

**UNIVERZITA PALACKÉHO
V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Posttranskripční umlčování genů regulujících
buněčný cyklus pomocí siRNA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jan Grohmann
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Zuzana Skrášková
Rok:	2016

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 6.5. 2016

Děkuji slečně Mgr. Zuzaně Skráškové za její ochotu, vstřícnost, cenné připomínky a rady, které mi jako vedoucí mé bakalářské práce poskytla při jejím zpracování. Mé poděkování patří také kolektivu pracovníků laboratoře růstových regulátorů, za přátelský přístup a vynikající spolupráci při realizaci mého výzkumu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora Jan Grohmann

Název práce Posttranskripční umlčování genů regulujících buněčný cyklus pomocí siRNA

Typ práce Bakalářská práce

Pracoviště Katedra biochemie

Vedoucí práce Mgr. Zuzana Skrášková

Rok obhajoby práce 2016

Abstrakt Buněčný cyklus a jeho deregulace často přispívají ke vzniku karcinogeneze. Proliferace buněk je řízena skupinou molekul označovaných cyklin-dependentní kinasy, přičemž molekula cyklinu je nezbytná pro aktivitu celého komplexu.

Práce je zaměřena na studium vlivu umlčení cyklinů na buněčný cyklus, přičemž pro umlčení genů kódujících cykliny byla zvolena metoda RNA interference. Jelikož se jedná o metodu posttranskripčního umlčení, lze výsledný efekt sledovat na úrovni proteinů metodou western blotting. Jako druhá srovnávací metoda byla použita průtoková cytometrie pro určení fáze buněčného cyklu v ovlivněných buňkách.

Výsledky této práce umožňují lepší poznání v oblasti regulace buněčného cyklu u nádorových buněk a získání nových poznatků, které mohou být využity v protinádorové terapii.

Klíčová slova CDK, cykliny, RNAi, siRNA

Počet stran 48

Počet příloh 0

Jazyk Český

Bibliographic identification

Author's first name and surname	Jan Grohmann
Title	Posttranscriptional gene silencing of cell cycle regulators by siRNA
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Zuzana Skrášková
The year of presentation	2016
Abstract	<p>The cell cycle and its deregulation often contribute to carcinogenesis. Cell proliferation is controlled by group of molecules known as cyclin-dependent kinases and the cyclin molecule is essential for activity of the whole complex.</p> <p>This thesis is focused on studying the effect of cyclin suppression on the cell cycle. For silencing genes encoding cyclins, an RNA interference approach was used. Since this method is based on post-transcriptional suppression, the resulting effect can be therefore observed on a protein level by means of western blotting method. As a second comparative method, the flow cytometry has been chosen to determine the phase of the cell cycle in affected cells.</p> <p>The results of this research enable a better understanding of the cancerous cells' cell cycle regulation and an acquisition of new information, which can be used in anti-cancer therapy.</p>
Keywords	CDK, cyclins, RNAi, siRNA
Number of pages	48
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1 Úvod	1
2 Současný stav řešené problematiky	2
2.1 Regulace buněčného cyklu	3
2.1.1 Obecná struktura CDK a cyklinů	4
2.1.2 Komplex CDK4-cyklin D a CDK6-cyklin D.....	6
2.1.3 CDK2 a její vazební partneři	7
2.1.4 CDK1 a její vazební partneři	8
2.1.4.1 Průběh mitózy	9
2.1.5 CDK-aktivační kinasa (CAK).....	10
2.1.7 Cyklin C a jeho vazební partneři.....	11
2.1.8 CDK inhibitory (CKI)	12
2.2 Posttranskripční umlčování genů	12
2.2.1 RNA interference (RNAi).....	13
2.2.2 Využití RNAi při nádorové terapii	17
3 Experimentální část	20
3.1 Cíl práce	21
4 Materiál a metodika	21
4.1 Přístroje a laboratorní vybavení	21
4.2 Seznam použitých chemikálií	21
4.3 Seznam použitých roztoků	23
4.4 Použité protilátky	23
4.5 Použitá buněčná linie	24
4.6 Kultivace buněk a transfekce.....	24
4.7 Sklizení buněk a lyzace	25
4.8 SDS-PAGE, western blotting, imunodetekce	26
4.9 Průtoková cytometrie	26
5 Výsledky	28
5.1 Umlčení cyklinu D.....	28
5.2 Umlčení cyklinu E	31
5.3 Umlčení cyklinu A	33
5.4 Umlčení cyklinu B	35
6 Diskuze	39
7 Závěr	41
8 Literatura	42
9 Seznam symbolů a zkratk	47

1 Úvod

Každý rok stoupá na celém světě počet pacientů trpících nádorovým onemocněním. Každoročně je tak odhaleno více než 14 milionů nových případů rakoviny. Jako nejčastější typ rakoviny je podle statistických údajů rakovina prsu u žen a rakovina plic u mužů. Jako jedna z možností léčby se v dnešní době nejvíce využívá chirurgická léčba, chemoterapie a radioterapie. Nicméně tyto přístupy jsou většinou zdlouhavé s velkou řadou omezení a vedlejších účinků pro pacienta (Torre *et. al.*, 2015; Boman et Wicha, 2008).

V dnešní době jsou vyvíjeny nové způsoby a postupy léčby rakoviny, z nichž některé jsou teprve v počáteční nebo již v klinické fázi vývoje. Jedním z nabízejících se řešení je ovlivnění regulace CDK a cyklinů, které hrají klíčovou roli při syntéze DNA a buněčného dělení. Ovlivnění funkce těchto proteinů může významně narušit normální průběh buněčného dělení, popřípadě apoptosu, což může následně vést ke vzniku karcinogeneze. Důkazem toho jsou zvýšené hladiny CDK a cyklinů pozorované u řady různých lidských typů rakoviny. Je velmi důležité pochopit průběh molekulárních mechanismů v buněčném cyklu v souvislosti s působením chemoterapeutických látek. Výsledky vědeckých prací jsou pak využity pro zlepšení účinnosti cílených terapií, snížení vedlejších účinků a překonání rezistence proti těmto chemoterapeutickým látkám (Johansson *et al.*, 2008).

Jednou z vyvíjejících se metod v oblasti léčby a studia rakoviny je posttranskripční umlčování genů. V rámci tohoto tématu je zkoumána RNA interference, což je metoda, která prostřednictvím specifické interferující RNA umožňuje cílené umlčení genů, především těch, které jsou součástí významných regulačních drah nádorových buněk.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Regulace buněčného cyklu

Buněčné dělení je přísně regulovaný proces, kdy z mateřské buňky živého organismu vznikají buňky dceřiné. Schopnost buněk dělit se, je řízena zejména přítomností dvou tříd molekul - cyklin-dependentních kinas (CDK), patřících do rodiny serin/threoninových kinas a jejich vazebných partnerů - cyklinů (Morgan, 1997). Aktivita CDK je závislá na této regulační podjednotce. Na základě sekvence kinasové domény byly CDK zařazeny do skupiny CMGC kinas spolu s mitogen-aktivovanými proteinkinasami (MAPK), glykogen syntasakinasou-3 β (Gsk3 β) a rodinou proteinů podobných s CDK (Manning, 2002). V průběhu evoluce docházelo ke zvyšování počtu CDK. Například houby obsahují 6 až 8 CDK a 9 až 15 cyklinů, zatímco mouchy obsahují 11 CDK a 14 cyklinů. U lidských buněk bylo dosud popsáno 20 CDK a 29 cyklinů (Cao *et al.*, 2014).

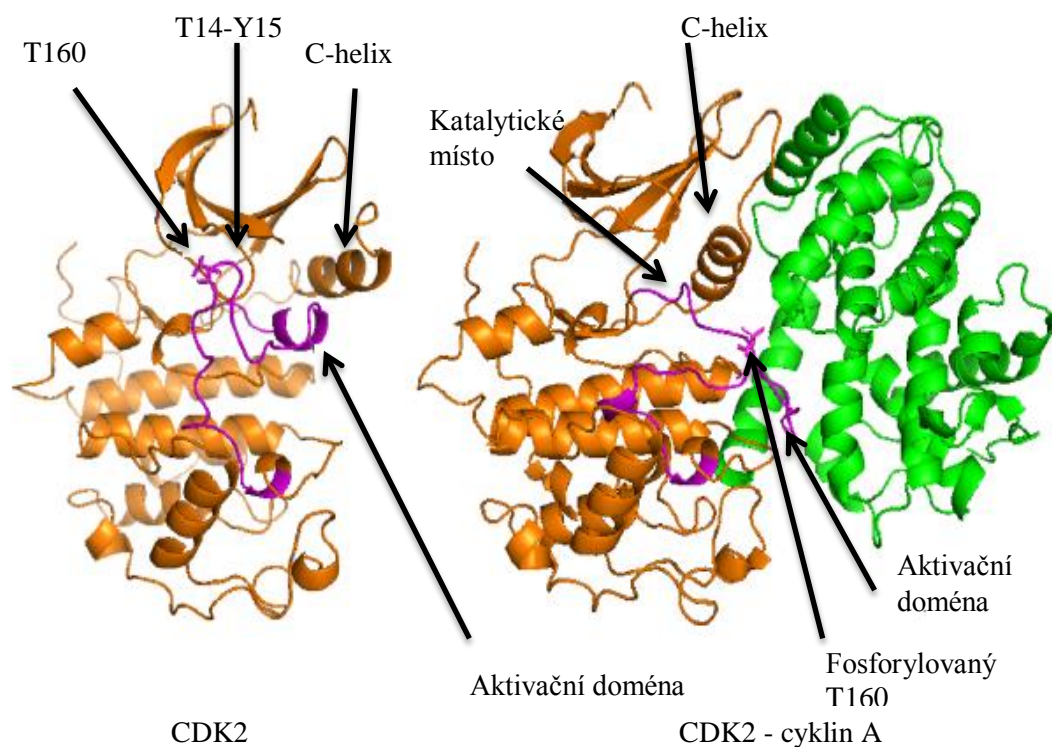
V posledních letech biochemická analýza malé skupiny CDK, jejich regulačních proteinů a substrátů, umožnila vytvořit zjednodušené schéma pro pochopení regulace buněčného cyklu. Po dokončení cytokineze mohou nově vytvořené buňky projít dalším buněčným dělením a nebo zastavit proliferaci. Buňky, které zvolí druhou možnost, se zastaví ve stavu obecně popisovaném jako klidový, neboli G0. Z tohoto stavu mohou opět přejít do G1 fáze a pokračovat v proliferaci (Malumbres *et Barbacid*, 2005).

Buněčný cyklus je rozdělen na čtyři fáze. Během těchto dvou fází musí buňka provést dvě základní podmínky buněčného dělení. Za prvé musí nasyntetizovat nový genetický materiál. K replikaci DNA dochází v S fázi buněčného cyklu. Posléze je nutné rozdělit všechny buněčné komponenty mezi dvě identické dceřiné buňky. Druhou podmínkou buněčného dělení je tedy průběh M fáze, čili mitózy. Zbylé dvě fáze, G1 a G2, představují časový úsek, během kterého buňka vykoná všechny důležité procesy pro správný průběh S a M fáze. Jedná se například o růst buňky nebo ukládání látek nutných pro syntézu organel a DNA (Norbury *et Nurse*, 1992).

2.1.1 Obecná struktura CDK a cyklinů

Velikost jednotlivých CDK je variabilní a kolísá přibližně od 250 aminokyselin, které zahrnují pouze katalytickou serin/threoninovou doménu, po velké proteiny s více než 1500 aminokyselinami s aminokoncovým a nebo karboxykoncovým prodloužením variabilní délky. Jako všechny kinasy mají i CDK strukturu dvou laloků. Aminokoncový lalok obsahuje β -skládané listy, zatímco karboxykoncový lalok obsahuje velké množství α -helixů. Aktivní místo je vloženo mezi oběma laloky. N-koncový lalok obsahuje oblast bohatou na glycin, tzv. G-smyčku a jeden hlavní helix, C-helix. C-koncový lalok obsahuje aktivační segment, který se rozpíná od DFG motivu, hrajícím důležitou roli v regulaci kinasové aktivity, po APE motiv a zahrnuje také fosforylačně senzitivní místo. V případě CDK2 se jedná konkrétně o threonin v pozici 160, u jiných CDK se mohou tato místa lišit (Malumbres, 2014).

Každá CDK je charakterizována katalytickým jádrem s ATP-vazebnou kapsou (Obr. 1), PSTAIRE podobnou cyklin-vazebnou doménou a aktivní T-smyčkou. Tyto části hrají hlavní roli v aktivaci CDK, která zahrnuje interakci s cyklinem přes PSTAIRE helix tak, aby došlo k přemístění T-smyčky a odkrytí vazebného místa pro substrát a dále k přeskupení důležitých postranních řetězců aminokyselin v aktivním místě tak, aby byly vytvořeny vhodné podmínky pro přenos fosfátu. Většina členů rodiny CDK se vyznačuje přítomností velkého množství fosforylačních míst. Například fosforylace threoninu 14 (T14) a tyrosinu 15 (Y15) CDK1 má inhibiční charakter a je zprostředkována inhibičními kinasami Myt1 (myelin transkripční faktor) a Wee1. Naopak fosforylace T-smyčky v pozici T161 má aktivační charakter a je zprostředkována CDK-aktivační kinasou (CAK). Fosforylace T161 má za následek lepší vazbu substrátu, tím se zvyšuje stabilita komplexu a dochází k úplné CDK aktivaci (Atherton-Fessler *et al.*, 1993; Pavletich, 1999).



Obr. 1: Struktura monomerní CDK2 a její konformace po vazbě cyklin A (Upraveno podle Malumres, 2014)

Velká rodina proteinů, vazebných partnerů CDK, se nazývá cykliny. Jedná se o skupinu přibližně 30 proteinů, které se liší hmotností od 35 do 90 kDa. Tyto proteiny jsou strukturně definovány tzv. cyklinovým boxem, což je oblast 100 aminokyselin, které vytváří shluk pěti α -helixů. Mnoho cyklinů má dva cyklinové boxy, jeden aminokoncový pro vazbu CDK a druhý karboxykoncový box, který je obvykle nutný pro správné poskládání molekuly cyklinu. Ve srovnání s CDK vykazují cykliny menší podobnost v sekvenci aminokyselin. Rodina cyklinů vyskytující se v lidských buňkách obsahuje přibližně 29 proteinů, které jsou rozděleny do tří hlavních skupin a 16 podskupin (Tab.I) (Cao *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2013).

Tab. I: Přehled tří hlavních skupin cyklinů, jejich členů a vazebných partnerů.

Hlavní skupina	Cyklin	CDK
B cyklin	A, B, D, E, F, G, J, I, O	CDK1, CDK2, CDK4, CDK6
Y cyklin	Y	CDK5
C cyklin	C, H, K, L, T	CDK8, CDK7, CDK9, CDK11

2.1.2 Komplex CDK4-cyklin D a CDK6-cyklin D

Cyklin D hraje nejdůležitější roli v G1 fázi. Známe tři typy cyklinu D - D1, D2 a D3. Ze jmenovaných cyklinů je v buňkách nejvíce exprimován cyklin D3. Jeho dva nejdůležitější vazební partneři jsou CDK4 a CDK6 (Obr. 2) (Sherr, 1993). CDK4, do roku 1991 známá jako PSK-J3, byla objevena Hanksem *et al.* (1987). Následný vzestup PCR technologie pomohl k objevu PLSTIRE, dnes známé jako CDK6 (Malumbres *et Barbacid*, 2005).

Hlavní úloha komplexů CDK4-cyklin D a CDK6-cyklin D spočívá ve fosforylaci retinoblastomového proteinu (Rb). Po dokončení mitózy se Rb nachází v hypofosforylovaném stavu. V průběhu G1 fáze nebo při opětovném přechodu buňky z G0 do G1 fáze je Rb protein postupně fosforylován. Při přechodu buňky z G1 do S fáze je Rb již zcela fosforylován. V hyperfosforylovaném stavu setrvává až do pozdní mitózy, kdy dochází k jeho defosforylaci. Z toho vyplývá, že Rb v hypofosforylovaném stavu drží buňky v G1 fázi, naopak fosforylaci dochází k inhibici účinků Rb (Hinds *et al.*, 1994).

Rb a jeho příbuzné proteiny p107 a p130 tvoří proteinovou rodinu regulující buněčné dělení. Tyto proteiny ovlivňují přechod z G1 do S fáze prostřednictvím regulace E2F-responsivních genů. Také se podílí na ukončení G0 fáze, prostorové organizaci replikace a genomové replikaci. Proteiny Rb rodiny přispívají k umlčení genů, které v buňce vyvolávají senescenci nebo diferenciaci (Cobrinik, 2005).

K zastavení transkripce pomocí Rb proteinu dochází několika rozdílnými mechanismy. Prvním způsobem je vazba Rb proteinu přímo na transaktivační doménu E2F, čímž je znemožněno transkripčním faktorům zahájit expresi cílových genů. Ve druhém případě dochází ke spojení Rb s chromatin-remodelujícími enzymy, což má za následek opět blokaci transaktivační domény E2F (Harbour *et Dean*, 2000). Pokud je Rb navázané na E2F, nemůže dojít k transkripci a buňka se nedostane do S fáze. I když počáteční fosforylace Rb proteinu je řízena komplexy CDK4-cyklin D a CDK6-cyklin D, za ireversibilní inaktivaci tohoto proteinu zodpovídá komplex CDK2-cyklin E (Malumbres *et Barbacid*, 2005).

Degradace cyklinů typu D je zprostředkována fosforylací na T286 pomocí GSK-3 β . Tato fosforylace je rozpoznána F-box FBX4 SCF E3 ubiquitin ligasou. Aby FBX4 rozpoznal fosforylovaný cyklin, musí být přítomen $\alpha\beta$ krystalin. Předpokládá se tedy, že komplex SCF^{FBX4}- $\alpha\beta$ ^{krystalin} může přímo ubiquitinovat a degradovat cyklin D. Tuto teorii potvrzuje fakt, že při umlčení FBX4 a $\alpha\beta$ krystalinu došlo v buňkách k prodloužení poločasu rozpadu cyklinu D na více než dvojnásobek. Umlčení FBX4 také stabilizuje cyklin D2, což nasvědčuje tomu, že komplex SCF^{FBX4}- $\alpha\beta$ ^{krystalin}, může regulovat proteolýzu všech cyklinů typu D (Lin *et al.*, 2006)

2.1.3 CDK2 a její vazební partneři

CDK2 byla objevena třemi nezávislými přístupy v klonování založenými na komplementaci *cdc28* mutantů *S. cerevisiae* interakcí s cyklinem A (Malumbres *et Barbacid*, 2005).

Cyklin E vytváří spolu s CDK2 komplex, který hraje důležitou roli při přechodu buňky do S fáze (Obr. 2). Jeho koncentrace narůstá na přechodu G1 a S fáze. Jsou známy dva typy cyklinu E - E1 a E2, které vykazují 75% podobnosti v cyklinovém boxu a 47% similaritu v kódující sekvenci. Hlavní role komplexu CDK2-cyklin E v buněčném cyklu spočívá v dokončení fosforylace Rb, kterou započaly komplexy CDK4-cyklin D a CDK6-cyklin D (Geng *et al.*, 2003). Rb protein je poté udržován v hyperfosforylovaném stavu pomocí komplexů CDK2-cyklin E, CDK2-cyklin A a později CDK1-cyklin A až do ukončení mitózy (Sherr *et Roberts*, 1999).

Komplex CDK2-cyklin E také kooperuje s CDK6 během přechodu buňky z G1 do S fáze. Tato kooperace umožňuje formování prereplikačních komplexů. To například zahrnuje vazbu MCM komplexu (Minichromosome maintenance protein complex) na počátky replikace a iniciaci replikace DNA. Poté, co buňka vstoupí do S fáze, musí být komplex CDK2-cyklin E umlčen, aby nedošlo k opětovné replikaci DNA. Další substráty tohoto komplexu, které jsou aktivní během S fáze, jsou proteiny působící při modifikaci histonů, opravě DNA a duplikaci a zrání centrozomů (Hwang *et Clurman*, 2005).

Množství cyklinu E v průběhu cyklu je řízeno zejména na úrovni transkripce a degradace. Jelikož gen cyklinu E je cílem E2F transkripčních faktorů, je exprese

tohoto genu nepřímo řízena regulací Rb proteinu. Cyklin E může být ubiquitinován dvěma způsoby. Nenavázaný cyklin E může být degradován pomocí Cul-3. Pokud je cyklin E ve vazbě s CDK2, začne být chráněn proti této ubiquitinaci. Přitom je fosforylován na reziduích T380, T62, S372 a S384, kde CDK2 primárně fosforyluje cyklin E na S384, zatímco GSK3 fosforyluje T380. Fosforylaci těchto aminokyselin rozpoznává Fbw7. Fbw7 je jedna ze substrátových rozpoznávacích jednotek řadící se do rodiny ubiquitin ligas - SCF komplex. Aktivace CDK2 a GSK3 tedy urychluje degradaci cyklinu E. Ve chvíli, kdy se CDK2 již neváže na cyklin E, dochází k interakci mezi CDK2 a cykliny A1 a A2 (Obr. 2) (Welcker *et al.*, 2003). Komplex CDK2-cyklin A fosforyluje poměrně velké množství proteinů, které jsou potřebné pro správné dokončení S fáze. Tyto proteiny zahrnují regulátory cyklinu A (Rb), transkripční faktory (E2F1), proteiny podílející se na replikaci DNA, modifikaci histonů, proteolýze a proteiny, jež se podílí na přechodu buňky kontrolními body buněčného cyklu (p53, p21^{Cip1}). Na konci S fáze se cykliny typu A váží na CDK1 (Sherr *et Roberts*, 1999; Malumbres *et Barbacid*, 2005).

2.1.4 CDK1 a její vazební partneři

Jako první CDK byla objevena právě CDK1 pomocí genetického skenování mutantů *Schizosaccharomyces pombe* a *Saccharomyces cerevisiae*, která vykazovala defekt buněčného cyklu. Později byl objeven homologní protein i v lidských buňkách. Tento protein známý původně jako CDC2 byl v roce 1991 přejmenován na CDK1. CDK1 váže dvě hlavní izoformy cyklinu B - B1 a B2 (Malumbres *et Barbacid*, 2005).

Během G2 fáze je cyklin A degradován ubiquitin řízenou proteolýzou, zatímco cyklin B je aktivně vytvářen. V důsledku toho se cyklin B váže na CDK1 a vytváří komplex, který je nezbytný pro spuštění a průběh mitózy (Obr. 2) (Malumbres *et Barbacid*, 2005). Před samotnou mitózou je komplex CDK1-cyklin B udržován inaktivní ve fosforylovaném stavu. Na konci G2 fáze se již koncentruje velké množství inaktivního komplexu CDK1-cyklin B. Tento komplex je aktivován fosfatou CDC25, která defosforyluje CDK1 v místech, která byla dříve fosforylována kinasami WEE1 a MYT1 v pozicích T14 a T15. Buňka tak vstupuje do mitózy (Chow *et al.*, 2011).

Komplex cyklinu B a CDK1 interaguje i s cyklinem F. Tento velký cyklin (85 kDa) vytváří spolu s CDK1-cyklinem B aktivní komplex, který vykazuje histon H1 kinasovou aktivitu (Kong *et al.*, 2000).

2.1.4.1 Průběh mitózy

Mitóza je část buněčného cyklu, ve které se duplikované chromozomy v jádře buňky rozdělí na dvě identické části. Skládá se z pěti fází - profáze, prometafáze, metafáze, anafáze a telofáze (O'Connor, 2008).

Během profáze se komplex CDK1-cyklin B váže na centrozom, kde zahájí jeho separaci fosforylací proteinu kinesinu 5 (EG5). Komplex CDK1-cyklin B je také zapojen ve strukturních procesech jako je například chromozomální kondenzace, fragmentace Golgiho sítě a kolaps jaderné laminy. Inaktivace tohoto komplexu je důležitá pro správné ukončení mitózy (Malumbres *et Barbacid*, 2005). Jakmile dojde ke kondenzaci chromozomů a poté k jejich seřazení do ekvatoriální roviny buňky (metafáze), dochází k deaktivaci CDK1 a uvolnění sesterských chromatid prostřednictvím aktivace separasy. Protein separasa štěpí kohesin na podjednotce SCC1, což způsobí uvolnění chromatid (Musacchio *et Salmon*, 2007).

K inaktivaci CDK1 na konci mitózy dochází díky degradaci cyklinu B proteasomem poté, co je cyklin B ubiquitinován E3 ubiquitin ligasou APC/C (anafázi-zprostředkující komplex). Komplex APC/C je aktivován vazbou podjednotky CDC20 (protein cyklu buněčného dělení), která v tomto případě působí jako substrát pro APC/C a zároveň ho přímo aktivuje (Kimata *et al.*, 2008). Pokud v buňkách nedojde k produkci CDC20, průběh buněčného cyklu se prodlouží, ale nezastaví se. V tomto případě funkci CDC20 mohou nahradit proteiny WEE1 a MYT1 inhibující komplex CDK1-cyklin B. Poté, co dojde k inhibici komplexu CDK1-cyklin B, následuje ukončení mitózy a degradace cyklinu B (Chow *et al.*, 2011).

Po anafázi je komplex APC/C řízen převážně pomocí proteinu CDH1, tzn. substrát CDC20 je nahrazen CDH1. CDH1 tedy přebírá funkci proteinu CDC20, který je následně také označen k degradaci. Komplex APC/C^{CDH1} pokračuje v ubiquitinaci dalších proteinů jako jsou mitogenní proteiny cyklin A a B, aurora kinasy A a B a DNA replikační proteiny. Další degradací cyklinu B udržuje

komplex APC/C^{CDH1} CDK1 inaktivní, což má za následek ukončení mitózy a vstup buňky do G1 fáze (Peters, 2006; Pesin *et Orr-Weaver*, 2008).

2.1.5 CDK-aktivační kinasa (CAK)

CDK-aktivační kinasa je pravděpodobně nejdůležitější kinasou v regulaci buněčného cyklu. V současné době se předpokládá, že CAK má za úkol aktivovat veškeré CDK, které se podílí na průběhu cyklu (Obr. 2). CAK je tedy důležitá pro aktivaci CDK1, CDK2, CDK4 i CDK6. Tato kinasa se skládá ze tří podjednotek - CDK7, cyklinu H a komplexu MAT1. CAK je vyžadována během celého buněčného cyklu, což napovídá, že umlčení, popřípadě delece CDK7, mohou být využity v protinádorové terapii (Lolli *et Johnson*, 2005).

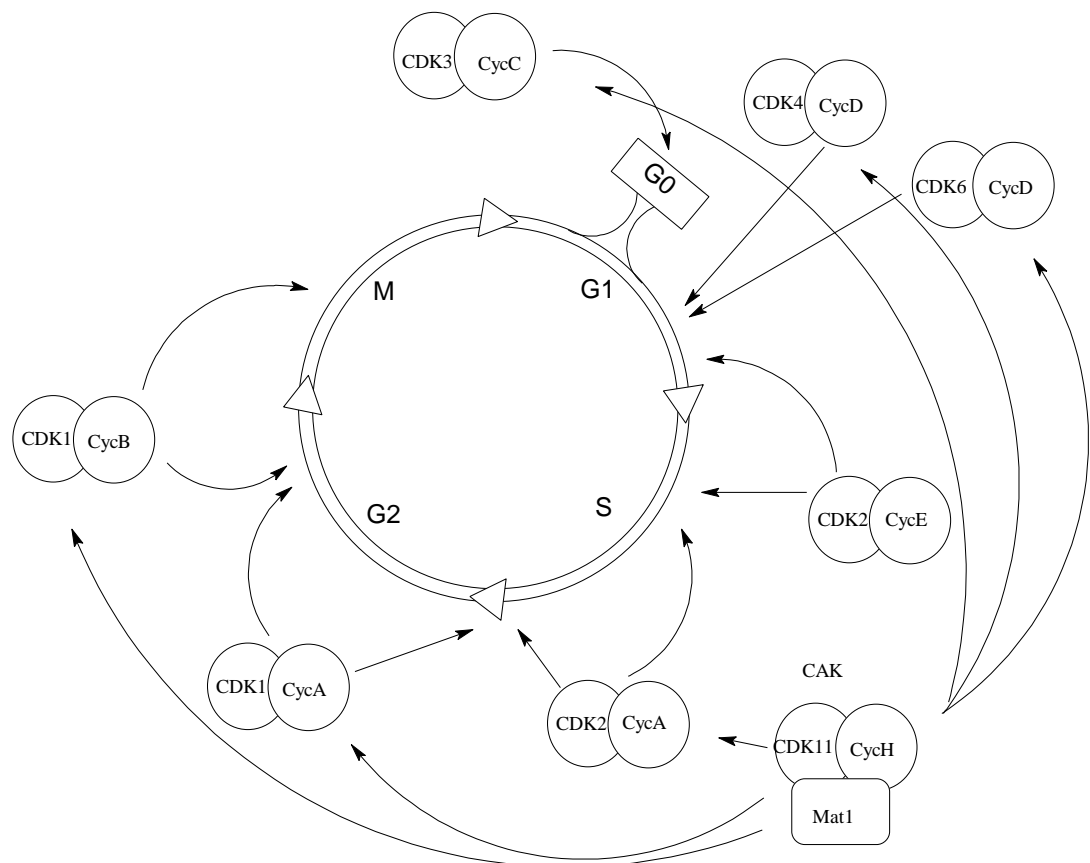
Pro CDK2 vyžaduje aktivace dva kroky. V první řadě dochází po vazbě CDK2 a cyklinu A k významným konformačním změnám kinasy, což vede ke konfiguraci katalytického místa pro vazbu ATP. Druhým krokem je pak fosforylace threoninu 160 pomocí CAK (Stevenson, 2002). Jelikož fosforylace T160 nebyla pozorována u monomerních forem CDK, předpokládá se, že je stimulována vazbou CDK s příslušným cyklinem. U monomerních CDK tedy aktivační segment T160 není pro CAK přístupný. Sama CDK7 je fosforylována v aktivačním segmentu na T170. Ovšem oproti jiným CDK tato fosforylace není esenciální pro její kinasovou aktivitu. Přítomnost faktoru MAT1 totiž může nahradit fosforylaci CDK7, což je dostačující pro aktivaci komplexu CDK7-cyklin H. CDK7 má také druhé aktivační místo na S164. Tato druhá fosforylace má za následek zlepšení aktivace a vazby cyklinu. Aktivita CDK7 se během buněčného cyklu nemění, výjimkou je pouze G0 fáze, kdy je aktivita této kinasy nižší (Lolli *et Johnson*, 2005).

Aktivita CAK může být inhibována fosforylací podjednotky cyklinu H. Tuto podjednotku fosforyluje komplex CDK8-cyklin C a to na reziduích S5 a S304. Tyto dvě fosforylační místa jsou v blízkosti N- a C- koncových helixů, které v porovnání s ostatními cykliny vytváří unikátní konformaci cyklinu H. Cyklin H je také fosforylován na T315 protein kinasou CK2 (kasein kinasa 2). CK2 je holoenzym složený ze dvou regulačních β -podjednotek a dvou katalytických α -podjednotek. Fosforylace na T315 se ukazuje jako nutná pro úplnou aktivaci CAK (Akoulitchev *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2002).

2.1.7 Cyklin C a jeho vazební partneri

Cyklín C vytváří komplex s vazebným partnerem CDK3. Tento komplex zastává důležitou roli zejména v G₀ fázi (Obr. 2), kdy povolna fosforyluje malé množství Rb proteinu v pozici S807/811. Díky této fosforylaci dochází v buňce k přechodu z G₀ fáze do G₁ fáze. Komplex také může fosforylovat Rb v rané G₁ fázi. Tato fosforylace nestačí na samotné spuštění S fáze. CDK3 může vázat cykliny typu A a E, což naznačuje, že má podobnou funkci jako CDK2. Naopak CDK2 cyklin C neváže (Ren *et al.*, 2004).

Druhý vazebný partner, se kterým cyklin C reaguje *in vivo* i *in vitro*, je CDK8. Za podmínek *in vivo* bylo zjištěno, že komplex CDK8-cyklín C fosforyluje karboxyterminální doménu největší podjednotky DNA polymerasy II. Komplex CDK8-cyklín C tedy kontroluje funkci DNA polymerasy II (Leclerc *et al.*, 1996; Akoulitchev *et al.*, 2002).



Obr. 2: Regulace buněčného cyklu prostřednictvím CDK a cyklinů (upraveno podle Malumbres *et al.*, 2005).

2.1.8 CDK inhibitory (CKI)

Kinasová aktivita CDK je kontrolována různými mechanismy, zahrnujícími zejména interakci s aktivačními podjednotkami, vazbu k regulačním proteinům (CDK inhibitory) a změny fosforylace (Malumbres *et Barbacid*, 2005).

CKI jsou rozděleny do dvou tříd na základě struktury a CDK specificity. Skupina inhibitorů INK4 [p16^{INK4a} (Cdkn2a), p15^{INK4b} (Cdkn2b), p18^{INK4c} (Cdkn2c) a p19^{INK4d} (Cdkn2d)] je skupinou homologních inhibitorů CDK, jmenovitě CDK4 a CDK6, které podporují proliferaci. Například p15^{INK4b} a p16^{INK4a} vykazují 85% podobnost aminokyselinového řetězce a mezi těmito dvěma proteiny jsou jen malé biochemické rozdíly (Sharpless, 2005). Vazba inhibitorů INK4 na CDK4 a nebo CDK6 vyvolá jejich alosterickou změnu, která naruší vazbu kinas na cykliny typu D. Exprese inhibitorů tedy udržuje Rb protein v hypofosforylovaném stavu a znemožňuje tak vstup buňky do S fáze. Inhibitory p15^{INK4b} a p16^{INK4a} jsou exprimovány z lokusu INK4a/ARF/INK4b (Kim *et Sharpless*, 2006).

Druhá skupina, označovaná jako CIP/KIP, zahrnuje proteiny p21^{Cip1} (Cdkn1a), p27^{Kip1} (Cdkn1b) a p57^{Kip2} (Cdkn1c). Oproti INK4, CIP/KIP rodina inhibuje širší spektrum CDK-cyklin komplexů, primárně však CDK1 a CDK2. Jeden ze členů CIP/KIP rodiny, p27, oddaluje přechod buňky z G1 do S fáze. Po dokončení mitózy je vytvářen kromě cyklinu D také cyklin E. Komplex APC/C^{CDH1} cyklin E nedokáže degradovat a ten se tak může vázat na CDK2. Hlavní úlohou p27 je oddálit akumulaci tohoto komplexu, dokud nedojde ke kompletnímu složení prereplikačního komplexu v místech počátků replikace chromozomů. Poté je p27 fosforylován v pozici T187 komplexem CDK2-cyklin E a převeden na substrát pro komplex SCF^{skp2} a následně degradován, čímž umožní buňkám přechod do S fáze (Ullah *et al.*, 2009). SCF komplex, neboli Skp1/cullin/F-box protein, zastává v buněčném cyklu stejnou funkci jako komplex APC/C. Jedná se také o ubiquitin ligasu, která degraduje v buněčném cyklu inhibitory p21, p27, p57, cyklin E a WEE1 protein (Vodermaier, 2004).

2.2 Posttranskripční umlčování genů

K posttranskripčnímu umlčení genů (PTGS) dochází účinkem transgenů nebo dvouvláknové RNA (dsRNA) napříč celou rostlinnou a živočišnou říší. Díky studiím v různých systémech byla zjištěna skutečnost, že PTGS funguje jako

univerzální regulační systém exprese genů při významných procesech jako je ochrana proti virům a transpozonomům (Cogoni *et Macino*, 2000).

Počáteční pozorování, že transgeny mohou indukovat degradaci specifické mRNA, byly poprvé pozorovány u čeledi lilkovitých rostlin, konkrétně v rostlině petúnie v roce 1990 (van der Krol *et al.*, 1990). Tento jev byl původně nazván „společné potlačení“. Další studie zjistily podobný úkaz u řady rostlinných druhů jako je například rýže, rajčata, brambory nebo rod *Arabidopsis*. Podobný proces byl také odhalen u hub *Neurospora crassa*, kde byl nazván „quelling“. PTGS může být také způsobeno virem a v takovém případě je nazýváno virem-indukované umlčení genů (VIGS) (Cogoni *et Macino*, 2000).

V roce 1998 Fire *et al.* prvně publikovali mechanismus RNA interference (RNAi) u živočišných buněk. RNAi má za následek specifickou degradaci endogenní RNA a to v přítomnosti dsRNA, která byla podána injekčně nebo byla transgenně exprimována. dsRNA způsobuje umlčení genů také u rostlin. Tyto zjištění naznačují, že existují vazby mezi PTGS, quellingem a RNAi.

PTGS v rostlinách probíhá v několika krocích. Tvorba dsRNA může být iniciována přítomností aberantní RNA. RNA-dependentní RNA polymerasa, kódovaná geny SDS2/SDE1, může využít aberantní RNA jako templát k syntéze dsRNA. Ta může být ale také produkována prostřednictvím virů. dsRNA je poté štěpena RNasou podobnou jako živočišný enzym Dicer. Vznikající siRNA poté zacílí endogenní mRNA na RNA-degradačním komplexu. dsRNA také může vyvolat metylaci transgenní DNA, čímž posílí její schopnost produkovat aberantní RNA (Wassenegger *et al.*, 1994; Vaucheret *et al.*, 2001).

Zavedení transgenů z části virového genomu může vést k rezistenci rostliny k tomuto viru. Rostliny tedy mohou odolat infekci nebo podstoupit předběžnou fázi infekce, ze které se uzdraví. Tyto rostliny jsou imunní vůči sekundární infekci způsobené stejným virem nebo jiným rekombinantním virem, který nese část genomu původního viru. V určitých případech lze nalézt i divoké typy rostlin vykazující stejné vlastnosti jako rostliny transgenní (Vaucheret *et al.*, 2001).

2.2.1 RNA interference (RNAi)

V minulosti bylo vyzkoušeno velké množství metod při pokusech vyvolat snížení exprese cílových genů v buňce. Například anti-sense oligonukleotidy a ribozymy

byly používány po více než dekádu let k cílené degradaci specifické RNA. Ačkoliv tyto metody fungovaly uspokojivě v některých jednoduchých experimentech, nedokázaly efektivně způsobit umlčení genů ve složitých savčích systémech. V následujících letech došlo k nevšednímu vývoji metod založených na RNA interferenci (RNAi) a tak se krátké interferující RNA staly hlavním nástrojem k cílenému umlčování genů. Jako první byla RNAi pozorována v organismu *Caenorhabditis elegans*. Pokud je háďátko vystaveno dvouvláknové RNA (dsRNA), která je homologní k některému z jeho genů, dochází k posttranskripčnímu umlčení právě tohoto genu. Zřejmý terapeutický potenciál RNAi vyústil k rychlému objasnění principu umlčení. Bylo zjištěno, že posttranskripční umlčení genů zahrnuje dva hlavní kroky. Nejprve je dsRNA rozpoznána RNasou III, nazývanou Dicer, pak následuje zpracování dsRNA na malé dvouvláknové molekuly označované jako siRNA. Ty jsou poté vázány RNA-indukovaným umlčujícím komplexem (RISC), který se vyznačuje RNasovou aktivitou a degraduje tak cílovou mRNA. Použití dlouhých dsRNA v savčích buňkách však vede mimo jiné k aktivaci antivirové interferonové odezvy (IR). Ta zastavuje veškerou syntézu proteinů v buňce, a proto použití dsRNA v savčích buňkách není vhodným způsobem umlčování genů. U syntetických siRNA o velikosti 21 - 23 nukleotidů nebyla tato odezva prokázána, a proto jsou používány pro studium savčích genů (Bantounas *et al.*, 2004).

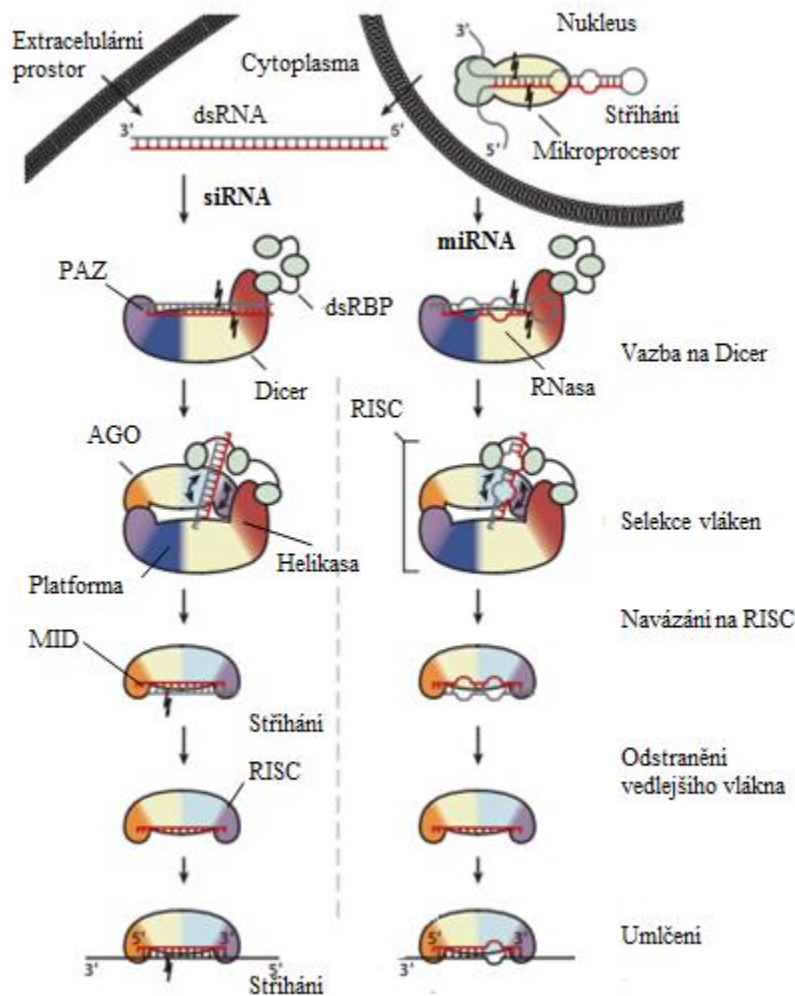
Tři hlavní dráhy RNAi (siRNA, jednoduchá mikro RNA - miRNA a PIWI intereagující RNA - piRNA) sdílí společný mechanismus umlčení cílových genů (Obr. 3). Nezbytným efektoem je ribonukleoproteinový komplex zahrnující protein rodiny argonaut (AGO), vázaný na jednovláknovou RNA složenou z 20 až 30 bází. Specifita této RNA je dána komplementaritou k cílovému genu. V případě miRNA a siRNA je komplex označován jako RNA-indukovaný umlčující komplex (RISC) a umlčuje mRNA degradací nebo potlačením transkripce. Původ miRNA a siRNA je odlišný. Zatímco miRNA je odvozena z genomu, siRNA může být jak edogenního, tak exogenního původu, kdy je její vznik důsledkem například virové infekce (Carthew *et* Sontheimer, 2009). Další zásadní rozdíl miRNA a siRNA je v jejich prekurzorech. dsRNA jako prekurzor pro vznik siRNA se vyznačuje dokonalým párováním bází, zatímco prekurzory miRNA obsahují více nekomplementárních bází a prodlouženou

koncovou smyčkou. I přes tyto rozdíly jsou obě RNA v buňce zpracovány stejnou molekulární cestou (Wilson *et* Doudna, 2013).

Produkce miRNA začíná v jádře vznikem transkriptů označovaných jako primární miRNA (pri-miRNA). Tyto transkripty jsou dlouhé nejméně 1000 nt, obsahují jednoduché nebo zmnožené dvouřetězcové vlásenky, které se vyznačují 5'- a 3'-koncovým jednovláknovým přesahem a distální smyčkou tvořenou zhruba 10 nt (Saini *et al.*, 2007). Pri-miRNA je zkrácena pomocí komplexu, jehož součástí je enzym Drosha, patřící do rodiny RNasy III. Dalším proteinem, který se podílí na zpracování pri-miRNA je DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8), obsahující dvě dvouvláknové RNA vazebné domény (Kim *et* Kim, 2007). DGCR8 rozpoznává rozhraní vláskové struktury pri-miRNA a jednovláknové RNA. Dochází k endonukleolytickému štěpení přibližně 11 bp od konce vlásenky. Štěpením vznikají prekurzorové miRNA (pre-miRNA) o velikosti 65 až 70 nt, které jsou translokovány za účasti transportních proteinů Exportin5 a RanGTP do cytoplasmy (Han *et al.*, 2006; Lund *et* Dahlberg, 2006).

V cytoplasmě je proces zpracování obou typů interferující RNA totožný. Oba typy RNA jsou zkráceny na dsRNA duplex o vhodné délce tak, aby mohlo dojít k vazbě proteinu AGO. Tento proces je řízen enzymem Dicer, což je velká endoribonukleasa s helikasovou doménou a vnitřně dimerizovanou dvojicí domén RNas III. Toto seskupení může být v rámci organismů variabilní. Výsledná dsRNA se skládá ze dvou řetězců o velikosti 21 až 25 nt, s fosfátovou skupinou na každém 5'- konci a dvoubázovým přesahem na každém 3'-konci (Schwarz *et al.*, 2003). Tento enzymatický proces umožňuje interakci RNA duplexu s proteinem AGO, následuje vazba enzymu Dicer prostřednictvím dsRNA-vazebného proteinu (dsRBP). Tím může být například TAR-RNA vazebný protein (TRBP). Dicer, AGO a dsRBP dohromady vytváří RISC. Multiproteinový komplex RISC je charakterizován přítomností domény PAZ (Piwi, Argonaut, Zwiller) a PIWI doménou (Parket *et* Barford, 2006; MacRae *et al.*, 2008). PAZ doména specificky rozpozná charakteristický 3'-konec RNA duplexu a 5'-fosfát hlavního vlákna, PIWI doména přijme strukturu podobnou RNase H a katalyzuje enzymatické štěpení RNA. Je známo osm lidských AGO proteinů, avšak pouze jeden z nich, Ago2, vytváří RISC s katalytickými vlastnostmi (Liu *et al.*, 2004). Ago2 je také zodpovědný za výběr vedoucího vlákna. K tomu dochází prostřednictvím asymetrického odvíjení RNA duplexu.

Vedoucí vlákno je zachováno pro RISC, kde se váže na AGO pro přímé umlčení cílové mRNA, druhé vlákno je degradováno. RISC vyhledává a váže jednovláknové RNA (ssRNA), např. mRNA, které jsou komplementární s vedoucím vláknem navázaným na AGO proteinu. Dochází tak k umlčení genu (Matranga *et al.*, 2005; Wilson *et Doudna*, 2013).



Obr. 3: Mechanismus umlčení genů v buňce při použití siRNA a miRNA.

miRNA vzniká sestříháním z pre-miRNA v jádře, odkud je transportována do cytoplazmy. V cytoplazmě dojde k vazbě proteinu AGO a endoribonukleasy Dicer, které dohromady spolu s dsRBP vytváří RISC. Následně dochází k dalšímu stříhání, kdy dojde k odstranění vedlejšího vlákna. Vedoucí vlákno posléze způsobí umlčení genu (upraveno podle Wilson *et* Doudna, 2013).

2.2.2 Využití RNAi při nádorové terapii

První klinické aplikace RNAi byly zaměřeny na léčbu věkem podmíněné makulární degenerace. Toto onemocnění způsobuje slepotu nebo zhoršení zraku u milionů dospělých ročně (Tolentino, 2006). Terapie založené na RNAi jsou také v současné době vyvíjeny pro virová onemocnění, zahrnující virus lidské imonudificience (HIV), viry žloutenky typu B a C a respirační syncytiální virus (Leonard *et* Schaffer, 2006). Další skupinou onemocnění, na které se technologie RNAi zaměřuje, je léčba rakoviny a neurodegenerativních onemocnění.

RNA interference je účinná metoda cíleného umlčování genů, která má velmi slibnou budoucnost v oblasti léčby rakoviny. Objev RNAi přispěl nejen k vývoji metod pro rychlou identifikaci klíčových molekul podílejících se na chorobných procesech. Neustálý výzkum v oblasti regulačních procesů během karcinogeneze vedl k myšlence využití potenciálu RNAi technologie v protinádorové terapii. Využití nachází zejména v umlčení důležitých molekul regulačních drah nádorů, molekul podílejících se na interakci nádor-hostitel a rezistenci nádorů k chemoterapii či radioterapii. Ve většině studií vyvolalo umlčení cílového genu antiproliferační a proapoptotické účinky. Nicméně největší nedostatky RNAi při léčbě rakoviny nejsou stále zcela vyřešeny. Patří mezi ně hlavně transport těchto látek *in vivo*, neúplné potlačení cílového genu, nespecifická imunitní odpověď a vedlejší účinky terapie (Pai *et al.*, 2006).

Technologie RNAi je zaměřena především na buněčné regulační dráhy, které jsou při nádorové transformaci pozměněny. Mezi proteiny zahrnuté v těchto regulačních drahách patří například komplexy CDK-cyklin, pRb, p53, proteiny apoptózy a podobně (Vogelstein *et Kinzler*, 2004). U těchto regulačních drah jsou nejčastěji cíleny geny, které se velkou měrou podílí na růstu nádoru. Dalšími kandidáty jsou pak geny, které kódují proteiny figurující v buněčném stárnutí, degradaci nebo stabilizaci proteinů (Pai *et al.*, 2006).

Například pRb hraje významnou roli při nádorových onemocněních. V důsledku změn v proteinech, které se vyskytují v Rb dráze, dochází ke ztrátě nebo ke zpoždění buněčného stárnutí. U velkého množství lidských nádorů se prokázala změna v Rb dráze. RNAi v tomto případě může zacílit transkripční faktor E2F4. Narušení E2F4 pomocí RNAi brání formování p130/E2F4 komplexu a zvýší tak citlivost buněk k chemoterapii vyvolávající apoptózu (DuPree *et al.*, 2004). V oblasti léčby rakoviny děložního čípku a u buněk infikovaných lidským papilomavirem se jeví jako efektivní využití RNAi k umlčení virových genů E6 a E7. Oba tyto geny vytváří proteiny, které se vážou na Rb. V obou případech bylo dosaženo selektivní degradace E6 a E7. U umlčeného genu E6 byl zaznamenán nárůst p53 a snížení rychlosti růstu buňky. Umlčení genu E7 vyvolalo buněčnou smrt. Zároveň se také jedná o první selektivní umlčení exogenních virových genů v savčích buňkách. Buňky, které nebyly napadeny papilomavirem, nebyly ani ovlivněny RNAi (Jiang *et Milner*, 2002).

Další významná regulační dráha je p53. Nádorový supresorový protein p53 je inaktivován zhruba v jedné polovině všech lidských druhů rakoviny. Dráha p53 se skládá ze sítě genů a jejich produktů, které v buňce reagují na vnější a vnitřní stresové signály. Ty mají v buňkách dopad na homeostatický mechanismus, který monitoruje DNA replikaci, chromozomální segregaci a buněčné dělení. V reakci na stresový signál je p53 aktivován posttranslační modifikací, což vede k zastavení buněčného cyklu, buněčnému stárnutí a apoptóze (Harris *et al.*, 2005). Velké množství molekul je zapojeno do p53 dráhy. Jako jeden z cílových proteinů RNAi může být protein Mdmx, což je klíčový negativní regulátor p53. Ve spoustě druhů rakoviny je tento protein nadexprimován. Použití RNAi k umlčení genu pro tvorbu proteinu Mdmx způsobilo výrazný pokles buněčného růstu u nádorových buněk (Danovi *et al.*, 2004).

V oblasti pokusů umlčení cyklinů bylo dosaženo významného výsledku při umlčování savčího cyklinu B1, který zodpovídá za správný průběh G2/M fáze (Yuan *et al.*, 2004). Na základě cyklinového boxu cyklinu B1 byly vytvořeny tři syntetické siRNA, které byly využity na buněčné linie HeLa a HUVEC. Umlčení cyklinu B1 v těchto buněčných liniích vyvolalo zpomalení růstu buněk a zvýšení apoptózy až o 50 %. Analýzou průtokovou cytometrií bylo také zjištěno, že u buněk docházelo k zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi (Yuan *et al.*, 2004). Kromě cyklinů je možné využít metodu siRNA také k umlčení jejich vazebných partnerů, CDK. V tomto případě dochází k zastavení buněčného cyklu nádorových buněk NCL H1299 a U2OS v příslušné fázi, popřípadě k indukci apoptózy. Po umlčení CDK souvisejících s buněčným cyklem dochází také k poklesu fosforylace RNA polymerasy II, což svědčí o inhibici transkripčních CDK, které jsou nezbytné pro správný průběh cyklu (Cai *et al.*, 2006).

3 Experimentální část

3.1 Cíl práce

Cílem práce bylo dosáhnout úspěšného posttranskripčního umlčení genů regulujících buněčný cyklus pomocí siRNA, dále popsat vliv umlčení na relativní hladiny proteinů související s buněčným cyklem a v neposlední řadě popsat vliv umlčení cílových genů na průběh buněčného cyklu.

4 Materiál a metodika

4.1 Přístroje a laboratorní vybavení

Aparatura pro western blot Mini Trans-Blot Cell, Biorad

Centrifuga BR4i, Thermo electron corporation

Centrifuga Epp 5702+ výkyvný rotor A4-38, Eppendorf

CO₂ inkubátor, Sanyo

Elektroforetická aparatura Mini protean tetra cell, Biorad

Flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48, Gelaire flow laboratories

Chemiluminiscenční kamera FUJI LAS 4000, Fuji film

Mikroskop TMS-F, Nikon

Pipety s rozsahem 0,1 µl a ž 5 ml, Eppendorf

Průtokový cytometr Cell Lab QuantaTM SC, Beckman Coulter

Předvážky EMS 3000-2, Kern

Spektrofotometr UV-1800, Shimadzu

Termostat blokový izotemp MBT 250, Kleinfeld Labortechnik

Termostatová míchačka RCT S26, Omnilab

Třepačka Reax top, Heidolph

Třepačka s kývavým pohybem Mr-1, Biosan

Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls UW 2200, Bandelin

Zdroj napětí EC 3000P a EC 105, E-C Apparatus corporation

4.2 Seznam použitých chemikálií

Akrylamid, Omnipur

Aprotinin, Sigma-Aldrich s.r.o

Bis akrylamid, Omnipur

Bromdeoxyuridin (BrdU), Thermo scientific

Bromfenolová modř, Sigma-Aldrich s.r.o.
Butanol, Lach-Ner
Dithiothreitol (DTT), Serva
Dodecylsírán sodný (SDS), Lach-Ner
Ethanol 96%, Lach-Ner
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), Sigma-Aldrich s.r.o.
Ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA), Sigma-Aldrich s.r.o.
Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma-Aldrich s.r.o.
Fetální telecí sérum (FS), Invitrogen
Fluorid sodný (NaF), Sigma-Aldrich s.r.o.
Glutamin, Sigma-Aldrich s.r.o.
Glycerol, Lach-Ner
Glycin, MP Biomedicals
Hovězí sérový albumin (BSA), Amresco
Hydroxid draselný, Sigma-Aldrich s.r.o.
Chlorid draselný (KCl), Penta
Kit pro detekci proteinů Super signal west pico/femto chemiluminescent substrate,
Thermo scientific
Kyselina chlorovodíková (35%), Penta
Leupeptin, Sigma-Aldrich s.r.o.
Médium RPMI 1640, Sigma-Aldrich s.r.o.
Nonidet - 40, Sigma-Aldrich s.r.o.
Ponceau S, Serva
Propidium jodid
Proteinový marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder
Pyruvát sodný (11 mg/ml), Sigma-Aldrich s.r.o.
siRNA komplementární k lidským genům *CCNE1*, *CCNA1*, *CCND1* a *CCNB1*,
Thermo Scientific Dharmacon
Tetraboritan tetrabarnatý (Ba₄B₂O₇), Lachema
Transfekční činidlo Interferin® siRNA Transfection reagent, Polyplus
Triton X-100, Sigma
Tween 20, MP biomedical

4.3 Seznam použitých roztoků

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄
(pH = 7,4 - 7,5);

TBS: 137 mM NaCl, 20 mM TRIS (pH = 6,8);

RIPA pufr: 20 mM (pH = 7,4), 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 5 mM EGTA,
2 mM NaF, 02% Nonidet P-40, před použitím bylo přidáno: 1 mM
DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10µg/ml aprotinin;

Bradfordovo činidlo: 0,01% Coomasie Brilliant Blue, 95% ethanol, 85% kyselina
fosforečná;

5x SDS vzorkový pufr: 0,3 M TRIS (pH = 6,8), 10% SDS, 50% glycerol, 0,05%
bromfenolová modř, 5% 2-merkптоethanol;

Elektroforetický pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin, 0,1% SDS;

Blotovací pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin;

Blokovací roztok: 5% sušené mléko v roztoku PBS + 0,1 % Tween 20

Ponceau S: 0,2% v 1% kyselině octové;

Roztoky použité při průtokové cytometrii:

2 N HCl/ Triton X-100: 7:3 destilovaná voda:35% HCl + 0,5% Triton
X-100

PBS/BSA: PBS + 1% BSA

Roztok tetraboritanu: 0,1M Na₂BO₄.10 H₂O (pH = 8,5)

PBS- T: PBS + 1% BSA + 0,5% v/v Tween 20

4.4 Použité protilátky

β-aktin (klon C4, ředění 1:2000) Santa Cruz biotechnology

CDK1 (klon POH1, ředění 1:500), Cell signaling technology

CDK2 (klon 78B2, ředění 1:500, Cell signaling technology

CDK4 (klon DCS156, 1:1000), Cell signaling technology

Cyklin A (klon BF683, ředění 1:500), Cell signaling technology

Cyklin B1 (klon V152, 1:500), Cell signaling technology

Cyklin D1 (klon 9262, ředění 1:250), Cell signaling technology

Cyklin E (klon HE12, ředění 1:500), Cell signaling technology

Mcl-1 (klon S-19, ředění 1:500), Santa Cruz biotechnology

PARP-1 (klon 46D11, ředění 1:500), Cell signaling technology
p53 (klon DO-1, ředění 1:10), Dr. B. Vojtěšek z Masarykova onkologického
ústavu v Brně
total Rb (klon 4H1, ředění 1:250), Cell signaling technology
fosfo-Rb S807/811 (ředění 1:250), Cell signaling technology
fosfo-Rb S780 (ředění 1:500), Cell signaling technology
Použité sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou - SwARpx a
RAMpx
antiBrdU-FITC (klon Bu20a, ředění 1:50), eBioscience

4.5 Použitá buněčná linie

V této bakalářské práci byla použita adherentní buněčná linie C4-2 odvozená od kostních metastaz rakoviny prostaty. Linie byla kultivována v Petriho miskách v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Po dosažení přibližně 90% konfluence byly buňky pasážovány. Linie byla udržována v médiu RPMI-1640 s přídavkem fetálního séra (10%), penicilinu (0,1 mg/ml), streptomycinu (0,1 mg/ml), L-glutaminu (0,3 mg/ml) a pyruvátu sodného (1%).

4.6 Kultivace buněk a transfekce

Pro účely experimentů byly buňky kultivovány na malých petriho miskách (60 mm, 22,1 cm²) při 37 °C v 5% atmosféře CO₂. Pro analýzu průtokovým cytometrem byly vysazeny v počtu 500.000 buněk na misku, pro analýzy proteinů metodou western blot byly vysazeny v počtu 800.000 buněk na misku. Buňky byly ponechány v inkubátoru přes noc, aby došlo k jejich dostatečné adhezi ke dnu kultivační nádoby.

Pro transfekci bylo do sterilních mikrozkrumavek napipetováno 500 µl nekompletního média RPMI-1640. Poté byl přidán 1 µl transfekčního činidla, respektive 1 µl siRNA pro příslušný cyklin. Konečná koncentrace siRNA byla vždy 200 nmol/l. Pro manipulaci s RNA byly použity špičky s filtrem. Po promíchání byly obě části transfekční směsi spojeny a to tak, že transfekční činidlo bylo přeneseno k siRNA. Následovalo opět promíchání a transfekční směs byla inkubována 10 minut ve flowboxu.

Z misek připravených na transfekci bylo odstraněno médium. Buňky byly opláchnuty nekompletním médiem a následně byla přidána transfekční směs. Transfekce probíhala po dobu 24 a 48 hodin, přičemž po 16 hodinách od transfekce byl doplněn objem misek na 5 ml RPMI-1640 médiem bez antibiotik.

4.7 Sklizení buněk a lyzace

Třicet minut před sklizením buněk pro průtokovou cytometrii byl do Petriho misek napipetován roztok BrdU, ředěný 1000x na konečnou koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Buňky byly sklizeny ve flowboxu trypsinizací a následně byly přeneseny do zkumavky. Vzorky byly poté centrifugovány při 1000 g, 4 °C po dobu 8 minut. Buněčný pelet by 2x promyt v PBS. Po následné centrifugaci byl pelet resuspendován ve 100 μl PBS a za zpomaleného vortexování byl pak po kapkách přidáván 1 ml chlazeného ethanolu, aby došlo k fixaci buněk. Vzorky byly posléze uchovány při teplotě - 20 °C.

Pro účely western blot analýzy byly buňky uvolněny ze dna kultivačních misek škrabkou a přeneseny do 15 ml zkumavky. Misky byly 2x opláchnuty PBS a objem byl rovněž přenesen do zkumavek. Vzorky byly poté centrifugovány 1000 g, 4°C po dobu 8 minut. Supernatant byl odsát a buněčný pelet byl následně rozsuspendován v 1 ml PBS, přičemž při druhém promytí byl rozsuspendovaný pelet přenesen do 1,5ml mikrozukumavky. Supernatant byl opět odstraněn a pelet byl uchován v hlubokomrazícím boxu při -80 °C.

Lyzace buněk byla provedena roztokem RIPA. Podle množství peletu v mikrozukumavkách byla přidána RIPA tak, aby koncentrace proteinů nebyla příliš nízká. Vzorky byly během 15 minut několikrát propipetovány. Po určité době byla pro zvětšení výtěžku použita ultrazvuková sonda. Následovala centrifugace při 14000 g, 4°C po dobu 30 minut. Supernatant byl přenesen do nových mikrozukumavek tak, aby zároveň nedošlo k přenosu zbytkového peletu.

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla měřena metodou Bradforda tak, že do 1 ml Bradfordova činidla byl přidán 1 μl celkového buněčného lyzátu. Po deseti minutách inkubace byla změřena absorbance při 595 nm. Vzorky byly

poté naředěny roztokem RIPA na nejnižší změřenou koncentraci. Po přidání 5x vzorkového pufru byly vzorky denaturovány v termobloku po dobu 5 min při 95 °C a uskladněny při -20 °C.

4.8 SDS-PAGE, western blotting, imunodetekce

Pro vertikální SDS-PAGE byly použity 10% polyakrylamidové gely. Bylo nastaveno počáteční napětí 80 V pro fokusaci proteinů v zaostřovacím gelu, které bylo při samotné separaci v gelu dělicím upraveno na 120 V.

Gely byly přeneseny do aparatury pro wester blot. Přenos proteinů probíhal při 270 mA po dobu 2 až 3 hodin za neustálého chlazení ledem. Po přeblování byly membrány barveny Poncau S ke zhodnocení kvality přenosu proteinů na membránu. Membrána byla poté opět odbarvena v TBS a následně 1 hodinu blokována v blokovacím roztoku, aby se zabránilo nespecifickým vazbám protilátek. Po uplynulé době byly na membránu nanесeny primární protilátky, které byly naředěné v blokovacím roztoku. Následovala inkubace přes noc při teplotě 4 °C.

Po inkubaci byly membrány promyty TBS, respektive v TBS/0,1% Tween 20. Po promytí byly nanесeny příslušné sekundární protilátky a membrána byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po uplynulé době byla membrána opět několikrát promyta v TBS a TBS/01% Tween 20. Závěrečná analýza byla provedena přístojem ImageQuant LAS 4000 series. Před analýzou chemiluminiscence byl na membrány nanесen komerční kit směsi luminolu a peroxidu vodíku. Po 5 minutové inkubaci byla kamerou detekována chemiluminiscence, jejíž intenzita odpovídá relativnímu množství proteinů.

4.9 Průtoková cytometrie

Po fixaci byly vzorky zvortexovány a zcentrifugovány při 1000 g, 4 °C po dobu 8 minut. Supernatnat byl odsát a pelet promyt v 1 ml PBS. Po další centrifugaci a odsátí supernatantu byl pelet rozsuspendován v 100 µl 1% roztokou BSA/PBS. Do vzorků byl po kapkách přidán 1 ml 2N HCl/triton X-100 (0,5%). Opět za mírného vortexování. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po uplynulé době byly opět centrifugovány při 1000 g, 4 °C po dobu 8

minut. Supernatant byl odstraněn a pelet rozsuspendován v 1 ml 0,1M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ /pH 8,5. Po dalším stočení a odsátí byl pelet promyt 1 ml PBS-T. Po centrifugaci bylo k peletu přidáno 70 μl roztoku PBS/BSA, ve kterém byla naředěna protilátka BrdU-FITC (ředění 50x). Vzorky byly inkubovány ve tmě při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Poté byl přidán 1 ml PBS-T. Po centrifugaci byly vzorky ještě jednou promyty v 1 ml PBS-T. Po poslední centrifugaci a odsátí supernatantu byl pelet rozsuspendován v 1 ml filtrovaného roztoku PBS a bylo přidáno 10 μl propidium jodidu. Po hodinové inkubaci ve tmě při pokojové teplotě následovala analýza na průtokovém cytometru.

5 Výsledky

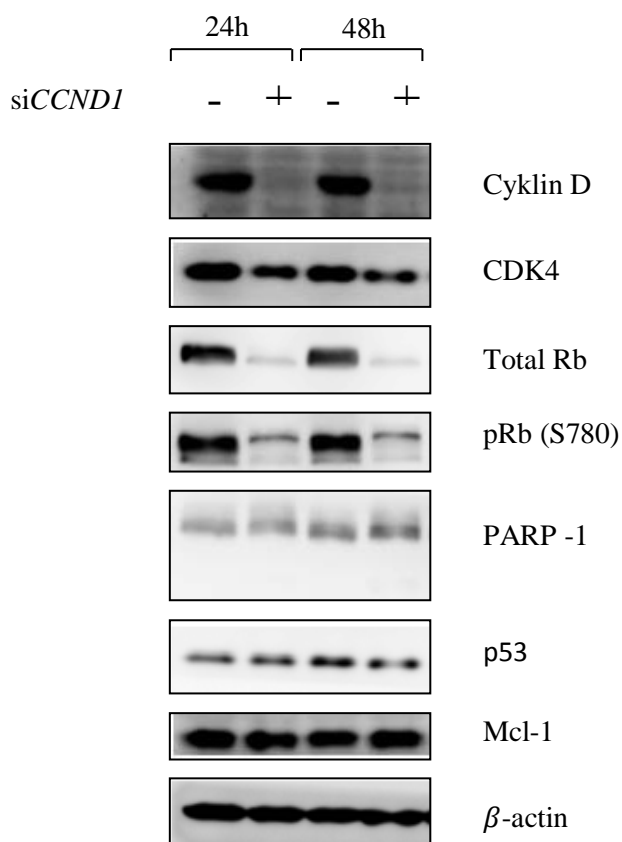
5.1 Umlčení cyklinu D

Po separaci proteinů a jejich přenosu na nitrocelulosovou membránu byly detekovány proteiny, které se bezprostředně účastní regulace buněčného cyklu nebo jsou zahrnuty v drahách s ní spojených. Další skupinou proteinů jsou pak substráty CDK, které byly detekovány pro ověření specifity siRNA a následného umlčení genů. V neposlední řadě byla hodnocena relativní hladina proteinů jakožto markerů apoptosy, jejíž výskyt v experimentech nebyl žádoucí.

Nejvýznamějším detekovaným proteinem po umlčení genu *CCND1* je cyklin D. Cyklin D vytváří komplex s CDK4 a CDK6, je nutný pro jejich aktivaci. Z obrázku 4 (Obr. 4) je patrné, že ke zřejmému poklesu relativní hladiny cyklinu D došlo již 24 hodin po transfekci. Stejně tomu tak je i po 48 hodinách umlčení. Snížená hladina cyklinu D vede ke snížení aktivity CDK4 respektive CDK6 a tudíž k poklesu fosforylace jejich substrátů. V případě umlčení cyklinu D byl sledován pokles fosforylace retinoblastomového proteinu a to jak jeho celkové hladiny, tak fosforylované formy v pozici S780. Jak po 24 hodinové, tak po 48 hodinové transfekci siRNA došlo k poklesu hladiny tohoto proteinu, což naznačuje, že komplexy CDK4-cyklin D a CDK6-cyklin D byly v porovnání s kontrolou méně aktivní.

Další skupinou proteinů, která byla sledována, byly proteiny spojené s apoptosou. Konkrétně se jedná o antiapoptotický protein Mcl-1, dále p53 protein, který za normálních okolností plní roli nádorového supresoru a nakonec byl sledován protein PARP-1 (poly ADP-ribose polymerasa). PARP-1 je substrátem kaspas, tedy enzymů aktivních pouze v apoptose. Za fyziologického stavu buňek má tento protein 112 kDa. Při stresových podmínkách, indukcii apoptosy a aktivaci kaspas dochází k jeho štěpení na 89 kDa velký fragment. Jak je patrné z obrázku 4, hladina proteinů Mcl-1 i p53 je v rámci vzorků konstantní, navíc štěpný fragment proteinu PARP-1 nebyl detekován a lze tedy usuzovat, že buňky po transfekci nebyly stresovány a nedocházelo k masivní apoptose.

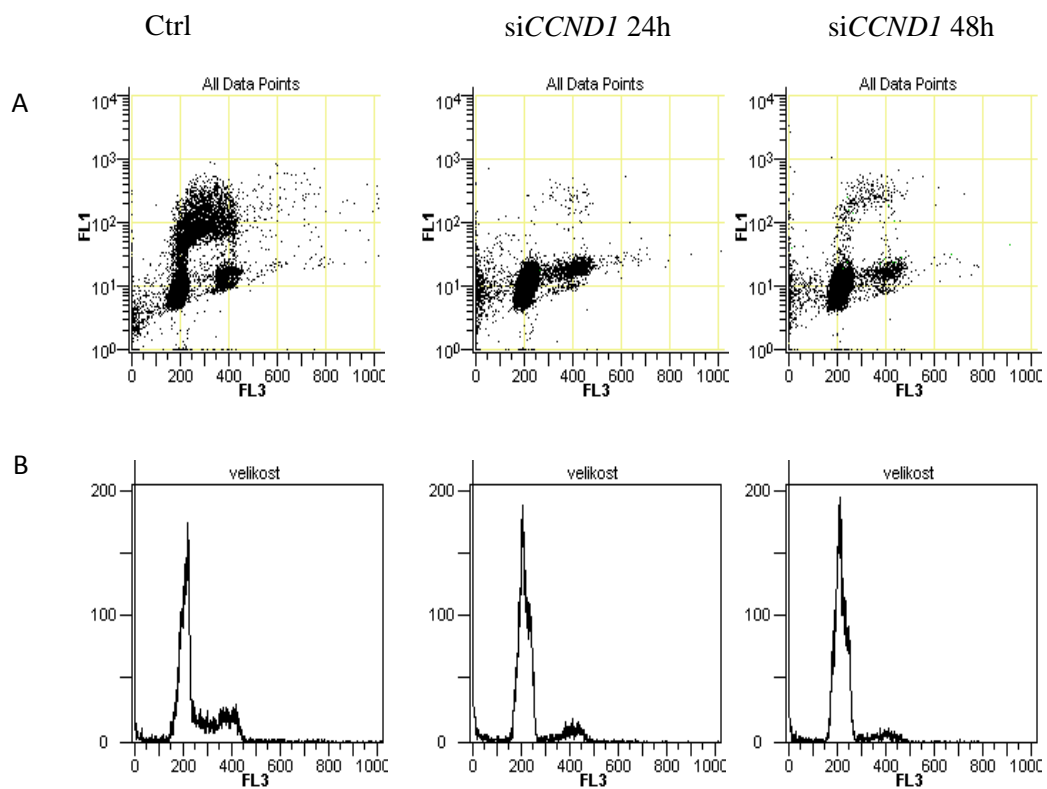
Hladina β -aktinu byla sledována jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků, jeho zastoupení se po ovlivnění buněk nikterak nemění.



Obr. 4: Imunodetekce proteinů regulujících buněčný cyklus, jejich substrátů a apoptotických proteinů po umlčení genu *CCND1* v buněčné linii C4-2. Transfekce probíhala po dobu 24 a 48 hodin.

Jak již bylo zmíněno výše, cyklin D je aktivační podjednotka CDK4 a CDK6 a společně se podílí na regulaci buněčného cyklu v G1 fázi. Z toho důvodu byla využita analýza průtokovou cytometrií. Po umlčení cyklinu D klesá aktivita těchto komplexů a předpokládá se zastavení buněčného cyklu právě v G1 fázi.

Průtoková cytometrie potvrdila umlčení cyklinu D (Obr. 5). Z dat vyplývá, že umlčení cyklinu D vede k akumulaci buněk v G1 fázi, naopak počet buněk v S a G2/M fázi se oproti kontrole snižuje (Obr. 5A). Z obrázku 5B je pak zřejmé, že pik odpovídající G2/M fázi se v závislosti na čase významně snižuje.



Obr. 5: Analýza buněčného cyklu buněčné linie C4-2 průtokovou cytometrií po značení BrdU a barvení PI. A) Závislost FL1signálu (FITC) na FL3 signálu (PI); B) Detekce FL3 signálu (PI) v závislosti na počtu buněk.

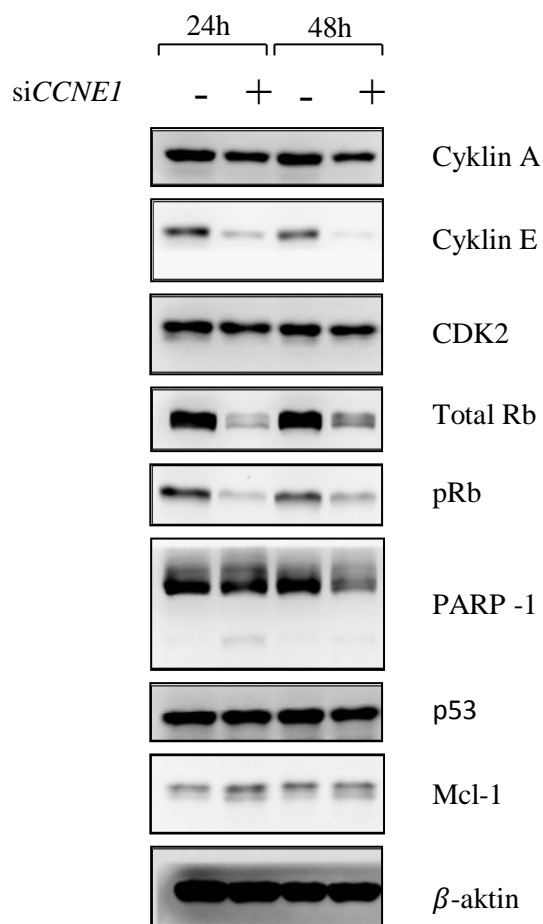
5.2 Umlčení cyklinu E

Pro snížení proteinové hladiny cyklinu E v buněčné linii C4-2 byla použita siRNA umlčující gen *CCNE1*. Cyklin E je nejvíce exprimován v průběhu G1 fáze a vytváří komplex s CDK2. Tento komplex na konci G1 fáze přebírá úlohu ve fosforylaci retinoblastomového proteinu po komplexech CDK4-cyklin D a CDK6-cyklin D.

Z uvedených dat vyplývá (Obr. 6), že po 24 i 48 hodinovém umlčení cyklinu E došlo k poklesu jeho proteinové hladiny, přičemž v závislosti na čase bylo umlčení efektivnější. Jako kontrola k umlčení cyklinu E byla dále sledována hladina cyklinu A, který je syntetizován až v S fázi a jeho hladina by měla po umlčení cyklinu E také klesat. Imunodetekce potvrdila, že v obou časových intervalech došlo ke snížení relativní hladiny cyklinu A, což naznačuje, že buněčný cyklus byl zastaven v G1 fázi.

Dále byla sledována hladina substrátu komplexu CDK2-cyklin E a sice retinoblastomového proteinu a jeho fosforylované formy v pozici S807/S811. Z obrázku 6 je patrné, že došlo ke značnému snížení hladiny celkového i fosforylovaného Rb proteinu, z čehož vyplývá, že umlčením cyklinu E došlo ke snížení aktivity komplexu CDK2-cyklin E.

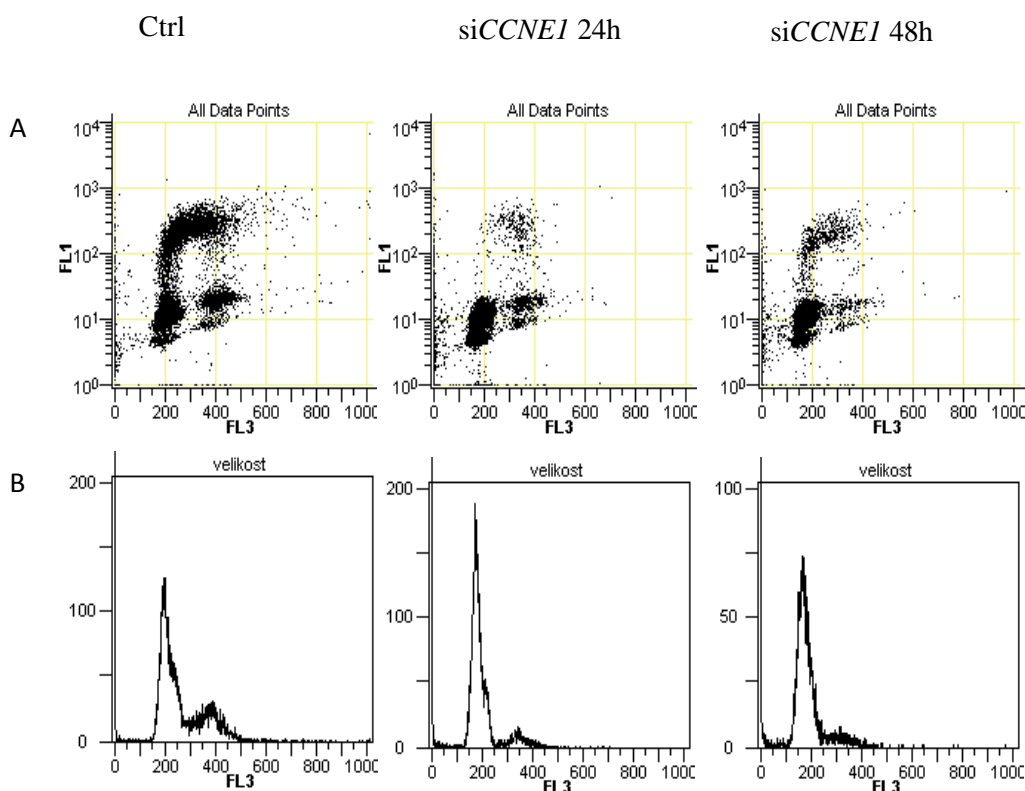
Relativní hladina apoptotických proteinů vykazuje určité odlišnosti oproti předchozím výsledkům při umlčování cyklinu D. Jelikož je hladina p53 i Mcl-1 ve všech vzorcích stejná, lze tvrdit, že buňky nebyly transfekcí a umlčením cyklinu stresovány. Na druhou stranu v případě proteinu PARP-1 je možné vidět mírný nárůst štěpného fragmentu 89 kDa. Nicméně jeho intenzita pro účely experimentu není významná.



Obr. 6: Imunodetekce proteinů regulujících buněčný cyklus, jejich substrátů a apoptotických proteinů po umlčení genu *CCNE1* v buněčné linii C4-2. Transfekce probíhala po dobu 24 a 48 hodin.

Jelikož se komplex CDK2-cyklin E aktivně podílí na ukončení G1 fáze a vstupu buněk do S fáze, umlčení cyklinu E by mělo mít za následek akumulaci buněk právě v G1 fázi.

Z analyzovaných dat vyplývá (Obr. 7), že umlčení cyklinu E vede k akumulaci buněk v G1 fázi v obou časových intervalech oproti kontrole (Obr. 7A). Z obrázku 7B je pak patrné, že došlo ke snížení píku G2/M opět v obou časových intervalech oproti kontrole, což znamená, že buňky, které se nacházely na začátku experimentu v G2/M fázi prošly cytokinezí, nicméně došlo k zastavení jejich proliferace v G1 fázi. Průtoková cytometrie tedy potvrdila umlčení cyklinu E.



Obr. 7: Analýza buněčného cyklu buněčné linie C4-2 průtokovou cytometrií po značení BrdU a barvení PI. A) Závislost FL1 signálu (FITC) na FL3 signálu (PI); B) Detekce FL3 signálu (PI) v závislosti na počtu buněk.

5.3 Umlčení cyklinu A

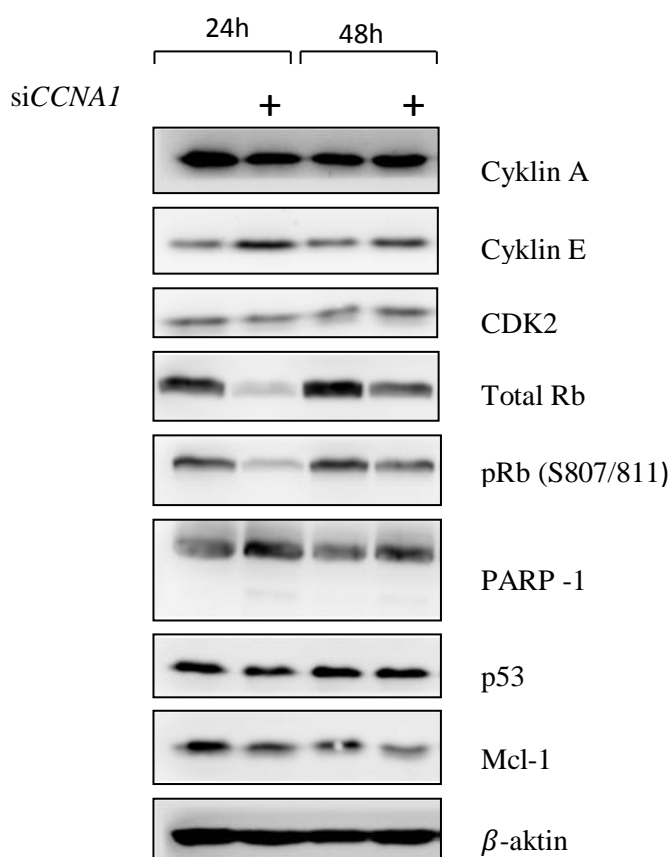
Jak už bylo dříve řečeno, cyklin A je akumulován během S fáze, kdy se váže na CDK2 namísto cyklinu E. Komplex CDK2-cyklin A reguluje průběh S fáze.

Pro ovlivnění množství cyklinu A v buněčném cyklu byla použita siRNA proti genu *CCNA1*. Z obrázku 8 (Obr. 8) vyplývá, že došlo k umlčení cyklinu A při 24 hodinách. Negativního výsledku bylo dosaženo při 48 hodinách, kdy se hladina cyklinu A opět srovnala s kontrolou. Jako jedna z kontrol umlčení zde slouží cyklin E, jehož množství by po umlčení cyklinu A v buňkách mělo narůstat. Byl zaznamenán nárůst cyklinu E při 24 hodinách, který koreluje s předchozím výsledkem. V druhém čase, při 48 hodinách je nárůst cyklinu E také patrný, ale ve srovnání s hladinou při 24 hodinách, klesá.

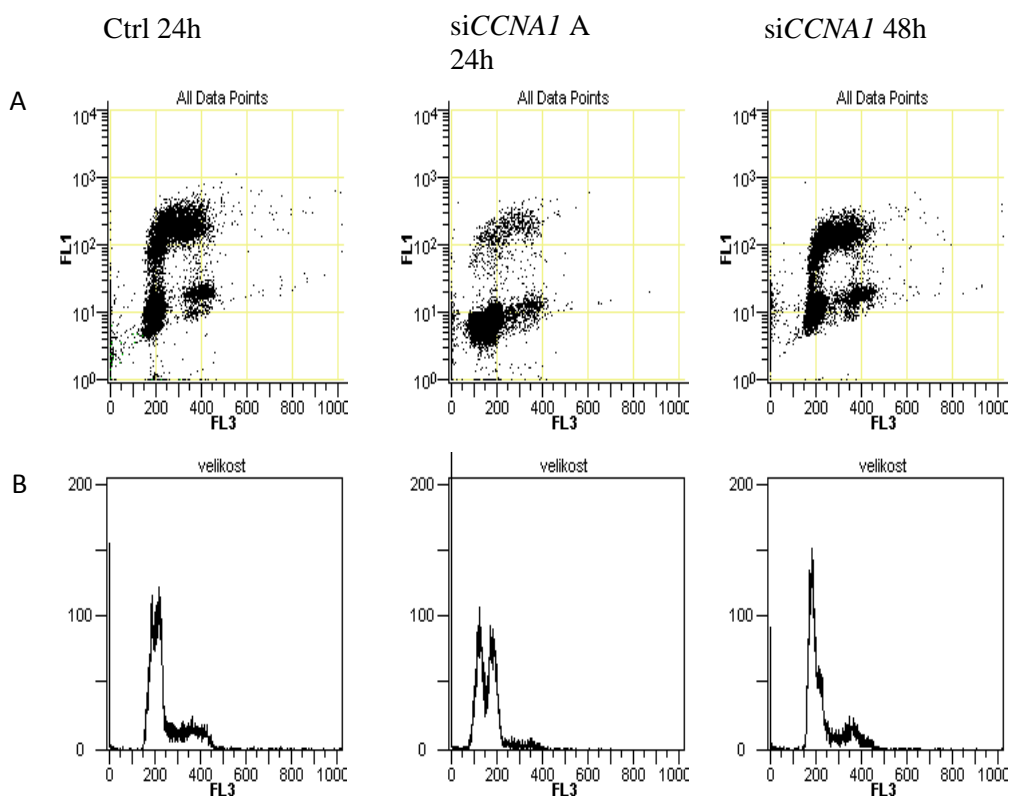
Během S fáze je Rb protein dále držen v hyperfosforylovaném stavu komplexem CDK2-cyklin A a to fosforylací na reziduích S807 a S811. Hladina

celkového Rb a fosforylovaného Rb při 24 hodinách v umlčených buňkách klesá, ale již při 48 hodinách začíná opět stoupat. Je tedy možné, že transfekce nebyla úspěšná.

Hladina všech tří proteinů, které kontrolují apoptosu, je jak v kontrolních, tak v buňkách umlčených, stejná. Výsledky ukazují, že v buňkách nedošlo ke vzniku stresových faktorů, které by vyvolaly nárůst apoptosy u buněk.



Obr. 8: Imunodetekce proteinů regulujících buněčný cyklus, jejich substrátů a apoptotických proteinů po umlčení genu *CCNA1* v buněčné linii C4-2. Transfekce probíhala po dobu 24 a 48 hodin.

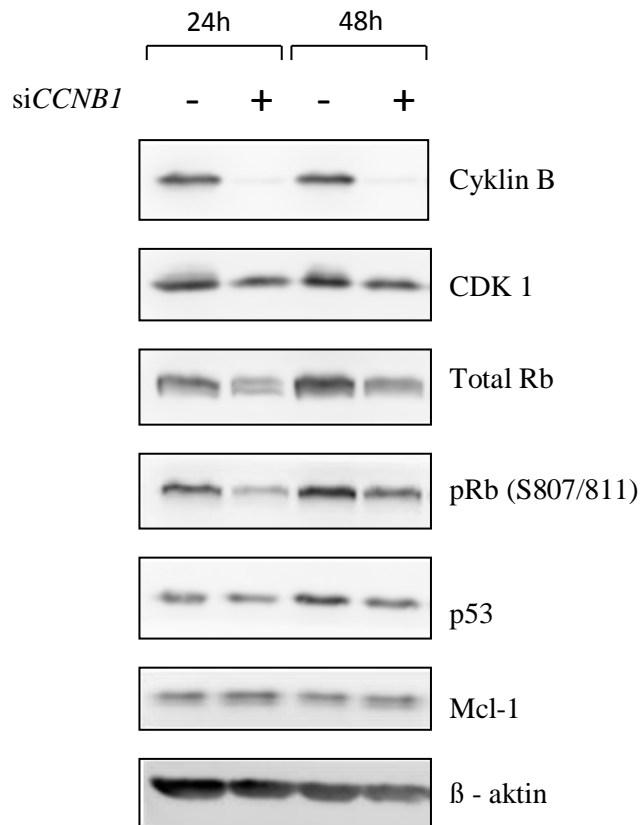


Obr. 9: Analýza buněčného cyklu buněčné linie C4-2 průtokovou cytometrií po značení BrdU a barvení PI. A) Závislost FL1signálu (FITC) na FL3 signálu (PI); B) Detekce FL3 signálu (PI) v závislosti na počtu buněk.

Analýza průtokovým cytometrem (Obr. 9) potvrdila výsledky western blotu, a sice, že po 24 hodinách došlo k akumulaci buněk v G1 fázi (Obr. 5A). Naopak při 48 hodinách se výsledek umlčení shoduje s kontrolou. U druhého obrázku (Obr. 5B) je pík G2/M fáze při 24 hodinách nižší než kontrolní. Výška tohoto píku ale opět v 48 hodinách stoupá. Analýzou veškerých dat bylo zjištěno, že došlo u umlčených buněk k obnovení buněčného cyklu.

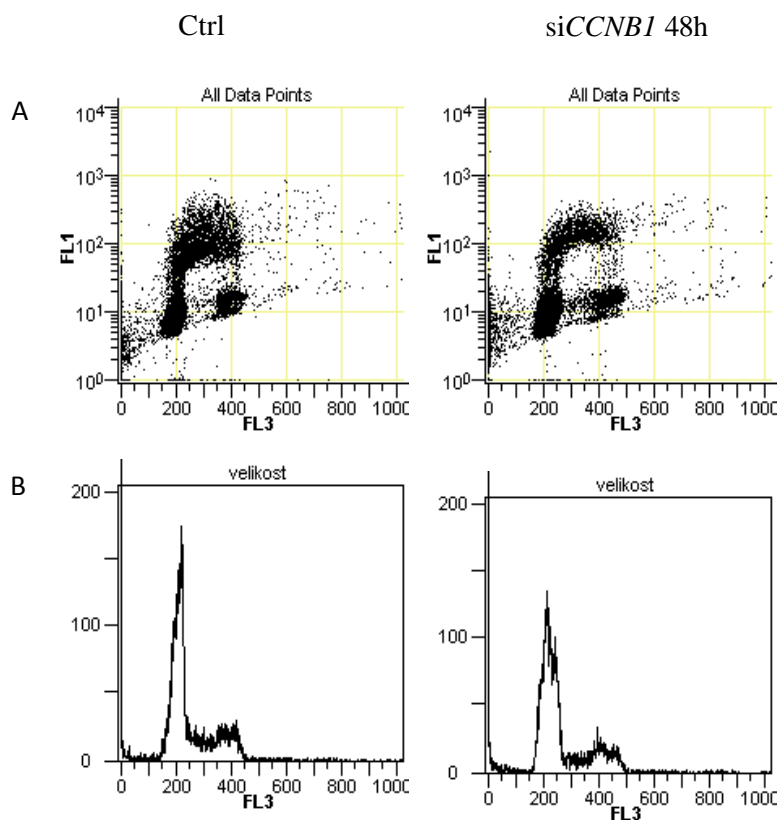
5.4 Umlčení cyklinu B

Poslední významný cyklin v regulaci bučného cyklu je cyklin B, který vytváří komplex s CDK1. Tento komplex pak reguluje vstup buněk z G2 do M fáze a následně proces mitózy.



Obr. 10: Imunodetekce proteinů regulujících buněčný cyklus, jejich substrátů a apoptotických proteinů po umlčení genu *CCNB1* v buněčné linii C4-2

Pomocí siRNA byl umlčen gen *CCNB1* pro tvorbu cyklinu B. Toto umlčení bylo pozorováno již při 24 hodinách (Obr. 10). Hladina celkového a fosforylovaného Rb proteinu ve vzorcích klesá. Hladina apoptotických proteinů p53 a Mcl-1 je také ve všech vzorcích stejná. Nedošlo tedy k významnému nárůstu buněčné smrti.

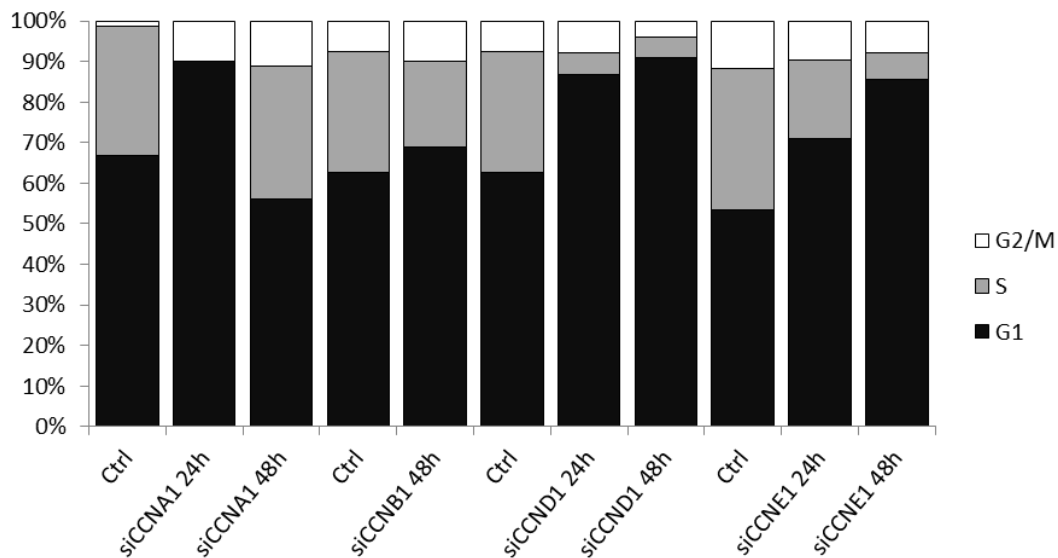


Obr. 11: Analýza buněčného cyklu buněčné linie C4-2 průtokovou cytometrií po značení BrdU a barvení PI. A) Závislost FL1 signálu (FITC) na FL3 signálu (PI); B) Detekce FL3 signálu (PI) v závislosti na počtu buněk.

Analýza na průtokovém cytometru (Obr. 11) výsledky western blotu nepotvrdila. Podle předpokladu by mělo při umlčení cyklinu B dojít k akumulaci buněk v G2/M fázi, jelikož bez cyklinu B klesá aktivita CDK1. Z obrázku 11A je ale zřejmé, že k tomuto jevu nedošlo. Po 48 hodinovém umlčení se průběh cyklu téměř shoduje s kontrolou. Totéž ukazuje pík G2/M umlčených buněk v obrázku 11B, který je shodný s kontrolou. Jelikož relativní hladina cyklinu B v buňkách po jeho umlčení je nízká a zároveň průběh buněčného cyklu se nemění, je pravděpodobné, že cyklin B v komplexu s CDK1 byl nahrazen jiným cyklinem, aby buňka mohla dokončit mitózu.

Závěrem byla analyzována data z průtokového cytometru programem MultiCycle a vytvořen graf, ve kterém je procentuálně vyjádřeno množství buněk nacházejících se v určité fázi buněčného cyklu. Z grafu vyplývá, že umlčení

buněk u cyklinů D a E v G1 fázi se s rostoucím časem zvětšovalo. Naopak je vidět velký pokles při umlčení cyklinu A mezi 24 a 48 hodinou v G1 fázi. U cyklinu B je výsledek přesně naopak. Buňky by se měly z většiny nacházet právě v G2/M fázi.



Obr. 12: Procentuální zastoupení buněk C4-2 v jednotlivých fázích buněčného cyklu po umlčení cyklinů A, B, D a E po dobu 24 a nebo 48 hodin.

6 Diskuze

Cykliny spolu s CDK jsou životně důležité pro dělení buňky. V roce 2006 *Grillo et al.* umlčoval cyklin D1 pomocí siRNA v MCF-7 buňkách. V jiné studii byla použita buněčná linie ACHN (rakovina ledvin), kdy umlčením cyklinu D1 došlo u buněk ke zpomalení proliferace, oslabení schopnosti migrace buněk a naopak byla zvýšena indukce apoptózy (*Wang et al.*, 2010). Obě studie se shodují s výsledky této práce. To znamená, že bylo dosaženo úspěšného posttranskripčního umlčení cyklinu D1 a současně byla jeho nízká exprese potvrzena také nízkou úrovní fosforylace retinoblastomového proteinu v pozici S780. Jediný rozdíl spočívá u apoptózy buněk, kdy u C4-2 nedošlo k nárůstu apoptózy oproti ACHN a MCF-7 buněčným liniím.

Umlčením cyklinu E se zabýval například *Wang et al.* (2013). U buněčných linií EC9706, Eca109 a KYSE30 byly významně umlčeny hladiny cyklinu E, což způsobilo uvěznění buněk v G1 fázi a pokles jejich počtu v S a G2/M fázi oproti kontrolám. Došlo také ke zpomalení proliferace a nárůstu apoptózy u umlčených buněk. Byla také výrazně ovlivněna invazivita (agresivita) těchto buněčných linií (*Wang et al.*, 2013). Výsledky předchozí práce se shodují s výsledky umlčení cyklinu E u C4-2 buněčné linie, kdy taktéž došlo ke zvýšení procentuálního zastoupení buněk v G1 fázi v závislosti na čase. Úroveň exprese cyklinu E po umlčení navíc dosahovala mnohem nižších hladin než v případě kontrolních vzorků.

V rámci umlčení cyklinu A byla použita siRNA k umlčení cyklinu A2 u K562 buněk. Umlčení způsobilo zpomalení proliferace a naopak zvýšení apoptózy (*Wang et al.*, 2008). Výsledky umlčení cyklinu A2 u K562 se neshodují s výsledky umlčení cyklinu A u C4-2 buněk. V této práci byly umlčovány geny *CCNA1*, tedy pro cyklin A1. Avšak ve zmiňované studii byl umlčován cyklin A2, který je velmi často nadexprimován u mnoha druhů nádorů a je častější typ než A1. Druhou možností, proč v případě cyklinu A nebylo dosaženo pozitivních výsledků, je možnost kontaminace zásobního roztoku siRNA všudepřítomnými RNasami a následné degradace interferující RNA.

Pokusy o umlčení cyklinu B byly prováděny například v buněčných modelech HeLa, BT-474, MCF-7, MDA-MB-435 a HUVEC. Bylo prokázáno umlčení cyklinu B1 u všech typů buněk, důsledkem čehož bylo také zvýšení apoptózy u ovlivněných buněk. Metoda průtokové cytometrie zjistila akumulaci buňek

v G2/M fázi u buněčné linie HeLa. Naopak u linie HUVEC došlo pouze k mírnému nárůstu zastoupení buněk v G2/M fázi (Yuan *et al.*, 2004). Výsledky metody western blot u zmíněné studie se shodují s výsledky v této práci, a sice cílový gen pro cyklin B byl úspěšně umlčen, což se projevilo jeho sníženou hladinou v C4-2 buňkách po transfekci již po 24 hodinách. Nicméně po umlčení cyklinu B se předpokládalo zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi v důsledku snížené aktivity CDK1. Průtokovou cytometrií však nebyl zaznamenán signifikantní nárůst procentuálního zastoupení buněk v této fázi po 48 hodinové transfekci. Akumulace buněk v mizóze tedy nebyla prokázána. Je pravděpodobné, že došlo k náhradě vazebné podjednotky CDK1, tedy cyklinu B, za jiný cyklin a průběh buněčného cyklu byl dokončen tímto komplexem. Nabízí se ale i druhá možnost a to, že buňky C4-2 proliferují příliš pomalu na to, aby bylo možné pozorovat blok buněčného cyklu v mitóze již po 48 hodinách.

7 Závěr

Práce byla zameřena na studium buněčného cyklu a proteinů, které se podílí na jeho regulaci. V rámci teoretické části byly popsány komplexy cyklin-dependentních kinas a cyklinů, které regulují buněčný cyklus. V další části se práce zabývala možnostmi posttranskripčního umlčování genů a dále mechanismem RNA interference, který byl využit při umlčování cyklinů v experimentální části.

V praktické části byly metodou RNAi umlčovány cykliny A, B, D a E, tedy vazebné a aktivační podjednotky CDK. Využitím metody western blotting a průtokové cytometrie byl charakterizován efekt umlčení cyklinů v buněčné linii C4-2. Umlčení jednotlivých cyklinů má tedy vliv nejen na hladinu studovaného proteinu, ale také na aktivitu příslušné CDK, se kterou cyklin vytváří komplex. Nedostatečná exprese cyklinů a tím snížená aktivita CDK pak vede k poklesu fosforylace substrátů těchto komplexů a tím k zastavení buněčného cyklu, což jsou poznatky, jež by v budoucnu mohly mít terapeutický potenciál při léčbě nádorových onemocnění.

8 Literatura

- Akoulitchev S., Chuikov S., Reinberg D. (2000): TFIID is negatively regulated by CDK8-containing mediator complexes. *Nature* **407**, 102-106
- Atherton-Fessler S., Parker L. L., Geahlen L. R., Piwnica-Worms H. (1993): Mechanisms of p34cdc2 regulation. *Molecular and Cellular Biology* **3**, 1675-1685
- Bantounas I., Phylactou A. L., Uney B. J. (2004): RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *Journal of Molecular Endocrinology* **33**, 545-557
- Cai D., Lathman Jr. M. V., Thang X., Shapiro I. G. (2006): Combined depletion of cell cycle and transcriptional Cyclin-dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Research* **66**, 9270
- Cao L., Chen F., Yang X., Xu W., Xie J., Yu L. (2014): Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evol Biol* **14**, 10
- Carthew W. R., Sontheimer J. E. (2009): Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642-655
- Cobrinik D. (2005): Pocket protein and cell cycle control. *Oncogene* **24**, 2796-809
- Cogoni C., Macino G. (2000): Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Elsevier* **10**, 638-643
- Danovi D., Meulmeester E., Pasini D., Migliorini D., Capra M., Frenk R. (2004) Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity. *Mol Cell Biol* **24**, 5835-5843
- DuPree E. L., Mazumder S., Almasan A. (2004): Genotoxic stress induces expression of E2F4, leading to its association with p130 in prostate carcinoma cells. *Cancer Res* **64**, 4390-4393
- Fire A., Xu S., Montgomery K. M., Kostas A. S., Driver E. S., Mello C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811
- Geng Y., Yu G., Sicinska E., Das M., Schneider E. J., Bhattacharya S., Rideout III M. W., Bronson T. R., Gardner H., Sicinski P. (2003): Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* **114**, 431-443
- Grillo M., Bott J. M., Khandke N., McGinnis P. J., Miranda M., Meyyappan M., Rosfjord C. E., Rabindran K. S. (2006): Validation of cyclin D1/CDK4 as an anticancer drug target in MCF-7 breast cancer cells: Effect of regulated overexpression of cyclin D1 and siRNA-mediated inhibition of endogenous cyclin D1 and CDK4 expression. *Breast Cancer Research and Treatment* **95**, 185-194

- Han J., Lee Y., Yeom H. K., Nam W. K., Heo I., Rhee K. J., Sohn Y. S., Cho Y., Zhang T. B., Kim N. V. (2006): Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* **125**, 887-901
- Harbour W. J., Dean C. D. (2000): The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes and Development* **14**, 2393-2409
- Harris S. L., Levine A. J. (2005): The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24**, 2899–2908
- Hinds P. W., Dowdy F. S., Eaton N. E., Arnold A., Weinberg A. R. (1994): Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Cell Biology* **91**, 709-713
- Hwang C. H., Clurman E. B. (2005): Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* **24**, 2776-2786
- Chow H. P. J., Poon C. Y. R., Ma T. H. (2011): Inhibitory phosphorylation of cyclin-dependent kinase 1 as a compensatory mechanism for mitosis exit. *Molecular and Cellular Biology* **31**, 1478-1491
- Jiang M., Milner J. (2002): Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene* **21**, 6041–6048
- Johansson M., Persson J. L. (2008): Cancer therapy: Targeting cell cycle regulators. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **8**, 7
- Kim Y. K., Kim V. N. (2007) Processing of intronic microRNAs. *EMBO* **26**:775–783
- Kim Y. W., Sharpless E. N. (2006): The Regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* **127**, 265-275
- Kimata Y., Baxter E. J., Fry M. A., Yamano H. (2008): A Role for the Fizzy/CDC20 family of proteins in activation of the APC/C distinct from substrate recruitment. *Molecular Cell* **32**, 576- 583
- Kong M., Barnes A. E., Ollendorf V., Donoghue J. D. (2000): Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *The EMBO Journal* **19**, 1378-1388
- Leonard J. N., Schaffer D. V. (2006): Antiviral RNAi therapy: emerging approaches for hitting a moving target. *Gene Ther* **13**, 532–540.
- Lin I. D., Barbash O., Kumar S. G. K., Wever D. J., Harper W. J., Klein-Szanto P. J. A., Rustgi A., Fuchs Y. S., Diehl A. J. (2006): Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF^{FBX4- α B Crystallin} Complex. *Molecular Cell* **24**, 355-366
- Liu J., Carmell M. A., Rivas F. V., Marsden C. G., Thomson J. M. (2004): Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**:1437-1441

- Lolli G., Johnson N. L. (2005): CAK- cyclin-dependent activating kinase: A Key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell cycle* **4**, 567-570
- Lund E., Dahlberg E. J. (2006): Substrate selectivity of Exportin 5 and Dicer in the biogenesis of MicroRNAs. *Cold Spring Harb Symposia on Quantitative Biology* **71**, 59-66
- Ma Z., Wu Y., Jin J., Yan J., Kuang S., Zhou M., Zhang Y., Guo AY. (2013): Phylogenetic analysis reveals the evolution and diversification of cyclins in eukaryotes. *Mol Phylogenet Evol* **66**, 1002–1010
- MacRae I. J., Ma E., Zhou M., Robinson C. V., Doudna J. A. (2008): In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 512- 517
- Malumbres M., Barbacid M. (2005): Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**, 630–641
- Malumbres M. (2014): Cyclin-dependent kinases. *Malumbres Genome Biology* **15**, 122
- Manning G., Whyte DB., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. (2002): The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**,1912–1934
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**, 607-620
- Morgan David O. (1997): CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**, 261-291
- Musacchio A., Salmon D. E. (2007): The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 379-393
- O’connor C. (2008): Stages of Mitosis. *Nature education* **1**, 188
- Pai S. I., Lin Y-Y., Macaes B., Meneshian A., Hung F-C., Wu C-T. (2006): Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Therapy* **13**, 464-477
- Pavletich P N. (1999): Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdk, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors. *Journal of molecular Biology* **287**, 821-828
- Parker S. J., Barford D. (2006): Argonaute: a scaffold for the function of short regulatory RNAs. *Trends in Biochemical Sciences* **31**, 622-630
- Pesin A. J., Orr-Weaver L. T. (2008): Regulation of APC/C Activators in Mitosis and Meiosis. *Annual Reviews Cell and Developmental Biology* **24**, 475-499
- Peters M. J. (2006): The anaphase promoting complex/cyklosome: a machine designed to destroy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 644-656

- Ren S., Rollins J. B. (2004): Cyclin C/CDK3 Promotes Rb-Dependent G₀ Exit. *Cell* **117**, 239-251
- Saini K. H., Griffiths-Jones S., Enright J. A. (2007): Genomic analysis of human microRNA transcripts. *The National Academy of Sciences of the USA* **104**, 17719-17724
- Schwarz D. S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P. D. (2003): Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199-208
- Sharpless E. N. (2005) INK4a/ARF: A multifunctional tumor suppressor locus. *Elsevier* **576**, 22-38
- Sherr J. Ch., Roberts M. J. (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes and Development* **13**, 1501-1512
- Schneider E., Kartarius S., Schuster N., Montenarh M. (2002): The cyclin H/CDK7/Mat1 kinase activity is regulated by CK2 phosphorylation of cyclin H. *Oncogene* **21**, 5031-5037
- Tolentino M. (2006): Interference RNA technology in the treatment of CNV. *Ophthalmol Clin North Am* **19**, 393-399.
- Ullah Z., Lee Y. Ch., DePamphilis L. M. (2009): Cip/Kip cyclin-dependent protein kinase inhibitors and the road to polyploidy. *Cell division* **4**, 10
- van der Krol, Mur A. L., Beld M., Mol N. J., Stuitje R. A. (1990): Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *American Society of Plant Biologists* **2**, 4291-4299
- Vaucheret H., Béclin Ch., Fagard M. (2001): Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Biology* **114**, 3083-3091
- Vodermaier C. H. (2004): APC/C and SCF: Controlling Each Other and the Cell Cycle. *Current Biology* **14**, R787-R796
- Vogelstein B., Kinzler K. W. (2004): Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**, 789-799
- Wang J., Guo F., Chen A., Yang C. (2010): Inhibition of proliferation induced by cyclin D1 gene silencing in human renal carcinoma ACHN cells. *Chin J Cancer Res* **22**, 316-322
- Wang N., Li M., Zang W., Ma Y., Wang Y., Zhao G. (2013): Effects of cyclin E gene silencing on the proliferation of esophageal cancer cell lines, EC9706, Eca109 and KYSE30. *Molecular Medicine Report* **7**, 799-804
- Wang X., Ren J., Qu X. (2008): Targeted RNA interference of cyclin A2 mediated by functionalized single-walled carbon nanotubes induces proliferation arrest and apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells. *ChemMedChem* **3**, 940-945

- Wassenegger M., Heimes S., Riedel L. and Sanger H. L. (1994): RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**, 567-576.
- Welcker M., Singer J., Loeb R. K., Grim J., Bloecher A., Gurien-West M., Clurman E. B., Roberts M. J. (2003): Multisite Phosphorylation by CDK2 and GSK3 Controls cyclin E Degradation. *Molecular cell* **12**,381-392
- Wilson C. R., Doudna A. J. (2013): Molecular Mechanism of RNA Interference. *Annual Review of Biophysics* **42**, 217-239
- Yuan J., Yan R., Kramer A., Eckerdt F., Roller M., Kaufman M., Strebhardt K. (2004): Cyclin B1 depletion inhibits proliferation and includes apoptosis in human tumor cell. *Oncogene* **23**, 5843-5852

9 Seznam symbolů a zkratek

AGO	Argonaut protein
APC/C	anafázi-zprostředkující komplex
bp	pár basí
BrdU	5'-bromo-2'-deoxyuridin
CAK	CDK aktivační kinasa
CDC 20;25	protein buněčného dělení
CDH1	CDC20 homolog 1
CDK	cyklin-dependentní kinasa
CIP/KIP	CDK interagující protein/Kinasový inhibiční protein
CK2	kasein kinasa
CKI	CDK inhibitor
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal region 8
DNA	deoxyribunukleová kyselina
dsRBP	dsRNA-vazebný protein
dsRNA	dvouvláknová RNA
EG5	kinesin 5
Fbw7	F-Box a WD repetice obsahující protein 7
FITC	Fluorescein isothiokyanát
Gsk3 β	glykogensynthasakinasa-3 β
HIV	virus lidské imunodeficiencie
IR	Interferonová odezva
MAPK	mitogn-aktivovaná protein kinasa
MAT1	Menage a trois
MCM	Minichromosome maintenance protein complex
miRNA	jednoduchá mikro RNA
mRNA	mediátorová RNA
Myt1	myelin trnaskripčnífaktor
PARP-1	poly ADP-ribosa polymerasa
PCR	Polymerázová řetězová reakce
piRNA	PIWI intereagující RNA
pre-miRNA	prekurzorová miRNA

pri-miRNA	primární miRNA
PTGS	posttranskripční umlčování genů
Rb	retinoblastomový protein
RISC	RNA-indukovaný umlčující komplex
RNA	ribonukleová kyselina
RNAi	RNA interference
SCF	Skp1/cullin/F-box protein
SDS-PAGE	Denaturující polyakrylamidová gelová elektroforéza
siRNA	krátká interferující RNA
ssRNA	jednovláknová RNA
TBS	Tris-buffered saline
TRBP	TAR-RNA vazebný protein
VIGS	Virem indukované umlčení genu
Wee	Wee1-like proteinkinasa