách s průměrem 10 cm v reakčním objemu 10 ml. Dále byla provedena transfekce buněk pouze reportérovým plazmidem ART, a to v jamce 6-jamkové destičky v reakčním objemu 2 ml. Transfekce byla provedena lipofekcí pomocí činidla Lipofectamine 2000 Transfection Reagent. Koncentrace buněk v transfekční směsi činila $0,3 \times 10^6$ buněk/ml. Buňky byly nejprve spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a světelného mikroskopu aby bylo stanoveno jejich množství, a následně byly zředěny na požadovanou koncentraci. Dále byly připraveny dvě složky transfekční směsi. První složka byla vytvořena smísením 100 μ l Lipofectamine 2000 s 1500 μ l média Opti-MEM. Druhá složka obsahovala XPR a ART plazmidy v množství 20 μ g a 1500 μ l média Opti-MEM. Následovalo smísení obou složek a takto vzniklý transfekční mix se nechal 20 min inkubovat při pokojové teplotě. Mezitím bylo na každou Petriho misku vyseto 3×10^6 buněk v 8,5 ml média a po ukončení inkubace transfekčního mixu bylo na každou z Petriho misek nanášeno 1 500 μ l tohoto mixu. Rozpis jednotlivých reagensů a jejich množství pro lipofekci buněk plazmidy XPR a ART shrnuje tabulka 7. Analogicky avšak s menšími objemy reagensů se postupovalo v případě transfekce buněk pouze reportérovým plazmidem ART viz tabulka 8.

Následující den byla úspěšnost transfekce zkontrolována změřením podílu buněk vykazujících po aktivaci dvojitou fluorescenční pozitivitu (GFP a RFP) na přístroji Beckman Coulter Cytomics FC500 a poté byly transfekované buňky převezeny na servisní pracoviště Ústavu molekulární genetiky v Praze, kde bylo provedeno sortování buněk přístrojem BD Influx high speed cell sorter. Sortovány byly buňky, které při aktivaci vykazovaly dvojitou fluorescenční pozitivitu (GFP a RFP). Byl proveden tzv. single-cell sorting, kdy byly jednotlivé pozitivní buňky přístrojem umístěny po jedné buňce na 96-jamkovou destičku a zbytek buněk byl sortován do kultivační láhve s 5 ml média s obsahem 20 % FBS. Do 5 ml bylo sortováno 100 000 pozitivních buněk.

Tabulka 7: Rozpis reakčních směsí pro transfekci MEL buněk plazmidy XPR a ART

1. složka transfekčního mixu				
	koncentrace plazmidu [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	množství DNA na misku [μg]	celkové množství DNA [$\mu\text{g}/2$ misky]	pipetovaný objem [μl]
plazmid XPR	0,244	10	20	82
plazmid ART	0,406	10	20	49
Opti-MEM	-	-	-	1 500
2. složka transfekčního mixu				
	množství [$\mu\text{l}/$ misku]	pipetovaný objem [μl]		
Opti-MEM	50	100		
Lipofectamine 2000	750	1 500		

Tabulka 8: Rozpis reakčních směsí pro transfekci MEL buněk plazmidem ART

1. složka transfekčního mixu				
	koncentrace plazmidu [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	množství DNA na jamku [μg]	celkové množství DNA [$\mu\text{g}/$ jamku]	pipetovaný objem [μl]
plazmid ART	0,406	2,5	2,5	6,2
Opti-MEM	-	-	-	125
2. složka transfekčního mixu				
	množství [$\mu\text{l}/$ jamku]	pipetovaný objem [μl]		
Opti-MEM	8	8		
Lipofectamine 2000	125	125		

4.4.5.2 Selekce jednotlivých buněčných klonů

Buněčná kultura získaná sortováním buněk byla za standardních podmínek kultivována v kultivačním mediu s 20% obsahem FBS po dobu 5 dní za účelem jejího ustálení. Poté byly buňky za pomoci mikroskopu a Bürkerovy komůrky spočítány a zředěny na koncentraci 5 buněk/ml média. Takto silně zředěné médium s buňkami bylo pipetováno po 100 μ l do 192 jamek dvou 96 jamkových kultivačních destiček. Po několika denní kultivaci byly pomocí mikroskopu zkontrolovány jamky, ve kterých narostly kolonie odvozené z jediné buňky. Kolonie byly přesazeny na 24-jamkové destičky do 1 ml nového standardního kultivačního média.

4.4.5.3 Izolace genomové DNA z jednotlivých klonů

Jednotlivé buněčné kolonie z 24-jamkových destiček byly rozděleny na dvě části. První část byla zamrazena pro další zachování jednotlivých klonů viz kapitola 4.4.4.3 Mrazení buněk. Druhá část buněk byla užita k izolaci genomové DNA pomocí Gentra Puregene Cell Kit. Při izolaci se postupovalo dle modifikovaného protokolu uvedeného výrobcem.

Nejprve bylo pomocí centrifugace odstraněno médium, buňky byly promyty fosfátovým pufrům (PBS pufr) a po odstranění PBS pufru byly jednotlivé buněčné kolonie lyzovány v 200 μ l lyzačního pufru (Cell Lysis Solution). Ke každému lyzátu bylo přidáno 35 μ l pufru pro precipitaci proteinů (Protein Precipitation Solution) a takto vzniklé roztoky byly 20 s vortexovány. Následovala 1,5min centrifugace při 13 000 RPM a poté byly získané supernatanty přeneseny do druhé sady předpřipravených zkumavek s obsahem 150 μ l isopropanolu a 1 μ l polyakrylového nosiče. Roztoky v nové sadě zkumavek byly znovu centrifugovány při zachování stejných parametrů centrifugace a po odstranění supernatantu byly jednotlivé pelety s vysráženou DNA promyty 150 μ l 70% etanolu. Po další centrifugaci byl etanol opatrně odstraněn a pelet DNA byl v otevřené zkumavce sušen v digestoři po dobu 10 minut. Vysušená genomová DNA byla rozpuštěna v 20 μ l roztoku DNA Hydration solution a následně byla spektrofotometricky stanovená její kvalita a koncentrace pomocí přístroje Infinite 200. DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C.

4.4.5.4 Genotypizace jednotlivých klonů

Genotypizace byla založena na amplifikaci cílové sekvence genu *RPS19* ze specifických primerů pomocí PCR a následné detekci délkového polymorfismu vzniklých PCR produktů

pomocí gelové elektroforézy. Genomová DNA jednotlivých klonů byla pro účely PCR reakce naředěna vodou na koncentraci 30 ng/μl. Sekvence primerů pro genotypizaci uvádí tabulka 9. Složení reakční směsi a specifické podmínky PCR amplifikace jsou shrnuty v tabulkách 10 a 11.

Tabulka 9: Sekvence forward (F) a reverse (R) primeru pro amplifikaci cílové sekvence genu *RPS19*

Primer	Sekvence (5' → 3')
<i>RPS19</i> (F)	GCTGTACTCATCCAGGGTTTG
<i>RPS19</i> (R)	CTCTCACCTGTCCAGCGATC

Tabulka 10: Složení PCR reakční směsi

Reagencie	Objem [μl]
voda bez DNáz	7
F primer	1
R primer	1
Hot start Taq Master mix	10
templátová DNA	1
Celkový reakční objem	20

Tabulka 11: Teplotní podmínky a časový profil PCR

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	15 min	1
denaturace	95	30 s	35
nasednutí primerů	58	30 s	
elongace	72	30 s	
závěrečná elongace	72	2 min	1

K elektroforetické detekci délkového polymorfismu bylo využito 3% agarózového gelu, který byl připraven rozvařením 4,5 g agarózy v 150 ml 1x SB pufru. K obarvení gelu bylo užito 20 μl 1% roztoku etidium bromidu a následně byl gel nalit do připravené vaničky s plastovým hřebínkem. Po zatuhnutí gelu byla vanička s gelem umístěna do elektroforetické komory a gel byl převrstven 1x SB pufrém. Následovalo nanesení vzorků dle schématu: první jamka 2 μl standartu molekulové hmotnosti Ultra load DNA ladder a do dalších jamek pak jednotlivé vzorky roztoků PCR produktů se 4 μl 6x LSB vzorkovacího pufru. Samotná elektroforetická separace probíhala 4 h při konstantním napětí 80 až 100 V. Po ukončení separace byly výsledky vizualizovány a dokumentovány pomocí UV transiluminátoru s dokumentačním systémem.

4.4.6 Charakterizace pozitivních klonů

4.4.6.1 Rozmrazení buněk pozitivních klonů a příprava na jejich charakterizaci.

V dalším kroku byly rozmrazeny klony buněk, u nichž byla zjištěna mutace v genu *RPS19* a klon u něhož byla již dříve zjištěna mutace v genu *RPL5*. Z těchto buněk bylo nejdříve vymyto toxické zamrazovací médium s obsahem DMSO a následně byly buňky kultivovány ve 4 ml standartního kultivačního média na 6-jamkové destičce. Následovala několikanásobná kultivace buněk, za účelem zvýšení jejich počtu a jejich následné přenesení do kultivačních lahví.

4.4.6.2 Test buněčné proliferace

Buňky jednotlivých testovaných linií byly vysázeny na čtyři 96 jamkové destičky s kulatým dnem (tvar U). Jednotlivé destičky s buňkami byly kultivovány v CO₂ buněčném inkubátoru po dobu 24, 48, 72 a 96 h. Množství buněk na jednu jamku činilo 3 000 buněk ve 100 µl normálního kultivačního média. Test byl pro každou testovanou buněčnou linii na každé destičce proveden ve dvanácti opakováních. Po uplynutí inkubačního času pro příslušnou destičku bylo do každé jamky nanášeno 12 µl roztoku MTT a buňky pak byly s tímto roztokem inkubovány ještě další 3 hodiny za standartních inkubačních podmínek ve tmě v CO₂ buněčném inkubátoru. Následně byla celá destička 2 min centrifugována při 2 000 RPM a po odstranění media bylo k usazeným krystalům formazánu (metabolický produkt MTT) přidáno 200 µl 10% roztoku dodecylsírany sodného (SDS). Rozpuštění formazánu v SDS probíhalo po dobu 24 h ve tmě na orbitální třepačce. Po rozpuštění formazánu následovalo kvantitativní vyhodnocení MTT testu metodou absorpční spektrofotometrie. Hodnota absorbance jednotlivých vzorků byla stanovena pro vlnovou délku 570 nm pomocí spektrofotometru Infinite 200. Získaná spektrofotometrická data byla graficky zpracována a statisticky vyhodnocena v tabulkovém editoru Excel 2016.

4.4.6.3 Studium genové exprese metodou real-time PCR

4.4.6.3.1 Extrakce RNA

K izolaci RNA byl využit TRIzol Reagent. Buňky byly nejdříve promyty PBS a pak lyzovány přidávkem 1 ml TRIzolu. Buněčný lyzát v TRIzolu byl buď zmražen, nebo ihned

použit pro izolaci RNA. Izolace RNA probíhala v laminárním boxu. Všechny užití chemikálie byly vymrazeny a centrifuga byla předchlazena na 4 °C, aby se předešlo degradaci RNA. K roztoku buněk v 1 ml TRIzolu se přidalo 200 µl chloroformu, směs se nechala 3 min inkubovat při pokojové teplotě a průběžně se nemísitelné fáze promíchávaly překlápěním. Poté proběhla 15 min centrifugace při 12 000 RPM. Po centrifugaci bylo k horní odebrané fázi obsahující RNA přidáno 500 µl isopropanolu a 2 µl polyakrylového nosiče. Po 10min srážení RNA při -20 °C následovala 10 min centrifugace při 12 000 RPM. Supernatant byl odstraněn a pelet promyt 75% roztokem etanolu v DEPC H₂O a znovu centrifugován při 7 500 RPM 5 min. Etanol byl odstraněn a pelet byl sušen v laminárním boxu v otevřené mikrozkuhavce po dobu 10 min. K vysušené RNA bylo přidáno 20 až 30 µl DEPC H₂O a pro lepší rozpuštění RNA byla uzavřená mikrozkuhavka 10 min inkubována v termobloku temperovaném na 65 °C. Vodný roztok RNA byl do dalšího užití uskladněn v mrazicím boxu při -80 °C.

4.4.6.3.2 Syntéza komplementární DNA

Syntéza komplementární DNA (cDNA) byla provedena pomocí soupravy SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit. Nejprve byla spektrofotometricky stanovena koncentrace izolované RNA, jelikož reakční směs pro přepis vyžadovala 1 µg RNA. Směs byla připravena v laminárním boxu a během přípravy byly jednotlivé reagentie i reakční směs uchovávány na chladicím bločku. Vzorky připravené k přepisu byly poté inkubovány v termocykleru. Rozpis reagentií pro syntézu cDNA shrnuje tabulka 12. Podmínky syntézy uvádí tabulka 13. Po ukončení inkubace byla syntetizovaná cDNA uložena do mrazicího boxu na -20 °C.

Tabulka 12: Složení reakční směsi pro syntézu cDNA

Reagencie	Objem [µl]
5x VILO pufr	4
10x VILO enzym	2
1 µg RNA	-
DEPC H ₂ O	do 20
Celkový reakční objem	20

Tabulka 13: Teplotní podmínky a časový profil syntézy cDNA

Teplota [°C]	Čas [min]
25	10
42	60
85	5

4.4.6.3.3 Real-time PCR zájmových genů *RPS19* a *RPL5*

Pomocí metody real-time PCR byla u testovaných buněčných klonů stanovena relativní exprese příslušného mutovaného genu (*RPS19*, *RPL5*). Jako stabilně exprimovaný („housekeeping“) gen, k němuž byla exprese *RPS19* resp. *RPL5* ve vzorcích vztažena, byl užit gen pro *beta-aktin* (*Actb*). Kvantitativní PCR byla provedena na plastové 96-jamkové destičce pomocí termocycleru LightCycler 480 se schopností kontinuálně zaznamenávat nárůst fluorescence. Templátem pro jednotlivé reakce byla cDNA ředěná vodou v poměru 1 : 4 (k 20 μ l roztoku cDNA bylo přidáno 80 μ l DEPC vody). Pro všechny reakce byly využity komerční TaqMan sondy. Jednotlivé reakce pro každý testovaný vzorek a každý gen byly provedeny ve třech opakováních (triplikátech). Pro každý gen byla zároveň připravena jedna negativní kontrola bez obsahu templátu. Takto navržený experiment byl 3x zopakován. Nanesení reagensií na destičku bylo prováděno v laminárním boxu. Složení reakční směsi a specifické podmínky PCR amplifikace jsou shrnuty v tabulkách 14 a 15. Relativní exprese příslušného mutovaného genu v testovaných vzorcích byla stanovena z naměřených C_T hodnot pomocí programu REST 2009 (Pfaffl *et al.*, 2002)

Tabulka 14: Složení jedné real-time PCR reakce

Reagencie	Objem [μ l]
Taq man pufr mix	10
Příslušná Taq man sonda	1
DEPC voda	4
5x ředěná templátová cDNA	5
Celkový reakční objem	20

Tabulka 15: Teplotní podmínky a časový profil real-time PCR

Krok	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
počáteční aktivace a denaturace	50	2 min	1
	95	10 min	
denaturace	95	15 s	40
nasednutí primerů /elongace	60	1 min	

4.4.7 Zpracování a vyhodnocení dat

Použité počítačové programy

Excel 2016 (Microsoft)

FinchTV (Geospiza)

REST 2009 (QIAGEN)

Statistická analýza

Pro stanovení, zda existuje signifikantní rozdíl mezi připraveným buněčným modelem a standardním *wt* genotypem, v průměrné hodnotě množství narostlých buněk při MTT testu buněčné proliferace a v průměrné hladině exprese příslušného genu, byl použit t-test.

Platilo, že:

rozdíl mezi dvěma průměrnými hodnotami byl hodnocen jako statisticky významný \Rightarrow

$p < 0.05$ (*)

rozdíl mezi dvěma průměrnými hodnotami byl hodnocen jako statisticky vysoce významný \Rightarrow

$p < 0.01$ (**)

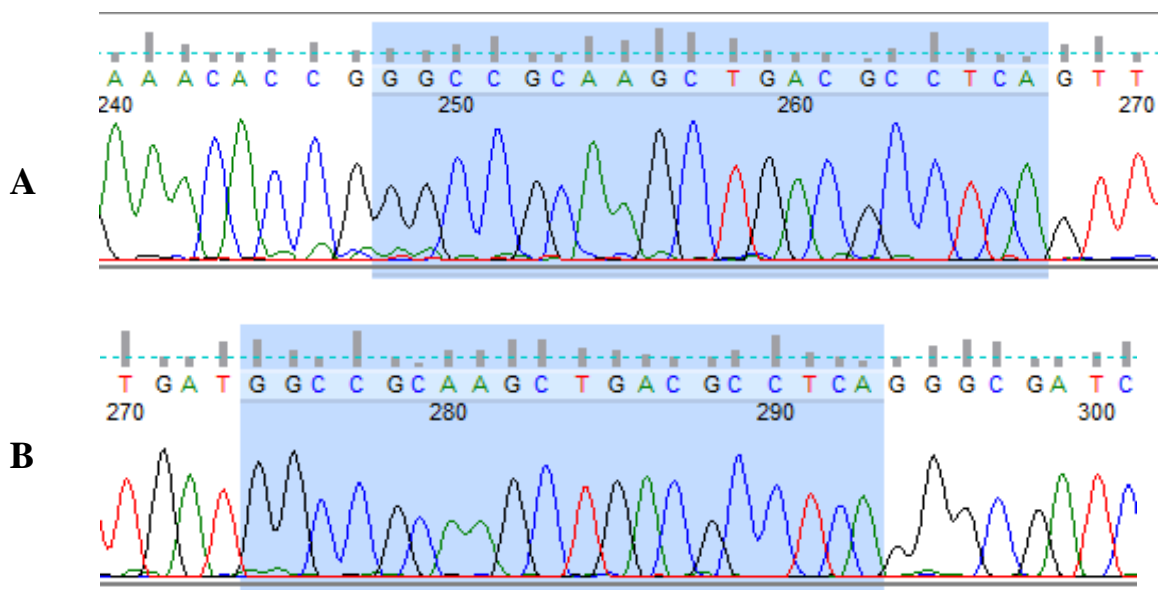
Hodnoty p byly pro testování významnosti rozdílu v množství narostlých buněk při MTT testu počítány v Excel 2016 a stanovení významnosti rozdílu genové exprese bylo určeno softwarem REST 2009.

5 Výsledky

5.1 Příprava a ověření plazmidů

Z transformovaných bakteriálních kultur byly pomocí komerční soupravy QIAGEN Plazmid Midi Kit úspěšně izolovány plazmidy XPR a ART. Oba plazmidy byly rozpuštěny v 200 µl vody zbavené RNáz a na základě spektrofotometrického měření absorbance pro vlnové délky 260 nm a 280 nm byla stanovena koncentrace 244,68 ng/µl pro plazmid XPR a 406 ng/µl pro plazmid ART.

Plazmidy byly částečně sekvenovány, za účelem detekování specifického sekvenčního motivu 5'-GGCCGCAAGCTGACGCCTCA-3'. Tato sekvence v případě plazmidu XPR kóduje část sgRNA a v případě plazmidu ART jde o sekvenci rozpoznávanou příslušnou sgRNA viz sekce Materiál a metody. V obou plazmidech byl sekvenční motiv detekován (Obr. č. 6).

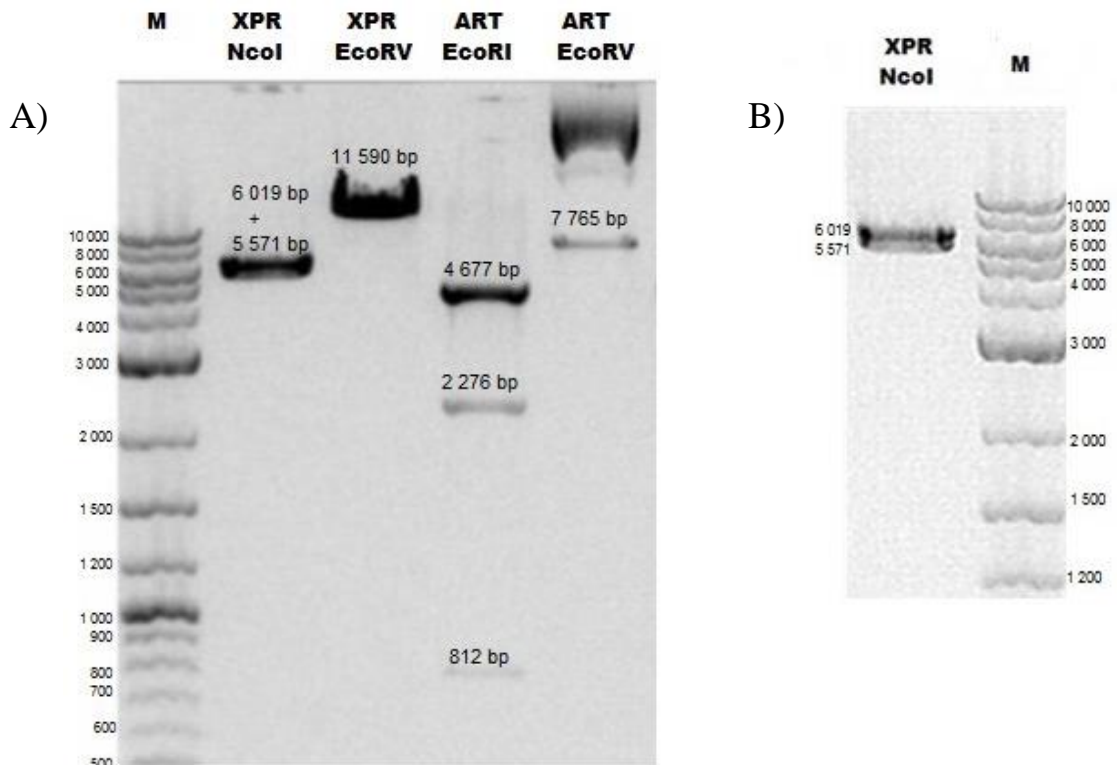


Obrázek 6: Specifický sekvenční motiv v plazmidu XPR a ART.

Vysvětlivky: A = část sekvence plazmidu XPR obsahující specifický sekvenční motiv (v modrém obdelníku)
B = část sekvence plazmidu ART obsahující specifický sekvenční motiv (v modrém obdelníku)

Plazmidy byly dále kontrolně štěpeny dvěma restrikními endonukleázami, aby bylo zkontrolováno, zda nedošlo k jejich desintegraci vlivem náhodných rekombinací. Restrikní endonukleáza *EcoRV* byla užita k linearizaci obou plazmidů a dále byl každý plazmid štěpen ještě druhou restrikní endonukleázou, za účelem vzniku restrikních fragmentů specifických

délek. Elektroforetická analýza vzniklých restričních fragmentů potvrdila délky, odpovídající teoretickým délkám restričních fragmentů (Obr. č. 7). Teoretické délky byly stanoveny z fyzických restričních map plazmidů viz kapitola 4.4.1 v sekci Materiál a metodika (Obr. č. 4 a 5).



Obrázek 7: Elektroforetická analýza kontrolního restričního štěpení plazmidů XPR a ART pomocí 1% agarózové elektroforézy

Vysvětlivky:

dráha 1 = marker molekulové hmotnosti Quick-Load 2-Log DNA Ladder (500 - 10 000 bp),

dráha 2 = separované restriční fragmenty vzniklé štěpením plazmidu XPR restriční endonukleázou *NcoI* (Pozn. 2 fragmenty jsou zde těsně u sebe. Jejich lepší rozlišení poskytuje elektroforetogram B)

dráha 3 = plazmid XPR linearizovaný restriční endonukleázou *EcoRV*

dráha 4 = separované restriční fragmenty vzniklé štěpením plazmidu ART restriční endonukleázou *EcoRI*,

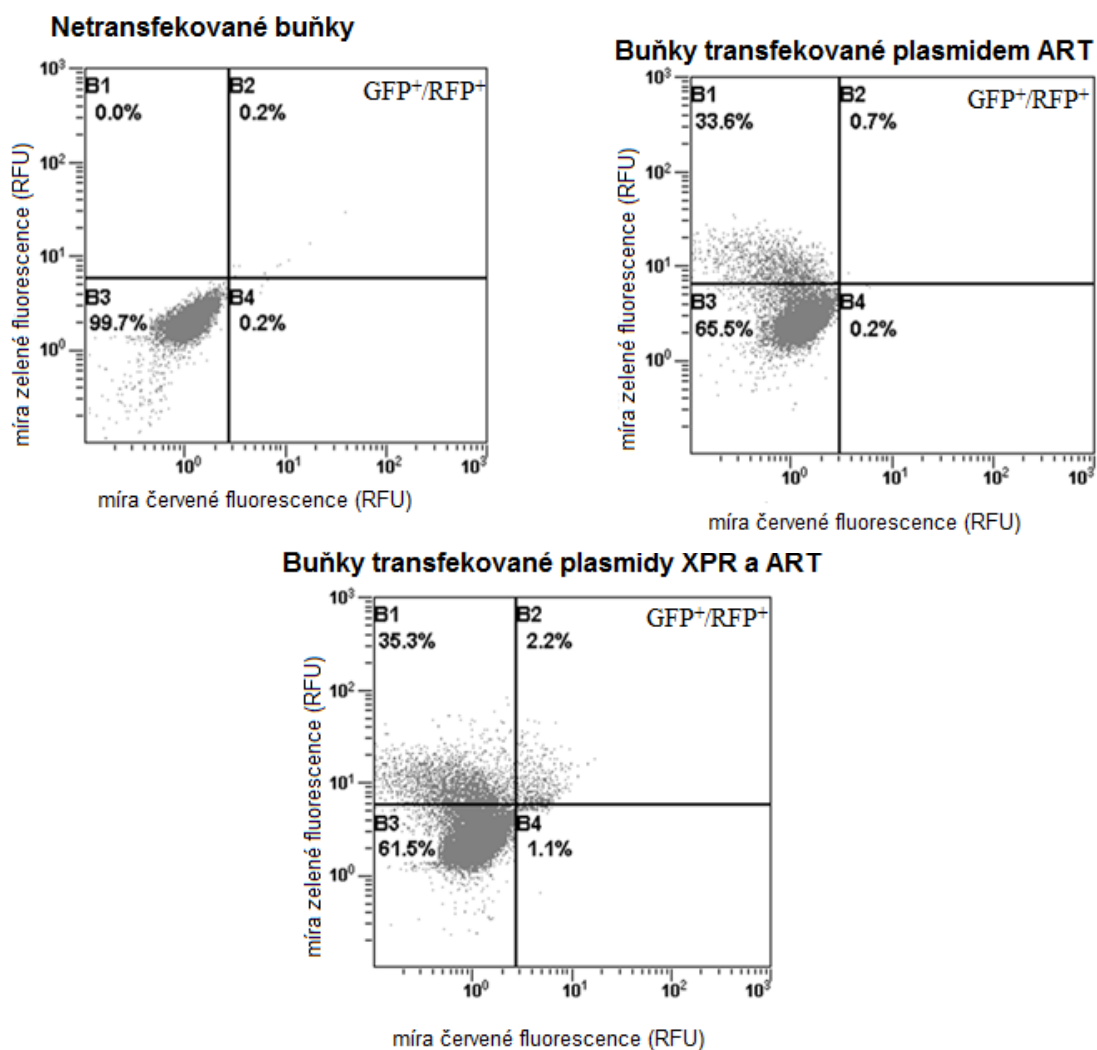
dráha 5 = plazmid ART linearizovaný restriční endonukleázou *EcoRV*

K vzniklým produktům restriční analýzy jsou přiřazeny hodnoty délek odpovídající teoretickým délkám stanoveným z restričních map plazmidů.

5.2 Transfekce a analýza transfekovaných buněk průtokovou cytometrií

Byla provedena transfekce MEL buněk plazmidem ART a kotransfekce buněk plazmidy XPR a ART. Po 24 h byla pomocí průtokové cytometrie měřena míra zelené a červené fluorescence transfekovaných buněk. Na základě zjištěné míry fluorescence byla stanovena účinnost transfekce a funkčnost CRISPR/Cas9 systému. Zelená fluorescence buněk naznačovala úspěšnou transfekci reportérovým plazmidem ART, který nese gen pro GFP.

Zelená i červená fluorescence pak naznačovala úspěšnou kotransfekci plazmidy XPR a ART a zároveň účinnost CRISPR/Cas9 systému exprimovaného z XPR, který umožňuje expresi funkčního RFP z reportérového plazmidu ART. Dle předpokladu kontrolní netransfekované buňky vykazovaly téměř úplnou negativitu na zelenou i červenou fluorescenci. V případě buněk transfekovaných pouze reportérovým plazmidem ART došlo ke značnému zvýšení podílu buněk pozitivních na zelenou fluorescenci a u buněk kotransfekovaných plazmidy XPR i ART bylo stanoveno 2,2 % buněk vykazujících dvojitou pozitivitu na zelenou i červenou fluorescenci (GFP⁺/RFP⁺), což potvrdilo úspěšnost transfekce i funkčnost CRISPR/Cas9 systému. Podíly jednotlivých buněčných fenotypů stanovených průtokovou cytometrií ilustruje následující série diagramů (Obr. č. 8).

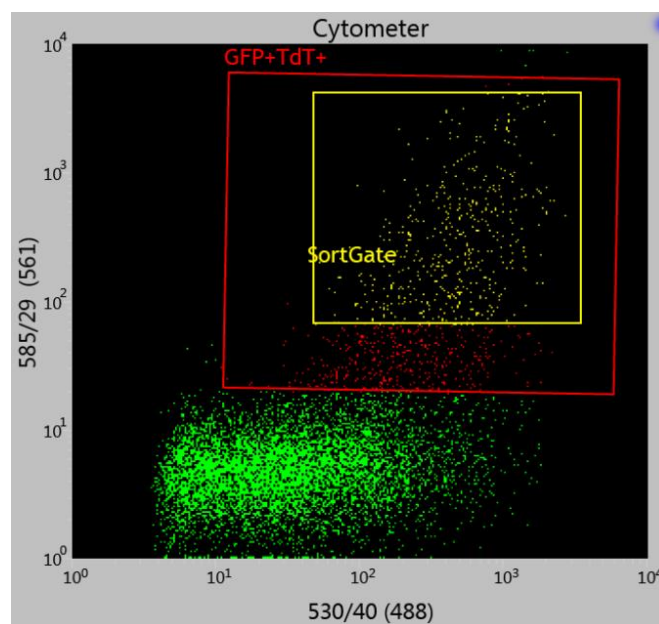


Obrázek 8: Stanovení účinnosti transfekce a funkčnosti CRISPR/Cas9 systému

Jednotlivé diagramy mají na ose x v logaritmickém měřítku v jednotkách RFU (relative fluorescence unit) vynesenu míru červené fluorescence a na ose y mají v logaritmickém měřítku v RFU vynesenu míru zelené fluorescence. Diagramy jsou dále rozděleny na čtyři části B1 až B4. B1 = vysoká míra zelené fluorescence, B2 = vysoká míra zelené i červené fluorescence, B3 = negativní oblast, B4 = vysoká míra červené fluorescence. Šedé body pak představují jednotlivé buňky.

5.3 Sortování transfekovaných buněk a selekce jednotlivých buněčných klonů

Po otestování účinnosti transfekce a funkčnosti CRISPR/Cas9 systému byly transfekované buňky sortovány na základě dvojité fluorescenční positivity (Obr. č. 9). Jelikož sortování po jedné buňce (tzv. single cell sorting) do 96-jamkové destičky a následnou přepravu buňky nepřežily, byly kolonie odvozené z jediného buněčného klonu selektovány manuálně ze směsné buněčné kultury vysortovaných GFP⁺/RFP⁺ buněk. Manuální selekcí bylo získáno 88 kolonií.



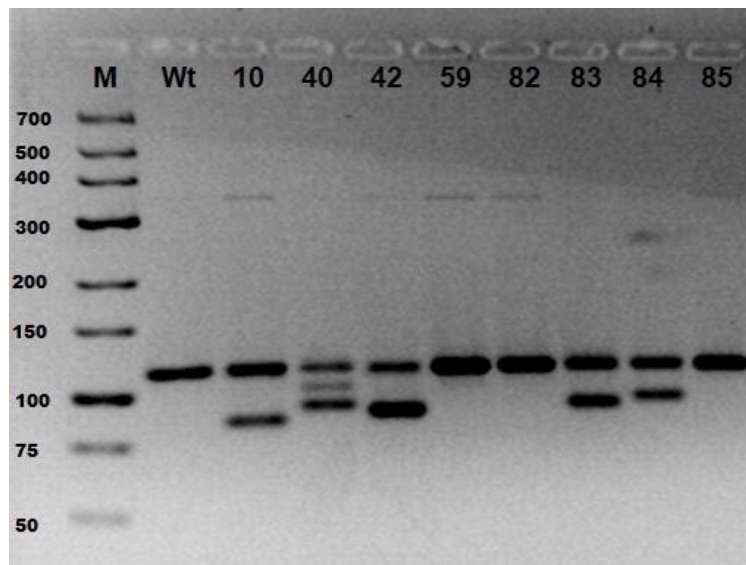
Obrázek 9: Sortování transfekovaných buněk.

Na ose x je v logaritmickém měřítku vynesena míra zelené fluorescence a na ose y je v logaritmickém měřítku vynesena míra červené fluorescence. Červené body nacházející se v oblasti červeného rámečku představují buňky, které byly přístrojem vyhodnoceny jako dvojité pozitivní, žlutá oblast buněk byla pak následně vysortována.

5.4 Genotypizace MEL klonů

Všech 88 buněčných klonů bylo genotypizováno pomocí PCR a agarózové elektroforézy dle kritérií uvedených v metodice. Detekce dvou různě dlouhých PCR produktů pro genotypizovaný klon naznačovala existenci dvou různých alel v daném lokusu, a byla tedy hodnocena jako pozitivita na mutantní genotyp způsobený nukleotidovou delecí ve 4. exonu genu *RPS19*. V případě detekce PCR produktu jedné délky byl daný klon hodnocen jako „wild type“ (*wt*). Pozitivita na mutantní genotyp byla stanovena u 16 z 88 testovaných klonů (celkově

18 % pozitivních klonů pro nukleotidovou delecí). Rozdíl mezi mutantním a *wt* genotypem vybraných testovaných klonů ilustruje Obr. č. 10.



Obrázek 10: Elektroforetická analýza PCR produktů získaných amplifikací části genu *RPS19* vybraných testovaných klonů pomocí 3% agarózové elektroforézy.

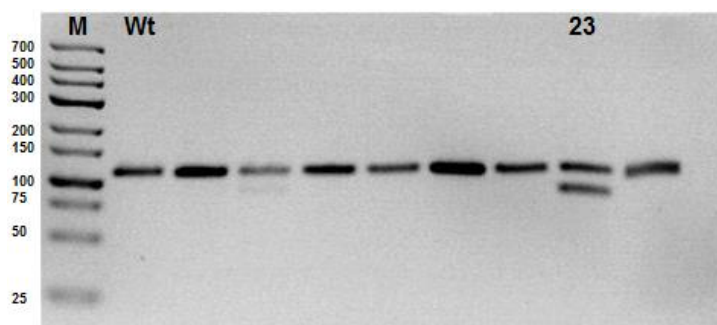
Vysvětlivky: dráha 1 = marker molekulové hmotnosti Ultra load DNA ladder (50 – 700 bp)

dráha 2 = kontrolní standardní *wt* genotyp

ostatní dráhy = vybrané testované klony 10, 40, 42, 59, 82, 83, 84, 85

5.5 Charakterizace připravených mutantních buněčných linií

Pro následnou charakterizaci byly vybrány tři buněčné linie klonů 10, 42 a 84, u nichž byla stanovena pozitivita na mutaci ve 4. exonu genu *RPS19* a dále byla použita již dříve připravená buněčná linie klonu 23 pozitivního na mutaci ve 3. exonu genu *RPL5* (Obr. č. 11).



Obrázek 11: Elektroforetická analýza PCR produktů získaných amplifikací části genu *RPL5* vybraných testovaných klonů pomocí 3% agarózové elektroforézy

Vysvětlivky: dráha 1 = marker molekulové hmotnosti Ultra load DNA ladder (25 – 700 bp)

dráha 2 = kontrolní standardní *wt* genotyp

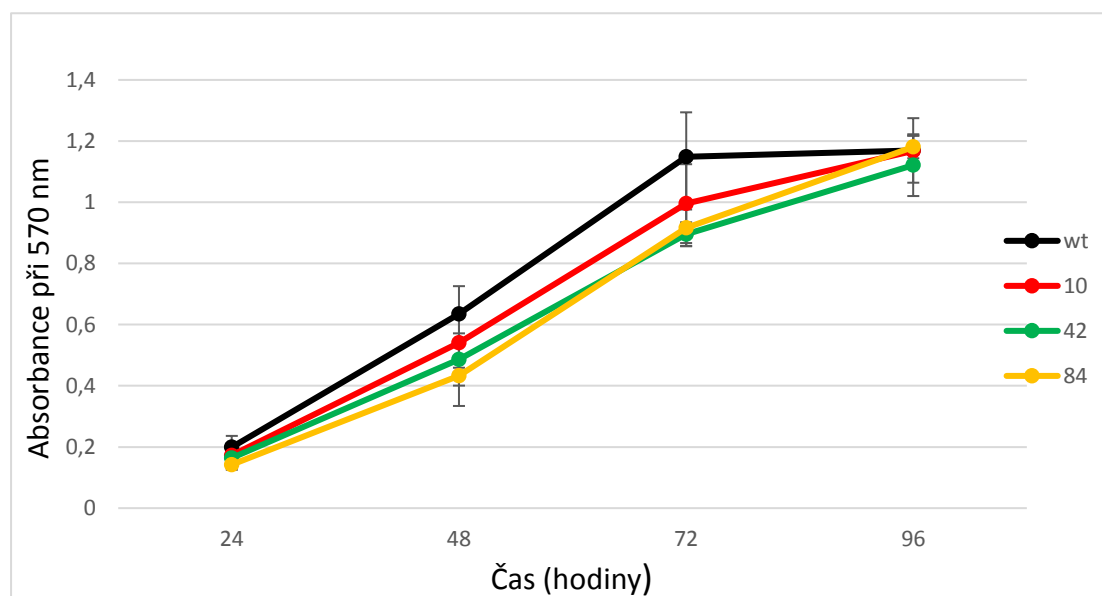
dráha 9 = klon 23 pozitivní na delecí v genu *RPL5*

ostatní dráhy = ostatní testované klony negativní na delecí v genu *RPL5*

(Pozn. Tato analýza byla provedena Dr. Kapraľovou před začátkem diplomové práce.)

5.5.1 Vliv mutace na buněčnou proliferaci

Pomocí MTT testu byla sledována schopnost proliferace u jednotlivých testovaných mutantních linií v porovnání s buňkami *wt* genotypu. Test MTT využívá principu, že živé buňky redukuje žlutý MTT reagent mitochondriálními dehydrogenázami na fialovomodrý formazán. Míra konverze MTT na formazán je tedy úměrná množství živých buněk. Množství vzniklého formazánu pak lze stanovit po jeho rozpuštění z absorbance vzniklého roztoku. U všech testovaných mutantních linií měla mutace v genu *RPS19* negativní vliv na buněčnou proliferaci (Obr. č. 12). Vliv mutace na snížení buněčné proliferace se projevil zejména u linií 42 a 84. V čase 48 h a 72 h od nasazení buněk bylo průměrné množství narostlých buněk výrazně nižší než v případě kontrolních *wt* buněk. Mutovaná buněčná linie 10 měla rovněž v porovnání s *wt* buňkami sníženou schopnost proliferace, avšak toto snížení již nebylo tak výrazné (Obr. č. 12). Signifikantnost rozdílu v průměrném množství narostlých mutantních buněk proti *wt* kontrolním buňkám v jednotlivých sledovaných časových intervalech byla hodnocena pomocí oboustranného dvouvýběrového t-testu. P hodnoty získané tímto testem jsou přehledně shrnuty v tabulce 16. Pomocí MTT testu byla otestována i proliferací schopnost buněčné linie 23, u které byla již dříve zjištěna snížená schopnost proliferace. Snížená schopnost proliferace buněčné linie 23 byla MTT testem jednoznačně potvrzena (Obr. č. 13).



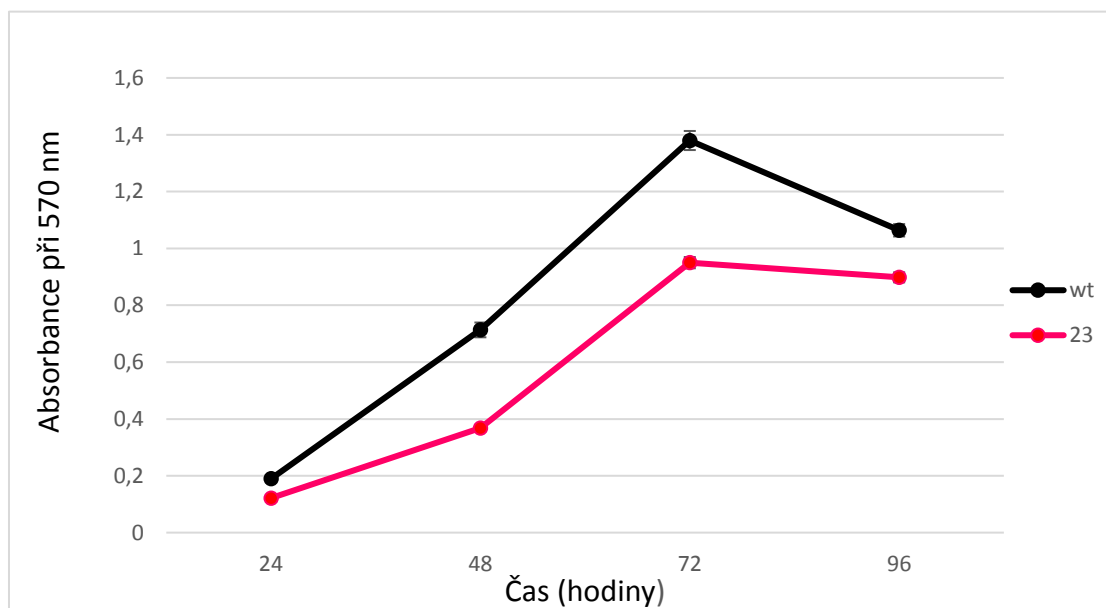
Obrázek 12: Dynamika nárůstu buněk mutantních linií 10, 42, 84 a buněk standardního *wt* genotypu.

Množství živých buněk je úměrné hodnotě absorbance. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka vypočítané ze čtyř nezávislých experimentů.

Tabulka 16: Signifikance změn proliferace testovaných mutantních linií proti *wt*

čas od nasazení [h]	p hodnoty pro klon 10	p hodnoty pro klon 42	p hodnoty pro klon 84
24	0,371409 (ns)	0,226507 (ns)	0,050743 (ns)
48	0,234835 (ns)	0,084910 (ns)	0,040649 (*)
72	0,221063 (ns)	0,026937 (*)	0,042878 (*)
96	0,991599 (ns)	0,773331 (ns)	0,927588 (ns)

(ns = nesignifikantní; * pro $p < 0,05$).



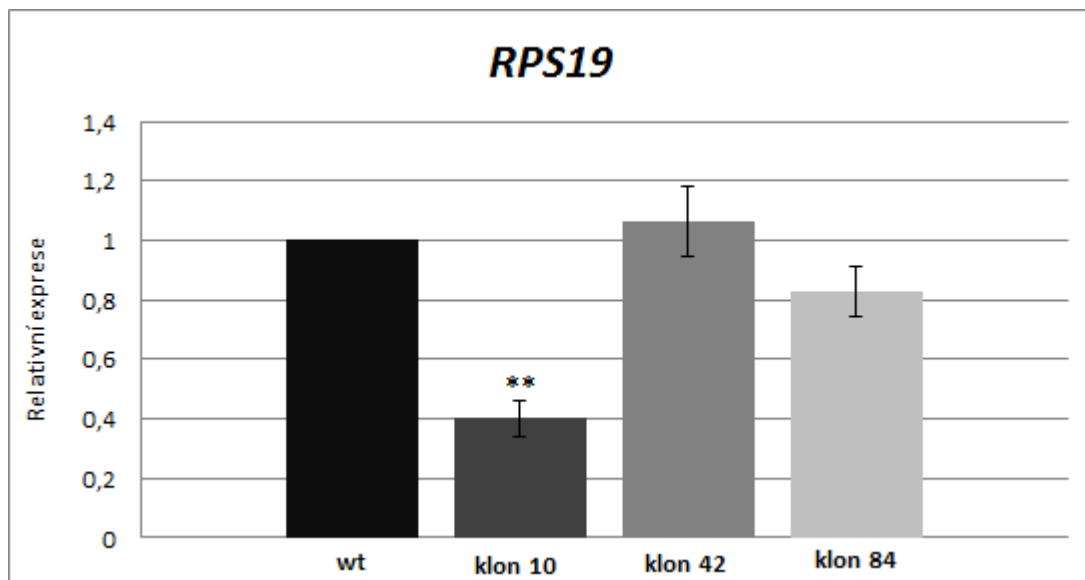
Obrázek 13: Dynamika nárůstu buněk mutantní linie 23 a buněk standartního *wt* genotypu.

Množství živých buněk je úměrné hodnotě absorbance. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka vypočítané z jediného experimentu.

5.5.2 Vliv mutace na expresi mutovaného genu

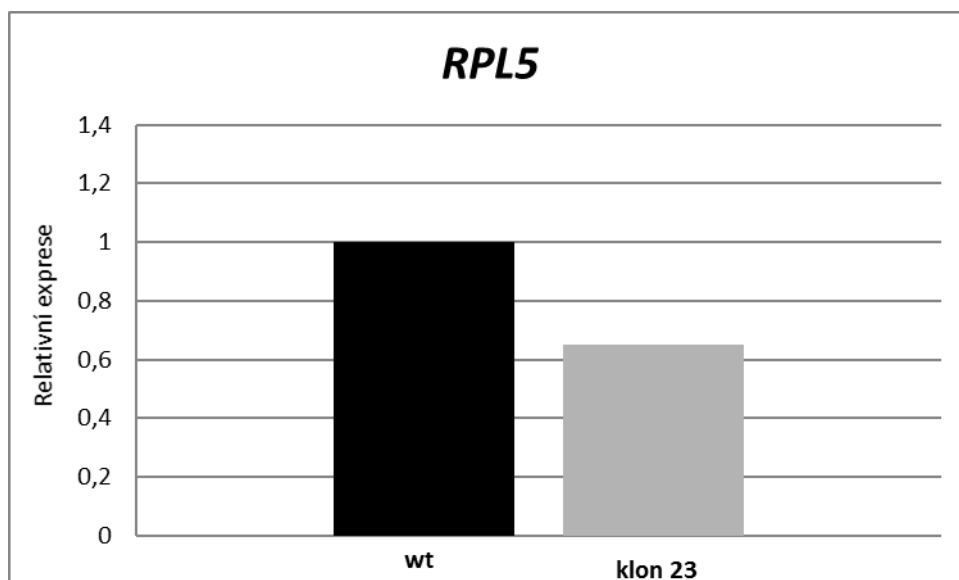
Pomocí metody real-time PCR byla srovnávána exprese genu *RPS19* u připravených mutantních klonů 10, 42 a 84 v porovnání s *wt* buňkami. Dále byla srovnávána exprese genu *RPL5* u již dříve připraveného buněčného klonu 23 (s defektem v tomto genu) se standartním *wt* genotypem. Míra genové exprese byla stanovena z naměřených C_T hodnot pro příslušný gen ribozomálního proteinu a referenční gen *beta-aktin* (*Actb*). Tabulky s naměřenými hodnotami C_T jsou přiloženy v oddíle Přílohy. U buněčné linie 10 bylo prokázáno statisticky vysoce významné snížení exprese genu *RPS19* ve srovnání s *wt* buňkami. U klonu 84 došlo k statisticky nevýznamnému poklesu genové exprese ve srovnání s *wt* a klon 42 vykazoval expresi na

porovnatelné úrovní jako kontrolní *wt* buňky (Obr. č. 14). U klonu 23 byla zjištěna snížená exprese genu *RPL5* v porovnání s *wt* (Obr. č. 15). Pro získání signifikantnějších výsledků bylo nutné tento experiment zopakovat, což z časových důvodů nebylo možné. Tabulka s p hodnotami je přiložena v oddíle Přílohy.



Obrázek 14: Relativní exprese genu *RPS19* u testovaných mutantních buněčných linií 10, 42 a 84.

Data reprezentují průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka vypočítané ze tří nezávislých experimentů. Dvě hvězdičky značí vysokou statistickou signifikanci ($p < 0,01$).



Obrázek 15: Relativní exprese genu *RPL5* u testované mutantní buněčné linie 23.

6 Diskuze

Jelikož dostupnost tkání pacientů postižených DBA je pro biomedicínský výzkum značně omezena, bývají pro studium molekulární patofyziologie DBA a identifikaci nových možných terapeutických postupů často využívány uměle připravené *in vitro* buněčné modely. U zhruba poloviny pacientů s DBA fenotypem se identifikuje kauzální mutace v některém z genů kódujících ribozomální proteiny (Ruggero *et* Shimamura, 2014). Z tohoto důvodu se *in vitro* buněčné modely připravují navozením haploinsuficience těchto genů. Pro navození haploinsuficience v buněčném modelu se klasicky využívalo umlčování genu prostřednictvím RNA interference. V dnešní době se díky pokrokům v možnosti cílené editace genomu pomocí místně specifických nukleáz nabízí možnost navození haploinsuficience mutagenézí příslušného genu.

V experimentální části předkládané práce jsme se zabývali přípravou buněčného modelu DBA. Model byl připraven cílenou mutagenézí genu *RPS19* v buněčné linii MEL pomocí systému CRISPR/Cas9. Tento gen byl pro cílenou mutagenézi vybrán, jelikož se jedná o gen, jehož defekt je nejčastěji zastoupen mezi pacienty s DBA fenotypem. Buněčná linie MEL byla pro přípravu modelu užita, neboť je tato linie vhodná pro studium erytropoézy. Jde o immortalizovanou suspenzní buněčnou linii erytroidních prekurzorů odvozených z myši sleziny, které jsou zastaveny ve vývojovém stádiu proerytoblastu (Antoniou, 1991). CRISPR/Cas9 systém byl navržen tak, aby generoval dvouvláknový zlom ve 4. exonu genu *RPS19* a spustil tak reparační mašinerii NHEJ (nehomologní spojování volných konců), která často vede ke vzniku delece v místě zlomu. Vzniklá delece může způsobit posunovou mutaci, která v konečném důsledku může vést až ke „knock-outu“ mutované alely. Aby mohla proběhnout cílená mutagenéze, musely být buňky nejprve transfekovány vektorem, který nesl příslušný CRISPR/Cas9 systém. Po transfekci následoval krok preselekcce úspěšně transfekovaných buněk pomocí cytometru, čímž byla získána buněčná populace se zvýšeným podílem mutovaných buněk. K tomuto účelu posloužilo využití reportérového plasmidu ART. Plasmid ART nese kompletní gen pro GFP a gen pro RFP ve dvou neúplných verzích oddělených sekvencí rozeznávanou příslušným CRISPR/Cas9 systémem. Po rozštěpení sekvence CRISPR/Cas9 systémem, dochází k opravě zlomu, což vede ke zkompletování genu pro RFP a tím je umožněna exprese funkčního RFP. Exprese obou fluorescenčních proteinů tak posloužila k selekci úspěšně transfekovaných buněk. Protože sortování po jedné buňce do 96-jamkové destičky (tzv. single cell sorting) nebyl úspěšný, zahrnoval další postup manuální selekci

kolonií odvozených z jediného buněčného klonu ze směsné kultury vysortovaných GFP+/RFP+ buněk. Jistou nevýhodou manuálního postupu byla zvýšená existence rizika, že takto připravené linie mohou být odvozeny z více než jednoho klonu. Z 88 vyselektovaných klonů byla pozitivita na nukleotidovou delecí stanovena u 16 klonů. Pro charakterizaci byly ovšem z materiálních a časových úspor vybrány jen 3 pozitivní klony.

Prvním testem provedeným za účelem charakterizace připravených mutantních klonů byl MTT test buněčné proliferace. Cílem tohoto testu bylo zjistit, jakou mají vytvořené mutantní klony proliferační schopnost, a zda došlo vlivem mutace k jejímu narušení. Jako pozitivní kontrola byl použit připravený klon 23, který obsahoval delecii v genu *RPL5*, a u něhož byla již dříve prokázána snížená proliferační schopnost ve srovnání s *wt* buňkami. Získané výsledky ukázaly všeobecné snížení proliferačního potenciálu u mutovaných buněk v porovnání s *wt* buňkami. Nejvíce se snížená schopnost proliferace projevila u klonu 84. Množství narostlých buněk po 24 h od nasazení bylo ve srovnání s *wt* buňkami sníženo na hranici statistické významnosti a po 48 h a 72 h od nasazení byl snížený počet narostlých mutantních buněk v porovnání s *wt* buňkami již statisticky významný. Naproti tomu mutantní klon 10 sice vykazoval rovněž sníženou dynamiku růstu buněk v porovnání s *wt* buňkami, avšak snížení počtu narostlých buněk nenabývalo statistické významnosti v žádném sledovaném časovém úseku od nasazení. Tyto rozdíly v proliferačním potenciálu mezi mutovanými klony mohou být dány rozdílným typem nebo rozsahem generované mutace. Z výsledků je rovněž patrné, že zatímco v sledovaných časových úsecích 24 h, 48 h a 72 h od nasazení buněk se obecně míra snížení narostlých mutantních buněk oproti *wt* s přibývajícím časem prohlubovala, ve sledovaném časovém úseku 96 h od nasazení, došlo mezi mutantními a *wt* buňkami k setření tohoto rozdílu. To bylo pravděpodobně způsobeno tím, že po 96 h od nasazení buněk, se již začalo projevovat zpomalování buněčné proliferace a odumírání buněk vlivem vyčerpání živného média u kontrolních *wt* buněk.

V dalším kroku byla v rámci charakterizace připravených mutantních klonů analyzována míra exprese genu *RPS19* a zároveň byla provedena i analýza exprese genu *RPL5* u dříve připraveného klonu 23. K analýze byla použita metoda real-time PCR využívající systém TaqMan sond. Cílem tohoto testu bylo zjistit, zda vytvořené mutace v genech pro ribozomální proteiny měly za následek snížení exprese těchto genů v porovnání s expresí těchto genů v kontrolních *wt* buňkách. Z dosažených výsledků plyne, že ke snížení exprese genu *RPS19* došlo především u klonu 10. Následná analýza pomocí REST programu pro stanovení relativní kvantifikace genu (Relative Expression Software Tool) potvrdila statisticky vysoce významné snížení exprese u tohoto klonu. Mírné snížení exprese genu *RPS19* bylo detekováno

také u klonu 84, avšak toto snížení již nenabývalo statistické významnosti. U klonu 42 byla exprese porovnatelná s expresí *RPS19* u *wt* buněk. Tyto výsledky naznačují, že všechny delece v genu nemusí nutně zapříčinit zásadní pokles jeho transkripce do mRNA.

Již v roce 2005 Fligar *et al.* prokázali, že umlčení genu *RPS19* snižuje proliferační schopnost hematopoetických progenitorů, přičemž míra defektu erytroidního vývoje korelovala se stupněm snížené regulace *RPS19* (Flygare *et al.*, 2005). Z buněčných klonů, které byly připraveny, se pro další využití ve studiu DBA ukázal jako nejvhodnější klon 84, jelikož se u něj mutace genu *RPS19* projevila nejsignifikantnějším snížením proliferačního potenciálu. Na druhou stranu výsledky real-time PCR neukázaly v případě tohoto klonu zásadní snížení hladiny mRNA mutovaného genu, jako tomu bylo v případě klonu 10. Tento zdánlivý paradox by se dal vysvětlit tak, že defekt genu *RPS19* u klonu 84 se projevuje až na posttranskripční úrovni. Například může způsobovat nestabilitu ribosomálního proteinu a tím pádem i snížení jeho hladiny. Nebo může být u mutovaného proteinu poškozena schopnost podílet se na sestavování ribozomů. V případě další charakterizace by proto bylo vhodné provést imunoblotování a detekovat hladinu ribosomálního proteinu S19 v proteinových lyzátech připravených z testovaných mutantních buněk a *wt* buněk. Test by mohl ukázat, zda na úrovni proteinů nedošlo ke změně exprese genu *RPS19*, který byl stanoven pomocí real-time PCR. Pro přesné zjištění rozsahu a charakteru mutací v připravených klonech by bylo vhodné mutované části genů sekvenovat a na základě získaných sekvencí stanovit rozsah a charakter vytvořených mutací.

7 Závěr

Cílem výše předložené diplomové práce bylo připravit a stručně charakterizovat buněčný model Diamondovy-Blackfanovy anémie. Pro přípravu modelu bylo užito cílené editace genomu myši erytroleukemické buněčné linie MEL pomocí technologie CRISPR/Cas9. Touto technologií bylo připraveno 16 linií s mutací v genu *RPS19*. Z těchto mutantních linií byly pro další charakterizaci vybrány 3 linie. Výsledky testování mutantních linií ukázaly všeobecné snížení buněčného proliferačního potenciálu oproti buňkám standardního *wt* genotypu a sníženou hladinu mRNA mutovaného genu ve 2 testovaných mutantních klonech oproti kontrolním buňkám. Připravené buněčné linie mohou být po další charakterizaci využity ke studiu DBA patofyziologie.

8 Literatura

- Akashi K., Traver D., Miyamoto T., Weissman I. L. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404(6774): 193–197.
- Antoniou M. (1991) Induction of Erythroid-Specific Expression in Murine Erythroleukemia (MEL) Cell Lines. In: Murray E. J. Gene Transfer and Expression Protocols, Humana Press.
- Bibikova E., Youn M. Y., Danilova N., Ono-Uruga Y., Konto-Ghiorghi Y., Ochoa R., Narla A., Glader B., Lin S., Sakamoto K. M. (2014) TNF-mediated inflammation represses GATA1 and activates p38 MAP kinase in RPS19-deficient hematopoietic progenitors. *Blood* 124(25): 3791–3798.
- Boocock G. R., Morrison J. A., Popovic M., Richards N., Ellis L., Durie P. R., Rommens J. M. (2003) Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nature Genetics* 33(1): 97–101.
- Bresnick E. H., Lee H. Y., Fujiwara T., Johnson K. D., Keles S. (2010) GATA switches as developmental drivers. *The Journal of Biological Chemistry* 285(41): 31087–31093.
- Broudy V. C. (1997). Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 90(4): 1345–1364.
- Cantor A. B., Orkin S. H. (2002) Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 21(21): 3368–3376.
- Clinton C., Gazda H. T. Diamond-Blackfan Anemia. *GeneReviews* [online] [navštíveno 14. 4. 2019] Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7047/>
- Češka R., Dítě P., Štulc T., Tesař V. (2010) Interna, Triton, Praha.
- Danilova N., Sakamoto K. M., Lin S. (2008) Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. *Blood*. 112: 5228–5237.
- Davis J. M., Arakawa T., Strickland T. W., Yphantis D. A. (1987) Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 26(9): 2633–2638.
- Deisenroth C., Zhang Y. (2010) Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway. *Oncogene* 29: 4253–4260.
- Dokal I., Vulliamy T. (2010) Inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica* 95(8): 1236–1240.
- Dordal M. S., Wang F. F., Goldwasser E. (1985) The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* 116(6): 2293–2299.

- Doré L. C., Crispino J. D. (2011) Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development. *Blood* 118(2): 231–239.
- Draptchinskaia N., Gustavsson P., Andersson B., Pettersson M., Willig T. N., Dianzani I., Ball S., Tchernia G., Klar J., Matsson H., Tentler D., Mohandas N., Carlsson B., Dahl N. (1999) The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nature Genetics* 21(2): 169–175.
- Dutt S., Narla A., Lin K., Mullally A., Abayasekara N., Megerdichian C., Wilson F. H., Currie T., Khanna-Gupta A., Berliner N., Kutok J. L., Ebert B. L. (2011) Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* 117: 2567–2576.
- Egrie J. C., Browne J. K. (2001) Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *British Journal of Cancer* 84: 3–10.
- Ellis S. R., Gleizes P. E. (2011) Diamond Blackfan anemia: ribosomal proteins going rouge. *Seminars in Hematology* 48(2): 89–96.
- Fábryová V. (2017) Definície a klasifikácia anémií. In Fábryová V., (ed.): Anémie, pp. 28–31, Osveta, Martin.
- Ferreira R., Ohneda K., Yamamoto M., Philipsen S. (2005) GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Molecular and Cellular Biology* 25(4): 1215–27.
- Flygare J., Kiefer T., Miyake K., Utsugisawa T., Hamaguchi I., Da Costa L., Richter J., Davey E. J., Matsson H., Dahl N., Wiznerowicz M., Trono D., Karlsson S. (2005) Deficiency of ribosomal protein S19 in CD34+ cells generated by siRNA blocks erythroid development and mimics defects seen in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 105(12): 4627–4634
- Fujiwara Y., Browne C. P., Cunniff K., Goff S. C., Orkin S. H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(22): 12355–12358.
- Gazda H. T., Sheen M. R., Vlachos A., Choismel V., O'Donohue M. F., Schneider H., Darras N., Hasman C., Sieff C. A., Newburger P. E., Ball S. E., Niewiadomska E., Matysiak M., Zaucha J. M., Glader B., Niemeyer C., Meerpohl J. J., Atsidaftos E., Lipton J. M., Gleizes P. E., Beggs A. H. (2008) Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *American Journal of Human Genetics* 83(6): 769–780.
- Giarratana M. C., Kobari L., Lapillonne H., Chalmers D., Kiger L., Cynober T., Marden M. C., Wajcman H., Douay L. (2005) Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nature Biotechnology* 23(1): 69–74.
- Gripp K. W., Curry C., Olney A. H., Sandoval C., Fisher J., Chong J. X., UW Center for Mendelian Genomics, Pilchman L., Sahraoui R, Stabley D. L., Sol-Church K. (2014) Diamond-Blackfan anemia with mandibulofacial dystostosis is heterogeneous, including the

novel DBA genes TSR2 and RPS28. *American Journal of Medical Genetics* 164(9): 2240–2249.

Hernandez-Hernandez A., Ray P., Litos G., Ciro M., Ottolenghi S., Beug H., Boyes J. (2006) Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1. *EMBO* 25(14): 3264–3274.

Huang L. E., Gu J., Schau M., Bunn H. F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(14): 7987–7992.

Ivan M., Haberberger T., Gervasi D. C., Michelson K. S., Günzler V., Kondo K., Yang H., Sorokina I., Conaway R. C., Conaway J. W., Kaelin W. G. (2002) Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(21): 13 459–13 464.

Jelkmann W. (2004) Molecular biology of erythropoietin. *Internal Medicine* 43(8): 649–659.

Lamonica J. M., Vakoc C. R., Blobel G. A. (2006) Acetylation of GATA-1 is required for chromatin occupancy. *Blood* 108(12): 3736–3738.

Lipton J. M., Ellis S. R. (2009) Diamond-Blackfan anemia: diagnosis, treatment, and molecular pathogenesis. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 23(2): 261–282.

Lipton J. M., Federman N., Khabbaze Y., Schwartz C. L., Hilliard L. M., Clark J. I., Vlachos A. (2001) Osteogenic sarcoma associated with Diamond-Blackfan anemia: a report from the Diamond-Blackfan anemia registry. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 23(1): 39–44.

Livnah O., Stura E. A., Middleton S. A., Johnson D. L., Jolliffe L. K., Wilson I. A. (1999) Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 283(5404): 987–990.

Lodish H., Flygare J., Chou S. (2010) From stem cell to erythroblast: regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones. *IUBMB Life* 62(7): 492–496.

Ludwig L. S., Gazda H. T., Eng J. C., Eichhorn S. W., Thiru P., Ghazvinian R., George T. I., Gotlib J. R., Beggs A. H., Sieff C. A., Lodish H. F., Lander E. S., Sankaran V. G. (2014) Altered translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia. *Nature Medicine* 20(7): 748–753.

Mamrak N. E., Shimamura A., Howlett N. G., (2016). Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia. *Blood Reviews* 31(3): 93–99.

Martin D. I., Orkin S. H. (1990) Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes & Development* 4(11): 1886–1898.

McGowan K. A., Li J. Z., Park C. Y., Beaudry V., Tabor H. K., Sabnis A. J., Zhang W., Fuchs H., de Angelis M. H., Myers R. M., Attardi L. D., Barsh G. S. (2008) Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nature Genetics* 40: 963–970.

- Merika M., Orkin S. H. (1993) DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Molecular and Cellular Biology* 13(7): 3999–4010.
- Miyake K., Utsugisawa T., Flygare J., Kiefer T., Hamaguchi I., Richter J., Karlsson S. (2008) Ribosomal protein S19 deficiency leads to reduced proliferation and increased apoptosis but does not affect terminal erythroid differentiation in a cell line model of Diamond-Blackfan anemia. *Stem Cells* 26(2): 323–329.
- Muta K., Krantz S. B., Bondurant M. C., Dai C. H. (1995) Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* 86(2): 572–580.
- Ney P. A. (2011) Normal and disordered reticulocyte maturation. *Current Opinion in Hematology* 18(3): 152–157.
- Nishikawa M., Tahara T., Hinohara A., Miyajima A., Nakahata T., Shimosaka A. (2001) Role of the microenvironment of the embryonic aorta-gonad-mesonephros region in hematopoiesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 938: 109–116.
- Pevny L., Lin C. S., D'Agati V., Simon M. C., Orkin S. H., Costantini F. (1995) Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 121(1): 163–172.
- Pospíšilová D., Čmejla R. (2013) Dědičné anémie a syndromy selhání kostní dřeně. In Pospíšilová Š., Dvořáková D., Mayer J. (ed.): *Molekulární hematologie*, pp. 290–295, Galén, Praha.
- Prchal J. T. (2016) Clinical manifestations and classification of erythrocyte disorders. In Kaushansky K. (ed.): *Williams hematology*, Ninth edition. pp. 503–510, McGraw-Hill Education, New York.
- Ridanpää M., van Eenennaam H., Pelin K., Chadwick R., Johnson C., Yuan B., van Venrooij W., Pruijn G., Salmela R., Rockas S., Mäkitie O., Kaitila I., de la Chapelle A. (2001) Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia. *Cell* 104(2): 195–203.
- Ruggero D., Shimamura A. (2014) Marrow failure: a window into ribosome biology. *Blood* 124(18): 2784–2792.
- Sankaran V. G., Ghazvinian R., Do R., Thiru P., Vergilio J. A., Beggs A. H., Sieff C. A., Orkin S. H., Nathan D. G., Lander E. S., Gazda H. T. (2012) Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *Journal of Clinical Investigation* 122: 2439–2443.
- Semenza G. L. (2001) HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current Opinion in Cell Biology* 13(2): 167–171.

- Singer D., Cooper M., Maniatis G. M., Marks P. A., Rifkind R. A. (1974) Erythropoietic differentiation in colonies of cells transformed by Friend virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71(7): 2668–2670.
- Sirén A. L., Fratelli M., Brines M., Goemans C., Casagrande S., Lewczuk P., Keenan S., Gleiter C., Pasquali C., Capobianco A., Mennini T., Heumann R., Cerami A., Ehrenreich H., Ghezzi P. (2001) Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(7): 4044–4049.
- Sposi N. M. (2015): Interaction between Erythropoiesis and Iron Metabolism in Human β -thalassemia-Recent Advances and New Therapeutic Approaches. In Munshi A. (ed.): *Inherited Hemoglobin Disorders*. IntechOpen.
- Tavian M., Péault B. (2005) Embryonic development of the human hematopoietic system. *The International Journal of Developmental Biology* 49(2-3): 243–250.
- TTCSC Group, (1996) Positional cloning of a gene involved in the pathogenesis of Treacher Collins syndrome. *Nature Genetics* 12(2): 130-136.
- Vlachos A., Ball S., Dahl N., Alter B. P., Sheth S., Ramenghi U., Meerpohl J., Karlsson S., Liu J. M., Leblanc T., Paley C., Kang E. M., Leder E. J., Atsidaftos E., Shimamura A., Bessler M., Glader B., Lipton J. M. (2008) Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *British Journal of Haematology* 142: 859–876.
- Vlachos A., Rosenberg P. S., Atsidaftos E., Alter B. P., Lipton J. M. (2012) Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood* 119(16): 3815–3819.
- Walrafen P., Verdier F, Kadri Z, Chrétien S, Lacombe C, Mayeux P. (2005) Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* 105(2): 600–608.
- Williams M. S., Ettinger R. S., Hermanns P., Lee B., Carlsson G., Taskinen M., Mäkitie O. (2005) The natural history of severe anemia in cartilage-hair hypoplasia. *The American Journal of Medical Genetics - Part A* 138(1): 35–40.
- Witthuhn B. A., Quelle F. W., Silvennoinen O., Yi T., Tang B., Miura O., Ihle J. N. (1993) JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 74(2): 227–36.
- Wu H., Liu X., Jaenisch R., Lodish H. F. (1995) Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83(1): 59–67.
- Wu H., Klingmüller U., Acurio A., Hsiao J. G., Lodish H. F. (1997) Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(5): 1806–1810.

Zivot A., Lipton J. M., Narla A., Blanc L. (2018) Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. *Molecular Medicine* 24(1): 11.

9 Přílohy

Příloha č. 1: Hodnoty C_T naměřené při prvním opakování real-time PCR experimentu.

Příloha č. 2: Hodnoty C_T naměřené při druhém opakování real-time PCR experimentu.

Příloha č. 3: Hodnoty C_T naměřené při třetím opakování real-time PCR experimentu.

Příloha č. 4: Hodnoty průměrné relativní exprese genu *RPS19* u testovaných mutantních klonů ve vztahu k *wt* a statistické zhodnocení významnosti změny exprese mutantních klonů vůči *wt*.

Příloha č. 1: Hodnoty C_T naměřené při prvním opakování real-time PCR experimentu.

I. Opakování					
	<i>RPS19</i>			Průměr	SD
wt2	30,82	30,61	30,31	30,57871	0,258211
wt10	29,83	29,83	29,83	29,82792	0,002101
10	31,74	31,71	31,74	31,73042	0,018615
42	30,04	30,13	30,13	30,10143	0,05631
84	30,68	30,61	30,58	30,62372	0,053209
	<i>Actb</i>				
wt2	17,66	17,35	17,66	17,55831	0,18331
wt10	17,3	17,31	17,32	17,30997	0,006746
10	17,28	17,27	17,22	17,25312	0,031251
42	17,13		17,15	17,14067	0,017741
84	17,31	17,34	17,32	17,32357	0,01236

Příloha č. 2: Hodnoty C_T naměřené při druhém opakování real-time PCR experimentu.

II. Opakování					
	<i>RPS19</i>			Průměr	SD
wt 2	30,46	30,46	30,52	30,47864	0,032044
wt 10	30,31	30,27	30,33	30,30238	0,025801
10	31,84	31,89	31,71	31,81586	0,093369
42	30,53	30,49	30,51	30,51086	0,018226
84	30,95	30,88	30,91	30,91081	0,034633
	<i>RPL5</i>				
wt 2	19,51	19,50	19,50	19,50363	0,006064
wt 10	18,79	18,80	18,80	18,79736	0,003611
23	19,65	19,57	19,85	19,69191	0,117757
	<i>Actb</i>				
wt 2	17,69	17,71	17,72	17,70871	0,015509
wt 10	17,08	17,08	17,08	17,08117	0,003029
10	17,73	17,76	17,75	17,75018	0,015225
23	17,34	17,30	17,32	17,31959	0,024448
42	17,68	17,7	17,73	17,70392	0,029158
84	17,73	17,74	17,74	17,74105	0,005762

Příloha č. 3: Hodnoty C_T naměřené při třetím opakování real-time PCR experimentu.

III. Opakování					
	<i>RPS19</i>			Průměr	SD
wt 10	31,07	31,09	31,02	31,06051	0,035474
10	32,39	32,38	32,43	32,39687	0,028381
42	30,75	30,66	30,69	30,70111	0,045242
84	31,07	31,13	31,14	31,11175	0,037325
	<i>Actb</i>				
wt 10	17,69	17,71	17,66	17,68825	0,022484
10	17,78	17,77	17,78	17,7782	0,008497
42	17,55	17,58	17,58	17,57017	0,017925
84	17,62	17,6	17,59	17,60274	0,016589

Příloha č. 4: Hodnoty průměrné relativní exprese genu *RPS19* u testovaných mutantních klonů ve vztahu k *wt* a statistické zhodnocení významnosti změny exprese vůči *wt*.

klon	gen	relativní exprese (I. opakování)	relativní exprese (II. opakování)	relativní exprese (III. opakování)	průměrná relativní exprese	p hodnota
10	<i>RPS19</i>	0,306	0,476	0,421	0,401	0,005
42	<i>RPS19</i>	0,876	1,140	1,182	1,066	0,931
84	<i>RPS19</i>	0,692	0,886	0,910	0,829333	0,150